

Aus dem
Institut für Veterinär-Pathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der freien Universität Berlin
und dem
Forschungslabor des Centrums für muskuloskeletale Chirurgie, Charité
Universitätsmedizin–Berlin

**Einfluss autologer osteogen prädifferenzierter
mesenchymaler Stammzellen auf die Knochenheilung
im atrophen Pseudarthrose-Modell
der Ratte**

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

vorgelegt von
Barbara Bach
Tierärztin aus Dierdorf

Berlin 2008
Journal-Nr.: 3234

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: PD Dr. A. Sterner-Kock, PhD
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr.-Ing. G.N. Duda
Dritter Gutachter: PD Dr. J. Walter

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

rats, animal models, fracture healing, postoperative complications,
pseudarthrosis, embryonic stem cells, mesenchymal stem cells [MeSH], cell
differentiation, osteogenesis

Tag der Promotion: 23.09.2008

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: 978-3-86664-486-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2008

Dissertation, Freie Universität Berlin

D188

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

© mbv 2008

Nordendstr. 75 - 13156 Berlin - 030-45494866
verlag@menschundbuch.de - www.menschundbuch.de

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1 Einleitung.....	3
2 Stand des Wissens.....	5
2.1 Biologie des Knochens	5
2.1.1 Funktionalität des Knochengewebes.....	5
2.1.2 Makroskopischer Aufbau des Knochens.....	6
2.1.3 Grundbausteine des Knochengewebes.....	8
2.1.4 Histologischer Aufbau und Entwicklung des Knochens.....	15
2.2 Knochenheilung.....	21
2.2.1 Primäre Frakturheilung.....	22
2.2.2 Sekundäre Frakturheilung.....	23
2.3 Störungen der Knochenheilung.....	31
2.3.1 Formen der Knochenheilungsstörungen.....	31
2.3.2 Ätiologie der atrophen Pseudarthrose.....	33
2.3.3 Morphologie und Diagnostik atropher Pseudarthrose	38
2.3.4 Therapie atropher Pseudarthrose.....	39
2.4 Mesenchymale Stammstellen.....	44
2.4.1 Zellursprung.....	44
2.4.2 Differenzierung und Kultivierung.....	44
2.4.3 Einsatz in osteoregenerativer Wissenschaft und Therapie.....	48
2.5 Hypothese der Studie.....	50
3 Material und Methoden.....	51
3.1 Auswahl und Haltung der Tiere.....	51
3.2 Aufbau der Studie.....	52
3.2.1 Versuchsplan.....	52
3.2.2 Fixateur externe.....	53
3.2.3 Zellexpansion und osteogene Prädifferenzierung.....	54
3.3 Operationen und Zelltransplantation.....	56
3.3.1 Gewinnung des Knochenmarks.....	56
3.3.2 Osteotomie.....	57
3.3.3 Zelltransplantation.....	62

3.4	Untersuchungen.....	63
3.4.1	Gewichts- und Temperaturkontrolle.....	63
3.4.2	Wund- und Pin-Pflege.....	63
3.4.3	Radiologische Untersuchung.....	63
3.5	Probengewinnung.....	64
3.5.1	Euthanasie.....	64
3.5.2	Probenentnahme.....	64
3.6	Probenaufbereitung.....	65
3.6.1	Fixation.....	65
3.6.2	Entwässerung und Einbettung.....	65
3.6.3	Herstellung von Schnittpräparaten	68
3.6.4	Färbungen.....	70
3.7	Auswertung.....	76
3.7.1	Festlegung der Region of Interest (ROI).....	76
3.7.2	Deskriptive Auswertungen.....	79
3.7.3	Histomorphometrische Auswertung.....	80
3.7.4	Histologische Auswertung.....	83
3.7.5	Statistik.....	86
4	Ergebnisse.....	88
4.1	Operationsverlauf und Tierkontrolle.....	88
4.2	Ergebnisse der deskriptiven Auswertung.....	89
4.2.1	Radiologische Aufnahmen.....	89
4.2.2	Deskriptive Histologie.....	90
4.3	Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung.....	102
4.3.1	Gesamtflächenanalyse.....	102
4.3.2	Analyse des endostalen Kallus.....	105
4.3.3	Analyse des periostalen Kallus.....	108
4.3.4	Kollagen II-Analyse.....	111
4.4	Ergebnisse der histologischen Auswertung.....	115
4.4.1	Osteoklastendichte.....	115
4.4.2	Gefäßdichte.....	119

5	Diskussion.....	124
5.1	Material und Methoden.....	124
5.1.1	Auswahl der Tiere.....	124
5.1.2	Entnahme, Kultivierung und Prädifferenzierung der MSCs.....	126
5.1.3	Modell der atrophen Pseudarthrose.....	129
5.1.4	Probengewinnung und Aufbereitung.....	132
5.1.5	Auswertung.....	134
5.2	Ergebnisse der Studie.....	137
5.2.1	Operationsverlauf und Tierkontrolle.....	137
5.2.2	Radiologie.....	138
5.2.3	Histomorphometrie und Histologie.....	138
5.2.4	Vergleich mit anderen Studien.....	156
5.2.5	Schlussfolgerung und Ausblick.....	159
6	Zusammenfassung.....	162
7	Summary.....	164
8	Literatur.....	166
	Anhang.....	177
	Färbeprotokolle der histologischen Schnitte.....	177
	Danksagung.....	183
	Selbständigkeitserklärung.....	184

Abkürzungsverzeichnis

°	Winkelgrad	Fa.	Firma
°C	Grad Celsius	FCS	fetales Kälberserum
A.	Arteria	FGF	Fibroblast Growth Factor
Abb.	Abbildung	g	Gramm
ABC	Avidin-Biotin-Complex	GD	Gefäßdichte
AG	Antigen	i.p.	intra peritoneal
AK	Antikörper	KD	Kirschner-Draht
AP	Alkalische Phosphatase	KG	Körpergewicht
aPA	atrophe Pseudarthrose	KHz	Kiloherz
Aqua dest.	Aqua destillata	KT	Körpertemperatur
Art.	Articulatio	l	Liter
BMP(s)	Bone Morphogenetic Protein(s)	m.	Musculus
BMSC	Bone Marrow Stromal Cell	MEA	2-Methoxyethyl-Acetat
BSP	Bone Sialoprotein	mg	Milligramm
CFU-F	Colony Forming Unit-Fibroblast	MHz	Megahertz
cm	Zentimeter	Min.	Minute
cm ²	Quadratcentimeter	mineral.	mineralisiert
cm ³	Kubikcentimeter	ml	Milliliter
CO ₂	Kohlendioxid	mM	Millimol
d	Tag	mm	Millimeter
DMEM	Dulbcos Modified Eagles Medium	mRNA	messenger Ribonucleinsäure
ESWT	Extrakorporale Stoßwellentherapie	MSC(s)	mesenchymale Stammzelle(n) (Mesenchymal Stem Cell(s))

N	Newton	ROI	Region of Interest (Region von Interesse)
OD	Osteoklastendichte	s.c.	subcutan
OPC(s)	Osteoprogenitorzelle(n)	Std.	Stunde(n)
p.o.	post operationem	SvK	Safranin Organge/von Kossa
PA	Pseudarthrose	tgl.	täglich
p _{abs.}	absoluter p-Wert [mm ²]	TRAP	Tartrate-Resistent-Acid- Phosphatase
PBS	Phosphat-Puffer-Lösung	U/Min.	Umdrehungen pro Minute
PMMA	Polymethylmethacrylat	V.	Vena
p _{rel.}	relativer p-Wert [%]	α-SMA	α-Smooth Muscle Actin
PTH	Parathormon	μM	Mirkromol
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum	μm	Mikrometer

1 Einleitung

Die Knochenheilung umfasst einen komplexen Regelkreis regenerativer Umbauprozesse, an deren Ende die vollständige anatomische und strukturelle Wiederherstellung der Knochen-Architektur steht (Einhorn, 2005). Sie stellt damit eine besondere Form der physiologischen Wundheilung dar, welche statt in einer Reparatur des geschädigten Gewebes durch die Bildung von Narbengewebe, in einer vollkommenen Regeneration des Knochens resultiert (Brighton, 1984). Der Prozess der Osteoregeneration ist dabei einer sehr sensiblen molekularen und zellulären Regulation unterworfen, dem zur Folge bei etwa 10 % aller Frakturen Störungen der Knochenheilung in Erscheinung treten (Haas, 2000, Choi et al., 2004). Diese sind neben einer physiologisch und psychologisch belastenden, verlängerten Rekonvaleszenz des Patienten ebenso mit hohen finanziellen Kosten verbunden (Rose et al., 2002; Kassem et al., 2004). Erliegt der Heilungsprozess in Folge biologischer Inaktivität des Knochengewebes im Frakturgebiet vollständig, entsteht eine atrophe Pseudarthrose (Stürmer, 1996). Eine knöcherne Verbindung der Fragmentenden kann hier nicht ohne therapeutische Intervention wiederhergestellt werden (Gebauer et al., 2005).

Das heute angewendete therapeutische Verfahren besteht in der Stabilisierung der Zusammenhangstrennung mittels Osteosynthese in Kombination mit einer biologischen Stimulation der Gewebeaktivität (Kasperczyk et al., 1996). Nach derzeitig angewendeten Methoden erfolgt die biologische Reizgebung zur Osteoinduktion dabei durch autologe oder allogene Spongiosa-Transplantation, auf Basis der regenerativen Kompetenz des natürlichen Gewebes. Die Nachteile des Verfahrens liegen in einer begrenzten Verfügbarkeit des zu verpflanzenden Gewebes sowie in Infektionen und zahlreichen Komplikationen in Folge des invasiven Eingriffs zur Entnahme des Transplantates (Lind et al., 2001). Die Erforschung und Etablierung minimal invasiver Behandlungsmethoden massiver Knochenheilungsstörungen, zu deren Kreis auch die atrophe Pseudarthrose gehört, bleibt daher ein stetig aktueller Gegenstand der osteoregenerativen Wissenschaft. Einen erfolgversprechenden Ansatz stellt hierbei der Einsatz adulter mesenchymaler Stammzellen (MSCs) aus dem Knochenmark dar. MSCs sind multipotente Zellen mit dem Vermögen, sich selbst zu regenerieren (Bianchi et al., 2001). Sie besitzen die Fähigkeit, sich u.a. zu Knochen- und Knorpel formierenden Zellen zu entwickeln und nehmen darüber maßgeblichen Anteil an der Osteoregeneration (Carter et al., 1998). Das heterogene Differenzierungspotential und die Möglichkeit der Kultivierung und Entwicklung der Zellen ex vivo setzte MSCs in den ver-

gangenen vier Jahrzehnten in den Fokus regenerativer Medizinwissenschaft (Kassem et al., 2004). Sie finden ihren Einsatz in Situationen, in welchen sich die Transplantation integren Gewebes und/oder reifer Zellen nicht durchführen lässt (LeBlanc et al., 2006). Auch die in vitro realisierbare, gezielte Prädifferenzierung der MSCs zu osteogenen Vorläuferzellen (Osteoprogenitorzellen (OPCs)) (Pittenger et al., 1999) und deren Transplantation in das Frakturgebiet, im Zusammenhang mit der Therapie verzögerter Knochenheilung bei erhaltener biologischer Kompetenz des Gewebes, konnte bereits mit positivem Resultat untersucht werden (Schliephake et al., 2002; Srouji et al., 2005). Der Vorteil des Einsatzes von OPCs gegenüber MSCs liegt in deren bereits strenger determinierten Ausdifferenzierung zu osteokonduktiven Zellen. Das Risiko einer heterogenen Gewebeentwicklung bei Einsatz multipotenter Stammzellen kann so minimiert und die bestehende Abhängigkeit der Zelldifferenzierung von der v.a. molekularen Signalgebung des umliegenden Gewebes reduziert werden (Kassem et al., 2004).

Die Eigenschaft der OPCs, sich in vivo zu syntheseaktiven Osteoblasten auszudifferenzieren und in Verbindung mit der Stimulation ortständiger Zellen und Modulation der Mikroumwelt neues Knochengewebe zu synthetisieren (Izadpanah et al., 2005), sind Grundlage der vorliegenden Studie. Untersucht wird der Einfluss autologer, in vitro osteogen prädifferenzierter MSCs (= OPCs) auf die gestörte Knochenheilung bei verminderter biologischer Aktivität der Fragmentenden anhand einer induzierten atrophnen Pseudarthrose-Situation im Ratten-Modell. Ziel der Studie war es zu evaluieren, ob der physiologischen Knochenheilungsprozess auf diesem Weg initiiert werden kann.

2 Stand des Wissens

2.1 Biologie des Knochens

2.1.1 Funktionalität des Knochengewebes

Das Knochenskelett, respektive das Knochengewebe, ist die strukturelle Stütze des Organismus und als Träger zahlreicher Ansatzstellen für Bänder und Sehnen der Muskulatur eine der wichtigsten Voraussetzungen und Grundlagen der Bewegung. Darüber hinaus stellt es einen Schutzmantel für zahlreiche Vitalorgane sowie das Zentralnervensystem dar. Der Knochen ist dabei ein Leben lang in der Lage, sich durch eigene Stoffwechsellistung, über permanente Ab- und Umbauprozesse, optimal zu regenerieren. Die Dynamik dieses immerwährenden Knochenabbaus und -umbaus passt sich hierbei nicht allein physiologischen Kreisläufen, sondern auch abweichenden statisch-dynamischen Belastungen an. In Folge anhaltend abweichender Gliedmassenstellung und/oder Fehlstellungen nach unphysiologisch geheilten Knochenfrakturen und darüber Veränderungen von Zug-, Druck- und/oder Scherkräften, nehmen die ossären Umbauprozesse zu. Diese Anpassungsfähigkeit des Gewebes garantiert die mechanische Stützfunktion des Knochenskeletts (Schiebler, 1986).

Die lebenslange Stoffwechsellistung des Knochens beinhaltet über diese statisch-adaptiven Vorgänge hinaus auch die Regulation der Mineralstoffdistribution hinsichtlich Kalzium und Phosphor. Das Knochengewebe stellt für diese Mineralien ein Depot dar. Es steuert über Hormon- und/oder Vitaminkonzentration abhängig induzierte Zellaktivität den Ab- bzw. Aufbau des Knochens und reguliert darüber die Blut-Kalzium Konzentration auf ein gleich bleibendes Niveau (Liebich, 1999). Positive Stimuli bezüglich des Knochenauf- bzw. Kalziumeinbaus und damit eine Erniedrigung der Blut-Kalzium Konzentration, erfolgen durch Calcitonin, einem Schilddrüsenhormon, welches die Osteoblastendifferenzierung und -aktivität und folglich das Knochenwachstum, anregt (siehe 2.1.3 *Grundbausteine des Knochengewebes*) (Klaushofer et al., 1994). Darüber hinaus wird der Knochenaufbau durch das Somatotrope Hormon (STH), das Thyreotrope Hormon (TSH), das Adenokortikotrope Hormon (ACTH), männliche und weibliche Geschlechtshormone sowie Vitamin C gefördert (Braun et al., 1996). Dem gegenüber steigert das Parathormon der Nebenschilddrüse über eine Stimulation der Knochen abbauenden und so Kalzium frei-

setzenden Osteoklasten, die Blut-Kalzium-Konzentration (siehe 2.1.3). Ebenso beeinflusst 1,25 Dihydroxycholecalciferol (Vitamin D₃), das die intestinale Kalzium-Resorption fördert, zusammen mit der in der Niere zu einer verminderten Kalzium-Ausscheidung führenden Vitamin-D-25-Hydroxylase, die Konzentration von Kalzium im Blut positiv (Liebich, 1999). Das Vitamin bzw. dessen Vorstufe führen so eine wichtige Prämisse für die Mineralisation des Knochengewebes herbei und fördern überdies die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten (siehe 2.1.3) (Klaushofer et al., 1994). Eine negative Wirkung auf das Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau haben hingegen Glukokortikoide. Diese Steroidhormone der Nebennierenrinde wirken hemmend auf Osteoblasten und führen so zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung des Knochenabbaus (negative Knochenbilanz) (Klaushofer et al., 1994). Über diese molekularen Regulationsmechanismen hinaus beinhaltet der Knochen das rote Knochenmark. Somit ist das Gewebe ein wichtiges Element der Hämpoese (Schiebler, 1986).

Zusammenfassend lassen sich die Aufgaben des Knochengewebes demnach in zwei miteinander korrespondierende funktionelle Bereiche einteilen. Auf der einen Seite steht die Stütz- und Schutzfunktion des Gewebes, auf der anderen die metabolische Funktion (Schiebler, 1986; Klaushofer et al., 1994; Liebich, 1999). Beide garantieren die lebenslange Aufrecht(er)haltung des Organismus und bestimmen so in ihrem Zusammenspiel die Architektur des Körpers.

2.1.2 Makroskopischer Aufbau des Knochens

Betrachtet man das intakte Knochenskelett makroskopisch, so lassen sich nach Form bzw. Größenverhältnissen folgende Arten des Knochens unterscheiden: platte Knochen (z.B. Schulterblatt, Darmbein), kurze Knochen (z.B. Knochen der Wirbelsäule) und lange oder Röhrenknochen (die meisten Knochen der Extremitäten). Diese Einteilung basiert jedoch nicht allein auf den bestehenden Proportionen. Durchtrennt man die verschiedenen Knochenarten entlang ihrer Längsachse, so werden zwei verschiedene Knochenstrukturen erkennbar (Schiebler, 1986). Eine oberflächliche, homogene und kompakte Schicht, die sog. Substantia compacta und ein schwammähnliches Geflecht aus kleinen Knochenbälkchen, welches als Substantia spongiosa bezeichnet wird. Die Qualität der drei Knochenarten unterscheidet sich somit zunächst nicht, jedoch bestehen deutliche Unterschiede in der räumlichen Ausdehnung von Kompakta und Spongiosa (Liebich, 1999).

Bei der Einteilung eines Knochens in die oben genannten Kategorien werden seine Proportionen sowie auch seine innere makroskopische Struktur berücksichtigt (Schiebler, 1986).

Charakteristisch für den inneren, makroskopischen Aufbau platter und kurzer Knochen ist eine dünne Kompakta, die ein mit Spongiosa gefülltes Hohlraumssystem umschließt (Schiebler, 1986). Das Netzwerk der Substantia spongiosa beherbergt hämoretikulares Gewebe (Schnorr, 1996). Röhrenknochen bestehen zunächst aus drei makroskopisch und architektonisch unterschiedlichen Komponenten: der Diaphyse, dem Knochenkörper oder auch –schaft (Corpus), einer sich beidseits an den Corpus anschließenden Metaphyse (Epiphysenplatte), sowie einem ebenso beidseitig abschließenden Element, der proximalen und distalen Epiphyse (Liebich, 1999). Die innere Struktur der Diaphyse lässt eine dicke Kompakta erkennen, welche den Knoenschaft umgibt. Dem Knochenmantel liegt im Inneren eine schmale Spongiosa direkt an, wodurch eine Knochenhöhle entsteht. In Richtung der proximalen und distalen Metaphyse sowie der Epiphyse verjüngt sich die Kompakta und liegt hier dünn auf einer raumfüllenden Substantia spongiosa auf (Schiebler, 1986; Liebich, 1999).

Äußere und innere Knochenhaut

Alle Arten des Knochens werden von einer bindegewebigen äußerer Haut, dem Periost, nahezu vollständig überzogen (Klaushofer et al., 1994; Liebich, 1999). Ausnahmen bilden dabei allein einige knorpelüberzogene Bänder- und Muskelansätze, sowie Gelenkflächen, welche mit Synovium beschichtet sind (Schiebler, 1986). Das Innere der Knochenoberfläche sowie die Bälkchenstruktur der Spongiosa, die Volkmannkanäle (Canaliculi perforantes) und Havers'schen Kanäle (Canales centrales) (siehe 2.1.4 *Histologischer Aufbau und Entwicklung des Knochens*) werden von einer Schicht aus abgeflachten Bindegewebszellen, dem Endost, ausgekleidet (Schiebler, 1986; Liebich, 1999).

Entsprechend seiner Funktionen besteht das **Periost** aus zwei Komponenten: der äußeren, schützenden, stark faserhaltigen Schicht, dem Stratum fibrosum und der inneren, den Knochen erhaltenden und ernährenden Schicht, dem Stratum cambium (Kambiumschicht) oder Stratum osteogenicum (Schiebler, 1986). Die im Gegensatz zum Stratum fibrosum faserarme, jedoch zellreiche Kambiumschicht liegt dem Knochen unmittelbar an. Sie beinhaltet zahlreiche sensible Nervenfasern sowie Blut- und Lymphgefäße (Liebich, 1999). Letztere garantieren u.a. die Ernährung des Knochens und ziehen in Abhängigkeit

von ihrer Größe durch Foramina nutrica und/oder innerhalb der Volkmann-Kanäle in den Knochen ein. Über einzelne Kollagenfasern («Sharpey-Fasern») der äußeren Grundlamellen des Knochens entsteht eine feste Verbindung zwischen Periost und Knochen (siehe 2.1.4) (Liebich, 1999). Die Zellen des Periosts ähneln in ihrer Morphologie den Fibroblasten. Es handelt sich um multipotente, proliferationsfreudige Zellen mit ausgeprägtem osteogenem Potenzial (Schiebler, 1986). Ihre Fähigkeit zu Osteoblasten zu differenzieren spielt eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und auch der Heilung des Knochengewebes (Schiebler, 1986). Ein makroskopischer Hinweis auf die Beteiligung der äußeren Knochenhaut am juvenilen Knochenwachstum und der Knochenheilung ist die Stärke des Periosts. In aktiven Phasen, wie Knochenentwicklung und/oder -regeneration, stellt sich das Periost verhältnismäßig dick und stark vaskularisiert dar, wohingegen sie in inaktiven biologischen Phasen bei adulten Individuen eher dünn erscheint (Remedios, 1999). Entsprechend den bereits beschriebenen Zellen des Periosts besitzt auch das **Endost** Zellen mit osteogenem Potenzial, welche zur Knochenneubildung beitragen können (Schiebler, 1986).

2.1.3 Grundbausteine des Knochengewebes

Das Knochengewebe setzt sich, unabhängig von der Art des Knochens, aus der Knochengrundsubstanz (Matrix) bzw. Interzellulärsubstanz und den Knochenzellen zusammen (Remedios, 1999).

Knochengrundsubstanz (Matrix)

Die Interzellulärsubstanz oder Knochenmatrix besteht zu 30 % aus organischem Anteil und ca. 70% anorganischen Bestandteilen (Remedios, 1999).

Das organische Material, welches überwiegend von Osteoblasten synthetisiert wird, umfasst Typ-I Kollagenfasern (ca. 90-95 %) und eine Grundsubstanz reich an Glykosamino- und Proteoglykanen (5-10 %) (Chondroitin-6 Sulfat, Chondroitin-4 Sulfat, Keratansulfat) (Boskey et al., 1984; Liebich, 1999). Die Strukturproteine des Kollagens liefern, zusammen mit ca. 5-10 % Lipidanteil, etwa ein Drittel der Trockenmasse des Knochengewebes (Liebich, 1999). Der organische Anteil der Matrix dient als strukturelles Grundgerüst (Kristallisationskern) bei der Mineralisation des Knochens. Die in Form von Hydroxylapatit-Kristallen (Größe: 20-40 x 2-3 nm) vorliegenden Mineralien, hier v.a. Kalzium-Phosphat, lagern sich dabei äußerlich als dreidimensionales Gitterwerk an die Kollagenstruktur an, welche von Grundsubstanz umgeben ist (Remedios, 1999).

Die Biegesteifigkeit des Knochens wird hierbei maßgeblich von der Stärke der Verbindung zwischen Kollagen und kristallinem Gitterwerk bestimmt (Liebich, 1999).

Zwei Drittel der Gesamttrockenmasse des Knochengewebes besteht schließlich aus dem anorganischen Bestandteil der Knochengrundsubstanz, den mineralische Verbindungen (Boskey et al., 1984). Das anorganische Gewebe enthält 85 - 90 % Kalzium-Phosphat, 8 - 10 % Kalzium-Carbonat, ca. 1,5 % Magnesium-Phosphat sowie etwa 0,3 % Kalzium-Fluorid (Liebich, 1999). Darüber hinaus einen geringen Anteil Natrium, Nitrat sowie weitere Spurenelemente (Schiebler, 1986).

Zellen des Knochens

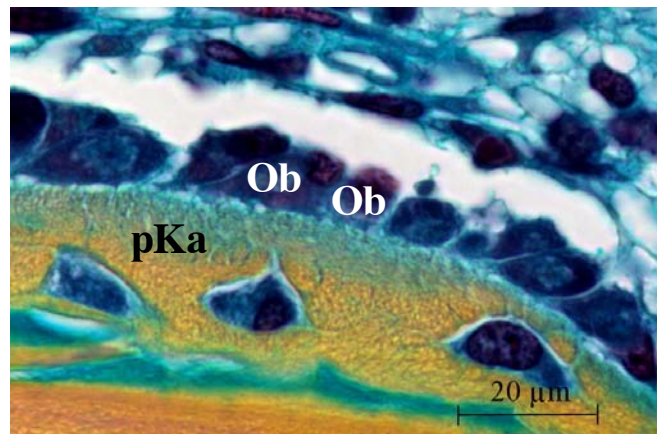
Die den Knochen aufbauenden, erhaltenden und abbauenden Zellen des Knochengewebes sind Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten (Schiebler, 1986; Remedios, 1999; Liebich, 1999).

Osteoblasten

Morphologie und Lokalisation

Diese syntheseaktiven, basophilen Knochenzellen finden sich an der Oberfläche des Knochengewebes an Knochenbälkchen, sowie in Havers'schen Systemen (siehe 2.1.4) (Remedios, 1999). Hier sind sie nach Art eines einschichtigen Plattenepithels organisiert und angeordnet. Die 20 – 30 μm großen Osteoblasten weisen in ihrer aktiven Phase («Synthese-Phase») eine kubische Form auf. Die sekretionsaktiven Zellorganellen, wie Golgi-Apparat und raues endoplasmatisches Retikulum (rER), sind gut entwickelt (Schweiberer et al., 1999). Der Zellkern ist rund und befindet sich an der von der Grundsubstanz des Knochengewebes abgewandten Seite der Zelle. Zur Kommunikation mit benachbarten Osteoblasten verfügen die Zellen an der der Grundsubstanz zugewandten Oberfläche über zytoplasmatische Fortsätze (siehe Abbildung (Abb.) 1) (Schiebler, 1999; Schweiberer et.al., 1999; Liebich, 1999). Mit abnehmender Syntheseaktivität verändert sich die Morphologie der Osteoblasten. Die Zellen werden deutlich flacher und entwickeln eine spindelige Form. Sie sind dann vor allem (v.a.) an der Knochenoberfläche lokalisiert und werden hier auch als »bone lining cells« bezeichnet. Das osteogene Potenzial der Knochenzellen bleibt, trotz einer eventuellen Inaktivität, lebenslang erhalten (Schiebler, 1986; Liebich 1999).

Abb. 1: Osteoblasten (**Ob**) an der Oberfläche des periostalen Kallus (**pKa**). (Movat Pentachrom)



Funktion

Die bedeutendste Syntheseaktivität von Osteoblasten besteht in der Bildung von organischer, nicht verkalkter Knochenmatrix, dem sog. »Osteoid« (Schiebler, 1986) sowie in der Synthese von nicht-kollagenen Proteinen (Osteokalzin, Osteonektin, Osteopontin, Bone Sialoprotein (BSP)) (Liebich, 1999). Das Osteoid entsteht durch Osteoblasten-Aktivität an der Knochenoberfläche als nicht mineralisierter Saum. Es besteht aus ungeordneten Kollagenfibrillen sowie Knochengrundsubstanz. Die Kollagen Typ I-Synthese, bzw. die des Vorläufers Prokollagen, beginnt intrazellulär im rER und Golgi-Apparat der Zellen und findet ihren Abschluss im Extrazellularraum durch Bildung von Tropokollagen, welches zu Kollagenfibrillen aggregiert (Cruess et al., 1975; Schnorr, 1996; Liebich, 1999). Die ungeordneten Fibrillen werden von den sie umgebenden Matrixsubstanzen maskiert, das entstandene Osteoid erscheint so mikroskopisch homogen in seiner Struktur (Liebich, 1999). Täglich produzieren die Osteoblasten einen Osteoidsaum von etwa 1 µm Dicke (Liebich, 1999). Die Zellen produzieren dabei innerhalb weniger Tage das 2-4fache ihres Volumens an organischer Matrix (Schweiberer et al., 1999). Innerhalb von ca. drei bis vier Tagen verkalkt das Osteoid zu etwa 70 %. Die endgültige Mineralisation ist nach ca. sechs Wochen abgeschlossen. Die Initialisierung und Steuerung der Mineralisation organischer Matrix erfolgt dabei über die Osteoblasten selbst (Liebich, 1999; Remedios, 1999). Induziert wird die Kalzifizierung durch die von den Zellen exprimierte alkalische Phosphatase (AP) (Boskey et al., 1984). Das zur Mineralisation benötigte Kalzium und Phosphor wird von den Osteoblasten über die Modulation der Funktion knochenabbauender Osteoklasten gesteuert. Das nach Abbau des Knochengewebes freigesetzte Kalzium

und Phosphor bildet zwischen bzw. an den Kollagenfibrillen der Matrix Hydroxylapatit-Kristalle aus. Unter Beteiligung der von den Osteoblasten synthetisierten nicht-kollagenen Proteine (s.o.) kommt es zur Mineralisation des Gewebes (Liebich, 1999). Die Regulation von Knochenformation und -resorption erfolgt durch Osteoblasten mit Hilfe kalzitroper Hormone (Parathormon (PTH), Kalzitinin), dem Steroidhormon Östrogen, sowie Zytokinen (IL-1/-6) und Wachstumsfaktoren (Transforming Growth Factor- α / β , (TGF- α / β), Bone Derived Growth Factor (BDGF), Epidermal Growth Factor (EGF)). Die Knochenresorption wird durch PTH gefördert. Osteoblasten verfügen auf der Zelloberfläche über Parathyroid-Rezeptoren, die für die eigentliche Resorption verantwortlichen Osteoklasten jedoch nicht. Nijweide et al. (1986) nehmen daher an, dass die hormonell gesteuerte Aktivierung resorptionsaktiver Osteoklasten oder auch deren Neubildung nur in Anwesenheit von Osteoblasten möglich wird. Gleichzeitig hemmt das PTH die Osteoblasten-Aktivität und verschiebt so das Gleichgewicht zu Gunsten der Knochenresorption. Eine weitere Rezeptorengruppe auf der Oberfläche von Osteoblasten ist die der Östrogen-Rezeptoren. Das Steroidhormon fördert die Knochenformation und hemmt gleichzeitig die Resorption des Knochens (Boskey et al., 1984; Klaushofer et al., 1994). Zytokine tragen über eine stimulierende Wirkung auf Osteoblasten zur Knochenformation bei (Nijweide et al., 1986).

Osteozyten

Die fortschreitende Matrixproduktion syntheseaktiver Osteoblasten resultiert schließlich in deren vollständiger Einbettung in das Osteoid. Man bezeichnet die Osteoblasten ab diesem Zeitpunkt als »Osteoid-Osteozyten« (Bonewald, 2007). Nach abgeschlossener Matrixmineralisation werden sie »reife« Osteozyten genannt (siehe Abb. 2) (Schiebler, 1986; Liebich, 1999; Bonewald, 2007).

Morphologie und Lokalisation

Die Morphologie der Osteozyten ergibt sich aus deren Entstehung. Sind ihre direkten Vorläuferzellen, die Osteoblasten, vollständig von Osteoid umgeben, beginnen sie radiär lange zytoplasmatische Fortsätze zu entwickeln. Der Zellkörper selbst verkleinert sich dabei und nimmt eine abgeflachte, spindelige Form an (Gesamtdurchmesser: ca. 20 - 60 μm) (siehe Abb. 2) (Boskey et al., 1984). Neben der charakteristischen äußeren Form der Osteozyten zeichnet sie ein großer, nahezu ovaler und chromatinreicher Nukleus, sowie nur wenige stoffwechselaktive Zellorganellen aus (Boskey et al., 1984; Bonewald,

2007). Durch den reduzierten Umfang der Zellkörper innerhalb der mineralisierten Knochenmatrix entstehen um die Osteozyten Knochenlakunen (Lacuna ossei). Dennoch sind die Zellen nicht vollständig von ihrer Umgebung isoliert. Sie stehen über dendritische Fortsätze, welche sich in kleinen Knochenkanälchen (Canaliculi ossei) radiär von der Knochenlakune ausbreiten, miteinander, sowie mit Zellen der Knochenoberfläche in Kontakt (siehe Abb. 2) (Bonewald, 2007). Diese Verbindungen dienen u.a. dem Stofftransport. Über »gap junctions« wird hier ein interzellulärer Austausch von Ionen und kleinen Molekülen ermöglicht (Schiebler, 1986).

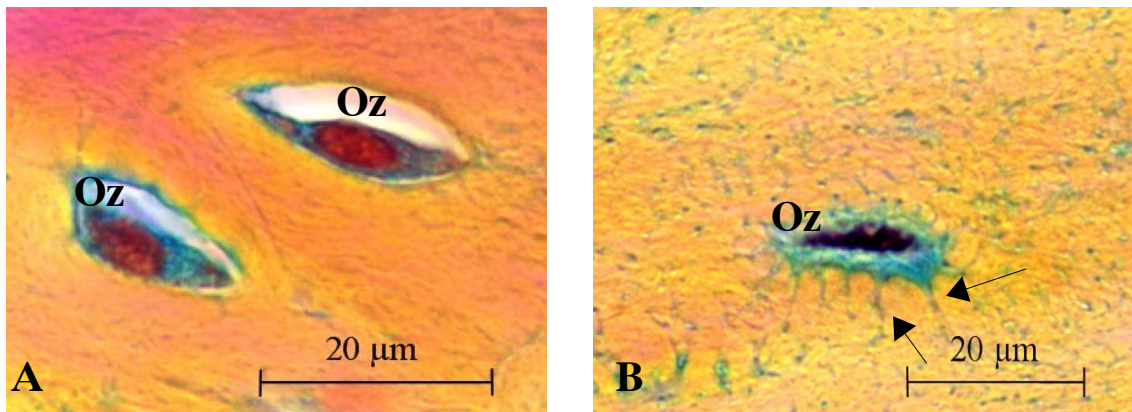


Abb. 2: **A:** Osteoid-Osteozyten (**Oz**) in Knochenlakunen im periostalen Kallus, **B:** reifer Osteozyt (**Oz**) mit dendritischen Fortsätzen (Pfeile) in der Kortikalis (Movat Pentachrom)

Funktion

Osteozyten erfüllen zunächst eine den Knochen erhaltende Funktion (Liebich, 1999). Neben der Aufgabe eines Platzhalters innerhalb des Knochengewebes beinhaltet dies den Aufbau interzellulärer Hartsubstanz durch enthaltenes protein- und glykoprotein-gebundenes Kalzium-Phosphat sowie die Beteiligung an feinregulativen Vorgängen der Blut-/Kalzium-Hämostase (Boskey et al, 1984; Schiebler, 1986). Vermittelt wird der Stofftransport in den Extrazellulärraum dabei über die kontraktile Zytoplasmfortsätze der Zellen via Diffusion (Liebich, 1999). Darüber hinaus nehmen Osteozyten an der Modulation und Regulation der Osteoklasten-/Osteoblasten-Aktivität teil (Liebich, 1999; Bonewald, 2007). Basis hierbei ist die Fähigkeit der Osteozyten, mechanische Krafeinwirkungen mittels Transformation in biochemische Zell-Signale umzusetzen. Die Signalübertragung erfolgt über die zytoplasmatischen Fortsätze der Zellen oder den Zellkörper selbst durch sog.

»fluid flow shear stress« (Bonewald, 2007). In Abhängigkeit von Veränderungen ihrer Umgebung sind Osteozyten so in der Lage, ihre eigene Mikroumwelt zu regulieren.

Osteoklasten

Die oftmals als Riesenzellen (\varnothing ca. 20 - 100 μm) (Remedios, 1999) bezeichneten Osteoklasten entstehen aus der hämatopoetischen Makrophagen/Monozyten-Zelllinie durch Fusion (Rauner et al., 2007). Ihre Aufgabe besteht in der Resorption mineralisierten Knochengewebes resp. der Demineralisierung des Knochens durch proteolytische Enzymaktivität (Schell et al., 2006). Dabei baut ein Osteoklast pro Zeitintervall etwa das Dreifache der Knochenmatrix ab, die ein Osteoblast aufbaut (Liebich, 1999; Schell et al., 2006).

Morphologie und Lokalisation

Charakteristisch ist die Vielkernigkeit der Zellen (10 - 100 Kerne) sowie ihr großer Umfang (siehe Abb. 3) (Schiebler, 1986; Liebich, 1999). Entsprechend ihrer Funktion als knochenabbauende Zellen findet man Osteoklasten in unmittelbarer Nähe zum Knochengewebe, wo sie in sog. Resorptionslakunen oder »Howship'schen Lakunen« liegen. Diese entstehen durch die enzymatische Resorptionsaktivität der Zellen selbst (Schiebler 1986). Die der Knochenoberfläche zugewandte Seite der Osteoklasten stellt sich mit einer stark gefalteten Struktur dar, der sog. »ruffled boarder« (siehe Abb. 3), welche durch Plasmalemm-Ausstülpungen entsteht (Liebich, 1999). So ergibt sich eine Oberflächenvergrößerung der Zelle auf Seiten ihrer maßgeblichen Aktivität. Zahlreiche Mitochondrien im Zytoplasmabereich dieser Resorptionsstruktur weisen auf einen aeroben Stoffwechsel der Osteoklasten hin (Liebich, 1999). Ebenso verfügen die Zellen über einen gut ausgebildeten Golgi-Apparat, entsprechend zahlreiche, mit saurer Phosphatase gefüllte Lysosomen, wenig rER und freie Polysomen im Zytoplasma (Schiebler, 1986). Durch Invagination der Zellmembran entstandene Vakuolen sind Ausdruck einer ausgeprägten endo-/exozytotischen Aktivität (Liebich, 1999). Mikrotubuli im Inneren der Osteoklasten verbinden die knochenseitige »ruffled boarder« mit der sog. »clear zone« (Liebich, 1999) oder »functional secretory domain« (FSD) (Rauner et al., 2007). Hier, an der der Knochenfläche abgewandten Seite der Zellen, gelangen die resorbierten Materialien entlang der Mikrotubuli durch Exozytose in den extrazellulären Raum (Fenton et al., 1990; Rauner et al., 2007).

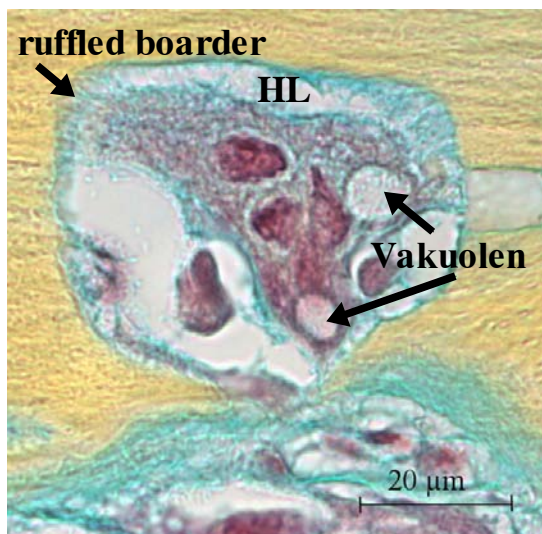


Abb. 3: Osteoklast in Howship'scher Lakune (HL) (Movat Pentachrom)

Funktion

Die Demineralisierung des Knochens erfolgt durch »lakunäre Resorption« (Liebich, 1999) in der Howship'schen Lakune. Durch proteolytische Reaktionen bzw. Zell-Aktivität entstandene freie Hydroxylapatitkristalle, organische Matrixbestandteile und Einzelbestandteile der Kollagenfibrillen werden durch Endozytose in die Osteoklasten aufgenommen und dort innerhalb der zytoplasmatischen Vakuolen und Lysosomen aufgelöst (Liebich, 1999, Rauner et al., 2007). Der Abbau der organischen Matrixbestandteile erfolgt dabei im wesentlichen durch Tetrat-resistente saure Phosphatase (TRAP), Kathepsin K sowie durch Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) (Rauner et al, 2007). Die Regulation der Osteoklasten erfolgt hormonell und zellvermittelt. Eine Hemmung der Aktivität bewirken dabei die Hormone Östrogen und Calcitonin (Schiebler, 1986; Liebich, 1999). Förderlich auf die Aktivität der Riesenzellen wirken dagegen das Parathormon, sowie Vitamin D₃. Die zelluläre Regulation erfolgt durch Osteozyten (s.o.) und Osteoblasten (Liebich, 1999). Osteoblasten stimulieren dabei die Zelldifferenzierung der Osteoklasten durch die Synthese des »Macrophage-Colony Stimulating Factor« (M-CSF) sowie den »Receptor activator of nuclear factor κB Ligand« (RANKL) mittels Zell-Zell-Interaktion (Pietschmann, 2006; Schell et al., 2006). Durch die Sekretion des Zytokins Osteoprotegerin (OPG), welches die RANKL-Wirkung antagonisiert, sind Osteoblasten jedoch ebenso in der Lage, die Osteoklastengnese zu hemmen (Rauner et al., 2007).

2.1.4 Histologischer Aufbau und Entwicklung des Knochens

Die Zusammensetzung des Knochengewebes aus Knochenzellen, Kollagenfasern und mineralisierten Verbindungen erscheint bei allen Arten des Knochengewebes gleich. Histologisch sind jedoch deutliche Unterschiede erkennbar bezüglich der Menge an organischen und anorganischen Bestandteilen sowie der inneren Struktur (Schiebler, 1986; Liebich, 1999).

Histologischer Aufbau

Entsprechend dem histologischen Aufbau unterscheidet man zwei Arten des Knochengewebes, den Geflecht-/Faserknochen und den Lamellenknochen (Liebich, 1999).

Geflechtknochen (Os membranaceum reticulo-fibrosum)

Die Anlage des Geflecht- oder Faserknochens erfolgt während der embryonalen Entwicklung des Skelettes über desmale und/oder chondrale Ossifikation. Geflechtknochen ist die einfachste Art des Knochengewebes, er wird mit Eintritt in die postnatale Periode nahezu vollständig zu Lamellenknochen umgebaut. Allein der äußere Gehörgang und das knöcherne Ohrlabyrinth, sowie Ansatzflächen starker Sehnen am Knochen werden auch in der adulten Lebensphase weiterhin durch Geflechtknochen gebildet. Darüber hinaus entwickelt sich diese Art des Knochens überall dort, wo über einen längeren Zeitraum starke Zug-, Druck und/oder Scherkräfte das Knochengewebe beeinflusst haben (Liebich, 1999). Kennzeichnend für den Geflechtknochen ist die fehlende einheitliche Verlaufsrichtung der Kollagenfaserbündel in der Matrix. Ebenso unterliegen die Knochen trabekel des Gewebes, sowie entsprechend auch die enthaltenen Osteozyten, keiner erkennbar regelmäßigen Anordnung. Insgesamt befinden sich im Vergleich zum Lamellenknochen weniger anorganische Substanzen in der Knochenmatrix (Schiebler, 1986).

Lamellenknochen (Os membranaceum lamellosum)

Diese Art des Knochens entwickelt sich aus der einfachen Form des Geflechtknochens und besteht aus qualitativ vergleichbaren, jedoch in ihrer Ausrichtung unterschiedlichen Knochenlamellen mit einer Stärke von 3 - 7 μm (Schiebler, 1986). Charakteristisch ist die Organisation der Kollagenfasern. Diese sind innerhalb der Lamellen, anders als im Geflechtknochen, regelmäßig, parallel oder konzentrisch angeordnet. Entsprechend der auf sie einwirkenden Druck- und Zugkräfte sind die Fasern so ausgerich-

tet, dass sie lokale, statische Anforderungen optimal erfüllen können. Die Fibrillen der Kollagenfasern selbst stellen sich dabei, im Gegensatz zu den welligen Verhältnissen im Bindegewebe, gestreckt dar (Schiebler, 1986). Die Kollagenfasern der einzelnen Knochenlamellen weisen architektonisch einen schraubenförmigen Verlauf waagrecht zu deren Längsachse auf. Richtung und Steigungswinkel der Fasern verändert sich dabei alternierend mit jeder Lamelle. Kollagenspiralen benachbarter Lamellen verlaufen stets einander entgegengesetzt und kreuzen sich dabei mit einem Winkel von 90 Grad (Liebich, 1999). Die Überschneidung einzelner Kollagenfasern im spitzen Winkel zur Mehrheit der Grundspiralen lässt ein feines, solides Gitterwerk entstehen. Durch die Verbindung von isolierten Kollagenfasern mit dem Kollagengefüge der Nachbarlamelle entwickelt sich eine strukturelle Brücke zwischen den einzelnen Lamellen. Auf diese Weise beginnt der Aufbau des Osteons, dem Grundbaustein des Lamellenknochen der Röhrenknochen (Liebich, 1999).

Im Zentrum des auch als »Havers-System« bezeichneten Osteons steht der Zentralkanal (Canalis centralis) oder »Havers-Kanal«, eine mit mesenchymalem Bindegewebe ausgefüllte Hohlöhre, welche ein feines Blutgefäß (Havers-Gefäß) sowie Lymphgefäße und vegetative Nervenfasern enthält (Schiebler, 1986; Liebich, 1999). Konzentrisch um den Zentralkanal herum angeordnet verlaufen in mehrfachen Lagen die sog. Speziallamellen (Lamellae osteoni), deren Struktur den oben beschriebenen Knochenlamellen entspricht. Der Aufbau des Havers'schen Systems aus Speziallamellen verläuft zentripetal. Ausgehend von der äußeren Speziallamelle entstehen alle Weiteren zum Zentralkanal hin. Die Zahl der Lamellen, welche ein Osteon bilden, variiert zwischen 5 und 20, demnach entstehen Osteone unterschiedlicher Durchmesser (\emptyset ca. 20 - 100 μ m) (Schiebler, 1986). Das einzelne Osteon hat eine zylindrische Form. Es ist durch die sog. Zementlinie (Linea cementalis), einem Kit reich an Fasern und Grundsubstanz, histologisch deutlich von anderen Osteonen und weiteren umgebenden Lamellen (s.u.) abgetrennt. Die Havers'schen Systeme des kompakten Lamellenknochens ziehen über mehrere Zentimeter parallel der Knochenoberfläche und stehen mit nachfolgenden, ebenso wie mit benachbarten Havers-Systemen, über einzelne Kollagenfasern in struktureller Verbindung. Eine strukturelle, jedoch ebenso funktionelle Verbindung entsteht auch über die Zytoplasmfortsätze von Osteozyten (Schiebler, 1986; Remedios, 1999). Die Zellen liegen regelmäßig angeordnet entlang der Lamellengrenzen in schmalen Knochenlakunen (Lacuna ossea). Ausgehend von den Lakunen bilden sich radiär feine Knochenkanäle (Canaliculi ossei) (\emptyset 1 μ m) aus,

durch welche die Fortsätze der Osteozyten miteinander in Kontakt stehen. Durch die Verbindung des so entstandenen Versorgungsnetzes mit dem zentralen Blutgefäß im Havers-Kanal (Havers- Gefäß) wird eine flächendeckende nutritive Versorgung des Gewebes ermöglicht (Schweiberer et al., 1999). Die Havers-Gefäße der einzelnen Osteone stehen ihrerseits durch die sog. Volkmann-Gefäße miteinander in Verbindung. Diese verlaufen, ausgehend von der inneren und äußeren Knochenhaut, senkrecht der Zentralkanäle der Osteone in Volkmann-Kanälen (Canaliculi perforantes) (Liebich, 1999). Die Verbindung des interossären Transportsystems mit dem peripheren Gefäßsystem entsteht letztlich im diaphysären Bereich des Knochens über Markraumgefäße (Aa. nutritiae). Diese durchbrechen die Kortikalis und breiten sich im Inneren des Knochens nach proximal und distal fächerförmig aus. Sie sind mit den Volkmann-Gefäßen verbunden. Darüber hinaus verfügt der Knochen über ein weiteres arterielles Gefäßnetz, ausgehend vom Periost, welches entlang der Sharpey-Fasern durch die kortikalen Lamellen in den Knochen eintritt und mit den Markraumgefäßen in Verbindung steht. Der venöse Abfluß erfolgt über Sinusoide des Knochenmarkraums, sowie über periostale Gefäße (Schweiberer et al., 1999; Remedios, 1999). Über die ernährende Funktion hinaus garantiert dieses Versorgungsnetz den Transport von Kalzium-/Phosphor-Ionen in periphere Blutgefäße. Freigesetzt werden diese Ionen über den in den Kapiteln 2.1.1 und 2.1.3 bereits beschriebenen, hormonell induzierten Abbau von Knochengewebe. Das in den Knochenlakunen enthaltene Kalzium bzw. Phosphor liegt frei vor und ist somit mobil. Die Ionen werden mittels aktiver Osteoklasten freigesetzt und gelangen über das vernetzte Gefäßsystem in die Peripherie (Schiebler, 1986).

