

Aus der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin  
und dem  
Julius Wolff Institut  
Campus Virchow Klinikum, Berlin

**Analyse des Einflusses des Biomaterialparameters  
„Mikrosteifigkeit“ neuartiger Gelatinescaffolds auf die  
Knochenregeneration in einem Rattendefektmodel**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Veterinärmedizin  
an der  
Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
Michèle Forner, geb. Demel  
Tierärztin aus Berlin

Berlin 2013

Journal-Nr.: 3681

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. G. Duda  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. C. Lischer

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

Rats, animal models, bone fractures, fracture fixation, gelatin, strength, regeneration

Tag der Promotion: 03.11.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

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

ISBN: 978-3-86387-566-4

**Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2014**

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

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

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

This document is protected by copyright law.

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

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2015

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

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

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>1</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>4</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>6</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>8</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>9</b>
<b>2 STAND DES WISSENS</b> .....	<b>10</b>
2.1 KNOCHENAUFBAU .....	10
2.1.1 Makroskopisch .....	10
2.1.2 Mikroskopisch .....	11
2.1.3 Gefäßversorgung.....	13
2.2 KNOCHENARTEN UND KNOCHENENTSTEHUNG .....	13
2.2.1 Knochenarten .....	13
2.2.2 Knochenentstehung .....	15
2.3 KNOCHENHEILUNG .....	16
2.3.1 Primäre (direkte) Knochenheilung .....	16
2.3.2 Sekundäre (indirekte) Knochenheilung.....	17
2.3.3 Störung der Knochenheilung .....	21
2.3.4 Stimulation der Knochenheilung.....	22
2.4 BIOMATERIALIEN/SCAFFOLDS .....	23
2.4.1 Gelatinescaffolds.....	24
2.5 ZIEL DER STUDIE UND HYPOTHESEN.....	25
<b>3 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>27</b>
3.1 VERSUCHSTIERE .....	27
3.1.1 Haltung und Fütterung .....	27
3.1.2 Gruppen .....	27
3.2 MATERIAL .....	28
3.2.1 Gelatinescaffolds.....	28
3.2.2 Spongiosa.....	29
3.2.3 Fixateur externe .....	29
3.3 OPERATIVES VORGEHEN .....	30
3.3.1 Vorbereitung .....	30
3.3.2 Operation .....	30
3.3.3 Nachsorge .....	35
3.3.4 Euthanasie und Probengewinnung .....	35
3.4 MICROCT .....	36
3.4.1 Durchführung.....	36

3.4.2	<i>Auswertung</i> .....	36
3.5	HISTOLOGIE .....	38
3.5.1	<i>Vorbereitung der Proben</i> .....	38
3.5.2	<i>Histologische Färbungen</i> .....	39
3.5.3	<i>Immunhistochemische Färbungen</i> .....	42
3.5.4	<i>Auswertung</i> .....	44
3.6	STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	51
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	<b>52</b>
4.1	OPERATIONSBEFUNDE .....	52
4.2	RADIOLOGISCHE ERGEBNISSE .....	53
4.2.1	<i>Röntgenbilder</i> .....	53
4.2.2	<i>MicroCT</i> .....	54
4.3	HISTOLOGISCHE ERGEBNISSE .....	60
4.3.1	<i>Deskriptive Histologie</i> .....	60
4.3.2	<i>Histomorphometrie</i> .....	68
4.3.3	<i>Messung des Osteotomiespaltes</i> .....	69
4.3.4	<i>AlphaSMA-Färbung</i> .....	74
4.3.5	<i>TRAP-Färbung</i> .....	78
4.3.6	<i>Kollagen I Schwein-Färbung</i> .....	81
4.4	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE .....	84
4.4.1	<i>Radiologie</i> .....	84
4.4.2	<i>Deskriptive Histologie</i> .....	84
4.4.3	<i>Histomorphometrische Auswertung</i> .....	85
4.4.4	<i>AlphaSMA-Färbung</i> .....	86
4.4.5	<i>TRAP-Färbung</i> .....	86
4.4.6	<i>Kollagen I Schwein-Färbung</i> .....	86
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	<b>87</b>
5.1	MATERIAL UND METHODEN .....	87
5.1.1	<i>Versuchstiere</i> .....	87
5.1.2	<i>Versuchsaufbau</i> .....	88
5.1.3	<i>Entnahme und Aufarbeitung der Proben</i> .....	91
5.1.4	<i>Radiologische Untersuchungen</i> .....	91
5.1.5	<i>Histomorphometrie</i> .....	92
5.1.6	<i>Histologie</i> .....	93
5.2	ERGEBNISSE .....	94
5.2.1	<i>Operationsbefunde</i> .....	94
5.2.2	<i>Radiologische Ergebnisse</i> .....	94
5.2.3	<i>Histologische Ergebnisse</i> .....	96
5.3	VERGLEICH MIT ANDEREN STUDIEN .....	100
5.4	SCHLUSSFOLGERUNG .....	102
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>104</b>

<b>7</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>105</b>
<b>8</b>	<b>LITERATUR.....</b>	<b>106</b>
	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>114</b>
	<b>SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG .....</b>	<b>115</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Complex
AP	Alkaline Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMU	Basic Multicellular Units
BV	Bone Volume
ca.	Circa
° C	Grad Celcius
cm	Zentimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikcentimeter
CT	Computertomographie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
engl.	englisch
et al.	et alii
Fa.	Firma
g	Gramm
HA	Hydroxylapatit
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
kg	Kilogramm
kPa	Kilopascal
kV	Kilovolt
L	Liter
LDI	2,6 Diisocyanat-L-Lysin-Ethylester
M.	Musculus
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
ms	Millisekunde
µA	Microampere
µm	Micrometer
n	Anzahl
N	Newton
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEEK	Polyetheretherketon
RNA	Ribonucleic acid
ROI	Region Of Interest
SEM	Scanning Electron Microscope
SMA	Smooth Musle Actin
TMC	Tissue Mineral Content
TMD	Tissue Mineral Density
TRAP	Tartrat-Resistant Acid Phosphatase

Tr.	Tropfen
TV	Total Volume
VOI	Volume Of Interest
vol%	Volumenprozent
z.B.	zum Beispiel
2D	zweidimensional
3D	dreidimensioal
%	Prozent

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung der Formstabilität und Elastizität der Gelatinescaffold. ....	29
Abb. 2: Foto von der Operation (1). ....	32
Abb. 3: Foto von der Operation (2). ....	32
Abb. 4: Foto von der Operation (3). ....	33
Abb. 5: Foto von der Operation (4). ....	33
Abb. 6: Foto von der Operation (5). ....	34
Abb. 7 und 8: Fotos von der Operation (6/7). ....	34
Abb. 9: Ratte im MicroCT-Tierbett. ....	37
Abb. 10: Darstellung MicroCT-Auswertung. ....	37
Abb. 11: 3D-Darstellung des Kallus im MicroCT. ....	38
Abb. 12: Femurosteotomie in der Übersicht/ Longitudinalschnitt (Movat Pentachrom-Färbung). ....	48
Abb. 13 + 14: Ansicht ROI und farbliche Markierung der Osteoklasten (TRAP-Färbung). ...	48
Abb. 15 : Schematische Darstellung immunhistochemischer Färbungen. ....	49
Abb. 16 und 17: Ansicht ROI und farbliche Markierung der Gefäße (AlphaSMA-Färbung). 49	
Abb. 18 und 19: Übersicht der Kollagen 1 Schwein-Färbung und Deklaration. ....	50
Abb. 20 und 21: Darstellung der ROI in Movat Pentachrom-Färbung und schematisch. ....	50
Abb. 22: Darstellung der Messung der Osteotomiespaltgröße(Movat Pentachrom-Färbung). 51	
Abb. 23: Foto: Ratten wenige Tage nach der Operation. ....	52
Abb. 24 und 25: Röntgenbilder Gelatinescaffoldgruppe 2. ....	53
Abb. 26: Röntgenbild Spongiosakontrollgruppe. ....	54
Abb. 27: TV in mm <sup>3</sup> nach zwei, vier, sechs Wochen und in vitro. ....	57
Abb. 28: BV in mm <sup>3</sup> nach zwei, vier, sechs Wochen und in vitro. ....	58
Abb. 29: TMC in mg nach zwei, vier, sechs Wochen und in vitro. ....	58
Abb. 30: BV/TV nach zwei, vier, sechs Wochen und in vitro. ....	59

---

Abb. 31: TMD in mg HA/cm <sup>3</sup> nach zwei, vier, sechs Wochen und in vitro.....	59
Abb. 32: Übersicht der Femurosteotomie eines Tieres der Gelatinescaffoldgruppe 1 (Movat Pentachrom-Färbung).....	63
Abb. 33: Ansicht der Kortikalisränder (Movat Pentachrom-Färbung). ....	64
Abb. 34: Ansicht des endostalen Kallus (Movat Pentachrom-Färbung).....	64
Abb. 35: Inaktive Osteoblasten am knöchernen Kallus (Movat Pentachrom-Färbung). ....	65
Abb. 36: Aktive Osteoblasten am knöchernen Kallus (Movat Pentachrom-Färbung). ....	65
Abb. 37: Osteoklast an Spongiosa (Movat Pentachrom-Färbung).....	66
Abb. 38: Abgerundeter knöcherner Kallus (Movat Pentachrom-Färbung).....	66
Abb. 39: Knorpelige Überbrückung des Osteotomiespaltes (Movat Pentachrom-Färbung). ..	67
Abb. 40: Knorpelgewebe, Ausschnitt aus Abb. 39 (Movat Pentachrom-Färbung). ....	67
Abb. 41: Spongiosatransplantat im Osteotomiespalt (Movat Pentachrom-Färbung). ....	68
Abb. 42: Diagramm mit Callus Area. ....	70
Abb. 43: Diagramm mit Bone Area. ....	70
Abb. 44: Diagramm mit Cartilage Area. ....	71
Abb. 45: Diagramm mit Connective Tissue Area. ....	71
Abb. 46: Diagramm mit Muscle Area. ....	72
Abb. 47: Diagramm Osteotomiespaltgröße. ....	74
Abb. 48 und 49: Diagramme Blutgefäßdichte und absolute Blutgefäßanzahl. ....	76
Abb. 50: Diagramm Gefäßverteilung (periostal ,endostal). ....	76
Abb. 51: Positiv gefärbte Blutgefäße (alphaSMA-Färbung). ....	77
Abb. 52: Diagramm absolute Anzahl der Osteoklasten. ....	79
Abb. 53: Diagramm Osteoklastendichte. ....	80
Abb. 54: Positiv gefärbte Osteoklasten (TRAP-Färbung). ....	81
Abb. 55: Diagramm Kollagenfläche. ....	82
Abb. 56: Positiv gefärbtes Kollagen (Kollagen 1 Schwein-Färbung).....	83
Abb. 57: Diagramm Kallusbestandteile der drei Gruppen. ....	85

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Gruppenübersicht .....	27
Tabelle 2: Ergebnisse MicroCT-Messungen.....	60
Tabelle 3: Ergebnisse histomorphometrische Messungen. ....	73
Tabelle 4: Ergebnisse Osteotomiespaltmessung.....	74
Tabelle 5: Ergebnisse der Blutgefäßzählung.....	77
Tabelle 6: Ergebnisse der Osteoklastenzählung.....	80
Tabelle 7: Ergebnisse Kollagen 1 Schwein Färbung. ....	83

# 1 Einleitung

Die Knochenheilung ist ein sehr komplexer Vorgang, bei der, im Gegensatz zu anderen Geweben, die Reparation nicht zur Bildung einer Narbe führt, sondern in einer kompletten Rekonstruktion der ursprünglichen Struktur, Funktion und Belastbarkeit mündet (McKibbin, 1978). Besonders die Heilung größerer Defekte langer Röhrenknochen über mehrere Zentimeter bis Dezimeter ist dabei meist langwierig und nicht immer erfolgreich. Bei zehn bis 20 Prozent aller Frakturen kommt es zu Heilungsstörungen (Haas, 2000). Mathon et al. (1998) kamen zu dem Schluss, dass eine diaphysäre Fraktur mit einer Defektgröße über 140 Prozent des Knochendurchmessers „natürlich“ und ohne ärztliche Intervention nicht heilt. Diese Frakturen werden auch als Defekte kritischer Größe (engl.: critical size defect) bezeichnet. Der aktuelle Goldstandard zur Behandlung dieser Defekte ist die Transplantation von körpereigenem spongiösem Knochengewebe in den Defekt, auch Autograft genannt (Jäger et al., 2005a). Das Spongiosatransplantat wirkt dabei als Leitgerüst für sich neubildende Blutgefäße und Stammzellen (osteokonduktiv), es stimuliert über Wachstumsfaktoren direkt die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen (osteoinduktiv) und es enthält vitale Zellen, die sich zu knochenbildenden Zellen differenzieren können (osteogen) (Babhulkar et al., 2005; Einhorn, 1995; Gazdag et al., 1995; Jäger et al., 2005a). Die Methode birgt jedoch auch viele Nachteile, wie die begrenzte Verfügbarkeit des Materials und eine relativ hohe Entnahmemorbidity (Rompe et al., 2004). Bei einem Misserfolg ist die Wiederholung der Operation meist nicht möglich. Eine Alternative zum Autograft ist das Allograft. Dabei handelt es sich um tiefgefrorenen körperfremden Spenderknochen. Allerdings gibt es dabei zusätzliche Nachteile, wie die Gefahr von Krankheitsübertragung (HIV, Hepatitis C) oder eine erhöhte Gefahr der immunologischen Abstoßung des Transplantats. Zusätzlich besitzen die Allografts durch die Gefriertrocknung eine im Vergleich zu den Autografts niedrigere biologische Aktivität (Jäger et al., 2005a; Ma et al., 2004). Als Alternative stehen Knochenersatzmaterialien/Füllmaterialien, sogenannte Scaffolds, im Fokus der Wissenschaft. Diese sollen die Defekte füllen und als osteokonduktives Medium dienen. In den letzten Jahren wurden diverse neue Materialien entwickelt. Die mechanischen Eigenschaften, die physikalischen und chemischen Charakteristika wurden dabei stetig verbessert (Neffe et al., 2007). Dabei ist es besonders wichtig, die mechanischen Eigenschaften der Scaffolds für die Knochenheilung optimal anzupassen. In *in vitro* Studien wurde die Wichtigkeit der Mikrosteifigkeit (Elastizitätsmodulus in kPa), als Widerstand den eine Zelle fühlt, wenn sie an die extrazelluläre Matrix bindet, belegt. Mesenchymale Stammzellen, die einer steiferen extrazellulären Matrix ausgesetzt waren, differenzierten zu osteogenen Zellen, wohingegen Stammzellen, die in Kontakt mit einer weicheren Matrix waren, zu den Vorläuferzellen des Gewebes differenzierten, das dem weicheren Elastizitätsmodulus entsprach (Chatterjee et al., 2010; Engler et al., 2006; Huebsch et al., 2010; Lutolf et al., 2009). In dieser Studie soll die Auswirkung der Mikrosteifigkeit nun erstmals auch *in vivo* untersucht werden. Dafür wurden im Helmholtz Zentrum Geesthacht zwei Gelatinescaffolds, die sich in ihren mechanischen Eigenschaften nur in ihrer Mikrosteifigkeit unterschieden, entwickelt und im Julius Wolff Institut in einen kritischen Knochendefekt am Rattenfemur implantiert. Die Effekte auf die Knochenheilung wurden nach sechs Wochen radiologisch, histologisch, immunhistochemisch und histomorphometrisch untersucht. Als Positivkontrolle diente der aktuelle Goldstandard, die Behandlung mit einem Spongiosatransplantat.

## 2 Stand des Wissens

### 2.1 Knochenaufbau

Neben der Zahnschmelze (Dentin) ist das Knochengewebe der härteste Baubestandteil des Körpers (Pschyrembel, 1998). Es dient als Gerüst einerseits dem Schutz der Weichteile und inneren Organe und ermöglicht durch Befestigung von Sehnen, Bändern und Muskeln andererseits die Bewegung. Zusätzlich stellen Knochen ein Reservoir für Kalzium und Phosphor dar und sind somit an der Regulation des Serumkalziumspiegels beteiligt (Remedios 1999; Trostle et al 1996). Knochen ist kein totes Gewebe sondern befindet sich lebenslang in einem Auf-, Ab- und Umbau (Remedios, 1999). Dieser Prozess wird Remodeling genannt (Noble et al., 2000). Die Dynamik dieses immerwährenden Remodelings passt sich nicht allein physiologischen Kreisläufen an, sondern kann auch auf abweichende Belastungen reagieren (Trostle et al., 1996).

#### 2.1.1 Makroskopisch

Knochen lassen sich nach Form und Größe unterscheiden. Es gibt platte Knochen (z.B. Schulterblatt, Darmbein), kurze Knochen (z.B. Wirbelknochen) und lange Röhrenknochen (z.B. Oberschenkel, Oberarm, weitere Knochen der Extremitäten). Schneidet man diese Knochen längs auf, so erkennt man verschiedene Knochenstrukturen (Schiebler, 1986) - oberflächlich, eine homogene, kompakte Schicht (Substantia compacta) und darunter eine schwammähnliche Schicht aus kleinen Knochenbälkchen (Substantia spongiosa). Es besteht bei den drei Knochenarten ein deutlicher Unterschied in Ausdehnung von der Substantia compacta und der Substantia spongiosa (Liebich, 1999). Platte und kurze Knochen bestehen aus einer dünnen Substantia compacta, die ein mit Substantia spongiosa gefülltes Hohlraumssystem umschließt (Schiebler, 1986). Röhrenknochen bestehen aus einem Knochenkörper oder auch Knochenschaft (Diaphyse). Diesem schließen sich zu beiden Enden die Metaphysen und abschließend die Epiphysen an (Liebich, 1999). Die Diaphyse besteht aus einer dicken Substantia compacta. Im inneren liegt eine schmale Substantia spongiosa direkt an. Zu den Metaphysen und Epiphysen hin verjüngt sich die Substantia compacta und liegt nur noch dünn der hier sehr ausgeprägten Substantia spongiosa auf (Liebich, 1999; Schiebler, 1986). Diese Verteilung hat besondere Vorteile. Der spongiöse Knochen ist flexibler als der kompakte Knochen und kann durch seine poröse Struktur viel Energie absorbieren bevor er bricht (Trostle et al., 1996). Der kompakte Knochen des Knochenschaftes gibt dem langen Röhrenknochen die benötigte Steifigkeit (Radasch, 1999). Die Diaphyse ist das wichtigste Element für die Tragfähigkeit des Knochens (Schweiberer et al., 1999). Zusätzlich sind die Epiphysen verbreitert. Somit wird die Belastung, die auf die Oberflächen der Gelenke einwirkt, auf einen großen Querschnitt verteilt (Trostle et al., 1996). Die Metaphysen dienen während der Knochenentwicklung als Epiphysenfugen dem Längenwachstum (Junqueira et al., 2002). Im inneren der langen Röhrenknochen befindet sich der Markraum. Er beinhaltet Blut- und Lymphgefäße, rotes Knochenmark und hämatopoetische Zellen (Remedios, 1999). Mit zunehmendem Alter wird das Knochenmark durch Fettmark verdrängt. Bei Bedarf ist die Umwandlung jedoch reversibel (Bucher et al., 1997). Ohne den Markraum, mit seiner elastischen Verformbarkeit, könnten die

Röhrenknochen starken Belastungen nicht standhalten (Schweiberer et al., 1999). Bis auf wenige Ausnahmen (Gelenkflächen, Ansätze von Sehnen und Bändern, Sesambeine) umgibt die Knochenhaut (Periost) den gesamten Knochen (Remedios, 1999). Sie besteht aus derben kollagenen Bindegewebsfasern, Blutgefäßen und Nerven. Über kollagene Fasern, auch Sharpeysche Fasern genannt, ist das Periost im Knochen verankert und bildet somit das Bindeglied zwischen Weichteilen und dem Knochen (Schweiberer et al., 1999; Webb et al., 2000). Das Periost ist an sämtlichen Knochenumbauvorgängen beteiligt (Junqueira et al., 2002). Die Innenauskleidung des Knochens bildet das Endost. Es besteht aus abgeflachten fibroblastenähnlichen Vorläuferzellen ohne bindegewebige Komponente (Kalfas, 2001; Webb et al., 2000). Genau wie das Periost besitzt das Endost osteogene Eigenschaften. Es ist in der Lage Knochengewebe neu zu bilden (Junqueira et al., 2002).

### **2.1.2 Mikroskopisch**

Unabhängig von der Knochenart setzt sich das Knochengewebe aus einer Knochengrundsubstanz, der Matrix, und den Knochenzellen zusammen. Die Matrix besteht dabei zu 30 Prozent aus organischen und zu 70 Prozent aus anorganischen Bestandteilen (Remedios, 1999). Kollagen bildet mit 95 Prozent den Hauptbestandteil der organischen Matrix wobei Kollagenfasern vom Typ 1 dominieren (Wang et al., 2002). Weitere Bestandteile der organischen Matrix sind Proteoglykane und Glykosaminoglykane, welche die ungeformte Grundsubstanz bilden (Liebich, 1999). Die anorganische Matrix besteht hauptsächlich (ca. 80 Prozent) aus Kalzium und Phosphat in Form von in Hydroxylapatit gebundenen Kristallen. Außerdem sind Karbonate, Natrium, Magnesium und Eisen enthalten. Die organische Matrix stellt ein strukturelles Grundgerüst (Kristallisationskern) dar, an der sich die Mineralien als dreidimensionales Gitterwerk anlagern können (Li et al., 2006; Remedios, 1999; Webb, 2000). Zusätzlich verleiht sie dem Gewebe seine mechanischen Eigenschaften, bindet Zellen und beeinflusst deren Proliferation und Differenzierung (Schweiberer et al., 1999). Den zellulären Anteil bilden Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten (Liebich, 1999).

#### ***Osteoblasten***

Osteoblasten sind 20-30 µm große Zellen mit einem runden Zellkern. Sie sind sehr plasmareich und besitzen basophile Eigenschaften. Sie entstehen aus undifferenzierten Mesenchymzellen des Knochenmarks, des Endosts und der inneren Schicht des Periosts (Remedios, 1999; Webb et al., 2000). Sie können sich nicht mehr durch Zellteilung vermehren (McKibbin, 1978), sondern müssen über die undifferenzierten Mesenchymzellen nachproduziert werden. Sie sind an der Knochenoberfläche nach Art eines einschichtigen Epithels angeordnet. Im aktiven Zustand sind die Osteoblasten kubisch und besitzen gut ausgebildete Zellorganellen. Im inaktiven Zustand werden die Zellen flacher und spindelförmig und werden als bone lining cells oder Belegzellen bezeichnet. Diese inaktiven Osteoblasten liegen zum Beispiel auf Knochenoberflächen, nachdem die Knochenheilung abgeschlossen ist. Sie behalten lebenslang ihr osteogenes Potential (Liebich 1999; Noble et al., 2000; Schiebler, 1986; Schweiberer et al., 1999). Die Osteoblasten produzieren die organische Matrix, das Osteoid, bestehend aus Kollagenen und Proteoglykanen und steuern die Mineralisation unter anderem durch Abgabe des Enzyms Alkalische Phosphatase. In wenigen Tagen produzieren sie das zwei- bis vierfache ihres Volumens an extrazellulärer

Matrix (Remedios, 1999; Schweiberer et al., 1999). Dabei bilden sie pro Tag einen ca. 0,7-1,2 µm breiten Osteoidsaum (Noble et al., 2000). Etwa zehn Prozent der Osteoblasten werden vollständig eingemauert und dann als Osteozyten bezeichnet (Bonewald, 2002; Noble et al., 2000; Remedios, 1999).

### ***Osteozyten***

Osteozyten sind reife Knochenzellen, die aus Osteoblasten entstehen (Kalfas, 2001; Liebich, 1999). Sie enthalten weniger Zellplasma und Zellorganellen als die Osteoblasten, was auf eine verminderte Syntheseaktivität hinweist. Sie bilden den größten Anteil aller Zellen im Knochen und liegen abgeflacht in Knochenhöhlen, den Lakunen (Remedios, 1999). Über zahlreiche zytoplasmatische Fortsätze, die radiär durch Kanälchen innerhalb der Knochenmatrix verlaufen, kommunizieren die Osteozyten mit anderen Osteozyten, aber auch mit Osteoblasten und Osteoklasten. So nehmen sie an der Modulation und Regulation der Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität teil und organisieren damit dem Knochenauf- und Umbau (Bonewald, 2007; Liebich, 1999). Zudem sind sie an der Kalzium- und Phosphorhomöostase beteiligt (Webb et al., 2000). Desweiteren dienen die Kanälchen dem Transport von Nährstoffen und Ionen aus der extrazellulären Flüssigkeit und den Blutgefäßen zu den Zellen (Noble et al., 2000; Remedios, 1999; Trostle et al., 1996).

### ***Osteoklasten***

Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen. Sie haben zwei bis maximal 100 Zellkerne pro Zelle und werden bis zu 100 µm groß (Amling et al., 1996; Li et al., 2006; Liebich, 1999). Zusätzlich besitzen sie viele Zellorganellen, unter anderem zahlreiche Lysosomen. Diese bilden die Grundlage für die positive Reaktion auf Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP-Reaktion), welche eine Unterscheidung zwischen Osteoklasten und anderen mehrkernigen Riesenzellen ermöglicht (Remedios, 1999). Osteoklasten sind in der Lage sich amöboid fortzubewegen. Ihre Lebenserwartung reicht von wenigen Tagen (Owen, 1970) bis zu sechs Wochen (Liebich, 1999). Osteoklasten bedecken nur etwa ein Prozent der gesamten Knochenoberfläche und stellen somit eine sehr kleine Zellpopulation dar (Amling et al., 1996). Sie entstehen aus hämatopoetischen Stammzellen und besitzen mit Monozyten und Makrophagen eine gemeinsame Vorläuferzelle. Aus dieser Vorläuferzelle bilden sich einkernige Osteoklastenprogenitorzellen, die sich dann durch den Kontakt mit Osteoblasten und der Matrix zu Präosteoklasten entwickeln (Klaushofer et al., 1994). Die einzelnen Präosteoklasten fusionieren und bilden die mehrkernigen Osteoklasten (Amling et al., 1996). Als knochenabbauende Zellen befinden sich Osteoklasten auf der Knochenoberfläche in sogenannten Howship Lakunen. Diese entstehen durch die Resorptionstätigkeit der Osteoklasten (Schiebler 1986). Die Zellen haben an der dem Knochen zugewandten Oberfläche fingerförmige Zellausstülpungen (ruffled border) an denen der Knochenabbau stattfindet. Ein Osteoklast kann pro Zeitintervall etwa dreimal so viel Knochen abbauen, wie ein Osteoblast aufbaut (Liebich, 1999; Remedios, 1999; Schell et al., 2006). Nach Beendigung der Resorption an einer Stelle des Knochens lösen sich die Osteoklasten ab und wandern zur nächsten Resorptionsstelle. Dort beginnen sie erneut mit dem Knochenabbau (Liebich, 1999).

### 2.1.3 Gefäßversorgung

Die Blutversorgung der Knochen besteht aus drei Systemen. Man unterscheidet ein afferentes (arterielles), ein efferentes (venöses) und ein gemischtes (metaphysäres) System (Rhineland, 1974). Das afferente Blutsystem beginnt mit der Versorgungsarterie (A. nutritiva), die aus dem Hauptgefäß abzweigt. Sie durchdringt die Kortikalis der Diaphyse, gelangt in den Markraum und teilt sich dort in auf- und absteigende Arterien auf. Diese Arterien verzweigen sich wiederum zu kleineren Arteriolen, die erneut die Kortikalis von innen durchbrechen und in die Havers'schen Blutgefäße münden. Diese bilden das Kapillarsystem des Knochens. So werden die inneren Anteile des diaphysären Knochens versorgt (Remedios, 1999). Der äußere Teil wird durch periostale Arteriolen versorgt. An der Grenze kommt es zu arterioarteriellen Anastomosen (Nakanishi et al., 1999). Die Havers'schen Gefäße versorgen die einzelnen Osteone und stehen durch sogenannte Volkmann Gefäße miteinander in Verbindung. Sie verlaufen vom Periost und Endost ausgehend, senkrecht zu den Zentralkanälen der Osteone in Volkmann Kanälen (Liebich, 1999). Desweiteren gibt es zahlreiche metaphyseale Arterien, welche distal und proximal in die Markhöhle eindringen und sich mit den medullären Arteriolen vereinigen (Rhineland, 1974). Ist der Knochen gesund, spielen die metaphysealen Arterien keine große Rolle in der Versorgung des Knochens (Remedios, 1999). Jedoch haben sie große Bedeutung, wenn die nutritive Arterie aufgrund einer Fraktur oder anderer Umstände zerstört ist. Dann kann die Versorgung des Knochens über eben diese Gefäße aufrecht erhalten werden. Das efferente System transportiert das venöse Blut nach außen. Dabei münden in der Markhöhle zahlreiche Venolen in größere Venen, welche zu einer großen Markvene zusammenfließen. Kortikale Venolen verbinden sich mit periostalen Venolen, die das Blut in die systemischen Gefäße abgeben (Rhineland, 1974). Dadurch werden Kortikalis und Markraum getrennt entsorgt (Remedios, 1999). Da der intramedulläre Druck höher ist als der periostale Druck, ist der arterielle Blutfluss im Knochen zentrifugal, das heißt von innen nach außen gerichtet. Der venöse Abfluss hingegen verläuft zentripetal, das heißt von außen nach innen (Remedios, 1999).

## 2.2 Knochenarten und Knochenentstehung

### 2.2.1 Knochenarten

Nach dem histologischen Aufbau können drei Knochenarten unterschieden werden: Der einfachere Geflecht- oder Faserknochen, der komplizierter strukturierte Lamellenknochen und der kombinierte plexiforme Knochen (Liebich, 1999; Martin et al., 1998).

#### *Geflechtknochen*

Geflechtknochen ist die einfachste Art des Knochengewebes. Er wird vor allem während der embryonalen Entwicklung angelegt, jedoch später den mechanischen Erfordernissen entsprechend in den stabileren Lamellenknochen umgewandelt. Beim Erwachsenen gibt es ihn nur noch in der dentalen Alveole, in einigen Bereichen der Schädel- und Gesichtsknochen, sowie an Ansatzflächen starker Sehnen am Knochen. Zusätzlich wird Geflechtknochen auch überall dort entwickelt, wo über einen längeren Zeitraum starke Zug-

Druck- und/oder Scherkräfte herrschen, oder wo Knochen schnell rekonstruiert werden muss, zum Beispiel bei Knochenbrüchen. Denn die Bildung von Geflechtknochen verläuft sehr viel schneller als die von Lamellenknochen. Typisch für diese Knochenart ist das Fehlen einer einheitlichen Verlaufsrichtung und Struktur der Kollagenfasern, der Knochen trabekel und auch der Osteozyten. Dadurch ist er zwar flexibler, aber auch instabiler als Lamellenknochen (Liebich, 1999; Noble et al., 2000; Schiebler, 1986; Trostle et al., 1996).

### ***Lamellenknochen***

Lamellenknochen ist die Knochenart, die im erwachsenen Individuum am häufigsten vorkommt (Noble et al., 2000). Er entsteht durch indirekte Ossifikation wesentlich langsamer als Geflechtknochen (Noble et al., 2000). Typisch ist die Organisation der Kollagenfasern, die, anders als beim Geflechtknochen, entsprechend der auf sie einwirkenden Kräfte regelmäßig und ausgerichtet angeordnet sind (Schiebler, 1986). Die Grundeinheit des Lamellenknochens bildet das Osteon (Webb et al., 2000). Im Zentrum wird jedes Osteon von einem 20 bis 30 µm großen Zentralkanal, dem Havers-Kanal durchzogen. In diesen verlaufen Blutgefäße (Havers- Gefäße), Lymphgefäße und Nervenfasern (Liebich, 1999; Trostle et al., 1996). Dieses System wird nach seinem Entdecker, dem englischen Anatom Clapton Havers, als Havers-System bezeichnet (Weiner et al., 1998). Die Havers'schen Kanäle versorgen die Osteozyten, welche in Lakunen in den Lamellen liegen. Die Osteozyten sind über ihre zytoplasmatischen Ausläufer untereinander und mit dem Zentralkanal verbunden. Die Havers-Kanäle stehen miteinander über sogenannte Volkmann-Kanäle, welche die Knochenlamellen quer durchbohren, in Verbindung (Remedios, 1999; Trostle et al., 1996; Weyrauch et al., 1998). Die Osteone bestehen aus fünf bis 20 Lamellen, den Speziallamellen, wobei jede Lamelle ca. 4 µm bis 10 µm dick ist und sie sind parallel zur Längsachse des Röhrenknochens angeordnet (Schiebler, 1986; Schweiberer et al., 1999). Die Speziallamellen bestehen aus Kollagenfasern und mineralisierter Matrix. Die Verlaufsrichtung der Kollagenfasern ändert sich dabei von Lamelle zu Lamelle. Außerdem scheren aus jeder Lamelle einzelne Fasern aus und treten in die benachbarten Lamellen über. Daraus resultiert ein Lamellenverbund (Junqueira et al., 2002). Dieses Bauprinzip ermöglicht eine hohe Resistenz gegenüber Belastungen (Liebich, 1999). Jedes Osteon ist von einer Zementlinie umgeben und somit von anderen Osteonen und Lamellen getrennt. Diese Zementlinie besteht vor allem aus Glykosaminoglykanen und stellt die Schwachstelle der Mikroarchitektur des Knochens dar (Trostle et al., 1996). Zurückgebildete und teilweise abgebaute Osteone werden als Schaltlamellen bezeichnet. Sie liegen zwischen den intakten Osteonen und füllen die Zwischenräume aus (Schiebler, 1986). Schließlich bilden die Grundlamellen die äußere und innere Abschlusschicht und umschließen den Knochen. Die äußere Grundlamelle bietet dabei unter anderem die Ansatzflächen für die oben beschriebenen Sharpeyschen Fasern (Schiebler, 1986, Schweiberer et al., 1999).

### ***Plexiformer Knochen***

Plexiformer Knochen stellt eine Kombination aus Geflecht- und Lamellenknochen dar. Er bildet sich schneller als lamellärer Knochen und besitzt im Vergleich zum Geflechtknochen eine höhere mechanische Stabilität über einen langen Zeitraum. Plexiformer Knochen entsteht aus Mineralisationskernen, die erst perpendikulär und dann parallel zur Knochenoberfläche wachsen. Dies verursacht eine typische ziegelartige Struktur. Aufgrund dieser Organisation bietet er eine große Oberfläche, an der neuer Knochen sehr schnell geformt werden kann.

Dadurch erzielt dieser Knochen innerhalb eines kurzen Zeitraums eine hohe Festigkeit und Steifigkeit, was vor allem bei großen und schnell wachsenden Tieren wie Schafen und Kühen mit hohen Knochenumbauraten von Bedeutung ist. Allerdings ist er durch seine hohe Steifigkeit anfälliger für Brüche und wird daher in aktiveren Spezies, wie dem Menschen, eher selten gesehen (Martin et al., 1998).

### **2.2.2 Knochenentstehung**

Knochengewebe kann auf zwei verschiedene Arten entstehen. Einerseits durch die sogenannte desmale oder direkte Ossifikation, bei der eine Mineralisierung der von Osteoblasten sezernierten Matrix stattfindet. Andererseits durch die enchondrale oder indirekte Ossifikation, bei der der Knochen über den Ersatz von Knorpelmatrix entsteht. Bei beiden Arten wird zuerst Geflechtknochen gebildet, der dann zumeist durch Lamellenknochen ersetzt wird (Junqueira et al., 2002).

#### ***Desmale (direkte) Ossifikation***

Bei der desmalen Ossifikation gibt es primäre Ossifikationszentren, welche in verdichtetem mesenchymalen Gewebe entstehen. In diesen Ossifikationszentren bilden sich direkt aus undifferenzierten Mesenchymzellen osteogenetische Stammzellen und daraus Osteoblasten. Diese produzieren Kollagene, dessen Fibrillen sich ungeordnet bündeln und durchflechten. (Junqueira et al., 2002; Trostle et al., 1996; Weiner et al., 1998). Es kommt zur Bildung von Osteoid, welches nach wenigen Tagen verkalkt. Dies führt zur Einmauerung der Osteoblasten und zur Bildung von Knochenbälkchen. Dazwischen sprossen neue Gefäße und es wandern weitere Stammzellen ein und differenzieren zu Osteoblasten. Die verschiedenen Ossifikationszentren wachsen und verschmelzen letztendlich miteinander und ersetzen somit das ursprüngliche Bindegewebe. Der so entstandene Knochen ist der Geflechtknochen. Die Entstehung des Knochengewebes über die desmale Ossifikation gehört nicht nur zu den wesentlichen Prozessen der embryonalen Knochenentwicklung, sondern ist unter anderem auch Bestandteil der indirekten Knochenheilung (Junqueira et al., 2002).

#### ***Enchondrale (indirekte) Ossifikation***

Bei der enchondralen Ossifikation bildet sich zunächst ausgehend von einer Mesenchymverdichtung ein Modell des Knochens aus hyalinem Knorpel. Die folgende eigentliche enchondrale Ossifikation lässt sich in zwei Phasen einteilen. In der ersten Phase hypertrophieren die Chondrozyten des Modells, gehen zu Grunde und hinterlassen Lakunen. In der zweiten Phase proliferieren Gefäße und es wandern Stammzellen ein, aus denen sich Osteoblasten entwickeln. Diese bilden Knochenmatrix und überziehen damit die übrig gebliebene Knorpelstruktur (Junqueira et al., 2002). Da die enchondrale Ossifikation besonders für Röhrenknochen charakteristisch ist (Schiebler, 1986), wird sie folgend am Beispiel der langen Röhrenknochen genauer beschrieben.

Die Knorpelmodelle für lange Röhrenknochen bestehen aus einem zylinderförmigen Schaft (Diaphyse) mit Auftreibungen an jedem Ende (Epiphyse). Sie sind vom Perichondrium überzogen. Durch desmale Ossifikation bildet sich zuallererst Knochengewebe innerhalb des

Perichondriums. Es entsteht ein hohler Knochenzylinder, der den Knorpel umgibt. Von da an wird das Perichondrium als Periost bezeichnet, da es den neu gebildeten Knochen bedeckt (Junqueira et al., 2002). Die so von der Versorgung durch Diffusion abgetrennten Knorpelzellen unterhalb der Knochenmanschette hypertrophieren und es entsteht der Blasenknorpel. Entsprechend der Druck- und Zugverhältnisse ordnen sich die Chondrozyten in Richtung der Epiphyse säulenförmig an und es entsteht der Säulenknorpel (Schnorr, 2006). Dann verkalkt die Knorpelmatrix durch die Einlagerung von Mineralsalzen und die degenerierten Knorpelzellen sterben ab. Es dringen Blutgefäße ein und mit ihnen Chondroklasten und mesenchymale Stammzellen. Die Chondroklasten bauen den verkalkten Knorpel ab und die Stammzellen differenzieren zu Osteoblasten. Diese synthetisieren Knochenmatrix und es bildet sich an den Resten der verkalkten Knorpelmatrix Geflechtknochen. Die periostale Knochenmanschette wächst in Richtung der Epiphysen, wobei gleichzeitig knöchernes Material im Zentrum des Knochens durch Osteoklasten abgebaut wird. Dadurch entsteht die Knochenmarkshöhle. Am Ende bleibt nur noch an zwei Stellen Knorpel übrig: an den Gelenken (Gelenkknorpel), der lebenslang besteht, sowie an den Epiphysen (Epiphysenfuge), der Epiphyse und Diaphyse miteinander verbindet. Im Laufe des Wachstums wird die Epiphysenfuge durch Knochen ersetzt und letztendlich geschlossen. Danach findet kein Längenwachstum mehr statt (Junqueira et al., 2002). Die enchondrale Ossifikation ist auch Bestandteil der Knochenheilung. Wie folgend noch genauer beschrieben, wird der knorpelige Kallus zunächst durch Geflechtknochen und dann durch Lamellenknochen ersetzt (Bucher et al., 1997).

## 2.3 Knochenheilung

Knochengewebe kann nur bis zu einem gewissen Maß einwirkende Kräfte absorbieren. Dabei ist die Grenze abhängig von Volumen und Biegesteifigkeit des Knochens. Übersteigt die auftreffende Energiemenge die Absorptionskraft des Knochens, bricht er (Brighton, 1984; Rüter et al., 1999). Bei der entstehenden Fraktur wird nicht nur der Knochen, sondern auch das umliegende Gewebe, wie Periost, Gefäße und Muskeln, geschädigt. Die Frakturheilung ist ein sehr komplexer Vorgang, der im Gegensatz zu Reparationsvorgängen anderer Geweben nicht zur Bildung einer Narbe führt, sondern in einer kompletten Rekonstruktion der ursprünglichen Struktur, Funktion und Belastbarkeit mündet. Die Heilung der Fraktur kann direkt (primär) oder indirekt (sekundär) erfolgen. Dies ist abhängig von Art und Ausmaß, aber auch von der Stabilisierung der Fraktur (Einhorn, 1998; Klaushofer et al., 1994; McKibbin, 1978; Trostle et al., 1996). Die primäre Knochenheilung geht ohne Bildung eines Fixationskallus einher. Bei der sekundären Knochenheilung hingegen befindet sich interfragmentäres Stützgewebe (Kallus) im Frakturspalt (Schenk, 1975; Stürmer, 1996).

### 2.3.1 Primäre (direkte) Knochenheilung

Die Voraussetzung für eine primäre oder direkte Knochenheilung ist die unmittelbare Nähe der Knochenfragmente zueinander (Klaushofer et al., 1994). Zudem sind eine anatomisch korrekte Position und stabile Fixation der Frakturrenden eine wichtige Bedingung (Braun et al., 1996; Schweiberer et al., 1999). Ebenso wichtig ist eine intakte und ausreichende Vaskularisierung im Frakturgebiet (Braun et al., 1996; Rhineland, 1974). Die Heilungsvorgänge laufen fast ausschließlich in der Kortikalis ab. Daher wird diese Form der

Knochenheilung auch kortikale Heilung genannt. Jedoch wird selbst unter günstigen Bedingungen nie ein Flächenkontakt über den gesamten Querschnitt der Knochenenden erreicht. Somit liegen Kontaktzonen und Spalträume nebeneinander. Daher wird die primäre Knochenheilung nochmals in eine Kontaktheilung und eine Spaltheilung unterteilt (Schenk, 1975).

### ***Kontaktheilung***

Bei der Kontaktheilung liegen die Knochenenden direkt aneinander, sodass das Eindringen von Blutgefäßen und Gewebeelementen nicht möglich ist (Willenegger et al., 1971). Die Fragmentenden werden direkt durch den Aufbau neuer Havers'scher Systeme verbunden (Braun et al., 1996). Durch Osteoklasten wird zunächst avitales Knochengewebe abgebaut und es entstehen Resorptionskanäle, die auch in das benachbarte Fragment einwachsen. Diese Resorptionshöhlen weisen eine Kegelform auf, weswegen man auch von einer sogenannten Verzapfung der Fragmente spricht (Braun et al., 1996; Mann et al., 1989; Schweiberer et al., 1999). In diese Kanäle dringen anschließend Blutkapillaren und mit ihnen mesenchymale Stammzellen ein. Die Stammzellen differenzieren sich zu Osteoblasten. Diese kleiden die Resorptionskanäle aus und füllen ihn mit neuem Lamellenknochen (Einhorn, 1998).

### ***Spaltheilung***

Bei der Spaltheilung liegen die Fragmentenden nicht direkt aneinander, sondern es besteht ein Spalt zwischen 0,01 mm und 0,05 mm. Somit können direkt periostale und endostale Blutkapillaren einsprossen. Damit verbunden ist eine perivaskuläre Migration mesenchymaler Stammzellen (Lane, 1998; Schenk, 1975). Diese differenzieren sich wieder zu Osteoblasten und synthetisieren neuen Lamellenknochen. Da die als Leitstruktur dienenden Blutgefäße in transversaler Richtung in den Frakturspalt einwachsen, bilden sich die neuen Knochenlamellen vorerst senkrecht zur Längsachse des Knochens. Dieses Regenerat verbindet zunächst die Knochenenden, entspricht jedoch noch nicht dem ursprünglichen Aufbau der Kortikalis. Entsprechend der oben beschriebenen Kontaktheilung werden anschließend diese quer verlaufenden Knochenlamellen durchbrochen und durch längsaxial ausgerichtete Osteone ersetzt. Es tritt kein endostaler oder periostaler Kallus auf (Mann et al., 1989; Schenk, 1975).

Die primäre Knochenheilung stellt eigentlich keine gezielte Reparatur dar, sondern ist vielmehr Teil des normalen, zeitlebens stattfindenden Knochenumbaus (McKibbin, 1978). Im Vergleich zur sekundären Form tritt die primäre Form der Knochenheilung wesentlich seltener auf, da sie nur unter absolut stabiler Osteosynthese möglich ist (Stürmer, 1996).

### **2.3.2 Sekundäre (indirekte) Knochenheilung**

Die meisten Frakturen heilen sekundär (Einhorn, 1998). Die sekundäre Knochenheilung kommt zum Einsatz, wenn der Defekt größer als 0,5 mm oder die Fraktur nicht ausreichend stabil ist, wodurch es zu einer Unruhe zwischen den Fragmenten kommt. Dies wird vor allem bei der konservativen Frakturbehandlung, aber auch bei nicht ausreichend stabilen Osteosynthesen, wie der Marknagelung oder dem Fixateur extern, gesehen (Klaushofer et al.,

1994; Stürmer, 1996). Die Kallusbildung, als charakteristisches Ereignis, findet periostal, endostal und interfragmentär statt und auch das umliegende Weichgewebe ist entscheidend für die Heilung (Einhorn, 1998). Histologisch lässt sich der Heilungsverlauf in mehrere Phasen einteilen. Einige Autoren beschreiben vier Phasen (Brighton, 1984; Cruess et al., 1975; Owen, 1970), andere teilen die sekundäre Frakturheilung in fünf Phasen ein (Braun et al., 1996; Klaushofer et al., 1994; Noble et al., 2000), wobei dann das Frakturereignis selbst als erste Phase definiert wird. Es treten somit folgende Phasen auf: Phase der Fraktur, Entzündungsphase, Phase des weichen Kallus, Phase des harten Kallus und Remodeling-Phase (Braun et al., 1996; Brighton, 1984; Cruess et al., 1975; Owen, 1970). Diese Phasen finden jedoch nicht streng nacheinander statt. Sie verlaufen vielmehr parallel und überlappend (Cruess et al., 1975; Remedios, 1999).

### ***Phase der Fraktur***

Die Phase der Fraktur dauert vom Beginn der Krafteinwirkung bis zu dem Moment, an dem die gesamte Energie durch den Knochen und das umliegende Gewebe aufgenommen ist. Dies geschieht im Zeitraum von Sekunden. Dabei werden Form, Ausmaß und Schwere der Fraktur festgelegt (Braun et al., 1996).

### ***Entzündungsphase***

Die Entzündungsphase schließt sich direkt der Fraktur an (Remedios, 1999). Sie dauert nach Braun et al. (1996) und Brighton (1984) ein bis drei Tage, nach Simmons (1985) fünf Tage und nach Klaushofer et al. (1994) bis zu sieben Tage. Durch das Trauma wird nicht nur der Knochen zerstört, sondern auch das ihn umgebende Periost, Weichteilgewebe und dessen Gefäße (Cruess et al., 1975). Es kommt zu Blutungen im Frakturgebiet und zur Ausbildung eines Hämatoms (McKibbin, 1978; Rhinelander, 1974). Auch die Knochenkanälchen der Enden der Knochenfragmente werden zerstört. Die so von ihrer Versorgung abgeschnittenen Osteozyten sterben ab und setzen dabei lysosomale Enzyme frei, die zum Abbau der organischen Matrix beitragen. Die Frakturenenden werden nekrotisch und haben somit nur eine passive Rolle in der Knochenheilung. Osteoklasten beginnen aktiv mit der Resorption des toten Knochengewebes. Die Gewebstrümmer des Knochens und der Weichteile lösen akute entzündliche Reaktionen aus, wobei diverse Entzündungsmediatoren in das Frakturgebiet geflutet werden (McKibbin, 1978; Remedios, 1999). Sie führen zunächst zu einer Vasodilatation, um eine verbesserte Sauerstoffversorgung der umliegenden Zellen zu gewährleisten und die Immigration neuer Zellen aus dem Endothel und dem Blutstrom zu steigern (Braun et al., 1996). Als erste Leukozyten wandern neutrophile Granulozyten in den Frakturbereich (Brighton, 1984). Diese sollen eventuell eingedrungene Bakterien beseitigen (Trostle et al., 1994), jedoch sehen einige Autoren ihre Hauptfunktion auch in der Sekretion zahlreicher Zytokine, die in der Frühphase der Heilung die Regulation der Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen leiten (Webb et al., 2000). Als nächstes migrieren Monozyten, die sich zu Makrophagen differenzieren und zusammen mit Lymphozyten Zelltrümmer und Bakterien entfernen. Zusätzlich sezernieren sie angiogenesestimulierende Faktoren (Probst et al., 1997; Remedios, 1999; Trostle et al., 1996). Desweiteren wandern multipotente Stammzellen in das Frakturgebiet ein, welche Osteoblastenvorläufer darstellen (Braun et al., 1996). Das Frakturhämatom ist nicht nur Quelle zahlreicher Entzündungsmediatoren, sondern verleiht der Fraktur auch ein gewisses Maß an Stabilität. Die Aggregation der Zellen resultiert in der Koagulation des Hämatoms

und es entsteht durch Einwirkung von Fibroblasten ein lockeres Fibrinnetz. Dieses verbindet die Knochenfragmente und ist somit eine erste Stabilisierung der Fraktur (Bucher et al., 1997; Remedios et al., 1999; Trostle et al., 1996). Die durch Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren gesteigerte Angiogenese ist ein wichtiger Faktor der Heilung (Rhineland, 1974). Die neuen Blutgefäße stammen aus dem Periost, dem Muskelgewebe oder dem Markraum. Sie nutzen für die Einsprossung die Fibrinfäden aus dem Hämatom als Leitschienen. Eine gute Gefäßversorgung ist für den heilenden Knochen sehr wichtig, da es sich um einen sehr stoffwechselaktiven Vorgang handelt (Cruess et al., 1975; Stürmer, 1996). Das ursprüngliche Hämatom bleibt nicht lange bestehen. Durch Makrophagen und Osteoklasten werden das Hämatom und Gewebstrümmer abgebaut und die Bruchränder geglättet (Bucher, 1997). Der zunächst niedrige pH-Wert im Hämatom unterstützt die Proliferation und Differenzierung der Zellen. Er verändert sich im Laufe der Heilung über neutral zu leicht alkalisch. Dieses alkalische Milieu ist bedeutsam für die spätere Mineralisation (Cruess et al., 1975). Schon in der sehr frühen Phase der Heilung können Mineralisationsherde zwischen den Kollagenfibrillenbündeln nachgewiesen werden (Brighton, 1984). Klinisch stellt sich die Entzündungsphase durch Schmerzen und Schwellungen im Frakturbereich dar. Das Abklingen dieser Zeichen kennzeichnet den fließenden Übergang von der Entzündungsphase zur Granulationsphase (Braun et al., 1996; Brighton, 1984).