Osteone unterliegen, entsprechend dem gesamten Knochengewebe, lebenslangen Ab- und Umbauvorgängen. Reste abgebauter Osteone füllen dabei die Räume zwischen den einzelnen Havers-Systemen. Die verbleibenden Knochenlamellen zwischen den einzelnen Osteonen werden als Schaltlamellen (Lamellae interstitiales) bezeichnet (Schiebler, 1986). Den inneren und äußeren Abschluss der ossären Binnenstruktur bilden schließlich die General- oder Grundlamellen. In ihrer Struktur analog zu den bereits genannten Lamellen, umschließen die äußeren Grundlamellen den Knochen vollständig. Sie sind in Form von Platten geschichtet und bieten die Ansatzfläche der Fibrae perforantes. Diese Kollagenfasern, auch als »Sharpey-Fasern« bezeichnet, verbinden die äußere Knochenhaut, das Periost, fest mit dem Knochen. Die inneren Grundlamellen entsprechen in Struktur und Anordnung weitgehend den Äußeren, die Anzahl an Lamellen ist jedoch ge-

ringer. Sie sind an der inneren Knochenoberfläche lokalisiert und werden von Endost überzogen. Der Zusammenhang der inneren Grundlamellen ist jedoch im Gegensatz zu den Äußeren nicht einheitlich. Unterbrochene Lamellen setzen sich hier in Form von Knochenbälkchen fort (Schiebler, 1986, Schweiberer et al., 1999).

Der histologische Aufbau des Lamellenknochen platter, sowie kurzer Knochen unterscheidet sich nicht grundlegend von den oben beschriebenen Strukturen. Auch hier finden sich in der kompakten Knochenschicht Knochenlamellen und/oder Teile von Lamellen (Schnorr, 1996). Eine systematische Organisation der Osteone, gleich den Verhältnissen im Röhrenknochen, findet sich in diesen Knochen jedoch nicht (Schiebler, 1986).

Entwicklung von Knochengewebe (Osteogenese)

Die Osteogenese verläuft über zwei mögliche Wege. Im Rahmen der desmalen Osteogenese entsteht das Gewebe direkt über die Differenzierung mesenchymaler Bindegewebszellen zu Osteoblasten. Im Verlauf der chondralen Osteogenese bildet sich der Knochen über die Zwischenstufe einer vorläufigen Knorpelschablone (perichondrale Ossifikation), entlang derer sich durch Ab- und Umbauprozesse Knochengewebe (enchondrale Ossifikation) entwickelt (Schnorr, 1996). Das Resultat beider Konzepte ist zunächst die Entstehung von, unter biomechanischen Aspekten, unreifem Geflechtknochen, der nachfolgend durch diesbezüglich kompetenteren, reifen Lamellenknochen ersetzt wird (Boskey et al., 1984). Die desmale Osteogenese führt in der Regel nicht allein zur Entwicklung des endgültigen Knochens, eine Ausnahme bilden hier lediglich die Knochen des Schädels (Schiebler, 1986). Die Entstehung des adulten Knochenskeletts besteht vielmehr in einer sich zeitlich überlappenden Kombination der desmalen und chondralen Osteogenese.

Desmale Osteogenese (Osteogenesis membranacea)

Die direkte Knochenbildung beginnt in sog. »primären Ossifikationszentren« des embryonalen Bindegewebes mit der Proliferation von Mesenchymzellen. Parallel dazu sprossen vermehrt Blutkapillaren in das Gewebe ein (Schiebler, 1986). Diese dienen zunächst der Nährstoffversorgung, transportieren aber darüber hinaus weitere mesenchymale Bindegewebszellen in das Gewebeareal (Liebich, 1999). Die lokalen und immigrierten pluripotenten embryonalen Stammzellen differenzieren entlang der osteogenen Zelllinie zu stoffwechselaktiven Osteoblasten und initiieren so die Synthese der Knochenmatrix (siehe 2.1.3). Die entstehenden Kollagenfasern erscheinen dabei unregelmäßig in ihrer Organisa-

tion (Schiebler, 1986). Da die Bildung der Knochen-Mineralkristalle resp. die Einlagerung anorganischer Materialien in die organische Knochenmatrix hier entlang der irregulären Kollagenfibrillen verläuft, bildet sich ein unregelmäßiges Netzwerk kleiner Knochenbalken, der »primitive« Geflechtknochen (Boskey et al., 1984; Schiebler, 1986). Die verschiedenen Ossifikationszentren verschmelzen im Verlauf der Osteogenese miteinander. Die inneren und äußere Knochenoberfläche bleibt dabei zunächst von einer mehrlagigen Bindegewebsschicht, dem Perichondrium, überzogen, welche sich nachfolgend zu Periost und Endost entwickelt (Schiebler, 1986). Die Entstehung von Knochengewebe über desmale Osteogenese gehört zu den wesentlichen Prozessen der embryonalen/juvenilen Entwicklung des Knochenskeletts und ist darüber hinaus fester Bestandteil der indirekten Knochenheilung (siehe Kapitel 2.2). Das daraus resultierende auch als »Faserknochen« bezeichnete Gewebe ist der Geflechtknochen.

Chondrale Osteogenese (Osteogenesis cartilaginea)

Bei der besonders für Röhrenknochen charakteristischen chondralen Osteogenese (Schiebler, 1986) unterscheidet man noch einmal zwischen perichondraler (Ossificatio perichonrales) und enchondraler (Ossificatio enchondralis) Ossifikation (Boskey et al., 1984; Schiebler, 1986; Liebich, 1999).

Die *perichondrale Ossifikation* verläuft analog zur desmalen Osteogenese (Liebich, 1999). An der diaphysären Oberfläche des Knorpelmodells, aus welchem der Knochen entstehen soll, transformieren sich hierbei jedoch Chondroblasten zu Osteoblasten. Dies geschieht an sog. »desmalen Ossifikationszentren« (Schiebler, 1986). Die Zentren haben ihren Ursprung zunächst im Perichondrium, später im daraus entstehenden Periost (Schnorr, 1996). Die Ossifikation verläuft, ausgehend von der Mitte des späteren Knochenschaftes, beidseits in Richtung der Epiphysen (Liebich, 1999). Die desmale Knochenbildung resultiert zunächst in der Ausbildung einer Ummantelung des Knorpelschaftes mit Geflechtknochen bis zum epiphysären Bereich (Schiebler, 1986). Die so von der vaskulären Versorgung abgetrennten Knorpelzellen unterhalb der Knochenmanschette hypertrophieren (sog. »Blasenknorpel«). Entsprechend zunehmender Druck- und Zugverhältnisse innerhalb der begrenzenden Manschette ordnen sie sich in Richtung der Epiphyse säulenförmig an (sog. »Säulenknorpel«) (Schnorr, 1996). In Folge der Unterversorgung degenerieren die hypertrophen Chondrozyten und die umgebende Knorpelmatrix kalzifiziert

(Schiebler, 1986; Schnorr, 1996). Die genauen molekularen und zellulären Mechanismen der Mineralisation hyaliner Knorpelmatrix werden in Kapitel 2.2 im Zusammenhang mit der sekundären Knochenheilung erläutert. Auf der Oberfläche der Knochenmanschette beginnen zeitgleich Osteoklasten im Rahmen physiologischer Umbauprozesse mit der Resorption des Knochengewebes. Über derart entstehende Kanäle sprossen, ausgehen vom Perichondrium/Periost, Gefäße in das Innere der Knorpelschablone (Schnorr, 1996). Die kalzifizierte Knochenmanschette wird rasch von neuen Kapillaren durchdrungen, mit ihnen gelangen auch Chondroklasten in das Gewebe. Sie resorbieren enzymatisch die kalzifizierte Knorpelmatrix und schaffen so Gewebs-Zwischenräume resp. -Kanäle, durch welche die Blutkapillaren weiter einsprossen (Liebich, 1999).

Dieser Vorgang stellt den Übergang von perichondraler zu enchondraler Ossifikation dar. Die auch als »Verknöcherung« bezeichnete Phase der Knochenentwicklung beginnt mit der Synthese neuer Knochengrundsubstanz an der Oberfläche von Knorpelresten durch Osteoblasten. Sie immigrieren mit den periostalen Blutgefäßen perivaskulär in Form mesenchymaler Stammzellen (MSCs) in das Gewebe. Hier proliferieren und differenzieren die MSCs zu Osteoblasten. Entsprechend der Leitstruktur der kalzifizierten Knorpelmatrix entsteht das charakteristische Gitterwerk des Geflechtknochens (Schiebler, 1986). Durch stetig ablaufenden Knochenauf- und -umbau entsteht im Inneren des Corpus ein Hohlraum, die sog. »primäre Markhöhle« (Schnorr, 1996). Sie beherbergt sowohl MSCs als auch zahlreiche Blutgefäße. Im späteren Verlauf der embryonalen Entwicklung beinhaltet sie maßgeblich MSCs und wird nun als »sekundäre Markhöhle« bezeichnet. Der »unreife« Geflechtknochen wird über physiologische Resorption und Formation von Knochengewebe abgebaut und so durch »reifen« Lamellenknochen ersetzt (Liebich, 1999). Die beschriebenen Arten der Knochenentwicklung vollziehen sich so auch im adulten Organismus im Verlauf der Knochenheilung.

2.2 Knochenheilung

Die Energie der auf das Knochengewebe einwirkenden Kräfte kann, in Abhängigkeit des Knochenvolumens und der Biegesteifigkeit, nur bis zu einer gewissen Grenze vom Knochen absorbiert werden. Übersteigt die auftretende Energiemenge die mögliche Absorptionskapazität des Knochens, bricht dieser (Brighton, 1984; Rüter et al., 1996). Die entstehende Fraktur umfasst dabei eine Gewebeschädigung der Knochenhaut, des vitalen Knochens, des Knochenmarks sowie des unmittelbar angrenzenden Weichteilgewebes (Klaushofer et al., 1994). Die Knochenheilung besteht im Wesentlichen aus der Neubildung von Knochen und dessen Eingliederung in das noch bzw. bereits vorhandene Knochengewebe (Schiebler, 1986). Sie stellt dabei eine außergewöhnliche Form der Heilung dar, denn die Knochenheilung resultiert, entgegen der normalen Wundheilung, nicht in reparativem Narbengewebe, sondern in restauriertem, in seinen mechanischen und strukturellen Eigenschaften vollständig regeneriertem Knochengewebe. Sie wird daher auch als Knochen-Regeneration bezeichnet (McKibbin, 1978; Brighton, 1984). Das Ziel ist die vollkommene Wiederherstellung der Knochenstruktur und damit, entsprechend Wolff's Gesetz »form follows function«, einer maximalen Stützfunktion im Sinne herrschender Gewicht-, Druck- und Zugbelastungen (Boskey et al., 1984).

Die Neubildung des Knochengewebes verläuft dabei in Anlehnungen an die embryonale/juvenile Knochenentwicklung in Form desmalen und/oder enchondraler Ossifikation. Die Art der Knochenheilung ist im Wesentlichen abhängig von der Entfernung der Frakturrenden zueinander und der Stabilität der Fraktur. Besteht ein direkter Kontakt zwischen den Knochenfragmenten in Verbindung mit einer ausreichenden Stabilität der Zusammenhangstrennung, so vollzieht sich die Knochenheilung bei intakter Vaskularisation (Braun et al., 1996) im Sinne der sog. *direkten oder primären Frakturheilung*. Fehlen die genannten Voraussetzungen, regeneriert das Gewebe nach Art der *indirekten oder sekundären Frakturheilung* (Einhorn, 1998/2005). Beide Heilungsarten umfassen die Differenzierung vom Knochenzellen, deren Matrix-Sekretion sowie die Einlagerung von Kalzium/Phosphor-Mineralien in die Matrix (siehe 2.1.3). Die Regeneration des ossären Gewebes erfolgt so, dass die strukturelle Anatomie des Gewebes wieder gesichert werden kann (Boskey et al., 1984). Wird die Knochenregeneration in ihrem geregelten Verlauf in eine ihrer Phasen unterbrochen oder fehlerhaft durchlaufen, so ist die Folge eine Störung der Knochenheilung (Braun et al., 1996).

2.2.1 Primäre Frakturheilung

Wie bereits erwähnt, setzt die primäre oder direkte Knochenheilung zunächst eine unmittelbare Nähe der Knochenfragmente zueinander voraus. Sie vollzieht sich im Sinne einer sog. »*Kontaktheilung*«, wenn die Weite des Frakturspaltens 0,01 mm nicht überschreitet (Klaushofer et al., 1994) oder so gering ist, dass weder Gefäß- noch Bindegewebsstrukturen hineingelangen können (Mann et al., 1989; Einhorn, 1998). Die primäre Knochenheilung kann jedoch auch noch bei einer Frakturspaltweite bis zu 0,5 mm nach Art der sog. »*Spalthheilung*« in Erscheinung treten (Mann et al., 1989). Da ein konstant unter 0,01 mm liegender Abstand zwischen den Fragmentenden selten ist, kann ebenso ein paralleles Auftreten beider Heilungsarten beobachtet werden (Schenk, 1975). Eine weitere Bedingung der primären Heilung ist neben der Entfernung zwischen den Frakturrenden, deren Stabilität bzw. minimale Beweglichkeit sowie eine anatomisch korrekte Position zueinander (Braun et al., 1996; Schweiberer et al., 1999). Eine ebenso wichtige Prämisse für die Knochenheilung im Rahmen der primären Knochenregeneration stellt eine ausreichende Vaskularisation des Knochens im Frakturgebiet dar (Rhineland, 1974; Braun et al., 1996). Histologisch-morphologisch ist die direkte Knochenheilung zum Einen gekennzeichnet durch das Fehlen eines stabilisierenden Frakturkallus (Mann et al., 1989; Braun et al., 1996), zum Anderen durch die völlige Abwesenheit von Knorpel- und Bindegewebsstrukturen im Frakturspalt (Schweiberer et al., 1999). Eine Ausnahme entsteht, wenn es nicht zu einer stabilen Fixation der Fragmente gegeneinander kommt, die Durchblutung der Frakturrenden jedoch ausreichend ist. In diesem Fall entsteht ein stabilisierender Kallus, der sog. »Unruhe-Kallus« (Braun et al., 1996). Die wesentlichen Prozesse dieser Art der Knochenheilung werden durch die Aktivität von Osteoklasten und Osteoblasten getragen und erfolgen, entgegen der sekundären Frakturheilung, unter einer nur geringen Beteiligung von umliegendem Weichteilgewebe, Periost und Knochenmark. (Einhorn, 2005).

Im Falle der *Kontaktheilung* werden die Fragmentenden in längsaxialer Ausrichtung durch direkten Aufbau neuer Havers'scher Systeme miteinander verbunden (Braun et al., 1996). Hierbei entstehen zunächst durch die Aktivität von Osteoklasten, sog. »cutter heads«, Resorptionskanäle mit zapfenförmiger Front (»cutting cones«), die in das benachbarte Knochenfragment einwachsen, so dass avitales Knochengewebe abgebaut wird (Mann et al., 1989; Schweiberer et al., 1999). Aufgrund der Kegelform der entstandenen Resorptionshöhlen spricht man dabei auch von einer sog. »Verzapfung« der Fragmen-

tenden (Braun et al., 1996). Innerhalb der entstandenen Verbindungskanäle kommt es zur Ausbildung von Blutkapillaren, welche perivaskulär mesenchymale Stammzellen (MSCs) mitführen. Diese multipotenten Zellen differenzieren zu Osteoblasten, welche die Resorptionskanäle auskleiden und konzentrisch mit Lamellenknochen füllen (Einhorn, 1998).

Angesichts eines im Verhältnis weiten Abstandes ($> 0,01$ mm) voneinander ist im Falle der *Spalthheilung* eine direkte Verbindung der benachbarten Fraktarenden nicht möglich. Der Heilungsprozess beginnt hier mit der Einsprossung periostaler/endostaler Blutkapillaren und der damit verbundenen perivaskulären Migration mesenchymaler Stammzellen in das Frakturgebiet (Lane, 1998). Entsprechend der als Leitstruktur dienenden, in transversaler Ausrichtung zur Knochen-Kompakta einsprossenden Blutgefäße, entstehen die neuen lamellaren Knochenstrukturen im Frakturspalt senkrecht zur kortikalen Knochenlängsachse (Mann et al., 1989). Wie auch im Falle der Kontaktheilung wird der Lamellenknochen dabei durch die Syntheseaktivität von aus MSCs differenzierten Osteoblasten aufgebaut. Blutgefäße und vitale Zellen innerhalb der kortikalen Havers'schen Systeme/Kanäle werden im weiteren Verlauf aktiv. Entsprechend der Vorgänge bei Kontaktheilung entstehen so neue Osteone/Havers'sche Systeme resp. Lamellenknochen in längsaxialer Ausrichtung zur Knochenkortikalis. Sie durchdringen den transversalen Lamellenknochen des Frakturspaltes und restaurieren durch ihren physiologisch verlaufenden Ab- und Umbau die kortikale Struktur (Schenk, 1975).

2.2.2 Sekundäre Frakturheilung

Fehlt der Kontakt zwischen den Fraktarenden über eine Strecke über 0,5 mm und/oder besteht keine ausreichende Stabilität zwischen den Fragmentenden, vollzieht sich die Knochenheilung entsprechend der sekundären oder indirekten Frakturheilung (Klaushofer et al., 1994). Es handelt sich bei dieser in der Mehrheit der Fälle auftretenden Art der Knochenheilung (Einhorn, 1998) um eine komplexe Abfolge fließend ineinander übergehender und auch überlappender, periostaler, endostaler und interfragmentärer Regenerationsprozesse des Gewebes (Einhorn, 1998). Die Neo-Osteogenese vollzieht sich im Rahmen dieser Heilung in Bereichen fern des Frakturspaltes nach Art desmalen Ossifikation sowie interfragmentär und in Spaltnähe nach Art enchondraler Ossifikation (McKibbin, 1984). Ein weiteres charakteristisches morphologisches Merkmal und mechanischer Schlüsselprozess der sekundären Frakturheilung ist die rasche Bildung einer Kallusmanschette um den

frakturierten Knochenbereich. Sie besteht entsprechend ihrer Entwicklung (enchondrale Ossifikation) zunächst aus Knorpel- und Bindegewebe, später aus primitivem Geflechtknochen (Brighton, 1984). Der Frakturkallus dient dabei einer vorläufigen ausreichend belastbaren Stabilisation und somit einer schnellst möglich wieder hergestellten Belastbarkeit und Mobilität.

Die sekundäre Frakturheilung gliedert sich histologisch in drei bzw. vier Phasen (A.-C.) (Cruess et al., 1975): Die Entzündungs-Phase (A.), die Phase der Kallusbildung (B.), untergliedert von Klaushofer (1994) und Braun & Rüter (1996) in die Sub-Phasen des weichen (B.1) und harten (B.2) Kallus sowie die Phase des »Remodeling« (C.) (McKibbin, 1978). Verschiedene Autoren, darunter Klaushofer et al. (1994), Braun et al. (1996) und Frost (1998), beschreiben darüber hinaus die Entstehung der Fraktur selbst als zusätzliche und »initiale Phase« der Frakturheilung.

A. Entzündungsphase

Im unmittelbaren Anschluss an die nur wenige Millisekunden andauernde Fraktur/Gewebeschädigung, beginnt die Entzündungs-Phase (Cruess et al., 1975; McKibbin, 1978; Klaushofer et al., 1994; Rüter & Braun, 1996; Frost, 1998). Die Dauer dieser Phase kann mit ein bis drei Tagen angegeben werden (Brighton, 1984; Braun et al., 1996). Klaushofer et al. (1994) sprechen sogar von einem Zeitraum bis zu sieben Tagen. Die gewaltsame Zusammenhangstrennung des Gewebes führt zu einer Zerreißung der Blutgefäße im Bereich des umliegenden Weichteilgewebes, der äußeren und inneren Knochenhaut, des kortikalen Knochengewebes sowie des Knochenmarks. In Folge der umfangreichen Gefäßschädigung tritt Blut- und Plasma-Exsudat in das Frakturgebiet aus, es entsteht ein (Fraktur-)Hämatom sowie ein Ödem in den betroffenen Gebieten (Klaushofer et al., 1994; Braun et al., 1996; Einhorn, 1998; Schweiberer et al., 1999). An die Fraktur angrenzende Zellen des Knochengewebes gehen durch mangelnde vaskuläre Nährstoffversorgung und/oder starke Dehnung zugrunde, Osteozyten setzen dabei lysosomale Enzyme frei (Braun et al., 1996). In Folge degeneriert die frakturnahe Knochenmatrix und die Fragmentenden des Knochens nekrotisieren (Brighton, 1984; Einhorn, 2005). Induziert durch Zelldetritus, Trümmer des geschädigten Gewebes und die Einblutungen in das Frakturgebiet beginnt, entsprechend des exsudativen Stadiums der physiologischen Wundheilung, eine akute inflammatorische Phase. Als Entzündungsmediatoren wirkende sog. »Akute-Phase-Proteine«

überfluten das Gewebe und führen hierbei zunächst zu einer Gefäßdilata-tion. Ziel der Gefäß-erweiterung ist eine verbesserte Sauerstoffversorgung der ortsständigen Zellen sowie eine gesteigerte Immigration neuer Zellen aus dem Endothel und dem Blutstrom selbst (Braun et al., 1996). Die mit dem Blutstrom in das Gewebe austretenden Thrombozyten adhäsieren an den geschädigten resp. freiliegenden Kollagenstrukturen der Subendothelien mit Hilfe des Faktors VIII der Gerinnungskaskade (Van Willebrand Faktor). Die Aggregation der Zellen resultiert letztlich in einer Koagulation des Hämatoms (Remedios et al., 1999). Die Blutplättchen sezernieren die Wachstumsfaktoren PDGF (Platelet derived growth factor) und TGF- β (Transforming growth factor- β) sowie zahlreiche Zytokine (v.a. Interleukine (IL-1, -6, -11)) (Lane, 1998). Diese fördern via Chemotaxis die Migration und Proliferation polymorphkerniger Granulozyten, Monozyten und Mastzellen in das Frakturgebiet (Klaushofer et al., 1994; Einhorn, 1998). Die genannten Entzündungszellen verstärken über freiwerdende inflammatorische Mediatoren die Entzündungsreaktion und entfernen darüber hinaus mittels Proteolyse und Phagozytose Zelldetritus, nekrotische Gewebereste und eventuell vorhandene Bakterien (McKibbin, 1984; Braun et al., 1996; Remedios et al., 1999). Zusätzlich werden auf diese Weise Fibroblasten, Angioblasten und Strukturproteine stimuliert und die Migration, Proliferation und Differenzierung lokaler, strukturbildender mesenchymaler Stammzellen (MSCs) in das Frakturgebiet gefördert. Das im Hämatom entstehende lockere Fibrinnetz verbindet die Knochenfragmente und stellt so eine erste wichtige, wenn auch nur geringe, Stabilisierung der Fraktur dar (Bucher et al., 1997).

Die durch Entzündungsmediatoren und Wachstumsfaktoren induzierte und gesteigerte Angiogenese bzw. Kapillareinsprossung, welche nach Braun et al. (1996) bis zu zwei Wochen nach dem Trauma um das sechsfache des physiologischen Ausmaßes gesteigert ist, stellt einen maßgeblichen Faktor der Knochenheilung dar (Rhineland, 1974). Die neugebildeten Blutgefäße entstammen intakten Gefäßendothelien des Periost, des angrenzenden Muskelgewebes sowie des Markkraums. Die Angiogenese vollzieht sich dabei entlang der Fibrinstrukturen des Hämatoms (Cruess et al., 1975). Braun et al. (1996) vertreten hier die Ansicht, dass die Blutversorgung des Frakturgebietes hauptsächlich von der äußeren Knochenhaut ausgeht. Sie sprechen in diesem Zusammenhang von einer Umkehrung der physiologischer Weise zentrifugalen Blutversorgung des Knochengewebes durch die Gefäße des Markkraums im Falle einer Fraktur. Auch Brighton (1984) ist der Ansicht, dass

eine vaskuläre Versorgung des Frakturgebietes mittels periostaler Gefäßeinsprossung für die Regeneration des Knochengewebes ausreicht. Sicher erscheint in diesem Zusammenhang, dass eine ausreichende (Re-)Vaskularisation des geschädigten Gewebes, wie bei jedem aktiven metabolischen Prozess, eine entscheidende Rolle innerhalb dieser Knochenheilungsphase darstellt (Stürmer, 1996).

B. Phase der Kallus-Bildung

B.1 Phase des weichen Kallus

Charakterisiert durch den enormen Zuwachs an Blutgefäßen und die massive Proliferation von Zellen im Frakturgebiet sowie die innerhalb des Hämatoms über stimulierte Fibroblasten entstehenden neuen Kollagenfibrillen, tritt die Knochenheilung fließend in die Kallus-Phase, genauer in die von Braun et al. (1996) auch als Granulations-Phase bezeichnete, »Phase der weichen Kallusbildung« über. Das Frakturhämatom organisiert sich, enthaltenes Fibrin wird mittels Phagozytose von Makrophagen abgebaut. Das Hämatom wird dabei zunächst schrittweise durch Granulationsgewebe ersetzt (Brighton, 1984). Osteoklasten erscheinen vermehrt im Frakturgebiet, sie resorbieren avitales Knochengewebe. Die Restprodukte der Resorption werden durch Makrophagen phagozytiert. In Vorbereitung auf die Neubildung von Knochengewebe, über den Weg der desmalen und enchondralen Ossifikation, proliferieren und differenzieren lokale und perivaskulär aus Periost/Endost sowie umliegenden Weichteilgewebe immigrierte mesenchymale Stammzellen (MSCs) zu Fibroblasten sowie Chondroblasten und Osteoblasten (Klaushofer et al., 1994; Braun et al., 1996). Im Verlauf ihrer Differenzierung sezernieren diese Zellen osteoinduktive »Bone morphogenetic proteins« (v.a. BMP-2, -7), auch weitere Mitglieder der TGF- β -Familie erscheinen erneut im Frakturgebiet. Die MSCs differenzieren sich in Abhängigkeit der herrschenden Sauerstoff-/Kohlendioxid-Spannungen sowie der vorhandenen Wachstumsfaktoren entlang der chondralen und/oder osteogenen Zelllinie. (Caplan, 1991; Lane, 1998). Dabei resultiert eine niedrige Sauerstoff- bzw. hohe Kohlendioxid-Spannung in der Bildung von Chondroblasten, eine weniger hypoxische Umgebung in der Differenzierung der MSCs zu Osteoblasten (siehe auch Kapitel 2.4. *Mesenchymale Stammzellen*) (Caplan, 1991). Da die vaskuläre Versorgung des Gewebes im Bereich der Frakturrenden in dieser frühen Phase der Knochenheilung noch keine ausreichend ernährende Kompetenz besitzt, entstehen hier mehrheitlich knorpelformatierende Chondroblasten, eine enchondrale

Knochenneubildung wird so vorbereitet (Lane, 1998; Einhorn, 1998). Entsprechend der Funktion des Hämatoms als Leitstruktur während der Angiogenese und in logischem Zusammenhang dessen, dient das locker Fibrinnetz sowie durch die Fibroblasten neu gebildete Kollagenfibrillen den chondro-/osteogenen Zellen als Gerüst (Braun et al., 1996; Schweiberer et al., 1999). Differenzierte Chondroblasten synthetisieren hyaline Knorpelgrundsubstanz bestehend aus Kollagen Typ I, aber vor allem dem für das Gewebe und die frühe Phase spezifischen Kollagen Typ II (Mann et al., 1989). Da der Stoffwechsel der Knorpelzellen anaerob verläuft, tritt Knorpelgewebe vermehrt in den hypoxischen Bereichen der Fragmentenden in Erscheinung.

So entsteht, innerhalb eines Zeitraums von zwei bis drei Wochen, entlang der genannten Leitstrukturen, über die Vorstufe eines Granulationsgewebes das sog. »weiche« Kallusgewebe. Es stellt eine erste interfragmentäre Überbrückung des Frakturgebietes, bestehend aus hyalinem Knorpel und Bindegewebsstrukturen, dar (Braun et al., 1996). Das Knorpelgewebe, welches sich dabei an Stelle des Granulationsgewebes bildet, entsteht im Verhältnis in größerer Menge in Ausrichtung auf die Peripherie als interfragmentär. Auf diese Weise entwickelt sich eine zunächst noch weiche stabilisierende Kallusmanschette um das Frakturgebiet (Brigthon, 1984). Das Depot der MSCs befindet sich in diesem Fall v.a. in der Kambiumschicht des Periosts (Einhorn, 2005). In diesem Zusammenhang wird auch von einer »Primären Kallusantwort des Periosts« gesprochen (Braun et al., 1996). Eine von Braun et al. (1996) als »sekundäre Kallusantwort des (fraktur-nahen) Weichteilgewebes« bezeichnete Situation entsteht, wenn keine ausreichende Stabilisierung durch die primäre Kallusentwicklung erreicht werden kann. Neben der beschriebenen initialen Phase der enchondralen Knochengenese vollzieht sich zeitgleich subperiostal, an der Oberfläche der frakturfernen Knochendiaphyse, der Aufbau von Geflechtknochen über desmale Ossifikation (Einhorn, 1998; Schweiberer et al., 1999). Die Entzündungs-Phase der Heilung bereitet demnach nicht allein die anschließende Kallus-Phase vor, sondern überschneidet sich bereits zu einem frühen Zeitpunkt der Heilung mit Letzterer. Einhorn (1998) und Schweiberer et al. (1999) vertreten die Ansicht, dass die subperiostale desmale Ossifikation bereits unmittelbar nach dem Trauma beginnt, jedoch nur bis etwa zum 14. Tag der Heilung besteht. Die für diese Art der Ossifikation verantwortlichen Osteoblasten differenzieren sich mehrheitlich aus MSCs der periostalen Kambiumschicht, Depots werden jedoch von Schweiberer et al. (1999) auch im umliegenden Weichteilgewebe, sowie den Havers'schen

Systemen der Kortikalis vermutet. Das sich konzentrisch entwickelnde Knochengewebe gewinnt in Richtung des Frakturspaltes an Stärke und wölbt die Faserschicht der äußeren Knochenhaut dabei leicht vom Knochen ab (Webb et al, 2000).

B.2 Phase des harten Kallus

Die der weiteren Stabilisation der Fraktur dienende Überbrückung der Fragmentenden wird im Folgenden durch die Mineralisation des weichen Kallusgewebes fortgeführt. Die Knochenheilung geht dabei in die sog. »Phase des harten Kallus« über (Brighton, 1984; Braun et al., 1996). Diese beinhaltet die Kalzifizierung der hyalinen Knorpelgrundsubstanz, sowie deren Ersatz durch Geflechtknochen gemäß der enchondralen Ossifikation. Einhorn (1998) unterscheidet innerhalb dieser Heilungs-Phase noch einmal zwischen einer Phase des Knorpelabbaus und der Knochenbildung. Die Dauer dieses Stadiums der Knochenheilung beim Menschen wird von Braun et al. (1996) und Brighton (1984) mit drei bis vier Monaten angegeben.

Die Grundsubstanz des hyalinen Knorpelgewebes wird von Chondroblasten synthetisiert. Sind diese vollständig von Knorpelmatrix umgeben, differenzieren sie zu Chondrozyten (Liebich, 1999). In Folge der hypoxischen Umgebung der Zellen erfolgt ihr Metabolismus über anaerobe Glykolyse. Die niedrige Sauerstoffspannung entsteht hier zum Einen, trotz stetiger Angiogenese, durch die enorme Zellproliferation und den damit verbundenen hohen Bedarf innerhalb des Frakturgebietes, zum Anderen durch die wachsende Menge an umgebender Knorpelgrundsubstanz. Ist das zur Verfügung stehende Glykogen verbraucht, hypertrophieren und degenerieren die Chondrozyten. Während der Vergrößerung der Zellen entlassen sie Proteasen und Phosphatasen in die extrazelluläre Matrix, welche die in der Grundsubstanz enthaltenen Phosphat-Ionen spalten. Durch Präzipitation mit den ebenso aus den Chondroblasten/-zyten-Mitochondrien freiwerden Kalzium-Ionen entstehen Mineralsalze. Die Knorpelmatrix kalzifiziert (Einhorn, 1998). Der weiche Kallus härtet in Folge aus und erhöht so, durch Bildung sog. »chondralen Knochengewebes«, die Stabilität der Fraktur (Remedios et al., 1999). Nach der Kalzifizierung des Knorpels dringen Blutgefäße aus dem Bereich des Periosts/Endosts und des Markraumes in die mineralisierte Knorpelsubstanz ein und ermöglichen damit die perivaskuläre Migration von MSCs. Diese differenzieren sich zu Osteoblasten und beginnen mit der Synthese organischer Knochenmatrix. Gleichzeitig gelangen Chondroblasten in das kalzifizierte Gewebe

und beginnen mit der Resorption mineralisierten Knorpels (Einhorn, 1998). Mit dem Ersatz kalzifizierten Knorpelgewebes im Austausch zu Geflechtknochen und die damit verbundene knöcherne Verbindung der Frakturrenden entlang des Kapillarnetzes endet die Phase der Kallushärtung (Braun et al., 1996).

C. Remodeling

»Remodeling« beschreibt den Vorgang der Wiederherstellung der ursprünglichen Knochenkontur und der Knochenmarkhöhle in der finalen Phase der Knochenheilung. Das Remodeling dauert beim Menschen nach Braun et al. (1996) mehrere Monate bis Jahre. Schlüsselprozess dabei ist der Ersatz des interfragmentären primitiven Geflechtknochen durch Lamellenknochen, auch als »Modeling« (Frost, 1998a; Braun et al., 1996) bezeichnet. Ebenso wichtig ist ferner der Abbau überschüssigen periostalen/endostalen knöchernen (Kallus-)Gewebes entlang der, durch Muskelaktivität und bestehende Gewichtsverhältnisse, auftretenden Spannungslinien resp. mechanischen Zug- und Druckbelastungen (Cruess et al., 1975). Remedios (1999) siedelt den Beginn des Knochen-Remodelings bereits in der Phase der harten Kallus im mineralisierten Knorpelgewebe an. Im Bereich der Kortikalis wird der interfragmentäre Geflechtknochen durch longitudinal, entlang bestehender Spannungslinien ausgerichtete, sekundäre Osteone/Havers'sche Systeme ersetzt. Das Knochengewebe erhält somit seine ursprüngliche biologische und mechanische Kompetenz vollständig zurück. Die sekundäre Knochenheilung findet schließlich ihren Abschluss in der Begradigung der Knochenkontur, durch resorptiven Abbau der knöchernen Kallusmanschette von Außen nach Innen. Ebenso wird der Markraum von überflüssigem Knochengewebe befreit und so die Kontinuität der Markhöhle wiederhergestellt. Der Kanon des Knochenum- und -aufbaus durch resorptive und formierende Zellaktivität vollzieht sich über sog. »Basic Multicellular Units« (BMUs), einer Einheit bestehend aus Osteoklasten, Osteoblasten und deren Interzellulärsubstanz sowie Blutkapillaren (Braun et al., 1996). Braun et al. (1996) sehen die BMUs ebenso als modulierende Einheiten des Modeling. Sie finden sich im subperiostalen Bereich, entlang der inneren Knochenhaut in der Markraumhöhle sowie in kleinen Gefäßkanälen der Knochen-Kompakta (Klaushofer et al., 1994). Der Regelkreis der BMUs besteht zunächst in der Resorption von Knochengewebe durch Osteoklasten und einer nachfolgenden Einsprossung von Blutkapillaren. Diese transportieren perivaskulär MSCs, welche sich zu syntheseaktiven Osteoblasten differenzieren und so neue Osteone/Havers-Systeme resp. Lamellenknochen aufbauen

(Frost, 1998a). Die Aktivität der BMUs beschränkt sich jedoch nicht allein auf die Knochenheilung, da das Gewebe lebenslang Ab-, Um- und Aufbauprozessen unterliegt. Im Falle der Frakturheilung wird allein das physiologische Gleichgewicht zwischen Knochenresorption und Knochenformation innerhalb der BMUs den herrschenden Notwendigkeiten angepasst und verschoben (Klaushofer et al., 1994).

Die Knochenheilung gilt als klinisch abgeschlossen, wenn, unabhängig vom morphologisch-histologischen Bild, der Patient in der Lage ist, die betroffene Gliedmaße ohne externe oder interne stabilisierende Maßnahmen zu belasten (Schiebler, 1986). Radiologisch wird die Knochenheilung von Kuner et al. (1996) und auch Einhorn (1998) mit dem Zeitpunkt als beendet erklärt, an dem die Fragmente knöchern verbunden und so die Knochenkontinuität wieder hergestellt ist. Schiebler (1986) spricht in diesem Zusammenhang von einer »komplikationslosen Heilung«. Diese Situation wird, in Abhängigkeit der Frakturform sowie der sie begleitenden Verletzungen, bei Tscherne (1996) sowie Rüter und Mayr (1999) nach einem Zeitraum von drei bis vier Monaten, bei Kuner et al. (1996) sogar bis zu sechs Monaten, angegeben. Marsh (1998) macht den Versuch einer messbaren Skalierung der Knochenheilung und definiert die vollständig eingetretene Regeneration oder »Union« mit einer biomechanischen Steifigkeit des Knochens von mindestens 15 Newton/Millimeter (N/mm). Radiologisch-histologisch legt er sich weniger präzise auf das Fehlen einer sichtbaren Frakturlinie innerhalb der Kortikalis und vollständig resorbierten periostalen Kallus fest.

2.3 Störungen der Knochenheilung

2.3.1 Formen der Knochenheilungsstörungen

Erfolgt die klinische Heilung resp. knöcherne Verbindung einer Fraktur nicht innerhalb des für den Menschen als physiologisch einzustufenden Zeitraums oder innerhalb einer für die Art, Form und Lokalisation der Fraktur angemessenen Zeit, liegt eine »**verzögerte Bruchheilung**« vor (Nunamaker et al., 1985; Schiebler, 1986; Tscherne, 1996; Rüter und Mayr, 1999; Remedios, 1999). Im anglo-amerikanischen Raum spricht man von einer »Delayed Union«. Hierbei sind ebenso das Alter des Patienten und die zugrunde liegende Behandlungsmethode zu berücksichtigen (Nunamaker et al., 1985; Schiebler, 1986). Auch Hayda et al. (1998) und Einhorn (1998) schließen sich dieser Definition an, erweitern jedoch die Kriterien hinsichtlich gleichzeitig vorliegender aktiver Heilungsmechanismen. Marsh (1998) spricht vom Vorliegen einer verzögerten Heilung, entsprechend der von ihm angestrebten biomechanischen Skalierung, wenn nach zwanzig Wochen eine Steifigkeit von 7 N/mm nicht erreicht wurde. Histologisch definiert er die »Delayed Union« mit dem Stillstand der periostalen Heilungsprozesse, bevor die Fraktur knöchern überbrückt wurde. Erliegt die Heilung periostal und endostal, ohne eine knöcherne Überbrückung, mit parallel auftretenden Resorptionsgeschehen, spricht Marsh (1998) von einer ausbleibenden Knochenheilung (Non-Union). Sie stellt ein mögliches, jedoch nicht zwingendes Resultat der verzögerten Heilung dar (Nunamaker et al., 1985).

Die **Situation einer erliegenden Knochenheilung** besteht, wenn die Knochenheilungsprozesse, ohne knöcherne Überbrückung des Frakturspaltes, vollständig zum Erliegen kommen (Nunamaker et al., 1985; Tscherne, 1996; Einhorn, 1998; Remedios, 1999) oder die vollständige Wiederherstellung der Knochenfunktion und -anatomie mehr als sechs bis acht Monate in Anspruch nimmt und noch nicht abgeschlossen ist (Reed et al., 2002; Rüter und Mayr, 1999). Im deutschen Sprachraum bezeichnet man die erliegende Knochenheilung als »**Pseudarthrose**«. Zur Beurteilung und Diagnostik dient dabei zunächst der Vergleich von regelmäßig angefertigten Röntgenaufnahmen (Nunamaker et al., 1985; Reed et al., 2002). Sind hier keine radiologisch-morphologischen Veränderungen (siehe 2.3.3 *Morphologie und Diagnose atropher Pseudarthrosen*) aufgetreten, gilt die »Fractura non sanata« als klinisch diagnostiziert. Die bildgebenden diagnostischen Möglichkeiten im Rahmen der Pseudarthrose werden in Kapitel 2.3.3 näher erläutert.

Klinische Kriterien sind eine fehlende Belastung der Gliedmaße mit folgender Muskelatrophie und eine eingeschränkte Beweglichkeit angrenzender Gelenke (Nunamaker et al., 1985). Auf Grundlage ihrer Ätiologie definierten Schweiberer et. al. (1999) die Non-Union oder Pseudarthrose (PA) als »(...) Störung des Regelkreises der Frakturheilung bestehend aus Osteoregeneration, Osteovaskularisation und Osteostabilisation.«

Klassifikation der Pseudarthrosen

Eine bis heute gültige Klassifikation der Pseudarthrosen wurde 1973 von Weber und Čech mit Bezug auf morphologische Gesichtspunkte ihrer biologischen/osteogenen Vitalität vorgenommen. Entsprechend ihrer Heilungspotenz werden sie in biologisch reaktionsfähige oder vitale Pseudarthrosen und biologisch reaktions-unfähige oder avitale Pseudarthrosen eingeteilt (vgl. Kuner et al., 1996; Rüter und Mayr, 1999).

Klasse der vitalen Pseudarthrosen (Typ A)

Pseudarthrosen des Typs A sind charakterisiert (Schiebler, 1986; Kuner et al., 1996) durch bestehende Vitalität der Fragmentenden sowie radiologisch darstellbare periostale und endostale Kallusbildung. Es erfolgt, primär mit Bezug auf die Kallusmenge, eine zusätzliche Untergliederung in: die »Elefantenfuß-Pseudarthrose« (Typ A 1), die »Pferdefuß-Pseudarthrose« (Typ A 2) sowie die »oligotrophe Pseudarthrose« (Typ A 3). Pseudarthrosen des Typs A 1 und A 2 sind reich an periostalem Kallus und gekennzeichnet durch aufgetriebene Knochenkonturen v.a. an den Fragmentenden (Weber, 1982; Kuner et al., 1996). Sie werden daher auch als »hypertrophe Pseudarthrose« bezeichnet. Histologisch ist eine Vielzahl von Gefäßen im Frakturbereich erkennbar (Schiebler, 1986). Elefantenfuß- und Pferdefuß-Pseudarthrosen unterscheiden sich hinsichtlich der Ausprägung der genannten morphologischen Kriterien. Entsprechend einer geringeren biologischen Aktivität sind diese bei der Pferdefuß-PA weniger prägnant (Schiebler, 1986; Rüter et al., 1999). Die Typ A 3 Pseudarthrose wird auch als biologisch reaktionslose PA bezeichnet. Die Bildung von Kallusgewebe bleibt hier, trotz Vitalität der Fragmentenden, entweder gänzlich aus (Weber, 1982; Kuner et al., 1996; Rüter et al., 1999; Rompe et al. 2004) oder ist nur im endostalen Bereich, in minimaler Ausdehnung, darstellbar (Schiebler, 1986).

Klasse der avitalen Pseudarthrosen (Typ B)

Bezeichnend für die Klasse der avitalen Pseudarthrosen ist eine fibrös-binde-gewebige Verbindung zwischen den Knochenfragmenten. Zur Ausbildung von periostalem Frakturkallus kommt es in dieser Gruppe der Pseudarthrosen nicht. Auch hier erfolgt eine zusätzliche Untergliederung in drei Subformen (Weber, 1982, Rüter und Mayr, 1999). Im Falle einer dystrophischen oder auch »Drehkeil-Pseudarthrose« (Typ B1), besteht zwischen den Fragmentenden Instabilität in Folge des in seiner Vaskularisation stark geschädigten interfragmentären Segments. Die »Defekt-Pseudarthrose«, (Typ B 2) ist gekennzeichnet durch fehlende Knochensubstanz mit osteogenem avitalen Defektbereich, aber vaskularisierten Fragmentenden. Merkmal der hypotrophen oder auch »atrophe Pseudarthrose« (Typ B 3) ist die Ausbildung von Narbengewebe als Ersatz von z.B. durch Trauma eingebüßten Knochenfragmenten oder posttraumatischen Sequestrierungen nach Knochenentzündung (Kuner et al., 1996; Rüter und Mayr, 1999; Rompe et al. 2004) (siehe auch 2.3.2 Ätiologie der atrophe Pseudarthrose). Radiologisch ist im Falle der atrophe Pseudarthrose, wie bereits erwähnt, kaum Frakturkallus darstellbar, die Fragmentenden atrophieren (Nunamaker, 1985; Runkel et al., 2000).

Da in der vorliegende Studie eine atrophe Pseudarthrose induziert werden sollte, wird in den folgenden Kapiteln die Ätiologie, Morphologie, Diagnose und Therapie der atrophe Pseudarthrose näher erläutert.

2.3.2 Ätiologie der atrophe Pseudarthrose

Der atrophe Pseudarthrose (aPA) geht eine massive Beeinträchtigung des für eine komplikationslose Heilung verantwortlichen Funktionskreises Periost, Kortikalis, Knochenmark und umgebendes Weichteilgewebe voraus (Schweiberer et al., 1999). Die bedeutendste Störgröße für den Regelkreis der Frakturheilung stellt dabei eine defizitäre lokale Vaskularisation dar (Liebermann et al., 1999; Lu et al., 2007). Ebenso können stark dislozierte Fragmentenden (Fraktur-Diastase) und Instabilität der Frakturenden gegeneinander zur Ausbildung und Erhaltung einer aPA führen (Nunamaker et al., 1985; Marsh, 1998; Bosch, 1999). Hervorgerufen werden die ursächlichen Defizite des Knochengewebes durch mechanische und/oder biologische Faktoren (Stürmer, 1996; Kasperczyk et al. 1996). Da atrophe Pseudarthrosen in der Vergangenheit vor allem als Komplikation vorangegangener Osteosynthesen in Erscheinung traten, werden sie im französischen Sprach-

raum als »Pseudarthroses modernes« bezeichnet. Diese Art der Pseudarthrose tritt jedoch nicht allein postoperativ auf, die Ätiologie erstreckt sich ebenso auf posttraumatische, selten auch kongenitale (Osteogenesis imperfecta) Faktoren (Einhorn, 1998). Dennoch bezeichnen Rüter et al. (1999) sowie Liebermann und Kollegen (1999) die postoperative Beeinträchtigung der Frakturheilung als die bedeutendste Ursache der aPA. Schon Frost gibt 1989 die technische Manipulation in 70 - 80 % aller auftretenden Pseudarthrosen in den USA und Kanada als Ursache an. Material und Methoden der Osteosynthese haben sich seit den 80er Jahren stark verändert und weiterentwickelt, in den meisten Fällen führt jedoch auch heute noch eine unsachgemäße oder unvorsichtige chirurgische Manipulation des Knochengewebes zum Auftreten dieser massiven Knochenheilungsstörung (Hayda et al., 1998).

Unabhängig von einer postoperativen und/oder posttraumatischen Ätiologie basiert die Entwicklung einer aPA vor allem auf einer inadäquaten lokalen Vaskularisation (A.), einer steten interfragmentären Bewegung/Instabilität (B.) und/oder einem mangelhaften Kontakt der Fragmentenden (C.) (Rüter et al., 1999; Schweiberer et al., 1999).

A. Inadäquate lokale Vaskularisation

Der Knochenheilungsprozess bedarf einer enormen Stoffwechselaktivität und ist dem entsprechend eng an eine intakte Vaskularisation der beteiligten, funktionellen Strukturen gebunden (Marsh, 1998). Nach Hulth (1989) bedarf die Stoffwechselaktivität im Falle einer Fraktur einer Steigerung um 20-25 %. Fehlt die ausreichende Durchblutung oder ist massiv geschädigt, kann der Heilungsprozess nicht komplikationslos durchlaufen werden (Stürmer, 1996; Brinker et al., 1997). Das Resultat mangelhafter lokaler, vaskulärer Versorgung sind Ischämie und ausgedehnte Nekrosen, besonders im Bereich der äußeren Knochenhaut, aber auch der Kortikalis und des umliegenden Weichteilgewebes (Marsh, 1998; Reed et al., 2002). Daraus ergibt sich, neben einer verminderten nutritiven Versorgung des Gewebes, eine massive Beeinträchtigung in der Entzündungs- und Granulationsphase der Knochenheilung. Die Ausschüttung initialer Mediatoren sowie die darüber modulierte und induzierte perivaskuläre Immigration und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen unterbleibt (Yoo et al., 1998; Remedios, 1999). Kallusgewebe entwickelt sich nur vermindert oder gar nicht, es entsteht eine atrophe Pseudarthrose (Stürmer, 1996).

Mechanische Faktoren, die zu einer massiven Schädigung der Durchblutung im Frakturbereich und/oder der Fragmentenden selbst führen, können dabei posttraumatisch oder postoperativ in Erscheinung treten (Kuner et al., 1996; Rompe et al., 1999).

Posttraumatisch treten Störungen der Vaskularisation durch eine mit dem Trauma einhergehende starke Schädigung von Knochen- und umliegendem Weichteilgewebe auf. Ebenso erscheinen sie nach einer durch bakterielle Besiedlung entstehenden Infektion der genannten Strukturen, v.a. bei offenen Frakturen (Schiebler, 1986; Bosch et al., 1999). Die Durchblutungsstörung ist in den genannten Fällen besonders im periostalen Bereich des Knochens lokalisiert (Stürmer, 1996). Eine posttraumatische Beeinträchtigung der medullären Vaskularisation erfolgt durch interfragmentäre Knochensegmente bei Trümmer- oder Splitter-Frakturen sowie stark dislozierten Zusammenhangstrennungen (Kuner et al., 1996; Rompe, 2004).

Postoperativ auftretende Pseudarthrosen in Folge Vaskularisationsstörungen nach Osteosynthese werden bei Kuner et al. (1998) nach 4–7 % der mit Osteosyntheseplatten, sowie 1 - 2 % der mit Marknagel versorgten Frakturen beschrieben. Das Einsetzen von Marknägeln, v.a. bei vorhergehender Aufbohrung der Markhöhle, kann die medulläre Blutversorgung des Knochens so weit schädigen, dass eine adäquate Knochenheilung nicht mehr möglich ist (Kasperczyk et al., 1996). Platten-Osteosynthesen bergen, auch bei sachgemäßer, aber v.a. bei inadäquater Durchführung, die Gefahr einer ausgedehnten Zerstörung periostaler Vaskularisation und darüber einer Pseudarthrose (Marsh, 1998; Bosch et al., 1999). Doch nicht allein die Operationstechnik, auch die Dauer des Eingriffs stellt einen Risikofaktor dar. Lang anhaltende Manipulationen bei exponiertem Gewebe potenzieren die Gefahr einer postoperativen Infektion und damit verbundenen Unterbrechung der Heilungsprozesse (s.o.) (Lu et al., 2007). Im Zusammenhang mit der chirurgischen Manipulation sind darüber hinaus auch die thermische Zerstörung von Blutgefäßen durch Bohrer oder Kauter sowie die Schädigung der periostalen Blutversorgung durch unvorsichtige Manipulation unmittelbar am Knochenmantel (Nudierung) zu nennen (Kuner et al., 1996).

Ferner können bereits bestehende Mikroangiopathien, der Einsatz von bestimmten Pharmazeutika (Steroide, Zytostatika) sowie Tumoren zu einer Störung der Vaskularisation und darüber ausbleibenden Knochenheilung führen (Rüter et al., 1999).

B. Stete interfragmentäre Bewegung/Instabilität

In der frühen Phase der Knochenheilung sichert ein gewisses Maß der Instabilität als auslösender Reiz die Initiierung der Kallusbildung (Goodship et al., 1985; Stürmer, 1996; Kuner et al., 1996). Eine andauernde interfragmentäre Bewegung/Instabilität zwischen den Fragmentenden führt jedoch zu einer fortwährenden Dehnung der Zellen in diesem Bereich, in deren Folge die Zellfunktion erliegt und so die physiologische Knochenheilung gestört wird (Cruess et al., 1975; Rompe, 2004). Das Kallusgewebe entwickelt sich im Falle der sekundären Frakturheilung dann nur ungenügend, zerreißt oder entsteht erst gar nicht.

Posttraumatisch ergibt sich eine Instabilität der Fragmentenden zueinander oftmals bei Trümmerfrakturen, mit teilweisem Verlust der Knochensubstanz und/oder einer weiten Dislokation der Segmente.

Postoperativ entsteht eine vermehrte Bewegung im Frakturbereich v.a. durch mangelhafte Fixation der Frakturrenden nach konservativer Behandlung (Schienen und Gipsverbände) sowie bei Versagen eingesetzter Osteosynthese-Implantate. Im letztgenannten Fall handelt es sich dabei nur selten um Materialfehler, häufiger sind die unsachgemäße Durchführung, sowie auch die Wahl des falschen Plattenmaßes die Ursache (Kasperczyk et al., 1996; Kuner et al., 1996; Hayda et al., 1998). Aber nicht allein inadäquate, auch passende Implantate können durch Ermüdung oder Lockerung in Folge von Infektionen, damit verbundenen Vaskularisationsstörungen und resultierenden Gewebs-Nekrosen und/oder -Lysen, zur Instabilität und so zur Entwicklung einer aPA beitragen (Schiebler, 1986; Stürmer, 1996). Auch eine verfrühte Belastung der Gliedmasse resp. der Fraktur kann in deren Instabilität und damit einem Erliegen der Knochenheilung resultieren (Nunamaker et al., 1985; Bosch et al., 1999; Rompe, 2004). Brechen neu gebildeten Knochen trabekel des Frakturkallus in der frühen, sensiblen Phase durch übermäßige oder verfrühte Bewegung/Belastung, so muss der Knochenheilungsprozess von Neuem beginnen (Stürmer, 1996; Bosch et al. 1999). Übersteigt der dazu nötige Abbau des entstandenen Zell- und Gewebedetritus und die erneute Initiierung der Knochenregeneration dabei die Kompetenz des geschwächten Gewebes, erliegt die Heilungspotenz. Eine neuerliche, knöcherne Überbrückung und somit Konsolidierung des Frakturspaltes kann nicht stattfinden (Kuner et al., 1996).

C. Mangelhafter Kontakt der Knochenfragmente

In direkter Verbindung zur Instabilität steht auch der mangelhafte Kontakt der Knochenfragmente zueinander (Claes et al., 1999a; Reed et al., 2002). Ist der Kontakt nicht ausreichend, entsteht bei konservativer sowie auch operativer Versorgung eines Knochenbruchs eine unzulängliche Stabilität und darüber eine vermehrte Bewegung zwischen den Fragmentenden (Remedios, 1999; Claes et al., 1999b). Entsprechend der vorhergegangenen Ausführungen führt dies zu einem Ausbleiben der knöchernen Kallusüberbrückung und somit zur Entwicklung einer Pseudarthrose. Über die chirurgisch-orthopädische Versorgung hinaus können ebenso ausgedehnte Substanzdefekte, in Folge schwerer Traumata entstandene, offene oder stark fragmentierte Frakturen sowie dabei interponierte Weichteilstrukturen zu einer Fraktur-Diastase mit nachfolgender Ausbildung einer aPA führen (Kuner et al., 1996, Claes et al., 1999a).

Weitere ätiologische Faktoren

Der allgemeine Status des Patienten stellt einen prädisponierenden Faktor bei der Entwicklung atropher Pseudarthrosen dar. Da die Multipotenz mesenchymaler Stammzellen sich antiproportional zum Alter verhält (Chamberlain et al., 2007), ist die Gefahr einer massiv gestörten Frakturheilung in Folge Maldifferenzierung osteogener Vorläuferzellen bei älteren Individuen höher (siehe 2.4. *Mesenchymale Stammzellen*) (Hayda et al., 1998). Auch das Geschlecht nimmt Einfluss auf das Auftreten und die Häufigkeit von Störungen der Frakturheilung. Mit Entfallen der physiologischen Östrogen-Produktion sind Frauen jenseits der Menopause besonders gefährdet. Das Risiko einer verzögerten Knochenheilung bis hin zur Pseudarthrose steigt überdies mit einem Mangel an Kalzium-/Phosphor-Mineralien, einer verminderten Aufnahme essentieller Aminosäuren zur Proteinsynthese sowie bei Überversorgung mit Vitamin A (Hypervitaminose A) (Cruess et al., 1985). Pharmakologisch können proliferationshemmende Substanzen wie Kortikosteroide, nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs), Antikoagulationen sowie verschiedene Antibiotika die Knochenheilung vehement negativ beeinflussen (Frost, 1989b). Darüber hinaus wirken Alkoholismus und das Rauchen sowie einige systemische (Stoffwechsel-)Erkrankungen und/oder Störungen wie z.B. Diabetis mellitus oder Osteoporose, prädisponierend (Hayda et al., 1998).

2.3.3 Morphologie und Diagnostik atropher Pseudarthrose

Entsprechend der in 2.3.1 genannten Klassifikationen und Charakteristika handelt es sich bei der aPA um eine biologisch reaktionsunfähige Pseudarthrose (Rüter et al., 1999). Das Heilungspotenzial des Knochengewebes reicht nicht aus, um den Knochen zu regenerieren (Josten et al., 1996), allein ein therapeutisches Eingreifen kann hier zur Heilung führen (Gebauer et al., 2005). Eine periostale/endostale Reaktion des massiv geschädigten Knochengewebes bleibt im Falle der aPA aus, den Knochen regenerierende Prozesse entfallen (Josten et al., 1996), es kann so nicht zu einer knöchernen Überbrückung und darüber Stabilisierung der Kontinuitätstrennung kommen (Marsh, 1998).

Das Erscheinungsbild der atrophen Pseudarthrose ist radiologisch durch deutlich sichtbare, sklerotische Fragmentenden und einen persistierenden Frakturspalt ebenso gekennzeichnet wie durch das Fehlen eines röntgendichten Frakturkallus und dem Erscheinen resorptionsbedingter Abrundungen (Atrophien) der fraktur nahen Knochenfragmente (Nunamaker et al., 1985; Schiebler, 1986; Marsh, 1998). Durch das resorptive Geschehen kann es so über die Fraktur-Phase hinaus zu einer Erweiterung des interfragmentären Spaltes kommen (Marsh, 1998; Rüter und Mayr, 1999). Morphologisch-histologisch ist die aPA durch fibrös-bindegewebige Strukturen im Frakturspalt gekennzeichnet. Eine Kalzifizierung der Matrix bleibt aus. Die sekundäre Frakturheilung kommt bereits vor Beginn enchondraler Ossifikationsprozesse zum Stillstand. Die Fragmentenden weisen histologisch adhäsierende und resorptionsaktive Osteoklasten auf (Kokubu et al., 2003). Das physiologische Gleichgewicht der Knochen-Resorption und -Formation wird zu Gunsten einer negativen Knochenbilanz verschoben, die Fragmentenden erscheinen atrophisch (Schiebler, 1986). Eine frühe, sichere Erkennung der atrophen Pseudarthrose und nachfolgende adäquate Behandlung kann, wie in den meisten Krankheitsfällen, zu einer Verbesserung der sonst fraglichen Prognose hinsichtlich einer Restitutio ad integrum führen.

Die bildgebende Diagnostik der atrophen Pseudarthrose erfolgt auf Basis von Anamnese und klinischen Befunden (siehe 2.3.1) zunächst durch regelmäßig angefertigte Röntgenbilder in zwei Ebenen. Zumeist können hier jedoch lediglich ein persistierender Frakturspalt und ggf. röntgendichte Verschattungen der kortikalen Kontur gesehen werden (Babulka et al., 2005). Die Durchführung einer Computer-Tomographie zur weiteren Absicherung durch eine überlagerungsfreie Darstellung ist hier in Kombination mit

der Radiologie denkbar um evtl. Überbrückungen sicher zu detektieren (Kuner et al., 1996). Ein weiteres wichtiges Mittel der Diagnostik ist die Szintigraphie. (Rüter et al., 1999) Hierbei wird dem Patienten ein Radiopharmazeutikum (Radioisotop + Pharmazeutikum) injiziert (z.B. Diphosphat/Technetium), welches rasch in den Knochen aufgenommen wird. In aktiven Gewebereichen kommt es zu einer starken Anreicherung resp. detektierbaren fotoelektrischen Strahlung (Peremans, 2004). Das Szintigramm bleibt entsprechend bei Vorliegen einer aPA durch die fehlende Vitalität der Knochenfragmente im Frakturgebiet stumm (Peremans, 2004). Die eine aPA kennzeichnende gestörte Vaskularisation sowie die inadäquate oder fehlende Kallusbildung wird sicher erfasst. Zur frühen und gesicherten Darstellung einer ausbleibenden Kallusbildung kann ebenso die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) angewendet werden. Fibröse Verbindungen zwischen den Fragmentenden und Granulationsgewebe stellen sich hierbei signalarm dar (Kuner et al., 1996; Rüter et al., 1999).

2.3.4 Therapie atropher Pseudarthrose

Die Therapie einer aPA sollte sich in erster Linie nach ätiologischen Gesichtspunkten richten (Schweiberer et al., 1999), zudem sind die bestehende Motilität und vorliegende Infektionen bei der Wahl der Behandlungsmethode mit einzubeziehen (Rompe et al., 2004). Liegt eine stabile, aseptische aPA vor, steht die Stimulation/Induktion der Knochenheilung im Vordergrund der therapeutischen Verfahren. Diese Situation ist jedoch selten. Im Falle einer instabilen aPA kann eine Heilung nur durch ausreichende Stabilisation der Fragmentenden, in Verbindung mit einer biologischen Stimulation der Knochenregeneration erfolgen (Kasperczyk et al., 1996; Schweiberer et al., 1999). Das Ziel der Therapie besteht in der infektfreien Konsolidierung, unter Berücksichtigung der umgebenden Weichteilschäden (Kuner et al., 1996; Bosch et al., 1999; Rompe et al., 2004).

Die Säulen der klassischen atrophen Pseudarthrose-Therapie bestehen heute in erster Linie aus der Sanierung des Frakturgebietes, gegebenenfalls auch einer bestehenden Infektion, dem Anfrischen der Hauptfragmente soweit, dass eine Durchblutung wieder gegeben ist, einer stabilen Fixation der Frakturenenden gegeneinander, sowie der Transplantation autologer oder allogener Spongiosa in den Frakturspalt (Kasperczyk et al., 1996; Bosch et al., 1999).

Zur Stabilisation der Fragmentenden ist die Osteosynthese nach wie vor Mittel der Wahl (Frost, 1989b; Kuner et al., 1996; Kasperczyk et al., 1996; Bosch et al., 1999). In Frage kommen in Abhängigkeit von Art, Form und Lokalisation der Fraktur resp. aPA, der Einsatz von Platten-, Marknagel-, oder Ring-Osteosynthesen, sowie die Versorgung mittels unilateralem Fixateur externe (Stürmer, 1996; Rüter et al., 1999). Dass die Blutversorgung medullär bei Marknagel-Osteosynthese sowie periostal bei Platten-Osteosynthese und im Bereich der umgebenden Weichteilgewebe durch die intraoperative Manipulation strapaziert und evtl. leicht geschädigt werden, muss hier in Kauf genommen werden. Ist die Pseudarthrose das Resultat einer fehlgeschlagenen Osteosynthese mit ausgedehnten nekrotischen resp. atrophischen Bereichen, ist die neuerliche stabile Befestigung einer Platte oft problematisch (Nunamaker et al., 1985; Schiebler, 1986). In der Regel verzichtet die Osteosynthese heute zu Gunsten der Erhaltung und Schonung umliegender Strukturen auf ausgedehnte Manipulationen des Frakturgebietes. Sie strebt statt einer detaillierten, korrekten Lage der Frakturrenden zueinander allein die Wiederherstellung der anatomischen Knochenachse in Verbindung mit einer ausreichenden Stabilisierung des Frakturgebietes an («biologische Osteosynthese») (Kuner et al., 1996).

Die Akzeptanz der Patienten gegenüber einer Intramedullar- oder Plattenosteosynthese ist aus ästhetischen und alltags-praktikablen Motiven oftmals höher als gegenüber einer Stabilisierung mittels Fixateur externe (FE). Jedoch kann durch Einsatz eines externen Fixations-Systems bereits mit einem geringen operativen Aufwand eine rigide Fixation der Fragmentenden erreicht werden. Auf Grund der Nähe der kontralateralen Gliedmaße werden Frakturen des Oberschenkelknochens dabei vornehmlich mittels unilateralem FE versorgt. Der Vorteil dieser Art der Frakturstabilisierung besteht im Falle einer Pseudarthrose in erster Linie darin, dass das Risiko einer Beeinträchtigung der Vaskularisation des Knochengewebes geringer ist. Ebenso sinkt die Gefahr einer zusätzlichen Beeinflussung des bereits gestörten Heilungsgeschehens durch direkten Kontakt der Fremd-Implantate zu Gewebe, Heilungsmitteln und gegebenenfalls eingesetzter Therapeutika. Der Abstand des Stabilisations-Systems vom Gewebe ermöglicht zudem eine(n) unkomplizierte(n) Zugang/Behandlung des Areal bei auftretenden Komplikationen. Biomechanisch besteht der Vorteil einer rigiden externen Stabilisierung in einer so möglichen Verminderung/Neutralisation einwirkender Rotationskräfte sowie axialer Kompressionskräfte. Die bei Belastung einwirkende und vom Boden rückwirkende Kraft wird mehrheitlich auf das FE-System

verteilt. Eine zusätzliche mechano-physikalische Belastung des bereits geschädigten Gewebes entfällt (Bradley et al., 1980). In der sensiblen Situation einer Pseudarthrose ist überdies durch die schrittweise Erhöhung des Abstandes zwischen Verbindungsbalken und Knochen eine vorsichtige, dosierte Mehr-Belastung möglich. Die Entnahme des FE kann in der Regel ohne Narkose unter entsprechender Schmerzmedikation vorgenommen werden, so dass ein erneuter operativer Eingriff und die damit verbundenen Risiken entfallen. Die Gefahren des FE liegen im Auftreten von Weichteil- und/oder tiefen Knocheninfektionen mit nachfolgend auftretenden Lysen und Nekrosen im betroffenen Gewebe durch eine Wechselwirkung mit den eingesetzten Pins (»Pintraktinfektion«). Eine sorgfältige Wund- und Pinpflege ist daher unerlässlich. Ebenso besteht die Gefahr eines Stabilitätsverlustes durch Lockerung der eingesetzten Drähte und Dislokation der Knochenfragmente (Mark et al. 2003). Eine verbesserte Stabilität kann durch die Erhöhung der Anzahl sowie des Durchmessers der Bohrdrähte erreicht werden (Bradley et al., 1980).

Zu den Methoden der biologischen Stimulation, die heute noch am häufigsten empfohlenen und durchgeführt werden, gehören autologe (Spender = Empfänger) sowie auch allogene (Spender \neq Empfänger) Spongiosaplastiken (Schweiberer et al., 1999; Rüter et al., 1999). Sie werden aufgrund ihrer intakten biologischen resp. osteoinduktiven Potenz in der Therapie ausbleibender Knochenheilung eingesetzt (Ma et al., 2004). Das Spongiosatransplantat dient dabei, neben der Stimulation der Osteoregeneration, als Gerüst, an welchem sich die an der physiologischen Knochenheilung beteiligten Zellen und entstehenden Strukturen interfragmentär orientieren und organisieren (Babhulka et al., 2005). Der osteoinduktive Effekt ergibt sich v.a. durch das Anregen der Differenzierung osteogener Vorläuferzellen. Das Transplantat liefert hierzu wichtige Induktoren und Modulatoren (Wachstumsfaktoren) (Brighton, 1984; Ma et al., 2004). Die Knochentransplantate, welche vornehmlich aus dem Beckenkamm entnommen werden, bergen jedoch erhebliche Risiken. Schon die Gewinnung des Transplantates kann für den Patienten/Spender schmerzhafte Folgen haben. Eine Infektion der umgebenden Weichteile, sowie seltener auch unmittelbar am Knochen selbst, ausgeprägte Hämatome und/oder eine Schädigung der Innervation des Entnahmegebietes können postoperativ zu beträchtlichen Komplikationen führen (Jäger et al., 2005). Rompe et al. (2004) geben die Häufigkeit, durch Gewinnung des Transplantates eintretender, pathologischer Gewebeveränderungen, die sog. »donor site morbidity«, mit 6 - 20 % an. Die Rekonvaleszenz der Betroffenen verlängert

sich in Folge oftmals erheblich. Überdies ist die Entnahme des Gewebes nur in begrenzter Menge möglich (Jäger et al., 2005). In der Literatur wird hier die Kombination mit einem allogenen Transplantat empfohlen (Rüter et al., 1999). Das osteoinduktive Potenzial des körperfremden Gewebes ist jedoch zumeist gegenüber dem autologen Transplantat geringer. Trotz etwaiger Akzeptanz des Empfängergewebes treten die gewünschten osteogenetischen Effekte oftmals nur in geringem Maße oder gar nicht ein (Jäger et al., 2005). Zudem besteht bei Einsatz allogenen Gewebes neben der Gefahr einer immunologischen Abstoßungsreaktion ein erhöhtes Risiko der Übertragung lebensbedrohlicher Krankheiten (z.B. Hepatitis A/B) (Ma et al., 2004). Rüter et al. (1999) empfehlen optional, ebenso wie zur Behandlung von Defekten mit einer Weite über 2 - 2,5 cm, den alternativen Einsatz von z.B. Marknägeln zum Segmenttransport (nach Ilizarov). Diese Methode beruht auf dem Prinzip eines stützenden und leitenden Gerüsts, entlang dessen sich das Knochengewebe neu formiert. Es fehlt jedoch hier der osteogene Stimulus von Seiten des Transplantates. Die Progression der Knochenheilung verläuft nur langsam, so dass diese Art der Therapie sehr langwierig und oftmals mit wiederholten Operationen verbunden ist (Yoo et al., 1998). Alternativ zu Spongiosaplastik und Segmenttransport kommen heute in der Therapie atropher Pseudarthrosen ebenso matrixbasierende Verfahren mit synthetischen Ersatzmaterialien (z.B. Titan, porösen Keramiken (Hydroxylapatit oder Trikalziumphosphat)) zum Einsatz. Der Nachteil liegt hier in einem fehlenden osteoinduktiven Potenzial dieser Materialien (siehe 2.4.3) (Kadiyala et al., 1997, Cornell et al., 1998). Über die genannten Ansätze hinaus wird ebenso demineralisierte Knochenmatrix zur Unterstützung der Therapie eingesetzt. Die enthaltenen mitogenen, osteoinduktiven Wachstumsfaktoren (z.B. BMPs) sollen hier die angestrebte biologische Stimulation der Knochenheilung ermöglichen. Ein Behandlungserfolg stellt sich hierbei jedoch nicht immer ein (Bruder et al., 1998b).

Auf Grund der genannten Nachteile der zum Einsatz kommenden Verfahren, war in den vergangenen Jahren die Erforschung effizienter und minimal invasiver Therapiemöglichkeiten Ziel der osteoregenerativen Wissenschaft.

Zu den bis heute erforschten und eingesetzten Alternativ-Therapien zählen die elektrische Knochenzell-/Gewebestimulation, die mechanische Gewebestimulation und die humorale Zell-/Gewebestimulation (Rüter et al., 1999; Bosch et al., 1999). Basis der Elektrostimulation (z.B. Magnetfeldtherapie, direkte Wechselstrombehandlung) ist die Erzeugung eines elektrischen Potentials im oder am Knochen zur Regulation von Ab-, Um- und Aufbauprozessen. Der Erfolg der alleinigen Behandlung ist jedoch bis heute fraglich. Kuner und Kollegen (1996) halten eine elektrische Stimulation der Knochenheilung für unwahrscheinlich, da die Widerstände innerhalb einer avitalen Pseudarthrose ihrer Meinung nach zu groß sind, als das ein Effekt erzielt werden könnte. Auch die Anwendung extrakorporaler, hochenergetischer Stoßwellen-Therapie (ESWT) im Rahmen mechanischer Zell-/Gewebestimulation zur alleinigen Behandlung atropher Pseudarthrosen (Frost, 1989b; Schleberger et al., 1992) bleibt zweifelhaft. Das Prinzip der ESWT besteht im Einsatz hochenergetischer Schallwellen (20 - 150 mJ), welche in Form von Einzelimpulsen (1000 - 6000) fokussiert auf den Frakturbereich abgegeben werden. Es beruht auf einer mechanischen Gewebestimulation durch Provokation von Mikrofissuren und lokaler Dekortikation (Rüter et al., 1999). Bei der ebenso mechanisch wirkenden stimulierenden, gepulsten Ultraschalltherapie erfolgt die hochfrequente Applikation einer Druckwelle (3 mg/cm²) direkt in den Frakturspalt (Trägerfrequenz: 1,5 MHz, Pulsfrequenz: 1 KHz) (Rüter et al., 1999). Der erfolgreiche Einsatz dieser Therapie basiert wahrscheinlich auf einer Stimulation der enchondralen Ossifikation durch die Ultraschallwellen, wurde jedoch bisher nicht an Patienten mit avitaler Pseudarthrose durchgeführt und ist daher in diesem Zusammenhang weiterhin fraglich.

Im Rahmen der alternativen, minimal invasiven Pseudarthrose-Therapien ist letztlich die humorale Zell-/Gewebestimulation zu nennen. Diese Art der Therapie kommt lokal oder systemisch zur Anwendung. Die lokale humorale Therapie besteht in der Applikation von autologem Knochenmark in das Gebiet des Pseudarthrosespalts (Yoshikawa et al., 1996; Breitbart et al., 1998). Bei der systemischen humoralen Therapie kommen Wachstumsfaktoren (z.B. BMP, weitere Mitglieder der TGF- β -Familie, Faktor XIII) zum Einsatz. Die Ergebnisse weisen auf eine verbesserte qualitative und quantitative Knochenregeneration hin (Liebermann et al., 2002). Die mit der humoralen Therapie in Verbindung stehenden, zellbasierenden Therapieansätze werden im Rahmen des Einsatzes mesenchymaler Stammzellen in Kapitel 2.4.3 eingehend erläutert.

2.4 Mesenchymale Stammstellen

2.4.1 Zellursprung

Als Stammzellen werden multipotente Zellen mit ausgeprägter Proliferationskapazität und hohem heterogenen Differenzierungspotential bezeichnet, welche in der Lage sind, sich selbst zu erneuern (Bianchi et al., 2001; Baksh et al., 2004). Die Zellen haben ihren Ursprung während der embryonalen Entwicklung im Mesoderm (Bruder et al., 1998a). Entsprechend ihrer maßgeblichen Fähigkeit und Beteiligung an der Bildung, Regeneration und Erhaltung mesenchymalen Gewebes, wie z.B. Knochen, Knorpel, Bänder/Sehnen, Bindegewebe etc., werden sie als mesenchymale Stammzellen (MSCs) bezeichnet (Jones et al., 2007). Das Reservoir adulter MSCs befindet sich im Knochenmark sowie in der Kambiumschicht des Periosts (Yoo et al., 1998). Darüber hinaus ist es gelungen, MSCs aus dem Fett- (Liu et al., 2007), Binde- und skeletalem Muskelgewebe und zahlreichen weiteren Geweben zu isolieren (Bruder et al., 1998a). Im Knochenmark stellen MSCs eine Fraktion undifferenzierter Stromazellen, abseits des medullären hämatopoetischen Systems dar. Sie werden hier auch als »bone marrow stromal cells« (BMSCs) bezeichnet (Jaquiéry et al., 2005). Schon bei ihrer Entdeckung in den 70er Jahren war zu erkennen, dass MSCs in vitro Kolonie-Einheiten bilden, welche eine fibroblastenähnliche, fusiforme Morphologie aufweisen. Daher werden sie auch als »Colony Forming Unit-Fibroblasts« (CFU-Fs) bezeichnet (Friedenstein et al., 1970). Das Auftreten von CFU-Fs wird auch heute noch zur morphologischen Charakterisierung und dem Nachweis multipotenter Stammzellen herangezogen (siehe 2.4.2) (Pittenger et al., 1999; Gao et al., 2007). Das Potenzial der MSCs im Bereich der medizinisch-therapeutischen Wissenschaft liegt in der Heterogenität der aus ihnen terminal hervorgehenden mesenchymalen Gewebe/Zellen und in der gezielt möglichen Kultivierung und Differenzierung in vitro (Bianchi et al., 2001; Arinzeh, 2005). Die Fähigkeit der MSCs, sich in verschiedene Zell-/Gewebetypen zu differenzieren (Multipotenz), bleibt dabei erhalten (Caplan, 1991; Pittenger et al., 1999).

2.4.2 Differenzierung und Kultivierung

Ob die Regeneration mesenchymaler Gewebe allein von einer zentralen Stammzelle ausgeht, bleibt Gegenstand der Diskussion (Caplan, 1991; Bruder et al., 1998b). Der Anteil mesenchymaler Stammzellen des Knochenmarks liegt durchschnittlich bei nur 0,01 % der Gesamtzellpopulation (Jaquiéry et al., 2005). Die Proliferations- und

Differenzierungs-Kapazität der MSCs verhält sich überdies deutlich antiproportional zum Alter des Individuums (D'Ippolito et al., 1999; Bianchi et al., 2001; Zhou et al., 2008). Entsprechend erklärt sich das verminderte Regenerations-Potenzial mesenchymaler Gewebe bei älteren Menschen (Caplan, 1991, Bianchi et al., 2001). Die Proliferation- und Differenzierungsrate ist ebenso abhängig von der betreffenden Spezies sowie dem Individuum selbst und daher kaum einheitlich zu definieren (Sidappa et al., 2007; Chamberlain et al., 2007).

Die Differenzierung multipotenter MSCs aus dem Knochenmark erfolgt nach heutigen Erkenntnissen durch asymmetrische Teilung in eine ebenso multipotente und eine bi- oder tripotente Tochterzelle. So ist die Selbsterneuerung der Zelle mit identischem Phänotyp und darüber die Erhaltung des multipotenten MSC-Pools gesichert. Im Laufe der symmetrischen Teilung der bi- und tripotenten Tochterzellen vermindert sich deren heterogenes Differenzierungspotential, es entwickeln sich unipotente Vorläuferzellen, sog. »Progenitorzellen« (Muraglia et al., 2000; Baksh et al., 2004; Zhou et al., 2008). Diese differenzieren im Folgenden streng in Anlehnung an eine determinierte Differenzierungskaskade, je nach Potenz, zu Chondrozyten und/oder Osteozyten und/oder Adipozyten (Caplan et al., 1991; Yoo et al., 1998; Pittenger et al., 1999). Die osteogen vordifferenzierten Zellen, sog. Osteoprogenitorzellen (OPCs), werden im weiteren Verlauf zu Prä-Osteoblasten, reifen (»Secretory-«) Osteoblasten und letztlich zu Osteozyten differenziert (Caplan, 1991). Entsprechend verläuft die Entwicklung von Chondrozyten und Adipozyten entlang einer mehrstufigen Differenzierungskaskade (Sidappa et al., 2007). Über die genannten Zell-Linien hinaus ist eine Differenzierung in zahlreiche weitere Zelltypen des Organismus (z.B. Tenozyten, skeletale Myozyten, Kardiomyozyten) beschrieben (Pittenger et al., 1998; Bianchi et al., 2001; Liu et al., 2007). Die Proliferation und Differenzierung der MSCs ist dabei weitgehend unabhängig von deren Ursprungsgebiet (Bianchi et al., 2001). Die Differenzierung unterliegt stattdessen einer empfindlichen lokalen Regulation, ausgehend von der jeweiligen Mikroumwelt und vorhandenen Induktionsmolekülen (Pittenger et al., 1999; Sidappa et al., 2007). So tritt in Gebieten mit verminderter Vaskularisation und hoher mechanischer Krafteinwirkung bei großer Zelldichte eine mehrheitlich chondrogene Differenzierung auf. Bei ausreichender Vaskularisation, mechanisch ruhiger Umgebung sowie geringeren Zelldichten zeigt sich hingegen eine überwiegend osteogene Entwicklung (Caplan, 1991; Bruder et al., 1998b, Aubin, 1999; Basso et al., 2005). Über die genaue mole-

kulare Regulation der Differenzierung ist nur wenig bekannt (Baksh et al., 2004; Kolf et al., 2007). Zur Kenntnis steht, dass zahlreiche Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β , FGF-2), Zytokine, intrazelluläre Transkriptionsfaktoren (z.B. Cbfa 1/Runx 2) und extrazelluläre Matrixmoleküle (z.B. Kollagene, Proteoglykane) die klassische dreidimensionale Differenzierung der MSCs beeinflussen, regulieren und steuern (Caplan, 1991; Yoo et al., 1998; Pittenger et al., 1999; Muraglia et al., 2000; Liu et al., 2007; Sidappa et al., 2007). In vivo stimuliert der humorale und/oder zelluläre Knochenabbau in Verbindung mit dem lokalen Gewebeschaden und so freigesetzten Wachstumsfaktoren und Zytokinen die Differenzierung multipotenter MSCs zu Osteoblasten und/oder Chondrozyten (Liu et al., 2007). Die Differenzierung der MSCs ist wichtiger Bestandteil der fortwährenden Erneuerung des Knochenskeletts. Innerhalb eines Zeitraums von durchschnittlich zwei bis drei Wochen ist es dabei möglich, auch in vitro aus dem Knochenmark fraktionierte MSCs über die intermediäre Stufe der OPCs zu reifen Osteoblasten zu differenzieren (Liu et al., 2007).

Die in vitro Kultivierung mesenchymaler Stammzellen aus dem Knochenmark (BMSCs) erfolgt zumeist initial in Form einer Primärkultur in Kunststoffkulturflaschen (Jones et al., 2007). Die Basis eingesetzter Kulturmedien ist eine Elektrolyt-Lösung zum Erhalt der Osmolarität (Liu et al., 2007). Häufig genutzt wird hier α -Minimal Essential Medium (α -MEM) unter Zusatz von Glukose und L-Glutamin-Pyruvat (D'Ippolito et al., 1999; Chamberlain et al., 2007). Um darüber hinaus eine ausreichende Nährstoffversorgung zu gewährleisten, wird Serum zugesetzt. Hierzu werden in der experimentellen Medizin neben fetalem Kälberserum (FCS) ebenso Seren von Schweinen und Pferden verwendet (Bianchi et al., 2001). Nach Inkubation der BMSCs in Kunststoffkulturflaschen werden sie in Vorbereitung auf die Vermehrung, aus dem Knochenmarks-Aspirat fraktioniert. Da die Zellen an Kunststoffoberflächen adhäsieren (Beyer Nardi et al., 2006), können sie durch Auswaschen der Primärkultur mit gepufferten Salzlösungen (z.B. »phosphatase buffered saline« (PBS)) nahezu vollständig von den Zellen des hämatopoetischen Systems isoliert werden (Jones et al., 2007). Zur Prädifferenzierung der MSCs werden dem Kulturmedium entsprechend dem gewünschten Zelltypus entweder chondrogene, adipogene oder osteogene Kulturmedien zugesetzt. Dem initialen Kulturmedium werden hierzu spezielle Additiva zugegeben, welche die Differenzierung der Zellen gewährleisten sollen. Die Entwicklung von MSCs entlang der osteogenen Zell-Linie kann durch den Zusatz eines osteogenen Additivums, bestehend aus Ascorbinsäure, β -Glycerolphosphat und

dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason, erfolgen (Jaquiéry et al., 2005; Liu et al., 2007). Innerhalb eines Zeitraums von durchschnittlich zwei bis drei Wochen differenzieren aus dem Knochenmark fraktionierte MSCs so zu reifen Osteoblasten (Caplan, 1991; Pittenger et al., 1999; Chamberlain et al. 2007). Um einer möglicherweise bei der Entnahme erfolgten bakteriellen Kontamination des Zellmaterials entgegen zu wirken, werden den Medien darüber hinaus präventiv Antibiotika, zumeist Penicillin in Kombination mit Streptomycin, zugesetzt (Liu et al., 2007). Da die Proliferations-Aktivität der kultivierten Zellen durch Kontakt-Inhibition mit steigender Zelldichte abnimmt, werden sie bei Erreichen eines konfluenten Zellteppichs geteilt (Passagieren). Die Trennung des adhärenen Monolayers erfolgt dabei enzymatisch (z.B. durch Trypsin) (Muraglia et al, 2000).

Charakterisieren lassen sich die einzelnen Entwicklungsstadien der MSCs resp. Progenitorzellen in vitro morphologisch-phänotypisch sowie biochemisch und auf Basis der Expression spezifischer, membran-assoziiertes Oberflächen-Proteine. Der Phänotyp der mesenchymalen Stammzellen ändert sich, ausgehen von dem bereits zuvor erwähnten, spindelförmigen Erscheinungsbild der CFU-Fs. Dabei ist morphologisch bereits die Bildung von fibroblastenähnlichen Zell-»Knoten« (CFU-Fs) hinweisend auf die Proliferations-Aktivität der MSCs (Nodulierung) in vitro (D'Ippolito et al. 1999). Die Zellen verändern ihr Aussehen im Verlauf der Differenzierung charakteristisch in Abhängigkeit von der jeweiligen Zielzelle (Paniushin et al, 2006; Gao et al., 2007). Osteoblasten erscheinen hier kubisch, Chondroblasten rund-oval, Adipozyten weisen hingegen eher eine einheitlich runde Morphologie auf (Liebich, 1999). Biochemisch gelingt der Nachweis einer gesteigerten alkalischen Phosphatase-Aktivität vor allem in der frühen Phase der osteogenen Differenzierungs-Kaskade (Bruder et al., 1998b; Pittenger et al., 1999; D'Ippolito et al., 1999). Molekular können die einzelnen Stufen der Differenzierungs-Linien anhand veränderter Protein-Biosynthese mittels immunhistologischer Färbungen und/oder Nachweis des genetischen messenger Ribonucleinsäure- (mRNA-) Musters via Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) identifiziert werden (Caplan, 1991; Bruder et al., 1998b; Pittenger et al., 1999; Gao et al., 2007). Oftmals erscheinen die detektierten Proteinstrukturen (z.B. Osteopontin, Osteokalzin) jedoch bei verschiedenen Zell-Linien gleichermaßen (Gerstenfeld et al., 1996; Lian et al., 2003) oder es treten in Zusammenhang mit immunhistologischen Methoden Kreuzreaktionen in Erscheinung (Jones et al., 2002). Eine exakte molekulare

Charakterisierung stellt daher bis heute eine wissenschaftliche Herausforderung dar. (Choi et al., 2004; Chamberlain et al., 2007; Kolf et al., 2007).

Das auch bei in vitro Kultivierung erhaltene Proliferations- und heterogene Differenzierungspotenzial mesenchymaler Stammzellen setzte die Zellen in den vergangenen drei Jahrzehnten in den Fokus der Erforschung und Entwicklung von Therapiemöglichkeiten auf nahezu allen Gebieten der medizinischen Wissenschaft, so auch im Bereich der Osteoregeneration.

2.4.3 Einsatz in osteoregenerativer Wissenschaft und Therapie

Zellbasierende, minimal invasive Verfahren stellen eine wertvolle Alternative zum derzeitigen »Goldstandard« der Therapie von Knochen-Defekten dar (Ma et al., 2004). In der Vergangenheit wurden daher bereits zahlreiche Studien zum erfolgreichen lokalen Einsatz mesenchymaler Stammzellen oder aus ihnen hervorgehenden Osteoprogenitorzellen (OPCs) durchgeführt. Gegenstand der Untersuchungen war dabei v.a. die Therapiemöglichkeit von Knochen-Defekten kritischer Größe (»critical size defects«), deren physiologische Heilung auf Grund der Weite der Zusammenhangstrennung mit großer Wahrscheinlichkeit zeitlebens nicht eintreten wird (Runkel et al., 2000).

Der erste erfolgreiche Einsatz mesenchymaler Stammzellen in Form einer lokalen, perkutanen Applikation autologen Knochenmarks erfolgte in den 80er Jahren. Connolly et al. (1986, 1989, 1998) therapierten zahlreiche Tibia-Defekte mit eingeschränktem Heilungsfortschritt durch lokale autologe Knochenmarks-Transplantation. Der Erfolg wurde maßgeblich auf die im Knochenmarks-Aspirat enthaltenen MSCs und deren osteoinduktives Potenzial zurückgeführt. Kadiyala et al. (1997), Bruder et al. (1998b) sowie auch Bianchi et al. (2001) gelang basierend auf diesem Gedanken die erfolgreiche Behandlung von Knochendefekten kritischer Größe mittels Transplantation von aus autologem Knochenmark fraktionierten MSCs auf geeigneten Trägermaterialien (»scaffolds«) aus porösen Keramiken (Hydroxylapatit/Trikalziumphosphat). Nach der Entdeckung der molekular-osteoinduktiven BMPs durch Urist (1965) sowie zahlreichen weiteren Wachstumsfaktoren der Osteogenese (TGF- β -Superfamilie) stellte sich die Frage nach einer möglichen Behandlung von Knochen-Defekten mit Heilungskomplikation durch mit MSCs oder autologem Knochenmark beladene Scaffolds in Verbindung mit z.B. BMPs oder TGF- β -1 (Kadiyala et al., 1997; Lind, 1998; Bruder et al., 1998b). Der solitäre Einsatz dieser

Wachstumsfaktoren zur Osteoregeneration wurde im Hinblick auf die Therapie von biologisch reaktionsfähigen Pseudarthrosen mit Erfolg untersucht (Liebermann et al., 1999; Betz et al., 2006), ist jedoch begrenzt durch die Anzahl vorhandener vitaler MSCs in vivo, welche die Induktions-Signale aufnehmen und verarbeiten können (Yoo et al., 1998; Bruder et al., 1998b). Eine Studie zur Behandlung eines critical size defects am Ratten-Femur konnte überdies zeigen, dass mit MSCs beladene Scaffolds einen deutlich besseren osteoregenerativen Effekt erbringen, als nur mit Knochenmark oder BMP beladene Trägermaterialien (Kadiyala et al., 1997). Im Laufe der MSC-Studien, wenngleich erfolgreich, zeigte sich dennoch ebenso, dass nur etwa 60 % der in vitro kultivierten Zellen in vivo die Regeneration von Knochengewebe beginnen und nur ca. 40 % letztlich dabei erfolgreich sind (Jaquiéry et al., 2005). Daher wurden auch deren bereits osteogen differenzierten Nachfolger, die OPCs, im Hinblick auf eine mögliche Verbesserung der Knochenheilung untersucht. OPCs waren in Kombination mit Trägermaterialien (Schliephake et al., 2001; Takamine et al., 2002; Srouji et al. 2005) sowie auch im alleinigen Einsatz (Tsubota et al., 1999; Shao et al., 2007) Gegenstand diverser Therapiestudien zur Osteoregeneration.

Die These, dass vitale Knochendefekte kritischer Größe und/oder Segmentalfrakturen durch autologe in vitro prädifferentzierte OPCs auch unter Verzicht auf Wachstumsfaktoren und Trägermaterialien erfolgreich behandeln werden können, ließ sich in den vergangenen Jahren wissenschaftlich unter Beweis stellen. Shao et al. (2007) erreichten durch die lokale Applikation von OPCs in das Kallusgebiet eine verbesserte und vermehrte Knochenentwicklung bei der Behandlung von Distraktions-Frakturen. Ferner erfolgten Untersuchungen zum Einfluss von lokal applizierten OPCs auf die Knochenheilung in Kombination mit Kollagen-Gel, nach durchgeführter Tibia-/Femur-Osteotomie. Diese, wie auch weitere vorgenommene Studien (Takamine et al., 2002; Srouji et al., 2005) zeigten eine quantitativ und qualitativ verbesserte Knochenformation und eine Verkürzung der Konsolidierungsphase (Qi et al., 2006; Tsubota et al. 1999) durch den Einsatz von OPCs. Dennoch bestand bei den bis heute durchgeführten Untersuchungen ausnahmslos ein biologisch reaktionsfähiger Gewebestatus des Knochens. Weder Distraktionsfrakturen, noch segmentale Defekte weisen in der frühen Phase avitale Fragmentenden auf (Yoo et al., 1998). Studien zum Einfluss autologer OPCs bei initial beeinträchtigter biologischer Aktivität des Knochengewebes wurden bis heute noch nicht durchgeführt.

2.5 Hypothese der Studie

Die Anzucht synthetischen Knochengewebes *in vitro* zur Behandlung von traumatisiertem, geschädigtem Knochen mit und ohne Segment-Verlust stellt einen bedeutenden Zweig der medizinischen Wissenschaft der vergangenen 30 Jahre dar. Die zur Anwendung kommenden klassischen Therapiemöglichkeiten, in Form von z.B. Osteosynthese, Spongiosa-Transplantation und Segment-Transport, sind oft mit wiederholten Eingriffen und zahlreichen physiotherapeutischen Maßnahmen verbunden (Ma et al., 2004). Die lange und mit teilweise erheblichen physischen und psychischen Belastungen des Patienten verbundene Rekonvaleszenz ist, zusammen mit den entstehenden hohen wirtschaftlichen Kosten, unermüdliche Motivation und Anlass fortschreitender medizinischer Forschung (Rose et al., 2002). Die im vorangegangenen Kapitel erwähnten Aspekte verdeutlichen, dass die wissenschaftlichen Bemühungen im Bereich der osteoregenerativen Knochenmedizin zahlreich und auch erfolgreich sind. Dennoch standen bis zum jetzigen Zeitpunkt überwiegend Untersuchungen zur Behandlung von weiten und daher, in Hinblick auf die physiologische klinische Heilung, kritischen Knochendefekten im Fokus der Entwicklung zellbasierender Therapie-Methoden. Eine Analyse des Einflusses autologer OPCs auf die Heilung eines Knochens mit eingeschränktem biologischen Potenzial wurde in der Vergangenheit nicht durchgeführt und sollte in dieser Studie untersucht werden. Aufbauend auf den oben dargestellten, bereits gesammelten Erfahrungen und Kenntnissen, konnte hierbei ein positives Ergebnis vermutet werden. Der vorliegenden Untersuchung lag, auf Grundlage dieses Gedankens, folgende zu beweisende Hypothese zugrunde:

*Eine Initiierung der Knochenheilung kann in einer Situation, die zu einer atrophen Pseudarthrose führen würde, durch die Transplantation von *in vitro* aus autologen mesenchymalen Stammzellen prädifferentiierten Osteoprogenitorzellen erfolgen.*

3 Material und Methoden

3.1 Auswahl und Haltung der Tiere

Die Haltung der am Versuch beteiligten Tiere erfolgte während des gesamten Zeitraumes in der tierexperimentellen Einrichtung der Charité Berlin, Campus Virchow-Klinikum. Das Versuchsvorhaben wurde genehmigt durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin (Genehmigungsnummer: G 0036/04).

Bei den eingesetzten Versuchstieren handelte es sich um 32 adulte männliche Sprague DawleyTM-Ratten (Fa. Harlan Winkelmann, Borcheln/Deutschland). Nach Anlieferung wurde der Gesundheitszustand der Tiere überprüft sowie eine Gewichtskontrolle durchgeführt. Um in die Studie aufgenommen zu werden, mussten die Tiere ein Körpergewicht zwischen 410 und 460 g aufweisen.

Die Haltung erfolgte in Gruppen zu je 5 Tieren in Makrolon-Versuchstierkäfigen gemäß des Eurostandards Typ IV (Fa. E. Becker & Co GmbH, Castrop-Rauxel/ Deutschland) mit einer Grundfläche von 1800 cm². Nach erfolgter Osteotomie wurden die Tiere einzeln in Makrolon-Versuchstierkäfigen, Eurostandard Typ III, des oben genannten Herstellers, mit einer Grundfläche von 810 cm² gehalten. Zwischen den Tieren bestand Sichtkontakt. Bei der verwendeten Einstreu handelte es es sich um Holzspäne (Lignocel®, Fa. J. Rettenmaier&Söhne GmbH+Co KG, Rosenberg/Deutschland), welche täglich gereinigt und einmal wöchentlich ersetzt wurden. Den Tieren wurde täglich ein diätetisches Alleinfuttermittel in Form von Pellets (Ssniff Ratten/Mäuse®, Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest/ Deutschland) sowie Trinkwasser ad libitum angeboten. Das Raumklima des Versuchstierstalles regulierte eine Klima- und Belüftungsanlage. Die Raumtemperatur lag konstant bei 18-20 °C, die relative Luftfeuchtigkeit bei 65 %. Das Licht in den Räumlichkeiten wurde entsprechend eines natürlichen, 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus geregelt.

3.2 Aufbau der Studie

3.2.1 Versuchsplan

Zu Beginn der Studie wurden die 32 Ratten randomisiert in zwei Gruppen (I. Versuchsgruppe, II. Kontrollgruppe) bestehend aus jeweils 16 Tieren eingeteilt. Die Versuchs- sowie auch die Kontrollgruppe wurden, entsprechend der späteren Probenaufbereitung (siehe 3.6.2. *Entwässerung und Einbettung*), erneut zufällig in jeweils zwei Subgruppen à acht Tiere aufgeteilt. Die Tiergruppen wurden wie folgt benannt:

I. Versuchsgruppe: Osteoprogenitorzellen-Gruppe (OPC-Gruppe)

Subgruppe I: Einbettung der entnommenen Femora in Polymethylmethacrylat (PMMA), (siehe Kapitel 3.5.2 *Probenentnahme* und 3.6.2 *Entwässerung und Einbettung*).

Subgruppe II: Einbettung der entnommenen, entkalkten Femora in Paraffin (siehe Kapitel 3.5.2 und 3.6.2).

II. Kontrollgruppe: Medium-Gruppe

Subgruppe I: Einbettung der entnommenen Femora in PMMA.

Subgruppe II: Einbettung der entnommenen, entkalkten Femora in Paraffin.

Den Tieren der Versuchs- und Kontrollgruppe wurde aus der rechten Tibia Knochenmark entnommen. Aus dem Aspirat der OPC-Gruppe wurden mesenchymale Stammzellen (MSCs) *in vitro* expandiert und in osteogenem Kulturmedium angezüchtet. Nach ausreichender Proliferation und mikroskopisch kontrollierter, osteogener Andifferenzierung der Zellen erfolgte im Anschluss die Induktion einer atrophen Pseudarthrose bei den Tieren beider Gruppen. Hierzu wurde die linke Femur-Diaphyse senkrecht zur Knochenachse so osteotomiert, dass zwischen den Segmenten ein Spalt entstand. Das Knochenmark wurde aus beiden Fragmenten entfernt, sowie das Periost beidseitig, unmittelbar angrenzend an den osteotomierten Bereich thermisch zerstört. Die Stabilisierung des osteotomierten Knochens erfolgte durch das Anbringen eines monolateralen Fixateur externe.

Im Anschluss an die Osteotomie wurde am zweiten Tag post operationem den Tieren der OPC-Gruppe eine Suspension, bestehend aus autologen, osteogen prädiffenzierten mesenchymalen Progenitorzellen und Expansions-Kulturmedium mittels perkutaner Injektion in den Osteotomiespalt transplantiert. Die Tieren der Medium-Gruppe erhielten allein ein äquivalentes Volumen des zur Anzucht genutzten Kulturmediums in den Knochenspalt. Nach zweiwöchiger Standzeit wurden alle Tiere euthanasiert und das osteotomierte Femur mit implantiertem Fixateur externe und umliegendem Weichteilmantel entnommen.

Die Auswertung der Proben erfolgte unter Anwendung histologischer, histomorphometrischer und immunhistologischer Techniken lichtmikroskopisch sowie mit Hilfe einer computergestützten Bildanalyse. Röntgenaufnahmen wurden deskriptiv beurteilt. Eine statistische Auswertung der Messergebnisse schloss die Studie ab.