### ***Phase des weichen Kallus***

Die Phase des weichen Kallus oder auch Granulationsphase schließt sich der Entzündungsphase an und dauert zwei (Braun et al., 1996; Frost, 1989; Klaushofer et al., 1994) bis drei (Braun et al., 1996, Brighton, 1984) Wochen. Das Frakturhämatom wird schrittweise durch Granulationsgewebe, bestehend aus Entzündungszellen, Fibroblasten, Kollagen und eingewanderten Kapillaren, ersetzt und organisiert (Klaushofer et al., 1994). Fibroblasten bilden extrazelluläre Matrix und füllen damit den interfragmentären Spalt aus (Braun et al., 1996). Fibrinreste werden über phagozytierende Makrophagen abgebaut (Brighton, 1984). Avitales Knochengewebe wird durch Osteoklasten resorbiert und vorhandene Restprodukte durch Makrophagen phagozytiert. Charakteristisch für die Granulationsphase ist der enorme Zuwachs an Blutgefäßen und massenhafte Proliferation und Einwanderung von mesenchymalen Stammzellen. Die Vaskularisierung erreicht dabei ca. zwei Wochen nach dem Trauma ihren Höhepunkt mit Werten bis zum sechsfachen der Norm. Die mesenchymalen Stammzellen entstammen aus dem Periost und Endost und differenzieren je nach mechanischer Situation, Sauerstoffspannung und Frakturspaltgröße, zu Fibroblasten, Chondroblasten oder Osteoblasten (Braun et al., 1996; Klaushofer et al., 1994). Da die Sauerstoffversorgung an den Frakturrenden in dieser frühen Phase noch nicht ausreichend ist, differenzieren sich dort vorwiegend Chondroblasten und es wird eine enchondrale Knochenbildung vorbereitet (Einhorn, 1998; Lane, 1998). Eine ausreichende Sauerstoffversorgung führt zur Ausbildung von Bindegewebe (Palmer et al., 1992; Willenegger et al., 1971). Dabei dient das Fibrinnetz und die durch Fibroblasten neugebildeten Kollagenfibrillen des Frakturhämatoms als Leitgerüst für die chondrogenen und osteogenen Zellen (Braun et al., 1996; Schweiberer et al., 1999). Es entsteht so innerhalb von zwei bis drei Wochen entlang der Leitstruktur der sogenannte weiche Kallus. Er ist eine erste Überbrückung der Frakturrenden und besteht aus hyalinem Knorpel und Bindegewebe (Braun et al., 1996). Dabei bildet sich das Knorpelgewebe weniger interfragmentär sondern eher periostal. Dadurch entsteht zunächst eine noch weiche Kallusmanschette um die Fraktur (Brighton, 1984). Die Größe des Kallus ist direkt abhängig vom Grad der Stabilität. Je größer

die Bewegung, desto größer ist auch der entstehende Kallus (Palmer et al., 1992). Neben der oben beschriebenen initialen enchondrale Knochenentwicklung an den Frakturenden vollzieht sich zeitgleich an der Oberfläche der frakturfernen Knochendiaphyse der Aufbau von Geflechtknochen über desmale Knochenentwicklung (Einhorn, 1998; Schweiberer et al., 1999). Die Granulationsphase endet, wenn die Frakturfragmente über Knorpel oder Bindegewebe miteinander verbunden sind (Brighton, 1984).

### ***Phase des harten Kallus***

Nachdem die Vereinigung der Knochenfragmente über den weichen Kallus abgeschlossen ist, beginnt die Phase des harten Kallus oder die Kallushärtung. Dies ist nötig, da die mechanischen Eigenschaften des weichen Kallus nicht ausreichen, die Bewegungen im Frakturspalt so zu verringern, dass das Überleben der Osteoblasten möglich ist (Braun et al., 1996; Brighton, 1984). Es kommt durch zunehmende Mineralisierung der Grundsubstanz und des Knorpelgewebes zur Aushärtung des Kallus und zur zunehmenden Stabilisierung der Fraktur (Klaushofer et al., 1994). Die Grundsubstanz des hyalinen Knorpels wird dabei von Chondroblasten gebildet, die sich nach und nach selbst einmauern. Sind sie vollständig von Knorpelmatrix umgeben, differenzieren sie zu Chondrozyten (Liebich, 1999). Durch die dadurch entstandene hypoxische Situation degenerieren die Chondrozyten nach einiger Zeit und entlassen dabei Proteasen und Phosphatasen. Diese spalten Phosphat-Ionen und durch Präzipitation mit ebenso freiwerdenden Kalzium-Ionen entstehen Mineralsalze. Die Matrix kalzifiziert (Einhorn, 1998). Anschließend dringen Blutgefäße aus dem Periost, dem Endost und dem Markraum in die mineralisierte Matrix ein und mit ihnen viele mesenchymale Stammzellen. Diese differenzieren zu Osteoblasten. Durch die anschließende enchondrale Ossifikation wird das mineralisierte Gewebe durch Geflechtknochen ersetzt. Zudem beginnen die gleichzeitig in das Gewebe gelangten Chondroklasten mit dem Abbau des mineralisierten Knorpels (Brighton, 1984; Einhorn, 1998). Dieser Vorgang dauert beim Menschen drei bis vier Monate (Braun et al., 1996; Brighton, 1984). Der Geflechtknochen ist dreidimensional und richtet sich bei seiner Orientierung nicht entlang der mechanischen Beanspruchung, sondern entlang der ihn ernährenden Kapillaren (Braun et al., 1996). Die Phase des harten Kallus endet, wenn die Fraktur klinisch und radiologisch geheilt ist (Brighton, 1984). Die zuvor beschriebenen Vorgänge im Frakturgebiet machen deutlich, dass die Phasen der Frakturheilung nicht isoliert und chronologisch ablaufen, sondern vielmehr als einander überlappende Phasen zu sehen sind (McKibbin, 1978).

### ***Remodeling***

Als letzte Phase der Knochenheilung schließt sich das Remodeling an. Es kann Monate bis mehrere Jahre in Anspruch nehmen (Braun et al., 1996; Brighton, 1984; Kalfas, 2001). Dabei wird der zuvor gebildete ungerichtete Geflechtknochen, der nur eine vorsichtige mechanische Belastung toleriert, in regelmäßigen Lamellenknochen umgebaut (Brighton, 1984; Klaushofer et al., 1994). Zudem wird überschüssiger knöcherner Kallus abgebaut (Cruess et al., 1975). Das Ziel des Remodelings ist die ursprüngliche Knochenstruktur wiederherzustellen. Dies geschieht durch sogenannte Basic Multicellular Units (BMUs). Sie bestehen aus Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten und Blutkapillaren und befinden sich in sämtlichen Knochenbereichen, wie unter dem Periost, den Gefäßkanälen und im Markraum (Braun et al., 1996; Klaushofer et al., 1994; Noble et al., 2000). Die Osteoklasten bauen zunächst den Geflechtknochen ab. Anschließend sprossen Blutkapillaren in die entstandenen Hohlräume.

Diese transportieren perivaskulär mesenchymale Stammzellen aus denen sich Osteoblasten differenzieren. Die Osteoblasten produzieren neuen Lamellenknochen. Die so gebildeten Osteone werden entsprechend der mechanischen Belastung longitudinal ausgerichtet. Anschließend wird überschüssiges oder schlecht platziertes Material resorbiert. Die Markhöhle entsteht dabei auf gleiche Weise, nämlich durch Entfernung des endostalen Kallus durch Osteoklasten (Cruess et al., 1975, Frost, 1989). Diese Zyklen von Aktivierung, Resorption und Neubildung laufen stereotyp ab und dauern drei bis vier Monate pro BMU. Der vollständige Umbau des Kallus zu funktionsfähigen Lamellenknochen umfasst einen Zeitraum von ein bis vier Jahren (Frost, 1989; Klaushofer et al., 1994). Es wird vermutet, dass das Remodeling durch elektrische Signale reguliert wird, welche durch mechanische Kräfte, die auf den Knochen einwirken, entstehen. Dabei besitzen konvexe Oberflächen für Osteoklasten stimulierende elektropositive Signale, wohingegen konkave Oberflächen durch ihr elektronegatives Signal eher attraktiv für Osteoblasten sind. Es finden demnach an konvexen knöchernen Oberflächen resorptive Vorgänge statt, wohingegen an konkaven Oberflächen Knochen angelagert wird (Cruess et al., 1975; Trostle et al., 1996). Diese Kopplung an die mechanische Belastung bestimmt die Form des neugebildeten Knochens. Dabei muss dieser nicht unbedingt seine ursprüngliche anatomische Form zurückerhalten, sollte sich die mechanische Situation verändert haben (Cruess et al., 1975; Probst et al., 1997). Das Remodeling auf Basis der BMUs findet nicht nur während der Knochenheilung, sondern lebenslang auch an gesundem Knochen statt. Dabei verläuft der Prozess jedoch wesentlich langsamer und in geringerem Umfang (Klaushofer et al., 1994).

### 2.3.3 Störung der Knochenheilung

Defekte langer Röhrenknochen können verschiedene Ursachen haben. Zum Beispiel kann die Resektion von größeren Knochenfragmenten nach einem Trauma, bei Knochentumoren oder Knochenzysten notwendig werden. Ziel einer Defektbehandlung ist die völlige Wiederherstellung der Funktion der Gliedmaße in möglichst kurzer Zeit. Dazu sollte die Knochenheilung komplikationslos verlaufen (Runkel et al., 2000). Jedoch treten bei zehn bis 20 Prozent aller Frakturen Heilungsstörungen auf (Haas, 2000). Fehlende Gefäßversorgung, Instabilität zum falschen Zeitpunkt und ein mangelnder Kontakt der Knochenfragmente stellen unter anderem wichtige Ursachen der gestörten Frakturheilung dar (Stürmer, 1996). Außerdem kann es am frakturierten Knochen zu Infektionen und/oder Nekrosen kommen, was wiederum dazu führen kann, dass große Knochenbereiche entfernt werden müssen. Auch die Verlagerung von Weichteilen, besonders Muskeln, in den Frakturspalt können die knöchernen Überbrückung verhindern (Runkel et al., 2000). Ist die Fraktur nach vier bis sechs Monaten noch nicht überbrückt, so spricht man von einer verzögerten Knochenheilung (delayed union). Ist der Knochen auch nach acht Monaten noch nicht klinisch und radiologisch geheilt, spricht man von einer nonunion oder Pseudarthrose (Runkel et al., 2000). Besonders die Heilung und Überbrückung größerer Defekte über mehrere Zentimeter bis Dezimeter ist meist langwierig und nicht immer erfolgreich. Die Studie von Mathon et al. (1998) kommt zu dem Schluss, dass eine diaphysäre Fraktur mit einer Defektgröße von über 140 Prozent des Knochendurchmessers auf natürlichem Weg und ohne ärztliche Intervention nicht heilt. Diese Frakturen werden auch als Defekte kritischer Größe (engl.: critical size defect) bezeichnet.

### 2.3.4 Stimulation der Knochenheilung

Die Therapie von Knochendefekten besteht einerseits aus einer stabilisierenden Osteosynthese und andererseits aus dem Wiederaufbau des fehlenden Knochengewebes. Dieser Aufbau kann unterstützt werden. Der momentane Goldstandard ist die Transplantation von körpereigenem Knochengewebe, auch Autograft genannt (Jäger et al., 2005a). Dabei wird der Defekt meist mit spongiösem Knochen aus dem Beckenkamm versorgt, was in der Regel zu guten Heilungsergebnissen führt. Das Spongiosatransplantat wirkt dabei als Leitgerüst für sich neubildende Blutgefäße und Stammzellen (osteokonduktiv), es stimuliert direkt die Differenzierung von Osteoprogenitoren (osteoinduktiv) und es enthält vitale Zellen, die sich zu knochenbildenden Zellen differenzieren können (osteogen) (Babhulkar et al., 2005; Einhorn, 1995; Gazdag et al., 1995; Jäger et al., 2005a). Die Nachteile dieser Methode sind unter anderem die begrenzte Verfügbarkeit des Materials, was besonders bei sehr großen oder mehreren Defekten eine Rolle spielt. Außerdem gibt es eine relativ hohe Entnahmemorbidität von sechs bis zu 20 Prozent (Rompe et al., 2004). Es handelt sich hierbei um nachteilige Effekte an der Entnahmestelle wie ein zusätzlicher Knochendefekt mit möglichem erneuten Frakturen, Hämatombildung, eine erhöhte Infektionsgefahr und die Gefahr von Nervenschädigungen sowie eine verlängerte Operationszeit mit höherem Narkoserisiko und postoperative persistierende Schmerzen (Arrington et al., 1996; Jäger et al., 2005a). Dies führt zu einem längeren Krankenhausaufenthalt und Unbehaglichkeit der Patienten (Banwart et al., 1995). Desweiteren besteht die Möglichkeit von verfrühten Resorptionserscheinungen oder Brüchen des Transplantats. Bei einem Misserfolg ist die Wiederholung der Operation aus oben genannten Gründen meist nicht möglich. Eine Alternative zum Autograft ist das Allograft. Dabei handelt es sich um tiefgefrorenen körperfremden Spenderknochen. Allerdings gibt es hier noch zusätzliche Nachteile, wie die Gefahr von Krankheitsübertragung (HIV, Hepatitis C) oder eine erhöhte Gefahr der immunologischen Abstoßung des Transplantats. Zusätzlich besitzen die Allografts durch die Gefriertrocknung eine im Vergleich zu den Autografts niedrigere biologische Aktivität (Jäger et al., 2005a; Ma et al., 2004).

Abgesehen vom Knochentransplantat gibt es zwei weitere Ansätze die Heilung kritischer Knochendefekte zu beschleunigen. Zum einem werden feste Füllmaterialien (Scaffolds) eingesetzt. Sie können je nach Material und Eigenschaft osteokonduktiv und/oder osteoinduktiv wirken. Es kommen sowohl organische Stoffe, wie Kollagene verschiedener Spezies, demineralisierte Knochenmatrix oder resorbierbare Polymere, als auch anorganische Stoffe, wie Kalziumsulfat oder Keramiken aus Trikalziumphosphat und Hydroxyapatit, zum Einsatz (Einhorn, 1995). Der Nachteil in der alleinigen Verwendung der Knochenersatzmaterialien ist ihr Mangel an osteogenen Faktoren (Petite et al., 2000).

Zum anderen wird die Heilung durch Verwendung humoraler Faktoren oder Transplantation von Stammzellen unterstützt. Diese sind allerdings wiederum meist auf Trägermaterialien (Scaffolds) angewiesen. Wachstumshormone wie BMP2 und BMP7 befinden sich bereits in klinischer Anwendung, jedoch sind sie zurzeit noch sehr teuer und als Nebenwirkung kann es zu ektopten Verknöcherungen in umliegenden Geweben kommen (Connolly, 1998; Gautschi et al., 2007; Jäger et al., 2005a; Sahibzada et al., 2005). Aufgrund der genannten Nachteile der derzeit üblichen Verfahren war in den vergangenen Jahren die Erforschung effizienter und minimal invasiver Therapiemöglichkeiten ein wichtiges Ziel der osteoregenerativen Wissenschaft.

## 2.4 Biomaterialien/Scaffolds

Biomaterialien, die für die Knochenheilung eingesetzt werden, sollten bestimmte Kriterien erfüllen. Die Biokompatibilität ist dabei eine wichtige Eigenschaft des Biomaterials und bestimmt dessen Bestehen im Gewebe (Cen et al., 2008). Optimalerweise sollte es nach Wochen bis Monaten im Körper abgebaut und sukzessive durch neues Knochengewebe ersetzt sein, ohne selbst stoffwechselaktiv oder gar toxisch zu wirken. Desweiteren sollte es so verformbar sein, dass es der Größe und Form des Defektes auch intraoperativ angepasst werden kann. Die Oberfläche dieser Materialien muss die Adhäsion, Proliferation und Differenzierung von Zellen des Empfängerbettes erlauben (Arnold et al., 2002). Außerdem sollten es der mechanischen Belastung durch Gewicht und Bewegung, zumindest anfangs, standhalten können (Einhorn, 1995). Es ist bekannt, dass der Transport von Nährstoffen und Sauerstoff in die Fraktur ein sehr wichtiger Prozess während der Heilung ist. *In vitro* und *in silicio* Untersuchungen haben den Zusammenhang zwischen zyklischer Kompression (zum Beispiel Druck auf den Frakturspalt während des Laufens) und Flüssigkeitstransport gezeigt (Op Den Buijs et al., 2010; Swartz et al., 2007; Urciuolo et al., 2008). Vermutlich hängt dies mit dem aktiven Flüssigkeitstransport während der Muskelkontraktion und der damit verbundenen Spannung des Gewebes zusammen. Als Konsequenz muss ein Scaffoldbiomaterial Flüssigkeitstransporte unter Druckveränderungen ermöglichen, wie es die natürliche extrazelluläre Matrix tut. Daher sollten die makromechanischen Eigenschaften des Scaffolds eine beträchtliche Kompression erlauben. Von diesem Standpunkt aus ist ein weniger steifes (weniger festes) Material zu bevorzugen, idealerweise kombiniert mit einer hohen Porosität und verbundenen Porenstruktur (Willie et al., 2010).

In den letzten Jahren wurden diverse neue Materialien entwickelt. Die mechanischen Eigenschaften, die physikalischen und chemischen Charakteristika sowie die Kontrolle der Porenmorphologie, der Oberflächentopographie und der Oberflächenfunktion wurden dabei stetig verbessert (Neffe et al., 2007). Bei der Entwicklung temporärer Implantate (Scaffolds) ist neben der Verträglichkeit des Materials mit lebendem Gewebe (Biokompatibilität) und den mechanischen Eigenschaften auch wichtig, eine gezielte Resorption einstellen zu können, um den Heilungsverlauf zu verbessern. Ein optimaler Scaffold muss verschiedene mechanische Stimuli anbieten, die unabhängig voneinander zugeschnitten werden können. Das Material muss unter physiologischen Bedingungen formstabil sein. Wichtig sind auch poröse Strukturen in denen Zellen und Gefäße einwachsen können. (Luetzow et al., 2007). Die Scaffoldoberfläche soll passend für Zellanheftung sein und die Zelldifferenzierung und Proliferation fördern. Außerdem soll der biokompatible Abbau des Scaffolds passend und in Synchronisation mit der Formation neuen Gewebes ablaufen (Ma, 2004). Verschiedene osteokonduktive Materialien wie Polymere (Gugala et al., 2002) oder Keramiken (Park et al., 2009) wurden entwickelt. Sie besitzen allerdings diverse Nachteile wie unerwünschte Entzündungsreaktionen sowie keine gezielte Anpassbarkeit. Außerdem lassen sich die einzelnen mechanischen Eigenschaften nicht unabhängig einstellen (Shastri et al., 2009). Zusätzlich sind die Keramiken meist zu porös, um den auf sie einwirkenden Kompressionen standzuhalten, wodurch sie oftmals brechen (Bruder et al., 1998). Bisher wurden die Biomaterialien hauptsächlich als Trägermaterialien für lösliche humorale Faktoren oder Stammzellen verwendet, wobei sie für die kontrollierte Freisetzung der jeweiligen Substanz sorgten oder als temporäres Füllmaterial dienten (Hench et al., 2002; Lutolf et al., 2003). In vergleichbaren Studien führten degradierbare Biomaterialien allein nicht zu den gewünschten

Erfolgen bei der Knochenregeneration (Hench et al., 2002; Hench, 1980; Levi et al., 2010; Mastrogiacomo et al., 2007; Petite et al., 2000; Tu et al., 2009; Zou et al., 2011).

### 2.4.1 Gelatinescaffolds

In diesem Projekt werden neuartige Gelatinescaffolds auf ihre Potenz, die Knochenheilung zu stimulieren, getestet. Sie sind im Institut für Polymerforschung, Helmholtz Zentrum Geesthacht entwickelt und auf ihre mechanischen und *in vitro* Eigenschaften getestet worden. Gelatine ist ein tierisches Polypeptid, welches aus Bindegewebe gewonnen wird. Die natürliche Zusammensetzung stellt einen Vorteil gegenüber synthetischen Materialien dar, da die in der Gelatine enthaltenen Proteine auch natürlicherweise im Frakturhämatom vorkommen und somit im Rahmen der Knochenregeneration durch körpereigene Proteasen vergleichsweise einfach abgebaut werden können (Weiss et al., 2005). Dieses Material kann eine Verbindung mit dem umgebenden Gewebe eingehen, was das Wachstum von Zellen ermöglicht, ohne als Fremdmaterial angegriffen zu werden. Damit wird die immunologische Antwort minimiert. Gelatine wird aus Kollagen durch Denaturierung und partielle Hydrolyse hergestellt. Da sie bei 37°C wasserlöslich, einfach abbaubar, wenig immunogen und zytotoxisch ist und bereits eine Zulassung in der Medizin als Gerinnungshemmer hat, ist sie als Biomaterial besonders gut geeignet. Zur Herstellung der Gelatinescaffolds wurde Gelatine in einer wässrigen Lösung auf 45°C erwärmt und unter Zusatz von einem Poloxamer (Pluronic® F-108) stark verquirlt und aufgeschäumt. Die Stabilisation des Scaffolds wurde durch die Zugabe einer Vernetzungsflüssigkeit (2,6-Diisocyanat-L-Lysin-Ethylester, LDI) erreicht. Durch den Zusatz der Vernetzungsflüssigkeit LDI wurde die Selbstorganisation der Gelatineketten zu Triplehelices behindert und es entstanden formbare Gelatinefilme. In Wasser, als Reaktionsmedium, erlaubte dies das Einstellen von bestimmten mechanischen Eigenschaften durch zum Beispiel Variation der Vernetzungsflüssigkeit oder Gelatinekonzentration. Die Mikrosteifigkeit (die Steifigkeit, die eine Zelle fühlt, wenn sie an das Material andockt) sinkt mit steigendem LDI Gehalt. Die makroskopische Steifigkeit (die Steifigkeit, die das Material einer Kompression entgegensetzt) hängt von der Gelatinekonzentration ab, ist aber unabhängig vom LDI (Draye et al., 1998; Dreesmann et al., 2007; Zohuriaan-Mehr et al., 2009). Die Scaffoldzusammensetzung und Scaffoldmorphologie und damit verschiedene Bioparameter wie Steifigkeit und Porosität können beinahe beliebig variiert werden (Neffe et al., 2007). Die Scaffoldmorphologie kann unabhängig von der Scaffoldzusammensetzung konstruiert werden. Es lassen sich für das Zellwachstum geeignete Porengrößen von 115 bis 150 µm und Interkonnektivitäten von 40 bis 50 µm herstellen. Die Porosität steigt mit sinkender Gelatinekonzentration. So kann der Einfluss verschiedener Parameter auf die Knochenheilung gezielt untersucht und in Zukunft möglicherweise individuell je nach Einsatzort angepasst werden. Die Scaffolds können mit Ethylenoxid sterilisiert werden. Sie können im feuchten Zustand auf die erforderliche Größe zugeschnitten und somit im Operationssaal je nach dargestelltem Defekt angepasst werden. Außerdem sind sie im trockenen Zustand nicht scharfkantig, was ein Problem bei den bisher eingesetzten Kollagenschwämmen war und teilweise zu Weichteilschäden während der Implantation geführt hat. Zudem sind sie im feuchten Zustand formstabil und bleiben somit an ihrem vorgesehenen Platz. Sie zeigten in *in vitro* Versuchen keine Zytotoxizität. Ein optimales Umfeld für die Knochenheilung wird durch das gezielte Zuschneiden der mechanischen Eigenschaften der Porenwände geschaffen, wobei Konzepte aus der Stammzellforschung übernommen wurden (Chatterjee et al., 2010; Engler et al., 2006; Gilbert et al., 2010; Huebsch et al., 2010; Lutolf et al., 2009).

Für dieses Projekt wurden zwei Scaffolds verwendet, die sich in ihrer Zusammensetzung und Steifigkeit unterschieden. Beide Scaffolds hatten eine Gelatinekonzentration von zehn Prozent. Bei dem Gelatinescaffold 1 war ein Überschuss von 8 mol LDI und bei dem Gelatinescaffold 2 ein Überschuss von 3 mol LDI vorhanden. Der Gelatinescaffold 1 hatte eine Mikrosteifigkeit von ca. 100 kPa und der Gelatinescaffold 2 eine Mikrosteifigkeit von ca. 1200 kPa. Die anderen Parameter wie Porosität, Porengröße, Dichte und Makrosteifigkeit waren annähernd identisch. Der einzige Unterschied zwischen den Scaffolds bestand somit in der Mikrosteifigkeit. Die Scaffolds waren in *in vitro* Untersuchungen nach ca. sechs bis zehn Wochen vollständig abgebaut. Die Porengröße veränderte sich während der Degradation. Dies wurde durch das Helmholtz Zentrum Geesthacht in gefriergetrockneten Scaffolds mit einem SEM gemessen. Die durchschnittliche Porengröße stieg mit zunehmendem Abbau der Scaffolds an. Die schnelle Degradation des Materials mit dabei wachsenden Porengrößen soll die Knochenentwicklung leiten. Mit den kleineren Poren zu Beginn wird die Adhäsion der Zellen gefördert, während das Einwandern der Zellen, der neuen Blutgefäße und die Knochenformation durch größere Poren und damit einer größeren Oberfläche und Interkonnektivität unterstützt wird (Lee et al., 2008; Murphy et al., 2010; O'Brien et al., 2005). In weiteren *in vitro* Zellkultur-Untersuchungen des Helmholtz Zentrums an den Scaffolds wurde eine größere Zelldichte an den weicheren Wänden des Gelatinescaffolds 1 beobachtet, allerdings wurde keine Differenzierung während der ersten neun Tage gesehen. In einem osteoinduktiven Zellmedium wurden Differenzierungen in osteogene Stammzellen induziert. Dabei differenzierten mehr Zellen an dem Scaffold mit der höheren Mikrosteifigkeit (Gelatinescaffold 2) in die osteogene Richtung, als an dem Scaffold mit der niedrigeren Mikrosteifigkeit (Gelatinescaffold 1). In dieser Studie soll die Knochenregeneration nur durch ein Biomaterial allein verbessert werden. Durch die Förderung der Infiltration von Stammzellen, dem Bereitstellen eines optimalen Umfeldes für Zelldifferenzierung und Knochenformation sowie eine möglichst schnelle Degradation des Biomaterials proportional zur Knochenentwicklung, wird die Regeneration besonders in der frühen Phase der Heilung unterstützt (Claes et al., 2012).

## 2.5 Ziel der Studie und Hypothesen

Ziel dieser Studie ist es, den Einfluss der Mikrosteifigkeit auf die Knochenheilung zu untersuchen. Vor dem Hintergrund, dass bis jetzt keine *in vivo* Studien darüber vorliegen, wie steif oder elastisch ein Biomaterial zur optimalen Unterstützung der Knochenheilung sein muss, ist das Forschungsziel dieser Arbeit besonders relevant.

Die extrazelluläre Matrix während der Knochenheilung ist nicht statisch sondern dynamisch. Sie verändert sich von Bindegewebe über Knorpel hin zu Geflechtknochen und schließlich Lamellenknochen. Somit werden den Zellen unterschiedliche Steifigkeiten als Stimuli angeboten. Für Stammzellen in 2D Hydrogelsubstraten und Zellen, die in einer 3D Hydrogelmatrix eingekapselt waren, wurde gezeigt, dass sie verschieden auf unterschiedliche mikromechanische Steifigkeiten reagieren. Der Widerstand, den eine Zelle fühlt, wenn sie an die extrazelluläre Matrix andockt, wird als lokale Elastizitätskonstante gemessen. Für Osteoid und nichtmineralisierten Knochen beträgt sie ca. 40 bis 100 kPa, für rigiden Knochen ca.  $10^6$  kPa. Es wurde in *in vitro* Untersuchungen gezeigt, dass mesenchymale Stammzellen, die einer steiferen extrazellulären Matrix ausgesetzt waren, zu osteogenen Zellen differenzieren, wohingegen Stammzellen, die in Kontakt mit einer weicheren Matrix waren, zu den

Vorläuferzellen des Gewebes differenzierten, das dem weichen Elastizitätsmodulus entsprach. Somit wurde gezeigt, dass die Mikrosteifigkeit der extrazellulären Matrix die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen leitet (Chatterjee et al., 2010; Engler et al., 2006; Huebsch et al. 2010; Lutolf et al., 2009). Zusätzlich wurde in den zuvor erwähnten Untersuchungen des Helmholtz Zentrums an den Scaffolds gezeigt, dass das Material mit der höheren Mikrosteifigkeit zwar die initiale Zellanheftung zu verzögern scheint, aber von den Stammzellen zur Differenzierung zu osteogenen Zellen präferiert wird. Dies führt zur ersten Hypothese:

**1.** Der Scaffold mit der höheren Mikrosteifigkeit (Gelatinescaffold 2) unterstützt die Knochenheilung besser als der Scaffold mit der niedrigeren Mikrosteifigkeit (Gelatinescaffold 1).

Als Vergleich dient die Behandlung mit einem spongiösen Knochentransplantat. Da dies dem aktuellen medizinischen Goldstandard entspricht, ergibt sich eine zweite Hypothese:

**2.** Beide Scaffolds unterstützen die Knochenheilung nicht so gut wie das Spongiosatransplantat.

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden 24 weibliche Spraque Dawley Ratten verwendet, welche in den Laboren der Harlan-Winkelmann GmbH, Borchon, Deutschland aufgezogen wurden. Die Genehmigung erfolgte durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (Genehmigungsnummer G0210/08). Die Tiere hatten ein Gewicht zwischen 250 und 300 g und waren 16 Wochen alt. Die Tierhaltung und Versuchsdurchführung erfolgte ausschließlich in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité, Campus Virchow-Klinikum, Berlin.

#### 3.1.1 Haltung und Fütterung

Die Haltung der Ratten vor den Versuchen erfolgte in Gruppen à fünf bis sechs Tiere in Makrolon-Versuchstierkäfigen (Eurostandard Typ IV, Fa. E. Becker & Co GmbH, Castrop-Rauxel/ Deutschland), welche eine Bodenfläche von 1800 cm<sup>2</sup> und eine Höhe von 19 cm aufwiesen. Nach den Operationen wurden die Tiere einige Tage allein und anschließend zu zweit in Käfigen mit einer Grundfläche von 810 cm<sup>2</sup> und einer Höhe von 18 cm gehalten (Eurostandard Typ III). In den Räumlichkeiten herrschten konstante Bedingungen mit einer Raumtemperatur von 18 bis 21 °C und einer relativen Luftfeuchte von 60 bis 70%. Die Beleuchtung war an einem künstlichen Tag-Nachtrhythmus von jeweils zwölf Stunden angepasst. Die Einstreu der Käfige bestand aus einem staubfreien Feinholzgranulat (Rettenmaier und Söhne GmbH und Co. KG, Rosenberg, Deutschland), welches täglich gereinigt und wöchentlich gewechselt wurde. Als Futter ad libitum bekamen die Tiere ein Alleinfuttermittel für Ratten (sniff-Alleinfuttermittel für Ratten und Mäuse, sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Außerdem stand Wasser ad libitum aus Trinkflaschen zur Verfügung.

#### 3.1.2 Gruppen

Die Ratten wurden randomisiert in drei Gruppen à acht Tiere aufgeteilt. Zwei Gruppen für die zu untersuchenden Gelatinescaffolds und eine Positivkontrollgruppe, die mit einem Spongiosatransplantat therapiert wurde (Tabelle 1).

*Tabelle 1: Gruppenübersicht*

Transplantat	Anzahl der Tiere
Gelatinescaffold 1 (G10LNCO8)	8
Gelatinescaffold 2 (G10LNCO3)	8
Spongiosatransplantat	8

## 3.2 Material

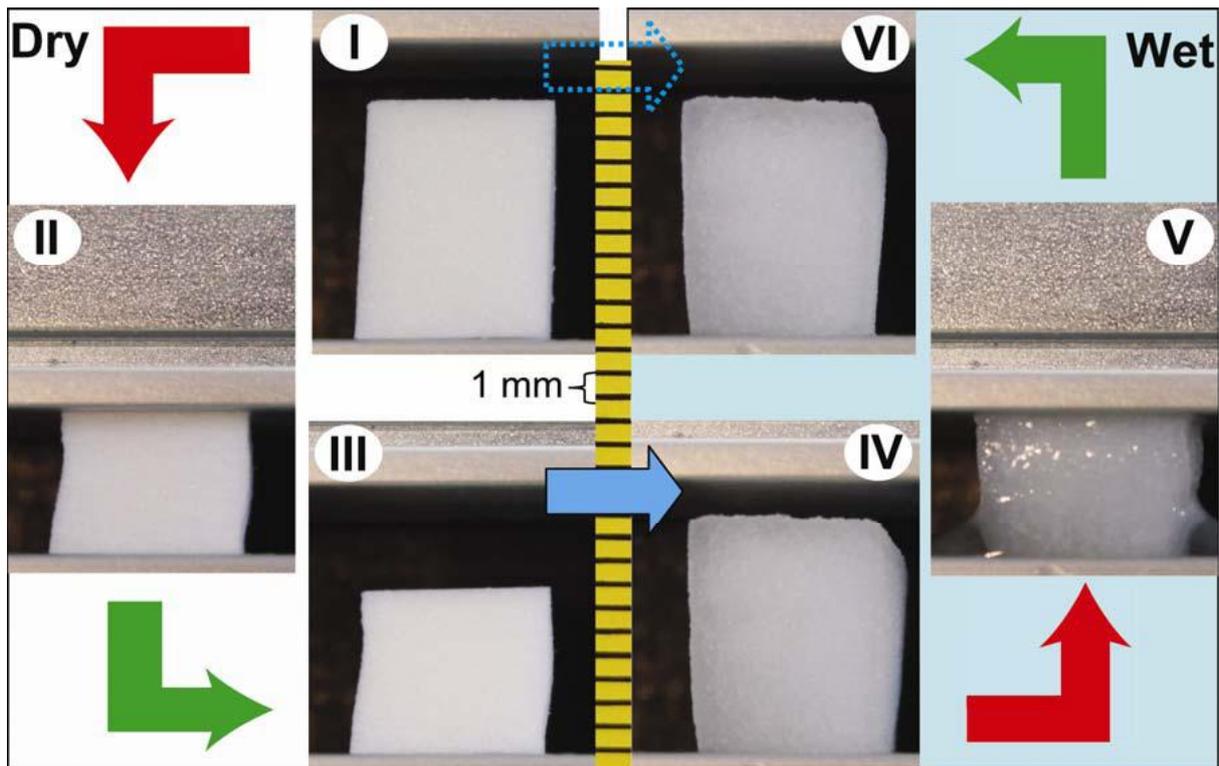
### 3.2.1 Gelatinescaffolds

Die für diesen Versuch verwendeten Gelatinescaffolds wurden im Institut für Polymerforschung, Helmholtz Zentrum Geesthacht, entwickelt und dort auch auf ihre mechanischen und *in vitro* Eigenschaften getestet. Zur Herstellung wurde Gelatine in einer wässrigen Lösung auf 45°C erwärmt und unter Zusatz von einem Poloxamer (Pluronic® F-108) stark verquirlt und aufgeschäumt. Die Stabilisation des Scaffolds wurde durch die Zugabe einer Vernetzungsflüssigkeit (2,6-Diisocyanat-L-Lysin-Ethylester, LDI) erreicht. Es wurden zwei verschiedene Scaffolds verwendet, welche sich in ihrer Zusammensetzung nur in dem Überschuss der Vernetzungsflüssigkeit unterschieden. Beide Scaffolds hatten eine Gelatinekonzentration von zehn Prozent. Bei dem Gelatinescaffold 1 war ein Überschuss von 8 mol LDI und bei dem Gelatinescaffold 2 ein Überschuss von 3 mol LDI vorhanden. Die Scaffolds besaßen folgende Eigenschaften:

Gelatinescaffold 1 (G10\_LNCO8): Makrosteifigkeit ca. 5 kPa, Mikrosteifigkeit ca. 100 kPa.

Gelatinescaffold 2 (G10\_LNCO3): Makrosteifigkeit ca. 5 kPa, Mikrosteifigkeit ca. 1200 kPa.

Desweiteren hatten beide Scaffolds eine Porosität von 80 vol% und eine Porengröße von  $156 \pm 56$  bis  $286 \pm 92$   $\mu\text{m}$  im trockenem und von  $192 \pm 59$  bis  $209 \pm 54$   $\mu\text{m}$  im nassen Zustand. Die Dichte betrug  $0.0664 \pm 0.0025$   $\text{g/cm}^3$  bis  $0.0959 \pm 0.0034$   $\text{g/cm}^3$ . Sie waren formstabil und veränderten ihre Dimensionen nicht, wenn sie nass wurden. Außerdem nahmen sie ihre ursprüngliche Form wieder an, nachdem sie bis auf die Hälfte zusammengedrückt und anschließend in ein wässriges Medium überführt wurden (Abb. 1).



**Abb. 1: Darstellung der Formstabilität und Elastizität der Gelatinescaffold.**

Der trockene Scaffold wird komprimiert (II) und verbleibt anschließend in dieser Form (III). Unter Zugabe von Wasser geht der Scaffold in seine Ausgangsform zurück (IV). Der nasse Scaffold kann komprimiert werden (V) und nimmt sofort nach Beendigung der Kompression seine ursprüngliche Form wieder ein (VI). Die äußeren Dimensionen des Scaffolds ändern sich nicht, wenn er nass wird.

### 3.2.2 Spongiosa

Die Spongiosazylinder stammten aus der Gewebebank der Charité und wurden freundlicherweise von Dr. Axel Pruss (Institut für Transfusionsmedizin, Charité-Universitätsmedizin, Berlin, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Der Spender war eine 65 Jahre alte männliche Person, die an einem Myokardinfarkt gestorben war. Die Zylinder waren etwa 4 mm hoch und hatten einen Durchmesser von ungefähr 2,5 mm. Nach der Entnahme wurden sie gefriergetrocknet und mit Chloroform/Methanol und anschließend mit Peressigsäure/Ethanol sterilisiert.

### 3.2.3 Fixateur externe

Zur Fixation wurde ein unilateraler Fixateur externe, bestehend aus vier Titan-Gewindepins (Kirschnerdrähte mit 5 mm langem Gewinde, Medizintechnik Jagel, Bad Blankenburg, Deutschland) und einem Querbalken aus rostfreiem Stahl, verwendet. Der Querbalken hatte die Maße 22 x 5 x 2 mm und die Pins einen Kerndurchmesser von 0,65 mm und einen Außendurchmesser von 1,2 mm. Jedes Pinpaar war mit dem Querbalken durch Klemmbacken aus Titan verbunden, welche Aussparungen für die Pins besaßen und mit versenkbaren

Schrauben und Muttern am Querbalken befestigt werden konnten. Die Steifigkeit dieses Fixateur externe betrug in axialer Richtung durchschnittlich 50 N/mm.

### 3.3 Operatives Vorgehen

#### 3.3.1 Vorbereitung

Die Tiere wurden unmittelbar vor der Operation aus den Gruppenkäfigen genommen und jeweils in einen eigenen Käfig verbracht, damit sie sich in der Einschlaf- und Aufwachphase nicht gegenseitig störten. Als Anästhesie erhielten die Ratten eine Injektionsnarkose intraperitoneal. Diese bestand aus Ketaminhydrochlorid 60 mg/kg (Ketamin<sup>®</sup> 50 mg, Actavis, Zug, Schweiz) und Medetomidin 0,3 mg/kg (Domitor<sup>®</sup>, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland). Nach wenigen Minuten waren die Tiere eingeschlafen. Jedes Tier bekam eine individuelle farbliche Markierung auf dem Schwanz und wurde gewogen. Zum Schutz der Hornhaut wurde eine Augensalbe (Bepanthen<sup>®</sup>, Jenapharm, Deutschland) aufgetragen. Als Antibiotikum bekamen sie Clindamycin-2-dihydrogenphosphat 45 mg/kg (Clindamycin<sup>®</sup>, Ratiopharm, Ulm, Deutschland) und als Schmerzmittel wurde Tramadolhydrochlorid 20 mg/kg (Tramal<sup>®</sup>, Grünenthal, Aachen, Deutschland) subkutan verabreicht. Die komplette linke Hintergliedmaße bis hin zur linken Bauchwand wurde großzügig lateral und medial freigeschoren und anschließend mit einer Polividon-Iod-haltigen Lösung (Braunoderm<sup>®</sup>, B. Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Zum Schluss ist die Narkosetiefe anhand der Tiefensensibilität (Kneifen zwischen den Zehen) getestet worden, erfolgte keine Reaktion, wurde das Tier auf den Operationstisch auf eine Wärmematte, welche mit einer sterilen Unterlage abgedeckt war, verbracht. Die Lagerung erfolgte vorn in Brust-Bauch-Lage und hinten in Seitenlage mit dem linken Bein nach oben. Nachdem das Tier komplett bis auf die linke Hintergliedmaße mit einem sterilen Lochtuch abgedeckt war, konnte die Operation beginnen.

#### 3.3.2 Operation

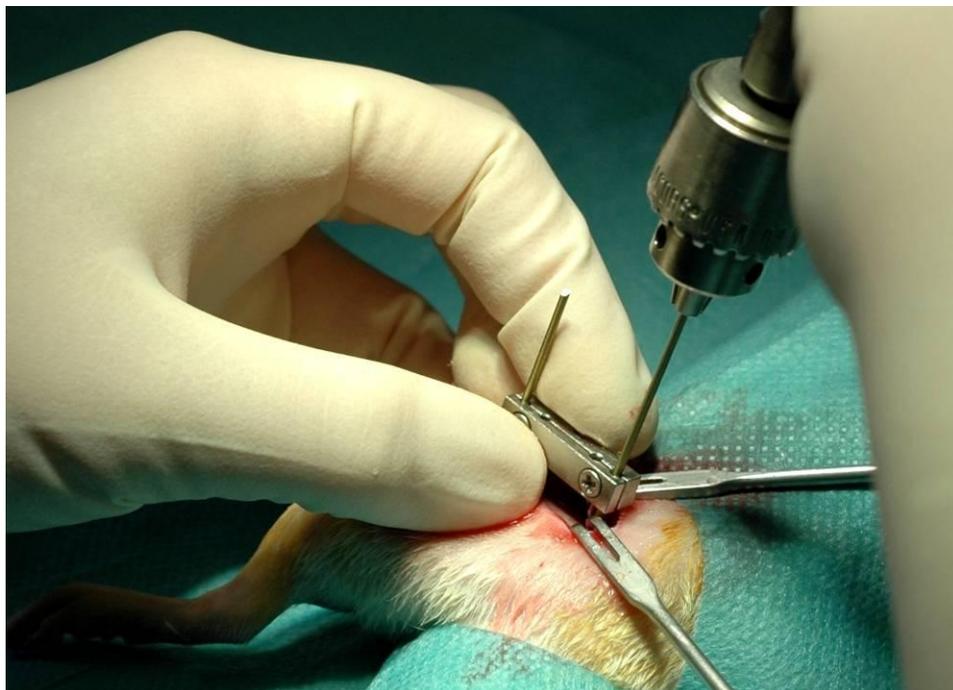
Die Haut der linken Hintergliedmaße wurde über die gesamte Länge des Femurs mit einem Skalpellschnitt eröffnet. Anschließend erfolgte die Faszien durchtrennung und das stumpfe Freipräparieren des Oberschenkelknochens mit einer Präparierschere. Dafür wurden der M. gluteus superficialis und der M. biceps femoris ohne Verletzung der Muskelfasern stumpf auseinandergedrängt (Abb. 2). Nachdem der Knochen frei lag, konnten die Löcher für die vier Titanpins mit einem 0,9 mm Bohrkopf (Proxxon, Föhren, Deutschland) gebohrt werden. Zuerst wurde das distale Loch gebohrt. Während des Bohrens wurde ständig mit steriler Kochsalzlösung gespült, um Schäden durch die entstehende Hitze zu vermeiden. Nachdem das erste Loch gebohrt war, wurde der Pin manuell eingeschraubt. Als zweites wurde der proximale Pin eingesetzt (Abb. 3). Um für die Bohrung den richtigen Abstand zwischen den Löchern zu erhalten, wurde eine Bohrschablone benutzt. Die beiden mittleren Pins wurden zuletzt in der gleichen Weise eingeschraubt. Dabei war darauf zu achten, dass alle Pins möglichst senkrecht zum Knochen und auf einer Linie eingesetzt wurden. Die Stabilisierung der Pins erfolgte nun mit dem Querbalken des Fixateurs, welcher normiert durch einen Abstandhalter, genau in einer Entfernung von 7,5 mm zum Knochen angebracht wurde (Abb. 4). Nachdem alles festgeschraubt war, wurden die langen Enden der Pins, die nach oben über

den Fixateur hinausragten, mit einem Seitenschneider gekürzt. Um den Defekt von 5 mm zu erzeugen, wurden mit Hilfe einer Schablone und einer oszillierenden Säge zwei Osteotomien durchgeführt (Abb. 5). Dabei wurden die Wundränder mit Wundhaken auseinander gehalten und wiederum mit steriler Kochsalzlösung gespült. Das so entstandene Knochenstück konnte nun entfernt und der Defekt mit den unterschiedlichen Transplantaten aufgefüllt werden (Abb. 6, 7 und 8). Die Gelatinescaffolds wurden dafür vorher drei bis vier Stunden in einer sterilen Lösung hydriert. Am Ende erfolgte der Wundverschluss mit Einzelknopfheften. Dabei wurde bei der Faszie ein resorbierbarer Faden (3-0 Vicryl<sup>®</sup> mit Nadel, Ethicon, Norderstedt/Deutschland) und bei der Haut ein nichtresorbierbarer (3-0 Prolene<sup>®</sup> mit Nadel, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verwandt.