3.2.2 Fixateur externe

Der in dieser Studie eingesetzte, unilaterale Fixateur externe (FE) bestand aus vier Kirschner-Drähten (KD) (Länge: 10 cm, \varnothing 1,25 mm) mit trokarförmiger Gewindespitze (10 mm) (Fa. M. Jagel, Bad Blankenburg/Deutschland) sowie einer äußeren Schienung, dem Verbindungsbalken (29 x 5 mm), bestehend aus zwei Stahlplatten unterschiedlicher Stärke (2,8 mm/1,8 mm) mit jeweils vier einander entsprechenden Nuten für die Kirschner-Drähte. Die Verbindung des Balkens erfolgte mittels zwei Senkkopf-Schrauben (M 2,5), deren Gewindelöcher sich, ebenso wie eine zentrale, äußere Führungsnut, in der stärkeren Platte befanden. Das Gesamtgewicht der Konstruktion beträgt 5,4 g. Die Verankerung des Systems im Knochen erfolgte durch bikortikales Einsetzen von je zwei Kirschner-Drähten beidseitig des Osteotomiespalt. Dabei überragte die Drahtspitze auf eine Länge von ein bis zwei Gewindedrehungen die jeweilige Gegenkortikalis. Der Abstand zwischen den Drähten eines Knochenfragmentes betrug jeweils 6 mm, zwischen den Osteotomiespalt überbrückenden Drähten 10 mm. Zur Standardisierung der Abstände wurden die Nuten des Verbindungsbalken als Schablone und Bohrführhilfe eingesetzt. Zur Auswertung der im Verlauf angefertigten Röntgenaufnahmen erfolgte eine Nummerierung der Drähte von proximal nach distal (KD 1 - 4).

3.2.3 Zellexpansion und osteogene Prädifferenzierung

Im Anschluss an die Entnahme (siehe 3.3.1. *Gewinnung des Knochenmarks*) wurde die Aspirat-Medium-Suspension unter sterilen Bedingungen in einer 25 cm² Zellkulturflasche (Fa. NUNC, Roskilde/Dänemark) ausgesät und 5 ml (0,2 ml/cm² Flaschenboden) des Expansionsmediums (α -Dulbcos Modified Eagles Medium (α -DMEM) + Glukose 4,5 g/l + L-Glutamin-Pyruvat, Fa. Invitrogen/Cambrex), fetales Kälberserum (FCS) (10%) (Biochrom AG, Berlin/Deutschland) sowie Penicillin/Streptomycin (1%) zugegeben. Die Lagerung erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 %. Nach Ablauf von zwei und vier Tagen wurde die Zellkultur zum Entfernen von Zelltrümmern und hämatopoetischen Zellen mit Phosphat-Puffer-Lösung (PBS) bei Raumtemperatur einmalig gespült und das Kulturmedium erneuert. Dabei wurde das in der Kulturflasche enthaltene Medium vorsichtig abpipettiert, danach die Pufferlösung mit einer Pipette aufgetragen und nach kurzem Schwenken des Behältnisses wieder abgenommen. Bei einer Konfluenz von 80 % wurde eine Splittung der Kultur durchgeführt. Hierzu erfolgte zunächst ein zweimaliges Spülen mit PBS (Raumtemperatur), wobei die Menge der Pufferlösung etwa der Hälfte des Medium-Volumens entsprach. Durch diese Spülvorgänge wurde die im FCS enthaltene α_1 -Anti-Trypsinase entfernt. Nachdem die Zellen durch Zugabe des proteolytischen Enzyms Trypsin bei 37°C für vier Minuten inkubiert wurden, lösten sie sich vom Boden der Zellkulturflasche. Die Menge der eingesetzten Serinproteinase Trypsin wurde der jeweiligen Fläche der Zellkulturflaschen angepasst: 1 ml/25 cm², 2 ml/75 cm², 3 ml/175 cm². Nach mikroskopischer Kontrolle der Zell-Ablösung konnte die Trypsinierung durch Zugabe von Kulturmedium unterbrochen und die Zell-Medium-Suspension in ein Falcon-Röhrchen (Falcon Tube BD™, Franklin Lakes/USA) überführt werden. Es folgte eine automatisierte Bestimmung der Zellzahl/ml (Casy®, Zellzahl-und Analyse System, Modell TT, Fa. Schärfe System/Deutschland). Das Gerät zählt Partikel entsprechend ihrer Größe zwischen 12,5 μ m und 25 μ m. Partikel über 12,8 μ m werden dabei als lebende Zellen bewertet und gezählt. Durch Hochrechnung konnte auf diese Weise das Gesamt-Zellvolumen der Probe ermittelt werden. Im Anschluss daran wurden die Zellen erneut auf Zellkulturflaschen ausgesät (ca. 2,5 x 10³ Zellen/cm²) und mit Kulturmedium versorgt (0,2 ml/cm²).

Ein Wechsel des Mediums erfolgte im Weiteren zweimal wöchentlich, wie oben beschrieben. Bei einer Konfluenz von 80 % wurde eine erneute Splittung sowie Zellzählung durchgeführt.

Die osteogene Prädifferenzierung der Zellen wurde bei einem konfluenten Zellteppich in einer 175 cm² Kulturflasche eingeleitet und erstreckte sich über fünf Tage. Sie bestand in einem Austausch des Kulturmediums durch osteogenes Medium (α -DMEM, 200 μ M Ascorbinsäure, 7 mM β -Glycerophosphat, 0,01 μ M Dexamethason, 1% Penicillin/Streptomycin). Der Startzeitpunkt der osteogenen Behandlung kann mit durchschnittlich zwei bis drei Wochen nach Beginn der Expansion angegeben werden. Die Anzahl der mesenchymalen Stammzellen lag nach dieser Zeit bei einem angestrebten Wert von $> 2 \times 10^6$ pro Tier. Die Kontrolle des Zellvolumens erfolgte mittels Zellzählung im Casy® (s.o.). Ein Wechsel des osteogenen Mediums sowie die Kontrolle der Zellzahlen fand entsprechend der oben genannten Vorgehensweise zwei Tage vor Transplantation der Zellen statt. Die Überprüfung der osteogenen Prädifferenzierung der mesenchymalen Stammzellen wurde mikroskopisch anhand phänotypischer Charakteristika sowie dem Nachweis alkalischer Phosphatase-Aktivität durchgeführt.

3.3 Operationen und Zelltransplantation

Die in diesem Kapitel beschriebenen operativen Verfahren kamen an beiden Tiergruppen zur Anwendung. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird daher im Folgenden auf eine Einzelnennung verzichtet. Eine Ausnahme bildete das Knochenmarksaspirat der Medium-Gruppe, es wurde in dieser Studie nicht weiter verwendet und nach der Gewinnung verworfen.

Die beschriebenen Eingriffe fanden unter aseptischen Bedingungen statt, zudem erfolgte im Vorfeld jeder Injektion die Sprühdesinfektion der Injektionsstellen mit Polyvidon- Iod (Braunoderm®, B.Braun Melsungen AG, Melsungen/Deutschland).

3.3.1 Gewinnung des Knochenmarks

Vorbereitung

Nach adspektorischer Beurteilung des Gesundheitszustandes erfolgte die Narkotisierung des Tieres mittels Inhalation eines Gasgemisches aus Isofluran (3,5%) (Forene®, Abbott GmbH&Co KG, Wiesbaden/Deutschland), Lachgas (0,4 l/Min.) und Sauerstoff (0,6 l/Min.). Hierzu wurde die Ratte in einen luftdicht verschließbaren, durchsichtigen Behälter gesetzt und das Gasgemisch in diesen eingeleitet. Nach Wirkeintritt der Narkose und anschließender rektaler Kontrolle der Körpertemperatur (°C), sowie des Körpergewichtes (g) wurde die rechte Hintergliedmasse mit einer Schermaschine (Favorita II/Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) zwischen Knie- und Sprunggelenk vollständig rasiert.

Zur Vorbereitung der Knochenmarks-Aspiration wurden 0,2 ml Kulturmedium in eine sterile 1 ml Einwegspritze (BD Plastipack™, Madrid/Spanien) mit 22G Kanüle (BD™ GmbH/Deutschland) aufgezogen.

Durchführung

Das Operationsfeld wurde durch Aufsprühen von Polyvidon-Iod desinfiziert und das Tier zur Durchführung des Eingriffes auf eine, mit einem sterilen Abdecktuch bedeckte, elektrische Wärmeplatte (37 °C) in Links-Seitenlage positioniert.

Nach erneuter Sprühdesinfektion erfolgte ein Hautschnitt von etwa 1 cm Länge medioventral der Tuberositas tibiae in Längsrichtung bis zur Knochenoberfläche der Tibia. In das Operationsfeld einfallende Weichteilgewebe konnten mit Hilfe einer Pinzette seitlich ver-

drängt werden. Mittels eines Handbohrers mit Kugelfräse (\varnothing 1 mm) (Fa. Proxoon, Niersbach/Eifel/Deutschland) wurde der Knochen von medio-ventral in kaudo-latero-distale Richtung bis zum Eintritt in den Knochenmarksraum angebohrt. Nach dem Entfernen des Bohrers wurde mit Hilfe der vorbereiteten 1 ml Spritze unter vorsichtigen proximo-distalen Bewegungen der Kanüle und dabei anhaltender Aspiration das Knochenmark aus der Markhöhle entnommen und unmittelbar unter sterilen Kautelen in ein mit Kulturmedium befülltes Falcon Röhrchen (15 ml) überführt. Um die Gewinnung der gesamten entnommenen Volumenmenge zu gewährleisten, erfolgte die vorsichtige, wiederholte Aspiration und Injektion innerhalb des Röhrchens. Die Hautwunde wurde mit 3-0 Prolene® (Fa. Ethicon, Norderstedt/Deutschland), einem nicht-resorbierbarem Nahtmaterial, durch ein bis zwei Einzelknopfhefte verschlossen.

Nachsorge

Mittels haltbarem Filzmarker wurden die Ratte zur eindeutigen Identifizierung am Schwanz mit einem tierspezifischen Nummerncode gekennzeichnet. Nach Sprühdesinfektion der Operationswunde wurde die Ratte vorsichtig in linke Seitenlage in den Käfig gelegt, wo sie nach wenigen Minuten das Bewusstsein wiedererlangte.

3.3.2 Osteotomie

Zeitpunkt

Die Wahl des Operationszeitpunktes richtete sich nach der Anzahl der in vitro angezüchteten autologen Osteoprogenitorzellen (siehe Kapitel 3.2.3 *Zellexpansion und osteogene Prädifferenzierung*). Sie wurde bei einer erreichten Zellzahl von ca. zwei Millionen durchgeführt. Die Osteotomie erfolgte an Tieren der OPC-Gruppe im Durchschnitt etwa drei Wochen nach Knochenmarksgewinnung. Die Tiere der Medium-Gruppe wurden entsprechend der Versuchsgruppe etwa drei Wochen nach der Knochenmarksentnahme (siehe Kapitel 3.3.2 *Osteotomie*) operiert.

Vorbereitung

Einer adspektorischen Beurteilung des Gesundheitszustandes des Tieres folgte entsprechend der in 3.3.1 genannten Vorgehensweise die Narkotisierung des Patienten sowie die Messung von Körpertemperatur und Gewicht. Darüber hinaus wurde die Operationswunde der Knochenmarksentnahme an der rechten Tibia kontrolliert, deren Hautfäden entfernt und eine Sprühdesinfektion mit Polyvidon-Iod durchgeführt.

Zur Aufrechterhaltung der Narkose erhielt das Tier im Anschluss intraperitoneal 0,5 ml eines Ketamin (Urostamin®, 100 mg/ml)/ Xylazinhydrochlorid (Rompun®, 20 mg/ml)–Gemisches (Verhältnis 4:3, 1,0 ml/kg KG). Zur Wahrung einer intra- und postoperativen Analgesie wurde ca. fünf Minuten vor dem Hautschnitt 0,05 ml des mit isotoni-scher Kochsalzlösung im Verhältnis 10:1 verdünnten Analgetikums Buprenorphin (Temgesic®, 0,1 ml/kg KG) s.c. injiziert. Eine Bepanthen-Augensalbe (Jenapharm®, Deutschland) wurde zum Schutz der Hornhaut vor Austrocknung beidseitig aufgebracht. Die anschließende Rasur erstreckte sich, ausgehend vom kaudalen Rippenbogen, über die gesamte linke hintere Körperhälfte von der Wirbelsäulenlinie bis zur abdominalen Medianen sowie über die gesamte linke Hintergliedmasse. Nach vollständigem Entfernen der Haare und wiederholter Säuberung sowie Desinfektion des rasierten Bereiches mit Polyvi-don-Iod wurde das Tier in rechter Seitenlage auf eine mit einem sterilen Abdecktuch be-legte elektrische Wärmeplatte (37 °C) positioniert und mit einem sterilen Loch-Tuch, die linke Hintergliedmasse freilassend, abgedeckt. Die Phalangen wurden mit einem sterilen, selbstklebendem Abdecktuch umwickelt und eine Sprühdesinfektion des OP-Feldes vorge-nommen.

Durchführung

Der Hautschnitt wurde lateral an der linken Hintergliedmaße, etwas kaudal des palpierbaren Hüftgelenkes nach distal über die gesamte Länge des Os femoris durchge-führt. Über eine dem Fixateur externe entsprechende Länge von etwa drei Zentimeter erfolgte die Freipräparation des Os femoris zwischen der proximalen Crista intertrochanterica und der Kniegelenkscapsel unter Schonung der proximo-lateralen Seh-nenansätze. Die Subkutanfaszie wurde dazu durchtrennt und die darunter sichtbar werden-den Beuger und Strecker des Kniegelenkes durch stumpfe Präparation entlang der

intermuskulären Faszie voneinander separiert. Stumpfe Wundhaken dienten ihm Verlauf der Operation dazu, das präparierte Weichteilgewebe zurückzudrängen.

Die im weiteren Verlauf genannten Bohrungen sowie die Osteotomie des Femurs wurden mittels eines elektrischen Bohrgerätes mit flexibler Welle und elektrischem Fußpedal durchgeführt (Proxoon, Niersbach/Eifel/Deutschland, 16.000 U/Min.).

Unter optischer Kontrolle einer lotrechten Lage zum Os femoris wurde mit einem Spiralbohrer (\varnothing 1,0 mm) am latero-distalen Ende der Femur-Diaphyse ein monokortikales Loch für den Kirschner-Draht 4 des Fixateur externe (FE) gesetzt. Es folgte die bikortikale Einbringung des Drahtes mittels eines Handbohrfutters senkrecht zu Knochenachse. Im Anschluss daran wurde ein bikortikales Bohrloch für den KD 1 am proximalen Ende der Femurdiaphyse ge-

setzt, dabei dienten die Nuten des an KD 4 befestigten Verbindungsbalkens des Fixateur externe zur Abstandsmessung und Bohrführhilfe. Die hier gewählte, bikortikale Bohrung verhinderte später ein Ablenken des Drahtes bei der Fixation im Knochen. Dies war zu beachten, da die sich gegenüberliegenden Kortizes der

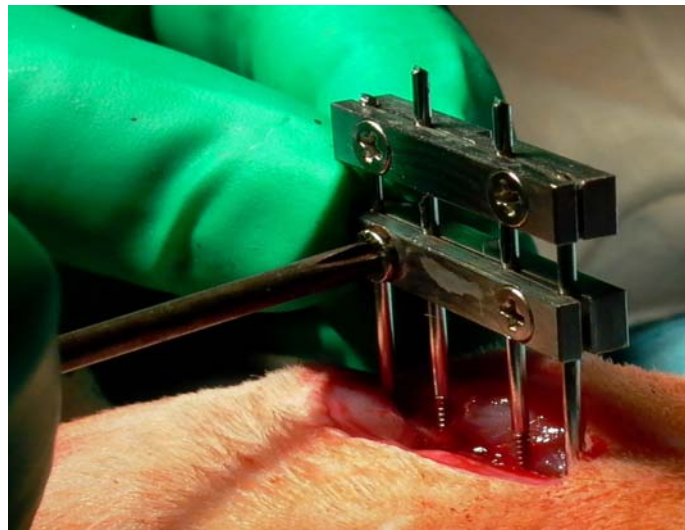


Abb. 4: Stabilisierung durch zwei Fixateur externe-Verbindungsbalken

proximalen Femurdiaphyse in diesem Bereich nicht exakt parallel verlaufen. Nach dem Entfernen des Verbindungsbalkens wurden die Bohrungen für KD 2 und 3 unter optischer Kontrolle, monokortikal, parallel zu den KD 1 und 4 sowie senkrecht zur Knochenachse vorgenommen und die Kirschner-Drähte anschließend bikortikal verankert. Die so platzierten Drähte wurden nun durch die Nuten des Verbindungsbalkens geführt und durch Anziehen beider Senkkopfschrauben fest mit diesem verbunden. Mit einem Seitenschneider konnten die so stabilisierten Pins zunächst auf eine Länge von etwa 4 cm oberhalb der äußeren Schienung gekürzt werden.

Um die Stabilität des durchtrennten Knochens während der Osteotomie sicher gewährleisten zu können, wurde der Verbindungsbalken eines zweiten Fixateur externe auf die oben genannte Weise über dem ersten platziert und an den Drähten fixiert (siehe Abb. 4 und 5). Zur Vorbereitung der Osteotomie wurde die Muskulatur im Osteotomiebereich zwischen KD 2 und 3 unter besonderer Schonung des Periost vorsichtig abpräpariert. Darauf folgend konnte nun das Os femoris unter Sichtkontrolle mit einem Diamant-Sägeblatt ($\varnothing 16$ mm, Stärke 0,4 mm) unter ständiger

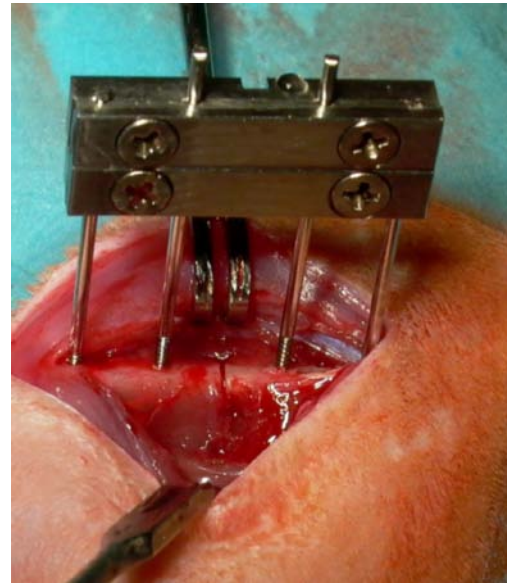


Abb. 5: Operationsfeld nach erfolgter Osteotomie

Kühlung mit steriler, isotonischer Kochsalzlösung (Plastipur®) vorsichtig vollständig osteotomiert werden. Dabei entstand ein Spalt von ca. 0,4-0,5 mm Weite (siehe Abb. 5).

Zum Schutz des umliegenden Weichteilgewebes wurde dieses während des Sägevorgangs mittels stumpfer Wundhaken zurückgehalten. Knochen- und Gewebedetritus wurde durch eine erneute Spülung mit steriler, isotonischer Kochsalzlösung entfernt. Hiernach wurde der knochen nahe, untere FE-Verbindungsbalken gelockert und in einer standardisierten Entfernung zum Knochen erneut

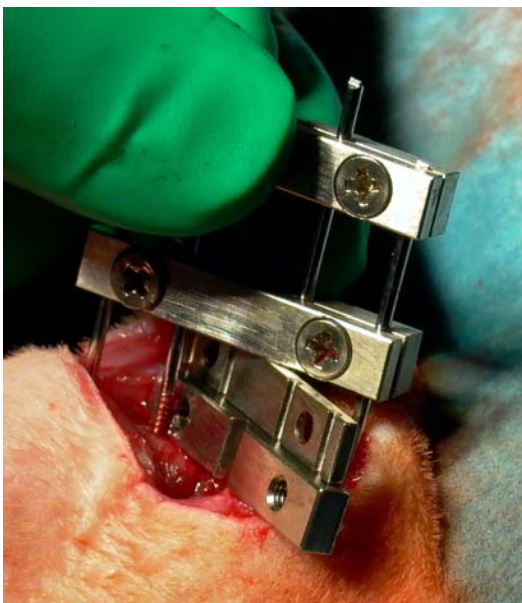


Abb. 6: Normierung des Abstandes auf 10 mm

fixiert. Die Normierung des Abstandes von 10 mm zwischen dem Knochen und dem Verbindungsbalken des FE erfolgte mit Hilfe der übereinander gelegten Stahlplatten eines dritten FE-Verbindungsbalken (siehe Abb. 6). Der während dieses Vorgangs stabilisierende, obere FE-Verbindungsbalken konnte anschließend entfernt und die Kirschner-Drähte auf Niveau des osteotomienahen FE gekürzt werden. Es folgte das Entfernen des FE-Verbindungsbalkens.

Die beiden Knochenfragmente des Os femoris wurden danach nach lateral leicht gespreizt, so dass der Zugang zum Markraum möglich wurde. Zur Induktion einer atrophen Pseudarthrose wurde mittels einer kleinen Pinzette das Knochenmark in beiden Fragmenten entfernt (siehe Abb. 7) und der Markraum mit isotonischer Kochsalzlösung sorgfältig gespült. An-

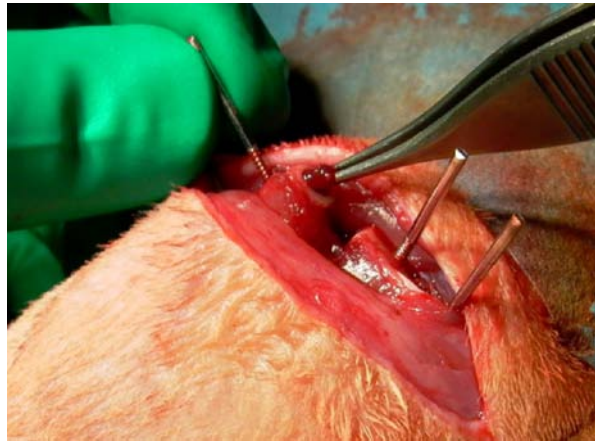


Abb. 7: Entfernen des Knochenmarks

schließend wurde das Periost durch zirkuläre Kauterisation jeweils 2 mm proximal und distal des Osteotomiespaltes thermisch zerstört. Um die Abstände gewährleisten und standardisieren zu können, kam hierzu ein monopolarer Thermokauter mit 2 mm Skalpellaufsatz zum Einsatz. Nach anatomischer Repositionierung der Knochenfragmente konnte der FE-Verbindungsbalken endgültig an den Kirschner-Drähten befestigt werden. Eine fortlaufende Muskelnäht mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl® 7-0, St. Stevens, Woluwe/Belgien) sowie eine Hautnaht, bestehend aus vier bis fünf Einzelheften mit nicht-resorbierbarem, 3-0 starkem Faden, verschlossen die Operationswunde.

Nachsorge

Die *operative Nachsorge* der Osteotomie entsprach der in Punkt 3.3.1 (*Gewinnung des Knochenmarks*) genannten Vorgehensweise. Ferner wurde eine radiologische Untersuchung der linken Hintergliedmaße durchgeführt (siehe 3.4.3 *radiologische Untersuchung*).

Im Anschluss an die Osteotomie wurden die Tiere sieben Tage post operationem einer *Verlaufskontrolle* unterzogen. Neben einer radiologischen Untersuchung wurden Gewicht und Körpertemperatur gemessen sowie eine Wund- und Pin-Pflege durchgeführt (siehe 3.4 *Untersuchungen*). Für die Dauer der Kontrolluntersuchung erhielten die Patienten eine Inhalationsnarkose entsprechend 3.3.1. Die Aufrechterhaltung der Narkose konnte hierbei durch Verabreichung des Gasmisches über eine Inhalationsmaske gewährleistet werden.

3.3.3 Zelltransplantation

Zeitpunkt und Vorbereitung

Die Transplantation der in vitro kultivierten/expandierten OPCs erfolgte zwei Tage nach der Osteotomie. Zur Vorbereitung der zu injizierenden Zell-Medium-Suspension mussten die OPCs zunächst analog zur Zellanzucht (siehe 3.2.3) durch Zugabe kalten Trypsins vom Boden der Kulturflasche gelöst werden. Nach Unterbrechen der Trypsinierung wurde eine ca. 2×10^6 Zellen enthaltende Suspensionsmenge in ein Falcon Röhrchen umgefüllt und 10 Min. zentrifugiert (15.000 U/Min.). Der entstandene Überstand wurde bis auf ein Restvolumen von 1-2 ml steril mit einer Pipette abgenommen. Nach anschließender einminütiger Zentrifugation (15.000 U/Min.) der übrigen Suspension ließ sich der restliche Überstand bis auf 0,1-0,2 ml steril abpipettieren. Das verbliebene Zellpellet wurde mit dem Kulturmedium-Überstand mittels einer Kanüle durchmischt und die fertige Zell-Medium-Suspension vorsichtig in eine sterile 1 ml Einwegspritze mit 24G Kanüle aufgezogen.

Analog zu der in Kapitel 3.3.2 (*Verlaufskontrolle*) genannten Vorgehensweise erhielten die Ratten eine Inhalationsnarkose, ferner wurden Gewicht und Temperatur kontrolliert. Nach Positionierung der Tiere in rechte Seitenlage und vorsichtigem Entfernen starker Verkrustungen und Verklebungen der Haut im Bereich der Pins erfolgte eine gründliche Sprühdesinfektion des Wund-, Pin- und Injektionsbereiches mit Polyvidon-Iod.

Durchführung

Die Injektion der Zell-Medium-Suspension erfolgte von lateral, zwischen KD 2 und 3, wobei die zentrale Nut des FE-Verbindungsbalkens als Führungsschiene diente. Nach Sicherung der Positionierung durch Ertasten des Osteotomiespalt mit der Kanülenspitze wurde das gesamte Suspensionsvolumen vorsichtig in den Spalt injiziert.

Nachsorge

Abschließend erfolgte eine Sprühdesinfektion des Wundbereiches mit Polyvidon-Iod. Nachdem das Tier in Rechts-Seitenlage in den Käfig gelegt worden war, kam es innerhalb weniger Minuten zu Bewusstsein. Die Transplantation zellfreien Kulturmediums in den Osteotomiespalt der Medium-Tiere erfolgte analog der oben genannten Vorgehensweise. Die injizierte Menge entsprach dabei mit 0,15 ml dem in der OPC-Gruppe applizierten Volumen.

3.4 Untersuchungen

3.4.1 Gewichts- und Temperaturkontrolle

Die Kontrolle der Körpertemperatur ($^{\circ}\text{C}$) und des Körpergewichtes (g) erfolgte im Vorfeld der Knochenmarks-Gewinnung, der Osteotomie (d_0), der Zelltransplantation (d_2), der Verlaufskontrolle (d_7), sowie der Euthanasie (d_{14}). Die Körpertemperatur wurde dabei mit einem digitalen Thermometer (Firma Hartmann/Deutschland) rektal gemessen. Zur Aufnahme des Körpergewichtes kam eine elektronische Waage (Kilomat- Präzisionswaage, Fa. Satorius, Göttingen/Deutschland) zum Einsatz.

3.4.2 Wund- und Pin-Pflege

Wie oben erwähnt, wurde am Tag der Zell-Transplantation und am Tag sieben nach Osteotomie eine Wund- und Pin-Pflege durchgeführt. Die Drähte des Fixateur externe wurden dabei an den Eintrittsstellen gründlich inspiziert und deren Verkrustungsgrad, auftretende Anzeichen eines entzündlichen Geschehens, sowie auch umgebende Gewebeschwellungen einzeln (entsprechend KD 1 - 4) dokumentiert. Ebenso wurden entstandene Leckstellen, deren Größe und Lokalisation schriftlich festgehalten. Im Anschluss daran wurden im Bereich der Operationswunde Gewebedetritus und getrocknetes Wundsekret mit Polyvidon-Iod aufgeweicht und vorsichtig mit einer Pinzette entfernt. Auf Anzeichen einer lokalen Infektion, vor allem im Bereich der Pins, wurde besonders geachtet. Die Sprühdeseinfektion der Operationswunde sowie etwaiger Leckstellen mit Polyvidon-Iod schloss die Untersuchung ab.

3.4.3 Radiologische Untersuchung

Eine radiologische Untersuchung wurde am Tag der Osteotomie (d_0), der Verlaufskontrolle (d_7), sowie der Euthanasie (d_{14}) am narkotisierten bzw. euthanasierten Tier durchgeführt (Strahlenhärte: 52 kV, Belichtungszeit: 1,8 mAs, Abstand: 60 cm). Dabei wurden pro Tier Aufnahmen in 3 Ebenen angefertigt: lateraler und medialer Strahlengang sowie ein anterior-posterior-Röntgenbild des Os femoris durch kranio-kaudal. Für die laterale Aufnahme wurde die Ratte in Bauchlage verbracht und das osteotomierte, linke Hinterbein abduziert. Das mediale Bild entstand in Rücklage bei abduzierter linker Hintergliedmasse. Für die 3. Ebene wurde das Tier so in Brust-Bauchlage positioniert, dass eine der physiologischen Sitzposition ähnliche Stellung des linken Hinterbeins erreicht

wurde. Die Ratte wurde anschließend mit dem Hinterkörper vorsichtig so nach links geneigt, dass Unterschenkel und Phalangen für die Aufnahme unter dem Bauch zu liegen kamen. Neben der wöchentlichen klinischen und röntgenologischen Verlaufskontrolle erfolgte eine tägliche, adspektorische Beurteilung des Gesundheitszustandes der Tiere.

3.5 Probengewinnung

3.5.1 Euthanasie

Die Euthanasie der Tiere erfolgte zwei Wochen post operationem. Nach Einleitung einer Inhalationsnarkose (siehe 3.3.1), welche über eine Inhalationsmaske aufrechterhalten wurde, wurden die Körpertemperatur und das Körpergewicht des Tieres ermittelt. Im Anschluss daran folgte die Euthanasie durch intrakardiale Injektion von 8 ml 7,45 %igem Kaliumchlorid (B.Braun Melsungen AG, Melsungen/Deutschland). Der Tod trat innerhalb weniger Sekunden post injectionem ein und wurde durch optische Kontrolle der Atmung und Retina-Durchblutung sowie palpatorische Kontrolle des Herzstillstandes überprüft und gesichert. Post mortem wurde eine radiologische Untersuchung entsprechend Kapitel 3.4.3 durchgeführt.

3.5.2 Probenentnahme

Entnommen wurden das osteotomierte Os femoris der linken Hintergliedmasse mit Fixateur externe und umliegendem Weichteilmantel. Bei der Probenentnahme wurde darauf geachtet, dass nur minimale Zug-, Druck- und Scherkräfte auf den osteotomierten Knochen wirkten. Die Fixation des zu entfernenden Gewebes erfolgte aus diesem Grund vorsichtig am Verbindungsbalken des Fixateur externe.

Nach Enthäutung der linken Hintergliedmasse erfolgte die Trennung des maximal gebeugten Kniegelenkes von kranial, senkrecht zur Gliedmassenachse, im Gelenkspalt. Hierzu wurde zunächst das gerade Kniescheibenband (Lig. patellae) und im Anschluss der intra- und subartikuläre Sehnen- und Bandapparat des Kniegelenkes (Art. genus) durchschnitten. Eine halbkreisförmige Umschneidung des Os femoris nach kaudal bis zum Hüftgelenk (Art. coxae) mit Durchtrennung der oberflächlichen und tiefen Muskulatur der Beckengliedmasse sowie medial der A. und V. femoralis schloss sich an. Nach Exartikulation des Femurkopfes aus der Beckenpfanne (Acetabulum coxae) konnte das Os femoris in Verbund mit Teilen des durchtrennten Muskelgewebes, nach Ablösung des Fe-

murkopfbandes (Lig. coxae) mit dem im Knochen verankerten Fixateur externe vorsichtig entnommen werden. Die am Knochen verbliebene oberflächliche Muskulatur der Beckengliedmasse wurde vorsichtig abpräpariert. Die Trennung der tiefen Anteile des entnommenen Muskelgewebes geschah unter besonderer Schonung des Periost. Das so entfernte Muskelgewebe wurde verworfen.

3.6 Probenaufbereitung

Die hier beschriebenen histologischen Aufbereitungsverfahren kamen in beiden Tiergruppen analog zur Anwendung. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird daher im Folgenden auf eine Einzelnennung verzichtet.

3.6.1 Fixation

Die entnommenen Knochenproben wurden einzeln in Gaze eingewickelt. Die Tiernummer wurde mit Bleistift auf Papier notiert und dieses zur sicheren Identifizierung der Probe jeweils im Inneren des Gazebeutels sowie an der Außenseite befestigt. Die so vorbereiteten Knochenproben wurden in einer gepufferten Formaldehyd-Lösung für die Dauer von sieben Tagen in einem entsprechend der Tiernummer gekennzeichnetes Becherglas mit Schraubverschluss fixiert. Die Fixationslösung setzte sich wie folgt zusammen: Formol (Formaldehyd) 37 %ig, Äthylalkohol 100%ig, Barbital-Natrium-Puffer (pH 7,4), Glukose.

3.6.2 Entwässerung und Einbettung

Die 16 entnommenen Femora jeder Gruppe wurden für die weitere Probenverarbeitung randomisiert in zwei Subgruppen (je n = 8) eingeteilt (siehe 3.2.1 *Versuchsplan*). In Vorbereitung zur Bestimmung des Mineralisationsgrades wurden die Knochen der Subgruppe I in den Kunststoff Polymethylmethacrylat (PMMA, Technovit 9100Neu, Heraeus Kulzer GmbH & Co KG, Wehrheim/Deutschland) eingebettet. Die Femora der Subgruppe II wurden in Vorbereitung auf die immunhistochemischen Färbetechniken (siehe 3.6.4) entkalkt und in Paraffin (Paraplast®, Tyco Healthcare, Mansfield/USA) eingebettet.

Kunststoff-Einbettung

Entwässerung

Aufgrund der Wasserunlöslichkeit des später verwendeten Einbettmediums Polymethylmethacrylat musste das Probenmaterial im Vorfeld der Verarbeitung entwässert werden. Die in Gaze gewickelten Femora durchliefen hierzu nach einstündigem Auswaschen mit Leitungswasser eine aufsteigende Alkoholreihe. Sie verblieben dabei sieben Tage in 70 %igem, jeweils 14 Tage in 80 % und 96 %igem, sowie 21 Tage in 100 %igem, denaturiertem Ethanol (Herbeta-Arzneimittel, Berlin/Deutschland). Aufgrund der eintretenden Verunreinigung des Alkohols durch Fixationslösungs-Rückstände, Wasser und gelöstes Gewebefett wurde während dieser Zeit ein wöchentlicher Wechsel der jeweiligen Alkoholverdünnung durchgeführt. Das stufenweise Vorgehen wirkte der Gefahr von Zerreißungen und Schrumpfungen des Gewebes entgegen (Romeis, 1989). Um durch konstante, leichte Bewegung die Infiltration zu verbessern und so das Ergebnis der Entwässerung zu optimieren, wurden die Probengläser auf einen Schüttler (Laborshake®, Fa. Gerhardt/Deutschland) verbracht. Nach Durchlaufen der Alkoholreihe wurden der Fixateur externe-Verbindungsbalken sowie die eingebrachten Kirschnerdrähte vorsichtig unter besonderer Schonung des weichen Kallus im osteotomierten Bereich entfernt. Im Anschluss daran erfolgte das zweimal zweistündige Einbringen der Knochen in Xylol (Dimethylbenzol, Xylene®, J.T. Baker, Deventer/Niederlande). Der zur Entwässerung der Proben eingesetzten Alkohol wurde so aus dem Gewebe verdrängt.

Einbettung

Nach der Entwässerung erfolgte eine zweitägige Präinfiltration und nachfolgend eine einwöchige Infiltration der Proben bei 4 °C. Im Anschluss wurden die Knochen einzeln so in PMMA eingebettet, dass die Knochenlängsachse möglichst plan, parallel zum Boden der verwendeten Ausgießformen lag. Vorgehensweise und Zubereitung der Lösungen entsprachen dabei den Angaben des Herstellers.

Die Ausgießformen wurden luftdicht verschlossen. Es folgte die Polymerisation des Kunststoffes innerhalb 24 bis 48 Stunden bei 4°C im Kühlschrank. Die entstehende Polymerisationswärme konnte so durch die erniedrigte Umgebungstemperatur abgefangen und die Aushärtung des PMMA beschleunigt werden.

Paraffin-Einbettung

Entkalkung

Um die Grundstruktur des organischen, nicht mineralisierten Knochengewebes untersuchen und beurteilen zu können erfolgte im Anschluss an die Fixation (3.6.1 *Fixation*) eine Entkalkung der Femora. Zu diesem Zweck wurden die Proben über einen Zeitraum von drei Wochen in EDTA-Lösung (Äthylendiamintetraessigsäure, Entkalkungslösung, Herbeta-Arzneimittel, Berlin/Deutschland) verbracht. EDTA ist ein Komplexbildner, welcher Kalziumionen aus dem Knochen bindet und diesen so entkalkt. Ein wöchentlicher Wechsel der Lösung, sowie die Aufbewahrung der Proben in einem Brutschrank (37°C) während dieser Zeit beschleunigte die Entkalkung. Nach dem endgültigen Abgießen des EDTAs verbliebene Rückstände wurden im Verlauf einer 30 minütigen Spülung mit Leitungswasser ausgewaschen.

Entwässerung

Die Entwässerung der Präparate sowie eine Durchtränkung mit Paraffin erfolgte nach Entfernen des Fixateur externe innerhalb von 67 Stunden in einem Entwässerungsautomaten (Fa. EXAKT Apparatebau GmbH, Norderstedt/Deutschland) nach Tauchprinzip (Romeis, 1989).

Entwässerungsprogramm:

Alkohol (Ethanol)

70%	4 Std.
80% (2x)	je 4 Std.
96%	8 Std.
96%	10 Std.
100% (3x)	je 10 Std.
Xylol (2x)	a) 1 Std. b) 1,5 Std.
Paraffinbad (60°C) (2x)	a) 2,5 Std. b) 2 Std.

Einbettung

Das Ausblocken der entkalkten und entwässerten Knochenpräparate erfolgte mit Hilfe eines Gewebe-Einbettungsgerätes (Paraffinbad EG 1120, Fa. Leica, Bensheim/Deutschland) in zusammengesteckten Ausgießrahmen aus Bleiwinkeln auf je einem glatten Bleiuntersatz. Die Rahmen wurden auf der erwärmten (60°C) Plattform des Gerätes positioniert und der Knochen waagrecht auf dem Boden platziert. Über einen Auslaßstutzen konnte nun verflüssigtes Paraffin (62°C) bis zum oberen Rand des Rahmens eingefüllt werden. Der gerahmte Paraffinblock erstarrte anschließend auf einer Kühlplatte (-20°C, Kühlplatte EG 1130, Fa. Leica, Bensheim/Deutschland), wobei das Präparat bis zur Aushärtung des Paraffins mit einer Pinzette in seiner Position fixiert wurde. Die niedrige Temperatur der Kühlplatte gewährleistet eine Abkühlung zu homogenen, feinkristallinen Paraffinblöcken, was die Herstellung von Schnittpräparaten erleichtert. Zur eindeutigen Identifizierung der Probe wurde die Tiernummer auf einem mit Bleistift gekennzeichneten Papier in das noch weiche Paraffin eingelegt. Nach dem vollständigen Abkühlen konnten die Paraffinblöcke leicht aus den Ausgießrahmen entnommen werden.

3.6.3 Herstellung von Schnittpräparaten

Die bei der Herstellung der Schnittpräparate verwendeten Objektträger waren ausnahmslos adhäsiv, silanisiert und vorgereinigt (Objektträger, Marienfeld GmbH & Co KG, Lauda- Königshofen/Deutschland).

Kunststoff- Schnittpräparate

Aus den unentkalkten Kunststoff-Knochenblöcken wurden mit Hilfe eines elektrischen Rotations-Hartmikrotoms (Leica RM 2255®, Fa. Leica Microsystems Nussloch GmbH, Bensheim/Deutschland) Schnittpräparate angefertigt. Um die Kunststoffblöcke fest im Gerät einspannen zu können, erfolgte im Vorfeld deren Aufbocken mit Technovit 3040® (Heraeus Kulzer GmbH & Co KG, Wehrheim/Deutschland) gemäß den Herstellerangaben. Im Anschluss wurden die Blöcke mit einer Tisch-Schleifmaschine (Phoenix 3000®, Fa. EXAKT Apparatebau GmbH, Norderstedt/Deutschland) abgeschliffen. Eine Erneuerung der Kennzeichnung der Präparate erfolgte nach dem Abschleifen.

Die Präparate wurden mit der Schnittfläche waagrecht zum Messer in das Mikrotom eingespannt. Bei einem Messerwinkel von etwa $4,5^\circ$ und einem Hubvorschub von $10\ \mu\text{m}$ wurden die Knochenblöcke bis zum Erreichen der gewünschten Schnittebene angeschnitten. Dabei war auf eine stetige Benetzung des Messers sowie des Blocks mit Schneideflüssigkeit (Tensid-Wassergemisch) zu achten. Das Detergenz diente der Herabsetzung der Oberflächenspannung und erleichtert so das schadloose Schneiden des harten Kunststoffes. Die gewünschte Schnittebene war bei gleichzeitiger Darstellung des peri- und endostalen Kallusgewebes, des Osteotomiespaltes sowie des Knochenmarkraums mit klarer Differenzierung der Kortikalis erreicht.

Nach dem Erscheinen der angestrebten Schnittebene auf Höhe der KD-Bohrungen wurden im Folgenden $6\ \mu\text{m}$ dünne Knochenschnitte mit Hilfe einer Pinzette abgenommen und auf mit Streckflüssigkeit (Ethanol 70%) beträufelte Objektträger platziert. Der Alkohol ermöglichte das vorsichtige Auseinanderrollen der Schnitte. Eine weitere Streckflüssigkeit/Weichmacher (2-Butoxyethylen-Acetat, Merck 801395) wurde auf die Objektträger aufgetragen, die Schnitte anschließend mit Kisol-Folie (Polyethylen-Folie) bedeckt und durch vorsichtiges überstreichen der Folie mit dem Handballen geglättet. Überschüssige Flüssigkeit zwischen Dünnschnitt und Kisol-Folie konnte dabei abgestrichen werden. Nach dem Bedecken der Objektträger mit Filterpapier wurden diese in eine Schnittpresse eingespannt und über einen Zeitraum von 24 Std. in einem Wärmeschrank (37°C) gelagert, um das Anhaften der Schnitte am Glasträger zu sichern.

Die Kennzeichnung der Präparate mit Tiernummer und Art der Probe erfolgte mit Bleistift auf den Objektträgern.

Paraffin- Schnittpräparate

Unter Verwendung eines Rotationsmikrotoms (Leica RM 2125®, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Bensheim/Deutschland) wurden aus den entmineralisierten Paraffin-Knochenblöcken Schnittpräparate angefertigt. Zur Verbesserung der Schneidequalität war während des gesamten Vorgangs auf ein wiederholtes Kühlen der Paraffin-Blöcke zu achten. Zu diesem Zweck wurden sie zwischen den Schneidevorgängen auf mit Aqua dest. befeuchteter Aluminium-Folie über einem Eisblock gekühlt.

Das Einspannen der Blöcke erfolgte mit der Schnittfläche waagrecht zum Messer. Nach Anschnitt des Knochen-Blocks, analog der oben genannten Vorgehensweise und Zielsetzung, wurden mit einem Hubvorschub von $4\ \mu\text{m}$ bei einem Messerwinkel von 0° Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden mit einem Pinsel vorsichtig abgenommen und zum Strecken in ein Wasserbad (Aqua dest./Raumtemperatur) gelegt. Mit einem Objektträger ließen sich die $4\ \mu\text{m}$ dünnen Schnitte aus dem Wasserbad aufnehmen und in ein konstant auf 47°C erwärmtes Aqua dest.-Bad überführen (Wasserbad HI 1210, Fa. Leica). Die auf diese Weise nochmals gestreckten Präparat-Schnitte konnten danach vorsichtig erneut auf den zuvor mit der Tiernummer gekennzeichneten Objektträger aufgenommen und in 48 Std. in einem Wärmeschrank (37°C) getrocknet werden.

3.6.4 Färbungen

Entplasten

Um eine Infiltration der Färbe-Lösungen zu ermöglichen, mussten vor Färbeginn die kunstharzeingebetteten Knochenpräparate von dem Kunststoff befreit werden. Zu diesem Zweck erfolgte ein 3×30 minütiges Eintauchen der Schnitte in Methylmethacrylat (MEA, Merck 806061) mit anschließender Rehydratation in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70% Ethanol). Abschließend wurde der Alkohol mit Aqua dest. ausgewaschen.

Entparaffinieren

Gleichermaßen mit dem Ziel einer optimierten Farbstoff-Infiltration mussten die paraffinisierten Schnittpräparaten entparaffiniert werden. Die Schnitte wurden dazu zunächst zweimal für jeweils 10 Min. in Xylol gelegt. Es folgte die Rehydratation in einer absteigenden Alkoholreihe (s.o.) und das Auswaschen der Schnitte durch Überführen in Aqua dest.

Eindecken

Am Ende jedes Färbvorgangs wurde ein Deckgläschen mit Hilfe von Vitro-Clud® (Fa. R. Langenbrink, Emmendingen/Deutschland) auf dem Schnittpräparat fixiert. Das Einschlußmittel Vitro-Clud® gewährleistet eine luftdichte Abdeckung und so eine lange Haltbarkeit der gefärbten Schnittpräparate.

Histomorphologische Färbungen***Kombinierte Safranin Orange/von Kossa Färbung***

Die Safranin Orange/von Kossa-Färbung ermöglicht an Kunststoff-Schnittpräparaten eine Unterscheidung zwischen mineralisierten und nicht mineralisierten Gewebeteilen. Das Prinzip besteht in einer Versilberung der Kalziumsalze nach von Kossa, bei anschließender Gegenfärbung mit Safranin-Orange. Nach Austausch der Anionen (Karbonat/Phosphat) gegen zugesetzte Silberionen entstehen durch Reduktion aus Letzteren metallische Silberionen, welche sich auf den Strukturanteilen des Knochens niederschlagen. Auf diese Weise entwickelt sich eine Schwärzung mineralisierter Gewebeteile. Durch anschließende Zugabe von Natrium-Thiosulfat bilden die nicht-reduzierten, überschüssigen Silberionen Komplexe $[\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_3]^{5-}$, welche leicht mit Wasser/Aqua dest. ausgespült werden können. Die Gegenfärbung mit Safranin-Orange (Merck 1382) dient der Betonung nicht versilberter Anteile (nicht-mineralisierter Knorpel, Bindegewebe). Der Farbstoff bindet dabei vor allem an Plasmaprotein-Strukturen und lässt diese rötlich erscheinen. (Burck, 1988)

Färbeergebnis

mineralisiertes Knorpel- & Knochengewebe	schwarz
Mineralisationsfronten	schwarz granuliert
hyaliner Knorpel	leuchtend rot
nicht-mineralisiertes Gewebe (z.B. Bindegewebe, Muskulatur)	rötlich

Movat Pentachrom-Färbung

Diese Färbetechnik kam bei den entmineralisierten Paraffin-Schnittpräparaten zur Anwendung, um eine Unterscheidung von Hart- und Weichteilkomponenten vornehmen zu können. Sie eignet sich aufgrund ihres Farbenreichtums neben der Unterscheidung von Knochen und nicht-knöchernem Gewebe vor allem zu Untersuchungen der chondralen Ossifikation und Knochenheilung (Romeis, 1989). In Anlehnung an das Prinzip der trichromatischen Färbung kommt es bei der verwendeten Pentachrom-Technik zu einer Kontrastierung des Gewebes in fünf statt drei Farben. Das Prinzip besteht neben einer Kernfärbung in der zeitlich differierenden Infiltration saurer Farbstoffe verschiedener Dispersität in Gewebe-/Zell-Strukturmaschen unterschiedlicher Weite. Die Differenz der Infiltrationsgeschwindigkeit bestimmt dabei die Anfärbung der Gewebeanteile. Während des Vorgangs ist daher auf eine genaue Einhaltung der zeitlichen Angaben zu achten, um eine farbliche Überlagerung feindisperser Farbstoffe in feinmaschigen Strukturen zu verhindern. (Burck, 1988)

Färbeergebnis

Knochengewebe, Kollagen	leuchtend gelb
Osteoid	dunkelrot
Knorpelgewebe	grün
Bindegewebe	blau-grün
elastische Fasern	rot
Zytoplasma	blass rot
saure Glykosaminoglykane	leuchtend hellblau
Zellkerne	blau-schwarz

Enzymhistochemische Färbung

TRAP – Färbung

Zur Darstellung aktiver Osteoklasten wurde an den entmineralisierten Paraffin-Schnittpräparaten die Anfärbung des für diese Zellen spezifischen Enzyms TRAP (Tartrat-Resistant Acid Phosphatase) durchgeführt. Das Prinzip der enzymhistochemischen Färbung besteht dabei im Nachweis der Co-Ferment-Aktivität. Ein enzymespezifisches Substrat wird dem Gewebe zugegeben und das bei Anwesenheit bzw. Aktivität des Enzyms entstehende Umsetzungsprodukt farblich sichtbar gemacht. Dementsprechend erscheinen aktive Osteoklasten mit Hilfe dieser Färbetechnik leuchtend rosa (Burck, 1988). Eine Gegenfärbung erfolgte mit Methylgrün (Fa. Merk, Darmstadt/Deutschland).

Immunhistochemische Färbungen

Prinzip

Bei der angewendeten immunhistochemischen Färbemethode handelt es sich um die sog. 2-Schritt oder indirekte Methode mit modifiziertem Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Detektionssystem (Vectastain ABC Kit®, Fa. Linaris, Wertheim/Deutschland). Prinzip dieser Technik ist die Antigen-Antikörper (AG-AK)-Reaktion. Die paraffinisierten Schnittpräparate mussten im Vorfeld der Färbungen entparaffiniert und rehydriert werden.

Nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen an Gewebeproteinen mit Hilfe eines Normalserum wird ein monoklonaler, unkonjugierter Primär-AK zugegeben, welcher an das nachzuweisende AG bindet. Es folgt der Einsatz eines biotinylierten Sekundär-AK, der nach Zugabe des Avidin-Biotin-Komplexes als Brücken-AK dient. Die Affinität von Avidin zu Biotin ist sehr ausgeprägt, drei von vier Bindungsstellen dieses (Hühner-)Eiweißes können durch Biotin besetzt werden. Es kommt so rasch zur Komplexbildung. Durch Zugabe einer Substrat-Chromogen-Lösung (hier: Alkalische Phosphatase (AP)-Substrat) reagieren nach hydrolytischer Ester-Spaltung entstandene Phenolverbindungen mit den Diazoniumsalzen zu wasserunlöslichem Azofarbstoff. Eine quantitative Bestimmung der Gewebe anhand der Farbreaktion wird so ermöglicht (Boenisch, 2003).

Das Prinzip der immunhistochemischen Färbung wurde zum Nachweis von α -Smooth Muscle Actin der glatten Gefäßmuskulatur und Kollagen II angewendet. Vor Färbeginn musste die jeweilig optimale Konzentration der Primär-AK zur Darstellung der zu detektierenden Antigene ermittelt werden. Hierzu wurden die Primär-AK in Vorversuchen mit einem Puffer (Dako Cytomation Antibody Diluent /USA) verdünnt. Die eingesetzten Gebrauchs-Lösungen wurden gemäß den Angaben des Herstellers angefertigt. Eine Negativkontrolle mit Präparaten ohne Primär-AK-Inkubation erfolgte.

α -Smooth Muscle Actin (α -SMA)

Um die Gefäßversorgung pro Fläche (mm^2) erfassen und auswerten zu können, wurden die Blutgefäße im Osteotomiebereich mit dieser Methode angefärbt. Bei den hierfür eingesetzten Primär-AK handelt es sich um monoklonale Maus-AK (Fa. DAKO, Code No. M0851, Glostrup/ Dänemark). Diese bilden mit dem als AG wirkenden α -SMA der glatten Gefäß-Muskulatur Komplexe. Die Gefäße können so entsprechend des erläuterten Prinzips farblich sichtbar gemacht werden.

Kollagen II

Die Knochenschnittpräparate wurden zur quantitativen Bestimmung von Kollagen II immunhistologisch mit einem monoklonalen Anti-Maus-Anti-Ratte-AK (Fa. DAKO, Glostrup/Dänemark) angefärbt.

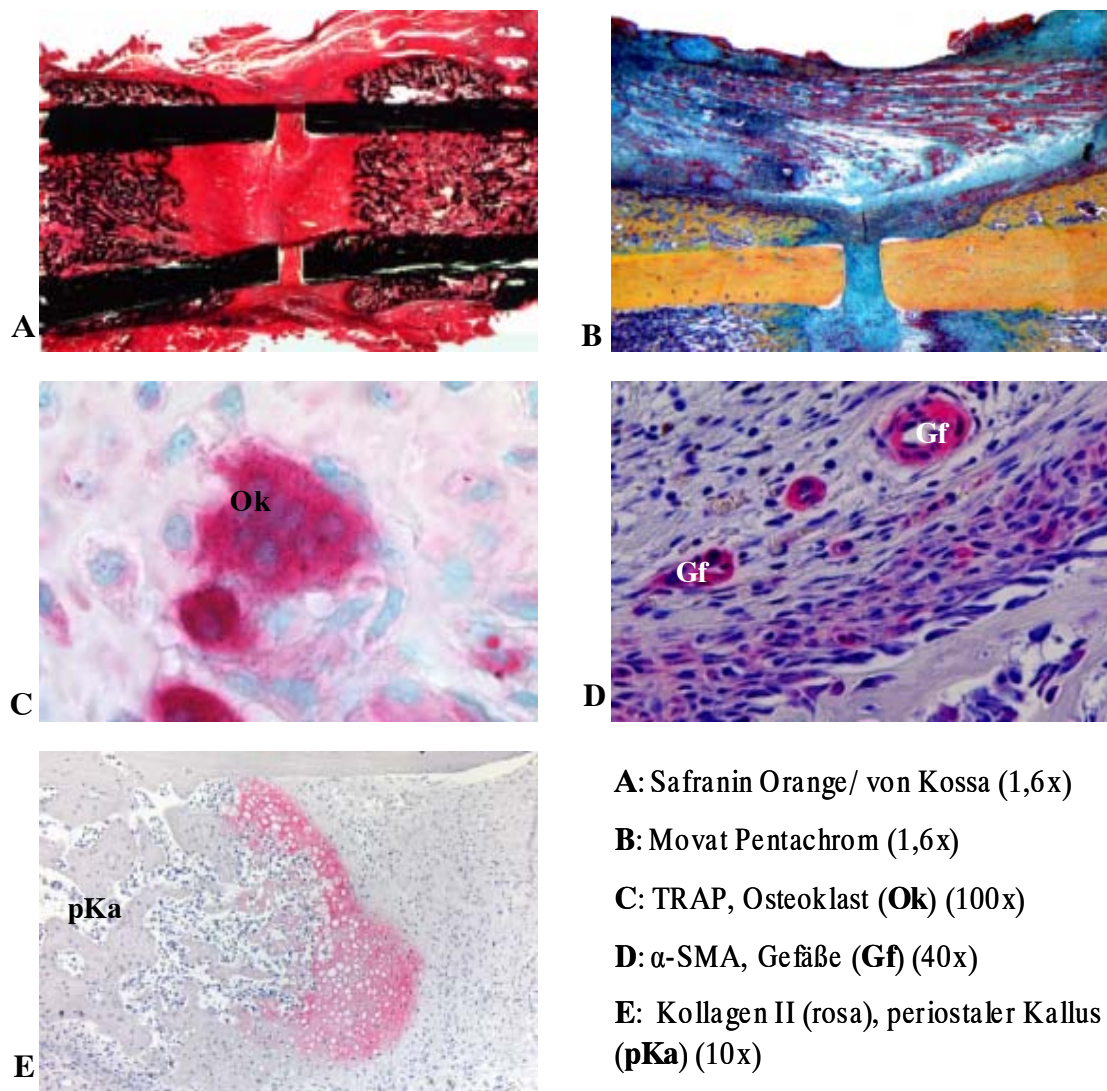


Abb. 8 A-E: Genutzte Färbungen in der Übersicht (OPC-Tier)

3.7 Auswertung

3.7.1 Festlegung der Region of Interest (ROI)

Um eine standardisierte und vergleichbare Untersuchung der unterschiedlich gefärbten Knochenschnittpräparate zu ermöglichen, wurde zunächst ein Areal innerhalb des Knochenschnittes definiert, binnen dessen alle lichtmikroskopischen, computergestützten sowie deskriptiven Auswertungen erfolgten: die Region von Interesse (ROI).

Die für diese Studie definierte ROI erstreckte sich ausgehend von der Medianen des Osteotomiespalt es jeweils 3,5 mm nach proximal und distal (Gesamthöhe: 7 mm). Die Höhe der Gesamt-ROI wurde so gewählt, da Gewebereaktionen und -veränderungen, die sich aus der Gegenwirkung des Knochengewebes mit den hier verankerten Pins eventuell ergeben haben, in dieser Studie nicht untersucht werden sollten. Die mediale und laterale ROI-Begrenzung verlief am äußersten Rand des entstandenen Kallusgewebes, da die Ausdehnung der auftretenden periostalen Kallusbildung sich von Tier zu Tier deutlich unterschied. Um einen detaillierten Vergleich einzelner Areale der ROI zu ermöglichen, wurde diese weiter in Sub-ROIs unterteilt. Die Mediane des Knochenmarkraums wurde als Trennlinie zwischen den medialen und lateralen Sub-ROIs festgelegt. Eine Markierung auf Seiten des Femurkopfes im Bereich der ROI-Grenze mit einem roten Filzmarker auf dem Objektträger ermöglichte hier die eindeutige Identifizierung der proximalen, medialen Seite. Eine weitere Unterteilung der medialen und lateralen Sub-ROIs in je ein periostales und ein endostales Areal erfolgte. Als Grenzlinie wurde dabei jeweils die Mediane der medialen und lateralen Kortikalis gewählt (siehe Abb. 9).

Die durch die Osteotomie im Schnittpräparat optisch vierteilige Kortikalis wurde in »Kortikalis 1-4«, wie folgt eingeteilt: »Kortikalis 1«: lateral distal, »Kortikalis 2«: lateral proximal, »Kortikalis 3«: medial proximal, »Kortikalis 4«: medial distal. Die gekennzeichnete Position des Femurkopfes diente hierbei der eindeutigen Identifizierung der Lage der kortikalen Abschnitte. Auch der Osteotomiespalt wurde als Sub-ROI definiert. Die folgenden Abbildungen veranschaulichen schematisch die Gesamt-ROI (Abb. 9), sowie deren Unterteilung in Sub-ROIs (Abb. 10) (Sub-ROIs »Kallusbereich« (SR I-IV), Sub-ROIs »Kortikalis 1-4«, Sub-ROI »Osteotomiespalt«).

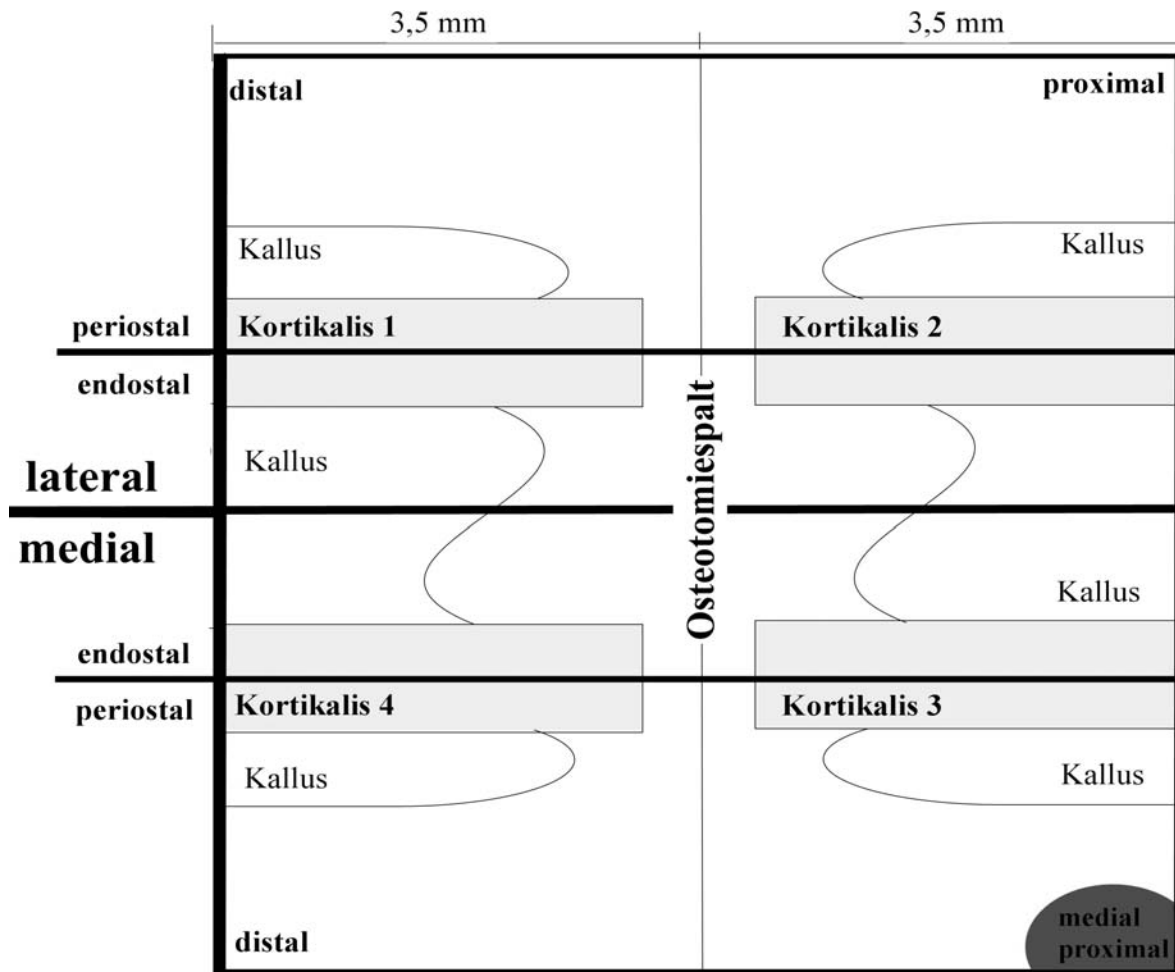


Abb. 9: Schematische Darstellung der Gesamt-ROI

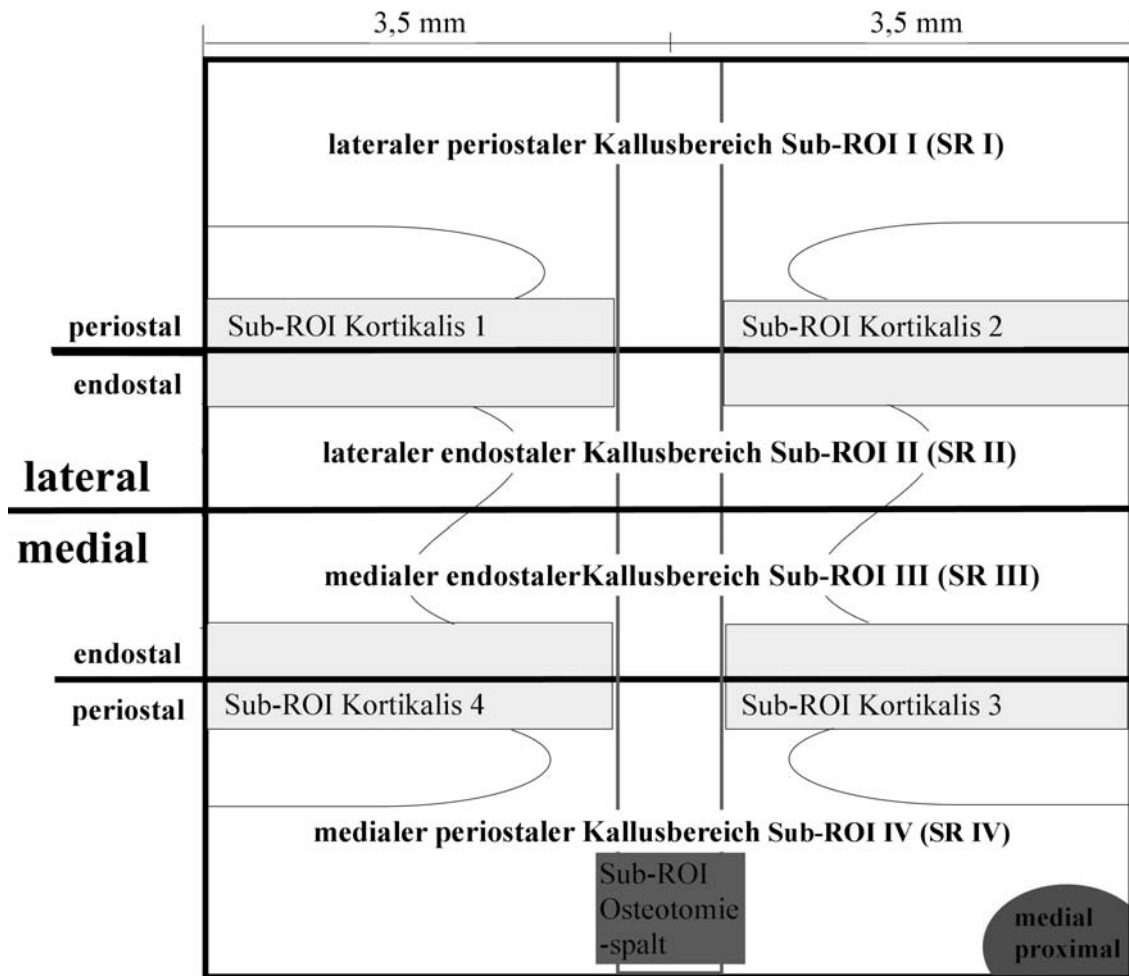


Abb. 10: Schematische Darstellung der Sub-ROIs

Innerhalb der so normierten ROI konnte im Folgenden der mediale und laterale periostale und endostale Kallusbereich, der Osteotomiespalt sowie die Kortikalis qualitativ und quantitativ ausgewertet werden.

3.7.2 Deskriptive Auswertungen

Radiologisches Bildmaterial

Die Analyse des radiologischen Bildmaterials erfolgte durch eine vergleichende optische Betrachtung der Röntgenbilder aller Tiere der Studie. Verglichen wurde zwischen den Zeitpunkten d_0 (Tag der Osteotomie) und d_{14} (Tag der Euthanasie). Untersucht und beurteilt wurden hierbei die folgenden Punkte:

- das Profil der Kortikalis mit etwaigen Dislokationen
- Auftreten, Entwicklung und Ausdehnung endostalen und periostalen Kallusgewebes
- die Weite des Osteotomiespaltes

Histologische Präparate

Die deskriptive Auswertung wurde an jeweils acht histologischen Präparaten/Tieren der Movat Pentachrom gefärbten Präparate der Medium- bzw. OPC-Gruppe durchgeführt. Bewertet wurden Struktur und Kontur der Kortikalis, die Ausdehnung und Zusammensetzung des endostalen und periostalen Kallusgewebes sowie die Gewebestrukturen des Osteotomiespaltes. Zur Beurteilung einer eventuellen Erweiterung des Osteotomiespaltes wurde ein Lineal so auf den Objektträger platziert, dass die Skala im mikroskopischen Bild zu erkennen war. Als Erweiterung des Osteotomiespaltes wurde eine Distanz über 0,5 mm zwischen den proximalen und distalen Fragmentenden der lateralen respektive medialen Kortikalis definiert. Entsprechend der kortikalen Segmentierung (siehe 3.7.1) wurden die Kallusbereiche für die deskriptive Analyse in die Abschnitte »periostaler Kallus 1 - 4« eingeteilt. Für die Untersuchung wurde der Markraum bzw. der endostale Kallusbereich in einen proximalen und distalen Abschnitt gegliedert (siehe auch 4.2.2/Abb. 13). Die Beurteilung der kortikalen Ränder erfolgte, ausgehend vom Osteotomiespalt, periostal bis zu den einsetzenden Kallusauflagerungen. Entsprechend wurden die endostalen kortikalen Ränder bis zur Grenze eventuell auftretenden endostalen Kallusgewebes analysiert. Darüber hinaus erfolgte eine Beurteilung der Kortikalistränder auf Seiten des Osteotomiespaltes.

3.7.3 Histomorphometrische Auswertung

Die gefärbten Schnittpräparate des Femurs wurden histomorphometrisch mit Hilfe der computergestützten Analyse-Software KS Run 400 (Version 3.0, Fa. Zeiss Kontron Elektronik GmbH, Eching/Deutschland) ausgewertet. So konnte eine qualitative Gewebe-Typisierung und quantitative Bestimmung von Flächen und Flächeninhalten der angefertigten Präparate durchgeführt werden. Hierzu wurden eigens erstellte Programme eingesetzt, welche je nach angewandter Färbetechnik abgewandelt wurden. Das jeweilige Programm konnte bestimmte Gewebetypen bzw. Flächen anhand unterschiedlicher Farbpixel detektieren und kategorisieren. Neben der Dokumentation der absoluten Flächenenergebnisse in [mm²], erfolgte auf deren Basis die Berechnung der entsprechenden Flächenanteile in [%], bezogen auf die jeweilig analysierte Gesamtfläche. Anhand der Software wurden pro Tier die wie folgend gefärbten Schnittpräparate ausgewertet:

Kollagen Typ II:	1 Schnittpräparat
Movat Pentachrom:	1 Schnittpräparat
Saffranin Orange/von Kossa:	4 Schnittpräparate

Aus den vier Einzelergebnissen der Safranin Orange/von Kossa (SvK)-Auswertung eines jeden Tieres wurde der Mittelwert gebildet und dieser in die weitere Datenverarbeitung einbezogen. Die Anzahl der zur Auswertung herangezogenen Präparate eines Tieres konnten sich dabei aufgrund von Ausfällen während der Herstellung der Schnittpräparate unterscheiden.

Vor Beginn der Auswertung wurden die Schnittpräparate zunächst mit Hilfe eines Mikroskopes und einer computergestützten Software (Axio Vision) digitalisiert. Eine mit dem Mikroskop verbundene und mit der Software vernetzte hochauflösende Digital-Kamera scannt das histologische Präparat innerhalb eines benutzerdefinierten Bereiches mit einer festgelegten Vergrößerung ein. Digitalisiert wurde hier der Bereich zwischen der Aussenkante der beiden inneren KD (KD 2 & 3), über die gesamte Breite des Präparates in 2,5facher Vergrößerung. Darüber hinaus wurde in jedes gescannte Präparat anhand des Programms ein Maßstabsbalken eingefügt. Die Präparate konnten nun innerhalb des Analyse-Programms »KS Run 400« einzeln aufgerufen und ausgewertet werden. Dabei erfolgte zunächst die Kalibrierung des Systems anhand des Maßstabsbalkens. Im Anschluss

daran konnte die ROI definiert werden. Hierzu wurden in Höhe des Osteotomiespaltes der Gesamtdurchmesser der Kortikalis aus den beiden Einzeldurchmesser proximal und distal des Osteotomiespaltes, der Gesamtdurchmesser des Kallus sowie der maximale Durchmesser des knöchernen Kallus festgelegt. Ebenso wurde die maximale Weite des Osteotomiespaltes im Bereich der medialen und lateralen kortikalen Enden bestimmt. Ferner wurde die Mediane des proximalen und distalen Markraums wie auch der lateralen und medialen Kortikalis definiert. Aus diesen Angaben errechnete das Programm die Fläche der Gesamt-ROI und unterteilte diese in Sub-ROIs entsprechend Kapitel 3.7.1 (siehe Abb. 9 und 10). Die Länge der ROI wurde im Vorfeld in das Makro definiert und so von dem Programm berücksichtigt. Aufgrund der unregelmäßigen Ausdehnung des Kallusbereiches medial und lateral, beinhaltete die auf Basis der erhobenen Daten errechnete ROI auch umgebende Weichteilstrukturen (z.B. Muskelgewebe), die nicht in die Auswertung mit eingehen sollten. Diese Areale mussten als »Leerräume« definiert werden. Hierzu wurden zunächst die einzelnen Abschnitte der Kortikalis manuell umzeichnet und so vom Programm gelb markiert. Im folgenden Auswertungsschritt konnten nun die als »Leerräume« zu bestimmenden Bereiche umfahren und durch die Software von der Auswertung ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurden solche Areale als »Leerräume« definiert, bei denen es sich um Artefakte handelte, welche bei der Anfertigung der Schnittpräparate entstanden waren. Nach manueller Markierung des Osteotomiespaltes erfolgte die Detektion und Kategorisierung einzelner Gewebetypen in Abhängigkeit ihrer Färbung. Bei den nach SvK gefärbten Präparaten wurden schwarz gefärbte Bereiche als mineralisiertes Gewebe, rote und rötliche Bereiche als Bindegewebe und leuchtend rot gefärbte Areale, unter Berücksichtigung weiterer morphologischer Kriterien, als Knorpel erkannt. Da sich durch diese Färbetechnik jedoch auch das Knochenmark in rötlichen Farbabstufungen darstellt, musste dieses durch manuelle Korrektur von der Bindegewebs-Auswertung ausgeschlossen werden. In den Kollagen Typ II gefärbten Knochenschnitten detektierte das Programm alle intensiv rosa erscheinenden Areale als Kollagen Typ II. Bei der Auswertung der Movat Pentachrom gefärbten Präparate mussten die knöchernen Areale manuell umfahren werden, da eine Segmentierung des Knochengewebes durch das Programm hier nicht möglich war. Das Bindegewebe wurde hingegen durch die Software detektiert. Zur Berechnung der endostalen und periostalen Kallusfläche und der darin enthaltenen Gewebestrukturen wurden die entsprechenden Kallusbereiche per Hand eingezeichnet.

Von den errechneten Daten der Analyse-Software wurden in die weitere Auswertung einbezogen:

- die Gesamtfläche der ROI [mm²]
- die Gesamtfläche [mm²] an:
 - a) Knochen
 - b) mineralisierter Knochen
 - c) Bindegewebe
 - d) Knorpel
- die Knochenflächen des endostalen und periostalen Kallus [mm²] inklusive enthaltenem Bindegewebe und Knorpel, zusätzlich eingeteilt in laterale und mediale endostale/periostale Kallusfläche in [mm²] und [%]
- die mineralisierte Knochenfläche des endostalen und periostalen Kallus in [mm²] und [%], exklusive Bindegewebe und Knorpel, zusätzlich eingeteilt in laterale und mediale endostale/periostale mineralisierte Kallusfläche in [mm²] und [%]
- die Bindegewebsfläche des end- und periostalen Kallus in [mm²] und [%]
- die Knorpelfläche des end- und periostalen Kallus in [mm²] und [%]
- der Anteil Kollagen Typ II am endostalen und periostalen Kallus in [%]
- zur Bestimmung der Osteoklasten- und Gefäßdichte (3.7.4. *Histologische Auswertung*) die Knochen- und Bindegewebsflächen des endostalen und periostalen Kallus sowie des Osteotomiespaltes in [mm²] in der Movat Pentachrom-Auswertung.

3.7.4 Histologische Auswertung

Anzahl/Dichte aktiver Osteoklasten

Mit Hilfe der TRAP angefärbten histologischen Knochen-Schnittpräparate (siehe 3.6.4) erfolgte eine manuelle, lichtmikroskopische Auszählung der aktiven Osteoklasten. Um dabei eine standardisierte Untersuchung entsprechend der festgelegten ROI zu erhalten, wurde eine dünne Plexiglasscheibe auf das Präparat gelegt, deren Länge mit 7 mm der Länge der Gesamt-ROI genau entsprach. Eine Markierung auf der Hälfte der Gesamtlänge (3,5 mm) diente dabei der Justierung der Schablone in der Medianen des Osteotomiespaltes. Die mediale und laterale Begrenzung erfolgte optisch entlang der äußeren Kallusgrenzen. Die Auszählung wurde unter dem Mikroskop bei 20facher Vergrößerung durchgeführt. Als Osteoklasten wurden die Zellen gezählt, welche eine TRAP-positive, intensive rosa Färbung aufwiesen, zudem mindestens zwei Zellkerne zeigten und unmittelbaren Kontakt zum Knochen hatten. Um mögliche Fehler einer manuellen Auswertung zu minimieren, wurde die Zählung in den einzelnen Arealen respektive Sub-ROIs jeweils dreimal wiederholt, der anschließend daraus errechnete Mittelwert pro Tier ging in die Auswertung ein.

Die Auszählung erfolgte im lateralen und medialen, end- und periostalen Kallusbereich (SR I-IV), innerhalb der kortikalen Sub-ROIs »Kortikalis 1-4« je endostal und periostal sowie der Sub-ROI »Osteotomiespalt« (siehe Abb. 10). Da es auf kortikaler Seite im Kallusgebiet (SR I-IV) dabei zu einer Überlagerung der Auswertungsbereiche kam, wurde im Anschluss an die Zählung rechnerisch die Differenz zwischen den jeweiligen Ergebnissen aus SR I-IV und dem je entsprechenden kortikalen Abschnitt ermittelt, um die Osteoklastenzahl der einzelnen Kalli möglichst exakt zu bestimmen. Durch Addition der jeweils endostalen (SR II und III) und periostalen (SR I und IV) Ergebnisse in den einzelnen Kalli konnten die Osteoklasten-Gesamtzahlen im endostalen und periostalen Kallus erhoben werden. Entsprechend erfolgte die Ermittlung der Osteoklastenzahlen im gesamten lateralen (SR I und II) und medialen (SR III und IV) Kallus durch Addition der lateralen/medialen jeweils end- und periostalen Ergebnisse. Ebenso konnte die Summe der Osteoklasten innerhalb der Kortikalis durch Addition der entsprechenden Einzelergebnisse aus Sub-ROI Kortikalis »1-4« errechnet werden.

Die Zahl der Osteoklasten wurde in der weiteren Auswertung der Ergebnisse nicht absolut angegeben, es erfolgte statt dessen die Ermittlung der Osteoklastendichte pro Quadratmillimeter Knochenfläche. Diese ergab sich aus der Gesamtzahl an Osteoklasten im jeweilig betrachteten Areal in Bezug auf den knöchernen Bereich der entsprechenden Auswertungsfläche in [mm²]. Die zur Dichte-Berechnung verwendeten knöchernen Flächen wurden histomorphometrisch anhand der Movat-Pentachrom gefärbten Schnittpräparate (siehe 3.7.3. *Histomorphometrische Auswertung*) ermittelt.

Anzahl/Dichte der Gefäße

Für die Zählung der Gefäße wurden die immunhistochemisch α -SMA gefärbten Schnittpräparate herangezogen. Pro Tier kam je ein Schnitt zur Auswertung. Die Präparate wurden entsprechend der in 3.7.2 beschriebenen Vorgehensweise zunächst digitalisiert und mit einem Maßstabsbalken versehen. Um eine standardisierte Auszählung zu ermöglichen, wurde die ROI mit Hilfe eines Bildbearbeitungsprogrammes (Adobe Photoshop, Version 7.0) manuell eingezeichnet. Der Maßstabsbalken diente hierbei der exakten Vermessung und Lokalisation der ROI-Begrenzungen. Darüber hinaus konnten anhand des Messbalkens die Gefäße nach Größe unterschieden werden. Als große Gefäße wurden dabei solche über 40 μ m, als kleine Gefäße solche unter 40 μ m definiert. Die Zählung erfolgte innerhalb der Bildbearbeitungs-Software in den abgegrenzten Sub-ROIs. Dabei wurden α -SMA positive Strukturen und/oder Endothelzellen enthaltende Strukturen als Gefäße gezählt (siehe Abb. 11). Die zusätzliche Darstellung eines Lumens konnte die Identifikation vereinfachen, war aber nicht Voraussetzung. Um eine Mehrfachzählung zu verhindern, wurden die bereits erfassten Gefäße mit Hilfe der Software farblich markiert.

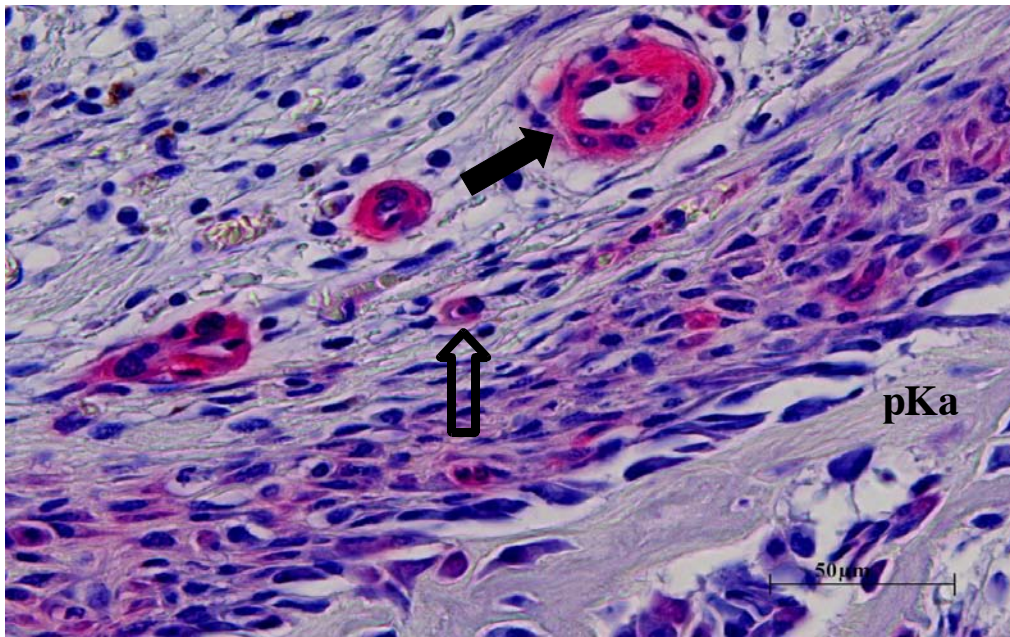


Abb. 11: Gefäß über (Pfeil) sowie unter (leerer Pfeil) $40\mu\text{m}$ am Rand des periostalen Kallus (**pKa**) (α -SMA, Medium-Tier)

Die Gesamtzahl an Gefäßen lateral (SR I und II) respektive medial (SR III und IV) wurde durch Addition der Auswertungsbereiche im endostalen und periostalen Bindegewebe errechnet. Die Anzahl der Gefäße im gesamten endostalen (SR II und III) respektive periostalen (SR I und IV) Bindegewebe des Kallus wurde durch Addition der endostalen/periostalen lateralen und medialen Ergebnisse ermittelt. Bei Betrachtung der Ergebnisse aus dem Bereich des Osteotomiespaltes musste die Überlagerung dieser Sub-ROI mit denen des endostalen (SR II und III) und periostalen (SR I und IV) Kallusbereiches berücksichtigt werden.

Zur weiteren Verarbeitung der erhobenen Daten wurde die Gefäßdichte pro mm^2 Bindegewebsfläche bestimmt. Hierzu wurde die Gefäßanzahl [n] durch die der jeweiligen Auswertungsfläche zugehörigen Bindegewebsfläche [mm^2] der Sub-ROI aus der Movat-Pentachrom Auswertung dividiert.

3.7.5 Statistik

Die statistische Bearbeitung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Datenverarbeitungsprogrammes SPSS für Windows 14.0 (SPSS Deutschland GmbH, München/Deutschland).

Zum Vergleich der voneinander unabhängigen Tiergruppen (Medium-Gruppe, OPC-Gruppe) wurde der Mann-Whitney-U-Test (nicht parametrischer 2-Stichproben-Test) herangezogen, da bei den vorliegenden Parameter nicht von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha = 0,05$ wurde angenommen. Dies entspricht einem Signifikanzniveau von 5 %. Die statistischen Ergebnisse wurden in Form von Tabellen dargestellt. Berücksichtigt wurden dabei der Median, Minimum- und Maximum-Werte, sowie der p-Wert. Darüber hinaus erfolgte eine graphische Darstellung der statistischen Ergebnisse mittels Boxplots.

Der Boxplot, oder auch Kasten-Diagramm, ist die schematische Darstellung einer Häufigkeitsverteilung (siehe Abb. 12). Er veranschaulicht sowohl die Verteilung, also auch die Lage der Werte einer Variablen. Er wird in Quartile entsprechend einem 25 %-, 50 %-, 75 %-, 100 %-Perzentil eingeteilt. Zwischen dem ersten und dritten Quartil liegt die Box. Dem entsprechend entfallen in diesen Bereich die mittleren 50% der Werte. Der waagerechte Strich innerhalb der Box bezeichnet den Median (50% Perzentil), das heisst die Hälfte aller Daten liegt über diesem Punkt, die andere Hälfte darunter. Die der Box unmittelbar anschließenden senkrechten Linien verdeutlichen, wie weit die restlichen 50 % der Werte streuen. Die Länge der Linien entspricht dabei maximal der 1,5fachen Boxenlänge. Der waagerechte Strich am Ende jeder Linie wird als »Whisker« bezeichnet. Er stellt den größten bzw. kleinsten Wert der Stichprobe dar, welcher noch kein Ausreißer oder Extremwert ist. Als Ausreißer werden die Werte benannt, welche zwischen der 1,5fachen und 3fachen Boxenhöhe, ausgehend vom der oberen/unteren Begrenzung der Box, entfernt liegen. Sie werden mit einem Kreis gekennzeichnet. Liegt ein Wert mehr als die 3fache Boxenhöhe über dem 75 %-Perzentil bzw. unter dem 25 %-Perzentil, bezeichnet man ihn als Extremwert, er wird in Form eines Sternes dargestellt. (Brosius, 2004)

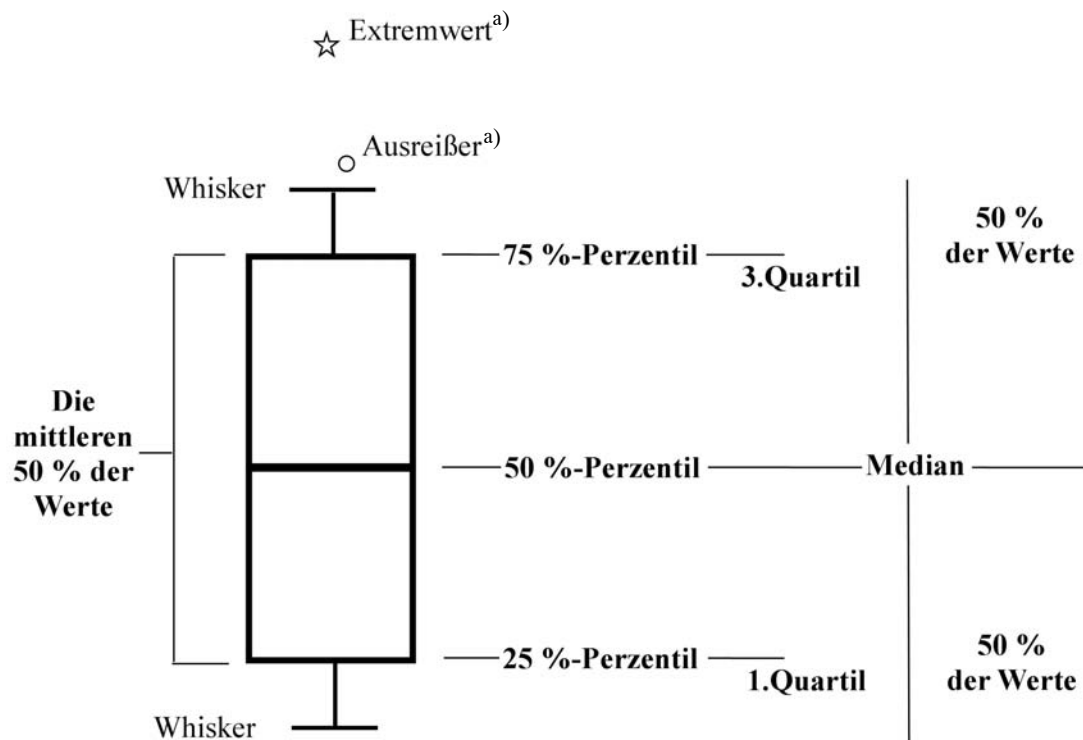


Abb. 12: Schematische Darstellung eines Boxplot-Diagramms

^{a)} Die Darstellungen von Ausreißer und Extremwert sind symbolisch zu betrachten. Sie zeigen daher hier nicht die definitionsgemäßen Abstände.

4 Ergebnisse

4.1 Operationsverlauf und Tierkontrolle

Die Tiere beider Gruppen kamen wenige Minuten nach dem Ende der vorgenommenen Eingriffe zu Bewusstsein und erholten sich innerhalb weniger Stunden völlig. Die osteotomierte, mit Fixateur externe versorgte Hintergliedmaße wurde von allen Tieren (n = 32) unmittelbar nach der Operation wieder belastet. Keines der in der Studie eingesetzten Tiere starb nach den Eingriffen oder musste aus gesundheitlichen Gründen vor Ende des 14. Tages nach Osteotomie euthanasiert werden.

Die Futteraufnahme der Tiere war post operationem leicht vermindert, dementsprechend sank ihr **Körpergewicht** im Median etwas ab. In der OPC-Gruppe konnte eine Gewichtszunahme bereits zwischen Transplantation der Zell-/Medium-Suspension und Tag 7 post operationem festgestellt werden. Die Tiere der Medium-Gruppe verzeichneten zwischen Tag 7 und Tag 14 nach Osteotomie eine erste Zunahme des Körpergewichtes (siehe Tabelle 1). Mit Ausnahme des Körpermasse an Tag 14 nach Osteotomie ($p = 0,01$), bestand hier kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten beider Tiergruppen.

Tabelle 1: Körpergewicht [g] der OPC- und Medium-Gruppe im Verlauf der Studie

Gruppe		Median		Minimum		Maximum		p-Wert
		OPC	Medium	OPC	Medium	OPC	Medium	
Zellentnahme	g	425,0	414,5	407,0	397,0	442,0	453,0	0,35
Osteotomie	g	451,0	446,5	435,0	410,0	460,0	460,0	0,18
Transplantation	g	431,0	428,5	407,0	383,0	460,0	460,0	0,21
Tag 7 n.O.	g	442,0	423,5	418,0	387,0	483,0	470,0	0,47
Tag 14 n.O.	g	459,5	431,5	441,0	373,0	497,0	487,0	0,01

n.O. = nach Osteotomie

(OPC: n = 16, Medium: n = 16)

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, wiesen die Tiere zu keinem Zeitpunkt der Studie eine erhöhte **Körpertemperatur** (KT) auf (physiologische KT: 36,5-37,9 °C). Die Temperaturkontrolle am Tag der Osteotomie sowie am Tag 7 und 14 nach Osteotomie erbrachte in der Medium-Gruppe eine im Median leicht erniedrigte KT. Der Gruppenunterschied war dabei jeweils signifikant ($p_{d7/d14} < 0,01$).

Tabelle 2: Körpertemperatur [C°] beider Tiergruppen im Verlauf der Studie

Gruppe		Median		Minimum		Maximum		p-Wert
		OPC	Medium	OPC	Medium	OPC	Medium	
Zellentnahme	°C	37,0	36,9	36,0	35,8	38,0	37,7	0,64
Osteotomie	°C	36,8	36,1	35,2	33,7	38,1	37,5	<0,01
Transplantation	°C	36,6	36,7	36,0	35,2	37,2	37,4	0,75
Tag 7 n.O.	°C	37,1	35,8	35,4	34,9	37,4	33,5	<0,01
Tag 14 n.O.	°C	36,8	36,0	36,3	33,5	37,6	36,6	<0,01

n.O. = nach Osteotomie

(OPC: n = 16, Medium: n = 16)

4.2 Ergebnisse der deskriptiven Auswertung

4.2.1 Radiologische Aufnahmen

Die während der operativen Nachsorge bzw. wöchentlichen Nachkontrolle angefertigten Röntgenaufnahmen dienten der Bewertung und Kontrolle des Heilungsverlaufs. Um zu beurteilen, in wie weit ein radiologisch sichtbarer Heilungsfortschritt binnen der ersten 14 Tage p.o. stattgefunden hat, wurde eine vergleichende radiologische Untersuchung durchgeführt. Verglichen wurden jeweils die Röntgenbilder, welche unmittelbar nach der Osteotomie (d_0) entstanden, mit denen, die am Tag der Euthanasie (d_{14}) der Tiere angefertigt wurden. Die folgende Ergebnisdarstellung bezieht sich auf die dabei erfassten Veränderungen ausgehend von d_0 .

Bei allen Tieren war 14 Tage nach der Operation der Osteotomiespalt noch deutlich zu erkennen. Auf periostaler Seite der lateralen und medialen Kortikalis waren nach zwei Wochen in beiden Gruppen außerhalb des thermisch zerstörten Periostbereiches Verschattungen sichtbar, welche auf die Bildung von röntgendichtem Kallusgewebe zu-

rückzuführen waren. Diffuse, wolkige Verschattungen an den zur Grenze des gekautherten Bereiches gerichteten periostalen Kallusstrukturen ließen hier eine beginnende Mineralisation des Gewebes vermuten. Dieses Phänomen trat innerhalb beider Gruppen gleichermaßen in Erscheinung. Anzeichen einer periostalen und/oder endostalen Überbrückung des Osteotomiespaltes mit röntgendichtem Kallusgewebe bestanden in keiner der beiden Tiergruppen.

4.2.2 Deskriptive Histologie

Im Rahmen der deskriptiven, histologischen Untersuchung wurde von je acht Tieren der OPC- und Medium-Gruppe ein Movat Pentachrom gefärbtes Schnittpräparat lichtmikroskopisch analysiert. Abbildung 13 veranschaulicht exemplarisch den dabei im Mikroskop sichtbaren und zu beurteilenden Bildausschnitt. Die Kortikalis (K) stellte sich in Form von vier gelb angefärbten, horizontal verlaufenden, rechteckigen Balken dar. Diese Unterteilung in vier kortikale Teilbereiche (»K 1 – 4«) sowie deren rechteckige Form, entstand durch die longitudinale Schnittführung bei der Herstellung der Präparate. Der in Längsrichtung durchtrennte Markraum teilte dabei die Kortikalis optisch in einen medialen (»K 3 + 4«) und einen lateralen (»K 1 + 2«) Abschnitt. Der senkrecht verlaufende Osteotomiespalt im Zentrum des Schnittpräparates (siehe Abb. 13) trennte die mediale respektive laterale Kortikalis in je ein proximales (»K 3« bzw. »K 2«) und distales (»K 4« bzw. K 1«) Segment.

Unmittelbar angrenzend an die periostalen Kortikalisbereiche stellte sich parallel knöchernes Kallusgewebe in Form unterschiedlich prominenter gelber Strukturen dar, welche von proximal und distal in Richtung des Osteotomiespaltes lawinenartig ausliefen. Im proximalen und distalen Markraum waren in unterschiedlicher Menge gelb angefärbte, unregelmäßige Balkenstrukturen erkennbar, welche sich ebenfalls in Richtung des Osteotomiespaltes ausdehnten. Hierbei handelte es sich um endostales knöchernes Kallusgewebe (siehe Abb. 13).

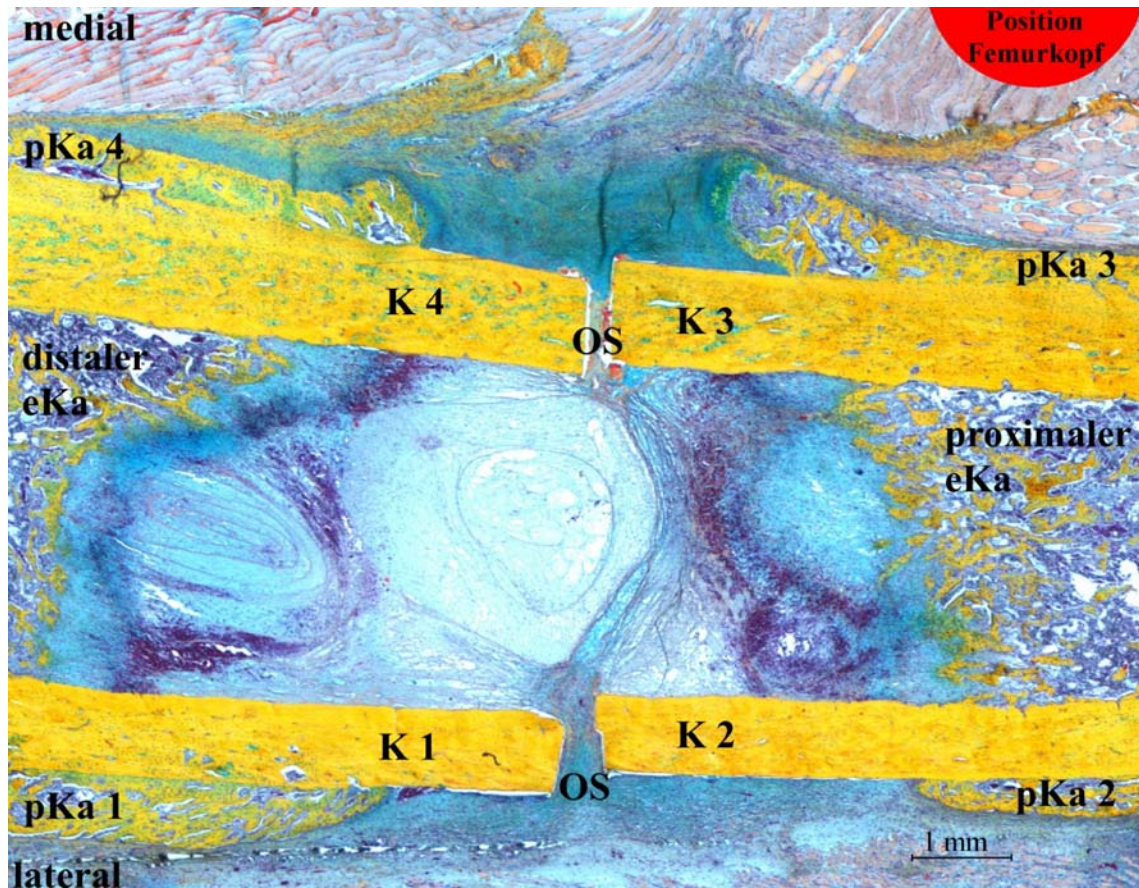


Abb. 13: Übersichts-Darstellung eines Femur-Schnittpräparates, mit Kennzeichnung der Auswertungs-Areale der deskriptiven Histologie: **K 1-4** (Kortikalis 1-4), **pKa 1-4** (periostaler Kallus 1-4), **eKa** (endostaler Kallusbereich), **OS** (Osteotomiespalt). Der Halbkreis, oben rechts im Bildrand, markiert exemplarisch die Seitenposition des Femurkopfes. (Movat Pentachrom, OPC-Tier)

Struktur der Kortikalis

In der Übersicht wies die Kortikalis zunächst allgemein horizontale, leicht wellig verlaufende, feine Linien auf, in deren Verlaufsrichtung zahlreich elliptische dunkelgraue Zellen zu sehen waren. Bei den ellipsenförmigen Zellen handelte es sich um Osteozyten, welche, in schmalen Lakunen gelagert, entlang der Lamellenstruktur angeordnet waren.