*Abb. 2: Foto von der Operation (1).*

**Zu sehen ist das linke intakte Femur. Die Muskeln sind auseinandergedrängt und werden durch Haken gehalten.**

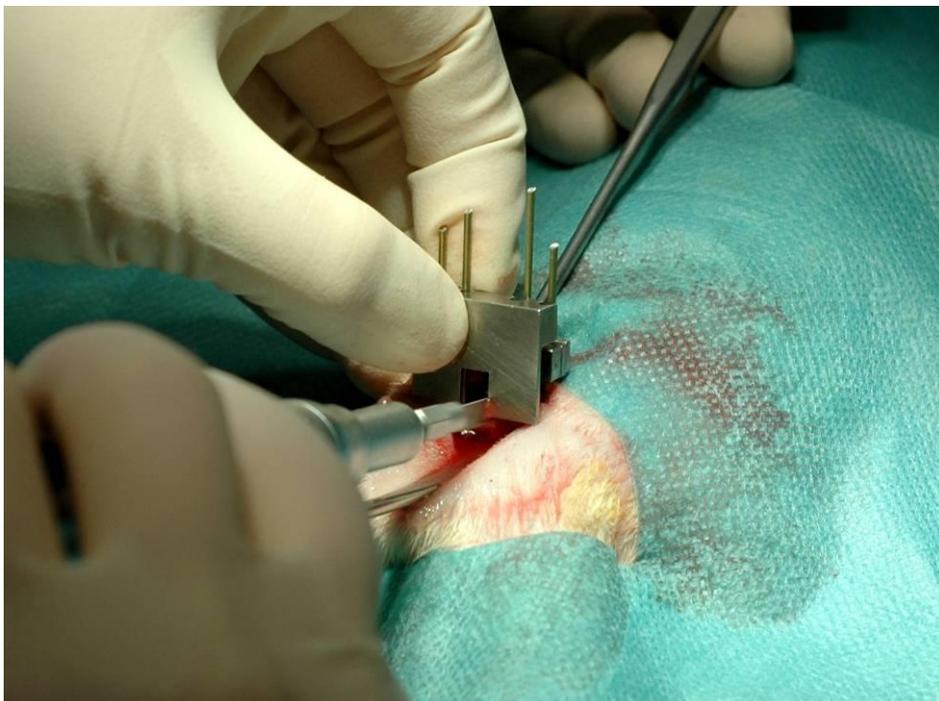


*Abb. 3: Foto von der Operation (2).*

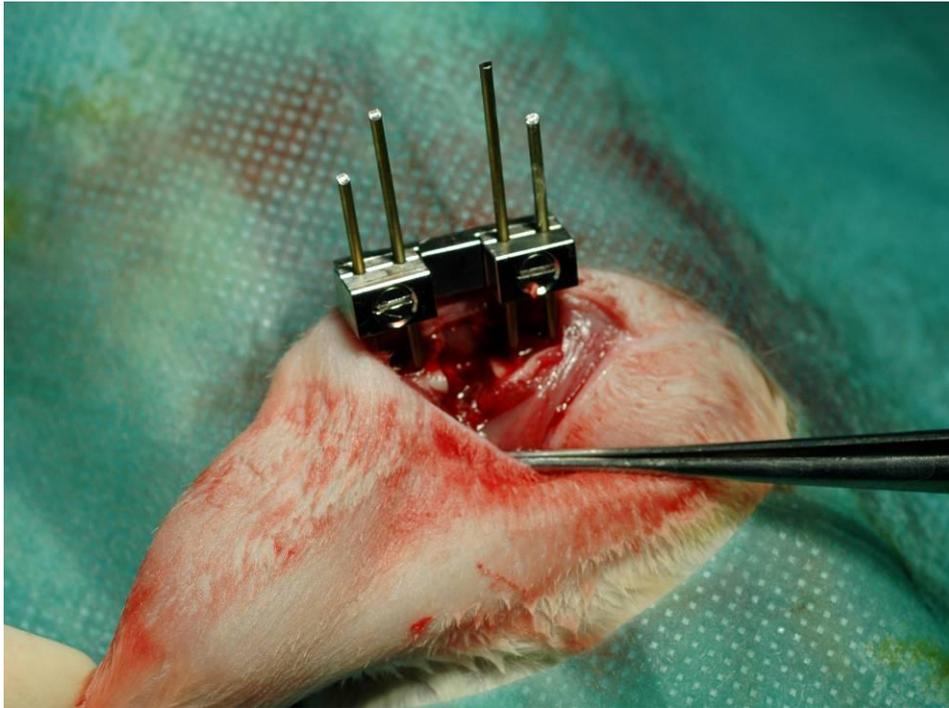
**Manuelles Einbringen des proximalen Titanpins. Der distale Titanpin wurde bereits eingeschraubt. Für den korrekten Abstand wird eine Bohrschablone genutzt.**



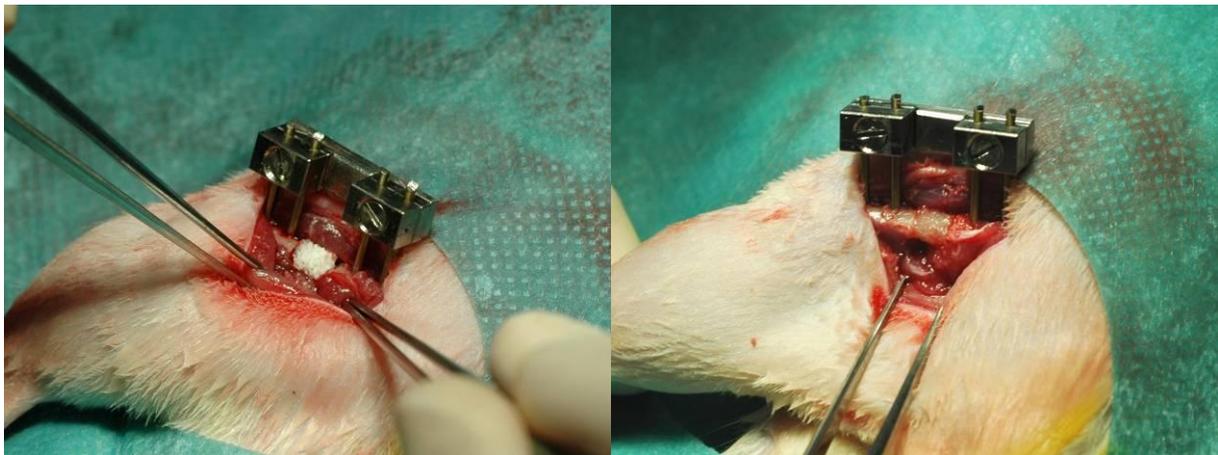
**Abb. 4: Foto von der Operation (3).**  
Stabilisierung der Pins mit dem Querbalken des Fixateurs, welcher normiert durch einen Abstandhalter genau in einer Entfernung von 7,5 mm zum Knochen angebracht wird.



**Abb. 5: Foto von der Operation (4).**  
Mit Hilfe einer Schablone und einer oszillierenden Säge wird ein Defekt von 5 mm erzeugt.



**Abb. 6: Foto von der Operation (5).**  
Der 5 mm Knochendefekt stabilisiert mit dem Fixateur externe. Die Titanpins sind noch nicht gekürzt.



**Abb. 7 und 8: Fotos von der Operation (6/7).**  
Der Defekt gefüllt mit Spongiosaimplantat (links) und Gelatinescaffold (rechts). Die Titanpins sind gekürzt.

### 3.3.3 Nachsorge

Im Anschluss an die Operation wurden die Tiere einzeln in ihre Käfige verbracht und erhielten zur Antagonisierung der Narkose 0,5 mg Atipamezolhydrochlorid (Antisedan<sup>®</sup>, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) intramuskulär. Dabei wurde darauf geachtet, dass sie in Brust-Bauch-Lage gebracht und ihre Augen abgedeckt wurden, da sie während der Aufwachphase mit Rotlicht bestrahlt wurden. Nach ungefähr 30 Minuten waren die Tiere wieder bei Bewusstsein und hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Über das Wasser erhielten sie für drei Tage ein Schmerzmittel (Tramadolhydrochlorid 25 mg/L, Tramal<sup>®</sup>, Grünenthal, Aachen, Deutschland). Für die erste Zeit wurden sie weiterhin einzeln gehalten. Anschließend wurden sie zu zweit gesetzt, um eine möglichst artgerechte Haltung zu gewährleisten. Es erfolgte eine tägliche Kontrolle des Gesundheitszustandes und des Gewichtes und eine wöchentliche Pinpflege. Dabei wurde der Sitz des Fixateurs kontrolliert, eventuelle Krusten an den Pins mit einer 0,1%igen Ethacridinlösung (Rivanol<sup>®</sup>, Chinosolfabrik, Seelze, Deutschland) entfernt und die Wunde gereinigt. Zwei, vier und sechs Wochen nach der Operation wurde die linke Hintergliedmaße in zwei Ebenen (latero-lateral, anterior-posterior) geröntgt (LX-60, Faxitron Bioptics, Tucson, USA) und ein MicroCT angefertigt. Dazu musste zuvor der Querbalken aus Stahl durch einen PEEK Kunststoffbalken ersetzt werden, da der Stahlbalken röntgendicht war. Die Tiere wurden wie zuvor intraperitoneal narkotisiert. Die Röntgenbilder dienten der Kontrolle des Heilungsverlaufes sowie zur Feststellung eines Ausbrechens der Pins des Fixateurs oder Knochenlysen. Bei einer derartigen Komplikation wurden die Tiere aus dem Versuch genommen und getötet, um unnötig Leid zu vermeiden. Die MicroCTs wurden später zur Analyse der Heilung ausgewertet. Die meisten Tiere vertrugen die Narkose und Operation gut. Es kam aber auch zu Verlusten. Ein Tier ist aus der Narkose nicht erwacht, bei jeweils drei Tieren kam es vor Ablauf der Standzeit zu Pinausbrüchen und großen Knochenlysen, dass sie aus dem Versuch ausgeschlossen wurden. Somit verblieben je sechs Tiere in den Gelatinescaffoldgruppen und fünf in der Spongiosakontrollgruppe.

### 3.3.4 Euthanasie und Probengewinnung

Sechs Wochen nach der Operation wurden die Tiere euthanasiert. Dafür wurden sie wie zuvor narkotisiert und sobald sämtliche Reflexe ausgeschaltet waren, mit Kaliumchlorid (7,45 %, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) intrakardial appliziert, getötet. Die Tiere starben sofort durch Herzstillstand. Dies konnte durch optische Kontrolle der Atmung und Retina-Durchblutung sowie palpatorische Kontrolle des Herzens gesichert werden. Anschließend wurden die beiden Hintergliedmaßen entnommen. Dazu wurde nach der Enthäutung das Kniegelenk maximal gebeugt, geöffnet und im Gelenkspalt abgesetzt. Auf der proximalen Seite wurde der Femurkopf aus der Beckenpfanne exartikuliert und nach Trennung aller Muskelansätze und Sehnen konnte der Oberschenkel vorsichtig entnommen werden. Die am Knochen verbliebene Muskulatur der Beckengliedmaße wurde unter besonderer Schonung des Periost und Kallus vorsichtig abpräpariert. Das entfernte Muskelgewebe wurde verworfen. Während der Probenentnahme musste sorgfältig darauf geachtet werden, dass nur minimale Zug-, Druck- und Scherkräfte auf den osteotomierten Knochen wirken. Daher verblieb der Fixateur zunächst am Knochen. Zuletzt wurden die Präparate für 48 Stunden in einer Fixierungslösung aus 37 %igem Formaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland), Ethylalkohol 100 % (Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland),

Barbital-Natrium-Puffer, pH 7,4/0,1 mol (Apotheke der Charité, Berlin, Deutschland) und Glukose (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert. Zur besseren Durchtränkung des Knochens mit der Fixierungslösung wurde der Oberschenkelkopf zuvor abgesetzt, um die Markhöhle zu öffnen.

### 3.4 MicroCT

#### 3.4.1 Durchführung

Zwei, vier und sechs Wochen nach der Operation wurden *in vivo* MicroCTs der osteotomierten Gliedmaße und nach der Probengewinnung und Fixierung auch *in vitro* MicroCTs von beiden Oberschenkeln jedes Tieres angefertigt (vivaCT 40, Scanco Medical AG, Brüttisellen, Schweiz). Dafür musste der Querbalken gewechselt beziehungsweise, nach der Fixierung der Knochen, der Fixateur entfernt werden. Zum Scannen wurden die Tiere in ein eigens dafür angefertigtes Tierbett mit Halterung für den Fixateur gelegt und mit Klebestreifen in Rückenlage fixiert. Der Fixateur extern konnte nun exakt waagrecht an der Fixateurschablone eingehakt werden, sodass die Gliedmaße nicht mehr bewegt werden konnte (Abb. 9). Die *in vivo* MicroCTs wurden mit 55kV und 145 $\mu$ A aufgenommen. Sie hatten eine Auflösung von 35 $\mu$ m und eine Integrationszeit von 150 ms. Die *in vitro* MicroCTs wurden mit 70kV und 114 $\mu$ A aufgenommen. Sie hatten eine Auflösung von 10,5 $\mu$ m und eine Integrationszeit von 381 ms.

#### 3.4.2 Auswertung

Als Volume Of Interest (VOI) wurden 6 mm festgesetzt. Dieses enthielt den 5 mm Frakturspalt und zusätzlich je 0,5 mm proximal und distal von den Grenzen der Osteotomie ausgehend. Somit wurden bei den *in vivo* MicroCTs je 170 Schnitte und bei den *in vitro* MicroCTs je 573 Schnitte analysiert. Zur Auswertung wurde nun in jedem einzelnen Schnitt die für die Messung interessante Region deklariert, indem sie mit Hilfe des Evaluierungsprogrammes (Scanco Medical AG, Brüttisellen, Schweiz) gegen den Uhrzeigersinn umrandet wurde. In diesem Fall also der Kallus, aufgeteilt in inneren Kallus (Endokallus; Kallus innerhalb der Kortikalis) und äußeren Kallus (Exokallus; Kallus außerhalb der Kortikalis). Zusätzlich musste die Kortikalis und bei der Kontrollgruppe die Spongiosa von den Berechnungen ausgeschlossen werden. Diese Leerfläche wurde durch Umrandung im Uhrzeigersinn deklariert (Abb. 10). Nachdem alle einzelnen Schnitte bearbeitet worden waren, errechnete das Programm folgende Werte:

Total Volume (TV, totales Kallusvolumen in mm<sup>3</sup>)

Bone Volume (BV, mineralisiertes Kallusvolumen in mm<sup>3</sup>)

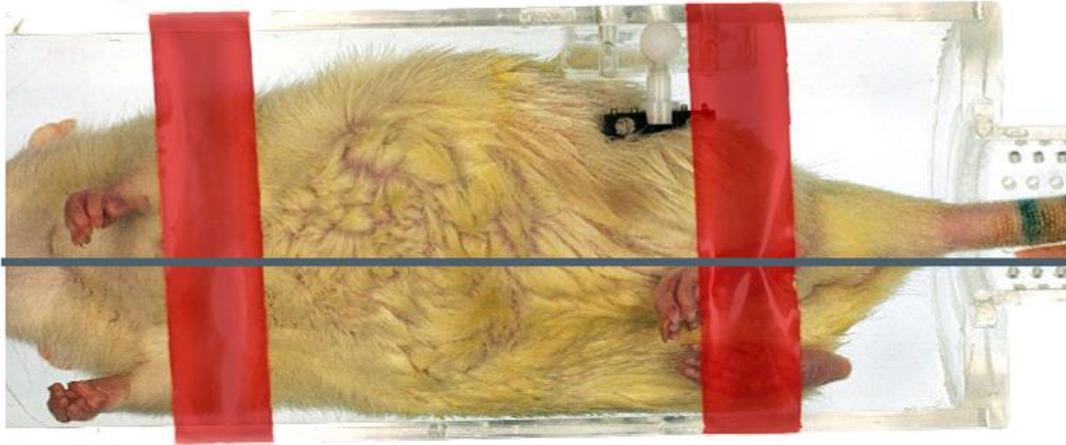
BV/TV

Tissue Mineral Density (TMD, Dichte des mineralisierten Gewebes in mg HA/ cm<sup>3</sup>)

Tissue Mineral Content (TMC=BV x TMD/1000; Inhalt mineralisierten Gewebes in mg).

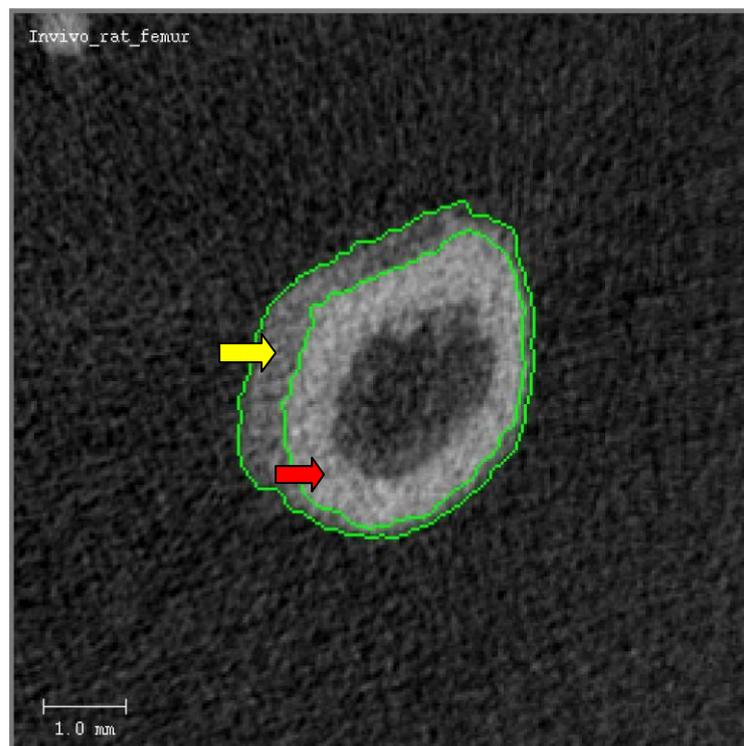
Für die Berechnung dieser Werte musste zuvor noch ein Grenzwert ermittelt werden, ab dem das Programm das Gewebe als mineralisiert ansieht. Dieser Wert wurde für die *in vivo* CTs

auf 50% der Dichte des intakten Tibiaknochens derselben Gliedmaße festgelegt und entsprach  $351 \text{ mg HA/cm}^2$ . Bei den *in vitro* CTs wurde die Dichte des kontralateralen Femurs genutzt. Der Grenzwert wurde auf 50% dieses Vergleichswertes festgelegt und entsprach  $353 \text{ mg HA/cm}^2$ .



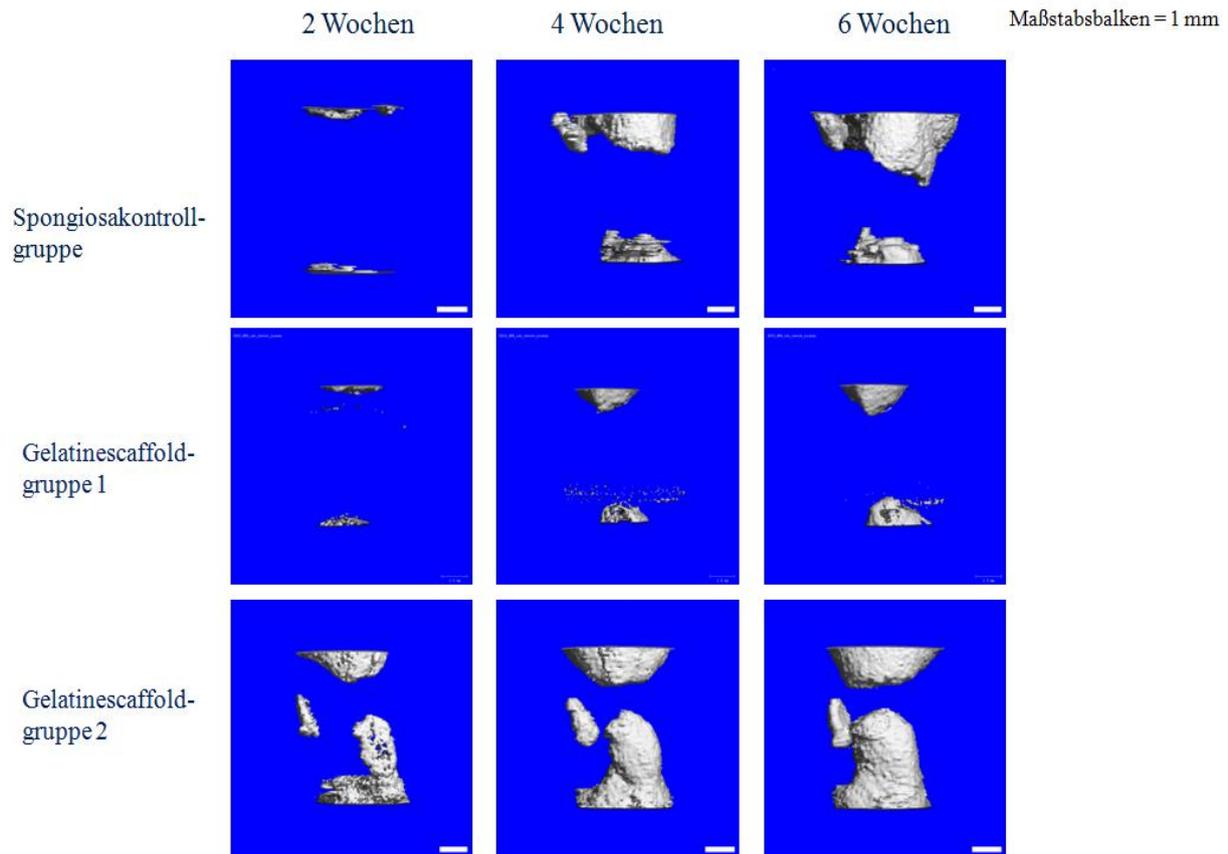
**Abb. 9: Ratte im MicroCT-Tierbett.**

Vorbereitung zum MicroCT. Das Tier liegt in einem eigens dafür angefertigten Tierbett mit Halterung für den Fixateur und ist mit Klebestreifen in Rückenlage fixiert. Der Fixateur externe ist exakt waagrecht an der Fixateurschablone eingehakt.



**Abb. 10: Darstellung MicroCT-Auswertung.**

Dargestellt ist ein transversaler Schnitt durch das Femur. Die Kortikalis (roter Pfeil) ist durch Umrandung im Uhrzeigersinn gekennzeichnet. Der Kallus (gelber Pfeil) ist durch Umrandung gegen den Uhrzeigersinn markiert.



**Abb. 11: 3D-Darstellung des Kallus im MicroCT.**

**Dreidimensionale Ansicht des Kallus in den verschiedenen Gruppen mit jeweils einem Beispieltier nach 2, 4 und 6 Wochen.**

## 3.5 Histologie

### 3.5.1 Vorbereitung der Proben

#### *Entkalken und Entwässern*

Nachdem die Proben 48 Stunden in der Fixierlösung fixiert waren, mussten die Knochen entkalkt werden. Nach einer ausgiebigen Wässerung mit Leitungswasser wurden sie in mit EDTA (Äthylendiamintetraessigsäure, Entkalkungslösung, Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland) gefüllte verschraubbare Gläser überführt. EDTA ist ein Komplexbildner, der Komplexe mit Kalzium bildet und den Knochen somit entkalkt. Die Proben verblieben fünf bis sechs Wochen im EDTA, wobei die Flüssigkeit zweimal wöchentlich gewechselt wurde. Außerdem standen die Gläser in einem 37°C warmen Brutschrank, um die Reaktion zu beschleunigen. Nachdem die Entkalkung abgeschlossen war, mussten die Proben nach einer weiteren ausgiebigen Wässerung mit Leitungswasser entwässert werden. Dafür sind die Knochen einzeln in Kunststoffkäfige verbracht worden. Die Dehydrierung erfolgte maschinell

in einem Entwässerungsautomaten (Leica TP 1020, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Deutschland) mit Alkohol und Xylol nach folgendem Schema:

1 x 70 %, 2 x 80 %, 2 x 96 %, 3 x 100 % Alkohol, 2 x Xylol, 2 x Paraffin

### ***Einbettung und Schneiden***

Eingebettet wurden die Proben mit Paraffin (Paraplast<sup>®</sup>, Plus Tissue Embedding Medium, Tyco, Healthcare, Mansfield, USA). Dazu wurden sie einzeln in kleine Gussformen gelegt und mit Paraffin aus einem Paraffinbad (Leica EG 1120, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Deutschland) übergossen. Zu beachten war, dass sie mit der anterioren Seite nach unten und möglichst parallel zum Boden lagen. Zur Abkühlung und Aushärtung kamen die Formen auf eine Kühlplatte (Leica EG 1130, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Deutschland). Nachdem die Blöcke ausgehärtet waren, konnten sie leicht aus den Formen gelöst werden. Zum Schneiden wurde ein Rotationsmikrotom (Leica RM 2125, Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Deutschland) verwendet. Die Blöcke wurden zuerst mit einem Messer grob von überschüssigen Paraffin befreit und dann in das Mikrotom so eingespannt, dass die anteriore Seite des Knochens nach vorn ragte und somit angeschnitten wurde. Für eine bessere Schneidbarkeit wurden die Blöcke vorher und auch zwischendurch immer wieder zur Kühlung auf einen Eisblock gelegt. Nun wurde der Knochen in 10 µm Schritten so weit angeschnitten, bis die Knochenmarkshöhle auf beiden Seiten der Osteotomie geöffnet war. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Knochen möglichst parallel zur Schnittrichtung ausgerichtet wurde. Nachdem die gewünschte Schnittebene erreicht war, wurden 4 µm dicke Schnitte hergestellt und sofort in ein Wasserbad (Leitungswasser, Raumtemperatur) verbracht. Dort wurden sie mit einem Pinsel vorsichtig separiert und geglättet. Anschließend konnte jeder einzelne Schnitt in ein weiteres wärmeres Wasserbad (Leitungswasser, 42°C, Leica HI 1210 Leica Microsystems, Nussloch GmbH, Deutschland) verbracht werden. Dort glättete sich das Paraffin nochmals und konnte einfach auf einen Objektträger aufgezogen werden. Zur weiteren Fixierung sind die Schnitte anschließend für mindestens 24 Stunden in einen Brutschrank (37 °C) zur Trocknung verbracht worden.

### **3.5.2 Histologische Färbungen**

#### ***Movat Pentachrom-Färbung***

Die Movat Pentachrom-Färbung wurde als Übersichtsfärbung für die deskriptive Histologie verwendet. Durch die stark ausgeprägten Farben war eine eindeutige Unterscheidung der verschiedenen Gewebearten möglich. Knochen und knöcherner Kallus stellten sich leuchtend gelb dar. Osteoid und Muskeln waren leuchtend rot. Die Muskeln konnten anhand ihrer typisch schmalen und parallel verlaufenden Muskelzellen identifiziert und vom Osteoid, welches sich immer an der Oberfläche des Knochens befindet, unterschieden werden. Nichtmineralisierter Knorpel und das Bindegewebe waren blau bis grün gefärbt. Der Knorpel konnte vom Bindegewebe durch die typisch säulenartige Lagerung der Knorpelzellen unterschieden werden. Das Bindegewebe konnte auch eine rot bis purpurne Farbe annehmen, besonders im Bereich des Knochenmarks (Abb. 12). Die Movat Pentachrom-Färbung ist zusätzlich für die Histomorphometrie herangezogen worden. Dabei konnten die verschiedenen Gewebeanteile mit Hilfe eines Computerprogrammes quantitativ erfasst und

ausgewertet werden. Zusätzlich wurde hier auch mit Hilfe eines Computerprogramms die Größe des Osteotomiespaltes zwischen den beiden Kallusenden vermessen.

Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

- Xylol 2 x 10 Minuten  
(J.T. Baker, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande)
- 100-100-96-80-70 %iger Alkohol je 2 Minuten  
(Ethanol, Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland)
- Aqua dest. 2 Minuten
- 1% ige Alcianblaulösung 10 Minuten  
(8GX, Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)
- Abspülen unter Leitungswasser 5 Minuten
- Alkalischer Alkohol: 10 ml 25 % Ammoniak 60 Minuten  
(Merk, Darmstadt, Deutschland) auf 180 ml 96 %Alkohol
- Wässern in Leitungswasser 10 Minuten
- Waschen in Aqua dest. 1 Minute
- Weigerts Eisenhaematoxylin 10 Minuten  
(Eisenhaematoxylin A und B, Waldeck GmbH, Dicsion Chroma<sup>®</sup>,  
Münster, Deutschland im Verhältnis 1:1)
- Waschen in Aqua dest. 1 Minute
- Wässern in Leitungswasser 15 Minuten  
Brillant Crocein-Säurefuchsin 10 Minuten  
(Brillanterocein R, Waldeck GmbH, Dicsion Chroma<sup>®</sup>  
Münster, Deutschland)
- 0,5 % Essigsäure kurz
- 5 % Phosphormolybdänsäure 15 Minuten  
(Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland)
- 3 x 100 % Ethanol 5 Minuten
- Saffron du Gatinais 60 Minuten  
(Waldeck GmbH, Dicsion Chroma<sup>®</sup>, Münster, Deutschland)  
in 100 % Ethanol
- 3 x 100 % Ethanol 3 Minuten

- Entfetten in Xylol 2 x 5 Minuten  
Eindeckeln mit Vitro-Clud®

### ***TRAP-Färbung***

Mit der TRAP-Färbung konnten Osteoklasten identifiziert werden. Dazu wurden die für diese Zellen typischen tartrat-resistenten sauren Phosphatasen angefärbt (Tartrat-resistant acid phosphatase, TRAP) Die Osteoklasten waren als rote Zellen zu erkennen, wobei der Hintergrund blass bis leicht rosa erschien (Abb. 13). Es war darauf zu achten, dass teilweise auch andere Zellen, wie Makrophagen, positiv gefärbt sein konnten. Daher erfolgte die Identifizierung der Osteoklasten nicht nur durch ein positives Färbeergebnis, sondern auch durch ihre Lage und die Anzahl der Zellkerne.

Die Färbung wurde wie folgt durchgeführt:

- Xylol 2 x 10 Minuten  
(J.T. Baker, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland)
- 100-100-96-80-70 %iger Alkohol je 2 Minuten  
(Ethanol, Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland)
- TRAP-Puffer bestehend aus: 10 Minuten  
1,64 g Natriumacetat (Merk, Darmstadt, Deutschland)  
23,05 g Natriumtartrat (Merk, Darmstadt, Deutschland)  
auf 1 Liter Aqua dest. bei pH 5,0
- TRAP- Färbung bei 37°C bestehend aus: 30 bis 120 Minuten  
40 mg Naphtol AS-Mix Phosphat (Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland)  
4 ml N-N-Dimethylformamid (Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland)  
240 mg Fast-Red-Violett LB Salt (Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland)  
2 ml Triton X (Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland)  
auf 200 ml TRAP-Puffer
- Spülen in Aqua dest. 1 Minute
- Gegenfärbung mit Mayer Hämatoxylin 3 Minuten  
(Merk, Darmstadt, Deutschland)
- Spülen mit Leitungswasser 5 bis 10 Minuten
- Eindeckeln mit Aquatex   
(Merk, Darmstadt, Deutschland)

### 3.5.3 Immunhistochemische Färbungen

Bei der Immunhistochemie wird sich die natürliche Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen zu Nutze gemacht. Um bestimmte Gewebe sichtbar zu machen, werden Antigene dieser Strukturen durch die Zugabe eines unkonjugierten Primärantikörpers, der sich gegen die Gewebs-Antigene richtet, markiert. Bei der hier angewandten immunhistochemischen Färbemethode handelte es sich um die sogenannte Zwei-Schritt oder indirekte Methode mit Avidin-Biotin-Komplex. Die ABC-Methode basiert auf der Fähigkeit des aus Hühnereiweiß gewonnenen Glykoproteins Avidin, vier Moleküle des wasserlöslichen Vitamins Biotin zu binden. Nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen an Gewebeproteinen mit Hilfe eines Normalserum wurde ein monoklonaler, unkonjugierter Primärantikörper zugefügt, welcher an das nachzuweisende Antigen andockte. Anschließend wurde ein gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper, welcher mit Biotin markiert (biotinyliert) war, dazugegeben. Der Sekundärantikörper bildete eine Verbindung mit dem Primärantikörper. Das Biotin stellte eine Verbindung zur dritten Reagenz, dem Avidin-Biotin-Komplex (ABC) dar, an dem das Enzym Alkalische Phosphatase gekoppelt war (Abb. 15). Durch die Fähigkeit des Avidins vier Verbindungen mit Biotin einzugehen, entstand ein Makromolekül, welches viel Enzym enthielt. Somit wurde eine Verstärkung der Färbung und Erhöhung der Sensitivität erreicht. Vor Färbebeginn musste die jeweils optimale Konzentration der Primärantikörper zur Darstellung der zu detektierenden Antigene ermittelt werden. Hierzu wurden die Primärantikörper in Vorversuchen mit einem Puffer (Dako, Antibody Diluent, Via Real, USA) verdünnt. Als Negativkontrolle dienten Präparate, die nicht mit dem Primärantikörper inkubiert wurden. Als Positivkontrolle wurde für die Kollagen 1 Schwein-Färbung zusätzlich Schweinehaut mit angefärbt.

Die Färbungen wurden im Einzelnen wie folgt durchgeführt:

- Xylol 2 x 10 Minuten  
(J.T. Baker, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland)
- 100-100-96-80-70 %iger Alkohol je 2 Minuten  
(Ethanol, Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland)
- Aqua dest. 2 Minuten
- Phosphatpufferlösung (PBS): Verdünnung 1:10 mit Aqua dest. 2 x 5 Minuten  
(Waldeck GmbH, Münster, Deutschland)
- Hyaluronidase 0,2% bei 37°C (nicht bei alphaSMA) 15 Minuten  
(Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland)
- Phosphatpufferlösung (PBS): Verdünnung 1:10 mit Aqua dest. 2 x 5 Minuten  
(Waldeck GmbH, Münster, Deutschland)
- Normalserum bei Raumtemperatur 30 Minuten
- Primärantikörper 1:100 mit Diluent bei 4°C über Nacht  
(Antibody Diluent, Dako, Via Real, USA)

- Phosphatpufferlösung (PBS): Verdünnung 1:10 mit Aqua dest. 2 x 5 Minuten  
(Waldeck GmbH, Münster, Deutschland)
- Sekundärer Antikörper bei Raumtemperatur 30 Minuten
- Phosphatpufferlösung (PBS): Verdünnung 1:10 mit Aqua dest. 2 x 5 Minuten  
(Waldeck GmbH, Münster, Deutschland)
- AB-Komplex bei Raumtemperatur 50 Minuten  
(5 ml PBS + 1 Tr. Lösung A + 1 Tr. Lösung B)  
(Alkaline Phosphatase Standard Kit, AK 5000,  
Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- Phosphatpufferlösung (PBS): Verdünnung 1:10 mit Aqua dest. 2 x 5 Minuten  
(Waldeck GmbH, Münster, Deutschland)
- Chromogenpuffer (pH 8,2) bestehend aus: 2 x 5 Minuten  
3,96 g Sigma HCLT 3253  
0,54 g Sigma T1503/6066  
2,63 g Merck 6404 NaCl  
auf 300 ml Aqua dest.
- Visualisierung mit AP-Substrat circa 7 Minuten  
(2,5 ml Chromogenpuffer + je 1 Tr. Lösung 1+2+3) (Kontrolle des  
(Alkaline Phosphatase Substrate Kit I, SK-5100, Farbumschlages unter  
Vector Laboratories, Burlingame, USA) dem Mikroskop )
- abstoppen der Reaktion in PBS
- Gegenfärbung mit Mayer Hämatoxylin 3 Minuten  
(Merk, Darmstadt, Deutschland)
- Spülen mit Leitungswasser 5 bis 10 Minuten
- Eindeckeln mit Aquatex  
(Merk, Darmstadt, Deutschland)

### ***alphaSMA-Färbung***

Bei der alphaSMA-Färbung wurden anhand der oben beschriebenen Methode die glatten Muskelzellen der Gefäße angefärbt. Diese erschienen rot, wohingegen sich der Hintergrund nur schwach rosa bis bläulich anfärbte (Abb. 16). Die Gefäße konnten anschließend mit Hilfe eines Computerprogrammes ausgezählt werden.

Es wurden für die Färbung folgende Reagenzien verwendet:

*Normalserum*: 2% in PBS, made in horse, Vector Laboratories, Burlingame, USA

*Primärantikörper*: Smooth Muscle Actin (SMA), made in mouse, Dako, Via Real, USA

*Sekundärantikörper*: 2% + 2% Normalserum in PBS, Anti mouse, made in horse, biotinylated, Vector Laboratories, Burlingame, USA

### ***Kollagen 1 Schwein-Färbung***

Bei der Kollagen 1 Schwein-Färbung handelte es sich um eine immunhistochemische Färbung, bei der porcines Kollagen 1 sichtbar gemacht werden konnte. Somit konnte untersucht werden, ob sich zum Zeitpunkt der Euthanasie noch Anteile des Gelatinescaffolds im Frakturspalt befanden. Das Kollagen färbte sich pink, wobei der Hintergrund nur sehr schwach rosa bis neutral erschien (Abb. 18). Die Fläche konnte anschließend mit Hilfe eines Computerprogrammes ausgemessen werden.

Es wurden für die Färbung folgende Reagenzien verwendet:

*Normalserum*: Normal Goat Serum, 5% in PBS, Vector Laboratories, Burlingame, USA

*Primärantikörper*: Polyclonal Antibody to Collagen type I porcine, made in rabbit, Acris, Herford, Deutschland)

*Sekundärantikörper*: 2% Normalserum + 1:150 sekundärer Antikörper in PBS Anti rabbit, made in goat, biotinylated, Vector Laboratories, Burlingame, USA

### **3.5.4 Auswertung**

Für die Auswertung der histologischen Schnitte mussten sie digitalisiert werden. Dafür wurden die Schnittpräparate mit Hilfe eines Mikroskops und einer computergestützten Software (Axio Vision, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland) aufgenommen. Eine mit dem Mikroskop verbundene und mit der Software vernetzte hochauflösende Digitalkamera scannte das histologische Präparat innerhalb eines benutzerdefinierten Bereiches mit einer festgelegten Vergrößerung ein. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Schnitte immer in der gleichen Ausrichtung aufgenommen wurden (proximal links, distal rechts, medial oben und lateral unten).

### ***Festlegung der ROI***

Die ROI (Region Of Interest) diente der einheitlichen und möglichst standardisierten Auswertung der Präparate und wurde auf 7 mal 6 mm festgelegt. Dabei wurde vom Mittelpunkt des Osteotomiespaltes 3,5 mm nach distal und 3,5 mm nach proximal gemessen um die Höhe der ROI zu erhalten. Desweiteren wurde die Breite auf 6 mm festgelegt, da dies der breitesten Kallusausdehnung in allen Schnittpräparaten entsprach. Somit hatte die ROI immer eine Gesamtfläche von 42 mm<sup>2</sup> (Abb. 20).

### ***Deskriptive Auswertung***

Für die deskriptive Histologie wurde von jedem Schnittpräparat und jeder Färbung ein Exemplar lichtmikroskopisch beurteilt. Dabei wurde bei der Übersichtsfärbung (Movat Pentachrom-Färbung) besonders auf die Zusammensetzung der einzelnen Gewebeanteile und das Ausmaß des Kallus geachtet. Bei der TRAP-, der alphaSMA- und der Kollagen-Färbung wurde besonderes Augenmerk auf das Verteilungsmuster der Osteoklasten, Gefäße beziehungsweise des Kollagens gelegt.

### ***Histomorphometrische Auswertung***

Die histomorphometrische Auswertung der Präparate mit Hilfe der computergestützten Analyse-Software (KS Run 400 Version 3.0, Carl Zeiss Vision, GmbH Eching, Deutschland) ermöglichte eine quantitative Erfassung einzelner Gewebearten anhand der Movat Pentachrom-Färbung. Hierzu wurden die Schnitte mit einer 16-fachen Vergrößerung digitalisiert und anschließend mit einem individualisiertem Programm (Makro) analysiert. Das Programm war in der Lage, anhand bestimmter Farbpixel Flächen zu erkennen und zu berechnen. Zusätzlich konnten Flächen oder Strukturen manuell umfahren und somit sequenziert werden. Nachdem die einzelnen Bilder hochgeladen waren, konnte Schritt für Schritt den Anweisungen des Makros gefolgt werden. Zuerst wurde eine Kalibrierung vorgenommen. Dabei musste der zuvor in das Bild eingebrachte Maßstabsbalken von 2 mm mit einem vom Programm vorgegebenen Rechteck abgemessen werden. Anschließend musste die Kortikalis manuell umfahren werden. Dabei wurde darauf geachtet, dass neugebildeter Geflechtknochen oder Kallus an den Rändern der Kortikalis nicht mit einbezogen wurde. Folgend wurde die ROI festgelegt, wobei das Programm genaue Anweisungen gab, wo Messpunkte gesetzt werden mussten. Dabei wurde die ROI nochmals in eine periostale und endostale und diese in eine mediale und laterale Fläche unterteilt (Abb. 21). Anschließend wurde nur noch der Bereich innerhalb der ROI analysiert. Dies erfolgte halbautomatisch. Das kalibrierte Computerprogramm markierte entsprechend der vorgegebenen Standardfarben die Knochen-, Binde- oder Knorpelgewebsflächen. Die auswertende Person konnte diese Einschätzung mittels Farbwertregler nach oben oder unten korrigieren und durch manuelles Umfahren bestimmte Bereiche aus-oder einschließen. Zuletzt wurden die Leerflächen, zu denen auch Muskeln, Fettgewebe oder Artefakte zählten, deklariert (Abb. 20).

Anhand der eingegeben Werte berechnete das Programm folgende Werte:

Total Callus Area in mm<sup>2</sup> (gesamte Kallusfläche abzüglich der Leerflächen, Kortikalis und Spongiosa)

Bone Area in mm<sup>2</sup> (knöchernes Gewebe außer Kortikalis und Spongiosa > Kallus)

Cartilage Area in mm<sup>2</sup> (Knorpelgewebe)

Connective Tissue Area in mm<sup>2</sup> (Bindegewebe, auch Knochenmark wenn vorhanden)

Muscle Area im mm<sup>2</sup> (Muskelanteile innerhalb des Frakturspaltes)

Zusätzlich wurden für alle Gewebe auch die Anteile in den einzelnen Abschnitten der ROI angegeben.

### ***Messung des Osteotomiespaltes***

In den digitalisierten Präparaten wurde mit Hilfe einer Computersoftware (AxioVision Rel. 4.8, Carl Zeiss Vision, GmbH Eching, Deutschland) die Distanz zwischen den proximalen und distalen knöchernen Kallusenden gemessen. Dazu wurden mit Hilfe von Parallelverschiebung die beiden am dichtesten zusammenliegenden Punkte des Kallus, parallel zum Verlauf der Knochenachse, vermessen (Abb. 22).

### ***Auswertung der alphaSMA-Färbung***

Mit Hilfe der alphaSMA-Färbung konnte die Gefäßdichte bestimmt werden. Dazu wurde von jedem Präparat ein Schnitt ausgewertet. Die Schnittpräparate wurden mit der oben genannten Methode und einer 100-fachen Vergrößerung digitalisiert. Anschließend konnten sie mit Hilfe eines Photoprogramms (Adobe Photoshop, Version 7.0) analysiert werden. Das Programm bekam die Abmessungen der ROI (7 mal 6 mm) und formte daraus ein Rechteck, welches manuell auf den entsprechenden Bereich vergleichend zur Movat Pentachrom-Färbung positioniert wurde. Somit entsprach die zu analysierende ROI ziemlich genau der der histomorphometrischen Auswertung. Dies war nötig, da die gezählten Gefäße nicht nur absolut, sondern auch im Verhältnis zum Bindegewebe in der ROI betrachtet werden sollten. Zusätzlich wurde die Region Of Interest in einen periostalen und endostalen Bereich aufgeteilt, indem eine Linie an der Außenseite der Kortikalis langgezogen wurde (Abb. 16). Der Bereich, der außerhalb dieser Linie lag, wurde als periostaler Bereich und alles andere als endostaler Bereich gezählt. Die Auswertung erfolgte, indem die ganze Region meanderförmig durchmustert und Gefäße mit einem farbigen Punkt markiert wurden (Abb. 17). Als Gefäß galten dabei alle Strukturen, die folgende Kriterien erfüllten: Positive Färbung, Lumen (Hohlraum), annähernd rund. Längsangeschnittene Gefäße wurden dabei nicht berücksichtigt. Außerdem wurden Gefäße in den Muskeln oder Knochen nicht mitgezählt.

Die Punkte zählte das Programm automatisch und berechnete folgende Ergebnisse:

totale Anzahl der Gefäße

periostale Anzahl der Gefäße

endostale Anzahl der Gefäße

Daraus wurde zusätzlich die Gefäßdichte im Bindegewebe berechnet (Anzahl Gefäße/mm<sup>2</sup> Bindegewebe).

### ***Auswertung der TRAP-Färbung***

Mit Hilfe der TRAP-Färbung konnte die Osteoklastendichte bestimmt werden. Dies wurde in der gleichen Weise wie für die Gefäße durchgeführt (Abb. 13 und 14). Die Schnitte wurden mit 100-facher Vergrößerung aufgenommen und die ROI manuell positioniert. Um als Osteoklast gezählt zu werden, mussten die Zellen folgende Kriterien erfüllen: Positives Färbeergebnis, Mehrkernigkeit (mindestens zwei Zellkerne) und an der Knochenoberfläche liegend.

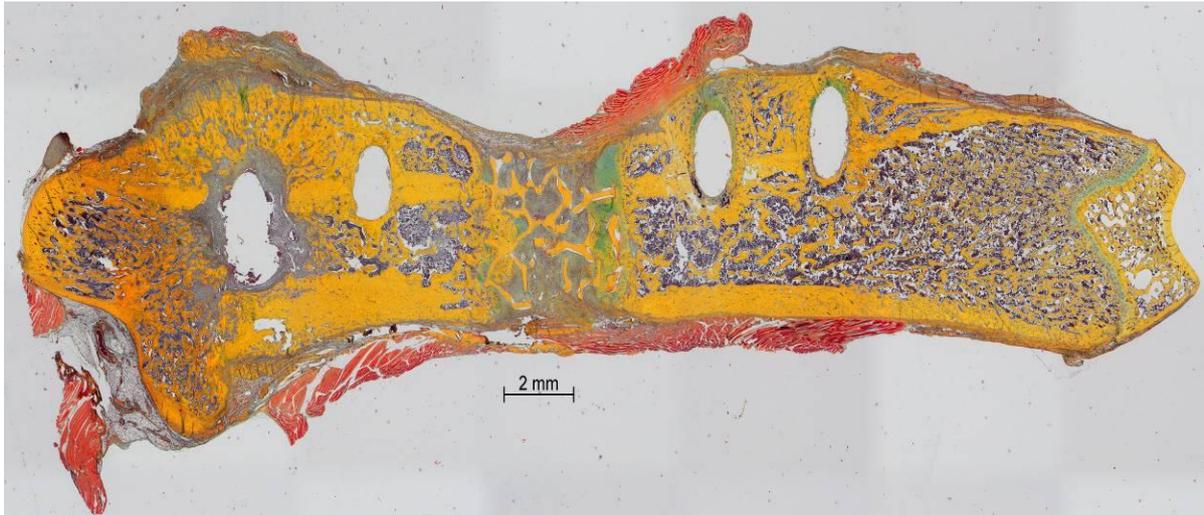
Das Programm errechnete folgende Ergebnisse:

totale Anzahl der Osteoklasten  
periostale Anzahl der Osteoklasten  
endostale Anzahl der Osteoklasten

Daraus wurde zusätzlich die Osteoklastendichte im Bezug auf den Knochen berechnet (Anzahl der Osteoklasten/mm<sup>2</sup> Knochen), wobei als Knochen in diesem Fall der Kallus, die Kortikales und in der Spongiosakontrollgruppe die Spongiosa zählen.

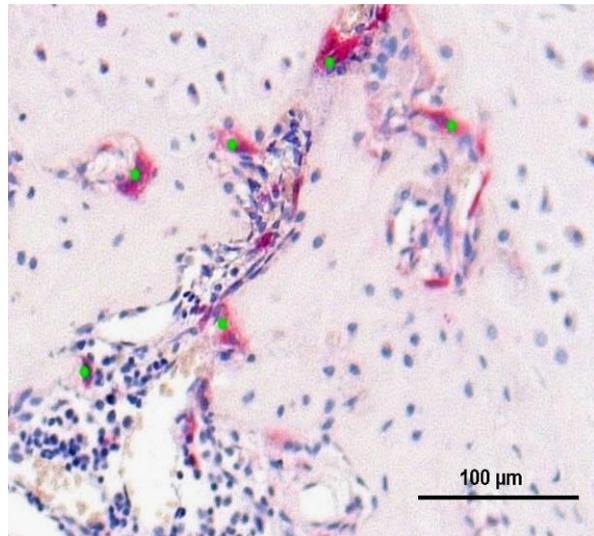
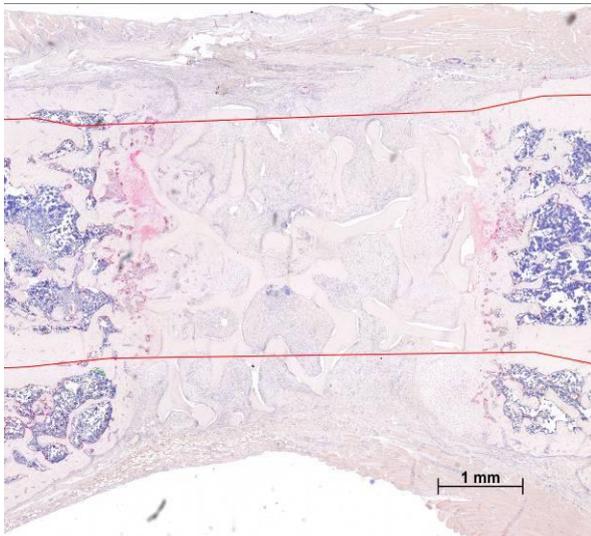
### ***Auswertung der Kollagen 1 Schwein-Färbung***

Diese Färbung sollte Auskunft über das Degradationsverhalten der Gelatinescaffolds geben. Dazu wurden nur Schnittpräparate der beiden Gelatinescaffoldgruppen angefärbt und ausgewertet. Die Bereiche, in denen Kollagen vorhanden war, färbten sich pink. Der Hintergrund blieb neutral bis leicht rosa. Die Schnitte wurden zuerst wie oben beschrieben mit einer 50-fachen Vergrößerung digitalisiert. Die Analyse erfolgte mit einem eigens für diese Auswertung erstellten Makro. Dafür wurde zuerst wieder eine feste ROI von 7 mal 6 mm wie oben beschrieben positioniert. Anschließend deklarierte das Programm automatisch alle pinkgefärbten Bereiche, wobei die Farbwertregler individuell nach oben oder unten reguliert werden konnten (Abb. 18 und 19). Als Ergebnis errechnete das Programm die Kollagenfläche in mm<sup>2</sup>.



**Abb. 12: Os femoris in der Übersicht/ Longitudinalschnitt (Movat Pentachrom-Färbung).**

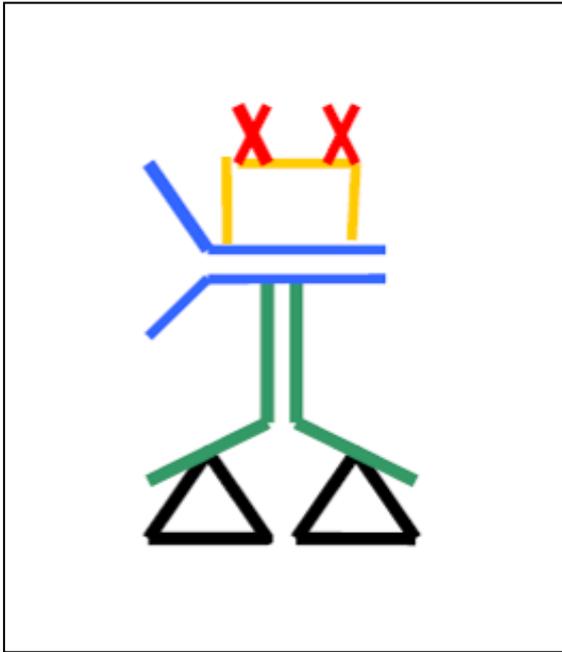
Zu sehen ist ein Longitudinalschnitt durch das linke Femur. Zentral ist der Osteotomiespalt mit dem Spongiosatransplantat zu erkennen. Knochen und knöcherner Kallus stellen sich in dieser Färbung leuchtend gelb dar. Muskeln sind leuchtend rot angefärbt. Nichtmineralisierter Knorpel und Bindegewebe sind blau bis grün gefärbt. Das Knochenmark stellt sich rot bis purpurn dar.



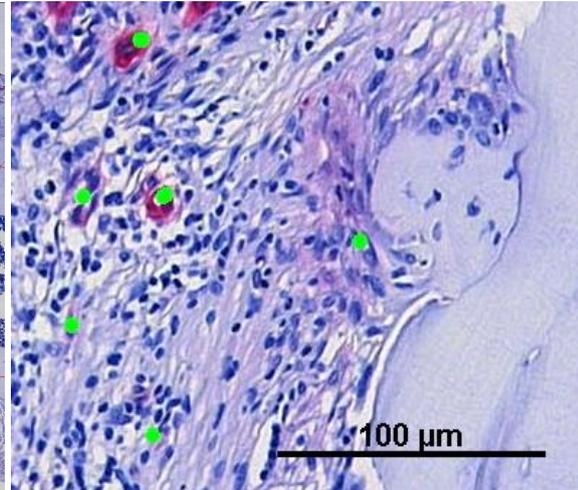
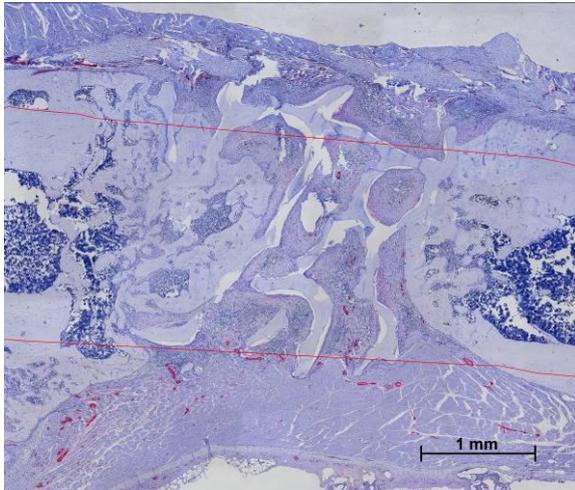
**Abb. 13 + 14: Ansicht ROI und farbliche Markierung der Osteoklasten (TRAP-Färbung).**

Links: Einteilung der ROI in endostalen (innerhalb der roten Linien) und periostalen (außerhalb der roten Linien) Bereich.

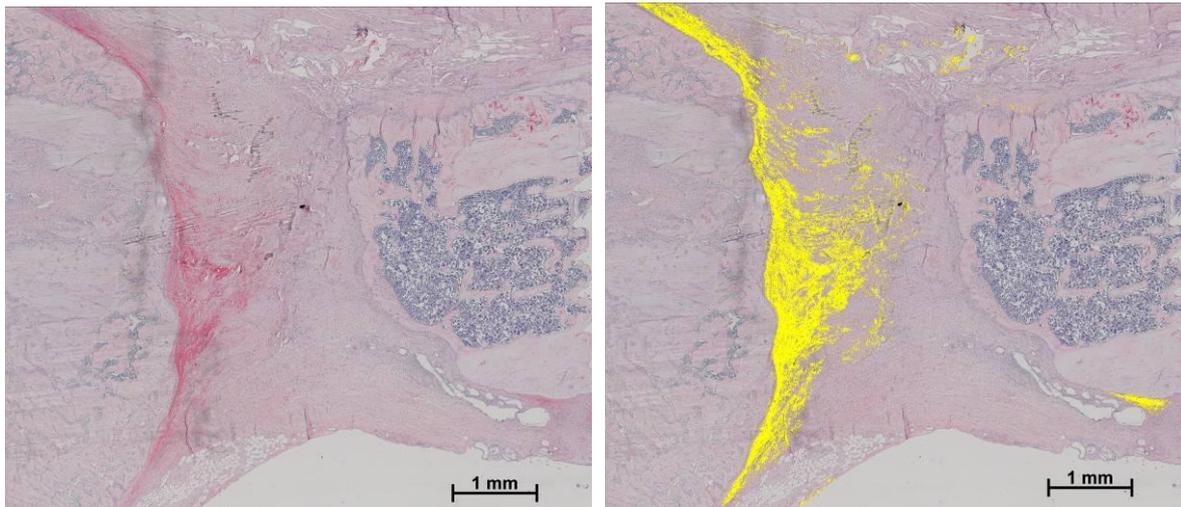
Rechts: Farbliche Markierung (grüne Punkte) der Osteoklasten zur Zählung.



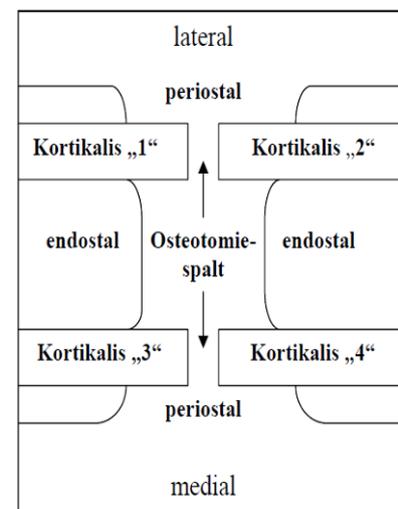
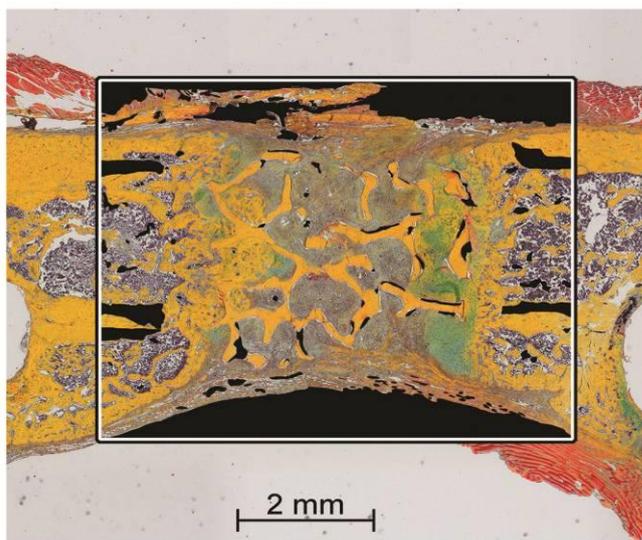
**Abb. 15 : Schematische Darstellung immunhistochemischer Färbungen.**  
 Schwarz: Antigene, grün: Primärantikörper, blau: Sekundärantikörper, gelb: enzymgekoppelter AB-Komplex, rot: Substrat



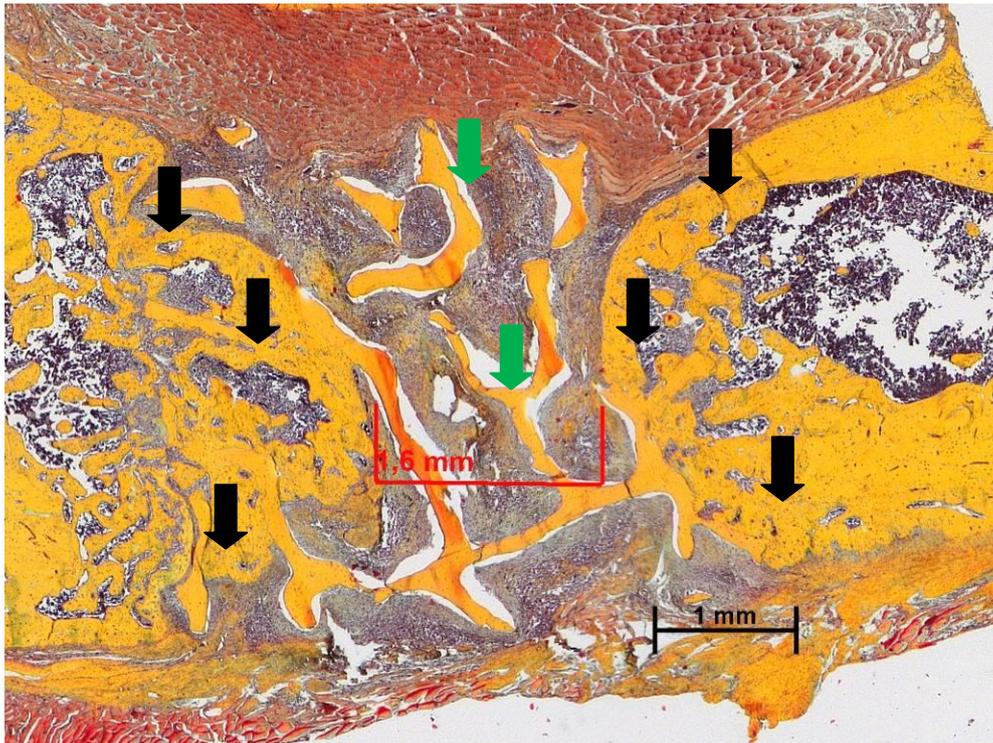
**Abb. 16 und 17: Ansicht ROI und farbliche Markierung der Gefäße (AlphaSMA-Färbung).**  
 Links: Einteilung der ROI in endostalen (innerhalb der roten Linien) und periostalen (außerhalb der roten Linien) Bereich.  
 Rechts: Farbliche Markierung (grüne Punkte) der Gefäße zur Zählung.



**Abb. 18 und 19: Übersicht der Kollagen 1 Schwein-Färbung und Deklaration.**  
**Links:** Das Kollagen ist kräftig pink gefärbt. Der Hintergrund ist schwach rosa.  
**Rechts:** Ansicht mit Analyseprogramm. Automatische Markierung aller pinkgefärbten Bereiche in gelb.



**Abb. 20 und 21: Darstellung der ROI in Movat Pentachrom-Färbung und schematisch.**  
**Links:** Darstellung der ROI (schwarzes Rechteck). Die Kortikalis, Muskel- und Fettgewebe sind als Leerflächen deklariert (schwarz). Im Osteotomiespalt ist das Spongiosatransplantat zu sehen.  
**Rechts:** Schematische Darstellung der ROI. Sie ist unterteilt in einen periostalen und endostalen Bereich, die sich wiederum in eine mediale und laterale Region unterteilen lassen.



**Abb. 22: Darstellung der Messung der Osteotomiespaltgröße (Movat Pentachrom-Färbung). Rote Linie: Abmessung des Osteotomiespaltes durch Parallelverschiebung. Kallus (schwarze Pfeile); Spongiosatransplantat (grüne Pfeile)**

### 3.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Messwerte wurde ein Statistikprogramm (SAS® 9.1; SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) verwendet. Alle drei Gruppen wurden miteinander verglichen. Dabei waren alle Messwerte voneinander unabhängig. Sie wurden entweder mit Hilfe des unpaired t-Test oder des Mann-Whitney U Test analysiert, abhängig davon, ob eine Normalverteilung vorlag, was anhand des Shapiro-Wilk Test bestimmt wurde. Zusätzlich wurden teilweise Messwerte innerhalb einer Gruppe miteinander verglichen. Diese Werte waren nicht unabhängig und wurden mit Hilfe des paired t-Test geprüft. Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von unter fünf Prozent angenommen, das Signifikanzniveau also bei  $p=0,05$  festgelegt. Alle p-Werte wurden mit Hilfe der Hochbergprozedur für die drei verschiedenen Vergleiche angepasst.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Operationsbefunde

Kurze Zeit nach dem Eingriff kamen die Tiere zu Bewusstsein und erholten sich innerhalb weniger Stunden. Lediglich eine Ratte erwachte nur langsam und starb in der folgenden Nacht. Die Tiere belasteten die operierte Gliedmaße unmittelbar nach der Osteotomie voll (Abb. 23). Im Rahmen der täglichen Kontrolle des Gesundheitszustandes, der wöchentlichen Pinpflege sowie der Gewichtsbestimmung wurde zunächst kein weiteres Tier auffällig. Jedoch zeigten sich bei der radiologischen Verlaufskontrolle bei einem Tier nach zwei Wochen und bei zwei weiteren Tieren nach vier Wochen Pinausbrüche, so dass dieser Tiere vorzeitig aus dem Versuch ausschieden und euthanasiert wurden. Drei weitere Tiere wiesen nach Ende der Standzeit von sechs Wochen im MicroCT eine sehr starke Knochenlyse auf und konnten nicht ausgewertet werden. Auch diese Tiere schieden aus, da durch die Auflösung des Knochens keine Beurteilung der Heilung möglich war. In die Auswertung gingen daher für die beiden Gelatinescaffoldgruppen jeweils sechs Tiere und für die Spongiosakontrollgruppe fünf Tiere ein.

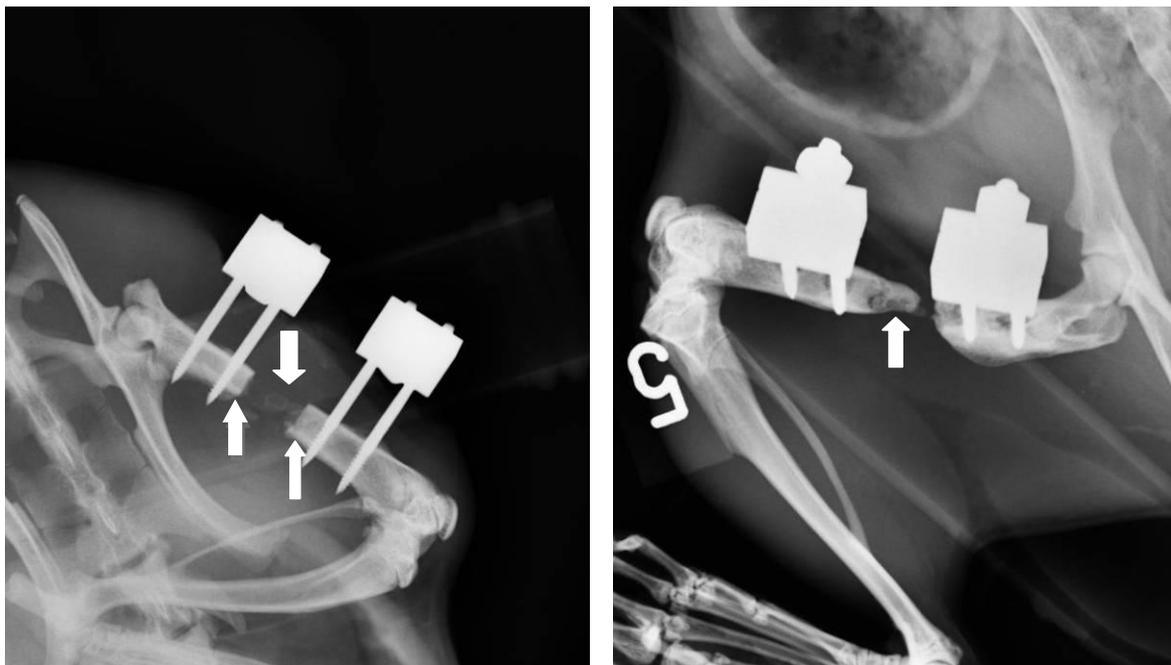


***Abb. 23: Foto: Ratten wenige Tage nach der Operation.  
Der Fixateur externe ist akzeptiert und die Gliedmaße voll belastet.***

## 4.2 Radiologische Ergebnisse

### 4.2.1 Röntgenbilder

Anhand der zweiwöchentlich durchgeführten Röntgenuntersuchungen wurde der Heilungsverlauf und der Sitz der Pins des Fixateurs radiologisch kontrolliert. Auf den ersten Röntgenbildern zwei Wochen nach der Operation stellte sich der fünf Millimeter breite Osteotomiespalt deutlich dar. Er wurde durch glatte, scharfkantige Osteotomieränder der Kortikalis begrenzt. Bei einigen Tieren waren dezente Verschattungen als erste Zeichen der Verdichtung und beginnenden Mineralisierung im Bereich des Spaltes sichtbar (Abb. 24 und 25). Bei der Spongiosakontrollgruppe war zudem die Spongiosa deutlich zu erkennen (Abb. 26). Die Kallusformationen stellten sich in den folgenden Röntgenaufnahmen zunehmend als wolkige oder zapfenförmige Verschattungen im Bereich des Spaltes oder der Osteotomieränder dar (Abb. 24 und 25). Kein Tier zeigte nach der sechswöchigen Standzeit eine vollständige knöcherne Überbrückung des Osteotomiespaltes. Bei einigen Ratten waren starke Osteolysen um die proximalen Kirschner-Drähte des Fixateurs oder Pinausbrüche sichtbar. Diese Tiere wurden ausgeschlossen oder vorzeitig euthanasiert.



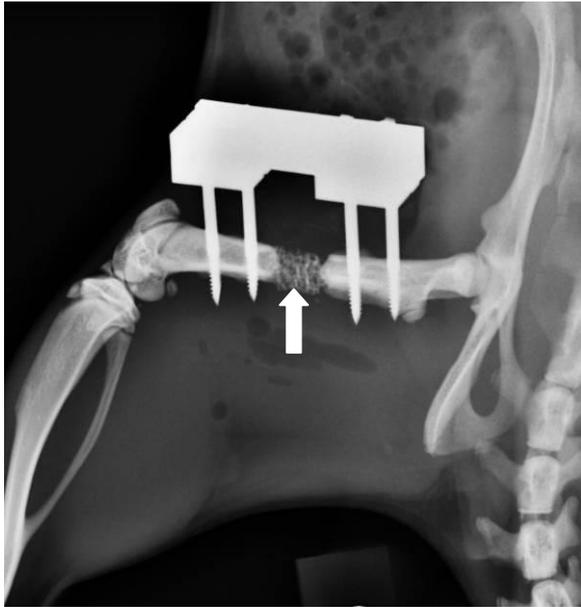
**Abb. 24 und 25: Röntgenbilder Gelatinescaffoldgruppe 2.**

**Links: Röntgenbild eines Tieres aus der Gelatinescaffoldgruppe 2 zwei Wochen post operationem.**

**Zu sehen ist der fünf Millimeter breite Osteotomiespalt mit glatten scharfkantigen Osteotomierändern der Kortikalis (Pfeile nach oben). Im Spalt sind dezente Verschattungen als erste Zeichen der beginnenden Mineralisierung sichtbar (Pfeil nach unten).**

**Rechts: Röntgenbild sechs Wochen post operationem.**

**Der Kallus reicht bis weit in den Osteotomiespalt, überbrückt diesen allerdings nicht vollständig (Pfeil nach oben).**



**Abb. 26: Röntgenbild Spongiosakontrollgruppe.**  
Röntgenbild eines Tieres aus der Spongiosakontrollgruppe zwei Wochen post operationem. Im Spalt ist die Spongiosa deutlich zu erkennen (Pfeil).

#### 4.2.2 MicroCT

Aus den Gelatinescaffoldgruppen gingen je sechs Tiere und aus der Spongiosakontrollgruppe fünf in die *in vivo* MicroCT-Auswertung ein. Bei den *in vitro* Aufnahmen gingen die Daten von zwei Scans verloren und konnten nicht wieder hergestellt werden, sodass in der *in vitro* MicroCT-Auswertung von der Gelatinescaffoldgruppe 1 nur vier Tiere analysiert werden konnten.

##### ***Gelatinescaffoldgruppen***

Nach zwei Wochen betrug in der Gelatinescaffoldgruppe 1 das totale Kallusvolumen (TV)  $4.47 \pm 1.84 \text{ mm}^3$ , das knöcherne Kallusvolumen (BV)  $2.44 \pm 1.08 \text{ mm}^3$  und der Inhalt mineralisierten Gewebes (TMC)  $1.45 \pm 0.65 \text{ mg}$ . In der Gelatinescaffoldgruppe 2 betrug das totale Kallusvolumen  $10.97 \pm 3.11 \text{ mm}^3$ , das Volumen des knöchernen Kallus  $4.92 \pm 1.40 \text{ mm}^3$  und der Inhalt mineralisierten Gewebes  $2.96 \pm 0.80 \text{ mg}$  (Tabelle 2). Die Gelatinescaffoldgruppe 2 hatte somit nach zwei Wochen ein signifikant größeres TV ( $p = 0,008$ ), BV ( $p = 0,031$ ) und TMC ( $p = 0,025$ ) als die Gelatinescaffoldgruppe 1 (Abb. 27, 28 und 29). Zwischen dem BV/TV und der Dichte des mineralisierten Gewebes (TMD) der Gelatinescaffoldgruppe 1 ( $BV/TV = 0.55 \pm 0.09$ ;  $TMD = 593 \pm 6 \text{ mg HA/cm}^2$ ) und der Gelatinescaffoldgruppe 2 ( $BV/TV = 0.45 \pm 0.08$ ;  $TMD = 604 \pm 15 \text{ mg HA/cm}^2$ ) bestand kein Unterschied (Abb. 30, 31 und Tabelle 2).

Nach vier Wochen zeigten sich keinerlei signifikanten Unterschiede in den Messwerten zwischen den beiden Gelatinescaffoldgruppen. Die Gelatinescaffoldgruppe 1 hatte ein TV von

10,24 ± 4,26 mm<sup>3</sup>, ein BV von 6,12 ± 3,08 mm<sup>3</sup>, ein TMC von 4,14 ± 2,15 mg, ein BV/TV von 0,58 ± 0,09 und eine TMD 675 ± 38 mg HA/cm<sup>2</sup>. Die Gelatinescaffoldgruppe 2 hatte ein TV von 18,79 ± 9,67 mm<sup>3</sup>, ein BV von 9,34 ± 5,84 mm<sup>3</sup>, ein TMC von 6,07 ± 3,90 mg, ein BV/TV von 0,48 ± 0,13 und eine TMD von 646 ± 29 mg HA/cm<sup>2</sup> (Tabelle 2).

Nach sechs Wochen wies die Gelatinescaffoldgruppe 1 ein TV von 9.18 ± 6.18 mm<sup>3</sup>, ein BV von 5.95 ± 4.62 mm<sup>3</sup> und ein TMC von 4.26 ± 3.09 mg auf. Die Gelatinescaffoldgruppe 2 besaß im *in vivo* MicroCT ein TV von 23.13 ± 7.96 mm<sup>3</sup>, ein BV von 15.25 ± 7.18 mm<sup>3</sup> und ein TMC von 11.36 ± 5.89 mg (Tabelle 2). BV (p = 0,049) und TMC (p = 0,044) waren somit in der Gelatinescaffoldgruppe 2 signifikant größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1 (Abb. 28 und 29). Das TV der Gelatinescaffoldgruppe 2 war zwar wesentlich größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1, jedoch nach der Hochbergprozedur nicht mehr signifikant (p = 0,061). BV/TV und TMD zeigten keinen Unterschied zwischen den beiden Gelatinescaffoldgruppen (Tabelle 2).

Im *in vitro* MicroCT war das TV, BV und TMC in der Gelatinescaffoldgruppe 2 auch wesentlich größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1, jedoch waren diese Unterschiede nach der Hochbergprozedur nicht mehr signifikant. In der Gelatinescaffoldgruppe 2 betrug das TV 27.06 ± 10.84 mm<sup>3</sup>, das BV 14.04 ± 7.15 mm<sup>3</sup> und der TMC 12.24 ± 6.51 mg. In der Gelatinescaffoldgruppe 1 betrug das TV 11.07 ± 8.00 mm<sup>3</sup>, das BV 6.16 ± 4.35 mm<sup>3</sup> und der TMC 5.01 ± 3.46 mg (Tabelle 2). Es gab keine Unterschiede im BV/TV oder in der TMD zwischen den beiden Gelatinescaffoldgruppen.

### ***Spongiosakontrollgruppe***

Nach zwei Wochen betrug in der Gelatinescaffoldgruppe 1 das TV 4,47 ± 1,84 mm<sup>3</sup>, das BV 2,44 ± 1,08 mm<sup>3</sup>, der TMC 1,45 ± 0,63 mg, das BV/TV 0,55 ± 0,09 und die TMD 593 ± 6 mg HA/cm<sup>2</sup>. In der Spongiosakontrollgruppe betrug das TV 5,59 ± 2,97 mm<sup>3</sup>, das BV 4,23 ± 2,28 mm<sup>3</sup>, der TMC 2,79 ± 1,56 mg, das BV/TV 0,76 ± 0,07 und die TMD 642 ± 24 mg HA/cm<sup>2</sup> (Tabelle 2). Das BV/TV war in der Spongiosakontrollgruppe signifikant größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1 (p = 0,024) (Abb. 30). Das BV und der TMC waren in der Spongiosakontrollgruppe wesentlich größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (Abb. 28 und 29). Zwischen dem TV und der TMD gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abb. 27 und 31).

Nach vier Wochen wies die Gelatinescaffoldgruppe 1 ein TV von 10,24 ± 4,26 mm<sup>3</sup>, ein BV von 6,12 ± 3,08 mm<sup>3</sup>, ein TMC von 4,14 ± 2,15 mg, ein BV/TV von 0,58 ± 0,09 und eine TMD von 675 ± 38 mg HA/cm<sup>2</sup> auf. In der Spongiosakontrollgruppe betrug das TV 15,35 ± 6,27 mm<sup>3</sup>, das BV 13,36 ± 6,23 mm<sup>3</sup>, der TMC 9,36 ± 4,50 mg, das BV/TV 0,87 ± 0,07 und die TMD 699 ± 28 mg HA/cm<sup>2</sup> (Tabelle 2). Das BV/TV war in der Spongiosakontrollgruppe signifikant größer als in der Spongiosakontrollgruppe (p = 0,016) (Abb. 30). Das BV und der TMC waren in der Spongiosakontrollgruppe wesentlich größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1, jedoch war dieser Unterschied wiederum nicht signifikant (Abb. 28 und 29). Beim TV und der TMD gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abb. 27 und 31).

Nach sechs Wochen betrug in der Gelatinescaffoldgruppe 1 das TV  $9,18 \pm 6,18 \text{ mm}^3$ , das BV  $5,95 \pm 4,62 \text{ mm}^3$ , der TMC  $4,26 \pm 3,09 \text{ mg}$ , das BV/TV  $0,62 \pm 0,14$  und die TMD  $731 \pm 49 \text{ mg HA/cm}^2$ . In der Spongiosakontrollgruppe betrug das TV  $20,89 \pm 14,42 \text{ mm}^3$ , das BV  $18,31 \pm 12,41 \text{ mm}^3$ , der TMC  $14,22 \pm 9,95 \text{ mg}$ , das BV/TV  $0,89 \pm 0,03$  und die TMD  $788 \pm 63 \text{ mg HA/cm}^2$  (Tabelle 2). Das BV/TV war in der Spongiosakontrollgruppe erneut signifikant größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1 ( $p = 0,008$ ) (Abb. 30). Das BV, der TMC und jetzt auch das TV waren wesentlich größer in der Spongiosakontrollgruppe, jedoch waren diese Unterschiede erneut nicht signifikant (Abb. 27, 28 und 29). Es gab keinen Unterschied in der TMD zwischen beiden Gruppen (Abb. 31).

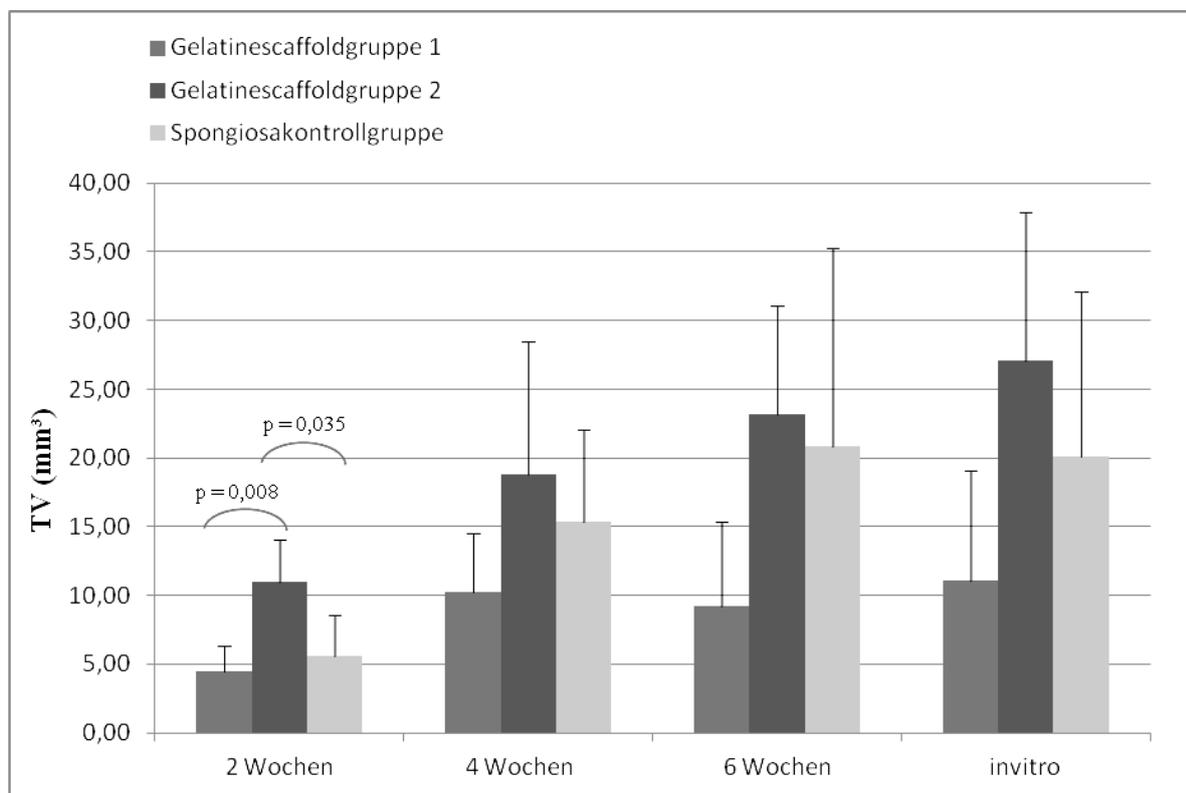
Im *in vitro* MicroCT betrug in der Gelatinescaffoldgruppe 1 das TV  $11,07 \pm 8,00 \text{ mm}^3$ , das BV  $6,16 \pm 4,35 \text{ mm}^3$ , der TMC  $5,01 \pm 3,46 \text{ mg}$ , das BV/TV  $0,56 \pm 0,14$  und die TMD  $825 \pm 62 \text{ mg HA/cm}^2$ . In der Spongiosakontrollgruppe betrug das TV  $20,12 \pm 11,98 \text{ mm}^3$ , das BV  $16,25 \pm 9,42 \text{ mm}^3$ , der TMC  $14,43 \pm 8,4 \text{ mg}$ , das BV/TV  $0,82 \pm 0,06$  und die TMD  $899 \pm 51 \text{ mg HA/cm}^2$  (Tabelle 2). Das BV/TV war auch hier signifikant größer in der Spongiosakontrollgruppe ( $p = 0,007$ ) (Abb. 30). Auch das TV, BV und der TMC waren erneut wesentlich größer in der Spongiosakontrollgruppe (Abb. 27, 28 und 29). Der Unterschied war jedoch nicht signifikant. In der TMD gab es keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abb. 31).

Nach zwei Wochen betrug in der Gelatinescaffoldgruppe 2 das TV  $10,97 \pm 3,11 \text{ mm}^3$ , das BV  $4,92 \pm 1,40 \text{ mm}^3$ , der TMC  $2,96 \pm 0,80 \text{ mg}$ , das BV/TV  $0,45 \pm 0,08$  und die TMD  $604 \pm 15 \text{ mg HA/cm}^2$ . In der Spongiosakontrollgruppe betrug das TV  $5,59 \pm 2,97 \text{ mm}^3$ , das BV  $4,23 \pm 2,28 \text{ mm}^3$ , der TMC  $2,79 \pm 1,56 \text{ mg}$ , das BV/TV  $0,76 \pm 0,07$  und die TMD  $642 \pm 24 \text{ mg HA/cm}^2$  (Tabelle 2). Das TV war in der Gelatinescaffoldgruppe 2 signifikant größer als in der Spongiosakontrollgruppe ( $p = 0,035$ ) (Abb. 27). Das BV/TV war in der Spongiosakontrollgruppe signifikant größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 2 ( $p = 0,012$ ) (Abb. 30). In BV, TMC und TMD gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abb. 28, 29 und 31).

Nach vier Wochen betrug in der Gelatinescaffoldgruppe 2 das TV  $18,79 \pm 9,67 \text{ mm}^3$ , das BV  $9,34 \pm 5,84 \text{ mm}^3$ , der TMC  $6,07 \pm 3,90 \text{ mg}$ , das BV/TV  $0,48 \pm 0,13$  und die TMD  $646 \pm 29 \text{ mg HA/cm}^2$ . In der Spongiosakontrollgruppe betrug das TV  $15,35 \pm 6,27 \text{ mm}^3$ , das BV  $13,36 \pm 6,23 \text{ mm}^3$ , der TMC  $9,36 \pm 4,50 \text{ mg}$ , das BV/TV  $0,87 \pm 0,07$  und die TMD  $699 \pm 28 \text{ mg HA/cm}^2$  (Tabelle 2). Das BV/TV war in der Spongiosakontrollgruppe signifikant größer ( $p = 0,016$ ) (Abb. 30). In TV, BV, TMC und TMD gab es keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abb. 27, 28, 29 und 31).

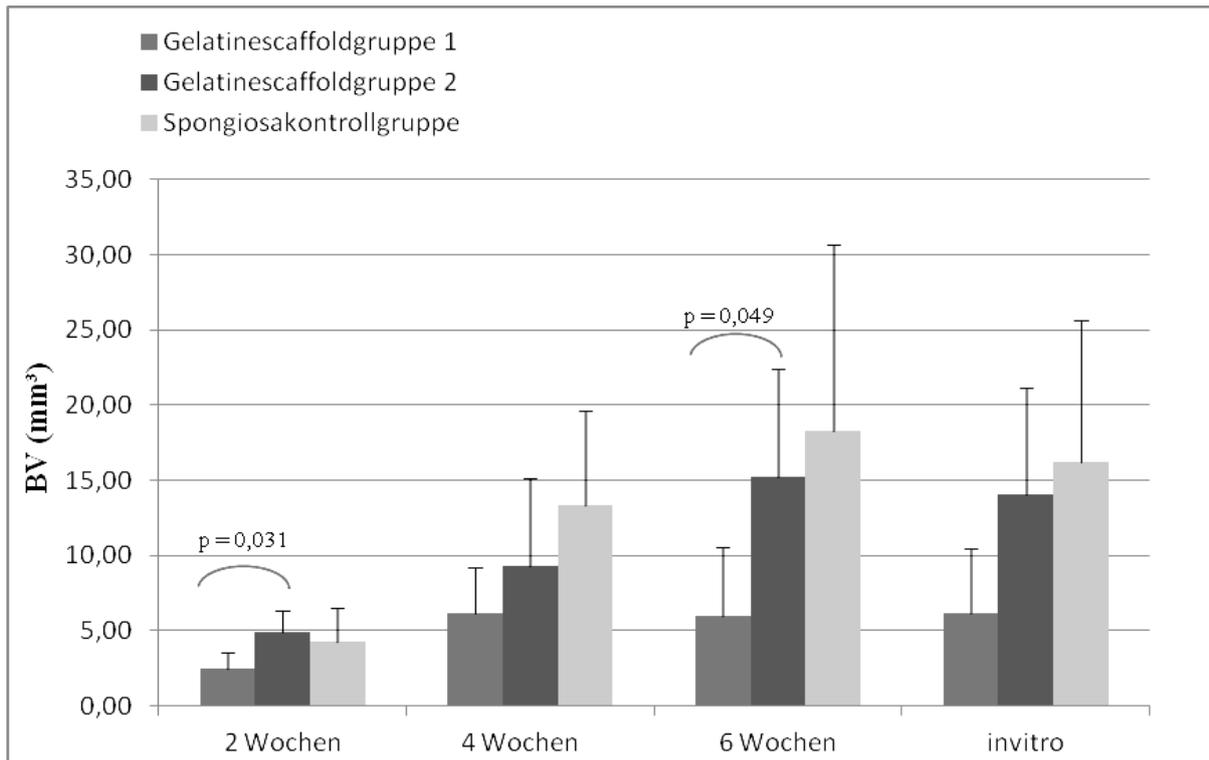
Nach sechs Wochen wies die Gelatinescaffoldgruppe ein TV von  $23,13 \pm 7,96 \text{ mm}^3$ , ein BV von  $15,25 \pm 7,18 \text{ mm}^3$ , ein TMC von  $11,36 \pm 5,89 \text{ mg}$ , ein BV/TV von  $0,64 \pm 0,14$  und eine TMD von  $746 \pm 83 \text{ mg HA/cm}^2$  auf. In der Spongiosakontrollgruppe betrug das TV  $20,89 \pm 14,42 \text{ mm}^3$ , das BV  $18,31 \pm 12,41 \text{ mm}^3$ , der TMC  $14,22 \pm 9,95 \text{ mg}$ , das BV/TV  $0,89 \pm 0,03$  und die TMD  $788 \pm 63 \text{ mg HA/cm}^2$  (Tabelle 2). Das BV/TV war in der Spongiosakontrollgruppe erneut signifikant größer ( $p = 0,008$ ) (Abb. 30). In TV, BV, TMC und TMD gab es wiederum keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (Abb. 27, 28, 29 und 31).

Im *in vitro* MicroCT betrug in der Gelatinescaffoldgruppe 2 das TV  $27,06 \pm 10,84 \text{ mm}^3$ , das BV  $14,04 \pm 7,15 \text{ mm}^3$ , der TMC  $12,24 \pm 6,51 \text{ mg}$ , das BV/TV  $0,51 \pm 0,14$  und die TMD  $872 \pm 64 \text{ mg HA/cm}^2$ . In der Spongiosakontrollgruppe betrug das TV  $20,12 \pm 11,98 \text{ mm}^3$ , das BV  $16,25 \pm 9,42 \text{ mm}^3$ , der TMC  $14,43 \pm 8,4 \text{ mg}$ , das BV/TV  $0,82 \pm 0,06$  und die TMD  $899 \pm 51 \text{ mg HA/cm}^2$  (Tabelle 2). Auch *in vitro* war das BV/TV in der Spongiosakontrollgruppe signifikant größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 2 ( $p = 0,003$ ) (Abb. 30). In TV, BV, TMC und TMD gab es erneut keine Unterschiede zwischen den beiden eben genannten Gruppen (Abb. 27, 28, 29 und 31).



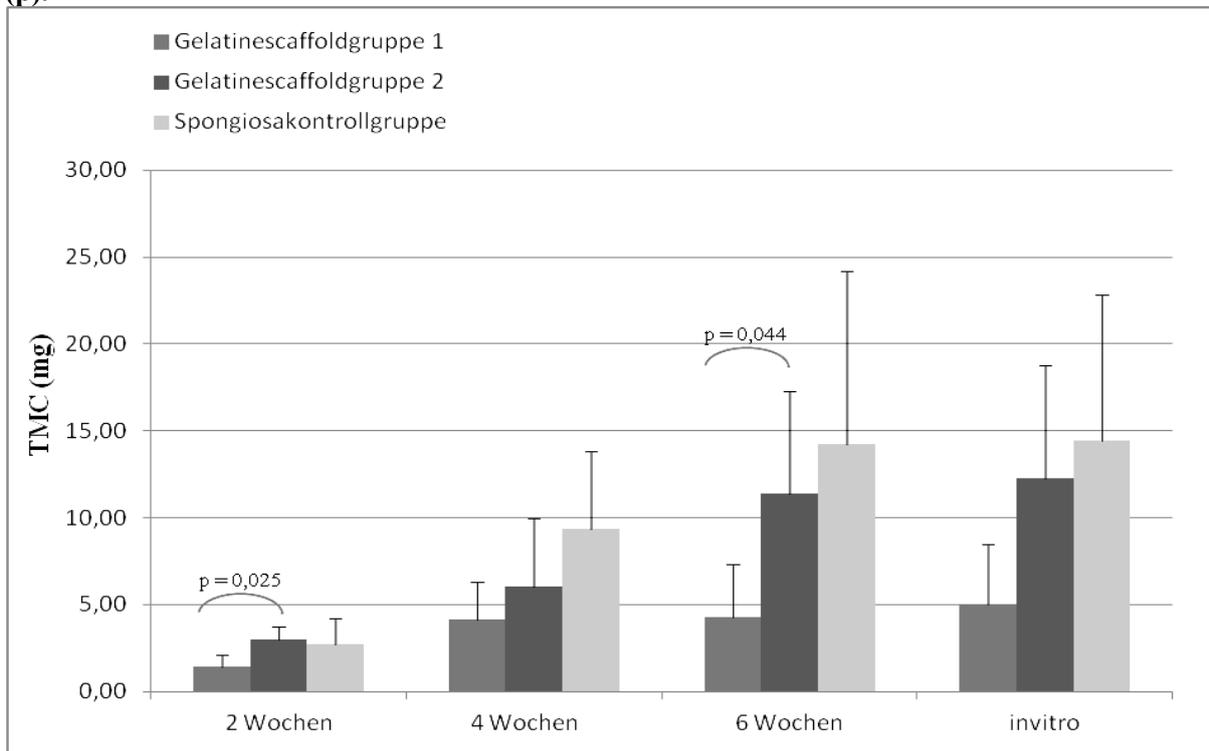
**Abb. 27: TV in  $\text{mm}^3$  nach zwei, vier, sechs Wochen und *in vitro*.**

**Dargestellt sind Mittelwerte mit positiver Standardabweichung und signifikanten Unterschieden (p).**



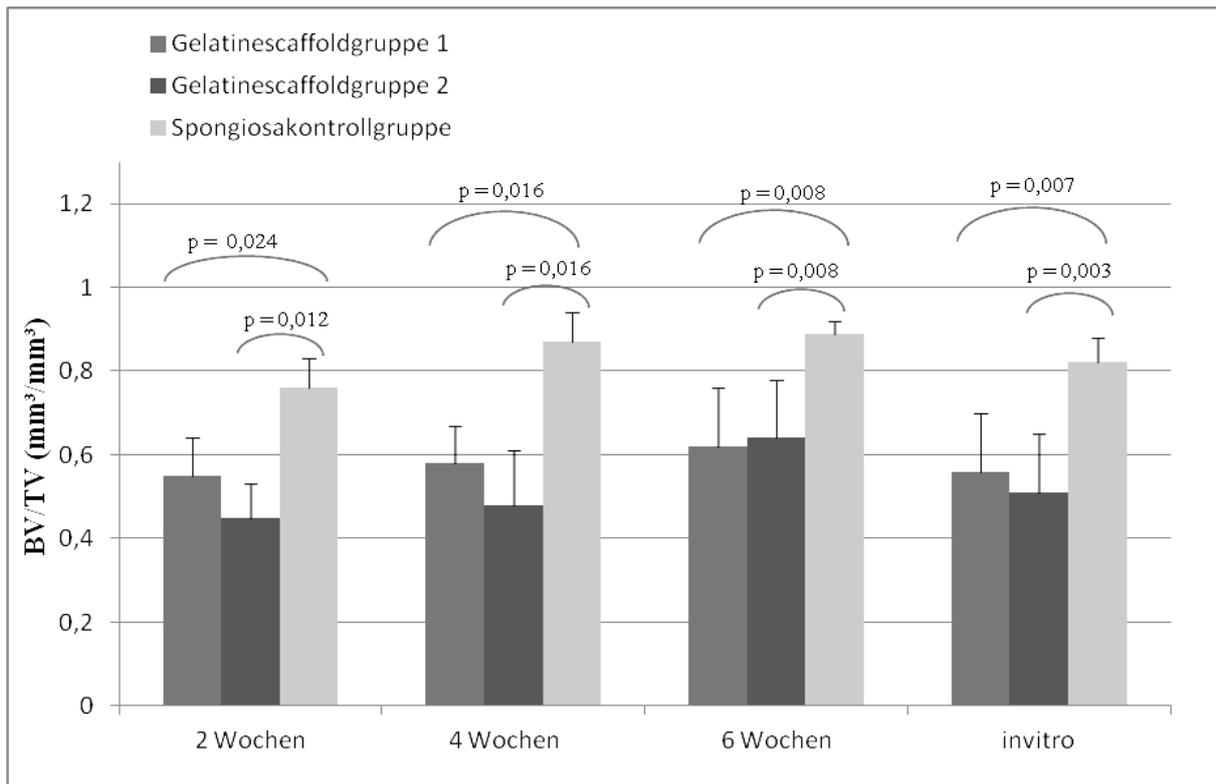
**Abb. 28: BV in mm<sup>3</sup> nach zwei, vier, sechs Wochen und in vitro.**

Dargestellt sind Mittelwerte mit positiver Standardabweichung und signifikanten Unterschieden (p).



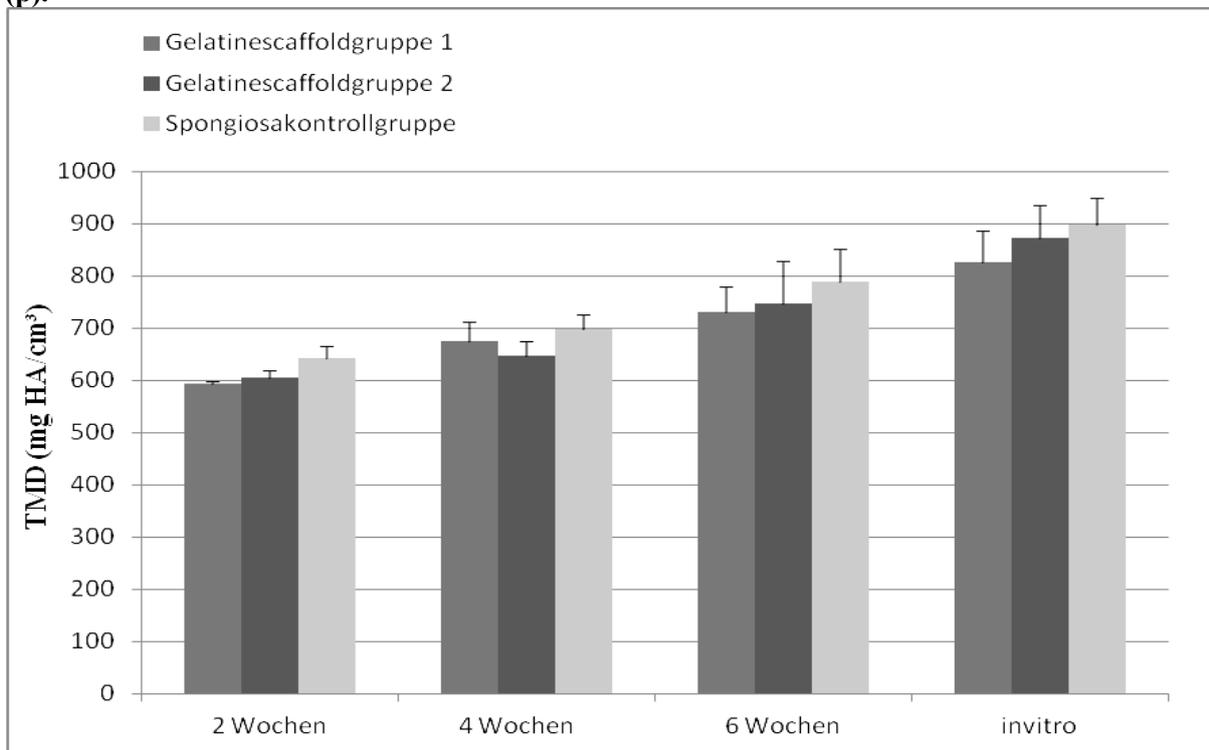
**Abb. 29: TMC in mg nach zwei, vier, sechs Wochen und in vitro.**

Dargestellt sind Mittelwerte mit positiver Standardabweichung und signifikanten Unterschieden (p).



**Abb. 30: BV/TV nach zwei, vier, sechs Wochen und in vitro.**

Dargestellt sind Mittelwerte mit positiver Standardabweichung und signifikanten Unterschieden (p).



**Abb. 31: TMD in mg HA/cm³ nach zwei, vier, sechs Wochen und in vitro.**

Dargestellt sind Mittelwerte mit positiver Standardabweichung.

**Tabelle 2: Ergebnisse MicroCT-Messungen.**

Darstellung aller Ergebnisse (Mittelwerte und Standardabweichungen) für die MicroCT-Messungen.

	Gelatinescaffoldgruppe 1	Gelatinescaffoldgruppe 2	Spongiosakontrollgruppe
<b>TV (mm<sup>3</sup>)</b>			
2 Wochen	4.47 ± 1.84	10.97 ± 3.11	5.59 ± 2.97
4 Wochen	10.24 ± 4.26	18.79 ± 9.67	15.35 ± 6.72
6 Wochen	9.18 ± 6.18	23.13 ± 7.96	20.89 ± 14.42
<i>in vitro</i>	11.07 ± 8.00	27.06 ± 10.84	20.12 ± 11.98
<b>BV (mm<sup>3</sup>)</b>			
2 Wochen	2.44 ± 1.08	4.92 ± 1.40	4.23 ± 2.28
4 Wochen	6.12 ± 3.08	9.34 ± 5.84	13.36 ± 6.23
6 Wochen	5.95 ± 4.62	15.25 ± 7.18	18.31 ± 12.41
<i>in vitro</i>	6.16 ± 4.35	14.04 ± 7.15	16.25 ± 9.42
<b>TMC (mg)</b>			
2 Wochen	1.45 ± 0.65	2.96 ± 0.80	2.73 ± 1.50
4 Wochen	4.14 ± 2.15	6.07 ± 3.90	9.36 ± 4.50
6 Wochen	4.26 ± 3.09	11.36 ± 5.89	14.22 ± 9.95
<i>in vitro</i>	5.01 ± 3.46	12.24 ± 6.51	14.43 ± 8.4
<b>BV/TV</b>			
2 Wochen	0.55 ± 0.09	0.45 ± 0.08	0.76 ± 0.07
4 Wochen	0.58 ± 0.09	0.48 ± 0.13	0.87 ± 0.07
6 Wochen	0.62 ± 0.14	0.64 ± 0.14	0.89 ± 0.03
<i>in vitro</i>	0.56 ± 0.14	0.51 ± 0.14	0.82 ± 0.06
<b>TMD(mg HA/cm<sup>3</sup>)</b>			
2 Wochen	593 ± 6	604 ± 15	642 ± 24
4 Wochen	675 ± 38	646 ± 29	699 ± 28
6 Wochen	731 ± 49	746 ± 83	788 ± 63
<i>in vitro</i>	825 ± 62	872 ± 64	899 ± 51

### 4.3 Histologische Ergebnisse

In die histologischen Auswertungen gingen je sechs Tiere aus den beiden Gelatinescaffoldgruppen und fünf Tiere aus der Spongiosakontrollgruppe ein.