Die *laterale* wie auch die *mediale Kortikalis* wiesen in beiden Tiergruppen eine regelmäßige und kompakte Struktur auf. Die Maserung der kortikalen Abschnitte zeigte einen gleichmäßigen, longitudinalen Verlauf und war nur vereinzelt durch Gefäßstrukturen unterbrochen. Die beschriebene Maserung entstand durch das Anschneiden der in Längsrichtung verlaufenden Havers'schen Systeme und Schaltlamellen des Lamellenknochen. Die längs bzw. quer angeschnittenen rötlich-violett erscheinenden Blutgefäße waren anhand von Kapillarendothelien und teilweise sichtbaren Lumen mit enthaltenen Erythrozyten gut zu identifizieren. Bei der überwiegenden Anzahl der Tiere (OPC-Gruppe: n = 7, Medium-Gruppe: n = 5) liesen sich intrakortikal lateral und medial in geringer Menge homogene, grün gefärbte Gewebeeinschlüsse in unterschiedlicher Ausprägung erkennen (Abb. 14).

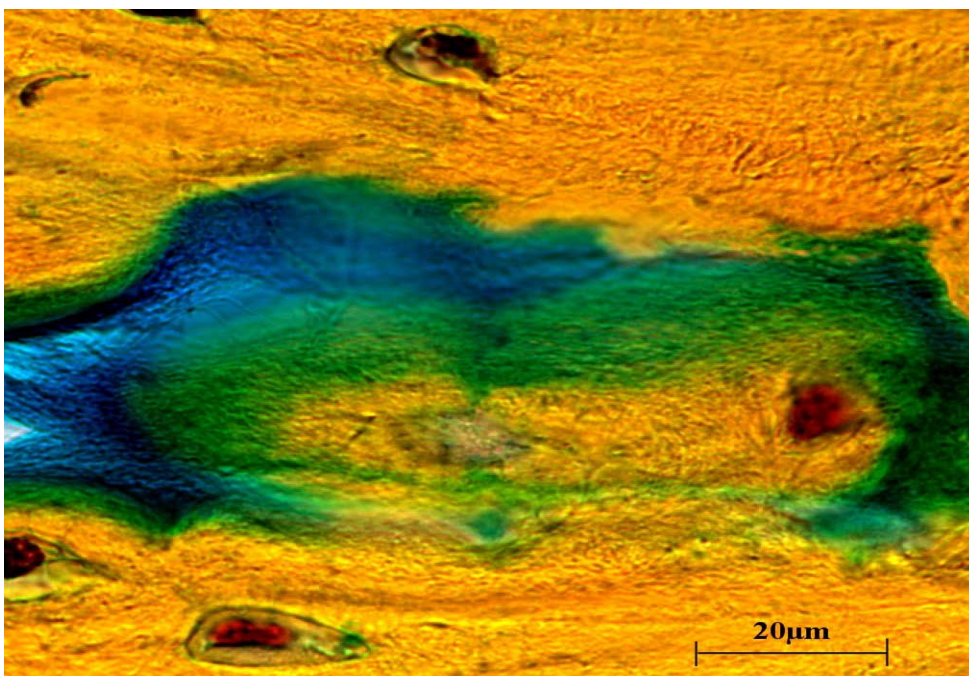


Abb. 14: Grünlicher Gewebeeinschluss in der Kortikalis (Movat Pentachrom, OPC-Tier)

Beschaffenheit der kortikalen Ränder

Beschaffenheit der endostalen kortikalen Ränder

Der endostale Rand der lateralen Kortikalis zeigte bei der Betrachtung nur geringradige Unterschiede zwischen den Tiergruppen. Die OPC-Tiere wiesen endostal lateral einen welligen Kortikalisrand auf, wohingegen der Randverlauf in der Medium-Gruppe sich überwiegend glatt darstellte. Leichte, durch Osteoklasten gekennzeichnete, osteoresorptive Vorgänge traten dabei in beiden Tiergruppen in etwa gleichem Maße auf. Der endostale Rand der medialen Kortikalis war in beiden Tiergruppen gekennzeichnet durch einen mehrheitlich glatten Verlauf ohne erkennbare Knochenresorptionen. Ein Unterschied zwischen den Tiergruppen zeigte sich jedoch hinsichtlich der kortikalen Ränder bzw. »Kanten«, welche sich unmittelbar an den Osteotomiespalt anschlossen. Wies in der OPC-Gruppe die überwiegende Anzahl der Tiere lateral und medial (proximal/distal) scharfe kortikale Kanten ohne resorptives Geschehen auf, so war innerhalb der Medium-Gruppe hier bei der Hälfte der Tiere eine Abrundung der endostalen Struktur zu erkennen. In direktem Kontakt mit dem Knochengewebe wurden in beiden Gruppen in diesem Bereich nur vereinzelt Osteoklasten gesehen.

Beschaffenheit der periostalen kortikalen Ränder

Der periostale Rand der lateralen und medialen Kortikalis stellte sich in beiden Tiergruppen überwiegend glatt dar. Sowohl in der Gruppe der OPC-Tiere, als auch in der Medium-Gruppe waren hier mehrheitlich keine Anzeichen von Knochenresorptionen zu sehen. Bei Betrachtung der kortikalen Kanten, zeigten etwa die Hälfte der OPC-Tiere lateral und medial geringfügig Abrundungen. Vereinzelt waren hier in unmittelbarer Nähe zum Knochen Osteoklasten (siehe Abb. 15) lokalisiert. In der Gruppe der Medium-Tiere hingegen stellte sich die Kortikalis auf lateraler Seite ausschließlich scharfkantig dar, es konnten hier keine Anzeichen von Osteolysen erkannt werden. Medial wiesen in etwa die Hälfte der Medium-Tiere leicht abgerundete osteotomiespaltnahe Kanten auf. Vereinzelt waren auch hier Osteoklasten in direktem Kontakt zu der knöchernen kortikalen Struktur sichtbar.

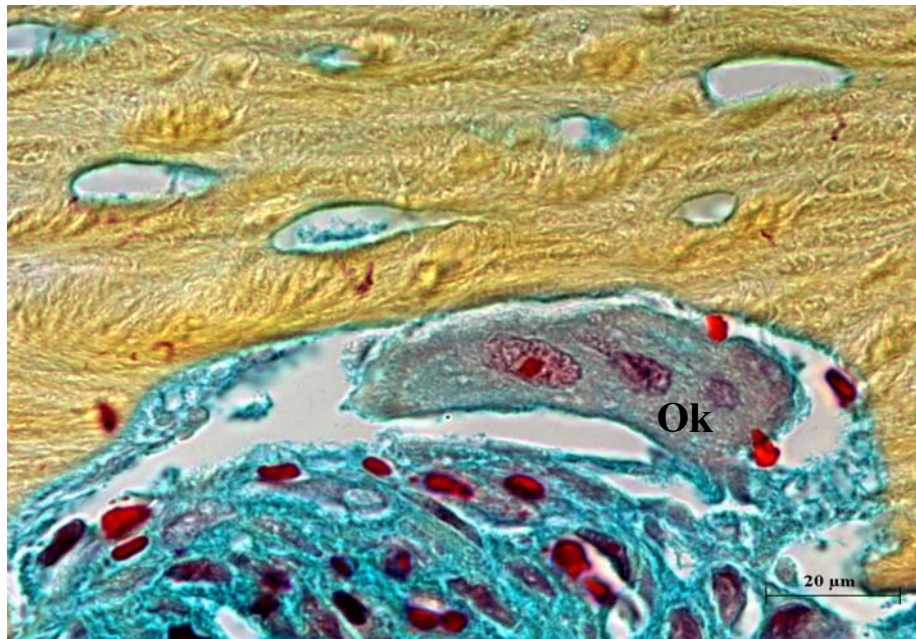


Abb. 15: Osteoklast (**Ok**) an der periostalen Kortikalis (Movat Pentachrom, OPC-Tier)

Beschaffenheit der Ränder des Osteotomiespaltes

Im Bereich der Ränder des lateralen Osteotomiespaltes war ein vorwiegend glatter Verlauf in beiden Tiergruppen proximal und distal sichtbar. Osteolytische Vorgänge konnten in keiner der beiden Gruppen gesehen werden. Entgegen der lateralen, zeigten die Ränder des medialen Osteotomiespaltes zunächst scheinbar deutliche Unterschiede im Vergleich der beiden Tiergruppen. Binnen der OPC-Gruppe waren die Osteotomiespaltränder bei nahezu allen Tieren glatt und es gab keine sichtbaren Anzeichen für Knochenresorptionen im Randbereich. Dem gegenüber zeigte in der Medium-Gruppe jedoch nur die Hälfte der Tiere auf medialer Seite glatte Osteotomiespaltränder. Die verbleibenden Tiere wiesen hier hingegen einen wellenförmigen bis leicht ackerfurchenähnlichen Rand des Osteotomiespaltes auf. Da in diesem Bereich aber keine Hinweise auf osteoresorptive Vorgänge gesehen wurden, handelte es sich hier wahrscheinlich um beim Schneiden der Präparate hervorgerufene Artefakte.

Lokalisation, Menge & Zusammensetzung des endostalen Kallusgewebes

In der Knochenmarkhöhle zeigten sich proximal und distal des Osteotomiespaltes in der Movat Pentachrom Färbung gelb-grünlich erscheinende, balkenartige Netzstrukturen in unterschiedlicher Ausdehnung, welche als Geflechtknochen identifiziert werden konnten. Der Bereich zwischen diesem knöchernen Kallusgewebe und der proximalen/distalen ROI-Begrenzung wies hämotoretikuläres Gewebe auf. Charakteristische Blutsinus, sowie Zellen der Erythropoese und vereinzelte Makrophagen konnten hier bei stärkerer Vergrößerung zwischen den Balkenstrukturen des Geflechtknochens gesehen werden. Bei den in nur sehr geringem Ausmaß sichtbaren homogenen, grünlichen Strukturen, welche sich den osteotomiespaltnahen Geflechtknochenbälkchen anschlossen, handelte es sich um Grundsubstanz hyalinen Knorpels. Angrenzend dehnten sich Bindegewebsstrukturen in Richtung des Osteotomiespaltes aus. Begleitet von Fibroblasten und Fibrozyten füllten die Fasern des Gewebes den Markraum bzw. den Osteotomiespalt (siehe *Lokalisation und Inhalt des Osteotomiespaltes*) vollständig aus.

Bei Vergleich der beiden Tiergruppen wurde erkennbar, dass sich endostales Kallusgewebe in beiden Tiergruppen proximal und distal nur fern des Osteotomiespaltes entwickelt hatte. In der Gruppe der OPC-Tiere zeigte sich dabei eine geringere Menge Geflechtknochen als in der Medium-Gruppe. Die Mehrheit der Tiere beider Gruppen wies eine den proximalen/distalen Markraum vom lateralen bis zum medialen endostalen Kortikalisrand vollständig überspannende Geflechtknochen-Brücke auf. Der Anteil sichtbaren hyalinen Knorpels glich sich in beiden Tiergruppen weitgehend. Sowohl die OPC- als auch die Medium-Tiere wiesen einen nur sehr geringen hyalinen Knorpelanteil im distalen und proximalen endostalen Kallusbereich auf. Nur vereinzelt waren in diesem Bereich auch hypertrophe Chondrozyten sichtbar. Die Tiere der OPC-Gruppe zeigten einen scheinbar strukturell kompakteren Bindegewebsanteil als die Tiere der Medium-Gruppe.

Über die genannten Strukturen hinaus waren bei nahezu allen Tieren beider Gruppen Hämatomreste im proximalen und distalen endostalen Markraum, nahe des Osteotomiespaltes, sichtbar. In der Übersicht erschienen sie als dunkel-violette, wolkige Bandstrukturen (siehe Abb. 13). Bei stärkerer Vergrößerung waren hier Erythrozyten, vereinzelt auch neutrophile Granulozyten und Makrophagen sowie Zelldetritus zu erkennen. Ein Unterschied zwischen den Tiergruppen hinsichtlich der Ausdehnung bzw. Organisation der Hämatome wurde nicht festgestellt. Auffällig war, dass vereinzelte Tiere jeder

Gruppe endostal, unmittelbar im Bereich des Osteotomiespaltes, eine blasenartige Struktur mit bindegewebiger Hülle (Bindegewebsfasern, Fibroblasten, Fibrozyten) aufwiesen (siehe Abb. 16). Sie war bei drei Tieren der OPC-Gruppe und zwei Tieren der Medium-Gruppe deutlich zu erkennen. Ihr Durchmesser erstreckte sich über die gesamte Breite des endostalen Kallusbereiches von den lateralen zu den medialen kortikalen Osteotomieenden. Im Innern der Blasenstruktur waren vereinzelt Lymphozyten und Erythrozyten zu sehen.

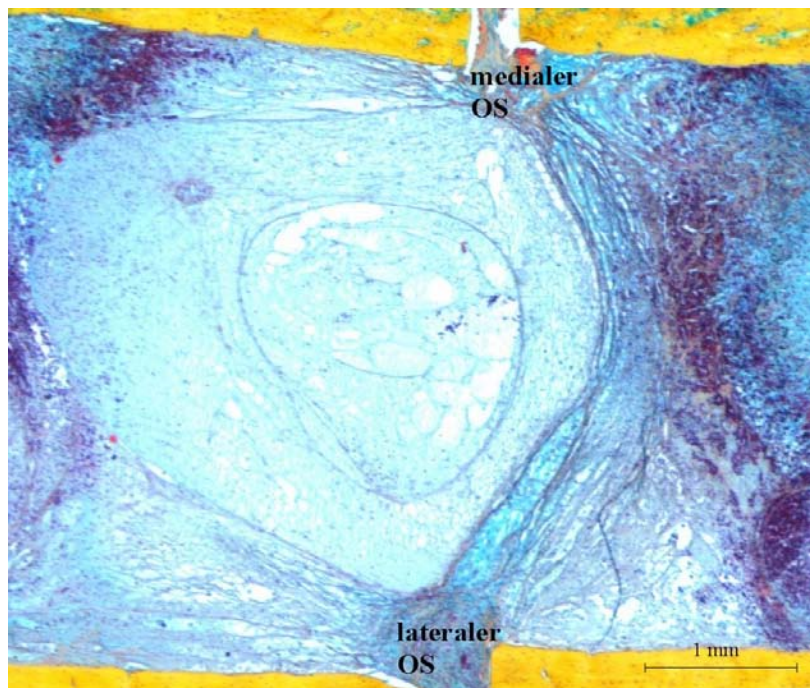


Abb. 16: Endostale Blase auf Höhe des Osteotomiespaltes (OS). (OPC-Tier, Movat Pentachrom)

Lokalisation, Menge & Zusammensetzung des periostalen Kallusgewebes

Die Entwicklung von periostalem Kallusgewebe war in beiden Tiergruppen, bei allen Tieren individuell, in unterschiedlicher Ausprägung und Menge deutlich zu erkennen. In keinem Präparat beider Tiergruppen war dabei jedoch eine Überbrückung des Osteotomiespaltes durch knöchernen Kallus zu sehen. Das Kallusgewebe dehnte sich innerhalb der ROI (siehe 3.7.1. *Festlegung der Region of Interest*) parallel der Kortikalis in Richtung des Osteotomiespaltes aus. Dabei bestand ein unmittelbarer Kontakt zur periostalen Kortikalis bis zur osteotomieseitigen Front des Kallus. Das Gewebe lief hier, ähnlich eines Lavastroms, in unterschiedlicher Nähe zum Osteotomiespalt aus (siehe Abb. 13). Der periostale Kallus setzte sich aus Geflechtknochen, hyalinem Knorpelgewebe sowie Bindegewebsstrukturen in unterschiedlicher Ausdehnung und Menge zusammen. Der Geflechtknochen war dabei anhand seiner charakteristischen, kompakten und unregelmäßigen Balkenstruktur erkennbar. Im Gegensatz zu der gleichmäßigen longitudinalen Maserung der Kortikalis erschien die Struktur des Geflechtknochens ungerichtet und durch zahlreiche Kavernen unterbrochen, an deren innerem Rand sich Osteoblasten identifizieren ließen. Die Kavernenlumen waren teilweise mit Bindegewebe gefüllt, teilweise stellten sie sich optisch »leer« dar. Hyalines Knorpelgewebe zeigte sich in den Movat Pentachrom gefärbten Schnittpräparaten mit einer leuchtend grünen Farbe. Da die Kollagenfasern dieses Gewebes das auftreffende Licht in exakt der gleichen Weise brechen wie dessen Grundsubstanz, sind sie lichtmikroskopisch nicht zu differenzieren. Kollagen-Fasern und Grundsubstanz des hyalinen Knorpels waren dementsprechend als grüne, homogene, milchglasähnliche Flächenstrukturen im mikroskopischen Bild zu sehen. Gelbliche Verfärbungen dieser Gewebestruktur wiesen auf eine beginnende Mineralisation des Knorpelgewebes hin. Das chondrale Gewebe überzog dabei oftmals kappenartig die osteotomieseitige Kallusfront (siehe Abb. 17). Vollständig von der Knorpelmatrix umgeben waren in unterschiedlicher Menge hypertrophe Chondrozyten zu sehen. Die zart rosa gefärbten Zellkerne waren in Knorpelhöhlen eingebettet und von einer leuchtend grünen Knorpelkapsel umgeben gut zu erkennen. Sie ordneten sich vereinzelt oder in Form von Säulenknorpel (siehe Abb. 17 und 18) nahe des Geflechtknochens zumeist an der Kallusfront an.

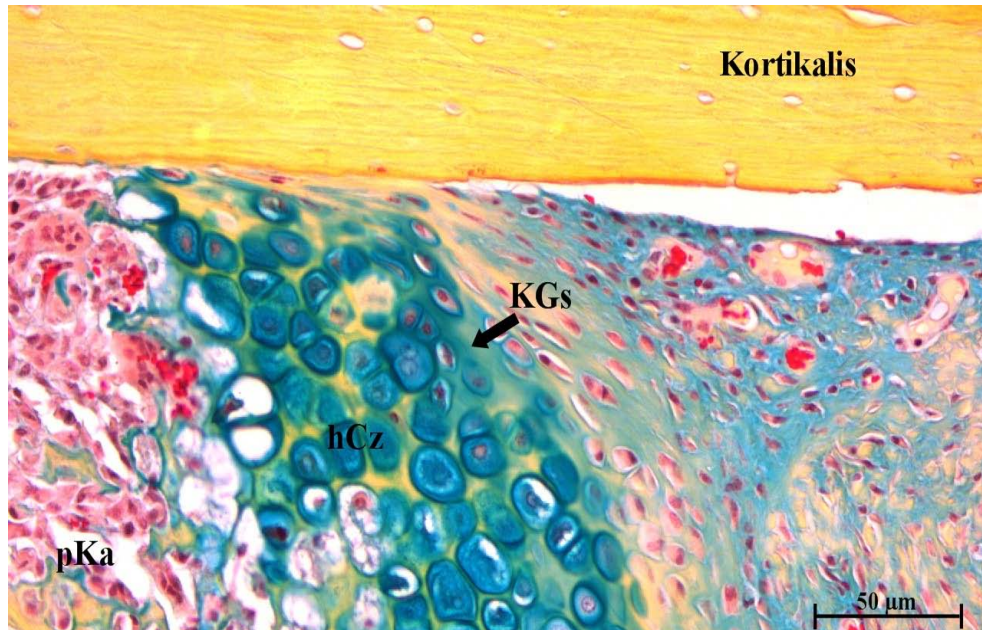


Abb. 17: Ausschnitt einer Knorpelkappe an der periostalen Kallusfront (**pKa**) mit solitären sowie in Form von Säulenknorpel angeordneten hypertrophen Chondrozyten (**hCz**), umgeben von Knorpelgrundsubstanz (**KGs**). (Movat Pentachrom, OPC-Tier)

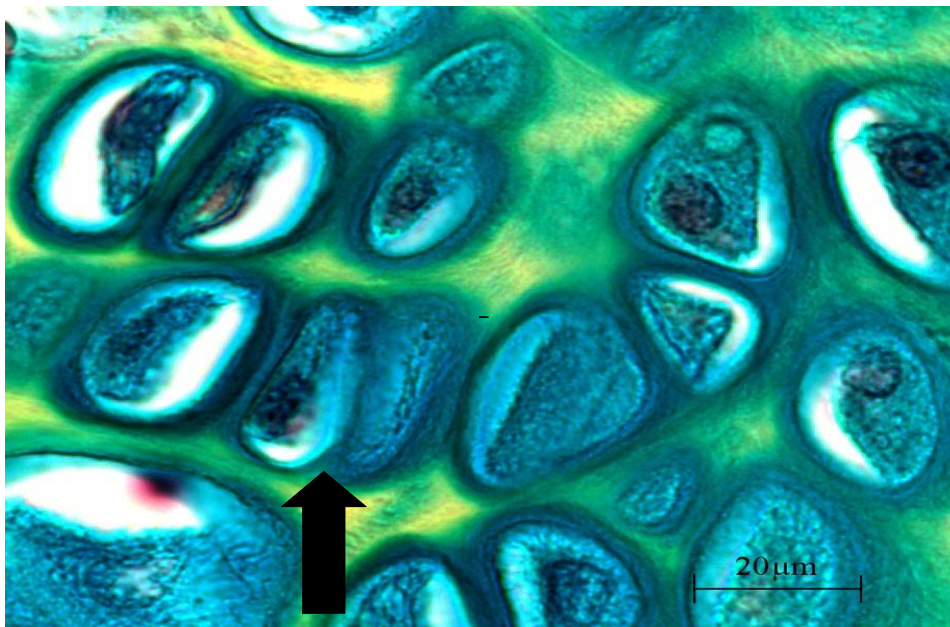


Abb. 18: Säulenförmig angeordnete hypertrophe Chondrozyten (Pfeil) im Bereich des periostalen Kallus. (Movat Pentachrom, OPC-Tier)

Die Oberfläche des periostalen Kallusgewebes wurde in allen Präparaten von einer mehrlagigen, zellreichen Schicht unterschiedlicher Breite überzogen, die bei stärkerer Vergrößerung als Bindegewebe identifiziert werden konnte. Das Gewebe stellten sich in Form von blau-violetten Bindegewebsfasern mit Fibroblasten und Fibrozyten dar. Auch die kallusfreien periostalen Areale wiesen Bindegewebsstrukturen auf. Die Fasern des Gewebes zogen sich entlang der Oberfläche des Kallusgewebes sowie der Kortikalisoberfläche in Richtung des Osteotomiespaltes.

Die Betrachtung der Schnittpräparate hinsichtlich der Lokalisation (Reichweite) des periostalen Kallusgewebes ergab, dass dieses in der Gruppe der OPC-Tiere auf lateraler Seite proximal und distal bis zum thermisch zerstörten Periostbereich, fern des Osteotomiespaltes, reichte. Medial entwickelte sich der Kallus bei der Hälfte der OPC-Tiere bis in die Nähe des Osteotomiespaltes, bei den verbleibenden Tieren bis an die Grenze des intakten Periosts. Demgegenüber war innerhalb der Medium-Gruppe bei allen Tieren lateral und medial Kallusgewebe nur bis an die Grenze des kauterisierten Periost-Areals fern des Osteotomiespaltes zu lokalisieren. Neben der unterschiedlichen Reichweite entlang der Kortikalis bestanden ferner Abweichungen bezüglich der Kallusmenge. In der allgemeinen Untersuchung aller Präparate wurde festgestellt, dass sich innerhalb von zwei Wochen p.o., unabhängig von der Tiergruppe, auf medialer Seite des Knochens etwas mehr Kallusgewebe entwickelte als lateral. Im Gruppenvergleich wurde überdies deutlich, dass sich in der Versuchsgruppe (OPC), vor allem medial, mehr Kallusgewebe bildete als in der Kontrollgruppe (Medium). Innerhalb der OPC-Gruppe wurde medial etwas mehr Geflechtknochen beobachtet als lateral. Der Vergleich zwischen lateralem und medialem periostalen Kallus in der Medium-Gruppe erbrachte in etwa die gleichen Mengen Geflechtknochen auf beiden Seiten. Die genauere Untersuchung des periostalen Kallus in Hinblick auf die Menge an hyalinem Knorpel zeigte, dass vor allem auf medialer Seite des Knochens in der OPC-Gruppe eine deutlich größere Menge dieses Gewebetyps vorhanden war als in der Medium-Gruppe. Auf lateraler Seite erbrachte die Untersuchung in etwa gleiche Mengen an hyalinem Knorpel in beiden Tiergruppen. Das hyaline Knorpelgewebe wurde in der OPC-Gruppe sowie auch in der Medium-Gruppe, im lateralen und medialen periostalen Bereich, in Form von Knorpelkappen, an der osteotomienahen Kallusfront lokalisiert (siehe Abb. 19).

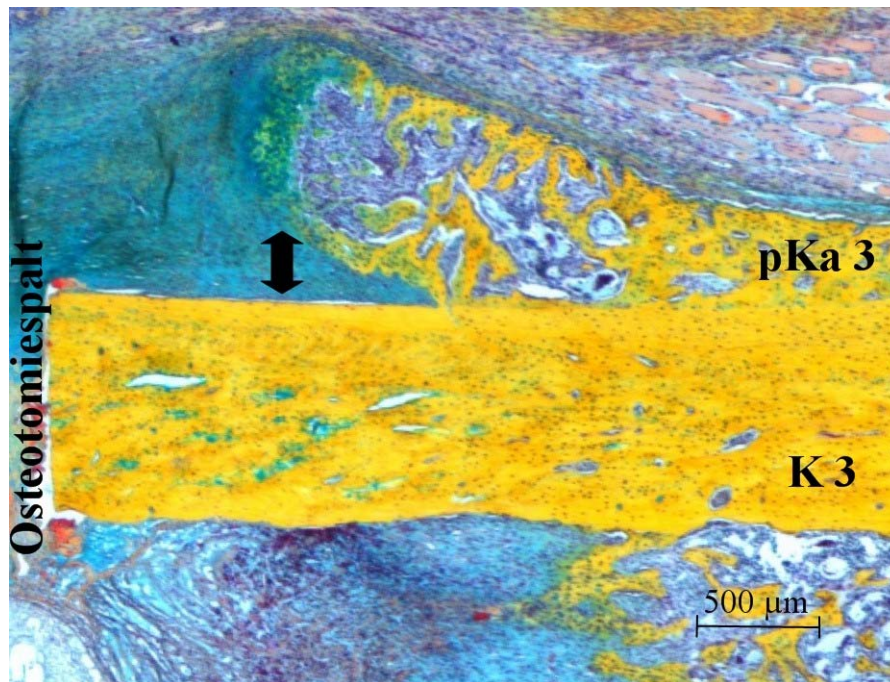


Abb. 19: Periostaler Kallus (**pKa 3**) in abaxialer Ausrichtung (Doppelpfeil) an der proximo-medialen Kortikalis (**K3**).
(Movat Pentachrom, OPC-Tier)

Dabei war auffällig, dass die Bildung dieser Knorpelkappen in der Gruppe der OPC-Tiere, v.a. im medialen Kallusbereich, häufiger auftrat als in der Medium-Gruppe. Darüber hinaus befand sich bei der Hälfte der OPC-Tiere sowie bei zwei Medium-Tieren die abgerundete Kallusfront nicht in Kontakt mit der periostalen Kortikalis. Sie breitete sich stattdessen, vor allem medial, unterschiedlich stark nach außen, in Richtung des umliegenden Weichteilgewebes aus (siehe Abb. 19). Nahe der Oberfläche des osteotomienahen Kallusrandes waren hypertrophe Chondrozyten in beiden Tiergruppen überwiegend solitär sowie auch in säulenartiger Ausrichtung zu erkennen (siehe Abb. 17 und 18). Dabei wiesen die Tiere der OPC-Gruppe im medialen Bereich mehr hypertrophe Knorpelzellen auf als die Tiere der Medium-Gruppe. Ein weiterer ausgeprägter Gruppenunterschied bestand in Bezug auf die Bindegewebsmenge. Diese lag bei den OPC-Tieren im lateralen und medialen periostalen Kallusbereich sowie auch in der »freien«, deperiostierten Zone nahe des Osteotomiespaltes etwas über der Menge der in der Medium-Gruppe sichtbaren bindegewebigen Strukturen.

Lokalisation und Inhalt des Osteotomiespaltes

Bei der Untersuchung war in beiden Tiergruppen mehrheitlich keine Erweiterungen des Osteotomiespaltes (OS) feststellbar. Bindegewebe stellte innerhalb der Versuchs- sowie auch der Kontrollgruppe den vorherrschenden Gewebetyp im OS dar. Die Fasern des Gewebes zogen, ausgehend vom lateralen und medialen periostalen Kallusbereich, in Richtung des OS und füllten diesen vollständig aus. Die Menge bzw. Dichte an Bindegewebe im OS der OPC-Gruppe überstieg hier etwas die der Medium-Gruppe. Ebenso waren in unterschiedlichem Ausmaß Gefäßstrukturen anhand von dunkel violett erscheinenden Kapillarendothelzellen sowie vereinzelt Gefäßlumina innerhalb des Osteotomiespaltes sichtbar. In der Medium-Gruppe traten hier bei der Mehrheit der Tiere zahlreiche Gefäßstrukturen im OS auf, welche sich im Vergleich dazu in der Gruppe der OPC-Tiere in geringerem Umfang zeigten.

4.3 Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertung

In die Untersuchung wurden von den nach Safranin Orange/von Kossa gefärbten Femur-Schnittpräparaten aus der Versuchsgruppe (OPC) insgesamt sieben Tiere mit jeweils vier Schnitten einbezogen. Aus der Kontrollgruppe (Medium) wurden insgesamt sechs Tiere, mit 3 x 3 und 3 x 4 Schnittpräparaten ausgewertet. Aus den vier (ggf. drei) Einzelwerten eines Tieres wurde je der Mittelwert bestimmt. Dieser ging in die statistische Auswertung zur Errechnung des jeweiligen Gruppenmedian ein. Die folgende Ergebnisdarstellung basiert mehrheitlich auf den Medianwerten.

4.3.1 Gesamtflächenanalyse

Bei der Analyse der **Gesamtfläche** [mm²], bestehend aus Kallus und Kortikalis, ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede ($p = 0,23$) zwischen der OPC-Gruppe (19,8 mm²) und der Medium-Gruppe (22,6 mm²). Für die weitere Betrachtung der Ergebnisse ist anzumerken, dass die kortikale Fläche nur in die Analyse der Gesamtfläche Eingang fand. Bei allen weiteren Untersuchungen wurde sich allein auf die periostale und endostale Gesamtkallusfläche bezogen.

Der Bereich des **Gesamt-Knochengewebes**, inklusive der mineralisierten Knochenfläche, war in der OPC-Gruppe mit einem Medianwert von 7,5 mm² kleiner als in der Medium-Gruppe, welche im Median eine Gesamtknochenfläche von 8,2 mm² aufwies. Die Anteils-Analyse ergab dem entsprechend in der OPC-Gruppe einen mit 32,4 % an der Gesamtfläche kleineren Wert als in der Medium-Gruppe, in welcher 40,8 % der Gesamtfläche aus Knochengewebe bestand. Weder die absoluten noch relativen Ergebnisse wiesen jedoch einen signifikanten Gruppenunterschied auf. Gleichermäßen ohne statistisch relevanten Unterschied war die Differenz der Ergebnisse im Bereich des gesamten **mineralisierten Knochengewebes**. In der OPC-Gruppe umfasste dieser im Median 3,3 mm² (15,0 %), innerhalb der Medium-Gruppe machte er eine Fläche von 3,1 mm² (15,6 %) aus. Der absolute p-Wert ($p_{\text{abs.}}$) lag mit 0,53 und der relative p-Wert ($p_{\text{rel.}}$) mit 0,84 über der als zulässig definierten Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$. Die Differenz war damit statistisch zufällig und nicht signifikant.

Die **Gesamt-Bindegewebsfläche** der OPC-Gruppe stellte sich absolut (14,9 mm²) und relativ (69,3 %) größer als die Bindegewebsfläche der Medium-Gruppe

(10,1 mm² bzw. 59,6 %) dar. Die Differenz der Ergebnisse war dabei nur hinsichtlich der absoluten Flächen [mm²] statistisch signifikant ($p_{\text{abs.}} = 0,01$). Ein signifikanter Unterschied im Bereich der relativen Flächen [%] wurde nicht festgestellt ($p_{\text{rel.}} = 0,14$).

Die Untersuchung des **Gesamt-Knorpelgewebes** ergab einen signifikanten Unterschied ($p_{\text{abs./rel.}} = 0,01$) zwischen den Tiergruppen zu Gunsten der OPC-Gruppe. Im Median bildete der Knorpel hier einen Anteil von 0,9 % an der Gesamtfläche, in der Medium-Gruppe lag lediglich 0,1 % Gesamtknorpelfläche vor.

Die vollständigen Ergebnisse werden in Tabelle 3 dargestellt. Die diesem Kapitel angefügte Abb. 20 veranschaulicht die oben genannten prozentualen Ergebnisse graphisch im Gruppenvergleich. In der Darstellung ist dabei noch einmal deutlich zu erkennen, dass die Tiere der Medium-Gruppe prozentual eine höhere Gesamtknochenfläche gegenüber der OPC-Gruppe aufwiesen, der Anteil [%] an mineralisiertem Knochengewebe sich jedoch zwischen den beiden Tiergruppen kaum unterschied. Die OPC-Gruppe zeigte dagegen im Median insgesamt mehr Bindegewebe und Knorpel [%] im betrachteten Areal.

Tabelle 3: Ergebnisse der Gesamtflächenanalyse im Kallus

		Median		Minimum		Maximum		p-Wert
Gruppe		OPC	Medium	OPC	Medium	OPC	Medium	
Gesamtfläche								
	[mm ²]	22,6	19,8	20,4	10,7	27,4	25,7	0,23
Kallusfläche								
Knochengewebe	[mm ²]	7,5	8,2	5,8	2,3	8,9	12,6	0,73
	(%) ^a	(32,4)	(40,8)	(28,4)	(21,0)	(35,4)	(58,8)	0,23
mineralisiertes Knochengewebe	[mm ²]	3,3	3,1	2,9	1,4	4,1	4,0	0,53
	(%) ^a	(15,0)	(15,6)	(13,8)	(13,0)	(18,1)	(18,8)	0,84
Bindegewebe	[mm ²]	14,9	10,1	14,8	8,4	18,7	14,4	0,01
	(%) ^a	(69,3)	(59,6)	(65,1)	(41,5)	(72,8)	(79,4)	0,14
Knorpel	[mm ²]	0,2	0,0	0,0	0,0	1,9	0,1	0,01
	(%) ^a	(0,9)	(0,1)	(0,0)	(0,0)	(9,2)	(0,5)	0,01

a. relativer Anteil an der Kallusfläche-Gesamt

(OPC: n = 7, Medium: n = 6)

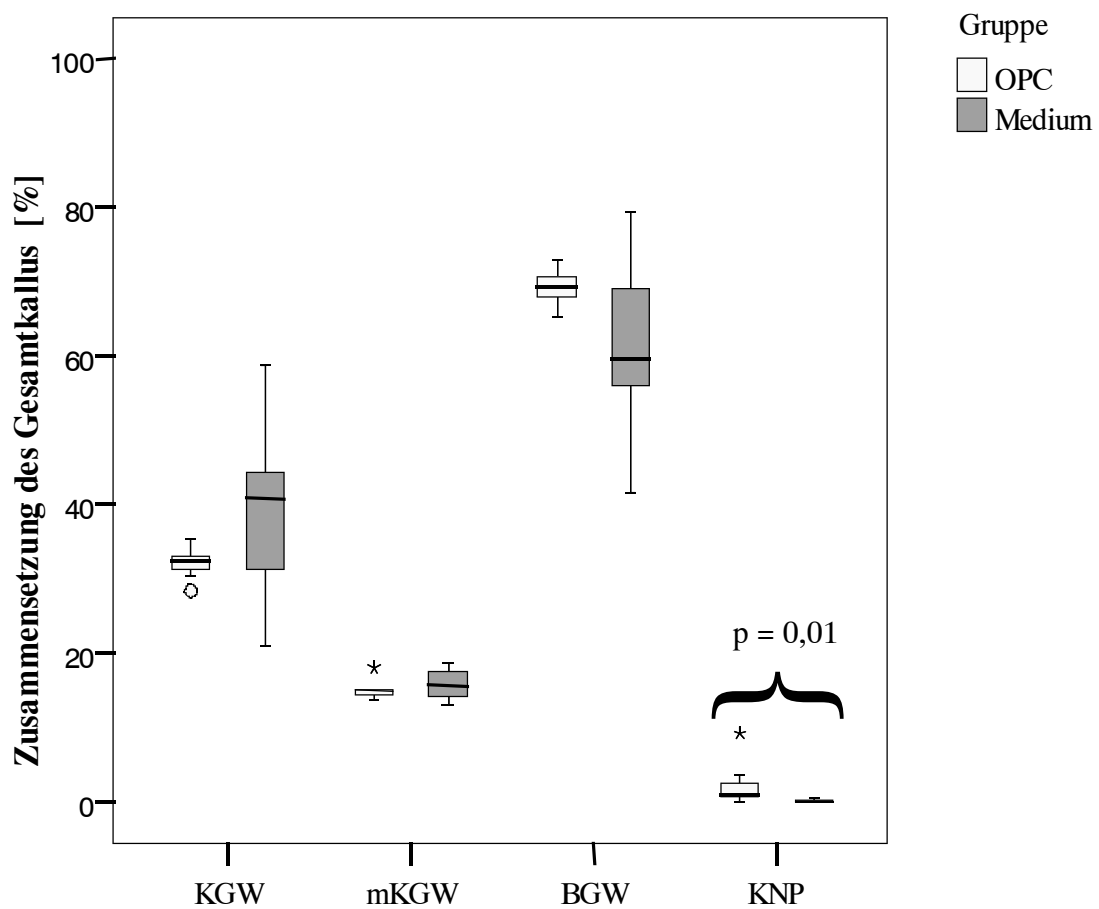


Abb. 20: Prozentualer Anteil an Knochengewebe (**KGW**), mineralisiertem Knochengewebe (**mKGW**), Bindegewebe (**BGW**) sowie Knorpelgewebe (**KNP**) an der gesamten Kallusfläche. Ein deutlicher Gruppenunterschied zeigte sich im Bezug auf den prozentualen Anteil an Knorpelgewebe, welcher in der OPC-Gruppe signifikant ($p = 0,01$) höher war als in der Medium-Gruppe. (OPC: $n = 7$, Medium: $n = 6$)

4.3.2 Analyse des endostalen Kallus

Die endostale Gesamtkallusfläche der OPC-Gruppe lag mit 12,7 mm² nicht signifikant unter der entsprechenden Fläche der Medium-Gruppe, welche einen Wert von 15,3 mm² aufwies (siehe Tabelle 4).

Bei Betrachtung des Knochengewebes zeigte die OPC-Gruppe eine Fläche von 3,5 mm², die Medium-Gruppe von 6,3 mm². Die Berechnung des p-Wertes ergab hier $p_{\text{abs.}} = 0,18$. Die Anteils-Analyse erbrachte für die OPC-Gruppe einen Wert von 26,2 % Knochengewebe an der endostalen Gesamt-Kallusfläche, für die Medium-Gruppe 40,9 % (siehe Tabelle 4). Trotz der weiten Ergebnisspanne war der Gruppenunterschied mit $p_{\text{rel.}} = 0,05$ nicht statistisch signifikant.

Auch die Analyse des mineralisierten Knochengewebes erbrachte keine deutlichen Unterschiede zwischen den Tiergruppen. Der absolute Wert der OPC-Gruppe lag im Median bei 1,4 mm² an mineralisiertem Knochengewebe, was einem Anteil von 9,0 % an der endostalen Gesamt-Kallusfläche entsprach. Die Ergebnisse der Medium-Gruppe waren mit 1,9 mm² mineralisierten Knochens, entsprechend 12,9 % der endostalen Gesamt-Kallusfläche, zwar höher als die Werte der OPC-Tiere, die Differenz war jedoch bei einem Wert von $p_{\text{abs.}} = 0,18$ bzw. $p_{\text{rel.}} = 0,10$ nicht statistisch signifikant.

Die Bindegewebsfläche des endostalen Kallus betrug in der OPC-Gruppe zwischen 6,1 mm² und 13,0 mm², der Median lag bei 9,6 mm². Dementsprechend bestanden in dieser Gruppe 73,8 % des gesamten endostalen Kallus aus Bindegewebe. In der Medium-Gruppe hingegen ergaben sich zwischen 6,1 mm² und 11,0 mm², im Median 7,8 mm² Bindegewebsfläche, was einem Anteil von 59,1 % an der endostalen Gesamt-Kallusfläche entsprach. (siehe Tabelle 4). Trotz der weiten Differenz der Daten unterschieden sich die Ergebnisse der absoluten und relativen Flächenberechnung zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe nicht signifikant (siehe Abb. 21).

Hinsichtlich der analysierten **Knorpelfläche** ergaben sich im Median keine Unterschiede zwischen den Tiergruppen ($p_{\text{abs./rel.}} = 0,95$). Sowohl in der OPC- als auch in der Medium-Gruppe lagen die Ergebnisse bei $0,0 \text{ mm}^2$ ($0,0 \%$) Knorpelgewebe im endostalen Kallus.

Die nachfolgende Tabelle 4 beinhaltet alle Ergebnisse der endostalen Kallus-Analyse, die anschließende Graphik (Abb. 21) veranschaulicht den Anteil der verschiedenen Gewebetypen an der Gesamtfläche des endostalen Kallus in Prozent.

Tabelle 4: Ergebnisse der Flächenanalyse des endostalen Kallus

		Median		Minimum		Maximum		p-Wert
		OPC	Medium	OPC	Medium	OPC	Medium	
endostale Kallusfläche								
Gesamt	[mm ²]	12,7	15,3	7,9	6,3	17,6	19,5	0,73
Knochengewebe	[mm ²]	3,5	6,3	1,8	0,2	4,6	11,1	0,18
	(%) ^a	(26,2)	(40,9)	(17,6)	(3,1)	(27,8)	(62,2)	0,05
mineralisiertes Knochengewebe	[mm ²]	1,4	1,9	0,7	0,0	1,7	2,7	0,18
	(%) ^a	(9,0)	(12,9)	(5,7)	(0,6)	(12,5)	(17,1)	0,10
Bindegewebe	[mm ²]	9,6	7,8	6,1	6,1	13,0	11,0	0,14
	(%) ^a	(73,8)	(59,1)	(72,2)	(37,8)	(82,4)	(97,0)	0,05
Knorpel	[mm ²]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,95
	(%) ^a	(0,0)	(0,0)	(0,0)	(0,0)	(0,1)	(0,5)	0,95

a. relativer Anteil an der endostalen Kallusfläche-Gesamt (OPC: n = 7, Medium: n = 6)

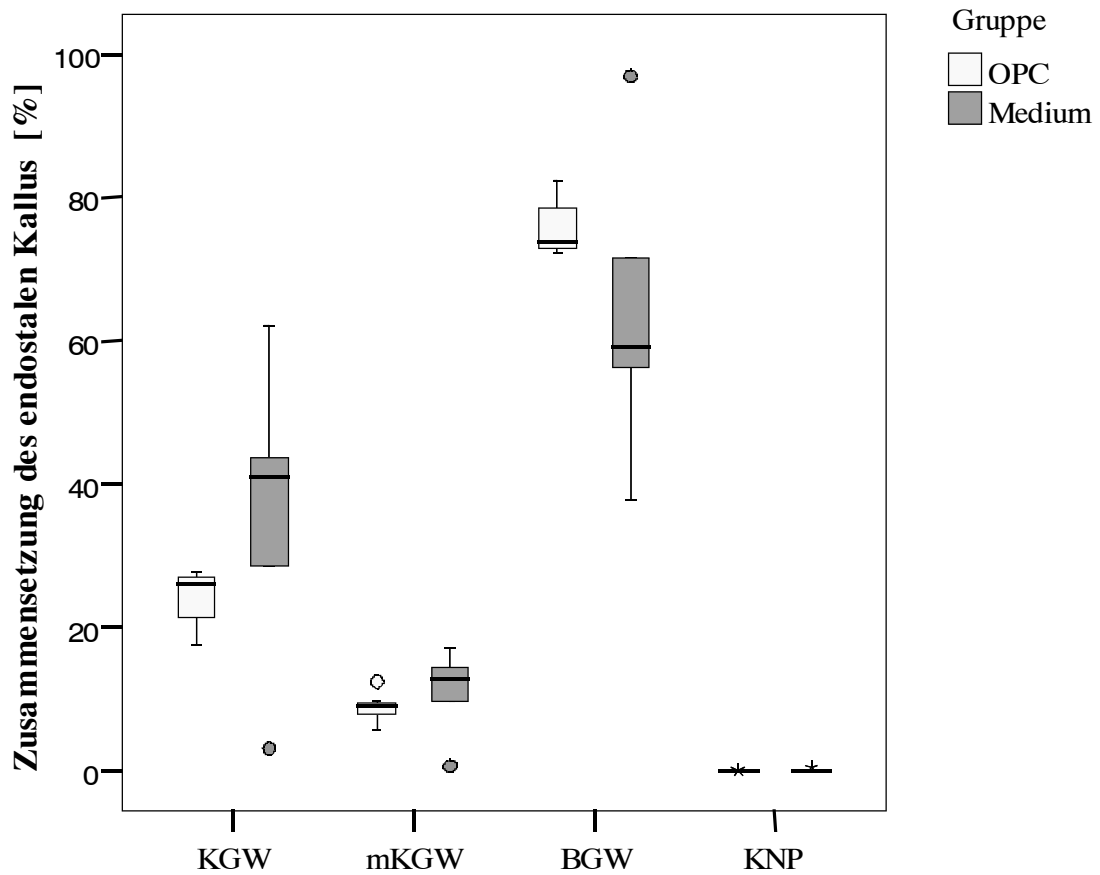


Abb. 21: Anteil an Knochengewebe (**KGW**), mineralisiertem Knochengewebe (**mKGW**), Bindegewebe (**BGW**) und Knorpelgewebe (**KNP**) an der endostalen Kallusfläche in Prozent. (OPC: n = 7, Medium: n = 6)

4.3.3 Analyse des periostalen Kallus

Im Bezug auf die **Gesamtfläche** des periostalen Kallus wurden signifikante Unterschiede zwischen den Tiergruppen festgestellt ($p < 0,01$). Die Gesamtfläche der OPC-Gruppe war mit $9,2 \text{ mm}^2$ deutlich größer als die der Medium-Gruppe, welche einen Wert von $3,9 \text{ mm}^2$ aufwies.

Die **Knochengewebsfläche** umfasste dabei in der OPC-Gruppe zwischen $2,9 \text{ mm}^2$ und $4,5 \text{ mm}^2$, der Median lag bei $4,1 \text{ mm}^2$. In der Medium-Gruppe reichten die Werte von $1,2 \text{ mm}^2$ bis $2,9 \text{ mm}^2$, der Median betrug $1,8 \text{ mm}^2$ (siehe Tabelle 5). Obwohl sich die absoluten Ergebnisse dieser Flächenanalyse mit $p_{\text{abs.}} < 0,01$ signifikant voneinander unterschieden, war die Differenz zwischen den Werten der Anteils-Analyse statistisch zufällig. Mit $43,7 \%$ war der Anteil des Knochengewebes am gesamten periostalen Kallus in der OPC-Gruppe in etwa identisch mit dem Anteil der Medium-Gruppe, welcher $43,1 \%$ betrug (siehe Abb. 22). Der p-Wert lag hier bei $p_{\text{rel.}} = 0,84$. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen bestand demnach in Hinblick auf den Anteil an Knochengewebe im periostalen Kallusbereich nicht.

Die Analyse des **mineralisierten Knochengewebes** ergab einen absoluten Wert von $2,3 \text{ mm}^2$ in der OPC-Gruppe und $1,2 \text{ mm}^2$ in der Medium-Gruppe. Die weite Differenz der Gruppen-Mediane lies zunächst einen signifikanten Unterschied zwischen Vergleichs- (OPC) und Kontrollgruppe (Medium) in Richtung der OPC-Tiere erkennen ($p_{\text{abs.}} < 0,01$). Die Berechnung der Flächenanteile des Knochengewebes an der gesamten periostalen Kallusfläche erbrachte einen Wert von $25,3 \%$ in der OPC-Gruppe gegenüber $28,3 \%$ in der Medium-Gruppe (siehe Abb. 22). In Hinblick auf den Gruppen-Unterschied zwischen den relativen Werten konnte hier keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden, der p-Wert lag mit $p_{\text{rel.}} = 0,37$ über dem definierten Signifikanzniveau von $p = 0,05$.

Vergleichbare Ergebnisse lieferte die Untersuchung der **Bindegewebsfläche** im periostalen Kallus. Auch hier zeigte sich zunächst ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der Absolutwerte. Die Bindegewebsfläche der OPC-Gruppe betrug im Median $5,4 \text{ mm}^2$, die der Medium-Gruppe $2,1 \text{ mm}^2$. Bei einem p-Wert von $p_{\text{rel.}} = 0,01$ war der Unterschied als statistisch signifikant zu bewerten. Die Betrachtung der Ergebnisse der Anteilsanalyse wies jedoch mit $56,6 \%$ Bindegewebsanteil in der OPC-Gruppe und $57,0 \%$

in der Medium-Gruppe keinen signifikanten Unterschied ($p_{\text{abs.}} = 0,84$) zwischen den Tiergruppen auf.