#### 4.3.1 Deskriptive Histologie

Für die deskriptive Histologie wurde von jedem Tier jeweils ein Schnitt mit der Movat-Pentachrom-Färbung angefärbt und mit unterschiedlichen Vergrößerungen durchgemustert. Desweiteren erfolgte eine deskriptive Beurteilung auch in der TRAP-Färbung und in der Immunhistochemie. Diese werden in den jeweiligen Kapiteln beschrieben.

## *Allgemein*

In der Übersichtsbetrachtung stellte sich die Kortikalis, bedingt durch die longitudinale Schnittebene, als vier durch Markraum und Osteotomie getrennte Rechtecke dar. Der Bereich, der sich jeweils außerhalb der Kortikalis befand, wurde als periostal und der Bereich innerhalb der Kortikalis als endostal bezeichnet. Im Zentrum des Bildes lag der Osteotomiespalt. Zwischen der lateralen und medialen Kortikalis befand sich jeweils der proximale und distale Markraum. Die Pinlöcher waren als runde oder schraubenförmige gewebefreie, teilweise umknöcherte Areale zu erkennen (Abb. 32). Bei fast allen Tieren war zudem eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Knochenlyse im Bereich eines oder mehrerer Pinlöcher zu sehen. Dort befanden sich vermehrt Anzeichen einer Inflammation, wie Einblutungen oder eine erhöhte Anzahl von Entzündungszellen. Teilweise bildete sich in diesem Bereich ein großer periostaler knöcherner Kallus, um den Lysedefekt zu stabilisieren. Der Markraum war zellreich und mit lockerem purpur gefärbtem Bindegewebe und Fettgewebe ausgefüllt. Die Kortikalis stellte sich als gleichmäßig mineralisiertes Gewebe dar. Durch die Schnittebene zeigte die Maserung einen gleichmäßigen, longitudinalen Verlauf. Dies entstand durch das Anschneiden der in Längsrichtung verlaufenden Havers'schen Systeme und Schaltlamellen des Lamellenknochens. Die eigentlich glatten Ränder der Kortikalis wiesen periostal und endostal dezente Auflagerungen von neu synthetisiertem Kallus in Form von Geflechtknochen auf und waren somit unregelmäßig wellig geformt (Abb. 33). Der knöcherne Kallus bestand zumeist aus kompakten Geflechtknochenbälkchen, aber teilweise auch schon aus Lamellenknochen. Er war im Gegensatz zum kortikalen Knochen eher unstrukturiert und wurde durch unterschiedlich große Kavernen, welche mit Bindegewebe gefüllt waren, durchbrochen (Abb. 34). Im Knochen waren viele eingemauerte Osteozyten sichtbar. Diese Zellen lagen eingemauert im Knochen, besaßen kein oder nur sehr wenig bläuliches bis rötliches Plasma und einen roten bis purpurnen Zellkern (Abb. 35 und 36). Dem knöchernen Kallus aufgelagert fand man Osteoblasten in aktiver oder inaktiver Form. Diese Zellen besaßen einen roten bis purpurnen Zellkern und bläuliches bis rötliches Plasma. Die inaktiven Osteoblasten waren eher flach und einzeln liegend (Abb. 35). Aktive Osteoblasten lagen in Reihen nebeneinander. Sie hatten eine eher kubische Form (Abb. 36). Zudem wurden auf der Knochenoberfläche auch Osteoklasten gefunden. Diese Zellen waren sehr groß und besaßen mehrere rote Zellkerne. Das Zytoplasma war rosa gefärbt und die Zellen saßen auf der Knochenoberfläche in Resorptionslakunen, den sogenannten Howship-Lakunen (Abb. 37).

## *Gelatinescaffoldgruppen*

In der Gelatinescaffoldgruppe 1 zeigte kein Tier eine knöcherne Überbrückung des Defektes. Zudem waren keine Knorpelareale zu finden. Der knöcherne Kallus war nur spärlich ausgebildet. Er begann an den periostalen proximalen und distalen Rändern der Kortikales und zog dann zwischen den lateralen und medialen Osteotomieenden entlang und verband diese. Dadurch war die Markhöhle zum Osteotomiespalt hin abgeschlossen (Abb. 38). Der Kallus bestand bei zwei von sechs Tieren auf der proximalen und der distalen Seite aus eher lockerem Geflechtknochen. Bei zwei Tieren bestand nur eine Seite des Kallus schon aus strukturiertem Lamellenknochen und bei zwei weiteren Tieren waren beide Seiten des Kallus (proximal und distal) zu Lamellenknochen umgewandelt. Diese Kallusenden wirkten wie ein dünner kompakter „Steg“, der zwischen den Kortikalisenden langzog. Bei allen Tieren waren die Enden des knöchernen Kallus zum Osteotomiespalt hin abgerundet (Abb. 38). Auf der

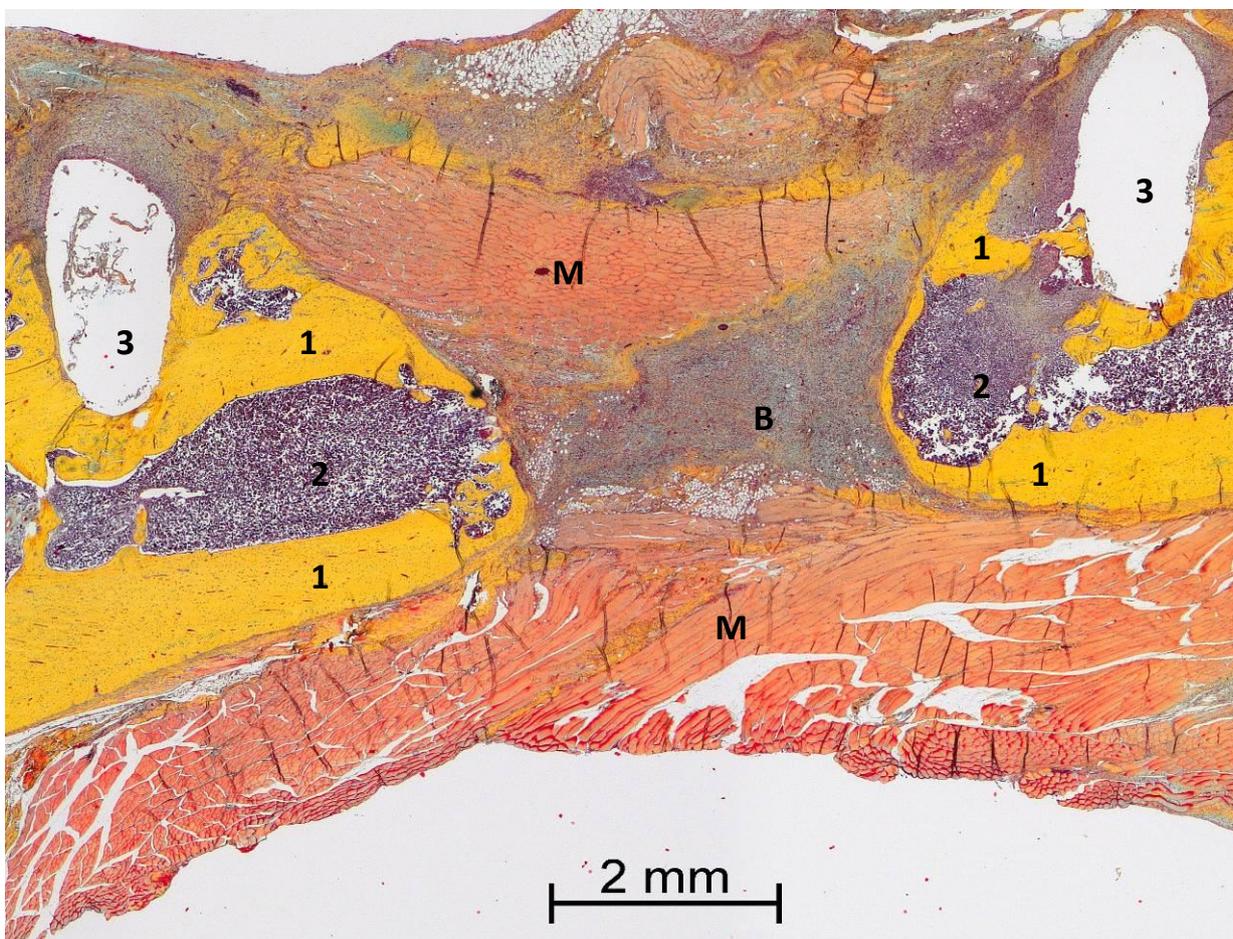
äußeren Oberfläche des Kallus aller Tiere zeigten sich nur vereinzelt inaktive abgeflachte Osteoblasten (Abb. 35). Bei den Tieren deren Kallusenden noch aus Geflechtknochen bestanden, gab es aktive Osteoblasten in den Hohlräumen der Geflechtbälkchen an der Knochenoberfläche (Abb. 36). Im Osteotomiespalt zwischen den Kallusenden befand sich lockeres unstrukturiertes Bindegewebe, welches teilweise mit Fettgewebe durchzogen war (Abb. 32). Entzündungsanzeichen in Form von Einblutungen und Zellverdichtungen konnten nicht gesehen werden. Bei drei Tieren waren zudem große Muskelanteile in den Osteotomiespalt vorgefallen (Abb. 32). Bei zwei weiteren Tieren zogen vereinzelt Muskelfasern durch das Bindegewebe im Osteotomiespalt. Bei zwei von sechs Tieren zogen Teile des oben erwähnten, durch die Knochenlysen um die Pinlöcher gebildeten, periostalen Kallus bis in die ROI und gingen somit teilweise in die Analyse als neugebildeter Knochen mit ein.

In der Gelatinescaffoldgruppe 2 kam es bei keinem der Tiere zu einer knöchernen Überbrückung. Allerdings standen zwei Tiere kurz davor. Bei diesen Tieren ragten die Kallusenden weit in den Osteotomiespalt hinein. Bei einem dieser beiden Tiere gab es eine knorpelige Überbrückung des Osteotomiespalt (Abb. 39). Hyaliner Knorpel konnte zudem noch bei einem weiteren Tier gefunden werden. Der Knorpel stellte sich deutlich in Form hypertropher Chondrozyten dar, welche säulenartig angeordnet waren. Das Knorpelgewebe war dem knöchernen Kallus aufgelagert. Chondrozyten, deren Matrix bereits mineralisierte, zeigten eine deutliche Gelbfärbung (Abb. 40). Außer bei den eben genannten beiden Tieren stellten sich die Osteotomiespalten sonst wie für die Gelatinescaffoldgruppe 1 beschrieben dar. Die Kallusenden waren abgerundet und der Geflechtknochen zum Teil schon in Lamellenknochen umgewandelt (Abb. 38). Nur bei einem Tier waren vereinzelt aktive Osteoblasten an der Oberfläche des Kallus zu sehen (Abb. 36). Dies war das Präparat welches einen sehr großen knöchernen endostalen Kallus aufwies. Alle anderen Tiere enthielten nur vereinzelt flache inaktive Osteoblasten auf der Kallusoberfläche (Abb. 35). Teilweise gab es bei diesen Tieren jedoch aktive Osteoblasten zwischen den Bälkchen der Kallusenden, die noch aus Geflechtknochen bestanden. Im Osteotomiespalt zwischen den Kallusenden befand sich lockeres unstrukturiertes Bindegewebe, teilweise von Fettgewebe durchzogen (Abb. 32), bei zwei Tieren fand man auch Muskelfasern dazwischen. Entzündungszeichen waren nicht nachweisbar. Bei zwei Tieren zog der um die osteotomienahen Pinlöcher gebildete periostale Kallus bis in die ROI und ging somit teilweise in die Analyse als neugebildeter Knochen mit ein.

### ***Spongiosakontrollgruppe***

In der Spongiosakontrollgruppe war der Defekt vor allem mit dem Spongiosazyylinder gefüllt. Dieser war gut als ein Geflecht aus kompakten Knochenbalken zu erkennen. Die Spongiosa war durch ihre kompaktere Struktur und teilweise dunklere Färbung eindeutig vom neugebildetem knöchernen Kallus zu unterscheiden (Abb. 41). Es gab auch in dieser Gruppe keine knöcherne Überbrückung. In drei Präparaten war hyalines Knorpelgewebe zu sehen. Bei allen fünf Präparaten bestand der knöcherne Kallus aus lockerem Geflechtknochen (Abb. 34), welcher teilweise bis zwischen die xenogenen Spongiosabälkchen reichte und diese umschloss. Bei drei Präparaten wirkte ein Ende des Kallus abgerundet und endete vor dem Spongiosazyylinder. Bei drei Präparaten waren viele aktive Osteoblasten zwischen den Knochenbälkchen sowie auf der Oberfläche des Kallus zu finden (Abb. 36). Bei zwei Präparaten waren aktive Osteoblasten nur spärlich zu sehen. Vorherrschend waren hier eher

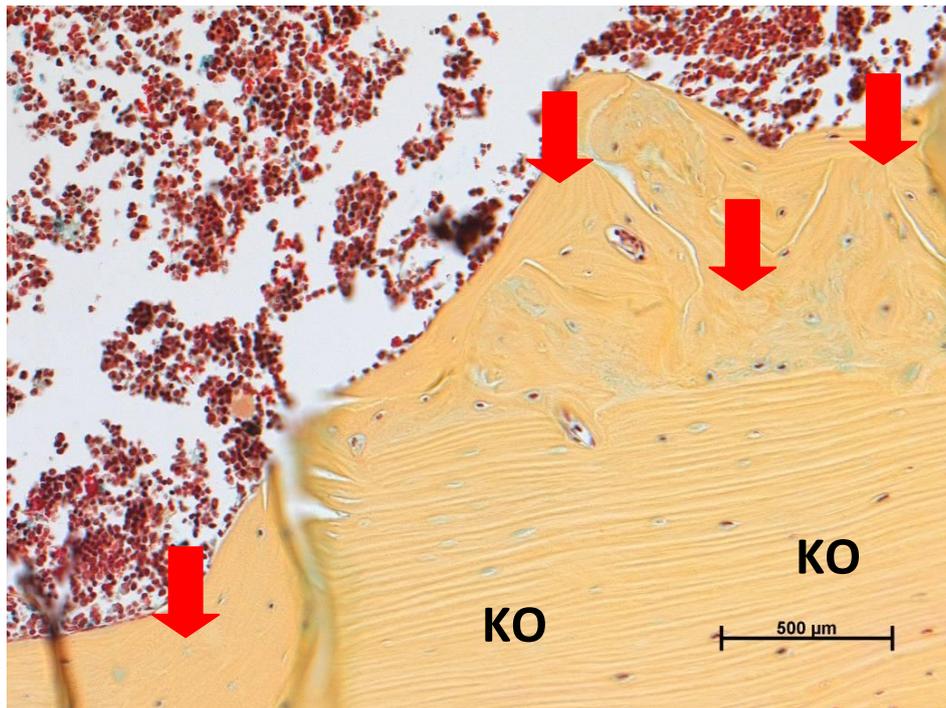
abgeflachte inaktive Osteoblasten (Abb. 35). An der Oberfläche der Spongiosatransplantate gab es viele Osteoklasten (Abb. 37). Die Ränder der Spongiosa darunter waren nicht mehr glatt und wirkten durch die Resorptionslakunen „angenagt“. Lediglich im Osteotomiespalt eines Präparates der Spongiosakontrollgruppe waren geringe Mengen Muskelgewebe in Form von einzelnen Muskelfasern zu finden. Bei einem Präparat war die Spongiosa teilweise nach medial disloziert. In diesem Präparat hatte sich ein besonders prominenter periostaler knöcherner Kallus nach medial hin gebildet, der teilweise bis in die ROI zog und somit in die Analyse als neugebildeter Knochen mit einging.



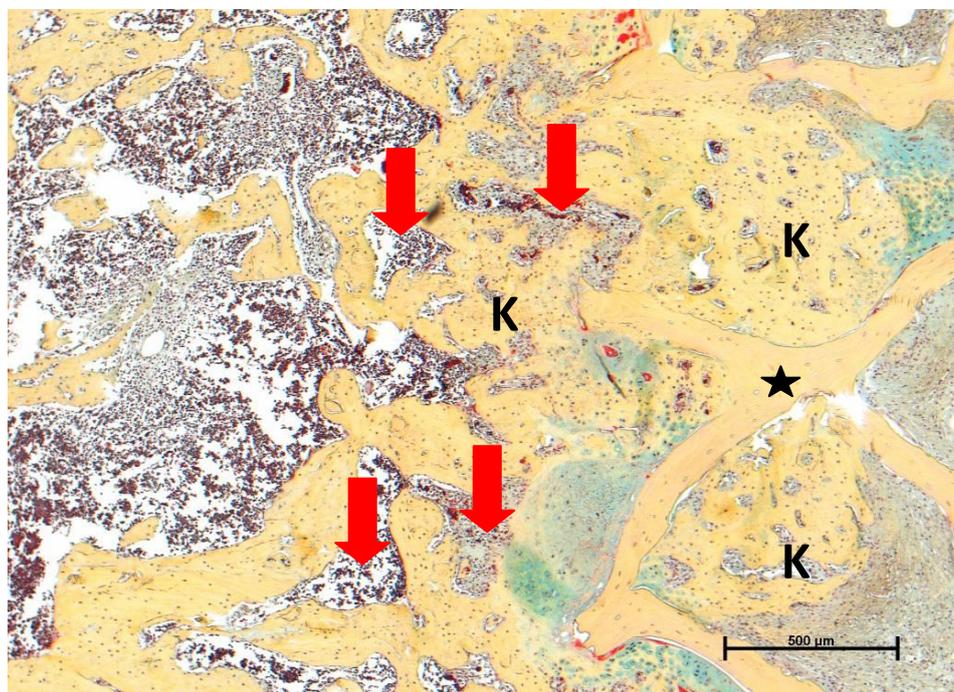
*Abb. 32: Übersicht der Femurosteotomie eines Tieres der Gelatinescaffoldgruppe 1 (Movat Pentachrom-Färbung).*

**Im zentralgelegenen Osteotomiespalt befindet sich vor allem Bindegewebe (B). Muskelgewebe ist leuchtend rot und fällt teilweise in den Osteotomiespalt vor (M).**

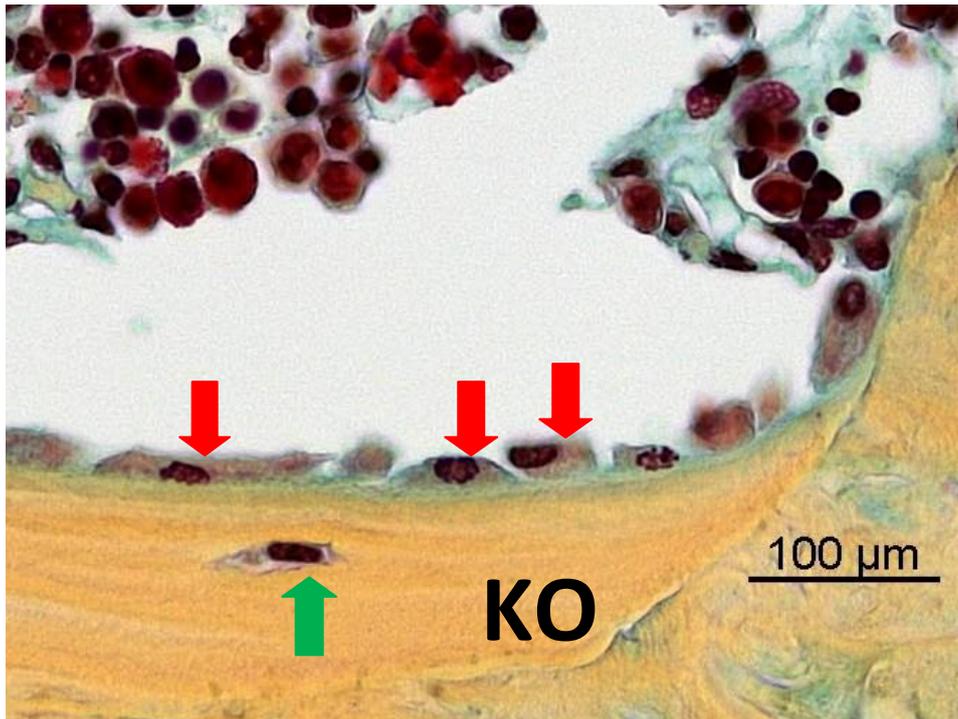
**Kortikalis (1), Markraum (2), Pinlöcher (3)**



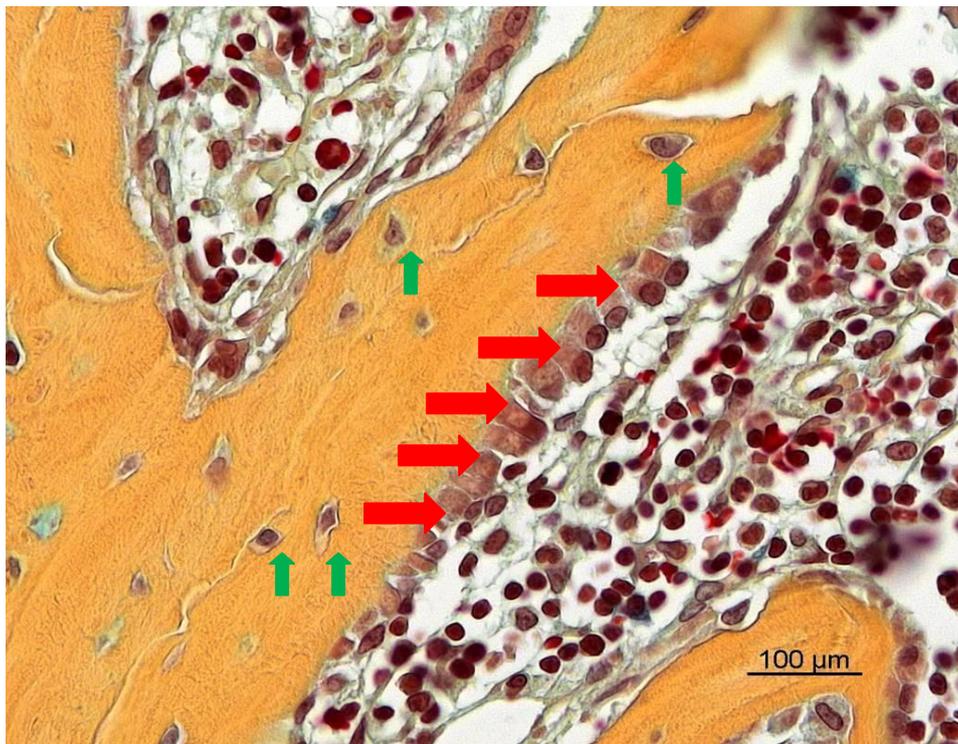
**Abb. 33: Ansicht der Kortikalisränder (Movat Pentachrom-Färbung).**  
Die Kortikalis (KO) als gleichmäßig mineralisiertes Gewebe. Die Maserung weist einen gleichmäßigen, longitudinalen Verlauf auf. Den eigentlich glatten Rändern der Kortikalis ist periostal und endostal neu synthetisierter kallöser Knochen aufgelagert (rote Pfeile).



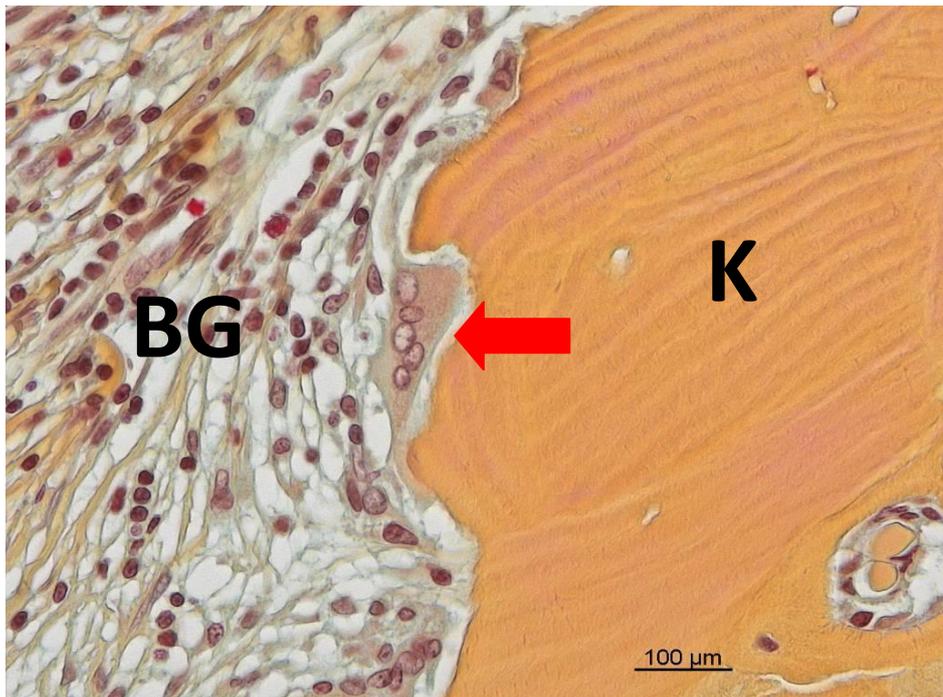
**Abb. 34: Ansicht des endostalen Kallus (Movat Pentachrom-Färbung).**  
Knöcherner Kallus aus kompakten Geflechtknochenbälkchen (K), unterschiedlich große Kavernen mit Bindegewebe gefüllt (rote Pfeile), Spongiosatransplantat: ★



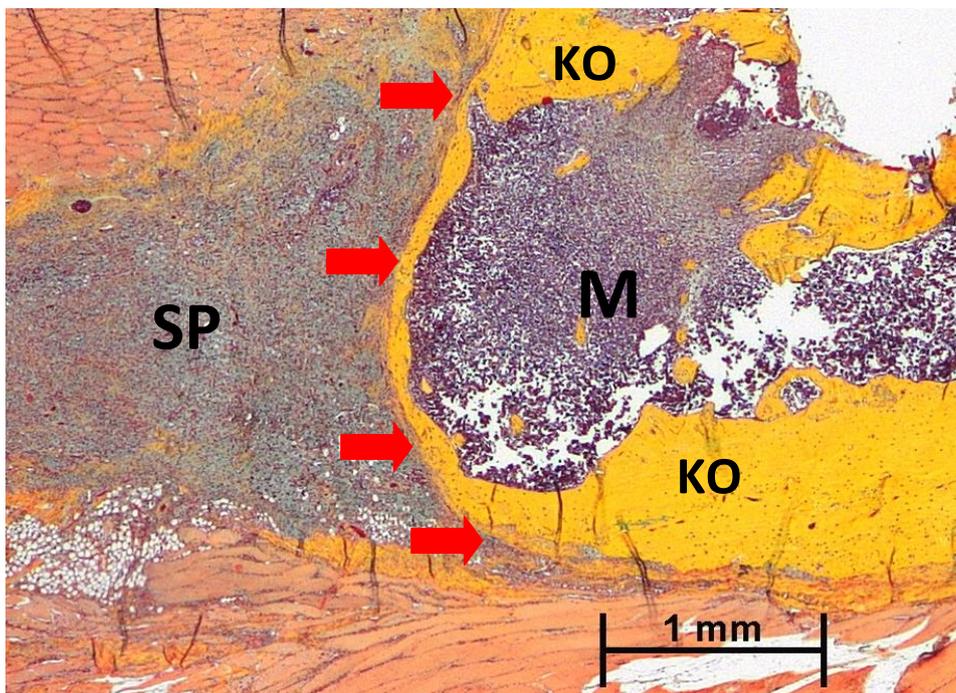
**Abb. 35: Inaktive Osteoblasten am knöchernen Kallus (Movat Pentachrom-Färbung).**  
 Inaktive Osteoblasten (rote Pfeile) auf der Knochenoberfläche der Kortikalis (KO). Sie sind eher flach und liegen einzeln. Darunter eingemauert ein Osteozyt (grüner Pfeil).



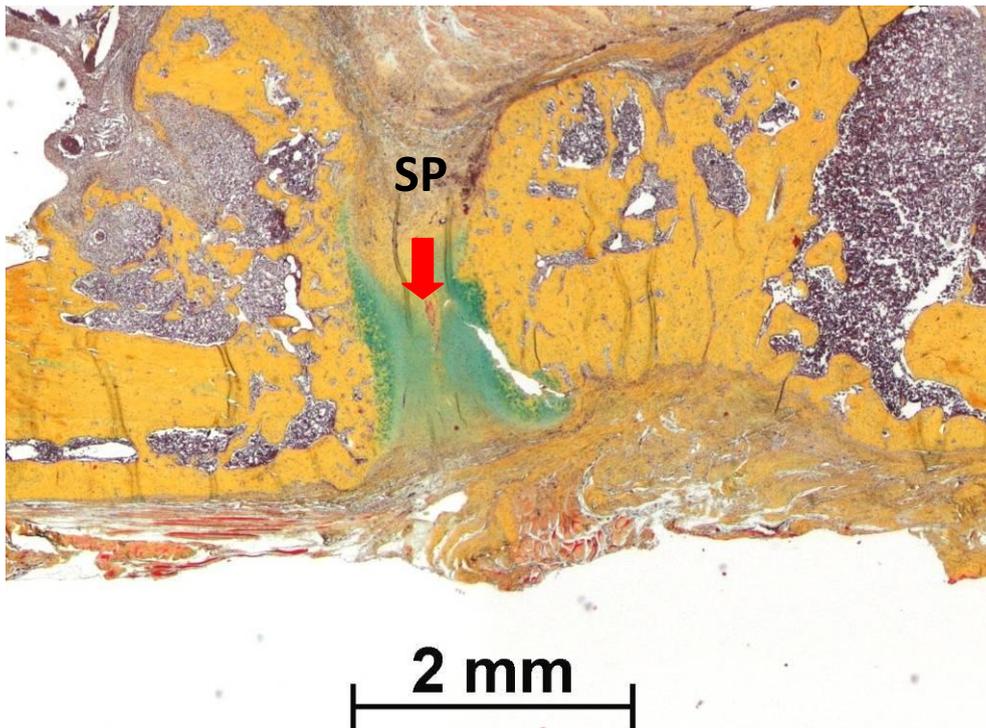
**Abb. 36: Aktive Osteoblasten am knöchernen Kallus (Movat Pentachrom-Färbung).**  
 Aktive Osteoblasten an der Knochenoberfläche (rote Pfeile). Sie sind kubisch geformt und aneinander gereiht. Im Knochen sind viele eingemauerte Osteozyten zu sehen (grüne Pfeile).



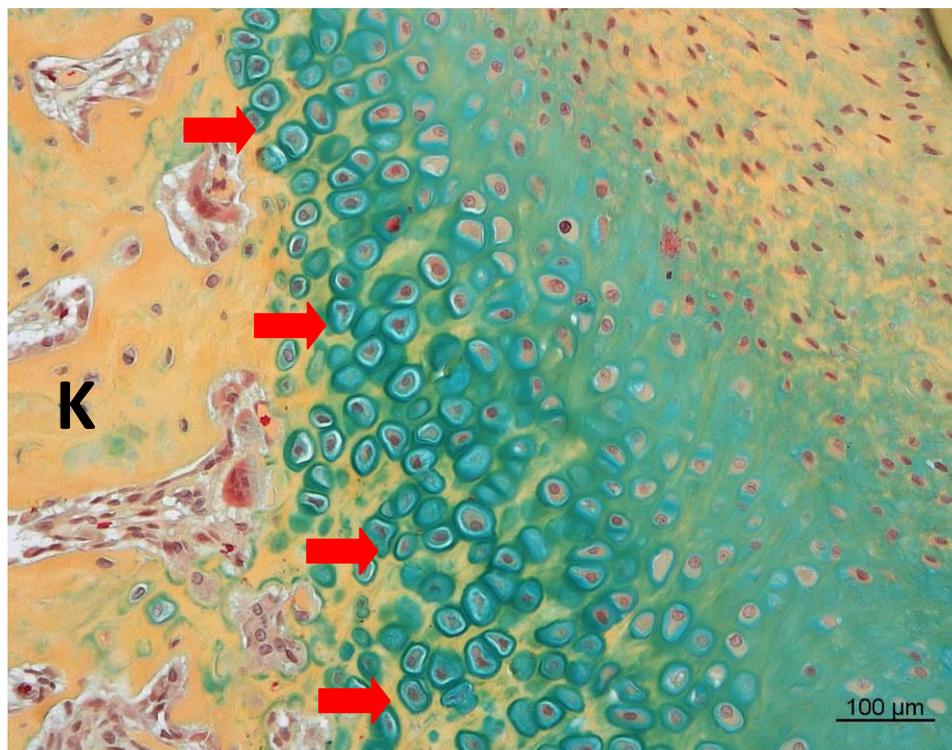
**Abb. 37: Osteoklast an Spongiosa (Movat Pentachrom-Färbung).** Osteoklast in Resorptionslakune (roter Pfeil) an der Knochenoberfläche. Charakteristisch sind das granuliertes Zytoplasma und die zahlreichen (5) Zellkerne. BG: Bindegewebe; K: Knochen



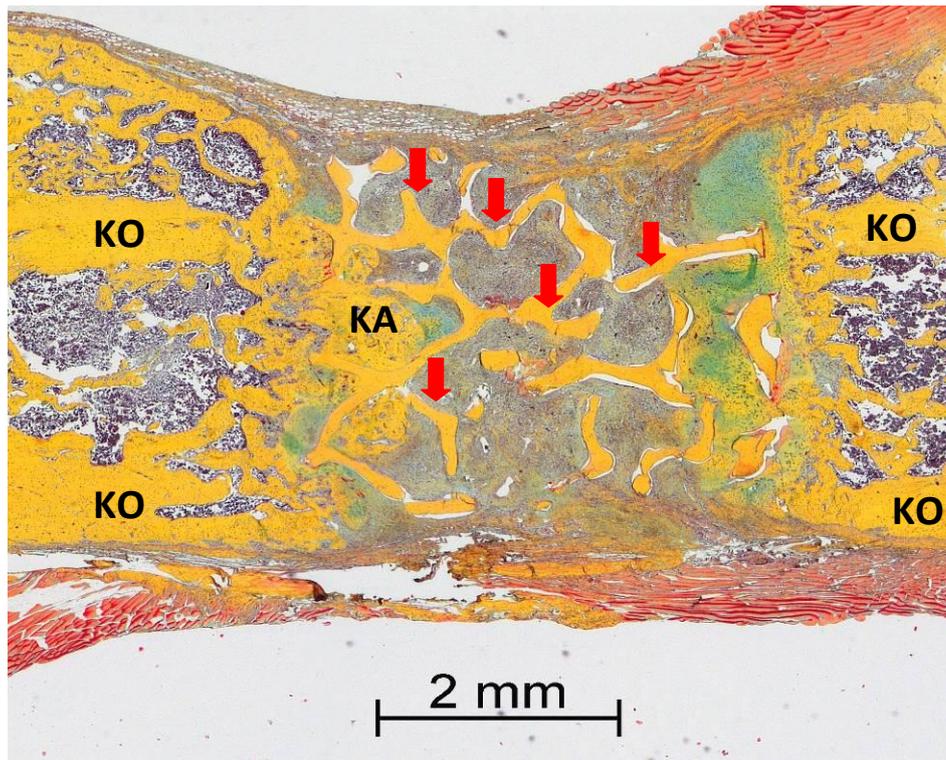
**Abb. 38: Abgerundeter knöcherner Kallus (Movat Pentachrom-Färbung).** Der knöcherne Kallus (rote Pfeile) beginnt periostal medial und lateral an den Rändern der Kortikalis (KO) und zieht zwischen diesen als dünner kompakter „Steg“ entlang. Die Enden sind zum Osteotomiespalt (SP) hin abgerundet. Die Markhöhle (M) ist dadurch zum Osteotomiespalt hin abgeschlossen.



**Abb. 39: Knorpelige Überbrückung des Osteotomiespalt (Movat Pentachrom-Färbung).** Der knöcherne Kallus reicht weit in den Osteotomiespalt (SP) hinein und es ist zu einer knorpeligen Überbrückung gekommen (roter Pfeil).



**Abb. 40: Knorpelgewebe, Ausschnitt aus Abb. 39 (Movat Pentachrom-Färbung).** Der hyaline Knorpel erkennbar an den hypertrophen Chondrozyten, die säulenartig angeordnet sind (rote Pfeile). Das Knorpelgewebe ist dem knöchernen Kallus aufgelagert (K).



**Abb. 41: Spongiosatransplantat im Osteotomiespalt (Movat Pentachrom-Färbung).**

Der Defekt ist vorwiegend mit dem Spongiosazylinder gefüllt. Dieser ist gut als ein Geflecht aus kompakten Knochenbalken zu erkennen. Die Spongiosa ist durch ihre kompaktere Struktur und teilweise dunklere Färbung eindeutig vom neugebildetem knöchernen Kallus zu unterscheiden.

**Kallus: KA; Spongiosatransplantat: rote Pfeile; Kortikalis: KO**

#### 4.3.2 Histomorphometrie

Alle in 4.1 genannten Tiere gingen in die Auswertung ein. Von jedem Tier wurde ein Schnitt in der Movat Pentachrom Färbung analysiert.

#### *Gelatinescaffoldgruppen*

Die Gelatinescaffoldgruppe 1 hatte eine Bone Area von  $3,37 \pm 1,42 \text{ mm}^2$  und eine Cartilage Area von  $0,01 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ . Bei der Gelatinescaffoldgruppe 2 betrug die Bone Area  $6,10 \pm 1,78 \text{ mm}^2$  und die Cartilage Area  $0,21 \pm 0,34 \text{ mm}^2$  (Tabelle 3). Die Bone Area ( $p = 0,023$ ) und die Cartilage Area ( $p = 0,032$ ) waren bei der Gelatinescaffoldgruppe 2 signifikant größer als bei der Gelatinescaffoldgruppe 1 (Abb. 43 und 44). Der periostale Anteil der Bone Area war in der Gelatinescaffoldgruppe 2 mit  $3,45 \pm 1,57 \text{ mm}^2$  wesentlich größer als der der Gelatinescaffoldgruppe 1 mit  $1,50 \pm 0,79 \text{ mm}^2$ , jedoch war dieser Unterschied nach der Hochbergprozedur nicht mehr signifikant. In der Gelatinescaffoldgruppe 2 war der periostale Anteil der Cartilage Area mit  $0,07 \pm 0,10 \text{ mm}^2$  wesentlich größer als der der Gelatinescaffoldgruppe 1 mit  $0,01 \pm 0,01 \text{ mm}^2$  (Abb. 43 und 44). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Die Muscle Area betrug in der Gelatinescaffoldgruppe 1  $1,15 \pm 1,21 \text{ mm}^2$  und in der Gelatinescaffoldgruppe 2  $0,31 \pm 0,37 \text{ mm}^2$  und war somit in der Gelatinescaffoldgruppe 2 wesentlich kleiner als in der Gelatinescaffoldgruppe 1 (Abb. 46). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Sonst gab es keine Unterschiede in der Total

Area und der Connective Tissue Area zwischen den beiden Gelatinescaffoldgruppen (Abb. 42 und 45).

### ***Spongiosakontrollgruppe***

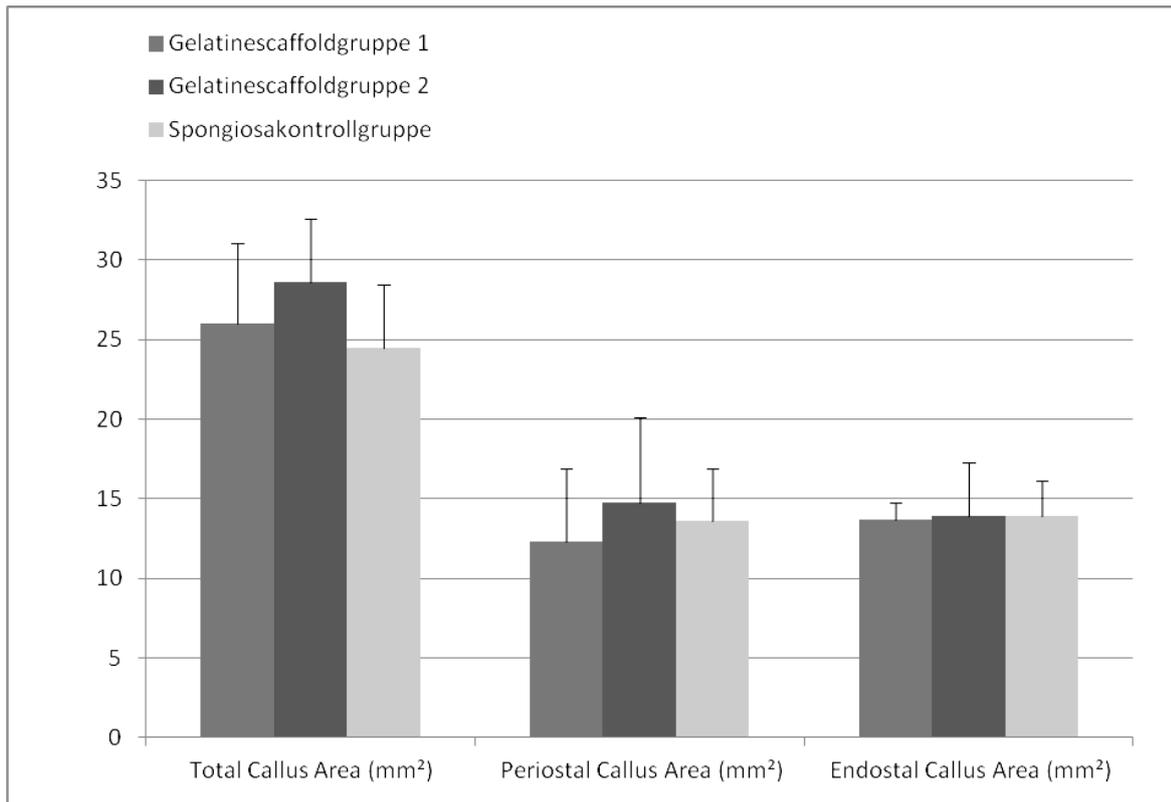
In der Spongiosakontrollgruppe betrug die Bone Area  $5,53 \pm 1,15 \text{ mm}^2$  und die Cartilage Area  $0,72 \pm 0,69 \text{ mm}^2$  (Tabelle 3). Die Gelatinescaffoldgruppe 1 hatte eine Bone Area von  $3,37 \pm 1,42 \text{ mm}^2$  und eine Cartilage Area von  $0,01 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ . Die Bone Area der Spongiosakontrollgruppe war signifikant größer als die der Gelatinescaffoldgruppe 1 ( $p = 0,045$ ) (Abb. 43). Auch der periostale und endostale Anteil der Bone Area war in der Spongiosakontrollgruppe wesentlich größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1, die Unterschiede waren nicht signifikant (Abb. 43). Die Cartilage Area der Spongiosakontrollgruppe war wesentlich größer als die der Gelatinescaffoldgruppe 1, jedoch war dieser Unterschied nach der Hochbergprozedur nicht mehr signifikant (Abb. 44). Im endostalen Bereich der Cartilage Area gab es einen signifikanten Unterschied ( $p = 0,027$ ) zwischen der Spongiosakontrollgruppe und der Gelatinescaffoldgruppe 1 (Abb. 44). Die Spongiosakontrollgruppe hatte mit  $0,43 \pm 0,43 \text{ mm}^2$  eine signifikant größere endostale Cartilage Area als die Gelatinescaffoldgruppe 1 mit  $0,0 \pm 0,0 \text{ mm}^2$ . Auch die Muscle Area war in der Gelatinescaffoldgruppe 1 mit  $1,15 \pm 1,21 \text{ mm}^2$  wesentlich prominenter als in der Spongiosakontrollgruppe mit  $0,04 \pm 0,09 \text{ mm}^2$  (Abb. 46). Der Unterschied war nicht signifikant. Es gab keine Unterschiede in der Total Area oder in der Connective Tissue Area zwischen den beiden Gruppen (Abb. 42 und 45).

Bei der Gelatinescaffoldgruppe 2 betrug die Bone Area  $6,10 \pm 1,78 \text{ mm}^2$  und die Cartilage Area  $0,21 \pm 0,34 \text{ mm}^2$ . In der Spongiosakontrollgruppe betrug die Bone Area  $5,53 \pm 1,15 \text{ mm}^2$  und die Cartilage Area  $0,72 \pm 0,69 \text{ mm}^2$ . Die Bone Areas unterschieden sich zwischen der Spongiosakontrollgruppe und der Gelatinescaffoldgruppe 2 nicht (Abb. 43). Die Cartilage Area war in der Spongiosakontrollgruppe wesentlich größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 2, allerdings ohne Signifikanz (Abb. 44). Es gab keine Unterschiede in der Total Area, der Muscle Area oder der Connective Tissue Area (Abb. 42, 45 und 46).

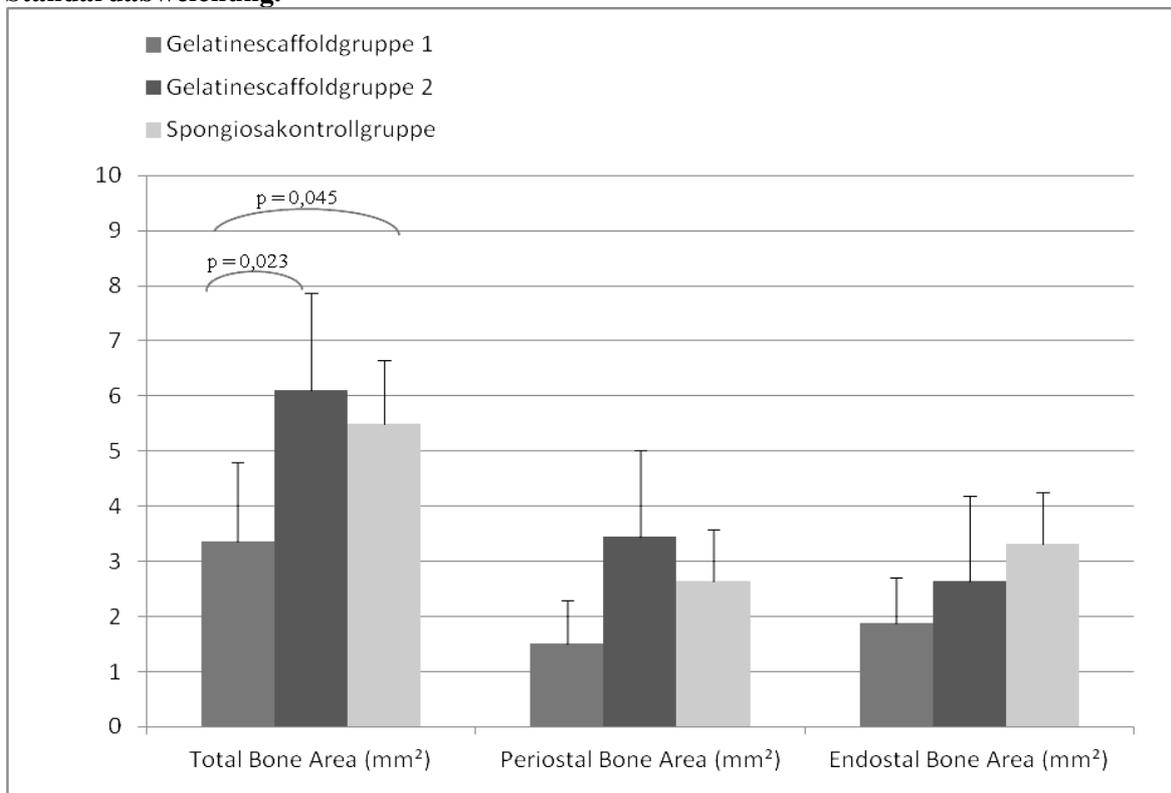
### **4.3.3 Messung des Osteotomiespaltes**

Alle in 4.1 genannten Tiere gingen in die Auswertung ein. Von jedem Tier wurde ein Schnitt in der Movat Pentachrom Färbung vermessen.

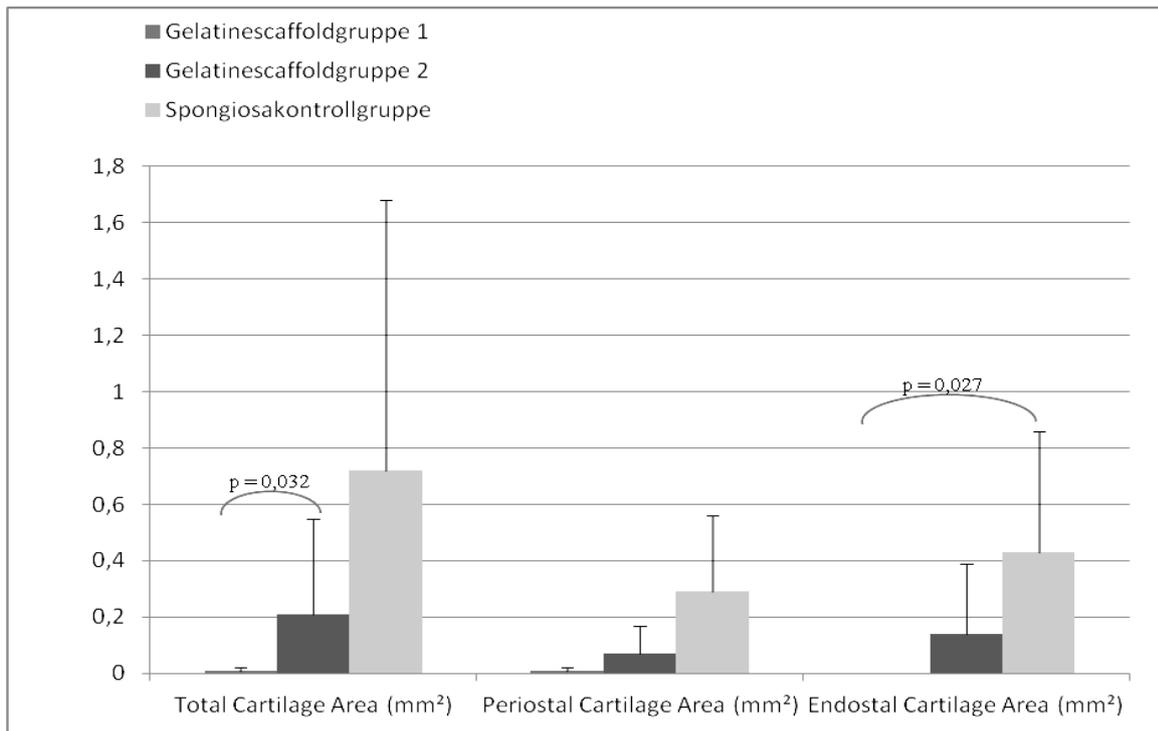
Die Osteotomiespaltlänge nach sechs Wochen betrug in der Gelatinescaffoldgruppe 1  $3,34 \pm 0,45 \text{ mm}$ , in der Gelatinescaffoldgruppe 2  $1,46 \pm 0,68 \text{ mm}$  und in der Spongiosakontrollgruppe  $2,35 \pm 1,00 \text{ mm}$  (Tabelle 4). Die Distanz zwischen den knöchernen Kallusenden war in der Gelatinescaffoldgruppe 2 signifikant kleiner als in der Gelatinescaffoldgruppe 1 ( $p = 0,00$ ). Auch in der Spongiosakontrollgruppe war die Distanz kleiner, jedoch nicht signifikant, als in der Gelatinescaffoldgruppe 1 (Abb. 47).



**Abb. 42: Diagramm mit Callus Area.**  
**Kallusflächen in mm²: total, periosteal und endosteal. Mittelwerte mit positiver Standardabweichung.**

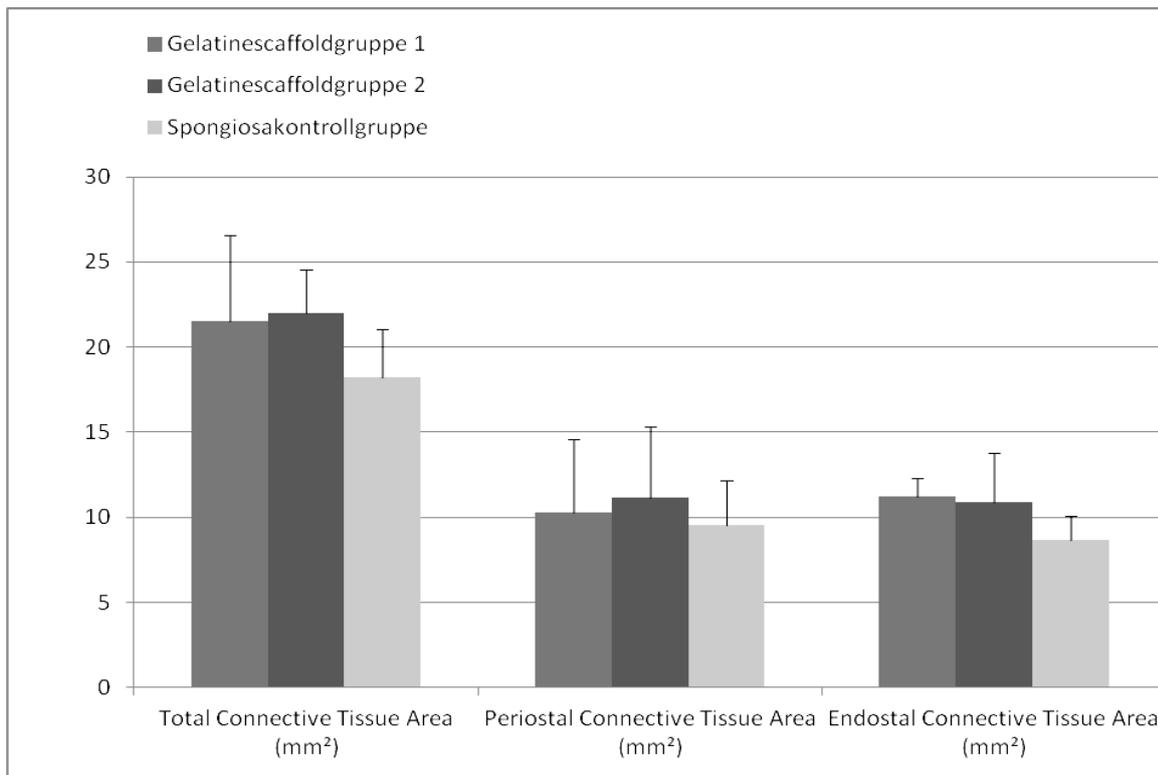


**Abb. 43: Diagramm mit Bone Area.**  
**Knochenflächen in mm²: total, periosteal und endosteal. Mittelwerte mit positiver Standardabweichung und signifikanten Unterschieden (p).**



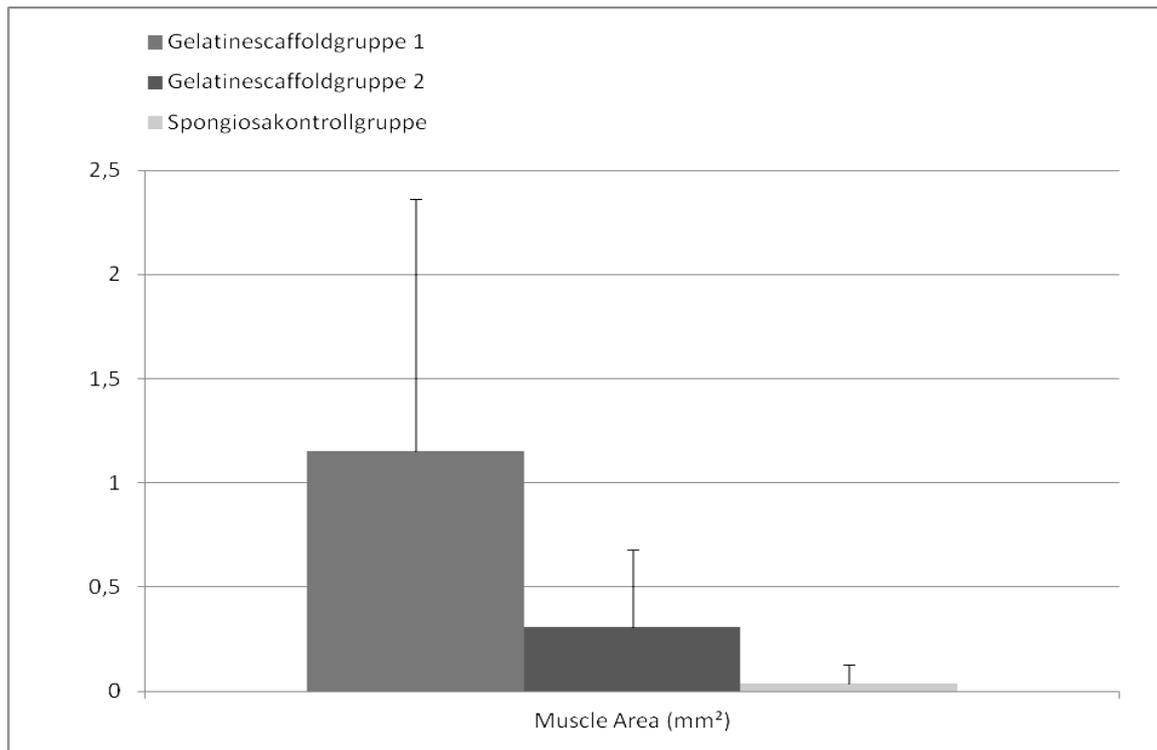
**Abb. 44: Diagramm mit Cartilage Area.**

**Knorpelflächen in mm<sup>2</sup>: total, periosteal und endosteal. Mittelwerte mit positiver Standardabweichung und signifikanten Unterschieden (p).**



**Abb. 45: Diagramm mit Connective Tissue Area.**

**Bindegewebsflächen in mm<sup>2</sup>: total, periosteal und endosteal. Mittelwerte mit positiver Standardabweichung.**

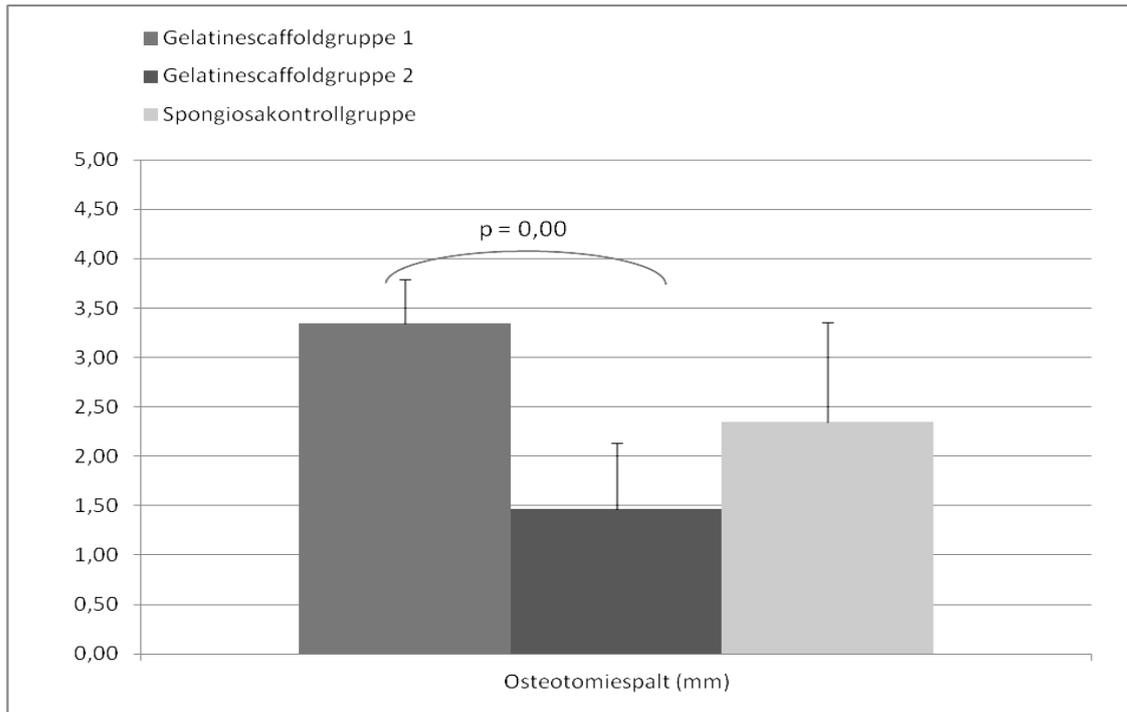


**Abb. 46: Diagramm mit Muscle Area.**  
Muskelprolaps in den Osteotomiespalt in mm<sup>2</sup>. Mittelwerte mit positiver Standardabweichung.

**Tabelle 3: Ergebnisse histomorphometrische Messungen.**

Dargestellt sind alle Ergebnisse (Mittelwerte und Standardabweichungen) für die histomorphometrischen Messungen.

Region/Parameter	Gelatinescaffoldgruppe 1	Gelatinescaffoldgruppe 2	Spongiosakontrollgruppe
<b>Total Callus</b>			
Total Callus Area (mm <sup>2</sup> )	26.02 ± 5.05	28.64 ± 3.95	24.51 ± 3.96
Bone Area (mm <sup>2</sup> )	3.37 ± 1.42	6.10 ± 1.78	5.50 ± 1.14
Cartilage Area (mm <sup>2</sup> )	0.01 ± 0.01	0.21 ± 0.34	0.72 ± 0.69
Connective Tissue Area (mm <sup>2</sup> )	21.49 ± 5.10	22.02 ± 2.54	18.22 ± 2.83
Muscle Area (mm <sup>2</sup> )	1.15 ± 1.21	0.31 ± 0.37	0.04 ± 0.09
<b>Periostal Callus</b>			
Periostal Area (mm <sup>2</sup> )	12.34 ± 4.53	14.73 ± 5.37	13.63 ± 3.26
Bone Area (mm <sup>2</sup> )	1.50 ± 0.79	3.45 ± 1.57	2.64 ± 0.93
Cartilage Area (mm <sup>2</sup> )	0.01 ± 0.01	0.07 ± 0.10	0.29 ± 0.27
Connective Tissue Area (mm <sup>2</sup> )	10.29 ± 4.30	11.13 ± 4.20	9.54 ± 2.61
<b>Endostal Callus</b>			
Endostal Area (mm <sup>2</sup> )	13.69 ± 1.05	13.89 ± 3.37	13.90 ± 2.27
Bone Area (mm <sup>2</sup> )	1.87 ± 0.84	2.65 ± 1.53	3.31 ± 0.94
Cartilage Area (mm <sup>2</sup> )	0.0 ± 0.0	0.14 ± 0.25	0.43 ± 0.43
Connective Tissue Area (mm <sup>2</sup> )	11.21 ± 1.07	10.88 ± 2.88	8.68 ± 1.37



**Abb. 47: Diagramm Osteotomiespaltlänge.**

**Osteotomiespaltlänge in mm nach sechs Wochen. Mittelwerte mit positiver Standardabweichung und signifikante Unterschiede (p).**

**Tabelle 4: Ergebnisse Osteotomiespaltmessung.**

**Dargestellt sind die Ergebnisse (Mittelwerte und Standardabweichungen) für die Osteotomiespaltmessungen.**

	Gelatinescaffoldgruppe 1	Gelatinescaffoldgruppe 2	Spongiosakontrollgruppe
Osteotomiespalt (mm)	3,34 ± 0,45	1,46 ± 0,68	2,35 ± 1,00

#### 4.3.4 AlphaSMA-Färbung

In die Auswertung der alphaSMA Immunhistochemie gingen alle in 4.1 genannten Tiere ein. Es wurde je 1 Schnitte in der alphaSMA Färbung analysiert.

#### *Deskriptive Auswertung*

Die Blutgefäße konnten im Bindegewebe (wozu auch das Knochenmark zählte) und in den Muskelanteilen nachgewiesen werden. Es wurden nur die im Bindegewebe, nicht die in den Muskeln gezählt. Im Knochenmarksbereich waren nur vereinzelt Gefäße zu sehen. In der Kortikalis, dem knöchernen Kallusanteil und den Knorpelarealen waren keine Gefäße nachweisbar. Die Blutgefäße, die quer angeschnitten waren stellten sich rund mit Lumen dar, diejenigen, die längs angeschnitten waren, erschienen als längliche, sich teilweise windende, hohle Schläuche (Abb. 51). Die Größe variierte von kleinsten Kapillaren bis zu größeren Arteriolen oder Venolen. Teilweise waren noch Erythrozyten in den Lumen zu erkennen. Die muskuläre Schicht der Gefäße war rosa bis rot gefärbt, wobei es, je nach Gefäßart,

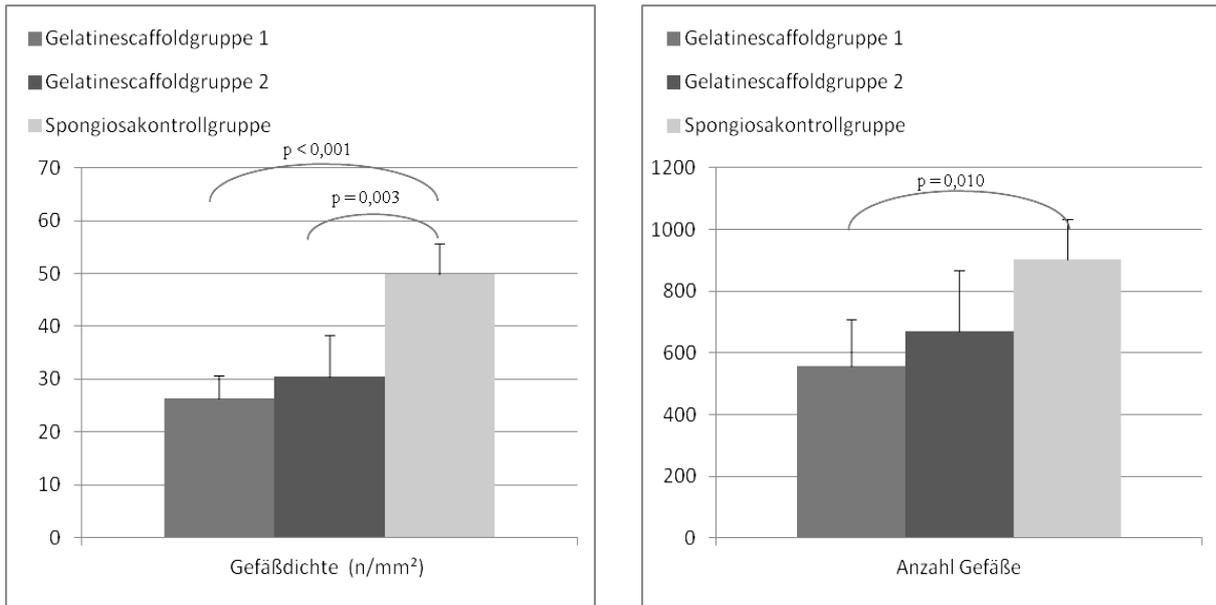
Unterschiede in der Dicke der Muskularisschicht gab (Abb. 51). In den Gelatinescaffoldgruppen konnten die Gefäße eher am Rand des Spaltbereiches (periostal) gefunden werden, während sie bei der Spongiosakontrollgruppe gleichmäßiger verteilt waren und auch eine große Anzahl im Bindegewebe endostal zu sehen war.

### ***Gelatinescaffoldgruppen***

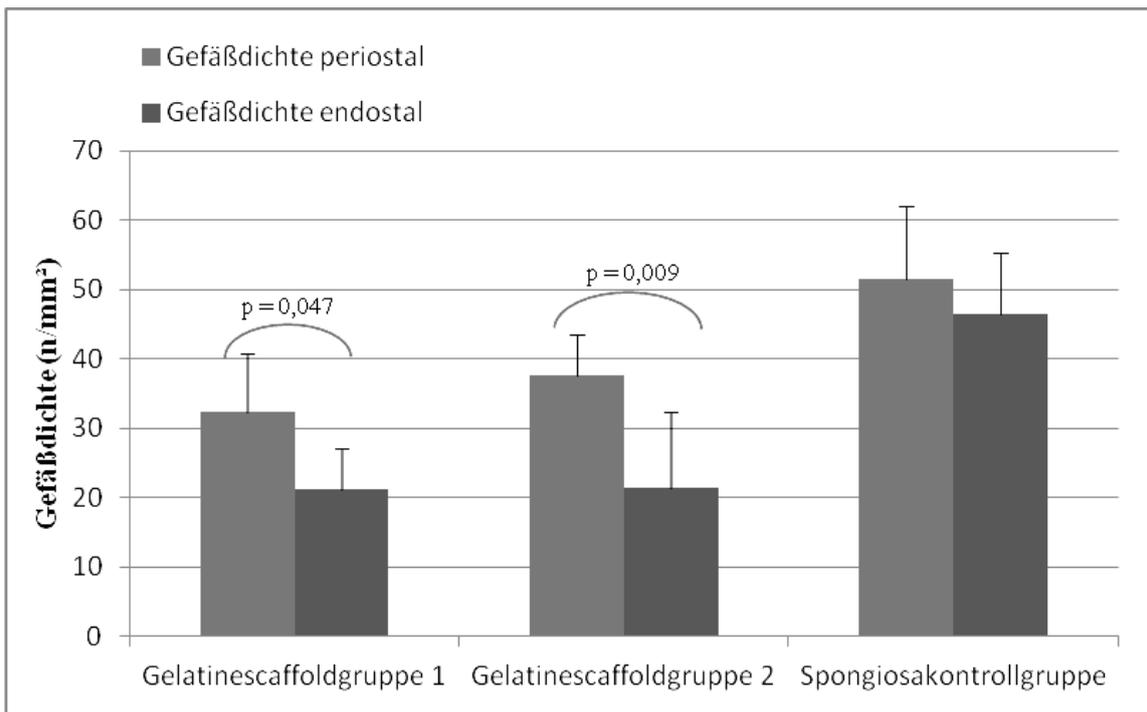
Die gesamte Anzahl an Blutgefäßen betrug in der Gelatinescaffoldgruppe 1  $558,3 \pm 150,7$  und in der Gelatinescaffoldgruppe 2  $669,3 \pm 197,9$ . Die Blutgefäßdichte betrug bei der Gelatinescaffoldgruppe 1  $26,3 \pm 4,3$  Blutgefäße/mm<sup>2</sup> und bei der Gelatinescaffoldgruppe 2  $30,4 \pm 7,9$  Blutgefäße/mm<sup>2</sup> (Tabelle 5). Bei der Blutgefäßzählung gab es zwischen den beiden Gelatinescaffoldgruppen keine Unterschiede. Weder in der absoluten Anzahl noch in der Blutgefäßdichte (Abb. 48 und 49). Innerhalb der Gelatinescaffoldgruppe 1 konnten signifikant mehr Blutgefäße im periostalen als im endostalen Bereich gefunden werden (Blutgefäßdichte periostal:  $32,4 \pm 8,4$  Blutgefäße/mm<sup>2</sup>; Blutgefäßdichte endostal:  $21,2 \pm 5,8$  Blutgefäße/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,047$ ). Dies galt auch für die Gelatinescaffoldgruppe 2 (Blutgefäßdichte periostal:  $37,5 \pm 6,1$  Blutgefäße/mm<sup>2</sup>; Blutgefäßdichte endostal:  $21,4 \pm 11,0$  Blutgefäße/mm<sup>2</sup>;  $p = 0,009$ ) (Abb. 50).

### ***Spongiosakontrollgruppe***

Die gesamte Anzahl der Blutgefäße betrug bei der Spongiosakontrollgruppe  $902 \pm 132,9$  (Tabelle 5). In der Gelatinescaffoldgruppe 1 betrug die gesamte Anzahl an Blutgefäßen  $558,3 \pm 150,7$  und in der Gelatinescaffoldgruppe 2  $669,3 \pm 197,9$ . Die Spongiosakontrollgruppe hatte absolut signifikant mehr Blutgefäße als die Gelatinescaffoldgruppe 1 ( $p = 0,010$ ). Zusätzlich waren wesentlich mehr Blutgefäße in der Spongiosakontrollgruppe als in der Gelatinescaffoldgruppe 2, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (Abb. 49). Die Blutgefäßdichte betrug bei der Spongiosakontrollgruppe  $49,9 \pm 5,8$  Blutgefäße/mm<sup>2</sup>. Die Blutgefäßdichte in der Gelatinescaffoldgruppe 1 betrug  $26,3 \pm 4,3$  Blutgefäße/mm<sup>2</sup> und in der Gelatinescaffoldgruppe 2  $30,4 \pm 7,9$  Blutgefäße/mm<sup>2</sup>. Die Blutgefäßdichte der Spongiosakontrollgruppe war signifikant größer als die der Gelatinescaffoldgruppe 1 ( $p < 0,001$ ) und die der Gelatinescaffoldgruppe 2 ( $p = 0,003$ ) (Abb. 48). Innerhalb der Spongiosakontrollgruppe gab es keinen Unterschied der Blutgefäßdichte im periostalen und endostalen Bereich (Abb. 50).



**Abb. 48 und 49: Diagramme Blutgefäßdichte und absolute Blutgefäßanzahl.**  
 Dargestellt sind die Blutgefäßdichte in n/mm<sup>2</sup> (links) und die absolute Blutgefäßanzahl (rechts) nach sechs Wochen als Mittelwerte mit positiver Standardabweichung sowie signifikanten Unterschieden (p).

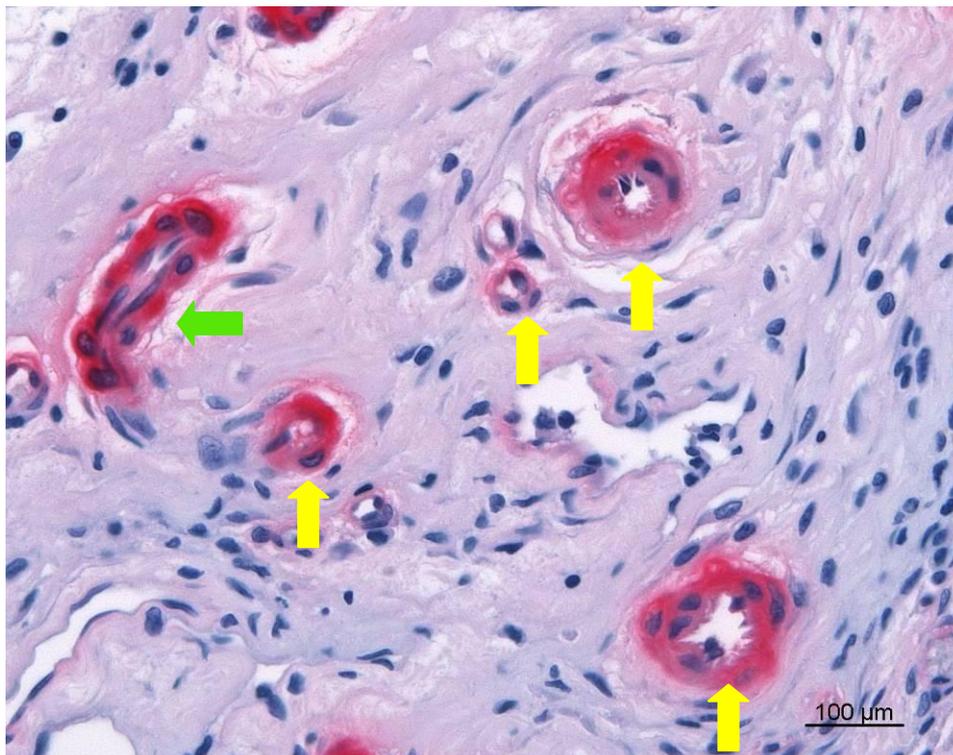


**Abb. 50: Diagramm Gefäßverteilung (periostal, endostal).**  
 Dargestellt ist die Gefäßdichte in n/mm<sup>2</sup> periostal und endostal innerhalb der einzelnen Gruppen als Mittelwerte mit positiver Standardabweichung sowie signifikanten Unterschieden (p).

**Tabelle 5: Ergebnisse der Blutgefäßzählung.**

Dargestellt sind die Ergebnisse (Mittelwerte und Standardabweichungen) für die Gefäßdichte und absolute Gefäßanzahl.

	Gelatinescaffoldgruppe 1	Gelatinescaffoldgruppe 2	Spongiosakontrollgruppe
Gefäßdichte (n/mm <sup>2</sup> )	26,3 ± 4,3	30,4 ± 7,9	49,9 ± 5,8
Gefäßdichte periostal (n/mm <sup>2</sup> )	32,4 ± 8,4	37,5 ± 6,1	51,5 ± 10,5
Gefäßdichte endostal (n/mm <sup>2</sup> )	21,2 ± 5,8	21,4 ± 11	46,4 ± 8,9
Anzahl Gefäße	558,3 ± 150,7	669,3 ± 197,9	902,4 ± 132,9
Anzahl Gefäße periostal	319 ± 138,4	429,3 ± 192	502,6 ± 187,5
Anzahl Gefäße endostal	239,3 ± 77	240 ± 138,3	399,8 ± 90,9



**Abb. 51: Positiv gefärbte Blutgefäße (alphaSMA-Färbung).**

Zu sehen sind unterschiedlich große Blutgefäße quer angeschnitten (gelber Pfeil) und längs angeschnitten (grüner Pfeil). Die muskuläre Schicht der Gefäße ist rosa bis rot gefärbt.

#### **4.3.5 TRAP-Färbung**

Alle in 4.1 genannten Tiere gingen in die Auswertung ein. Es wurde je 1 Schnitt in der TRAP-Färbung analysiert.

##### ***Deskriptive Auswertung***

Die Osteoklasten waren mehrkernig, rosa bis pink gefärbt und saßen auf dem Knochen in Resorptionslakunen, den sogenannten Howship-Lakunen (Abb. 54). Sie befanden sich zumeist am inneren und äußeren Rand des knöchernen Kallus. Bei den Präparaten, in denen der knöcherne Kallus nur aus einem dünnen „Steg“ zwischen der medialen und lateralen Kortikalis bestand, waren Osteoklasten eher selten zu finden. Sie befanden sich dann vor allem an der Kallusseite zum Markraum hin. In der Spongiosakontrollgruppe waren nur in einem Präparat wenige TRAP positive Osteoklasten an einem Spongiosabälkchen nachzuweisen. Ansonsten waren keine Osteoklasten an den Spongiosatransplantaten direkt TRAP positiv gefärbt. Im Bereich der Knochenlysen an den Pinlöchern waren vermehrt Osteoklasten zu sehen. Dies wurde nicht ausgewertet, da sie außerhalb der ROI lagen.

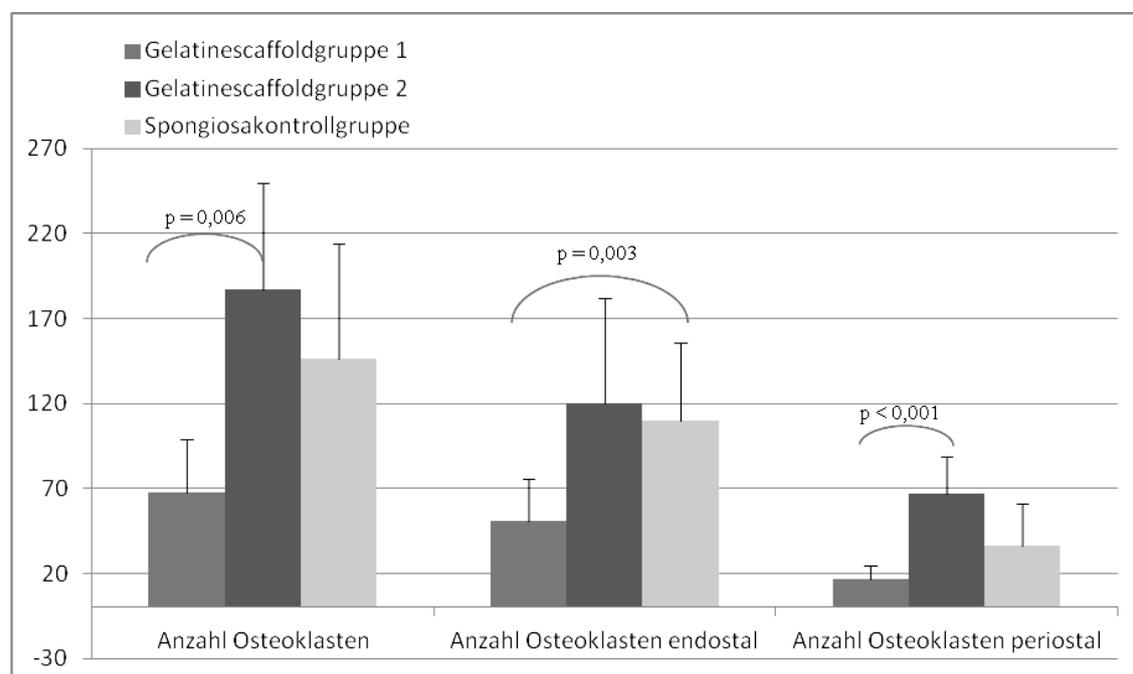
##### ***Gelatinescaffoldgruppen***

In der Gelatinescaffoldgruppe 1 betrug die Gesamtzahl der Osteoklasten  $68 \pm 31$ , die Zahl der Osteoklasten im periostalen Bereich  $17 \pm 8$  und die im endostalen Bereich  $51 \pm 25$ . In der Gelatinescaffoldgruppe 2 betrug die Gesamtzahl der Osteoklasten  $187 \pm 63$ , periostal  $67 \pm 22$  und endostal  $120 \pm 62$  (Tabelle 6). Die Gesamtzahl der Osteoklasten ( $p = 0,006$ ) und die der im periostalen Bereich ( $p < 0,001$ ) war in der Gelatinescaffoldgruppe 2 signifikant größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1. Auch im endostalen Bereich gab es wesentlich mehr Osteoklasten in der Gelatinescaffoldgruppe 2, jedoch ohne Signifikanz (Abb. 52). Die Osteoklastendichte der Gelatinescaffoldgruppe 2 war mit  $24 \pm 6$  Osteoklasten/mm<sup>2</sup> signifikant größer als die der Gelatinescaffoldgruppe 1 mit  $13 \pm 3$  Osteoklasten/mm<sup>2</sup> ( $p = 0,009$ ) (Abb. 53). Auch die Osteoklastendichte im periostalen Bereich war in der Gelatinescaffoldgruppe 2 signifikant größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1 ( $p = 0,012$ ) (Abb. 53). Sie betrug für die erstgenannte Gruppe  $16 \pm 6$  Osteoklasten/mm<sup>2</sup> und für die zweitgenannte Gruppe  $7 \pm 2$  Osteoklasten/mm<sup>2</sup> (Tabelle 6). Für die Osteoklastendichte im endostalen Bereich ergab sich eine wesentlich größere Dichte in der Gelatinescaffoldgruppe 2. Jedoch war dieser Unterschied erneut nicht signifikant (Abb. 53). Es konnten in beiden Gruppen jeweils mehr Osteoklasten im endostalen als im periostalen Bereich nachgewiesen werden (Abb. 52 und 53).

##### ***Spongiosakontrollgruppe***

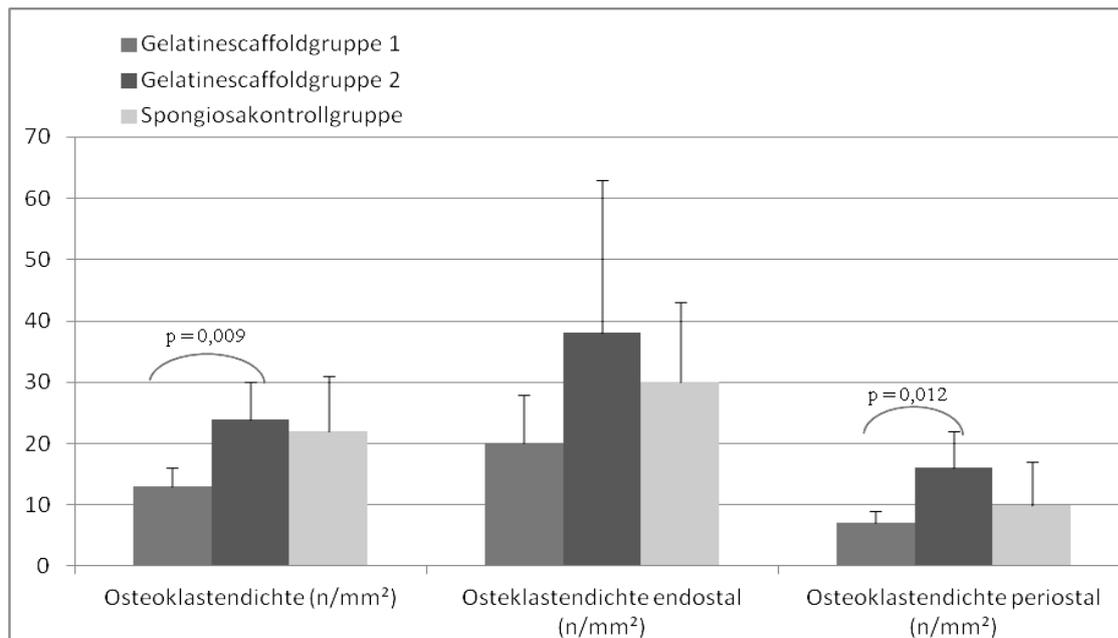
Die Gesamtzahl der Osteoklasten in der Spongiosakontrollgruppe betrug  $146 \pm 68$ , die der im periostalen Bereich  $36 \pm 25$  und die der im endostalen Bereich  $110 \pm 46$  (Tabelle 6). In der Gelatinescaffoldgruppe 1 betrug die Gesamtzahl der Osteoklasten  $68 \pm 31$ , die Zahl der Osteoklasten periostal  $17 \pm 8$  und endostal  $51 \pm 25$ . Im endostalen Bereich war die Anzahl der Osteoklasten in der Spongiosakontrollgruppe signifikant größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1 ( $p = 0,030$ ). Auch die Gesamtzahl der Osteoklasten und die Anzahl

der Osteoklasten im periostalen Bereich waren in der Spongiosakontrollgruppe wesentlich größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1, jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant (Abb. 52). Die Dichte der Osteoklasten war in der Spongiosakontrollgruppe mit  $22 \pm 9$  Osteoklasten/mm<sup>2</sup> wesentlich größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1 mit  $13 \pm 3$  Osteoklasten/mm<sup>2</sup>, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Bei der Osteoklastendichte periostal und endostal ergaben sich keine großen Unterschiede in den beiden Gruppen (Abb. 53). Innerhalb der Spongiosakontrollgruppe und der Gelatinescaffoldgruppe 2 ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich der absoluten Osteoklastenzahlen und Osteoklastendichte. Die absolute Anzahl der Osteoklasten und die Osteoklastendichte waren auch innerhalb der Spongiosakontrollgruppe endostal höher als periostal (Abb. 52 und 53).



**Abb. 52: Diagramm absolute Anzahl der Osteoklasten.**

Dargestellt ist die Osteoklasten Gesamtzahl, endostal und periostal als Mittelwerte mit positiver Standardabweichung sowie signifikanten Unterschieden (p).



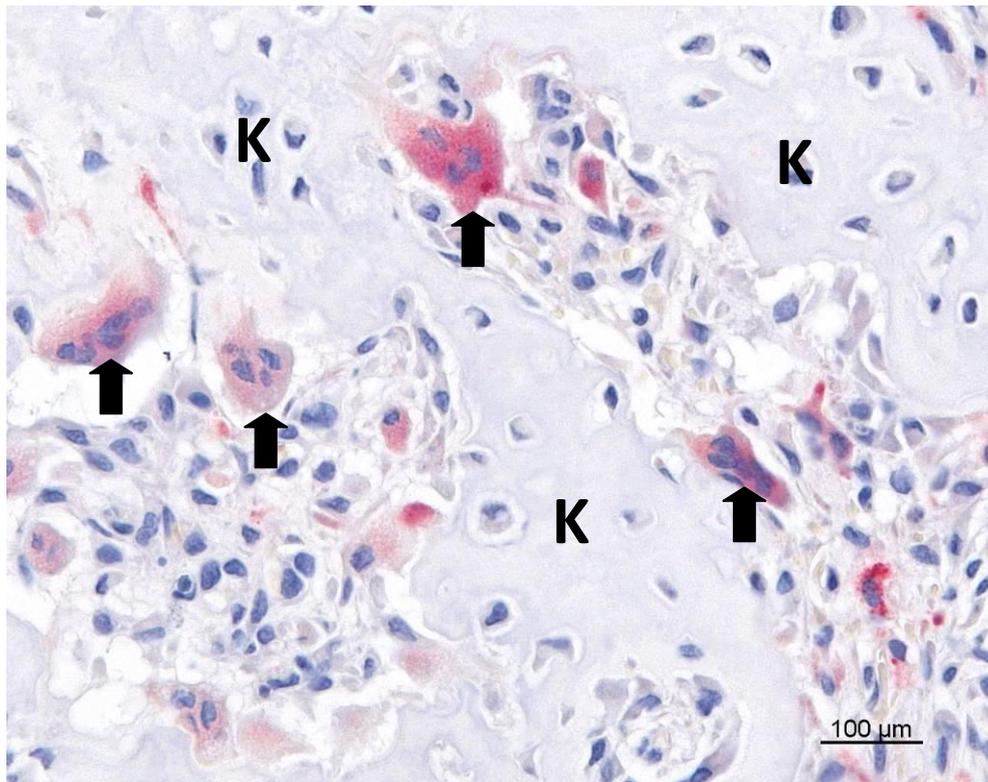
**Abb. 53: Diagramm Osteoklastendichte.**

Dargestellt ist die Osteoklastendichte in n/mm<sup>2</sup> gesamt, periostal und endostal als Mittelwerte mit positiver Standardabweichung sowie signifikanten Unterschieden (p).

**Tabelle 6: Ergebnisse der Osteoklastenzählung.**

Dargestellt sind die Ergebnisse (Mittelwerte und Standardabweichungen) für Osteoklastendichte und absolute Osteoklastenzahl.

	Gelatinescaffoldgruppe 1	Gelatinescaffoldgruppe 2	Spongiosakontrollgruppe
Anzahl Osteoklasten	68 ± 31	187 ± 63	146 ± 68
Anzahl Osteoklasten periostal	17 ± 8	67 ± 22	36 ± 25
Anzahl Osteoklasten endostal	51 ± 25	120 ± 62	110 ± 46
Osteoklastendichte (n/mm <sup>2</sup> )	13 ± 3	24 ± 6	22 ± 9
Osteoklastendichte periostal (n/mm <sup>2</sup> )	7 ± 2	16 ± 6	10 ± 7
Osteoklastendichte endostal (n/mm <sup>2</sup> )	20 ± 8	38 ± 25	30 ± 13



**Abb. 54: Positiv gefärbte Osteoklasten (TRAP-Färbung).**  
Die Osteoklasten (Pfeile) sind mehrkernig, rosa bis pink gefärbt und sitzen auf dem Knochen (K) in Resorptionslakunen (Howship-Lakunen).

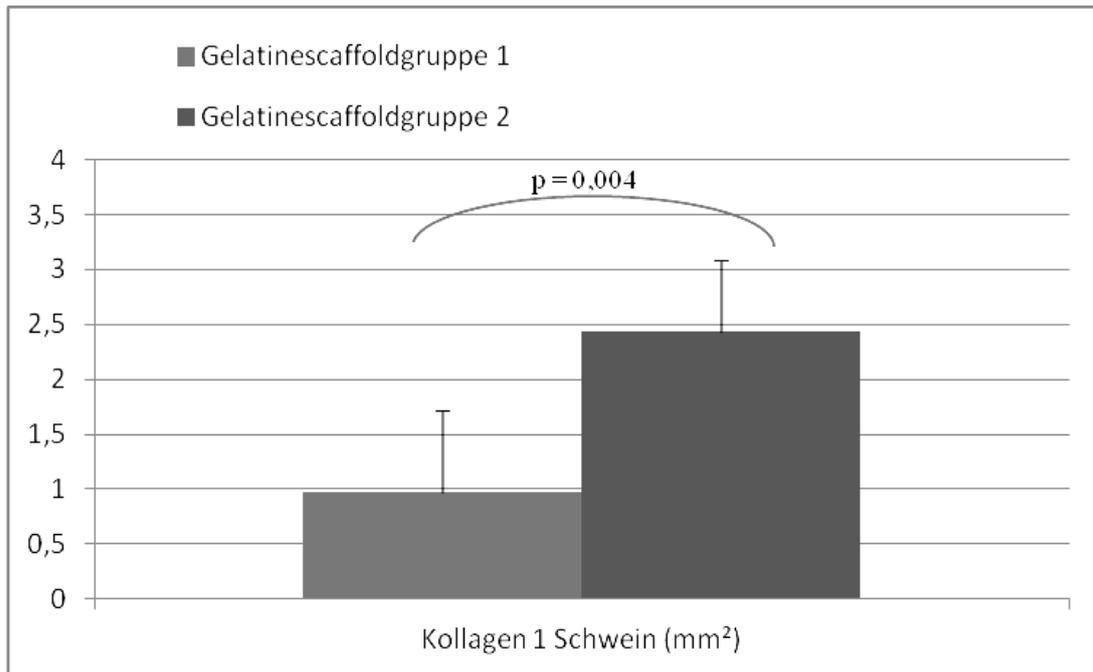
#### 4.3.6 Kollagen 1 Schwein-Färbung

##### *Deskriptive Auswertung*

In der Gelatinegruppe 1 war das pink gefärbte Kollagen nur selten als große flächige Ansammlung darstellbar. Es befand sich zumeist in kleinen Stücken am Rand des neugeformten knöchernen Kallus endostal und periostal verteilt im Bindegewebe. Dort zog es als dünner Streifen in unterschiedlicher Ausdehnung entlang. Nur in drei von sechs Präparaten konnten größere Anteile Kollagen im Osteotomiespalt identifiziert werden (Abb. 56). In der Gelatinegruppe 2 war wesentlich mehr pink gefärbtes Kollagen im Spalt zu sehen, allerdings war das Meiste am Rand des knöchernen Kallus periostal und endostal gelegen (Abb. 56).

##### *Gelatinescaffoldgruppen*

Die Gelatinescaffoldgruppe 2 hatte mit  $2.44 \pm 0.64 \text{ mm}^2$  einen signifikant größeren Anteil an schweinespezifischem Kollagen 1 als die Gelatinescaffoldgruppe 1 mit  $0.97 \pm 0.75 \text{ mm}^2$  ( $p = 0,004$ ) (Abb. 55 und Tabelle 7).



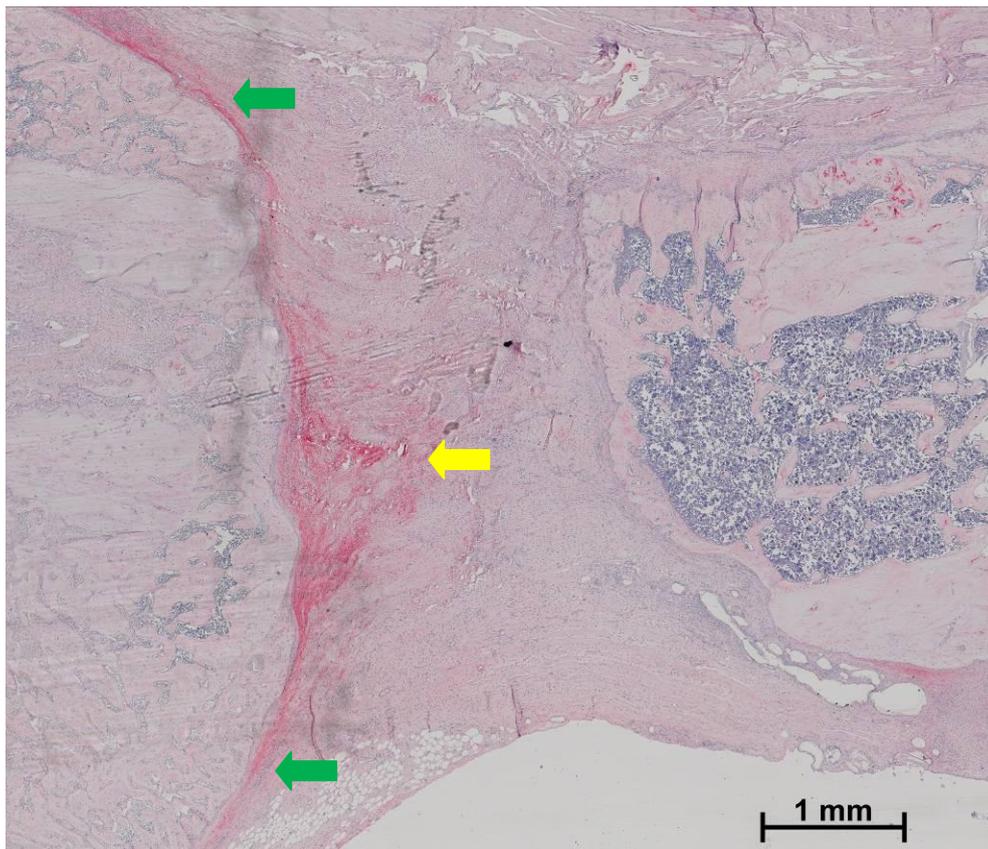
**Abb. 55: Diagramm Kollagenfläche.**

Dargestellt ist das Kollagen 1 Schwein in mm<sup>2</sup> der beiden Gelatinescaffoldgruppen als Mittelwerte mit positiver Standardabweichung sowie signifikanten Unterschieden (p).

**Tabelle 7: Ergebnisse Kollagen 1 Schwein Färbung.**

Dargestellt sind die Ergebnisse (Mittelwerte und Standardabweichungen) für die Kollagen 1 Schwein Messung in mm<sup>2</sup>.

	Gelatinescaffoldgruppe 1	Gelatinescaffoldgruppe 2
Kollagen 1 Schwein (mm <sup>2</sup> )	0.97 ± 0.75	2.44 ± 0.64



**Abb. 56: Positiv gefärbtes Kollagen (Kollagen 1 Schwein-Färbung).**

Grüne Pfeile: Das Kollagen zieht als dünner Streifen am Rand des neugeformten knöchernen Kallus entlang; Gelber Pfeil: Es sind größere Anteile Kollagen im Osteotomiespalt sichtbar.