Eine bedeutende Abweichung der Versuchsgruppe (OPC) von der Kontrollgruppe (Medium) fand sich dagegen hinsichtlich der **Knorpelgewebsfläche**. Mit einem Anteil von 4,6 % an der gesamten periostalen Kallusfläche, lagen die Werte der OPC-Gruppe deutlich über denen der Medium-Gruppe, in welcher nur 0,3 % Knorpelgewebsanteil detektiert wurden (siehe Tabelle 5). Der ausgeprägte Unterschied zwischen den Tiergruppen war bei einem p-Wert von $p_{\text{abs./rel.}} = 0,01$ statistisch signifikant.

In Tabelle 5 werden alle Ergebnisse der periostalen Kallus-Analyse im Überblick dargestellt. Abb. 22 stellt die Anteilsverteilung der unterschiedlichen Gewebetypen im periostalen Kallus graphisch dar.

Tabelle 5: Ergebnisse der Flächenanalyse des periostalen Kallus.

		Median		Minimum		Maximum		p-Wert
Gruppe		OPC	Medium	OPC	Medium	OPC	Medium	
periostale Kallusfläche								
Gesamt	[mm ²]	9,2	3,9	6,5	3,3	12,8	6,2	<0,01
Knochengewebe	[mm ²]	4,1	1,8	2,9	1,2	4,5	2,9	0,00
	(%) ^a	(43,7)	(43,1)	(35,3)	(36,2)	(54,7)	(48,7)	0,84
mineralisiertes Knochengewebe	[mm ²]	2,3	1,2	1,7	0,8	2,5	1,92	<0,01
	(%) ^a	(25,3)	(28,3)	(17,2)	(23,4)	(28,2)	(32,1)	0,37
Bindegewebe	[mm ²]	5,4	2,1	3,3	2,0	8,3	3,3	0,01
	(%) ^a	(56,6)	(57,0)	(45,4)	(51,6)	(64,8)	(63,8)	0,84
Knorpel	[mm ²]	0,2	0,0	0,0	0,0	1,9	0,1	0,01
	(%) ^a	(4,6)	(0,3)	(0,1)	(0,0)	(23,2)	(2,9)	0,01

a. relativer Anteil an der periostalen Kallusfläche-Gesamt (OPC: n = 7, Medium: n = 6)

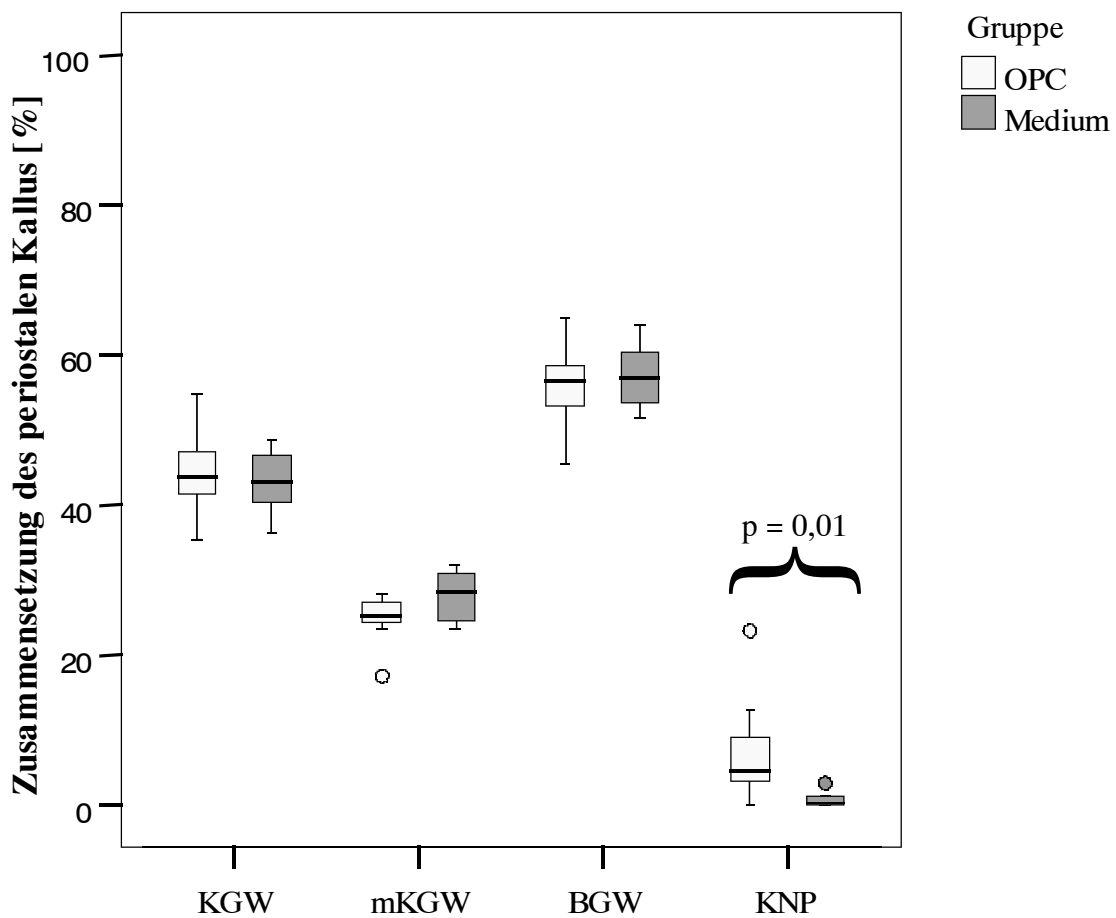


Abb. 22: Prozentualer Anteil an Knochengewebe (**KGW**), mineralisiertem Knochengewebe (**mKGW**), Bindegewebe (**BGW**) und Knorpelgewebe (**KNP**) an der periostalen Kallusfläche. Der prozentuale Anteil an Knorpelgewebe war hierbei in der OPC-Gruppe gegenüber der Medium-Gruppe signifikant ($p = 0,01$) größer. (OPC: $n = 7$, Medium: $n = 6$)

4.3.4 Kollagen II-Analyse

Die Analyse des Kollagen II wurde anhand jeweils eines Präparates von sieben Tieren der OPC-Gruppe und acht Tieren der Medium-Gruppe durchgeführt und entsprechend 3.7.3 (*Histomorphometrische Auswertung*) ausgewertet. Eine vollständige Darstellung der Ergebnisse liefert Tabelle 6, die Ergebnisse der Anteilsanalyse werden in Abb. 23 und 24 graphisch veranschaulicht.

Der Anteil des Kollagen II an der ***Gesamt-Kallusfläche*** lag mit 2,9 % in der OPC-Gruppe signifikant ($p_{\text{rel.}} < 0,01$) über dem prozentualen Anteil der Medium-Gruppe, welcher nur 0,7 % betrug. Nach Aufgliederung in endostalen und periostalen Kallus (Abb. 23 und 24) wurde deutlich, dass in der OPC-Gruppe ***im endostalen Kallus*** im Median kein (0,0 %) Kollagen II vorhanden war. In der Gruppe der Medium-Tiere bestanden lediglich 0,24 % der endostalen Gesamt-Kallusfläche, 0,3 % der medialen und 0,1 % der lateralen endostalen Kallusfläche aus Typ II Kollagen. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen bestand dabei nicht (siehe Tabelle 6). Der signifikante Gruppenunterschied der Gesamt-Kallusfläche begründete sich ***im periostalen Kallus***. Hier lag mit 7,3 % (OPC-Gruppe) zu 1,8 % (Medium-Gruppe) der prozentuale Flächenanteil bei den OPC-Tiere deutlich und statistisch signifikant ($p_{\text{rel.}} < 0,01$) über dem der Medium-Tiere. Dabei fand sich 0,0 % Kollagen II im lateralen periostalen, jedoch 12,0 % im medialen periostalen Kallusbereich der OPC-Gruppe. Auch innerhalb der Medium-Gruppe konnte mit 0,6 % lateral zu 1,5 % medial ein deutlicher Unterschied zu Gunsten des medialen periostalen Kallus detektiert werden (siehe Tabelle 6 und Abb. 24). Die Gruppendifferenz der prozentualen Kollagen II-Anteile im periostalen medialen Kallusbereich war statistisch signifikant ($p_{\text{rel.}} < 0,01$).

Im ***Bereich des Osteotomiespaltes*** zeigte sich weder in der Versuchs- (OPC), noch in der Kontrollgruppe (Medium) Typ II Kollagen (siehe Tabelle 6, Abb. 23).

Tabelle 6: Anteil Kollagen II [%] an der jeweils genannten Auswertungsfläche

		Median		Minimum		Maximum		p-Wert
Gruppe		OPC	Medium	OPC	Medium	OPC	Medium	
Kallusfläche								
Gesamt	%	2,9	0,7	1,1	0,1	9,0	1,7	<0,01
<i>Endostal</i>								
Gesamt	%	0,0	0,2	0,0	0,0	5,9	1,6	0,96
medial	%	0,0	0,3	0,0	0,0	4,3	1,3	0,46
lateral	%	0,0	0,1	0,0	0,0	11,6	1,9	0,87
<i>Periostal</i>								
Gesamt	%	7,3	1,8	3,4	0,0	17,2	2,6	<0,01
medial	%	12,0	1,5	5,8	0,0	22,9	4,6	<0,01
lateral	%	0,0	0,6	0,0	0,0	8,6	2,8	0,63
Osteotomiespalt								
Gesamt	%	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,00

(OPC: n = 7, Medium: n = 8)

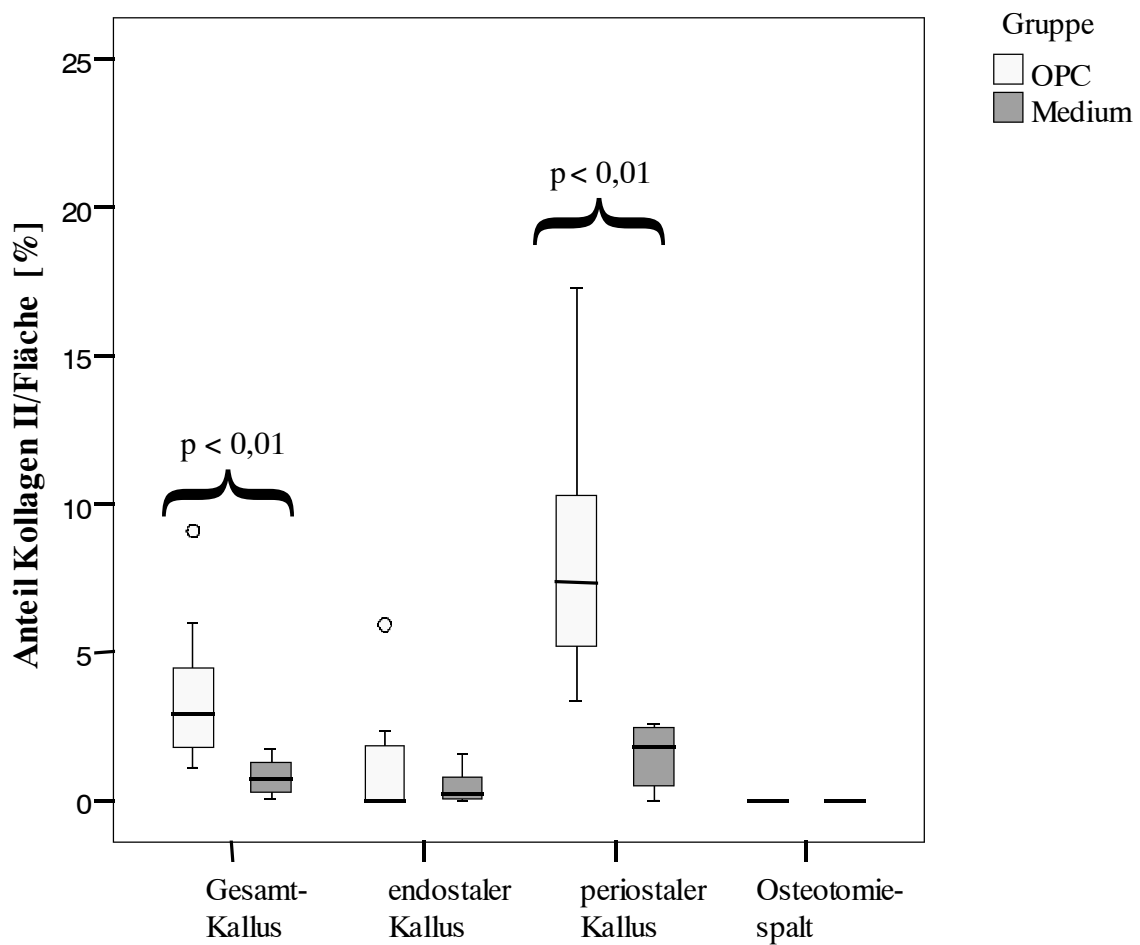


Abb. 23: Prozentualer Anteil Kollagen II an der Fläche des Gesamt-Kallus, des endostalen und periostalen Kallus sowie des Osteotomiespaltes. Deutlich wird der signifikante Unterschied zu Gunsten der OPC-Gruppe im Gesamt-Kallus ($p < 0,01$) sowie im periostalen Kallus ($p < 0,01$). (OPC: $n = 7$, Medium: $n = 8$)

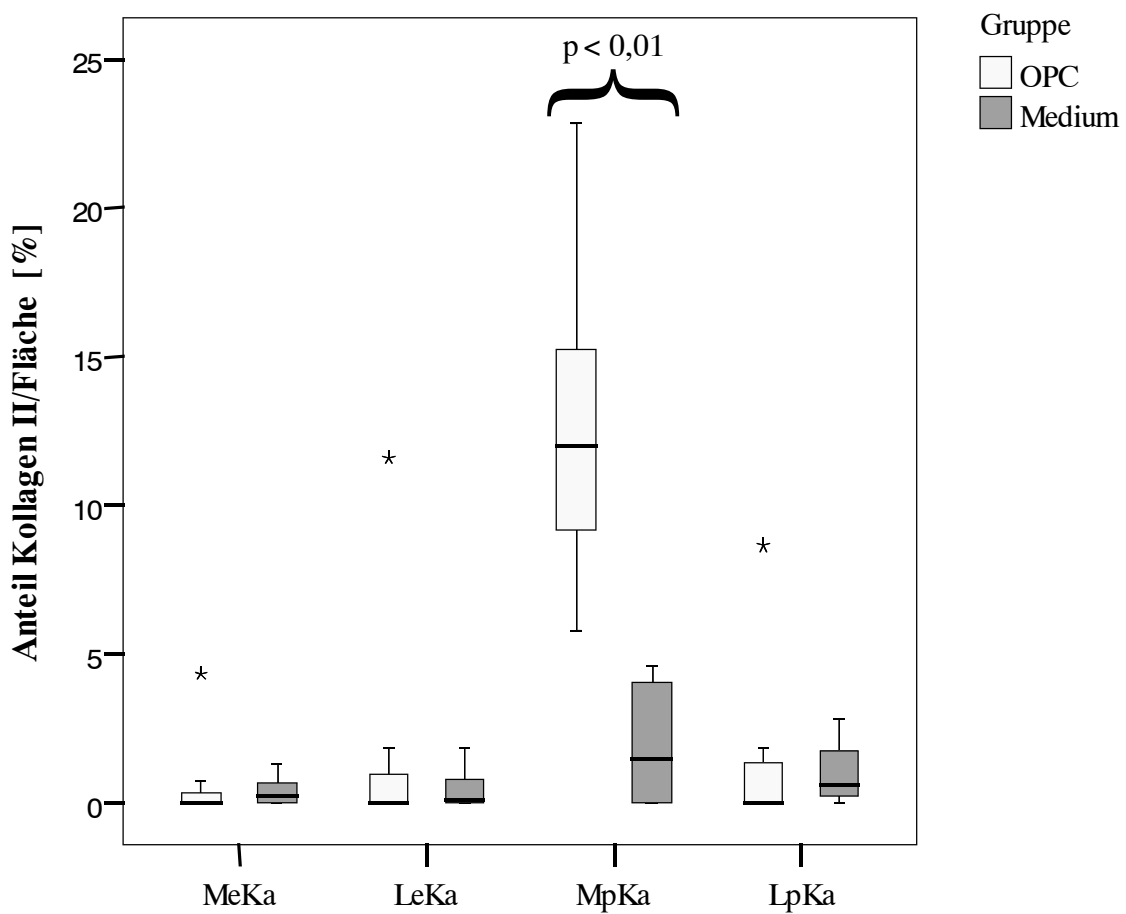


Abb. 24: Anteil Kollagen II [%] an der Fläche des medialen endostalen Kallus (**MeKa**), lateralen endostalen Kallus (**LeKa**), medialen periostalen Kallus (**MpKa**) und lateralen periostalen Kallus (**LpKa**). In der Darstellung des medialen periostalen Kallus wird der im Vergleich hohe Anteil an Typ II Kollagen des Areals sichtbar. Darüber hinaus bestand hier ein signifikanter Gruppenunterschied ($p < 0,01$) in Richtung der OPC-Gruppe. (OPC: $n = 7$, Medium: $n = 8$)

4.4 Ergebnisse der histologischen Auswertung

4.4.1 Osteoklastendichte

Die OD ergab sich aus der Anzahl der Osteoklasten in Bezug auf die knöcherne Fläche des jeweiligen Auswertungsareals (n/mm^2) und bezog sich nicht auf die absoluten Zellzahlen. Lichtmikroskopisch ausgewertet wurde, entsprechend Kapitel 3.7.4 (*Histologische Auswertung, Anzahl/Dichte aktiver Osteoklasten*), jeweils ein TRAP gefärbtes Schnittpräparat von sieben Tieren der OPC-Gruppe sowie acht Tieren der Medium-Gruppe. Die im Folgenden angeführten Analyse-Ergebnisse basieren auf dem jeweiligen Median und werden im Anschluss tabellarisch (Tabelle 7) und graphisch (siehe Abb. 25 und 26) dargestellt.

Die Untersuchung der Kallusbereiche ergab, unabhängig von der untersuchten Tiergruppe, eine insgesamt höhere OD im endostalen gegenüber dem periostalen Kallus. Im endostalen Kallus wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen festgestellt. In der Medium-Gruppe lag die Dichte der aktiven Osteoklasten hier mit $54,4/\text{mm}^2$ signifikant ($p < 0,01$) höher als in der OPC-Gruppe, welche lediglich eine OD von $23,5/\text{mm}^2$ aufwies (siehe Tabelle 7 und Abb. 25). Dieser deutliche Unterschied setzte sich in der nach medial und lateral getrennten Betrachtung des endostalen Kallus fort. Medial zeigten die OPC-Tiere lediglich eine OD von $21,8/\text{mm}^2$, die Medium-Tiere von $53,1/\text{mm}^2$, hierbei bestand ein signifikanter Unterschied zwischen den Tiergruppen ($p = 0,03$). Lateral wiesen die Tiere der OPC-Gruppe ($19,5/\text{mm}^2$) ebenso eine signifikant geringere OD auf als die Medium-Tiere ($64,4/\text{mm}^2$), der p-Wert lag hier bei $p < 0,01$. (siehe Tabelle 7 sowie Abb. 26). Auch im periostalen Kallus wiesen die OPC-Tiere sowohl insgesamt als auch medial und lateral eine geringere OD als die Medium-Tiere auf (siehe Tabelle 7, Abb. 25 und 26). Der Unterschied zur Medium-Gruppe war dabei nur insgesamt und lateral statistisch signifikant ($p_{\text{gesamt}} = 0,01$, $p_{\text{lateral}} = 0,01$). Im medialen periostalen Kallus konnte keine Signifikanz zwischen den Tiergruppen festgestellt werden ($p = 0,14$). Die OD war jedoch in diesem Bereich gegenüber dem lateralen periostalen Kallus innerhalb beider Gruppen höher.

Die *Untersuchung der Kortikalis* ergab eine insgesamt niedrigere OD bei den Tieren der OPC-Gruppe ($1,4/\text{mm}^2$) gegenüber den Medium-Tieren ($2,3/\text{mm}^2$). Bei einem p-Wert von 0,28 war dieses Ergebnis jedoch nicht statistisch signifikant (Tabelle 7). Abbildung 25 stellt die kortikalen Ergebnisse graphisch dar.

Tabelle 7: Osteoklastendichte der Kortikalis sowie des end- und periostalen Kallus.

		Median		Minimum		Maximum		p-Wert
Gruppe		OPC	Medium	OPC	Medium	OPC	Medium	
Kortikalis^a	n/mm ²	1,4	2,3	0,4	1,2	5,2	4,9	0,28
Kallusbereich								
<i>Endostal</i>								
Gesamt ^a	n/mm ²	23,5	54,4	0,0	44,4	41,9	159,8	<0,01
medial ^a	n/mm ²	21,8	53,1	0,0	31,7	97,1	130,7	0,03
lateral ^a	n/mm ²	19,5	64,4	0,0	25,6	40,3	205,1	<0,01
<i>Periostal</i>								
Gesamt ^a	n/mm ²	11,2	32,6	2,5	16,4	22,6	54,4	0,01
medial ^a	n/mm ²	15,6	28,9	1,4	18,1	24,8	79,0	0,14
lateral ^a	n/mm ²	13,8	23,7	6,0	14,9	20,7	70,1	0,01

(OPC: n = 7, Medium: n = 8)

a. Die OD ergibt sich aus der Gesamtzahl an Osteoklasten (n) im betrachteten Areal, in Bezug auf den knöchernen Bereich der jeweiligen Auswertungsfläche in [mm²].

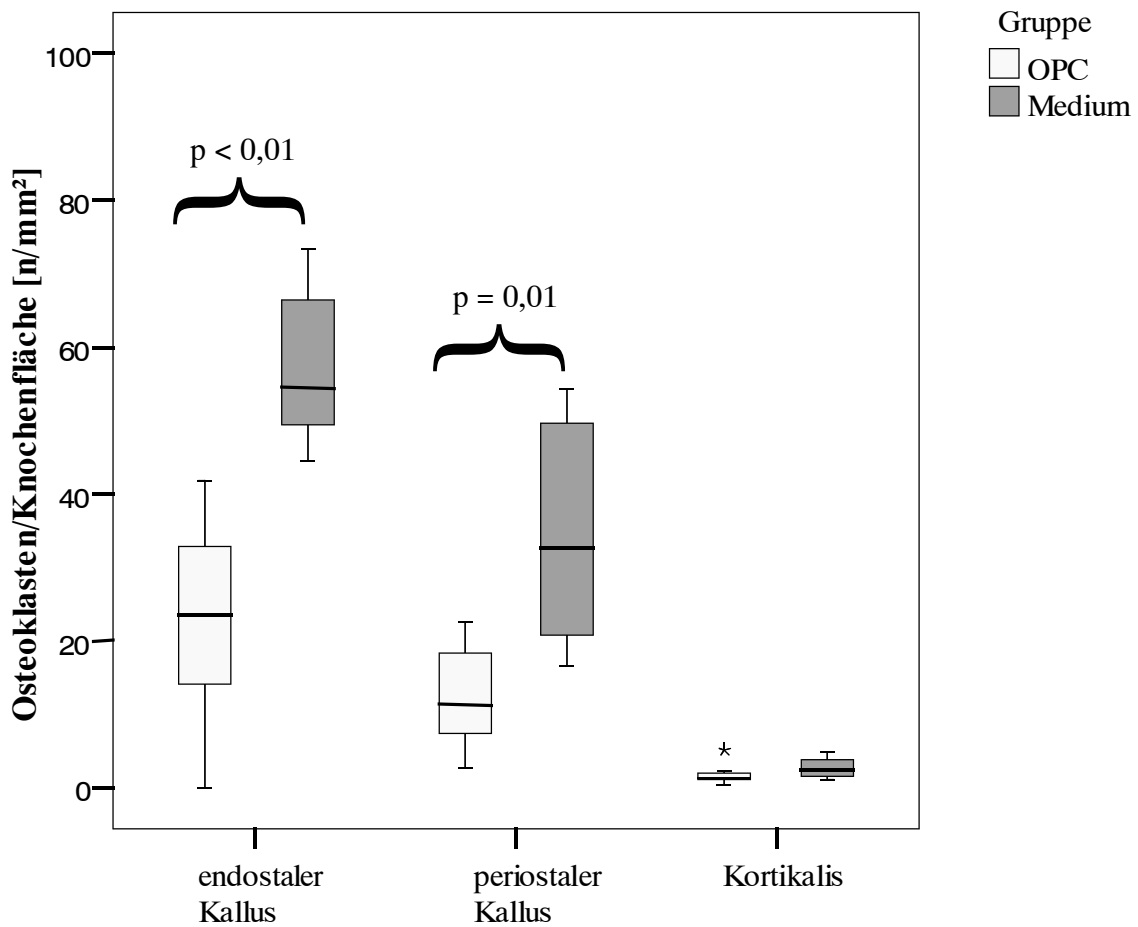


Abb. 25: Darstellung der Osteoklastendichte (OD) [n/mm²] im gesamten endostalen und periostalen Kallus sowie in der Kortikalis. Die OD der Medium-Gruppe lag im endostalen ($p < 0,01$) und periostalen ($p = 0,01$) Kallus signifikant höher als in der OPC-Gruppe. Darüber hinaus bestand eine höhere OD im endostalen Kallus beider Gruppen im Vergleich zum periostalen Kallus. (OPC: n = 7, Medium: n = 8)

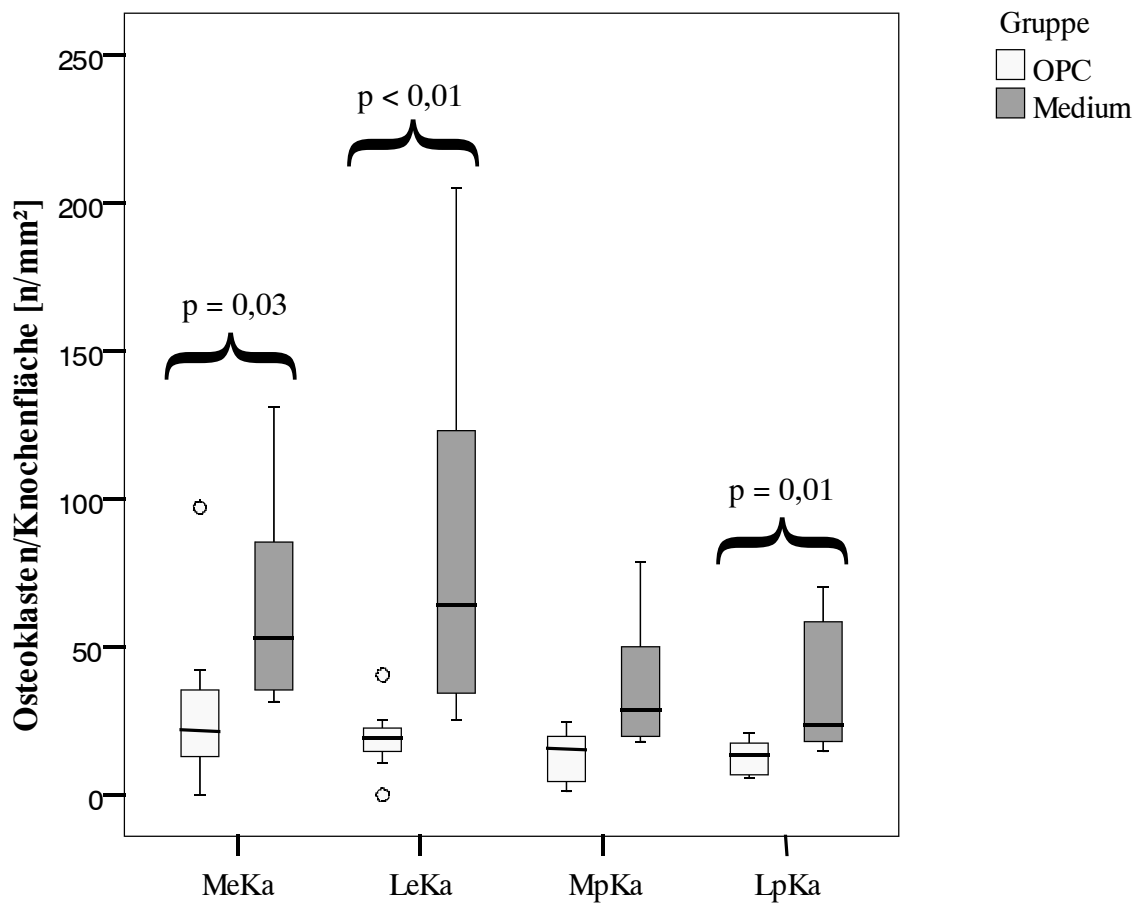


Abb. 26: Darstellung der Osteoklastendichte [n/mm²] im medialen endostalen Kallus (**MeKa**), lateralen endostalen Kallus (**LeKa**), medialen periostalen Kallus (**MpKa**) und lateralen periostalen Kallus (**LpKa**). Die Medium-Gruppe wies medial ($p = 0,03$) und lateral ($p < 0,01$) im endostalen Kallus, wie auch im lateralen periostalen Kallus ($p = 0,01$) eine signifikant höhere Osteoklastendichte auf. (OPC: $n = 7$, Medium: $n = 8$)

4.4.2 Gefäßdichte

Wie auch bei der Beurteilung der Osteoklastenanzahl wurde im Anschluss an die Gefäßzählung die Dichte der Gefäße bestimmt. (siehe 3.7.4 *Histologische Auswertung/Gefäßzählung*). Die absoluten Gefäßzahlen gingen nicht in die Ergebnisbetrachtung ein. Zur Auswertung kam bei sieben Tieren der OPC-Gruppe sowie acht Tieren der Medium-Gruppe jeweils ein α -SMA gefärbtes Schnittpräparat. Im gesamten sowie jeweils medialen und lateralen, end- und periostalen Kallus sowie im Osteotomiespalt wurden dabei die Gesamt-Gefäßdichte und die darin enthaltene Dichte an kleinen ($\varnothing < 40 \mu\text{m}$) und großen Gefäßen ($\varnothing > 40 \mu\text{m}$) erfasst. Die vollständigen Ergebnisse veranschaulicht Tabelle 8. Die diesem Kapitel angefügte Abb. 27 stellt die Verteilung der Gesamt-Gefäßdichten im periostalen und endostalen Kallusbereich sowie im Osteotomiespalt dar. Die Abb. 28 veranschaulicht graphisch die mediale und laterale Verteilung der Gesamt-Gefäßdichte im endostalen und periostalen Kallus. Bei der Auswertung der Analyseergebnisse ergaben sich zwischen den Tieren der OPC- und der Medium-Gruppe in keinem der betrachteten Areale statistisch signifikante Unterschiede. Alle im Folgenden genannten Differenzen geben daher nur Tendenzen hinsichtlich einer höheren/niedrigeren Gefäßdichte zwischen den beiden Tiergruppen wieder. Die Darstellung der Ergebnisse bezieht sich auf den jeweiligen Median.

Insgesamt konnte bei der Untersuchung des ***Gesamtkallus*** in beiden Gruppen eine höhere Gefäßdichte (GD) im periostalen gegenüber dem endostalen Areal beobachtet werden (siehe Abb. 27). Dies schloss sowohl kleine ($\varnothing < 40 \mu\text{m}$) als auch große Gefäße ($\varnothing > 40 \mu\text{m}$) ein. Die Dichte kleiner Gefäße lag dabei stets über der Dichte großer Gefäße. Im Vergleich der beiden Tiergruppen waren die Gefäßdichten der Medium-Gruppe allgemein höher, wobei eine weite Streuung der Ergebnisse auffällig war. Eine Ausnahme bildete der laterale periostale Kallus. Wie in Abb. 28 dargestellt und aus Tabelle 8 ersichtlich, wies in diesem Bereich die OPC-Gruppe in allen Kategorien (Gesamt, $\varnothing < 40 \mu\text{m}$, $\varnothing > 40 \mu\text{m}$) im Median eine höhere Gefäßdichte gegenüber den Medium-Tieren auf. Dies wurde besonders bei den Gefäßen unter $40 \mu\text{m}$ Durchmesser (OPC: $83,8/\text{mm}^2$, Medium: $45,1/\text{mm}^2$) erkennbar.

Bei Betrachtung der Ergebnisse des *Osteotomiespaltes* musste berücksichtigt werden, dass die verhältnismäßig hohen Gefäßdichten in diesem Bereich darauf basieren, dass die Bindegewebsfläche, auf welche bei der Berechnung Bezug genommen wurde, in diesem Areal nur gering war. Eine Darstellung der Analyse-Ergebnisse des Osteotomiespaltes liefert Abb. 27. In der Gruppe der OPC-Tiere war die Gesamt-GD mit $42,9/\text{mm}^2$ gegenüber der Medium-Gruppe ($61,2/\text{mm}^2$) niedriger. Die statistische Irrtumswahrscheinlichkeit lag hier mit 5 % ($p = 0,05$) exakt auf der für diese Studie definierten Signifikanzgrenze. Wie auch bei der Untersuchung des end- und periostalen Kallus überwogen im Bereich des Osteotomiespaltes die kleinen Gefäße ($\varnothing < 40 \mu\text{m}$) in beiden Gruppen. Die Anzahl resp. die Dichte der Gefäße unter $40 \mu\text{m}$ Durchmesser war dabei im Gruppenvergleich bei den OPC-Tieren ($38,1/\text{mm}^2$) geringer als bei den Medium-Tieren ($45,0/\text{mm}^2$). Die Differenz der Gruppen-Ergebnisse war nicht signifikant, bewegte sich jedoch mit $p = 0,05$ am Rande eines statistisch signifikanten Unterschiedes. Auch im Bereich der großen Gefäße ($\varnothing > 40 \mu\text{m}$, Abb.29) ergaben sich in der OPC-Gruppe ($4,8/\text{mm}^2$) niedrigere Werte im Vergleich zur Medium-Gruppe ($9,9/\text{mm}^2$).

Tabelle 8: Gefäßdichte (GD) [n/mm²] (Gesamt, Ø > 40 µm, Ø < 40µm) im peri- und endostalen Kallus sowie im Osteotomiespalt

Gruppe		Median		Minimum		Maximum		p-Wert
		OPC	Medium	OPC	Medium	OPC	Medium	
Endostal^a								
Gesamt	n/mm ²	35,7	41,2	10,3	1,9	86,6	66,3	0,96
>40µm	n/mm ²	2,8	3,1	0,2	0,1	4,8	10,3	0,69
<40µm	n/mm ²	33,7	33,8	9,7	1,8	83,2	57,6	0,96
<i>Endostal, medial^a</i>								
Gesamt	n/mm ²	38,8	41,9	11,9	1,4	96,1	70,3	0,87
>40µm	n/mm ²	2,6	4,1	0,4	0,1	5,5	13,4	0,46
<40µm	n/mm ²	33,9	32,4	11,2	1,3	92,5	64,6	0,87
<i>Endostal, lateral^a</i>								
Gesamt	n/mm ²	32,5	38,4	8,7	2,4	78,3	62,6	0,87
>40µm	n/mm ²	3,2	2,2	0,0	0,0	5,2	11,4	0,78
<40µm	n/mm ²	30,8	32,0	8,2	2,3	75,0	59,4	0,87
Periostal^a								
Gesamt	n/mm ²	57,3	59,9	39,2	23,7	74,3	210,5	0,78
>40µm	n/mm ²	4,1	5,9	2,4	0,7	8,3	18,9	0,34
<40µm	n/mm ²	55,0	49,3	35,8	23,0	66,1	191,6	0,96
<i>Periostal, medial^a</i>								
Gesamt	n/mm ²	41,7	47,8	28,8	19,2	54,6	166,7	0,61
>40µm	n/mm ²	3,2	5,8	2,2	0,4	6,4	18,9	0,23
<40µm	n/mm ²	39,1	42,0	25,5	18,8	48,1	150,0	0,69
<i>Periostal, lateral^a</i>								
Gesamt	n/mm ²	84,3	53,3	41,5	26,6	106,2	248,1	0,54
>40µm	n/mm ²	6,2	5,6	0,5	1,0	10,4	20,8	0,87
<40µm	n/mm ²	83,8	45,1	34,8	25,7	98,2	227,3	0,40
Osteotomiespalt^a								
Gesamt	n/mm ²	42,9	61,2	14,9	28,7	58,5	180,4	0,05
>40µm	n/mm ²	4,8	9,9	0,0	3,4	15,5	25,2	0,15
<40µm	n/mm ²	38,1	45,0	14,9	24,4	45,8	155,1	0,05

a. Bezogen auf die Bindegewebsfläche des jeweiligen Areals (OPC n = 7, Medium n = 8)

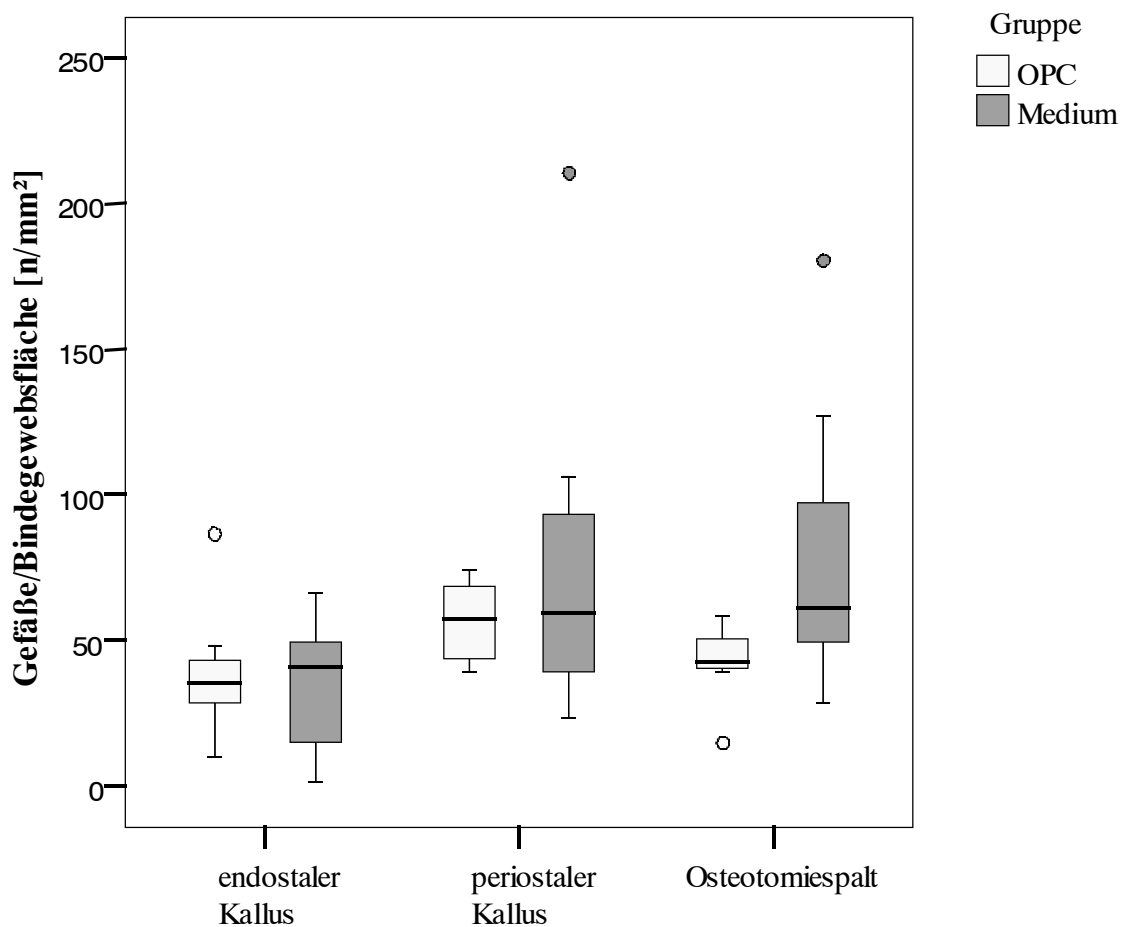


Abb. 27: Gefäßdichte (GD) des endostalen und periostalen Kallus sowie des Osteotomiespaltes bezogen auf die jeweilige Bindegewebsfläche in [mm²]. In der Abbildung wird deutlich, dass die Mediane der jeweiligen Gruppenergebnisse eng zusammenlagen. Im Bereich des Osteotomiespaltes war ein deutlicher Unterschied der GD zu Gunsten der Medium-Gruppe festzustellen, welcher sich jedoch als nicht statistisch signifikant erwies ($p = 0,05$). (OPC: $n = 7$, Medium: $n = 8$)

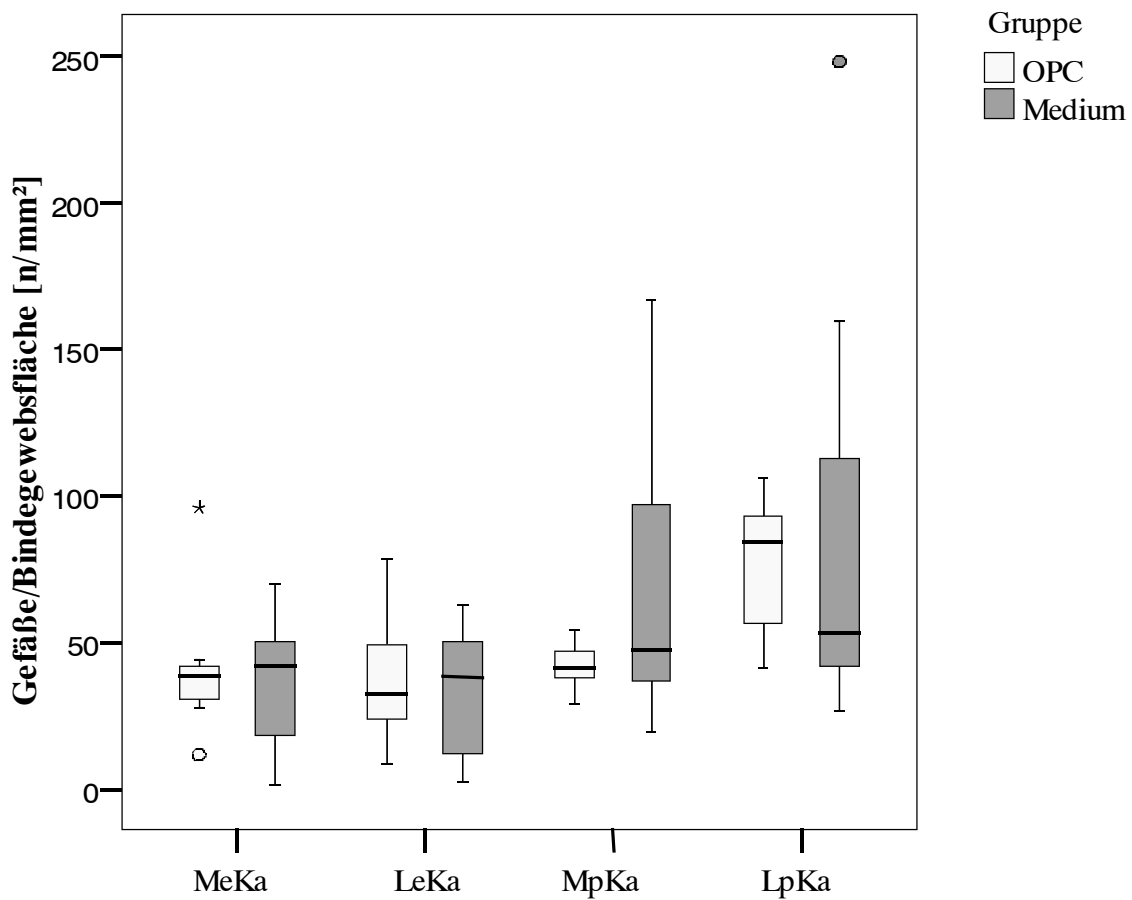


Abb. 28: GefäÙdichte (**GD**) des endostalen Kallus getrennt nach medial (**MeKa**) und lateral (**LeKa**) sowie des periostalen Kallus getrennt nach medial (**MpKa**) und lateral (**LpKa**), bezogen auf die jeweilige BindegewebsfläÙe in [mm²]. Der Median der GefäÙdichte der OPC-Gruppe lag hier einzig im periostalen lateralen Bereich deutlich über dem der Medium-Gruppe. Der analysierte Gruppenunterschied war jedoch mit $p=0,54$ nicht statistisch signifikant. (OPC: $n=7$, Medium: $n=8$)

5 Diskussion

5.1 Material und Methoden

5.1.1 Auswahl der Tiere

Im Bereich der zellulären und molekularen Grundlagenforschung können Erkenntnisse anhand von rein technologischen Simulationen oder postmortalen humanen Untersuchungen nur schwer erzielt werden. Im Besonderen kann das in vivo sensibel regulierte und anpassungsfähige Mikromilieu des Knochengewebes hier kaum in seiner umfassenden Variabilität nachgestellt werden. Das Tiermodell bietet in diesem Zusammenhang die Möglichkeit, authentischerer Untersuchungen von biologischen Prozessen und möglicher Modulations-Reaktionen in vivo. Die human-experimentelle Wissenschaft unterliegt diesbezüglich zum Einen einem strengeren ethischen Reglement, zum Anderen sind allgemein gültige, aussagekräftige Untersuchungen aufgrund oft nur geringer Probandenzahlen schwierig und langwierig sowie, gerade im Bereich der Orthopädie, häufig nur retrospektiv möglich. Ziel des Tiermodells ist es, Kenntnisse zur Prävention, Diagnostik und Therapie von Erkrankungen in vivo zu sammeln, welche sich auf die humane Situation/Erkrankung weitmöglichst übertragen bzw. mit dieser vergleichen lassen. Das deutsche Tierschutzgesetz (Fassung vom 18.05.2006) schreibt in §9 Nr. 2 dabei vor, dass die Wahl des geeigneten Versuchstieres, unter Berücksichtigung der geplanten Studie, hinsichtlich der sinnesphysiologisch am niedrigsten entwickelten Tierspezies getroffen werden muss. Zur Durchführung der vorliegenden Studie wurde die Ratte als Versuchstier gewählt. Sie entspricht den Kriterien des Gesetzes in diesem Fall. Die Verwendung von Mäusen war auf Grund der geringen Größe der Femora und damit verbundenen komplizierten und schwierig zu standardisierenden Chirurgie indiskutabel. Überdies wurde die Ratte bereits in der Vergangenheit häufig zur Untersuchung knochenregenerativer Studien erfolgreich eingesetzt (Harrison et al., 2003; Kokubu et al., 2003), was vergleichende Beobachtungen zuließ und die Analyse der erfassten Ergebnisse unterstützte. Ein weiterer Vorteil der Spezies liegt in der kostengünstigen Haltung und unkomplizierten Handhabung der Tiere. Der Einsatz größerer Tierzahlen war daher möglich. Dieser Aspekt war in der vorliegenden Studie von Bedeutung, da sie Teil eines Gesamt-Projektes war, in welchem ebenso das Tiermodell einer avitalen Knochenheilung etabliert sowie der Einfluss autologer, mesenchymaler Stammzellen auf die Knochenheilung im aPA-Modell untersucht werden sollte.

Die Untersuchungen erfolgten dabei jeweils zum Zwei- und Achtwochen-Zeitpunkt. Eine große Fallzahl war daher notwendig. In Hinblick auf die Studie selbst war es überdies von Vorteil, dass der Knochen in seiner Gesamtheit leicht als Probe gewonnen und verarbeitet werden konnte. Dies ermöglichte die Auswertung eines die auftretende Gewebereaktionen weiträumig umfassenden Areal.

Das osteogene Potenzial des Knochengewebes kleiner Nagetiere ist allgemein höher als das des Menschen. Die physiologische Knochenregeneration nimmt hier, bezüglich einer knöchernen Überbrückung des Fraktur-/Osteotomiespaltes, einen Zeitraum von nur 4 - 6 Wochen (Mensch: mehrere Monate) in Anspruch (Hietaniemi et al., 1995). Pathologische Heilungsprozesse sowie auch die hier untersuchte mögliche Induktion der Knochenheilung mittels lokal applizierter, autologer OPCs können daher bereits nach kurzer Zeit erkannt werden. Der Vorteil der zeitnah möglichen Analyse relativiert sich jedoch dahingehend, dass eine zeitliche und phasische Einteilung der Knochenheilungsprozesse erschwert wird. Die Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen kann so nur vorsichtig erfolgen. Da es sich bei dem hier durchgeführten Projekt jedoch um eine Studie im Rahmen der Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Knochenregeneration handelt, war der Einsatz der Ratte als Versuchstier zu vertreten. Bei positiven Studienergebnissen kann im Weiteren eine Spezies (z.B. das Schwein) eingesetzt werden, deren anatomisch-physiologischen Gewebestrukturen denen des Menschen ähnlicher sind. So kann die klinische Relevanz der Ergebnisse untermauert und eine Übertragbarkeit in den humanmedizinischen Bereich deutlich unter Beweis gestellt werden.

In der Studie wurden allein männliche Ratten eingesetzt, um eine hormonelle Modulation der Knochenheilung durch Östrogen auszuschließen. Die Tiere der Versuchs- und Kontrollgruppe unterschieden sich weder im Alter noch im Gewicht, was eine identische und vergleichbare Ausgangssituation gewährleistete. Eine Körpermasse von 410 - 460 g wurde angestrebt, da sich die Gefahr einer Materialermüdung des stabilisierenden Osteosynthese-Systems mit dem Körpergewicht der Tiere erhöht (Harrison et al., 2003). Die Haltungsbedingungen sowie auch die grundsätzlichen Behandlungsmethoden waren, mit Ausnahme der OPC-Applikation, in beiden Tiergruppen identisch und konnten so keinen falsch positiven Effekt innerhalb der Studie hervorrufen.