## 4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

### 4.4.1 Radiologie

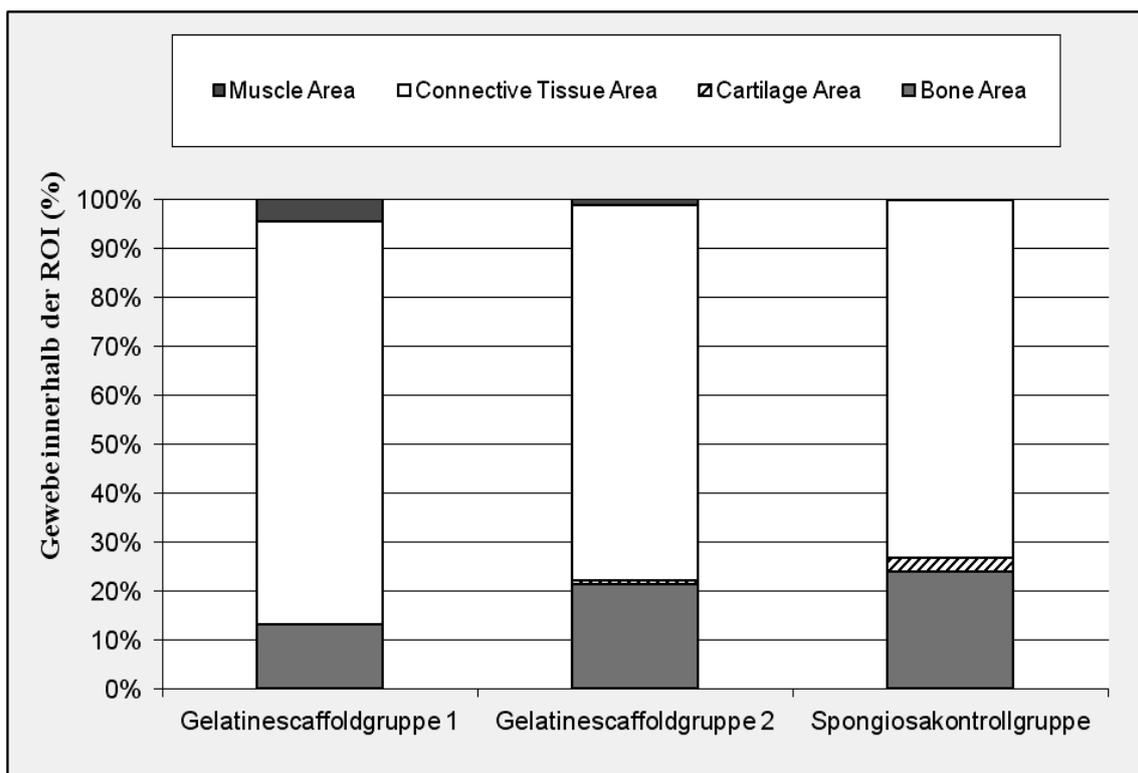
Im Röntgen war bei keinem Tier nach sechs Wochen der Osteotomiespalt knöchern vollständig überbrückt. Bei einigen Ratten waren ausgeprägte Osteolysen proximal um die Fixationspins des externen Fixateurs oder Pinausbrüche sichtbar. Diese Tiere wurden von der Analyse ausgeschlossen oder vorzeitig euthanasiert. Im MicroCT hatte die Gelatinescaffoldgruppe 2 nach zwei Wochen ein signifikant höheres TV, BV und TMC als die Gelatinescaffoldgruppe 1. Nach vier Wochen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gelatinescaffoldgruppen. Nach sechs Wochen war im *in vivo* CT das BV und TMC in der Gelatinescaffoldgruppe 2 signifikant größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1. Das TV im *in vivo* CT und das TV, BV und TMC im *in vitro* CT waren auch in der Gelatinescaffoldgruppe 2 größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1, allerdings waren diese Unterschiede nicht signifikant. Im BV/TV und in der TMD gab es im gesamten Verlauf der Studie keinen Unterschied zwischen den beiden Gelatinescaffoldgruppen. Das BV/TV der Spongiosakontrollgruppe war zu allen Messzeitpunkten signifikant größer als das der beiden Gelatinescaffoldgruppen. Nach vier und nach sechs Wochen war ein größeres BV und TMC in der Spongiosakontrollgruppe im Vergleich zur Gelatinescaffoldgruppe 1 zu messen, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Nach zwei Wochen war das TV der Gelatinescaffoldgruppe 2 signifikant größer als das der Spongiosakontrollgruppe.

### 4.4.2 Deskriptive Histologie

Das histologische Erscheinungsbild war in den drei Gruppen vergleichbar. Der knöcherne Kallus bestand entweder aus eher lockerem Geflechtknochen oder war, besonders bei den Gelatinescaffoldgruppen, häufig in strukturierten Lamellenknochen umgewandelt. Diese Kallusenden wirkten zumeist wie ein dünner kompakter „Steg“, der zwischen den Kortikalisenden langzog. Dabei waren die Enden des knöchernen Kallus zum Osteotomiespalt hin abgerundet. Auf der äußeren Oberfläche des Kallus waren nur vereinzelt inaktive abgeflachte Osteoblasten zu finden. Nur bei einem Präparat der Gelatinescaffoldgruppe 2 und bei drei Tieren der Spongiosakontrollgruppe waren auch aktive Osteoblasten an der Außenseite des Kallus zu sehen. Bei den Tieren, deren Kallusenden noch aus Geflechtknochen bestanden, gab es aktive Osteoblasten an den Geflechtknochenbälkchen. Im Osteotomiespalt zwischen den Kallusenden befand sich lockeres unstrukturiertes Bindegewebe, das teilweise von Fettgewebe durchzogen war. In der Spongiosakontrollgruppe war zudem das Spongiosatransplantat eindeutig zu erkennen. In der Gelatinescaffoldgruppe 1 war häufiger Muskelgewebe in den Osteotomiespalt vorgefallen und kein hyalines Knorpelgewebe nachweisbar. In der Gelatinescaffoldgruppe 2 befand sich bei zwei Tieren Knorpelgewebe im Osteotomiespalt, bei einem dieser Tiere kam es zu einer knorpeligen Überbrückung des Spaltes. Auch in der Spongiosakontrollgruppe konnte bei drei Tieren hyalines Knorpelgewebe nachgewiesen werden. Bei keinem der Tiere der drei Gruppen kam es zu einer knöchernen Überbrückung des Osteotomiespaltes.

#### 4.4.3 Histomorphometrische Auswertung

Die Bone Area und die Cartilage Area waren in der Gelatinescaffoldgruppe 2 signifikant größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1. Der Muskelanteil im Spalt war in der Gelatinescaffoldgruppe 1 wesentlich größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 2, allerdings war dies nicht signifikant. Die Bone Area und Cartilage Area waren in der Spongiosakontrollgruppe wesentlich größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1, wobei nur bei der Bone Area ein statistisch signifikanter Unterschied bestand. Der endostale Anteil der Cartilage Area war jedoch in der Spongiosakontrollgruppe signifikant größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1. Der Muskelanteil im Osteotomiespalt war in der Gelatinescaffoldgruppe 1 größer als in der Spongiosakontrollgruppe, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Zwischen der Spongiosakontrollgruppe und der Gelatinescaffoldgruppe 2 gab es keine Unterschiede in Bone Area und Total Area. Der Osteotomiespalt war in der Gelatinescaffoldgruppe 2 und in der Spongiosakontrollgruppe kleiner als in der Gelatinescaffoldgruppe 1, wobei nur bei der Gelatinescaffoldgruppe 2 ein signifikanter Unterschied zur Gelatinescaffoldgruppe 1 bestand.



**Abb. 57: Diagramm Kallusbestandteile der drei Gruppen.**

Dargestellt sind die prozentualen Gewebekomponenten der ROI der drei Studiengruppen.

#### **4.4.4 AlphaSMA-Färbung**

Die beiden Gelatinescaffoldgruppen unterschieden sich nicht in der absoluten Gefäßanzahl und der Gesamtgefäßdichte. Allerdings war jeweils die periostale Gefäßdichte signifikant größer als die endostale. Die Gefäßanzahl war in der Spongiosakontrollgruppe signifikant höher als in der Gelatinescaffoldgruppe 1. Ebenso wies die Spongiosakontrollgruppe eine signifikant höhere Gefäßdichte auf als die beiden Gelatinescaffoldgruppen.

#### **4.4.5 TRAP-Färbung**

Die Gesamtzahl und die Gesamtdichte der Osteoklasten sowie die periostalen Anteile waren in der Gelatinescaffoldgruppe 2 signifikant höher als in der Gelatinescaffoldgruppe 1. Ebenso war die Osteoklastenzahl im endostalen Bereich der ROI in der Gelatinescaffoldgruppe 2 größer. Dies war statistisch jedoch nicht signifikant. Osteoklastendichte und Osteoklastenzahl waren ohne statistische Signifikanz in der Spongiosakontrollgruppe höher als in der Gelatinescaffoldgruppe 1. Eine signifikant höhere Zahl an Osteoklasten war im endostalen Bereich der ROI in der Spongiosakontrollgruppe sichtbar verglichen mit der Gelatinescaffoldgruppe 1.

#### **4.4.6 Kollagen 1 Schwein-Färbung**

Die Gelatinescaffoldgruppe 2 wies einen signifikant größeren Anteil an Schweinekollagen 1 im Osteotomiespalt auf als die Gelatinescaffoldgruppe 1.

## 5 Diskussion

Die verzögerte oder ausbleibende Heilung von Frakturen ist trotz aller therapeutischer Fortschritte in Orthopädie und Chirurgie weiterhin eine häufige und oft schwerwiegende Komplikation (Zimmermann et al., 2006). Zehn bis zwanzig Prozent aller Frakturen weisen Heilungsstörungen auf. Die hoch komplexen Abläufe während der Knochenheilung sind auch heute noch nicht vollständig verstanden. Dadurch und durch das Streben der Patienten und Ärzte nach immer schnellerer Rehabilitation ist die unfallchirurgische Forschung zur Verbesserung der Frakturheilung auch heute noch gerechtfertigt (Haas, 2000).

### 5.1 Material und Methoden

#### 5.1.1 Versuchstiere

Bei der Grundlagenforschung können neue Erkenntnisse anhand alleiniger technologischer Simulationen oder postmortalen humanen Untersuchungen nur schwer gewonnen werden. Besonders das *in vivo* sensibel regulierte und anpassungsfähige Mikromilieu des Knochens kann *in vitro* kaum in seiner umfassenden Variabilität nachgeahmt werden. Postmortale Studien menschlicher Proben erlauben zwar histologische und biochemische Untersuchungen, geben jedoch geringen Aufschluss über zelluläre Mechanismen. Zudem ist die Probenanzahl häufig sehr niedrig und es existieren oftmals keine Kontrollgruppen, die einen Vergleich zulassen (Roach et al., 1989). Humanexperimentelle Studien unterliegen einem strengen ethischen Reglement und allgemein gültige, aussagekräftige Untersuchungen sind aufgrund oft nur geringer Probandenzahlen schwierig und langwierig sowie, gerade im Bereich der Orthopädie, häufig nur retrospektiv möglich. In diesem Zusammenhang bietet das Tiermodell eine einfachere Möglichkeit authentischer Untersuchungen von biologischen Prozessen *in vivo*. Daher ist auch heute der Einsatz von Versuchstieren in der medizinischen Forschung unumgänglich. Nur im Tierversuch ist es möglich, homogene Untersuchungsgruppen hinsichtlich Alter, Gewicht, Geschlecht und Größe mit dem Ziel des Erreichens standardisierter Bedingungen zusammen zu stellen. Ein Tiermodell sollte dabei bestimmte Anforderungen erfüllen, die sich einerseits aus der Fragestellung und andererseits aus den Eigenschaften der Tierart selbst ergeben. Zusätzlich ist das deutsche Tierschutzgesetz zu berücksichtigen, das bei der Wahl des geeigneten Versuchstiers vorschreibt, die Tierart mit den geringsten sensorischen Funktionen und der phylogenetisch niedrigsten Entwicklungsstufe zu wählen, immer unter Berücksichtigung der geplanten Studie (Jäger et al., 2005b). Sinn des Tierexperiments ist die Anwendbarkeit der aus diesen Versuchen gewonnenen Daten und Erkenntnisse auf die Humanmedizin. Es gibt jedoch keine Garantie, dass die im Tierexperiment gewonnenen Ergebnisse auch auf die humane Situation übertragen werden können. Es sollten daher Tiermodelle gewählt werden, bei denen die zu untersuchenden Parameter möglichst ähnlich dem des Menschen sind (Roach et al., 1989). Bei der vorliegenden Studie wurde die Ratte als Versuchstier verwendet. Mäuse zu nutzen war wegen zu geringer Knochengröße und der damit verbundenen komplizierten und schwierig zu standardisierenden Chirurgie nicht möglich. Ratten werden häufig in Studien zu skeletalen Reparatursprozessen verwendet, sodass Daten verschiedener Forscher verglichen werden können (Jäger et al., 2005c). Das osteogene Potenzial des Knochengewebes der Ratte

ist allgemein höher als das des Menschen. Die physiologische Frakturheilung der Ratte dauert nur vier bis sechs Wochen (Hietaniemi et al., 1995). Entsprechend frühzeitig liegen Ergebnisse der Studien vor und können ausgewertet werden. Geringe Erwerbs- und Unterbringungskosten sowie eine leichte Handhabung machen die Ratte zu einem attraktiven Versuchstier. Auch größere Tiergruppen können so realisiert werden. Zusätzlich besteht durch die geringe Größe die Möglichkeit, den Knochen komplett als Probe zu gewinnen und zu beurteilen. Der Einsatz von Ratten ist zudem ethisch weniger bedenklich als der von höher entwickelten Tierarten (Jäger et al., 2005b; Nunamaker, 1998). Jedoch unterscheidet sich der Rattenknochen von dem des Menschen. Sie bestehen ausschließlich aus Primärosteonen, wohingegen im Menschenknochen Primärosteone nur in der fetalen Entwicklung und unmittelbar postnatal vorhanden sind. Sie werden im Laufe des Wachstums durch Sekundärosteone ersetzt. Zusätzlich besitzt der Rattenknochen, im Vergleich zum Menschenknochen, kein Havers-System (Nunamaker, 1998). Hunde und Primatenknochen würden sich aufgrund der zum Menschen sehr ähnlichen Struktur am besten als Model zur Übertragung der gewonnenen Daten auf die humane Situation eignen. Jedoch wird vor allem aufgrund ethischer Bedenken, aber auch aufgrund höherer Kosten, von diesen Tierarten Abstand genommen (Eitel et al., 1981; Nunamaker, 1998). Auch Schafe werden häufig als Versuchstiere für Frakturheilungsstudien eingesetzt, da insbesondere die Tibia große anatomische Übereinstimmungen mit der des Menschen aufweist (Nunamaker, 1998). Jedoch sind auch die Knochen des Schafes überwiegend aus Primärosteonen aufgebaut (Eitel et al., 1981) und durch die Größe der Tiere entstehen wiederum höhere Kosten bei Anschaffung, Unterbringung und Haltung (Nunamaker, 1998). Da es sich in diesem Projekt um eine Studie im Rahmen der Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Knochenheilung handelt, war der Einsatz der Ratte als Versuchstier gerechtfertigt, zumal die an der Frakturheilung beteiligten Zellen bei allen Tierarten die gleichen sind und gleiche Funktionen besitzen. Somit sind bei aller Vorsicht Rückschlüsse auf die zellulären Abläufe beim Menschen möglich (Roach et al., 1989). Sind die Studienergebnisse positiv sollte in weiteren Untersuchungen eine Spezies eingesetzt werden, deren anatomisch-physiologische Gewebestrukturen mit denen des Menschen noch übereinstimmender sind (Schaf, Schwein, Hund). Die Tiere dieser Studie waren im Hinblick auf Rasse, Gewicht, Alter und Geschlecht homogen. Die operative Prozedur sowie die postoperativen Haltungs- und Nachsorgebedingungen waren für alle Tiere identisch. Auch in der Standzeit und Probenaufbereitung bestand kein Unterschied. Dadurch sollte ein etwaiger Einfluss externer Faktoren auf die Ergebnisse vermieden werden.

### **5.1.2 Versuchsaufbau**

Untersucht wurde, welchen Einfluss die Mikrosteifigkeit neuartiger Gelatinescaffolds auf die Knochenregeneration hat. Bekannt ist, dass die physiologische Frakturheilung bei Ratten nach ca. vier bis sechs Wochen zu einer Überbrückung des Defektes führt (Hietaniemi et al., 1995). Daher wurde ein Untersuchungszeitraum von sechs Wochen für die Studie ausgewählt. Der Versuchsaufbau und das operative Vorgehen wurden aus erfolgreichen vorangegangenen Studien des Julius Wolff Institutes übernommen (Kaspar et al., 2007; Metha et al., 2010; Schwarz et al., 2013; Strube et al., 2008).

### ***Gelatinescaffolds***

Speziell für die zu untersuchende Fragestellung wurden neuartige Gelatinescaffolds vom Institut für Polymerforschung, Helmholtz Zentrum Geesthacht entwickelt und dort *in vitro* auf ihre Eigenschaften getestet. In dieser Studie kamen zwei Gelatinescaffolds zum Einsatz, die sich in ihrer Zusammensetzung im Überschuss der Vernetzungsflüssigkeit unterschieden. Dadurch variierte ihre Mikrosteifigkeit beträchtlich, bei annähernd gleichbleibender Makrosteifigkeit. In vorangegangenen *in vitro* Studien wurde herausgefunden, dass mesenchymale Stammzellen, die einer steiferen extrazellulären Matrix ausgesetzt waren, zu osteogenen Zellen differenzieren, wohingegen Stammzellen, die in Kontakt mit einer weicheren Matrix waren, zu anderen Vorläuferzellen weicherer Gewebe differenzierten. Somit wurde nachgewiesen, dass die Mikrosteifigkeit der extrazellulären Matrix die Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen leitet (Chatterjee et al., 2010; Engler et al., 2006; Huebsch et al. 2010; Lutolf et al., 2009). Dieser Einfluss der Steifigkeit eines Biomaterials auf die Knochenentwicklung und -heilung sollte anhand dieser Studie *in vivo* untersucht werden. Durch ihre natürliche Zusammensetzung und ihre beliebig einstellbaren Eigenschaften, waren die Gelatinescaffolds besonders gut geeignet. Die Gelatine konnte eine Verbindung mit dem umgebenden Gewebe eingehen, ohne als Fremdmaterial angegriffen zu werden. Damit wurde die immunologische Antwort minimiert. Zusätzlich konnten die Transplantate im feuchten Zustand auf die erforderliche Größe zugeschnitten und dem Defekt angepasst werden. Sie waren formstabil und blieben am vorgesehenen Platz. In *in vitro* Versuchen wiesen sie keine Zytotoxizität auf (Neffe et al., 2007).

### ***Spongiosa***

Der Goldstandard für die Therapie großer Knochendefekte ist die Transplantation körpereigenen Knochengewebes (Autograft) (Jäger et al., 2005a). Dabei wird der Defekt meist mit spongiösem Knochen aus dem Beckenkamm versorgt. Jedoch birgt diese Methode auch viele Nachteile, wie die begrenzte Verfügbarkeit und eine hohe Entnahmemorbidität (Rompe et al., 2004). Zudem kann bei einem Misserfolg die Operation aus den eben genannten Gründen oft nicht wiederholt werden. Da es der aktuellen Goldstandardtherapie entspricht, wurde für diese Studie als Positivkontrolle ein Spongiosatransplantat gewählt. Jedoch wurde nicht Rattenspongiosa, sondern humane Spongiosa verwandt. Dies ist ein Xenograft und heißt, dass Spender und Empfänger nicht der gleichen Art angehören. Bei einem Autograft sind Spender und Empfänger identisch. Die Gewinnung eines ausreichend großen Spongiosaautotransplantats für den in dieser Studie verursachten Defekt wäre in der Ratte unmöglich gewesen. Nicht nur, dass die Größe des benötigten Autograft durch die Größe des Beckenkamms der Ratten limitiert war, zusätzlich wäre die zu untersuchende Defektheilung am Femur durch die zweite Knochenläsion stark beeinflusst worden und die somit gewonnenen Ergebnisse nicht repräsentativ. Von der Verwendung eines Allograft (Spender und Empfänger sind verschiedene Individuen einer Art) wurde abgesehen, da zusätzlich mehr Tiere benötigt worden wären und deren Zahl unverhältnismäßig angestiegen wäre. Zusätzlich hätte es keine Vorteile gegenüber des Xenografts gebracht, da auch die Allografts vom Empfängerindividuum als „fremd“ erkannt worden wären und vergleichbare Immun- und/oder Abstoßungsreaktionen hervorbringen hätten können. In vorangegangenen Studien wurde aufgedeckt, dass Xenografts durchaus geeignete Füllmaterialien für Knochendefekte sind und teilweise bessere Heilungsergebnisse erbringen als Allografts (Athanasίου et al., 2010; Develioglu et al., 2009). Daher wurde ein humanes

Spongiosatransplantat aus der Gewebekbank der Charité gewählt. Dies war in ausreichender Menge verfügbar und konnte auf die benötigte Größe zurechtgeschnitten werden. Jedoch ist zu berücksichtigen, dass dieses Transplantat mit Peressigsäure und Ethanol sterilisiert wurde und somit seine osteoinduktiven und osteogenen Fähigkeiten weitestgehend verloren gegangen waren. Dies wurde bereits in einer *in vitro* Studie von Bormann und Kollegen 2010 untersucht. Allerdings sind die Autoren auch zu dem Schluss gekommen, dass *in vivo* die gegebenenfalls in der knöchernen Matrix verbliebenen Wachstumsfaktoren durch Ab- und Umbauvorgänge des Transplantats aus der mineralisierten Matrix freigesetzt werden könnten und das Transplantat dann zumindest teilweise osteoinduktiv wirken könnte (Bormann et al., 2010).

### ***Fixateur externe***

Um eine stabile Fixation des Knochendefektes zu erzielen, wurde in dieser Studie ein Fixateur externe verwandt. Dabei handelt es sich um eine häufig genutzte, unkomplizierte und effektive Technik der rigiden Frakturstabilisierung (Braun et al., 1996). Der unilateral eingesetzte Fixateur externe bestand aus vier Titan-Gewindepins und einem Querbalken aus rostfreiem Stahl. Zu bedenken ist, dass der Querbalken aus Stahl eine stärkere Belastung der Kirschner-Drähte verursachen und so eine lokale Osteolyse induzieren kann (Jäger et al., 2005c). Deswegen wurden Pins mit einem Durchmesser von 1,2 mm gewählt, da dies die Steifigkeit des Fixateurs erhöht und somit Lockerungen und Osteolysen vermindert (Harrison et al., 2003). Mit dem Fixateur externe wird verglichen zur intramedullären Fixation oder Plattenosteosynthese die Beeinflussung der Heilung durch eng dem Knochen aufliegende Implantate minimiert. Beim Fixateur externe lässt sich zudem radiologisch die Knochenheilung besser beurteilen. Risiken sind allerdings sogenannte Pintraktinfektionen der Weichteile und/oder des Knochens mit folgender Lyse und/oder Nekrose (Bradley et al., 1980), Stabilitätsverlust durch Lockerung der Drähte und neuerlicher Dislokation der Fragmente (Mark et al. 2003).

### ***Operative Prozedur***

Operiert wurde nach einer etablierten und im Julius Wolff Institut schon vielfach erfolgreich eingesetzten Methode (Kaspar et al., 2007; Metha et al., 2010; Schwarz et al., 2012; Strube et al., 2008). Es wurde ein Defekt von fünf Millimeter Größe erzeugt. Dies entsprach einer Defektgröße von 160 bis 200 Prozent des Os femoris Durchmessers der Ratte. Die Größe des Defektes wurde so gewählt, weil in dieser Studie die Heilung eines Defektes von kritischer Größe untersucht werden sollte. Dies sind diaphysäre Defekte, die größer als 140 Prozent des Knochendurchmessers ausmachen und auf natürlichem Weg und ohne ärztliche Intervention nicht heilen (Mathon et al., 1998). Der Defekt wurde mit den unterschiedlichen Transplantaten gefüllt. Eine weitere Standardisierung wurde in diesem Projekt dadurch erzielt, dass alle Operationen, inklusive der Vorbereitungen und Nachsorge, von derselben Person durchgeführt wurden.

### 5.1.3 Entnahme und Aufarbeitung der Proben

Nach der Euthanasie wurden die Femora entnommen. Dabei erwies es sich als sehr hilfreich, dass der externe Fixateur die Osteotomie stabilisierte. Somit konnten größere interfragmentäre Bewegungen oder Zerreißen des Kallus verhindert werden. Durch die folgende Fixierung der Präparate in Formaldehyd härtete das Gewebe aus, sodass der Fixateur entfernt werden konnte um die Proben weiter zu bearbeiten. Für die histologische Aufarbeitung mussten die Knochen entkalkt in Paraffin eingebettet werden, sodass 4 µm dicke Schnittpräparate hergestellt werden konnten. Die Entkalkung musste sehr sorgfältig vorgenommen und stetig geprüft werden um beim Schneiden ein Zerreißen der Schnitte bei unzureichender Dekalzifizierung zu vermeiden. Das Schneiden der sorgfältig entkalkten Knochen war nicht schwierig. Allerdings entstanden kleine Risse im Schnitt durch die rasche Erwärmung und Erweichung des Paraffins. Um das zu verhindern wurden die Paraffinblöcke auf einem Eisblock gekühlt. Defekte Schnitte wurden aussortiert oder bei kleineren Artefakten wurden sie beim Auswerten manuell korrigiert. Dadurch gestaltete es sich als sehr schwierig Serienschnitte herzustellen, sodass dies nicht umgesetzt werden konnte. Es wurde eine sagittale Schnittebene in kraniokaudaler Richtung des Femurs gewählt. Dabei ergab sich ein Längsschnitt durch den Defekt, in dem die einzelnen Kallusstrukturen und -gewebe, auch in Verbindung mit der Kortikalis, gut zu untersuchen waren. So konnte die longitudinale Entwicklung des Kallus entlang der Knochenachse bestmöglich zweidimensional dargestellt und beurteilt werden.

### 5.1.4 Radiologische Untersuchungen

#### *Röntgen*

Zwei, vier und sechs Wochen nach der Operation wurde die linke Hintergliedmaße in zwei Ebenen (medio-lateral, kranio-kaudal) geröntgt. Dazu musste zuvor der Querbalken aus Stahl durch einen Kunststoffbalken ersetzt werden, da der Stahlbalken röntgendicht war und Artefakte auf den Röntgenbildern verursacht hätte. Die Bilder wären nicht beurteilbar gewesen. Anhand der Röntgenbilder wurde der Heilungsverlauf beurteilt, beziehungsweise konnten Knochenlysen oder Pinausbrüche im Knochen festgestellt werden. Bei insgesamt sechs Tieren kam es zu derartigen Komplikationen. Diese Tiere wurden aus dem Versuch genommen und euthanasiert, um unnötige Schmerzen und Leiden zu vermeiden.

#### *MicroCT*

Um die Röntgenbilder anzufertigen mussten die Tiere narkotisiert werden. In der Narkose wurden zugleich *in vivo* MicroCTs und nach der Probengewinnung und Fixierung auch *in vitro* MicroCTs angefertigt. Die MicroCT Untersuchungen wurden nach einer im Julius Wolff Institut bewährten Methode und zur weiteren Standardisierung von nur einer Person durchgeführt. Dabei mussten die *in vivo* im Gegensatz zu den *in vitro* MicroCTs mit einer geringeren Auflösung vorgenommen werden, da sie andernfalls die Narkosedauer überschritten hätten. Es wurden Transversalschnitte durch den Knochen/Kallus angelegt, damit der knöcherne Kallus dreidimensional ausgewertet werden konnte. Um den Aufwand zeitlich nicht entgleiten zu lassen, wurde ein genau definierter Bereich „VOI“ (Volume Of Interest) im Defekt analysiert. Der Bereich beinhaltete 5 mm aus dem Frakturspalt und

weitere 0,5 mm proximal sowie distal angrenzend an die Osteotomieeränder. So konnte der gesamte Osteotomiespalt mit den Osteotomieerändern und einige Mikrometer vom intakten Knochen ausgewertet werden. Dazu wurde jeder einzelne Schnitt im Bereich des knöchernen Kallus markiert. Zusätzlich musste die Kortikalis und bei der Kontrollgruppe die Spongiosa von den Berechnungen ausgeschlossen werden. Die Umrandung der zu untersuchenden Strukturen machte keine größeren Schwierigkeiten, konnte jedoch individuell subjektiven Schwankungen unterliegen. Um dies zu vermeiden, wurde die Analyse der MicroCTs nur von der Verfasserin dieser Arbeit, durchgeführt.

### **5.1.5 Histomorphometrie**

Die computergestützte Bildanalyse wurde an nach Movat Pentachrom und an immunhistochemisch Kollagen 1 Schwein gefärbten Präparaten vorgenommen. Von jedem Tier wurde ein Schnitt jeder Färbung ausgewertet.

#### ***Festlegung der ROI***

Als Höhe der ROI wurden sieben Millimeter gewählt, sodass der gesamte Osteotomiespalt mit seinen Rändern und den angrenzenden Reaktionen zu erkennen waren. Etwaige Gewebereaktionen im Bereich der Pinverankerungen im Knochen waren nicht Gegenstand der Studie und wurden daher nicht in die ROI mit eingeschlossen. Die Breite des Auswertungsareals wurde auf sechs Millimeter festgelegt. Sie wurde so gewählt, da dies, nach lichtmikroskopischer Betrachtung der Präparate, der breitesten Ausdehnung des Kallus in allen Präparaten entsprach.

#### ***Auswertung***

Die Movat Pentachrom-Färbung macht es möglich Knochen von Knorpel und Bindegewebe zu unterscheiden und Zelltypen leicht zu erkennen und zu benennen. Geeignet ist diese Färbung entsprechend nicht nur für die Histomorphometrie sondern auch für die deskriptive Histologie (Olah et al., 1977). Die Quantifizierung der verschiedenen Gewebe in der Histomorphometrie war nicht nur essentiell für die vergleichende Kontrolle der Heilung, sondern auch für die Berechnungen der Dichten von Osteoklasten und Blutgefäßen im Gewebe. Über die Kollagen 1 Schwein-Färbung ist es möglich Schweinekollagen Typ 1 zu identifizieren. So ist das Degradationsverhalten der Scaffolds zu erkennen. Das kalibrierte Computerprogramm markierte entsprechend der vorgegebenen Standardfarben das Kollagen Typ 1 und die Knochen-, Binde- oder Knorpelgewebsflächen an den jeweiligen Färbungen. Die auswertende Person konnte diese Einschätzung mittels Farbwertregler nach oben oder unten korrigieren und durch manuelles Umfahren bestimmte Bereiche aus- oder einschließen. Dies war erforderlich, da teilweise verschiedene Gewebearten in der gleichen Farbe vorkamen und das Computerprogramm somit falsche Gewebearten deklarierte. Außerdem mussten etwaige Artefakte erkannt und manuell entfernt werden. Zusätzlich war es in der Movat Pentachrom-Färbung schwierig die Kortikalis zu markieren, da sie am Bildschirm besonders an den Grenzen zum Kallus nicht immer eindeutig abgrenzbar war. Deswegen wurden die Proben immer auch lichtmikroskopisch ausgewertet. Da dabei individuell Untersucher abhängig abweichende Ergebnisse entstehen können, wurde dies nur von der Verfasserin der Arbeit vorgenommen.

## 5.1.6 Histologie

### *Deskriptive Histologie*

Die Beschreibung der Präparate erfolgte subjektiv entsprechend der Kriterien, die die Untersucherin erstellt hatte. Mit der deskriptiven Analyse der Movat Pentachrom Präparate sollten vor allem vergleichend die Gewebeanteile und deren Lokalisation und Ausbreitung übersichtlich dargestellt werden. Zusätzlich sollten bestimmte Zelltypen identifiziert und ihre Verteilung ermittelt werden. Auch wenn dies subjektiv ist, ist es doch hilfreich die Ergebnisse mit denen der Histomorphometrie zu vergleichen und sie unterstützend zu nutzen.

### *AlphaSMA-Färbung*

Die alphaSMA-Färbung ist ein immunhistochemisches Verfahren mit dem spezifische Strukturen dargestellt, leicht erkannt und ausgewertet werden können. Die Färbung gelingt nicht immer und es können auch präparatabhängige Unterschiede der Anfärbung auftreten, selbst in einem Färbedurchgang. Nachteilig sind zudem der hohe Kosten- und Zeitaufwand. In dieser Studie wurde die Färbung problemlos nach einem im Julius Wolff Institut etablierten und erfolgreichem Protokoll vorgenommen (Lienau et al., 2005). Die angefärbten Blutgefäße wurden analog zur Histomorphometrie in der festgelegten ROI gezählt. So konnten die Ergebnisse auf die histomorphometrischen Ergebnisse bezogen und z.B. die Anzahl der Blutgefäße pro Bindegewebsfläche ( $\geq$  Blutgefäßdichte) angegeben werden. Eine möglichst hohe Messgenauigkeit wurde zudem durch das Einscannen der Präparate und die farbliche Markierung und Zählung mit Hilfe eines Computerprogrammes erreicht. So wurden Doppelzählungen vermieden. Es wurden nur Gefäße gezählt, die folgende Bedingungen erfüllten: positiv gefärbt, annähernd rund und Lumen. So wurden längsangeschnittene Gefäße nicht berücksichtigt, um eine doppelte Zählung, eines sich eventuell mehrmals durch die Ebene schlängelnden Blutgefäßes, möglichst zu vermeiden. Allerdings schloss dies auch teilweise kleinste neugebildete Kapillaren aus, da diese oft noch kein erkennbares positives Färbeergebnis lieferten oder kein Lumen besaßen.

### *TRAP-Färbung*

Bei der TRAP-Färbung werden die Tartrat-resistenten sauren Phosphatasen in den Osteoklasten rosa angefärbt. Gezählt wurden alle Zellen die sich rosa anfärbten, mindestens zwei Zellkerne aufwiesen und in Kontakt zu einer knöchernen Oberfläche standen (Schell et al., 2006). Die Zellen waren zum Teil unterschiedlich intensiv gefärbt. Dies lässt sich durch die unterschiedliche Aktivität der sauren Phosphatase und damit der Zellen erklären. Allerdings fiel auch auf, dass in der Spongiosakontrollgruppe Osteoklasten, die an der Oberfläche der Spongiosatransplantate saßen, teils nicht TRAP-positiv gefärbt waren, obwohl im gesamten Schnitt die Färbung positiv war, da andere Osteoklasten im knöchernen Kallus eindeutig positiv gefärbt waren. Diese Osteoklasten konnten in der Movat Pentachrom-Färbung zweifelsfrei als mehrkernige Riesenzellen identifiziert werden. Zusätzlich schienen sie aktiv zu sein, da der spongiöse Knochen unter ihnen wie „angenagt“ erschien und bereits sogenannte Howship Lakunen entstanden waren. Es handelte sich also mit hoher Wahrscheinlichkeit um aktive Osteoklasten. Es kann nicht erklärt werden warum diese Zellen in der TRAP-Färbung nicht positiv gefärbt waren, obwohl sie wie zuvor beschrieben

zumindest zeitweise aktiv gewesen sein mussten. Da zur Berechnung der Osteoklastendichte die in der histomorphometrischen Untersuchung ermittelten Knochenflächen genutzt wurden, erfolgte die Zählung analog zur Histomorphometrie in der festgelegten ROI. Die Messgenauigkeit wurde durch die farbliche Markierung und Zählung mit einem Computerprogramm verbessert.

## 5.2 Ergebnisse

Trotz vielfältiger Forschung auf dem Gebiet der Knochenheilung ist besonders die Heilung und Überbrückung größerer Defekte über mehrere Zentimeter bis Dezimeter immer noch sehr langwierig und nicht immer erfolgreich. Häufig sind Transplantationen von eigenem Knochen oder Knochenersatzmaterialien notwendig. In zahlreichen *in vitro* Studien zum Reaktionsmuster von Zellen im Körper gegenüber diesen Ersatzmaterialien wurde nachgewiesen, dass die Reifung mesenchymaler Stammzellen zu Osteoprogenitorzellen durch steifere Materialien gefördert wird (Chatterjee et al., 2010; Engler et al., 2006; Huebsch et al., 2010; Lutolf et al., 2009). In dieser Studie wurde erstmals der Einfluss der Mikrosteifigkeit eines Scaffolds auf die Knochenheilung *in vivo* studiert. Dazu wurde die Auswirkung unterschiedlich steifer Gelatinescaffolds und eines Spongiosatransplantats auf die Heilung eines Defektes von kritischer Größe radiologisch, histomorphometrisch und histologisch analysiert.

### 5.2.1 Operationsbefunde

Die Tiere erholten sich zunächst gut von dem Eingriff. Jedoch brachen bei einem Tier nach zwei Wochen und bei zwei weiteren nach vier Wochen die Pins aus. Drei weitere Tiere wiesen am Ende der Standzeit nach sechs Wochen ausgeprägte Knochenlysen auf. Obwohl für diese Studie ein Fixateur externe mit Pins mit einem Durchmesser von 1,2 mm verwendet wurde, um die Steifigkeit der Montage zu erhöhen (Harrison et al., 2003), kam es doch zu Pinlockerungen und Osteolysen. Dies kann erfahrungsgemäß durch übermäßige Bewegungen und Belastung der Pins im Knochen entstehen (Jäger et al., 2005c). Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass trotz täglicher Pinpflege, eine Infektion entstand. Dies könnte Knochenlysen verursacht haben (Bradley et al., 1980). Diese Komplikationen bedenkend sollte für zukünftige Studien erwogen werden andere Osteosyntheseverfahren zu verwenden, um Verluste mit denen beim Fixateur externe zu rechnen ist zu vermeiden.

### 5.2.2 Radiologische Ergebnisse

#### *Röntgenbilder*

In den drei Gruppen war der Defekt bei keinem Tier nach sechs Wochen knöchern überbrückt, sodass der Osteotomiespalt immer deutlich zu erkennen war. Allerdings ließen sich neue Kallusformationen zunehmend als wolkige oder zapfenförmige Verschattungen im Bereich des Spaltes und/oder der Osteotomieänder nachweisen. Da sich mineralisiertes Gewebe erst ab einer Dichte von 30 Prozent radiologisch darstellen lässt (Radasch, 1999), muss der knöcherne Kallus nach sechs Wochen bereits eine entsprechende Dichte

aufgewiesen haben. Auch wenn der Spalt nach sechs Wochen noch nicht überbrückt war, war doch mehr oder weniger ausgeprägt knöcherner Kallus bei allen Tieren entstanden. Zur besseren qualitativen und quantitativen Analyse des Kallus wurden anschließend jedoch andere, zuvor erwähnte, Untersuchungstechniken angewandt. Das Röntgen diente vor allem zur Feststellung von Pinausbrüchen oder Knochenlysen, um die betroffenen Tiere rechtzeitig aus dem Versuch zu nehmen.

### *MicroCT*

Im MicroCT konnten Qualität und Quantität des neugebildeten knöchernen Kallus dreidimensional evaluiert werden. Es zeigte sich, dass die Tiere der Gelatinescaffoldgruppe 2 zu allen drei Untersuchungszeitpunkten ein größeres totales Kallusvolumen (TV), ein größeres mineralisiertes Kallusvolumen (BV) und mehr Inhalt mineralisierten Gewebes im Kallus (TMC) aufwiesen als die Gelatinescaffoldgruppe 1. Das TV, BV und TMC der Gelatinescaffoldgruppe 2 war nach zwei und sechs Wochen nahezu doppelt so groß wie das der Gelatinescaffoldgruppe 1. Lediglich nach vier Wochen ergaben sich in den beiden Gelatinescaffoldgruppen keine großen Unterschiede im TV, BV und TMC. In der Gelatinescaffoldgruppe 1 ist das TV, BV und TMC nach vier und nach sechs Wochen nahezu identisch. Daraus lässt sich schließen, dass es ab der vierten Woche in dieser Gruppe zu keiner größeren knöchernen Kallusbildung mehr kam, wohingegen in der Gelatinescaffoldgruppe 2 die Werte weiter anstiegen. Warum die Kallusbildung in der Gelatinescaffoldgruppe 1 nach der vierten Woche stagnierte, lässt sich durch die histologischen Befunde erklären. Der Unterschied zwischen den beiden Gelatinescaffoldgruppen war allerdings nur nach zwei Wochen für das TV, BV und TMC und nach sechs Wochen für das BV und TMC signifikant. Auch in der *in vitro* Untersuchung gab es keinen signifikanten Unterschied im TV, BV oder TMC zwischen den beiden Gelatinescaffoldgruppen, obwohl es zum gleichen Zeitpunkt in der *in vivo* Untersuchung einen signifikanten Unterschied im BV und TMC zwischen den beiden Gelatinescaffoldgruppen gegeben hat. Dies kann daran liegen, dass in der *in vitro* Untersuchung nur vier Tiere in die Auswertung der Gelatinescaffoldgruppe 1 eingegangen sind, da zwei Scans verloren gingen. Die geringe Gruppengröße von  $n=4$  macht statistische Aussagen schwierig bis unmöglich. Das Verhältnis des knöchernen Kallus zum gesamten Kallus (BV/TV) und die Dichte des mineralisierten Gewebes (TMD) waren bei beiden Gelatinescaffoldgruppen zu allen Untersuchungszeitpunkten gleich. Durch die MicroCT-Untersuchungen wurde somit nachgewiesen, dass der neugebildete Kallus der beiden Gelatinescaffoldgruppen sich im Hinblick auf Qualität nicht, aber quantitativ sehr unterschied. Dies zeigt, dass der Scaffold mit der höheren Mikrosteifigkeit die Knochenheilung besser unterstützt, als der mit niedrigerer Mikrosteifigkeit. Somit bestätigt sich die erste Hypothese aus Gliederungspunkt 2.5.

Der Vergleich der Gelatinescaffoldgruppe 1 mit der Spongiosakontrollgruppe ergab, dass TV, BV und TMC der Spongiosakontrollgruppe ab der vierten Woche wesentlich größer waren, als das der Gelatinescaffoldgruppe 1. Allerdings waren die Differenzen bis zur zweiten Woche nicht markant. Obwohl die Werte der Spongiosakontrollgruppe teilweise bis zu doppelt so groß waren als die der Gelatinescaffoldgruppe 1, war dies ohne Signifikanz. Dies lässt sich durch die große Streuung der Werte der Spongiosakontrollgruppe erklären. Das Verhältnis des mineralisierten Kallus zum totalen Kallus (BV/TV) war bei der Spongiosakontrollgruppe immer signifikant größer als das der Gelatinescaffoldgruppe 1,

wohingegen es hinsichtlich der Dichte des mineralisierten Gewebes (TMD) keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen gab. Die MicroCT-Untersuchung ergab, dass der Kallus der Spongiosakontrollgruppe nicht nur größer war als der der Gelatinescaffoldgruppe 1, sondern, dass er auch einen signifikant größeren knöchernen Anteil besaß.

Im Vergleich der Gelatinescaffoldgruppe 2 mit der Spongiosakontrollgruppe ergab sich, dass nur das TV nach zwei Wochen in der Gelatinescaffoldgruppe 2 signifikant höher war als in der Spongiosakontrollgruppe. Das BV/TV der Spongiosakontrollgruppe war immer signifikant höher, als das der Gelatinescaffoldgruppe 2, wohingegen die TMD bei beiden Gruppen gleich war. Somit ergab die Untersuchung, dass der Kallus der Gelatinescaffoldgruppe 2 hinsichtlich der Quantität keinen Unterschied zum Kallus der Spongiosakontrollgruppe aufwies. Allerdings befand sich im Verhältnis zum gesamten Kallus mehr mineralisierter Kallus in der Spongiosakontrollgruppe als in der Gelatinescaffoldgruppe 2. Dies ist jedoch kritisch zu betrachten. Während der MicroCT-Auswertung musste die Spongiosa manuell aus dem neu entstandenen Kallus ausgeschnitten werden. Es ist nicht auszuschließen, dass dabei auch kleine Stücke der Spongiosa nicht mit erfasst wurden und somit mit in die Berechnung als neugebildeter knöcherner Kallus eingingen. Denkbar ist, dass der Anteil des mineralisierten Kallus bei der Spongiosakontrollgruppe teilweise verfälscht hoch ausfällt. Dies bestätigt die Histomorphometrie.

Die zweite Hypothese aus Gliederungspunkt 2.5, dass die Gelatinescaffolds die Knochenheilung nicht so gut unterstützen wie das Spongiosatransplantat, bestätigt sich nur für den Gelatinescaffold mit der niedrigeren Mikrosteifigkeit. Der Gelatinescaffold mit der höheren Mikrosteifigkeit hingegen scheint die Knochenbildung und -heilung in ähnlicher Weise zu fördern wie das Spongiosatransplantat.

### **5.2.3 Histologische Ergebnisse**

#### ***Deskriptive Histologie***

In der deskriptiven Histologie wurden der Osteotomiespalt, die Kallusbildung und die Gewebearten und -verteilung beschrieben. Dabei wurde nicht nur der ROI Bereich wie in der Histomorphometrie, sondern das ganze Präparat analysiert. Zunächst fiel auf, dass in nahezu allen Präparaten eine mehr oder weniger stark ausgeprägte Knochenlyse im Bereich eines oder mehrerer Pinlöcher vorlag. Dort waren vermehrt Anzeichen einer Inflammation, wie Einblutungen oder Zellverdichtungen zu finden. Teilweise bildeten sich in diesen Bereichen große periostale knöcherne Zubildungen um den Lysedefekt zu stabilisieren. In einigen Präparaten reichten die Zubildungen bis in die ROI und gingen somit teilweise in die Berechnung als neugebildeter Kallus ein, obwohl sie mit der Heilung nichts zu tun hatten. Da dies aber nur bei sehr wenigen Präparaten der Fall war und diese sich auch gleichmäßig auf die verschiedenen Untersuchungsgruppen verteilten, hatte es keinen Einfluss auf die Ergebnisse der Histomorphometrie und wurde daher nicht gesondert deklariert. Auch hiermit werden die Überlegungen gestützt bei künftigen Studien ein anderes Osteosyntheseverfahren zur Stabilisation, als den Fixateur externe, zu nutzen. Weitere Zeichen für Entzündungsreaktionen im Bereich der Osteotomiespalte wurden nicht gefunden. Das weist darauf hin, dass weder die Gelatinescaffolds noch die xenogenen Spongiosatransplantate übermäßige Immunreaktionen ausgelöst haben. Bei keiner Gruppe war nach sechs Wochen zu Versuchsende der Osteotomiespalt knöchern überbrückt. Allerdings war dies in der

Gelatinescaffoldgruppe 2 bei zwei Tieren kurzfristig zu erwarten, da große knöcherne Zapfen bis weit in den Osteotomiespalt hinein ragten und bei einem der beiden Tiere war der Defekt immerhin knorpelig überbrückt. Insgesamt gab es wenig Knorpelgewebe in allen Präparaten. Die geringen Mengen an Knorpelgewebe sprechen dafür, dass die Knochenheilung eher über die direkte oder desmale Ossifikation abgelaufen ist, bei der sich mesenchymale Stammzellen direkt zu osteogenen Zellen und damit zu Osteoblasten entwickeln (Junqueira et al., 2002; Trostle et al., 1996; Weiner et al., 1998). Nur bei einigen Präparaten der Gelatinescaffoldgruppe 2 und der Spongiosakontrollgruppe war Knorpel zu finden und die Heilung erfolgte über die enchondrale Ossifikation. Es scheint vorwiegend eine ausreichende Sauerstoffversorgung vorgelegen zu haben, welche eher zur Ausbildung von Bindegewebe führt (Palmer et al., 1992; Willenegger et al., 1971), wohingegen eine niedrige Sauerstoffspannung eher zur Knorpelbildung führt (Einhorn, 1998; Lane, 1998). Allerdings ist fraglich, ob gegebenenfalls bei den Präparaten ohne Knorpelbefund, sich Knorpel bereits zu Knochen transformiert hatte und daher kein Knorpelgewebe mehr gesehen werden konnte. Um dies besser einschätzen zu können, müssten histologische Untersuchungen in künftigen Studien auch zu früheren Zeitpunkten der Knochenheilung vorgenommen werden.

In den Gelatinescaffoldgruppen waren die Kallusenden bei einigen Tieren zum Osteotomiespalt hin zum Teil abgerundet und zogen als dünner „Steg“ von periostal kommend zwischen der medialen und lateralen Kortikalis entlang. Somit war die Markhöhle zum Osteotomiespalt hin abgeschlossen. Zusätzlich bestanden diese „Stege“ zumeist aus schon strukturierten Lamellenknochen und an der Oberfläche befanden sich nur wenig inaktive abgeflachte Osteoblasten. Dies können Zeichen einer Pseudarthrose sein (Kokubu et al., 2003; Volpon, 1994). Bei einer Pseudarthrose wäre die Knochenheilung zu diesem Zeitpunkt verzögert oder zum Stillstand gekommen. Ursachen dafür können unter anderem vermehrte Instabilität (Kutscha-Lissberg et al., 2003), gestörte Vaskularisierung - frakturbedingt oder durch operative Versorgung, (Runkel et al., 2000) oder auch Infektionen mit einhergehenden Knochenlysen sein (Bosch et al., 1999; Runkel et al., 2000). Auch die Verlagerung von Weichteilen (besonders Muskeln) in den Frakturspalt können die knöcherne Überbrückung verhindern (Runkel et al., 2000). Solch ein Muskelprolaps war vor allem in der Gelatinescaffoldgruppe 1 zu sehen. Allerdings muss für diese Studie ganz klar die Defektgröße (Defekt kritischer Größe) als Hauptursache für eine ausbleibende Überbrückung genannt werden. Was ursächlich für die ausbleibende Überbrückung noch mitverantwortlich sein könnte ist nicht zu beantworten. Wahrscheinlich verursachen dies mehrere Faktoren im Zusammenspiel. Ob es sich allerdings um eine verzögerte Heilung handelt, die gegebenenfalls zu einem späteren Zeitpunkt erneut reaktiviert werden und zur Überbrückung führen könnte oder um eine ausbleibende Heilung, kann in dieser Studie mit einer Standzeit von nur sechs Wochen nicht geklärt werden. Dazu müssten in künftigen Studien radiologische und histologische Untersuchungen auch zu späteren Zeitpunkten erfolgen.

In der Spongiosakontrollgruppe bestand der knöcherne Kallus bei der Mehrzahl der Tiere aus unstrukturierten Geflechtknochen. Bei drei Tieren fanden sich aktive Osteoblasten auf der Knochenoberfläche. Dies weist auf eine aktive Knochenheilung hin, die gegebenenfalls zu einem späteren Zeitpunkt zu einer Überbrückung geführt hätte. Allerdings war auch in dieser Gruppe bei drei Tieren der Kallus zum Teil als kompakter „Steg“ zu sehen, der zum Spalt hin abgerundet war. Bei zwei Tieren wurden auf der Kallusoberfläche nur inaktive Osteoblasten gefunden. Dies sind dezente Indizien einer Pseudarthrose.

### ***Histomorphometrie***

Aus den Ergebnissen der Histomorphometrie war ein signifikant größerer Anteil von Knochen- und Knorpelfläche in der Gelatinescaffoldgruppe 2 im Vergleich zur Gelatinescaffoldgruppe 1 zu ersehen. Die Größe des gesamten Kallus und seines bindegewebigen Anteils des Kallus wies keine großen Unterschiede auf. Dies bestätigt die Befunde der MicroCT-Untersuchungen und deskriptiven Histologie und wieder auch die erste Hypothese.

In der Gelatinescaffoldgruppe 1 befand sich deutlich mehr Muskelgewebe im Spalt als in der Gelatinescaffoldgruppe 2. Dies könnte unter anderem die verzögerte oder ausbleibende weitere Heilung in der Gelatinescaffoldgruppe 1 begründen, da die Interposition von Weichteilen, besonders Muskeln, die Heilung behindern kann (Runkel et al., 2000). So ließe sich auch erklären, warum in der MicroCT-Untersuchung bei der Gelatinescaffoldgruppe 1 ab der vierten Untersuchungswoche kein großer Volumenzuwachs des knöchernen Kallus entstand. Wahrscheinlich waren zu dieser Zeit bereits Muskelbündel in den Spalt prolapiert und störten die weitere Heilung. Zusätzlich waren in der Gelatinescaffoldgruppe 1 signifikant weniger verbliebene Gelatinescaffoldreste zu erkennen als in der Gelatinescaffoldgruppe 2. Dies bedeutet, dass der Scaffold mit der höheren Mikrosteifigkeit *in vivo* langsamer zu degradieren schien als der Scaffold mit der niedrigeren Mikrosteifigkeit. Es ist zu überlegen, ob es gegebenenfalls durch die schnelle Degradation des weicheren Gelatinescaffolds zu einem vermehrten Muskeleinfall in der Gelatinescaffoldgruppe 1 kam, weil der Scaffold nicht mehr die Platzhalterfunktion übernahm. Desweiteren konnte der steifere Scaffold länger als Leitschiene für Gefäß- und Zellinvasion und so osteokonduktiv wirken und unter anderem ein besseres Heilungsergebnis erzielen. Um diese Überlegungen zu bestätigen, müssten weitere Studien folgen, in denen früher histologische Untersuchungen vorgenommen werden.

Die Spongiosakontrollgruppe hatte eine signifikant größere Knochenfläche als die Gelatinescaffoldgruppe 1 und auch die Knorpelfläche war wesentlich größer als die der Gelatinescaffoldgruppe 1. Jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant. Dies kann mit der breiten Streuung der Werte in der Spongiosakontrollgruppe erklärt werden. Die Größe des gesamten Kallus und der bindegewebigen Anteile waren annähernd gleich. Allerdings befand sich in der Gelatinescaffoldgruppe 1 wesentlich mehr Muskelgewebe im Spalt als in der Spongiosakontrollgruppe.

Zwischen Spongiosakontroll- und Gelatinescaffoldgruppe 2 gab es keine großen Unterschiede. Lediglich die Knorpelfläche war in der Spongiosakontrollgruppe wesentlich größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 2, jedoch war dies aufgrund der großen Streuung der Werte in der Spongiosakontrollgruppe nicht signifikant. In der Spongiosakontrollgruppe war so gut wie kein Muskelgewebe im Spalt zu messen. Vermutlich hat das Spongiosatransplantat den Muskelprolaps verhindert. Die auf den Ergebnissen der MicroCT-Untersuchung basierende Vermutung, dass die Kallusqualität in der Spongiosakontrollgruppe besser war als die in der Gelatinescaffoldgruppe 2, bestätigte sich in der Histomorphometrie nicht. Wahrscheinlich ist, dass wie zuvor schon erwogen Spongiosatransplantat zum Teil falsch-positiv als Kallus deklariert wurde. Da nur der Gelatinescaffold 1 mit der niedrigeren Mikrosteifigkeit ein schlechteres Heilungsergebnis als das Spongiosatransplantat ergab, der Gelatinescaffold 2 mit der höheren Mikrosteifigkeit die Knochenheilung aber vergleichbar

dem Spongiosatransplantat förderte, kann auch aus der histologischen Analyse die zweite Hypothese nicht bestätigt werden.

### ***Osteotomiespaltmessung***

In der deskriptiven Histologie fiel auf, dass bei den beiden Gelatinescaffoldgruppen Zeichen einer Pseudarthrose zu sehen waren. Deswegen wurde die Breite des Osteotomiespaltes vermessen, um eine zusätzliche Information über die Heilungstendenz der mit Scaffolds versorgten Defekte zu bekommen. Dabei ergab sich, dass der Osteotomiespalt in der Gelatinescaffoldgruppe 2 signifikant kleiner war als in der Gelatinescaffoldgruppe 1. Dies deutet auf die bessere Heilung der Defekte mit dem Gelatinescaffold 2 hin. Diese Untersuchung ist nicht repräsentativ, da jeweils nur eine Schnittebene vermessen wurde und die Breite des Osteotomiespaltes in verschiedenen Ebenen variieren kann. Zusätzlich könnte sich auch ein etwas schräg angeschnittener Osteotomiespalt breiter darstellen, als er eigentlich ist. Jedoch ist eine Tendenz erkennbar: Obwohl in beiden Gelatinescaffoldgruppen in der deskriptiven Histologie Zeichen einer Pseudarthrose gefunden wurden, scheint beim Gelatinescaffold 2 die Heilung weiter vorangeschritten zu sein als beim Gelatinescaffold 1. Auch dies bestätigt die erste Hypothese.

### ***Blutgefäßzählung***

Die absolute Blutgefäßzahl wie auch deren Dichte berechnet auf die Bindegewebsfläche waren in beiden Gelatinescaffoldgruppen identisch. Allerdings fiel auf, dass sich die Blutgefäße eher periostal als endostal befanden. Eine Ursache dafür könnte sein, dass sich bei großen Defekten neue Blutgefäße sowohl vom Periost, als auch von umliegenden Weichteilen, besonders Muskeln, her bilden und in den Kallus einsprossen (Cruess et al., 1975; Reed et al., 2002).

Im Vergleich dazu war die Blutgefäßdichte in der Spongiosakontrollgruppe signifikant größer als die in den Gelatinescaffoldgruppen. In der Spongiosakontrollgruppe war die Blutgefäßverteilung zudem gleichmäßig periostal und endostal verteilt. Daraus lässt sich ableiten, dass der Defekt in der Spongiosakontrollgruppe zu dieser Zeit besser durchblutet war. Dies deutet auf eine bessere Heilungstendenz hin, da es sich bei der Knochenheilung um einen sehr stoffwechselaktiven Vorgang handelt und eine intakte Durchblutung essentiell ist. (Cruess et al., 1975; Stürmer, 1996). Es bleibt offen, ob sich in den Gelatinescaffoldgruppen die Blutgefäße bereits wieder zurückgebildet hatten, da die Knochenheilung stagnierte und in eine Pseudarthrose mündete. Denkbar ist aber auch wie in anderen Studien beschrieben, dass eine mangelnde Vaskularisierung erst zur Bildung einer Pseudarthrose führte (Runkel et al., 2000; Stürmer, 1996). Um dies zu klären, sollte in künftigen Studien unter diesem Aspekt frühzeitiger histologisch untersucht werden. Analysiert werden muss auch die Ursache verminderter Vaskularisierung in den Gelatinescaffoldgruppen. Denkbar ist, dass die weicheren Gelatinescaffolds mehr interfragmentäre Kompressionsbewegungen zugelassen haben als das feste Spongiosatransplantat und dadurch die feinen neugebildeten Gefäße in den Gelatinescaffoldgruppen wiederholt zerrissen, sodass die Gefäßdichte vermindert war, was zur Pseudarthrose führte. Offen bleibt auch die Ursache für die Menge der Knorpelgewebsbildung in der Spongiosakontrollgruppe. Bekannt ist, dass Knorpel sich eher bei schlechter Vaskularisierung und damit einhergehender niedriger Sauerstoffbildung bildet (Einhorn, 1998; Lane, 1998).

### ***Osteoklastenzählung***

Signifikant mehr Osteoklasten konnten in den Präparaten der Gelatinescaffoldgruppe 2 als in denen der Gelatinescaffoldgruppe 1 gezählt werden. Auch die Dichte der Osteoklasten, in Relation zur Knochenoberfläche, war in der Gelatinescaffoldgruppe 2 signifikant größer als in der Gelatinescaffoldgruppe 1. Daher ist davon auszugehen, dass die Knochenumbau- und Heilungsprozesse in der Gelatinescaffoldgruppe 2 deutlich aktiver als in der Gelatinescaffoldgruppe 1 waren. Das bestätigt die bisherigen Befunde der Untersuchungen. In den Präparaten, in denen der neugebildete knöcherne Kallus als dünner kompakter „Steg“ ausgebildet war, waren nur wenige Osteoklasten zu finden. Sie befanden sich zumeist an der dem Markraum zugewandten Seite des Kallus. Das lässt vermuten, dass die aktive Umbauphase am Kallus in diesen Fällen nahezu abgeschlossen war. Wie vermutet scheint sich so zu bestätigen, dass eine Art Pseudarthrose entstanden ist, auch wenn aufgrund des Studiendesigns offen bleiben muss, wie sich die Situation zu einem späteren Zeitpunkt darstellen würde.

Die Spongiosakontrollgruppe wies eine wesentlich höhere absolute Osteoklastenzahl und Osteoklastendichte als die Gelatinescaffoldgruppe 1 auf. Zu beachten ist aber, dass viele Osteoklasten, die dem Spongiosatransplantat direkt aufsaßen, unbegründbar nicht positiv gefärbt waren (wie in 5.6.1 erwähnt) und deswegen nicht mitgezählt wurden. Daher dürfte die Differenz im Hinblick auf Osteoklastenzahl zwischen Spongiosakontroll- und Gelatinescaffoldgruppe 1 noch größer sein. Die Osteoklastenzahl und -dichte waren in der Gelatinescaffoldgruppe 2 und Spongiosakontrollgruppe nahezu identisch. Die Knochenumbau- und Heilungsprozesse schienen in diesen beiden Gruppen vergleichbar aktiv zu sein. Zusätzlich wurde in allen Gruppen eine höhere Osteoklastenzahl und -dichte in den endostalen Bereichen gefunden. Das vermehrt endostale Osteoklastenvorkommen war zu erwarten, da die Rekonstruktion des Markraums im Verlauf der Knochenheilung als wichtige Voraussetzung für eine fortschreitende und erfolgreiche Wiederherstellung der physiologischen Gefäß- und damit Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Knochengewebes gilt (Braun et al., 1996).

### **5.3 Vergleich mit anderen Studien**

In zahlreichen Modellen wurde die Heilung kritischer Knochendefekte mit Hilfe verschiedenster Biomaterialien/Scaffolds vergleichbar untersucht. Eine *in vivo* Studie, die den Einfluss der Mikrosteifigkeit eines Materials unter diesen Aspekten studiert, gibt es bisher nicht, sodass die eigenen Ergebnisse auch nicht mit denen anderer Studien verglichen werden können. In den vorliegenden *in vivo* Studien wurde meist nur der Einfluss eines Biomaterials allein im Vergleich zum mit Wachstumsfaktoren oder Stammzellen „beladenen“ Biomaterial untersucht.

Petite et al (2000) analysierten die Heilung kritischer Knochendefekte am Metatarsalknochen des Schafes mit Scaffolds aus Korallenexoskeletten. Die Scaffolds wurden allein oder befüllt mit mesenchymalen Stammzellen oder frischem Knochenmark in 25 mm große Defekte transplantiert. Nach einer Standzeit von 16 Wochen wurde die Tiere euthanasiert und die Knochenheilung radiologisch sowie histologisch ausgewertet. Sie stellten fest, dass der Scaffold allein bei keinem Tier zu einer Überbrückung des Defektes führte. Die Osteogenese

war sehr gering. Auch in der Gruppe mit dem frischen Knochenmark war wenig Knochenformation zu erkennen und entsprechend wurde kein Defekt knöchern überbrückt. Bei den mit mesenchymalen Stammzellen bepflanzten Scaffolds wurde, abgesehen von einem Tier, zumindest eine Kortikalis knöchern fusioniert. „Leere“ Scaffolds unterstützen demnach die Heilung verglichen zu „befüllten“ eher nicht.

Tu et al. (2009) prüften in einem vergleichbaren Studiendesign Scaffolds aus Maisprotein allein sowie mit mesenchymalen Stammzellen bepflanzte zur Füllung eines 1,5 cm großen kritischen Defekts im Kaninchenradius. In einer Negativkontrolle wurde der Defekt belassen. Radiologisch konnten nach 12 Wochen in der Negativkontrolle keine neuen Knochenformationen, und in der Scaffoldgruppe ohne Stammzellen nur sehr wenige Knochenformationen nachgewiesen werden. Der Defekt wurde in der Beobachtungszeit nicht knöchern überbrückt. Bei den mit Stammzellen beladenen Scaffold konnte dagegen nach 12 Wochen eine knöcherne Überbrückung festgestellt werden. Auch quantitativ konnte in der CT signifikant mehr neugebildeter Knochen in dieser Gruppe nachgewiesen werden. Dies bestätigte wieder, dass ein Scaffold allein die Knochenheilung nicht ausreichend fördert.

Reichert et al. (2012) wählten im Studiendesign ein Polycaprolactone-Tricalziumphosphat-Scaffolds und setzten kritische Defekte von 3 cm in Schafstibiae. Sie füllten diese mit einem Autograft (Positivkontrolle), mit einem Scaffold allein oder mit Scaffolds beladen mit mesenchymalen Stammzellen oder Wachstumsfaktoren. Zwölf Monate später war bei den „puren“ Scaffolds in der 3D MicroCT-Rekonstruktionen der Defekt nur partiell überbrückt, während beim autologen Transplantat und der Wachstumsfaktorengruppe der Defekt knöchern überbrückt war und bereits ein Remodeling vorlag. Auch quantitativ waren mit den „puren“ Scaffolds, aber auch mit denen mit mesenchymalen Stammzellen, keine Knochenformationen entstanden, wie bei der Autograftgruppe oder der mit Wachstumsfaktoren befüllten.

Wie aus diesen Studien zu ersehen, ist der Einfluss der Mikrosteifigkeit eines Scaffolds allein bisher *in vivo* nicht vergleichend untersucht. Weiterhin haben degradierbare Biomaterialien allein bisher nicht den gewünschten Erfolg in der Knochenregeneration.

In einigen *in vitro* Studien wurde aber der Einfluss bestimmter mechanischer Eigenschaften von Scaffolds, insbesondere ihre Mikrosteifigkeit, im Hinblick auf die Knochenheilung belegt.

Engler et al. (2006) haben die Entwicklung natürlicher humaner mesenchymaler Stammzellen auf 2D Polyacrylamidgelen mit unterschiedlichen Elastizitätsmodulen (Mikrosteifigkeiten) getestet. Sie fanden heraus, dass bei weicheren Substraten (0,1 bis 1 kPa), die ähnlich der Gehirnelastizität waren, Zellen entstanden, die morphologisch Neuronen ähnelten. Bei Substraten, die eine Elastizität wie Muskeln aufwiesen (8 bis 17 kPa) entwickelten sich spindelförmige Zellen, die Myoblasten ähnelten und bei noch steiferen Substraten (25 bis 40 kPa) konnten polygonale Zellen, Osteoblasten ähnlich, nachgewiesen werden. Zur Verifizierung der histologischen Befunde haben die Autoren RNA-Profile von neurogenen, myogenen und osteogenen Markern vorgenommen. An den weichen Gelen wiesen die mesenchymalen Stammzellen die größte Expression von neurogenen Markern auf, an den etwas härteren exprimierten die mesenchymalen Stammzellen myogene Faktoren und an den härtesten wurden vermehrt osteogene Faktoren entdeckt. So war in diesem *in vitro* Versuch

belegt, dass sich mesenchymale Stammzellen an einer steiferen Matrix (25 bis 40 kPa) eher in die osteogene Richtung entwickeln.

Huebsch et al. (2010) studierten den Einfluss unterschiedlicher Mikrosteifigkeiten auf Mäusestammzellen, die in einem 3D Hydrogel aus Alginatpolymeren eingekapselt waren. Der Elastizitätsmodulus der Gele variierte von 2,5 bis 110 kPa. Nach einer Woche wurde der Phänotyp analysiert. Es wurden vermehrt osteogene Zellen in Gelen mit einer Mikrosteifigkeit von 11 bis 30 kPa nachgewiesen, während in weicheren Gelen (2,5 bis 5 kPa) eher Zellen der adipösen Linie gefunden wurden. Auch in dieser Studie wurden die histologischen Ergebnisse durch Analysen osteogener und adipogener Biomarker verifiziert. Es ist damit nachgewiesen, dass ein mikrosteiferes Material die Entwicklung zu osteogenen Zelllinien fördert.

Chatterjee et al. (2010) analysierten wie die mechanischen Eigenschaften von Polyethylenglycol-dimethacrylat-Hydrogelen die Differenzierung von Mäuseosteoblasten, die in diese Gele eingekapselt waren, beeinflussen. Die Hydrogele hatten ein Elastizitätsmodul von 10 bis 300 kPa. Im Ergebnis steigert eine Mikrosteifigkeit von 225 kPa und höher die Osteogenese. Belegen konnten sie dies mit der erhöhten Expression alkaliner Phosphatase und vermehrten Kalziumablagerungen, die histologisch durch eine Alizarin Rot Färbung und radiologisch im MicroCT dargestellt wurden. In dieser Studie wurde erneut nachgewiesen, und dies belegen auch die eigenen Ergebnisse: Ein höhere Mikrosteifigkeit (225 kPa und höher) fördert die Differenzierung von Osteoblasten und steigert die Mineralisierung.

## 5.4 Schlussfolgerung

Scaffolds als Alternative zum autologen Spongiosatransplantat erlangen in Forschung und Klinik eine zunehmende Bedeutung. Ziel der hier vorgelegten Studie war es, den Einfluss der Mikrosteifigkeit eines neuartigen Gelatinescaffolds auf die Knochenheilung zu untersuchen.

Die Hypothese, dass der Gelatinescaffold mit der höheren Mikrosteifigkeit bessere Heilungsergebnisse liefert als der Gelatinescaffold mit der niedrigeren Mikrosteifigkeit, wurde durch die radiologischen und histologischen Untersuchungen bestätigt. Dies war zu erwarten, da, wie in der aktuellen Literatur beschrieben, Materialien mit höheren Elastizitätsmodulen *in vitro* die osteogene Entwicklung fördern (Chatterjee et al., 2010; Engler et al., 2006; Huebsch et al., 2010). Dabei untersuchten die genannten Autoren vorwiegend Mikrosteifigkeiten im Bereich von 30 bis 250 kPa, wobei eine osteogene Entwicklung schon bei circa 30 kPa beobachtet werden konnte. Der in der vorliegenden Studie schlechter heilende, weichere Scaffold (Gelatinescaffold 1) hatte eine Mikrosteifigkeit von 100 kPa und der besser heilende, steifere Scaffold (Gelatinescaffold 2) hatte eine Mikrosteifigkeit von 1200 kPa. Fraglich ist, warum der so viel steifere Scaffold die Knochenheilung besser unterstützte, obwohl er eine wesentlich höhere Mikrosteifigkeit aufwies, als die in den vorrangegangenen *in vitro* Studien zur Osteogenese benötigten ca. 30 kPa. Auch bleibt unklar, warum der weichere Gelatinescaffold mit seinen 100 kPa die Heilung nicht genauso förderte. Tatsächlich wurde noch nie untersucht, ob ein immer steiferes Material die Osteogenese proportional immer mehr fördert. Einerseits ist zu bedenken, dass die natürliche Gelatine im Körper sehr schnell abgebaut wird und daher die Mikrosteifigkeit

der Scaffolds schon nach kurzer Zeit drastisch gesunken sein könnte. Somit besaß der weichere Scaffold vermutlich dann eine nicht mehr optimale Steifigkeit für die Osteogenese, wohingegen der steifere Scaffold sich dadurch eher im Bereich der optimalen Steifigkeit befand. Andererseits darf auch nicht vergessen werden, dass sich *in vitro*-Untersuchungen nicht 1:1 auf die *in vivo*-Situation übertragen lassen. Um diese Fragen zu beantworten, müssten weitere *in vivo* Untersuchungen folgen, bei denen die Degradation der Scaffolds und die sich dadurch verändernde Mikrosteifigkeit auch zu früheren Zeitpunkten intensiv untersucht werden.

Die Hypothese, dass beide Gelatinescaffolds die Heilung nicht so gut unterstützen wie das Spongiosatransplantat, stimmt nur teilweise. Der weichere Gelatinescaffold zeigte signifikant schlechtere Heilungsergebnisse als das Spongiosatransplantat. Allerdings zeigten sich in den quantitativen radiologischen und histologischen Untersuchungen kaum Unterschiede zwischen dem härteren Gelatinescaffold und dem Spongiosatransplantat. Dies bedeutet, dass der härtere Gelatinescaffold die Knochenheilung in gleicher Weise fördert wie die transplantierte Spongiosa. Jedoch ist zu bedenken, dass es sich bei diesem Spongiosatransplantat um ein Xenograft handelte, welches zusätzlich sterilisiert wurde. Es ist anzunehmen, dass ein frisch transplantiertes Autograft bessere Heilungsergebnisse liefern würde. Zukünftige Studien an größeren Versuchstieren (z.B. Schafe), bei denen die Verwendung eines Autografts möglich wäre, sollten folgen um hier Klärung zu schaffen.

Abschließend ist zu bemerken, dass keines der Tiere nach einer Standzeit von sechs Wochen eine knöcherne Überbrückung und damit eine Heilung des kritischen Defektes zeigte. Bei den Gelatinescaffoldtieren zeigten sich teilweise sogar Zeichen einer sich ausbildenden Pseudarthrose, wie verminderte Vaskularisierung, abgerundete remodelte Kallusenden oder Muskelprolaps. Um in vorliegender Studie eine abschließende Aussage über den endgültigen Heilungsausgang treffen zu können, ist der Beobachtungszeitraum mit sechs Wochen zu kurz bemessen. Es kann lediglich die Aussage getroffen werden, dass bis zum letzten Untersuchungszeitpunkt von sechs Wochen eine deutliche Verzögerung mit ungewissem Heilungsausgang vorliegt. In wie fern es nach einer längeren Standzeit doch zur weiteren Heilungen und Überbrückungen kommen würde, sollte in zukünftigen Studien geprüft werden.

Zusammenfassend wurde in der hier diskutierten Studie gezeigt, dass die Mikrosteifigkeit eines Materials großen Einfluss auf die Knochenregeneration hat und, dass ein mikrosteiferes Material die Knochenheilung besser fördert. Für die Behandlung von Knochendefekten kritischer Größe scheint jedoch der Gelatinescaffold allein im Moment noch nicht die gewünschten Heilungsergebnisse erzielen zu können. Weitere Untersuchungen auch anderer wichtiger mechanischer Eigenschaften sind nötig, um zukünftig ein Biomaterial zu entwickeln, was das autologe Spongiosatransplantat gegebenenfalls ersetzen kann. Weiterhin vielversprechend scheint die Kombination mit zellulären oder humoralen Faktoren.

## 6 Zusammenfassung

Die Heilung von Knochendefekten kritischer Größe stellt immer noch eine Herausforderung dar, da sie ohne weitergehende Eingriffe in einer verzögerten oder ausbleibenden Heilung (Pseudarthrose) enden (Mathon et al., 1998). Die Behandlung mit autologer Spongiosa als Goldstandard funktioniert gut, besitzt jedoch auch viele Nachteile (Jäger et al., 2005a; Rompe et al., 2004). Daher werden immer mehr Knochenersatzmaterialien, sogenannte Scaffolds, entwickelt, die die Knochenheilung leiten und somit unterstützen sollen. Dabei sind besonders die mechanischen Eigenschaften, wie die Mikrosteifigkeit, dieser Scaffolds für die Osteoregeneration wichtig und müssen optimal an die Bedürfnisse des heilenden Knochens angepasst werden (Chatterjee et al., 2010; Engler et al., 2006; Huebsch et al. 2010). In dieser Studie wurde erstmals *in vivo* der Einfluss der Mikrosteifigkeit des Scaffoldmaterials, also den Widerstand den eine Zelle fühlt, wenn sie an die extrazelluläre Matrix bindet, untersucht. Dafür wurden im Helmholtz Zentrum Geesthacht zwei Gelatinescaffolds entwickelt, die sich in ihren mechanischen Eigenschaften nur in der Mikrosteifigkeit unterschieden. Der Gelatinescaffold 1 besaß eine Mikrosteifigkeit von etwa 100 kPa, der Gelatinescaffold 2 eine Mikrosteifigkeit von etwa 1200 kPa. Bei 24 Ratten, die randomisiert in drei Gruppen aufgeteilt wurden, wurde ein fünf Millimeter Defekt am Os Femoris erzeugt. Dieser wurde mit einem unilateralen Fixateur extern stabilisiert und in der ersten Gruppe mit dem weicheren Scaffold (Gelatinescaffoldgruppe 1), in der zweiten Gruppe mit dem härteren Scaffold (Gelatinescaffoldgruppe 2) und in der dritten Gruppe mit einem xenogenen Spongiosatransplantat (Spongiosakontrollgruppe) als Positivkontrolle gefüllt. Röntgenkontrollen und MicroCT-Untersuchungen erfolgten alle zwei Wochen. Nach einer Standzeit von sechs Wochen wurden die Tiere euthanasiert, die Oberschenkelknochen entnommen und histologisch, immunhistochemisch und histomorphometrisch untersucht.

Radiologisch und histologisch zeigte keines der Tiere der Gelatinescaffoldgruppen nach sechs Wochen eine knöcherne Überbrückung, jedoch gab es bei einem Tier aus der Gelatinescaffoldgruppe 2 eine knorpelige Überbrückung und ein weiteres Tier dieser Gruppe stand kurz vor einer knöchernen Konsolidierung. Die restlichen Tiere aus den beiden Gelatinescaffoldgruppen zeigten allerdings teilweise Zeichen einer verzögerten Heilung in Form von verminderter Vaskularisierung, abgerundeter Kallusenden oder Muskelprolaps in den Osteotomiespalt. Auch in der Spongiosakontrollgruppe gab es nach sechs Wochen keine knöcherne Überbrückung des Defektes. Im Osteotomiespalt war die Spongiosa noch gut zu erkennen und teilweise schon in den sich neubildenden knöchernen Kallus eingebaut. Zeichen einer verzögerten Heilung wurden kaum beobachtet. In den quantitativen radiologischen und histomorphometrischen Messungen zeigte sich, dass im Vergleich die Gelatinescaffoldgruppe 2 signifikant größere neue Knochen- und Knorpelbildungen im Kallus aufwies, als die Gelatinescaffoldgruppe 1. Auch in der Spongiosakontrollgruppe war der neugebildete knöcherne und knorpelige Kallus signifikant größer als der der Gelatinescaffoldgruppe 1. Zwischen der Gelatinescaffoldgruppe 2 und der Spongiosakontrollgruppe bestanden jedoch keine quantitativen Unterschiede im neugebildeten Kallus.

Daraus lässt sich schließen, dass der Scaffold mit der höheren Mikrosteifigkeit die Knochenheilung nicht nur besser unterstützt als der Scaffold mit der niedrigeren Mikrosteifigkeit, sondern sogar in ähnlicher Weise wie das Spongiosatransplantat.

## 7 Summary

### **Analyzing the influence of the biomaterial parameter „microstiffness“ of novel gelatin scaffolds on bone regeneration in a rat defect model.**

Healing of a critical size defect remains still a challenge, because without intervention it ends in a delayed healing or nonunion (Mathon et al., 1998). Treatment with an autologous cancellous bone transplant, the gold standard, often works well, but also possesses many disadvantages (Jäger et al., 2005a; Rompe et al., 2004). Thus many new bone substitutes, used as scaffolds, are being developed. These scaffolds shall “guide” and thereby promote the bone healing process. The mechanical properties of the scaffold, such as the microstiffness are very important for osteoregeneration and have to be tailored in an optimal manner to address the needs of the healing bone (Chatterjee et al., 2010; Engler et al., 2006; Huebsch et al. 2010). This study examined, for the first time, the influence of the microstiffness of the scaffold material on the healing outcome *in vivo*. The microstiffness affects the resistance a cell feels when it binds to the extracellular matrix. Therefore, two gelatin scaffolds were developed at the Helmholtz Centrum Geesthacht. The mechanical properties of these scaffolds only differ in their microstiffness. Gelatin scaffold 1 had a microstiffness of 100 kPa and Gelatin scaffold 2 had a microstiffness of 1200 kPa. In 24 rats, which were randomized and divided into three groups, a five millimeter defect at the os femoris was created. This defect was stabilized with a unilateral external fixator and was filled in the first group with the softer scaffold (gelatin scaffold group 1), while the second group received the stiffer scaffold (gelatin scaffold group 2), and the third group received a xenograft of cancellous bone (positive control group). Biweekly radiographs and *in vivo* micro-computer tomography scans were prepared. After six weeks the animals were euthanized, the bones were obtained and evaluated histologically. Radiologic and histological analysis revealed that no animals from the two gelatin scaffold groups showed a bony bridging after six weeks. However, one animal from the gelatin scaffold group 2 shows a cartilaginous bridging and another animal from this group had almost achieved bony consolidation. The remaining animals from both gelatin scaffold groups indicated some signs of delayed healing, such as decreased vascularisation, rounded ends of the callus or prolapsed muscle into the osteotomy gap. Even in the cancellous bone graft group, no animal had a bony bridging of the gap after six week. The cancellous bone graft was clearly visible in the gap and partly already consolidated into the newly formed bony callus. Signs of delayed healing were hardly observed in this group. The quantitative radiologic and histological measurements showed that the gelatin scaffold group 2 had significantly higher bone and cartilage formations in the new formed callus than the gelatin scaffold group 1. Also, the cancellous bone graft group had significantly higher new bone and cartilage callus tissue formation than the gelatin scaffold group 1. However, there were no quantitative differences in the amount of bone or cartilage tissue formation between the gelatin scaffold group 2 and the cancellous bone graft group. That implies that the scaffold with the higher microstiffness not only better supported the bone healing than the scaffold with the lower microstiffness, it even supported a similar degree of healing to that of the cancellous bone graft.

## 8 Literatur

- Amling, M., Delling, G., 1996. Cell biology of osteoclasts and molecular mechanisms of bone resorption. *Pathologie* 17, 358–367.
- Arnold, U., Lindenhayn, K., Perka, C., 2002. *In vitro*-cultivation of human periosteum derived cells in bioresorbable polymer-TCP-composites. *Biomaterials* 23, 2303–2310.
- Arrington, E.D., Smith, W.J., Chambers, H.G., Bucknell, A.L., Davino, N.A., 1996. Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 300–309.
- Athanasίου, V.T., Papachristou, D.J., Panagopoulos, A., Saridis, A., Scopa, C.D., Megas, P., 2010. Histological comparison of autograft, allograft-DBM, xenograft, and synthetic grafts in a trabecular bone defect: an experimental study in rabbits. *Med. Sci. Monit.* 16, BR 24–31.
- Babhulkar, S., Pande, K., Babhulkar, S., 2005. Nonunion of the diaphysis of long bones. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 50–56.
- Banwart, J.C., Asher, M.A., Hassanein, R.S., 1995. Iliac crest bone graft harvest donor site morbidity. A statistical evaluation. *Spine* 20, 1055–1060.
- Bonewald, L.F., 2002. Osteocytes: a proposed multifunctional bone cell. *J Musculoskeletal Neuronal Interact* 2, 239–241.
- Bormann, N., Pruss, A., Schmidmaier, G., Wildemann, B., 2010. *In vitro* testing of the osteoinductive potential of different bony allograft preparations. *Arch Orthop Trauma Surg* 130, 143–149.
- Bosch, U., Skutek, M., Kasperczyk, W.J., Tscherne, H., 1999. Nonunion of the humeral diaphysis - operative and nonoperative treatment. *Chirurg* 70, 1202–1208.
- Bradley, R.L., Rouse, G.P., 1980. External skeletal fixation using the through-and-through Kirschner splint. *J Am Anim Hosp Assoc.* 523–530.
- Braun, W., Rüter, A., 1996. Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects. *Unfallchirurg* 99, 59–67.
- Brighton, C.T., 1984. The biology of fracture repair. *Instr Course Lect* 33, 60–82.
- Bruder, S.P., Kraus, K.H., Goldberg, V.M., Kadiyala, S., 1998. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 80, 985–996.
- Bucher, O., Wartenberg, H., 1997. *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen.* Huber, Bern.
- Cen, L., Liu, W., Cui, L., Zhang, W., Cao, Y., 2008. Collagen tissue engineering:

- development of novel biomaterials and applications. *Pediatr. Res.* 63, 492–496.
- Chatterjee, K., Lin-Gibson, S., Wallace, W.E., Parekh, S.H., Lee, Y.J., Cicerone, M.T., Young, M.F., Simon, C.G., Jr, 2010. The effect of 3D hydrogel scaffold modulus on osteoblast differentiation and mineralization revealed by combinatorial screening. *Biomaterials* 31, 5051–5062.
- Claes, L., Recknagel, S., Ignatius, A., 2012. Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nat Rev Rheumatol* 8, 133–143.
- Connolly, J.F., 1998. Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res* 257–266.
- Cruess, R.L., Dumont, J., 1975. Fracture healing. *Can J Surg* 18, 403–413.
- Den Buijs, J.O., Dragomir-Daescu, D., Ritman, E.L., 2009. Cyclic deformation-induced solute transport in tissue scaffolds with computer designed, interconnected, pore networks: experiments and simulations. *Ann Biomed Eng* 37, 1601–1612.
- Develioglu, H., Unver Saraydin, S., Kartal, U., 2009. The bone-healing effect of a xenograft in a rat calvarial defect model. *Dent Mater J* 28, 396–400.
- Draye, J.P., Delaey, B., Van de Voorde, A., Van Den Bulcke, A., De Reu, B., Schacht, E., 1998. *In vitro* and *in vivo* biocompatibility of dextran dialdehyde cross-linked gelatin hydrogel films. *Biomaterials* 19, 1677–1687.
- Dreesmann, L., Ahlers, M., Schlosshauer, B., 2007. The pro-angiogenic characteristics of a cross-linked gelatin matrix. *Biomaterials* 28, 5536–5543.
- Einhorn, T.A., 1995. Enhancement of fracture-healing. *J Bone Joint Surg Am* 77, 940–956.
- Einhorn, T.A., 1998. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.* 7–21.
- Eitel, F., Seiler, H., Schweiberer, L., 1981. Morphological examination of animal-experiment results: comparison with regeneration of the human bone-structure. II. Research results (author's transl). *Unfallheilkunde* 84, 255–264.
- Engler, A.J., Sen, S., Sweeney, H.L., Discher, D.E., 2006. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 126, 677–689.
- Frost, H.M., 1989a. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res* 283–293.
- Frost, H.M., 1989b. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II. *Clin Orthop Relat Res* 294–309.
- Gautschi, O.P., Frey, S.P., Zellweger, R., 2007. Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg* 77, 626–631.

- Gazdag, Lane, Glaser, Forster, 1995. Alternatives to Autogenous Bone Graft: Efficacy and Indications. *J Am Acad Orthop Surg* 3, 1–8.
- Gilbert, P.M., Havenstrite, K.L., Magnusson, K.E.G., Sacco, A., Leonardi, N.A., Kraft, P., Nguyen, N.K., Thrun, S., Lutolf, M.P., Blau, H.M., 2010. Substrate elasticity regulates skeletal muscle stem cell self-renewal in culture. *Science* 329, 1078–1081.
- Gugala, Z., Gogolewski, S., 2002. Healing of critical-size segmental bone defects in the sheep tibiae using bioresorbable polylactide membranes. *Injury* 33 Suppl 2, B71–76.
- Haas, N.P., 2000. Callus modulation--fiction or reality? *Chirurg* 71, 987–988.
- Harrison, L.J., Cunningham, J.L., Strömberg, L., Goodship, A.E., 2003. Controlled induction of a pseudarthrosis: a study using a rodent model. *J Orthop Trauma* 17, 11–21.
- Hench, L.L., 1980. Biomaterials. *Science* 208, 826–831.
- Hench, L.L., Polak, J.M., 2002. Third-generation biomedical materials. *Science* 295, 1014–1017.
- Hietaniemi, K., Peltonen, J., Paavolainen, P., 1995. An experimental model for non-union in rats. *Injury* 26, 681–686.
- Huebsch, N., Arany, P.R., Mao, A.S., Shvartsman, D., Ali, O.A., Bencherif, S.A., Rivera-Feliciano, J., Mooney, D.J., 2010. Harnessing traction-mediated manipulation of the cell/matrix interface to control stem-cell fate. *Nat Mater* 9, 518–526.
- Jäger, M., Westhoff, B., Wild, A., Krauspe, R., 2005a. Bone harvesting from the iliac crest. *Orthopade* 34, 976–982, 984, 986–990, 992–994.
- Jäger, M., Sager, M., Lensing-Höhn, S., Krauspe, R., 2005b. 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.
- Jäger, M., Sager, M., Lensing-Höhn, S., Krauspe, R., 2005c. 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.
- Junqueira, L.C., Carneiro, J., 2002. *Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen ; unter Berücksichtigung der Histophysiologie ; mit 21 Tabellen* 5. Auflage, Springer, Berlin
- Kalfas, I.H., 2001. Principles of bone healing. *Neurosurg Focus* 10, E1.
- Kaspar, K., Schell, H., Toben, D., Matziolis, G., Bail, H.J., 2007. An easily reproducible and biomechanically standardized model to investigate bone healing in rats, using external fixation. *Biomed Tech (Berl)* 52, 383–390.

- Klaushofer, K., Peterlik, M., 1994. Pathophysiology of fracture healing. *Radiologe* 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* 21, 503–510.
- Kutscha-Lissberg, F., Hopf, K.F., 2003. Why do osteosyntheses fail? The problem with biomechanics and biology. *Unfallchirurg* 106, 708–721.
- Lane, J.M., 1998. Breakout session. 2: Fracture repair process. *Clin Orthop Relat Res* 355 Suppl, 354–355.
- Lee, K.-W., Wang, S., Yaszemski, M.J., Lu, L., 2008. Physical properties and cellular responses to crosslinkable poly(propylene fumarate)/hydroxyapatite nanocomposites. *Biomaterials* 29, 2839–2848.
- Levi, B., James, A.W., Nelson, E.R., Vistnes, D., Wu, B., Lee, M., Gupta, A., Longaker, M.T., 2010. Human adipose derived stromal cells heal critical size mouse calvarial defects. *PLoS ONE* 5, e11177.
- Li, Z., Kong, K., Qi, W., 2006. Osteoclast and its roles in calcium metabolism and bone development and remodeling. *Biochem Biophys Res Commun* 343, 345–350.
- Liebich, H.-G., 1999. Funktionelle Histologie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis ; mit 5 Tabellen. Schattauer, Stuttgart.
- Lienau, J., Schell, H., Duda, G.N., Seebeck, P., Muchow, S., Bail, H.J., 2005. Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res* 23, 639–645.
- Luetzow, K., Klein, F., Weigel, T., Apostel, R., Weiss, A., Lendlein, A., 2007. Formation of poly(epsilon-caprolactone) scaffolds loaded with small molecules by integrated processes. *J Biomech* 40 Suppl 1, S80–88.
- Lutolf, M.P., Raeber, G.P., Zisch, A.H., Tirelli, N., Hubbell, J.A., 2003. Cell-Responsive Synthetic Hydrogels. *Advanced Materials* 15, 888–892.
- Lutolf, M.P., Gilbert, P.M., Blau, H.M., 2009. Designing materials to direct stem-cell fate. *Nature* 462, 433–441.
- Ma, H.-L., Chen, T.-H., Hung, S.-C., 2004. Development of a new method in promoting fracture healing: multiple cryopreserved bone marrow injections using a rabbit model. *Arch Orthop Trauma Surg* 124, 448–454.
- Mann, F.A., Payne, J.T., 1989. Bone healing. *Semin Vet Med Surg Small Anim* 4, 312–321.
- Mark, H., Bergholm, J., Nilsson, A., Rydevik, B., Strömberg, L., 2003. An external fixation method and device to study fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 74, 476–482.

- Martin, R.B., 1998. *Skeletal tissue mechanics*. Springer, New York.
- Mastrogiacomo, M., Papadimitropoulos, A., Cedola, A., Peyrin, F., Giannoni, P., Pearce, S.G., Alini, M., Giannini, C., Guagliardi, A., Cancedda, R., 2007. Engineering of bone using bone marrow stromal cells and a silicon-stabilized tricalcium phosphate bioceramic: evidence for a coupling between bone formation and scaffold resorption. *Biomaterials* 28, 1376–1384.
- Mathon et al., D.H., Autefage, A., 1998. Development of a Segmental Long-bone Defect Model in Sheep. *Vet Comp Orthop Traumatol* 11, 1–7.
- McKibbin, B., 1978. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 60-B, 150–162.
- Mehta, M., Schell, H., Schwarz, C., Peters, A., Schmidt-Bleek, K., Ellinghaus, A., Bail, H.J., Duda, G.N., Lienau, J., 2010. A 5-mm femoral defect in female but not in male rats leads to a reproducible atrophic non-union. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 131, 121–129.
- Murphy, C.M., Haugh, M.G., O'Brien, F.J., 2010. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 31, 461–466.
- Nakanishi, M., Yoh, K., Uchida, K., Maruo, S., Rai, S.K., Matsuoka, A., 1999. Clinical usefulness of serum tartrate-resistant fluoride-sensitive acid phosphatase activity in evaluating bone turnover. *J. Bone Miner Metab* 17, 125–130.
- Neffe, A.T., Lendlein, A., 2007. Tailoring established polymers for medical applications. *Med Device Technol* 18, 14–16, 18–19.
- Noble, B.S., Reeve, J., 2000. Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance. *Mol Cell Endocrinol* 159, 7–13.
- Nunamaker, D.M., 1998. Experimental models of fracture repair. *Clin Orthop Relat Res* 355 Suppl, 56–65.
- O'Brien, F.J., Harley, B.A., Yannas, I.V., Gibson, L.J., 2005. The effect of pore size on cell adhesion in collagen-GAG scaffolds. *Biomaterials* 26, 433–441.
- Olah, A.J., Simon, A., Gaudy, M., Herrmann, W., Schenk, R.K., 1977. Differential staining of calcified tissues in plastic embedded microtome sections by a modification of Movat's pentachrome stain. *Stain Technol* 52, 331–337.
- Op Den Buijs, Jorn, Erik L. Ritman, and Dan Dragomir-Daescu. 2010. "Validation of a Fluid-Structure Interaction Model of Solute Transport in Pores of Cyclically Deformed Tissue Scaffolds. *Tissue Eng., Part C: Methods* 16 (5), 1145–1156.
- Owen, M., 1970. The origin of bone cells. *Int Rev Cytol* 28, 213–238.
- Palmer, R.H., Hulse, D.A., Hyman, W.A., Palmer, D.R., 1992. Principles of bone healing and

- biomechanics of external skeletal fixation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 22, 45–68.
- Park, J.-W., Jang, J.-H., Bae, S.-R., An, C.-H., Suh, J.-Y., 2009. Bone formation with various bone graft substitutes in critical-sized rat calvarial defect. *Clin Oral Implants Res* 20, 372–378.
- Petite, H., Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., De Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L., Guillemin, G., 2000. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 18, 959–963.
- Probst, A., Spiegel, H.U., 1997. Cellular mechanisms of bone repair. *J Invest Surg* 10, 77–86.
- Pschyrembel, W., 1998. *Klinisches Wörterbuch*, 258th ed. De Gruyter, Berlin; New York.
- Radasch, R.M., 1999. Biomechanics of bone and fractures. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29, 1045–1082, v–vi.
- 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* 20, 593–599.
- Reichert, J.C., Cipitria, A., Epari, D.R., Saifzadeh, S., Krishnakanth, P., Berner, A., Woodruff, M.A., Schell, H., Mehta, M., Schuetz, M.A., Duda, G.N., Hutmacher, D.W., 2012. A tissue engineering solution for segmental defect regeneration in load-bearing long bones. *Sci Transl Med* 4, 141ra93.
- Remedios, A., 1999. Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29, 1029–1044, v.
- Rhineland, F.W., 1974. Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 34–81.
- Roach, H.I., Shearer, J.R., Archer, C., 1989. The choice of an experimental model. A guide for research workers. *J Bone Joint Surg Br* 71, 549–553.
- Rompe, J.D., Schöllner, C., Heine, J., 2004. Operative und nichtoperative Behandlung bei Pseudarthrosen. Hochenergetische Stoßwellentherapie. *Trauma Berufskrankh* 6, 357–367.
- Rüter, A., Mayr, E., 1999. Pseudarthrosis. *Chirurg* 70, 1239–1245.
- Runkel, M., Rommens, P.M., 2000. Pseudoarthrosis. *Unfallchirurg* 103, 51–63.
- Sahibzada, A.S., Khan, M.A., Khan, M.S., 2005. Management of tibial bone defects due to high energy trauma using the locally manufactured external fixator by segmental bone transport. *J Ayub Med Coll Abbottabad* 17, 68–72.
- Schell, H., Lienau, J., Epari, D.R., Seebeck, P., Exner, C., Muchow, S., Bragulla, H., Haas, N.P., Duda, G.N., 2006. Osteoclastic activity begins early and increases over the

- course of bone healing. *Bone* 38, 547–554.
- Schenk, R.K., 1975. Histology of primary bone healing. *Fortschr Kiefer Gesichtschir* 19, 8–12.
- Schiebler, T.H., 1986. *Histologie: Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen ; unter Berücksichtigung der Histophysiologie*, 2. Auflage. Springer, Berlin.
- Schnorr, B., Kressin, M., 2006. *Embryologie der Haustiere: ein Kurzlehrbuch ; 14 Tabellen*. Enke, Stuttgart.
- Schwarz, C., Wulsten, D., Ellinghaus, A., Lienau, J., Willie, B.M., Duda, G.N., 2013. Mechanical load modulates the stimulatory effect of BMP2 in a rat nonunion model. *Tissue Eng Part A* 19, 247–254.
- 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. *Chirurg* 70, 1193–1201.
- Shastri, V.P., Lendlein, A., 2009. Materials in regenerative medicine. *Adv Mater Weinheim* 21, 3231–3234.
- Simmons, D.J., 1985. Fracture healing perspectives. *Clin Orthop Relat Res* 200, 100–113.
- 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.
- Stürmer, K.M., 1996. Pathophysiology of disrupted bone healing. *Orthopade* 25, 386–393.
- Swartz, M.A., Fleury, M.E., 2007. Interstitial flow and its effects in soft tissues. *Annu Rev Biomed Eng* 9, 229–256.
- Trostle, S.S., Markel, M.D., 1996. Fracture biology, biomechanics, and internal fixation. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 12, 19–46.
- Tu, J., Wang, H., Li, H., Dai, K., Wang, J., Zhang, X., 2009. The *in vivo* bone formation by mesenchymal stem cells in zein scaffolds. *Biomaterials* 30, 4369–4376.
- Urciuolo, F., Imparato, G., Netti, P.A., 2008. Effect of dynamic loading on solute transport in soft gels implication for drug delivery. *AIChE Journal* 54, 824–834.
- Volpon, J.B., 1994. Nonunion using a canine model. *Arch Orthop Trauma Surg* 113, 312–317.
- Wang, X., Shen, X., Li, X., Agrawal, C.M., 2002. Age-related changes in the collagen network and toughness of bone. *Bone* 31, 1–7.

- Webb, J. C., Tricker, J., 2000. Bone biology- a review of fracture healing. *Current Orthopaedics* 12, 457–463.
- Weiner, S., Wagner, H.D., 1998. THE MATERIAL BONE: Structure-Mechanical Function Relations. *Annual Review of Materials Science* 28, 271–298.
- Weiss, S., Zimmermann, G., Baumgart, R., Kasten, P., Bidlingmaier, M., Henle, P., 2005. Systemic regulation of angiogenesis and matrix degradation in bone regeneration--distraction osteogenesis compared to rigid fracture healing. *Bone* 37, 781–790.
- Weyrauch, K.D., Schnorr, B., 1998. *Histologie-Kurs für Veterinärmediziner*. Enke, Stuttgart.
- Willenegger, H., Perren, S.M., Schenk, R., 1971. Primary and secondary healing of bone fractures. *Chirurg* 42, 241–252.
- Willie, B.M., Petersen, A., Schmidt-Bleek, K., Cipitria, A., Mehta, M., Strube, P., Lienau, J., Wildemann, B., Fratzl, P., Duda, G., 2010. Designing biomimetic scaffolds for bone regeneration: why aim for a copy of mature tissue properties if nature uses a different approach? *Soft Matter* 6, 4976-4987.
- Zimmermann, G., Wagner, C., Moghaddam, A., Wentzensen, A., 2006. Notwendigkeit von „bone morphogenetic proteins“ in der Frakturbehandlung. *Trauma und Berufskrankheit* 8, 45–48.
- Zohuriaan-Mehr, M.J., Pourjavadi, A., Salimi, H., Kurdtabar, M., 2009. Protein- and homo poly(amino acid)-based hydrogels with super-swelling properties. *Polymers for Advanced Technologies* 20, 655–671.
- Zou, D., Zhang, Z., He, J., Zhu, S., Wang, S., Zhang, W., Zhou, J., Xu, Y., Huang, Y., Wang, Y., Han, W., Zhou, Y., Wang, S., You, S., Jiang, X., Huang, Y., 2011. Repairing critical-sized calvarial defects with BMSCs modified by a constitutively active form of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  and a phosphate cement scaffold. *Biomaterials* 32, 9707–9718.

## **Danksagung**

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Brunberg für die Betreuung und Durchsicht meiner Arbeit als Erstgutachter danken.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. Duda für die Bereitstellung des Themas und die Möglichkeit die Arbeit an seinem Institut durchzuführen.

Ein sehr großes Dankeschön geht an Dr. Bettina Willie für die intensive Betreuung und Hilfe im Projekt.

Des Weiteren möchte ich Dr. Hanna Schell für die Hilfe danken, meine Gedanken und Ergebnisse geordnet auf Papier zu bringen.

Danke auch an Dr. Agnes Ellinghaus, Gabriela Korus und Mario Thiele für die intensive und immer freundliche Unterstützung im OP, Labor und Bildanalyse.

Allen Mitarbeitern des Julius Wolff Institutes gilt mein Dank für das immer freundliche und aufgeschlossene Arbeitsklima, in dem ich mich in den 3 Jahren der Durchführung meiner Arbeit immer wohl gefühlt habe.

Mein größter Dank jedoch gilt meiner Familie, die mich immer bei allem unterstützt und fest an mich glaubt.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen Anspruch genommen habe.

Berlin, September 2013

Michèle Forner