5.1.2 Entnahme, Kultivierung und Prädifferenzierung der MSCs

Gewinnung des Zellmaterials

Zur Gewinnung des autologen, mesenchymalen Zellmaterials wurde zunächst jedem Tier der OPC- und Medium-Gruppe Knochenmark aus der Tibia-Markhöhle entnommen. Die Knochenmarkentnahme innerhalb der Kontrollgruppe (Medium-Gruppe) erfolgte zur Standardisierung der Ausgangssituation. Das Aspirat der Medium-Gruppe wurde unmittelbar nach Entnahme verworfen. Um eine mögliche, die Studie beeinflussende Reizung des femuralen Zielgewebes vor Beginn der Untersuchungen weitgehend zu vermeiden, wurde das Knochenmark kontralateral, aus der Markhöhle der rechten Tibia, aspiriert. Die Tibia als Entnahmestelle wurde hier gewählt da sie, im Vergleich zum Femur, von einem Weichteilmantel nur geringer Stärke umgeben ist, was einen raschen und einfachen chirurgischen Zugriff auf den Knochen ermöglichte. Der minimal invasive Eingriff war innerhalb weniger Minuten durchzuführen, so dass hier bedenkenlos eine kontrollierte Inhalationsnarkose eingesetzt werden konnte. Bei keinem der Eingriffe traten Komplikationen auf, die Tiere erwachten wenige Minuten nach Beendigung der Narkose. Sie erholten sich rasch und zeigten im Verlauf von zwei Wochen keine allgemein-gesundheitliche oder orthopädische Beeinträchtigung. In Voraussicht auf eine nachfolgende Zellexpansion anhand etablierter Kultivierungs- bzw. Proliferations-Techniken (Chamberlain et al., 2007) war die Gewinnung einer kleinen Menge (1 ml) Knochenmarks ausreichend.

Anhand der Adhärenz mesenchymaler Stammzellen am Boden der im Weiteren eingesetzten Kunststoffkulturflaschen (Baksh et al., 2004; Beyer-Nardi et al., 2006), konnten die im Knochenmarks-Aspirat enthaltenden MSCs durch das Auswaschen von Zellen des hämatopoetischen Systems mit geeigneter Pufferlösung (PBS) sicher fraktioniert und zur weiteren Kultivierung gewonnen werden (Boyan et al., 1999).

Zellexpansion und Prädifferenzierung

Bei dem zur Kultivierung der MSCs eingesetzten α -DMEM + FCS (10 %) handelt es sich um eine in der Wissenschaft häufig und mit Erfolg eingesetzte Medium-Kombination (Jaiswal et al., 1997; Chaudhary et al., 2004). Neben der biochemischen Zusammensetzung des Mediums wirkt die Mikroumwelt ebenso beeinflussend auf die Zellkultur (Bianchi et al., 2001). Die aufrecht erhaltenen Umgebungsbedingungen hinsichtlich Temperatur (37 °C), Luftfeuchtigkeit (95 %) und CO₂-Zufuhr (5 %) sind hierbei zur

exzessiven Proliferation und Kultivierung mesenchymaler Stammzellen wissenschaftlich etabliert (vgl. Bruder et al., 1998a; Liu et al., 2007). Die weiterführende Differenzierung der MSCs ex vivo stützt sich neben der ernährenden Komponente des Mediums ebenso auf die Art und Menge zugesetzter Additiva sowie auf die bestehenden Zelldichte im Kultivierungsbehältnis (Jaiswal et al., 1997). Unter Einsatz spezifischen, osteogenen Mediums wird so eine erfolgreiche Prädifferenzierung von MSCs zu OPCs in vitro möglich (Chen et al., 2008). Das in dieser Untersuchung sowie in gleicher Zusammensetzung auch bei zahlreichen weiteren Studien mit Erfolg zur osteogenen Prädifferenzierung von MSCs in vitro eingesetzte Medium bestand aus Dexamethason, β -Glycerolphosphat und Ascorbinsäure (Pittenger et al., 1999; Muraglia et al., 2000; Bianchi et al., 2001, Chamberlain et al., 2007). Das synthetische Glukokortikoid Dexamethason fördert hierbei die Proliferation der Zellen. Sowohl Jaiswal und Kollegen (1999) als auch Chaudhary und sein Team (2004) bezeichnen es als wesentlichen Zusatz eines osteogenen Mediums. Die Zugabe von β -Glycerolphosphat zur Unterstützung der Differenzierungsrate ist ebenso obligat (Bruder et al., 1998a). Die zugesetzte Ascorbinsäure wirkt als Antioxidans (Chen et al., 2008) ebenso wie als Co-Faktor bei Hydroxylierung von Aminosäuren (Jaiswal et al., 1997). Da die Zellen im Laufe ihrer Differenzierung innerhalb weniger Tage von einem anaeroben zur aeroben Energiegewinnung übergehen, ist das Additivum wichtige Voraussetzung zur Aufrechterhaltung der Zellaktivität und biochemischen Mikroumwelt (Chen et al., 2008). Um einem infektiösen Geschehen in Folge Kontamination bei Entnahme und Kultivierung der Zellen vorzubeugen, wurden dem Differenzierungsmedium überdies Antibiotika zugesetzt. Eine nachteilige Beeinflussung auf die Entwicklung der Zellen durch das eingesetzte Penicillin/Streptomycin konnte hierbei bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht nachgewiesen werden (Liu et al., 2007). Neben dem osteogenen Medium ist die Dichte der Zellen in Kultur ebenso bedeutsam. Um ein vollständiges Zusammenfließen des Zellteppichs (Konfluenz) und damit verbundene Kontakt-Hemmung der Zellaktivität (Jaiswal et al., 1997) entgegenzuwirken, erfolgte bei einer 85 %igen Konfluenz die Passage der Zellen und ihre Trennung in kleinere Fraktionen zur weiteren Kultivierung und Prädifferenzierung. Das hierbei zur enzymatischen Dissoziation eingesetzte Trypsin hat keinen Einfluss auf die Differenzierungskapazität der Zellen (Jaiswal et al., 1997; Pittenger et al. 1999). Hinsichtlich einer Verminderung des Entwicklungspotenzials mesenchymaler Stammzellen durch wiederholtes passagieren (Bianchi et al., 2001) konnten die Untersuchungen von Izdapanah

und Kollegen (2005) zeigen, dass die osteogene Zelllinie auch nach wiederholter Passage hierbei nicht wesentlich beeinträchtigt wird. Sie beschreiben ferner eine erfolgreiche osteogene Prädifferenzierung unter den oben beschriebenen Bedingungen in 60 % der Fälle. Erste Differenzierungserfolge können bei genannter Zusammensetzung bereits nach acht Tagen festgestellt werden (Jaiswal et al., 1997).

Die frühe osteogene Andifferenzierung von MSCs lässt sich auf Basis einer veränderten Morphologie und gesteigerten Alkalische Phosphatase (AP)-Aktivität überprüfen (Chen et al., 2008). Die MSCs zeigten in der vorliegenden Studie *in vitro* die charakteristische morphologische Veränderung von einer kubischen zu einer spindeligen Zellform (D'Ippolito et al., 1999) innerhalb von zwei bis vier Tagen nach Zugabe des osteogenen Mediums. Ebenso wurde zu diesem Zeitpunkt eine erhöhte spezifische Aktivität der AP ermittelt. Beide Faktoren waren hinweisend auf eine osteogene Prädifferenzierung der MSCs (Jaiswal et al., 1997). Da die morphologische Beurteilung der Zellen allein unter subjektiven Kriterien erfolgte und hier keine sichere, phänotypische Definition existiert (Chamberlain et al., 2007), kann jedoch keine gesicherte Aussage bezüglich einer homogenen OPC-Kultur gemacht werden. Ebenso erscheint eine gesteigerte AP-Aktivität in der frühen Phase auch bei chondrogen andifferenzierten Zellen (Lian et al., 2003). Charakteristische OPC-Marker auf Proteinbasis sind zum jetzigen Stand der Wissenschaft kaum vorhanden und/oder nicht zuverlässig (Choi et al., 2004; Kolf et al., 2007). So scheitert z.B. der Ansatz einer Identifizierung des für Osteoblasten spezifischen Oberflächenproteins Stro-1 unter Einsatz monoklonaler Antikörper (Kassem et al., 2004; LeBlanc et al., 2006) an einer möglichen Kreuzreaktion (Jones et al., 2002). Auch das oftmals als kennzeichnend betrachtete nicht-kollagene Matrixprotein Osteopontin zur Identifizierung von Osteoblasten (Chen et al., 2008) wird in seiner Aussagekraft dadurch reduziert, dass es ebenso bei Syntheseaktivität hypertropher Knorpelzellen bereits frühzeitig nachgewiesen werden kann (Lian et al., 2003, Gerstenfeld et al., 1996). Der Nachweis erfolgt dabei anhand der Detektion spezifischer messenger Ribonukleinsäure (mRNA)-Sequenzen durch eine Real Time-Polymerase-Kettenreaktion (Chamberlain et al., 2007). Chaudary und sein Team (2004) regen an, durch den Zusatz spezifischer Wachstumsfaktoren (z.B. BMP-7) die Proliferation und determinierte, osteogene Differenzierung zu unterstützen und zu sichern.

In der vorliegenden Studie handelt es sich bei den *in vitro* aus MSCs prädiffenzierten Zellen auf Grund der eingangs erwähnten charakteristischen, spindeligen Morphologie sowie der detektierten, erhöhten AP-Aktivität wahrscheinlich um determinierte Osteoprogenitorzellen. Eine Heterogenität der Zellkultur kann, entsprechend der Ausführungen, hier dennoch nicht zweifelsfrei ausgeschlossen werden.

5.1.3 Modell der atrophen Pseudarthrose

Das gewählte Tiermodell orientierte sich an den durch Hietaniemi et al. (1995) und Kokubu et al. (2003) etablierten Modellen einer experimentellen atrophen Pseudarthrose. Hietaniemi und Kollegen (1995) führten eine Studie zur standardisierten Herstellung einer non-union am Rattenfemur durch, welche Untersuchungen biochemischer Aspekte der ausbleibenden Knochenheilung ermöglichen sollte. Alle vorangegangenen Studien wurden vorwiegend hinsichtlich des therapeutischen Effektes elektrischer Heilungsstimulation an hierfür eigens etablierten Modellen vorgenommen (Hietaniemi et al., 1995). Auch Kokubu und Kollegen (2003) nutzten den Rattenfemur zur Etablierung eines non-union Modells, anhand dessen molekulare Faktoren untersucht werden sollten. Die Osteotomie zur Induktion der aPA erfolgte in der vorliegenden Studie im wesentlichen in Anlehnung an die beiden oben genannten, etablierten Modelle.

Im Fokus der Pathophysiologie atropher Pseudarthrosen steht die biologische Inaktivität des betroffenen Knochengewebes. Die häufig zur Untersuchung eingesetzten Distraktions-Frakturen können aus diesem Grund nicht als adäquate Modelle einer avitalen Gewebesituation betrachtet werden (Yoo et al., 1998). Die Fragmentenden bleiben hier, trotz massivem Schaden, zunächst hinsichtlich (Re-)Vaskularisation und Stammzell-Depot biologisch integer. Eine aPA entwickelt sich ggf. allein auf Basis der Defektgröße, welche das bestehende Heilungspotenzial des Gewebes überschreitet (»critical size defect«) (Stürmer, 1996). Durch massive Schäden des Periosts und des Knochenmarks kann eine erliegende Knochenheilung durch gestörte Vaskularisation in Zusammenhang mit einer nachfolgenden Beeinträchtigung der perivaskulären Immigration mesenchymaler Stammzellen und/oder Zerstörung des lokalen Stammzell-Depots hervorgerufen werden. Choi und Mitarbeiter (2004) sehen in der Entnahme des Stammzell-Depots die wichtigste Voraussetzung einer aPA-Induktion. Ebenso trägt jedoch eine zerstörte Gefäßversorgung in der frühen Phase der Knochenheilung maßgeblich zur Entwicklung einer avitalen Pseudarthrose

bei (Brownlow et al., 2001; Reed et al., 2003). Sowohl Hietaniemi und Kollegen (1995), als auch Kokubu und sein Team (2003) wählten eine thermische Zerstörung der äußeren Knochenhaut 2 mm proximal und distal des Osteotomiespaltes, um eine aPA zu induzieren. Die bei Hietaniemi et al. (1995) eingesetzte Marknagelung zur Stabilisierung der Osteotomie führte neben einer Schädigung des Knochenmarks ebenso zu einer bewusst provozierten Rotationsinstabilität. In Folge der stimulierenden, mechano-physikalischen Reizgebung auf das Gewebe entwickelte sich dabei zunächst eine hypertrophe Pseudarthrose. Ein atrophes Erscheinungsbild konnte erst nach einem Jahr dargestellt werden. In der vorliegenden Studie wurde die äußere Knochenhaut, analog der Modelle Hietaniemis et al. (1995) und Kokubus et al. (2003), thermisch zerstört sowie überdies das Knochenmark entfernt, um die periostale/endostale Blutversorgung zu unterbinden und gewebeständige multipotente Stammzellen weitmöglichst zu entnehmen. Es wurde jedoch eine stabile Fixation der Zusammenhangstrennung angestrebt, da allein der Einfluss der applizierten OPCs auf die Initiierung der Knochenheilung untersucht werden sollte. Eine bestehende Instabilität führt zum Einen über die so stimulierte Expression von lokalen Mediatoren und Prostaglandinen zu einer Beeinflussung der biochemischen Mikroumwelt (Hietaniemi et al. 1995), zum Anderen zu einer direkten Stimulation der Knochenregeneration durch differierende und stimulierende mechanische/physikalische Belastungsreize (Carter et al., 1998). Beide Faktoren mussten hier weitgehend ausgeschlossen werden, um eine zuverlässige Aussage über den alleinigen Einfluss der OPCs zu ermöglichen. Die stabile Versorgung der Osteotomie war dabei einer erfolgreich zu induzierenden Knochenheilungsstörung nicht hinderlich. Nach den Untersuchungen von Choi und Kollegen (2004) ist die Entstehung einer aPA unabhängig von einem konstanten Bewegungsreiz.

Um eine stabile Fixation der Zusammenhangstrennung des Knochens innerhalb der Studie zu erzielen, kam ein unilateraler Fixateur externe (FE) zum Einsatz. Es handelt sich dabei um eine in human- und tierexperimentellen Studien zur Frakturheilung häufig genutzte, unkomplizierte und effektive Technik der rigiden Frakturstabilisierung (Braun et al., 1999). Um die Steifigkeit des Systems zusätzlich zu erhöhen, wurde ein Pin-Durchmesser von 1,25 mm bei einer Bohrlochweite von 1 mm gewählt (Kokubu et al. 2003, Mark et al., 2003, Harrison et al., 2003). Der FE wurde in dieser Studie einer Intramedullar- oder Plattenosteosynthese vorgezogen, um die Gefahr einer Beeinflussung des Heilungsgeschehens durch direkten Kontakt der Fremdimplantate zu Gewebe, Heilungsmediatoren und

den eingesetzten Zell-/Medium-Suspensionen weitgehend auszuschließen. Ebenso ermöglichte die externe Fixation eine sichere Analyse/Beurteilung des endostalen Regenerationsgeschehens. Bei einer Versorgung mittels intramedullärer Fixation wäre dies so nicht möglich gewesen. Darüber hinaus erschwert eine intramedulläre oder auch Platten-Osteosynthese die Reproduzierbarkeit des Modells (Mark et al., 2003). Der Abstand des Stabilisations-Systems vom zu behandelnden Knochenareal ermöglichte die gezieltere Platzierung der Zell-/Medium-Suspension in den Osteotomiespalt. Die Entfernung des Systems zum Knochen konnte dabei anhand der beiden hierzu verwendeten Verbindungsbalken eines weiteren FE sicher standardisiert werden, wie die radiologischen Aufnahmen bewiesen. Die Risiken der Technik liegen im Auftreten von Weichteil- und/oder tiefen Knocheninfektionen mit nachfolgend auftretenden Lysen und Nekrosen im betroffenen Gewebe durch eine Wechselwirkung mit den eingesetzten Pins (»Pintraktinfektion«) (Bradley et al., 1980). Ebenso besteht die Gefahr eines Stabilitätsverlustes durch Lockerung der eingesetzten Drähte und Dislokation der Knochenfragmente (Mark et al. 2003). Bei den an der Studie beteiligten Tieren waren jedoch weder Materialermüdungen noch Infektionen festzustellen. Radiologisch und auch histologisch waren keine Anzeichen einer hypertrophen Pseudarthrose oder Fragmentverschiebungen binnen beider Gruppen zu erkennen. Die angestrebte stabile Fixation wurde demnach erreicht. Der histologisch und histomorphometrisch innerhalb des Osteotomiezone detektierte hohe Bindegewebsanteil weist auf eine erfolgreiche Induktion einer Knochenheilungsstörung hin (Volpon, 1994; Hietaniemi et al. 1995; Choi et al., 2004) (siehe 4.2.3). Es bleibt jedoch zu berücksichtigen, dass die physiologische Knochenheilung bei der Ratte einen Zeitraum von 4-6 Wochen benötigt (Hietaniemi et al. 1995). In Anlehnung der humanen Definition einer non-union kann erst nach Ablauf der als physiologisch zu betrachtenden Heilungszeit in Verbindung mit morphologischen Charakteristika sicher von einer vollständig erliegende Knochenheilung gesprochen werden (Schweiberer et al. 1999). In der vorliegenden Studie war daher nach einer Standzeit der Tiere von nur zwei Wochen die Entwicklung einer manifesten aPA fraglich. Das Tiermodell der Studie führte jedoch erfolgreich eine Situation herbei, welche im weiteren Verlauf zu einer atrophen Pseudarthrose führen könnte. Dies konnte sowohl histomorphometrisch als auch histologisch bewiesen werden.

Nach Induktion der aPA-Situation wurde den Tieren der OPC-Gruppe zwei Tage nach Operation eine Suspension aus osteogen prädifferentierten MSCs resp. OPCs

und Medium lokal in den Osteotomiespalt injiziert. Um den Einfluss des eingesetzten Suspensionsmittels auf die Knochenheilung dabei auszuschließen, erhielten die Tiere der Kontrollgruppe ein äquivalentes Gesamt-Volumen des Mediums in den Spalt appliziert. Die gleiche Vorgehensweise nutzten auch Liu et al. (2007) sowie Shao et al. (2007) für ihre Untersuchungen bei weitgehend identischer Zusammensetzung des Mediums. Die Führung der Kanüle entlang der Nut des FE unterstütze eine sichere und genaue Zell-/Medium-Applikation. Dennoch gestaltete sich die exakte medulläre Platzierung schwer, da die Weite des Osteotomiespaltes nur gering und die Kontrolle des Kanülensitzes allein unter manueller und taktile Kontrolle erfolgen konnte. Die erfolgreiche Applikation wurde in Vorbereitung auf das Projekt mittels einer Injektion von röntgendichtem Kontrastmittel in den Osteotomiespalt unter Durchleuchtungskontrolle weitmöglichst routiniert.

5.1.4 Probengewinnung und Aufbereitung

Nach zwei Wochen wurden der osteotomierte Femur in Verbund mit dem FE als Probe von allen Tieren gewonnen. Dieses Vorgehen erleichterte die Entnahme des Knochens und sicherte überdies ein Fortbestehen der Osteotomie-Stabilisierung, so dass entstandenes Regenerationsgewebe von mechanischen Belastungen resp. Zerreißen verschont werden konnte. Der FE verblieb dabei am Knochen, bis das zur Fixation eingesetzte Formaldehyd das Gewebe soweit ausgehärtet hatte, dass dieser komplikationslos entfernt werden konnte.

Bei Herstellung der Schnittpräparate waren wünschenswerte Serienschnitte innerhalb der erreichten Zielebene nur schwer möglich. Im Falle der in Kunststoff eingebetteten, unentkalkten Präparate beeinträchtigten auch nur die geringsten, nicht vollständig infiltrierten Gewebeareale die Herstellung eines einheitlichen histologischen Schnittpräparates, so dass zahlreiche Schnitte einer Ebene aufgrund von Zerreißen verworfen werden mussten. Traten Rupturen der Knochenstruktur in Folge ungenügender Infiltration gehäuft auf, mussten die Präparate in MEA wieder aufgelöst und einer erneuten Prä- sowie Infiltration unterzogen werden. Die Schneideergebnisse wurden so optimiert. Dennoch auftretende Risse innerhalb der histologische Präparate wurden anhand der computergestützten Analyse erkannt und manuell aus der Auswertung entfernt. Im Falle der in Paraffin eingebetteten, entkalkten Femora führte die rasche Erwärmung und damit Erweichung des Wachsgemisches während des Schneidens zu einem leichten Verschieben der Gewebe-

strukturen, in dessen Folge auch hier verwertbare Serienschnitte nur erschwert möglich waren. Die dem entgegengesetzte, wiederholte Kühlung der Präparate konnte das Risiko zwar vermindern, jedoch nicht völlig beseitigen.

Zur Unterscheidung der mineralisierten und nicht-mineralisierten Anteile wurden die unentkalkten Präparate der Subgruppe I zunächst nach Safranin Orange/Lichtgrün gefärbt. Dabei ergab sich jedoch das Problem einer auch nach wiederholten Färbeversuchen innerhalb der Gruppe nur inhomogenen Anfärbung des Knorpelgewebes. Aus diesem Grund wurden die Knorpelareale anhand von Safranin Orange/von Kossa (SvK) gefärbten Präparaten ausgewertet. Binnen der computergestützten Analyse musste der Knorpel dabei manuell eingezeichnet werden, was die sonst objektiven Analyse-Ergebnisse subjektivierte. Es wurden daher vier Schnitte pro Tier zur histomorphometrischen Auswertung herangezogen und der Mittelwert gebildet, um Messfehler zu minimieren. In diesem Zusammenhang wurde darüber hinaus auch die immunhistologische Kollagen II-Färbung der entkalkten Präparate (Subgruppe II) herangezogen. Die Kollagen II-Analyse diente primär als Marker der frühen Knorpelbildung, wurde jedoch überdies eingesetzt, da die Knorpelanteile der femoralen Kortikalis von Tier zu Tier erheblich variierten. Sie ermöglichte eine zusätzliche, histomorphometrische Absicherung der in der SvK-Analyse erhobenen Ergebnisse hinsichtlich des neu entstandenen Knorpelgewebe-Anteils. Die Anfärbung der histologischen Präparate nach Movat Pentachrom in Subgruppe I erlaubte eine farbenprächtige Unterscheidung von knöchernen und nicht-knöchernen Gewebeanteilen. Dies verbesserte eine diffizile Gewebeanalyse innerhalb der deskriptiv histologischen Auswertung. Überdies war es zur Berechnung der Dichte von Osteoklasten und Gefäßen sowie des prozentualen Kollagen II-Anteils notwendig, die zu dem jeweiligen Tier gehörigen, entsprechenden bindegewebigen und knöchernen Bezugsflächen genau zu ermitteln. Die SvK gefärbten Präparate der Subgruppe II konnten daher hier nicht verwendet werden, da es sich nicht um die gleichen Tiere handelte.

5.1.5 Auswertung

Die Höhe der ROI wurden so gewählt, dass sich die Auswirkungen der vorgenommene Osteotomie sowie der OPC-Injektion, welche innerhalb des Areal durchgeführt wurden, deutlich zeigten. Eventuell auftretende Gewebereaktionen im Bereich der Pin-Verankerung im Knochen waren nicht Gegenstand der Studie und wurden daher nicht in die ROI mit eingeschlossen. Die Breite des Auswertungsareals wurde von Tier zu Tier so festgelegt, dass sie alle in ihrer Ausdehnung individuell erscheinenden Strukturveränderungen resp. das gesamte entstandene weiche Kallusgewebe zuverlässig einschloss. Gestützt wurde die Wahl des Gesamt-Auswertungsgebietes durch eine vorhergehende lichtmikroskopische Betrachtung der gefärbten Präparate.

Histomorphometrie

Innerhalb der computergestützten Bildanalyse wurde die Höhe der ROI durch das Programm festgelegt, die Breite wurde individuell entsprechend der maximalen Ausdehnung des entwickelten Gesamt-Kallus manuell definiert. Eine Validierung der histomorphometrisch erfassten absoluten Einzelergebnisse [mm²] konnte in den so tierspezifisch unterschiedlich großen ROIs anhand der objektivierenden prozentualen Anteilsberechnung zufriedenstellend erreicht werden.

Der Vorteil der computergestützten Untersuchung lag in einer weitgehend objektiven, weil automatisierten Beurteilung der zur Auswertung vorliegenden Präparate. Das Prinzip der individuell an die jeweiligen Färbungen anzupassenden Programme besteht dabei in einer möglichen Detektion und Kategorisierung bestimmter Gewebetypen bzw. -flächen anhand unterschiedlicher Farbpixel. Im Fall der Safranin Orange/von Kossa (SvK) gefärbten Präparate ergab sich dabei folgende Problematik: Zum Einen erschienen die Übergänge des knöchernen Gewebes zu nicht-mineralisierten Anteilen (Bindegewebe) oftmals in einer tief dunkelroten Farbe, welche das Programm irrtümlich als mineralisiert einordnete, zum Anderen war eine exakte Festlegung der Hartkallusgrenzen am kortikalen Übergang, aufgrund der identischen, schwarzen Anfärbung beider Gewebe-Bereiche, nur schwer möglich. Um diese individuellen Fehlerquellen in der Datenverarbeitung zu minimieren, wurde eine begleitende mikroskopisch-histologische Kontrolle vorgenommen, anhand derer eine manuelle Korrektur durchgeführt wurde. Ebenso mussten durch die Herstellung der Schnittpräparate aufgetretene Artefakte als solche erkannt, histologisch

überprüft und manuell aus der computerisierten Auswertung entfernt werden. Wenngleich zur Minimierung der Fehlerquelle geeignet, musste die subjektive histologische Beurteilung beider Aspekte innerhalb der computergestützten Auswertung dennoch als subjektivierendes Kriterium bei Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Die Auswertung von vier SvK-Schnittpräparaten pro Tier sowie die Ermittlung des Mittelwertes aus den vorliegenden Ergebnissen konnte die Fehlerquelle zwar unterstützend minimieren, jedoch nicht vollständig ausschließen.

Um histomorphometrisch eine objektiv vergleichbare Beurteilung der unterschiedlichen, detektierten Gewebeflächen des Gesamt-Kallus durchführen zu können, wurden die ermittelten absoluten Flächen [mm²] der verschiedenen Gewebetypen innerhalb der SvK-, Kollagen II- sowie auch Movat Pentachrom-Auswertung, mit der jeweiligen Gesamtfläche in Bezug gesetzt und so deren prozentualer Anteil ermittelt. Die alleinige Beurteilung der Absolutflächen hätten hier zu falschen Gruppensaussagen führen können. Der auftretende tierindividuelle Unterschied binnen der absoluten Gesamtflächen [mm²] konnte durch das Errechnen der entsprechenden prozentualen Anteile als subjektivierendes Kriterium jedoch weitgehend ausgeschlossen werden.

Histologie

Deskriptive Histologie

Die Ergebnisse der deskriptiven Histologie stehen in Auftreten und Ausprägung allein auf Basis einer subjektiven Beurteilung durch die Untersucherin. So wurde auch der Rahmen der zu untersuchenden Gesichtspunkte hier durch die untersuchende Person selbst festgelegt. Die histologische Analyse der Movat Pentachrom gefärbten Präparate diente innerhalb sowie auch zwischen den Tiergruppen einer vergleichenden, allgemeinen Übersicht auftretender Gewebeanteile sowie deren Lokalisation und Ausbreitung. Ebenso wurde die genaue Identifikation und Gewebeposition auftretender Zelltypen ermöglicht. Die als rein subjektiv zu betrachtenden Ergebnisse der deskriptiven Analyse konnte dennoch unterstützend und überprüfend zu den histomorphometrisch erfassten Werten hinzugezogen werden.

Gefäß- und Osteoklastenzählung

Da zur Berechnung der Gefäß- und Osteoklastendichte [n/mm^2] die innerhalb der histomorphometrischen Untersuchung ermittelten Bindegewebs- resp. Knochenflächen herangezogen wurden, erfolgten die Zählungen analog in den für die computergestützte Analyse festgelegten Sub-ROIs.

Die zur Zählung der Gefäße eingesetzte immunhistochemische Färbetechnik ließ das als Antigen wirkende α -Smooth Muscle Actin der glatten Gefäßmuskulatur leuchtend rot erscheinen, die Kapillaren waren so optisch eindeutig im Gewebe zu identifizieren. Allein in der frühen angiogenen Entwicklungsphase, in welcher neugebildete Endothelzellen den Hauptbestandteil der Gefäße bilden, ist eine eindeutige Anfärbung nicht zu erreichen (Schiebler, 1986). Die in diesem Fall aufgrund noch nicht ausreichend entwickelter glatter Muskulatur teilweise nur schwache Farbgebung, erschwerte die Auszählung. Ebenso wurde vereinzelt glatte Muskulatur nicht angefärbter Kapillargefäße im histologischen Bild erkennbar. Individuelle Unterschiede konnten daher nicht sicher ausgeschlossen und mussten bei Betrachtung der Ergebnisse berücksichtigt werden. Anhand eingescannter Präparate wurde die Zählung manuell vorgenommen und mit Hilfe eines Bildverarbeitungsprogrammes bereits erfasste Strukturen farblich markiert. So konnte eine Mehrfachzählung vermieden und die Genauigkeit der Ergebnisse erhöht werden.

Die enzymhistochemische Färbung der Tartrat-resistenten, sauren Phosphatase (TRAP) ermöglichte die Darstellung und Zählung der aktiven Osteoklasten durch deren intensive, rosa Anfärbung (Schell et al., 2006). Dabei ergaben sich Unterschiede in der Farbsättigung einzelner Osteoklasten innerhalb der Präparate sowie zwischen den einzelnen Schnitten. Dies resultierte wahrscheinlich aus einer unterschiedlich starken Aktivität des detektierten Enzyms. Ebenso wurden die Knochenpräparate vor Herstellung der histologischen Schnitte in 60 °C heißem Paraffin infiltriert. Die Gefahr einer Beeinträchtigung oder Denaturierung des hitzelabilen Enzyms war hierbei gegeben. Das Umwickeln der Femora mit Gaze bei Infiltration verminderte das Risiko, konnte es jedoch nicht vollständig beseitigen. Die unterschiedliche Stärke des Textils und damit verbundene differierende Temperaturen am Knochen erklären hier wahrscheinlich die variierende Anfärbung der Osteoklasten innerhalb eines Präparates. Von Nachteil war in der Auswertung, dass sich die knöchernen Bezugsflächen zur Dichtebestimmung [n/mm^2] nicht nach mineralisiertem und nicht-mineralisiertem Anteil exakt unterscheiden ließen, da sie an den jeweils tierspe-

zifischen entkalkten Paraffin-Präparaten vorgenommen werden mussten (siehe *Histomorphometrie*).

Die Osteoklastenzählung erfolgte zur klaren Darstellung der Zellen lichtmikroskopisch bei einer 20fachen Vergrößerung. Aufgrund der enormen Größe des Datenpakets beim Einscannen der Präparate musste hier auf eine unterstützende digitale Bildverarbeitung, wie sie innerhalb der Gefäßzählung möglich war, verzichtet werden. Um individuelle Fehlerquellen durch eine wiederholte Zählung einzelner Zellen und die leichte Verschieblichkeit der eingesetzten ROI-Schablone dennoch zu minimieren, wurde jedes Präparat dreifach gezählt und der Mittelwert zur Berechnung der Osteoklastenanzahl pro Quadratmillimeter herangezogen.

5.2 Ergebnisse der Studie

5.2.1 Operationsverlauf und Tierkontrolle

Die Osteotomie verlief bei allen Tieren komplikationslos. Einige Minuten nach dem Eingriff gelangten die Tiere zu Bewusstsein, verhielten sich munter und medizinisch unauffällig. Die osteotomierte Gliedmaße wurde wenige Stunden nach der Operation von allen Tieren wieder belastet, auch nach Abklingen der Schmerzmedikation. Es konnten im Verlauf der Tierkontrollen in beiden Tiergruppen keine Anzeichen einer bestehenden Infektion festgestellt werden. Die Gewichtsabnahme der Tiere erklärt sich wahrscheinlich durch den mit der Operation verbundenen Stress. Der Körper reagiert auf seine physische/psychische Unversehrtheit angreifenden Reize dabei durch eine gesteigerte Sympathikusaktivität, welche u.a. zu verminderten Verdauungsvorgängen führt und so die Energieversorgung des Organismus beeinträchtigt (Liebich et al., 1999). Die Kontrollgruppe wies hier ein geringeres Körpergewicht gegenüber der OPC-Gruppe auf. Die Stoffwechselleistung resp. der Energiebedarf erhöhte sich in Folge des Gewebeschadens durch Osteotomie und damit verbundenen, beginnenden Reparationsprozessen des Organismus (Hulth, 1989; Frost, 1989b). Der im Verhältnis verminderte Ernährungszustand der Medium-Tiere führte dadurch wahrscheinlich zu einer Beeinträchtigung der Thermoregulation, somit zu niedrigeren Körpertemperaturen in dieser Gruppe.

Die Frage nach der gesteigerten Stress-Situation innerhalb der Medium-Gruppe lässt sich dabei nicht eindeutig klären. Da die beiden Tiergruppen zwar nach identischer

Vorgehensweise, jedoch nicht in einem identischen Zeitraum operiert wurden, könnte es sich um ein Resultat zusätzlichen Stress auslösender Faktoren, durch z.B. haltungsbedingte, unterschiedliche Umwelteinflüsse handeln.

5.2.2 Radiologie

Zwei Wochen nach Osteotomie war der Osteotomiespalt (OS) in beiden Gruppen gleichermaßen noch deutlich zu erkennen. Es wurde weder eine Erweiterungen des OS noch Dislokationen der Fragmentenden festgestellt. Eine röntgendichte Überbrückung des Spaltes lag bei keinem der Tiere vor, war jedoch zu dieser frühen Phase der Heilung auch nicht zu erwarten. Wolkige Verschattungen im periostalen medialen und lateralen Kortikalisverlauf außerhalb der deperiostierten Zone waren hinweisend auf eine beginnenden Geflechtknochenformation bzw. Mineralisierung, konnten jedoch radiologisch zu diesem frühen Zeitpunkt nicht eindeutig diagnostiziert werden. Im endostalen Areal waren in keiner der beiden Gruppen Verschattungen sichtbar, welche auf eine beginnende knöcherne Kallusbildung hinweisen konnten. Charakteristika einer vorliegenden atrophen Pseudarthrose konnten demnach hinsichtlich ausbleibenden Überbrückung und Persistenz des OS sowie einer fehlende eindeutigen Kallusentwicklung innerhalb der periostalen und endostalen Osteotomie-Zone verzeichnet werden (vgl. Hietaniemi et al., 1995; Josten et al., 1996). Da jedoch bei allen Tieren beider Gruppen zu dem frühen Untersuchungszeitpunkt von zwei Wochen nach Osteotomie weder eine Erweiterung des OS, noch Abrundungen der Fragmentenden (Volpon et al., 1984, Braun et al., 1999) sichtbar waren, konnte im Rahmen der radiologischen Untersuchung lediglich der Hinweis auf die vermutliche Entwicklung einer aPA, jedoch nicht auf deren Manifestation formuliert werden. Ebenso wiesen die röntgendichten Verschattungen auf neu gebildete Strukturen innerhalb einer beginnenden Regeneration des Knochens außerhalb des beeinträchtigten Gewebes hin, blieben jedoch an dieser Stelle ohne Beweiskraft.

5.2.3 Histomorphometrie und Histologie

Innerhalb der Studie war zwei Wochen nach lokaler Applikation der autologen, osteogen prädifferentierten Stammzellen (OPCs) in den Osteotomiespalt ein Einfluss der OPCs in Form einer Initiierung der Knochenheilung feststellbar. Die ermittelten Effekte entsprachen dabei dennoch weder in ihrer Art noch in ihrer Ausprägung den erwarteten Ergebnissen der Studie.

Kallusgewebe entwickelte sich in beiden Tiergruppen endostal und periostal. Der knöcherne Anteil des Kallus entstand dabei jedoch mehrheitlich fern des Osteotomie-spaltes, abseits der zur Induktion einer aPA-Situation chirurgisch manipulierten Knochenareale. Er bildete sich somit nahezu ausschließlich in Bereichen erhaltener Gewebevitalität. Die äußere Knochenhaut hob sich im Verlauf der periostalen Kallusentwicklung dabei charakteristisch mantelförmig (Webb et al., 2000; Ito et al., 2000) von der Kortikalis ab. Allein periostal medial konnte in der OPC-Gruppe auch innerhalb der unmittelbaren Osteotomiezone, im deperiostierten Areal, knorpeliges Kallusgewebe histologisch dargestellt und histomorphometrisch detektieren werden. Ein Kontakt mit der Kortikalis bestand dabei dennoch nur bis an die Grenze des intakten Periosts. Im deperiostierten Bereich hob sich der entstandene Kallus erkennbar in Richtung des umliegenden Weichteilgewebes ab. Die Hälfte der OPC-Tiere zeigte dabei eine knorpelige Kallusentwicklung bis in die Nähe des Osteotemiespaltes. Entsprechend des radiologischen Bildes kam es dennoch in keiner der beiden Tiergruppen zu einer endostalen und/oder periostalen Überbrückung der Fragmentenden durch den entstandenen Kallus. Die anhand der histomorphometrischen Analyse bestimmten Flächen des endostalen Kallus entsprachen sich zwischen den Tiergruppen weitgehend. Die Betrachtung des periostalen Kallus erbrachte zunächst histologisch, ungeachtet der Tiergruppe, eine größere Menge auf medialer Seite des Knochens gegenüber der Lateralen. Der Gruppenvergleich verdeutlichte, dass sich überdies die Fläche des periostalen Kallus in der OPC-Gruppe deutlich größer als in der Medium-Gruppe darstellte. Diese innerhalb der Histologie als subjektiv zu betrachtende Feststellung konnte anhand der histomorphometrischen Untersuchung objektivierend bewiesen werden. Die OPC-Tiere zeigten hier eine signifikant ($p < 0,01$) größere periostale Kallus-Gesamtfläche gegenüber der Medium-Gruppe. Der histologische Gruppenvergleich zeigte überdies, dass sich bei den OPC-Tieren v.a. medial periostal mehr Kallus entwickelte als bei den Medium-Tieren. Im lateralen Bereich hingegen waren die Mengen periostalen Kallusgewebes beider Gruppen gleich.

In Hinblick auf die in der vorliegenden Studie angestrebte Situation einer massiv beeinträchtigten Knochenheilung bei stark eingeschränkter Bioaktivität des Gewebes lassen die genannten Ergebnisse ein erfolgreich vermindertes osteoregeneratives Potenzial im unmittelbaren Bereich der Osteotomie des Knochens (Osteotomiezone) erkennen. Bei erhaltener Vitalität des Knochengewebes ist die endostale und periostale Kallusentwick-

lung ein charakteristisches, zeitiges Phänomen innerhalb der sekundären Knochenheilung (Frost, 1989b; Hietaniemi et al., 1996), welches ebenso im Falle einer Osteotomie in Erscheinung tritt (Carter et al., 1998). Die Entwicklung von Kallusgewebe beschränkte sich jedoch innerhalb der Studie mehrheitlich auf osteotomiespaltferne Areale. Sie verlief somit jenseits der gezielt chirurgisch zerstörten, funktionell an der Knochenregeneration beteiligten Einheiten Periost und Knochenmark (Schweiberer et al., 1999) in biologisch weitgehend integren Gewebebereichen. Dies weist auf die erfolgreiche Induktion einer Störung der Knochenheilung im manipulierten und folglich biologisch stark beeinträchtigten Knochenareal der Osteotomiezone hin.

Die Zusammensetzung des Kallus bestand bei den Versuchs- und den Kontrolltieren überwiegend aus Bindegewebe sowie (Geflecht-)Knochengewebe und hyalinem Knorpel. Dies entsprach einer zum Zweiwochen-Zeitpunkt erwarteten Gewebekombination des Kallus im vitalen Knochenbereich (vgl. Boyan et al. 1999; Hietaniemi et al., 1996). Der knöcherne Anteil des Kallus entwickelte sich dabei über physiologische desmale sowie enchondrale Ossifikation und stellte sich in Form einer für Geflechtknochen charakteristischen, ungerichteten Bälkchenstruktur (Einhorn, 2005) dar.

Entsprechend der frühen Phase einer aPA-Situation wies der Osteotomiespalt beider Gruppen keine sichtbaren resorptiven Randveränderungen oder Erweiterungen auf. Die histologisch erkennbaren, leichten Verluste scharfer kortikaler Kanten in beiden Tiergruppen sind angesichts der hier nur einzeln zu lokalisierenden Osteoklasten auf bei Herstellung der histologischen Präparate entstandene Schneide-Artefakte zurückzuführen. Die Kallusentwicklung im endostalen, ungeschädigten Knochenareal ging vorwiegend von den histologisch durch hämoretikuläres Gewebe gekennzeichneten vitalen Strukturen des Knochenmarks aus und erfolgte über desmale und in geringem Maße auch enchondrale Knochenneubildung (vgl. Boyan et al., 1999). Syntheseaktive Osteoblasten sowie wenige Matrix produzierende Knorpelzellen konnten hier mikroskopisch gesehen werden. Ebenso besaßen periostal die an der Heilung maßgeblich beteiligten Strukturen der äußeren Knochenhaut (Yoo et al., 1998, Saris et al., 1999) abseits des deperiostierten Osteotomiebereiches die biologische Kapazität über desmale und enchondrale Ossifikation Kallusgewebe aufzubauen. Osteoblastensäume an der Oberfläche des periostalen Kallus sowie innerhalb der Kavernen des hier entstandenen Geflechtknochens weisen dabei v.a. auf desmale Knochenneubildung hin. Das hyaline Knorpelgewebe des Kallus sowie die stellenweise histo-

logisch aufzufindende beginnende Kalzifizierung der Knorpelmatrix kennzeichnen eine parallele Entwicklung via enchondraler Osteogenese (vgl. Braun et al., 1996; Lane, 1998).

Die Entwicklung von Kallusgewebestrukturen im medialen periostalen Areal der OPC-Gruppe, welche über die Grenze des erhaltenen, vitalen Periostbereiches hinaus und überdies bei der Hälfte der OPC-Tiere bis in die Nähe des Osteotomiespaltes reichte, ist hier hinweisend auf einen erfolgten osteoinduktiven Einfluss der transplantierten OPCs. Zwar waren die Gewebereaktionen insgesamt innerhalb beider Tiergruppen periostal medial stärker als lateral, aber im Vergleich in der Versuchsgruppe noch deutlich ausgeprägter als in der Kontrollgruppe, was für die Abhängigkeit des Phänomens von den applizierten OPCs spricht.

Der auffälligen, allgemein gesteigerten Gewebeentwicklung im medialen Bereich liegt vermutlich eine erhöhte biologische Aktivität dieses Areals zugrunde, da während der Durchführung der Osteotomie das mediale Gewebe wahrscheinlich einer weniger starken Beeinträchtigung gegenüber dem lateralen Knochen- und umliegenden Weichteilgewebe unterlag. Der laterale Zugang bei Operation sowie die überwiegend von lateral durchgeführten Manipulationen bedeuteten hier eine gegenüber der medialen Seite höhere mechanische und strukturelle Belastung sowie funktionelle Beeinträchtigung. In deren Folge wurde das regenerative Potenzial auch außerhalb der Osteotomiezone möglicherweise lateral etwas vermindert. Die im lateralen periostalen Areal auftretenden, gleich großen Kallusflächen in beiden Tiergruppen entkräfteten den sich medial periostal darstellenden Einfluss der OPCs in Form stärkerer Kallusentwicklung nicht. Vielmehr war in Kontext dessen zunächst die Lokalisation der applizierten Vorläuferzellen zu hinterfragen. Die Sicherung einer angestrebten medullären Zell-Injektion wurde im wesentlichen anhand der Führung der Kanüle unter palpatorischer Kontrolle sowie taktil-sensorischer Erfassung des Osteotomiespaltes mit der Kanülenspitze durchgeführt. Aufgrund der geringen Weite des Osteotomiespaltes und dem ebenso kleinen Gesamt-Durchmessers des Rattenfemurs kann nicht ausgeschlossen werden, dass die OPCs auch in den periostalen Bereich appliziert wurden, hierbei vornehmlich auf medialer Seite. Die Position der Tiere in linker Seitenlage während der Zell-Medium-Injektion könnte überdies in Hinblick auf das technische Vorgehen sowie einwirkenden Gravitationskräfte eine verstärkte, mediale Lokalisation der OPCs bewirkt haben. Die geringe Viskosität der Suspension begünstigte unter Umständen hier ebenso eine Dislokation der enthaltenen OPCs via Diffusion.

Die quantitative Flächenanalyse des medullär entstandenen Gewebes zeigte, dass die endostale Osteotomiezone binnen beider Tiergruppen mehrheitlich mit bindegewebigen Strukturen (ca. 60-70 %) ausgefüllt war. Endostal blieb folglich in der Versuchsgruppe im unmittelbaren Bereich der Osteotomiezone, dem angestrebten Ort der OPC-Applikation, eine im Besonderen erwartete, zellinduzierte Knochenheilung oder auch osteokonduktive Gewebedifferenzierung innerhalb der ausgedehnten bindegewebigen Strukturen gänzlich aus. Der Anteil detektierten Knochengewebes und mineralisierten Knochengewebes beschränkte sich endostal allein auf osteotomiespaltferne Kallusbereiche. Die histomorphometrischen und histologischen Ergebnisse der (mineralisierten) Knochen- und Bindegewebsflächen entsprachen dabei denen der mit zellfreiem Medium versorgten Kontrollgruppe. Histomorphometrisch detektierte Anteile hyalinen Knorpelgewebes lagen endostal in beiden Tiergruppen im Median bei 0 %. Die Kollagen II-Analyse unterstützte die hier erhaltenen Ergebnisse. Ebenso wies keine der beiden Tiergruppen im Median Kollagen II positive Gewebeanteile resp. Knorpelgewebe unmittelbar im Osteotomiespalt auf (0 %). Den genannten Ergebnissen entsprechend dominierte das entstandene Fasergewebe den Osteotomiespalt in beiden Tiergruppen, was auf die Entwicklung von reparativem Ersatzgewebe an Stelle von regenerativen Gewebereaktionen und somit einem endostal ausbleibenden Einfluss der OPCs auf die Knochenheilung hinweist. Die Gewebeanalyse ließ hier vielmehr überwiegend morphologische Charakteristika einer sich entwickelnden aPA, in Form von fibrös-bindegewebigen Strukturen im Osteotomiespalt, erkennen (vgl. Volpon, 1994; Hietaniemi et al., 1995; Boyan et al., 1999). Sowohl in der OPC-Gruppe als auch in der Medium-Gruppe wurde überdies histologisch eine senkrecht zur Knochenachse verlaufende Abdichtung des Markraumes durch knöchernes Kallusgewebe bei allen Tieren sichtbar. Der vordergründig zu einer verbesserten interkortikalen Stabilität beitragende Vorgang einer medullären Markraumabdichtung durch knöchernes Kallusgewebe (Brighthon et al., 1984) kann jedoch ebenso, im Zusammenhang mit der endostal ausbleibenden osteogenen Organisation des Bindegewebes, Hinweis auf die fortschreitende Ausbildung einer aPA im klassischen Sinne eines Fehlgelenkes sein.

Auch im periostalen Bereich dominierten bindegewebige Strukturen im deperiostierten Bereich beider Tiergruppen sowie entlang der Oberfläche des entstandenen periostalen knöchernen Kallus. Bindegewebe stellte hier wie auch endostal mit einem Anteil von jeweils mehr als 50 % den hauptsächlichen Gewebetyp innerhalb der analysierten

Kallusflächen dar. Auch hinsichtlich der detektierten periostalen Kallusflächen-Anteile an Knochengewebe und mineralisiertem Knochengewebe ließen sich prozentual keine deutlichen Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe feststellen. Der Knorpelflächen-Anteil des periostalen Kallus war hingegen in der OPC-Gruppe gegenüber der Medium-Gruppe signifikant größer ($p = 0,01$). Überdies bestand eine statistische Signifikanz im medialen periostalen Areal ($p < 0,01$) bei Auswertung der Kollagen II-Analyse. Hier reagierte in der OPC-Gruppe im Median 12 % des untersuchten Kallusgewebes positiv auf Kollagen II-Antigenstrukturen, dem gegenüber nur 1,5 % des Kallus der Medium-Gruppe. Das histologische Bild bestätigte die Verhältnisse. Im lateralen periostalen Kallus konnten hingegen in keiner der beiden Gruppen nennenswerte Anteile an Knorpelgewebe bzw. Kollagen II detektiert werden. Der in der OPC-Gruppe im periostalen medialen Kallusbereich ermittelte Knorpel lokalisierte sich dabei vorwiegend in Form von Knorpelkappen an der osteotomieseitigen Kallusfront. Die Knorpelmatrix wies hier Anzeichen einer beginnenden Kalzifizierung auf. Auch in der Medium-Gruppe zeigten sich die beschriebenen Knorpelkappen, jedoch entsprechend der nur geringen Knorpelanteile weit weniger ausgeprägt. Das Gewebe der Kontrollgruppe stellte sich an der Front des Kallus überwiegend fibrotisch dar.

Bei einheitlicher Zusammensetzung unterschied sich das Kallusgewebe der beiden Tiergruppen demnach allein innerhalb der medialen periostalen Osteotomiezone bezüglich einer verbesserten Kallusqualität sowie einer stärkeren Ausdehnung und Reichweite des Kallus in Richtung des Osteotomiespaltes. Hinweisend auf eine hochwertigere Qualität des medialen periostalen Kallus der OPC-Gruppe war dabei, bei weitgehend identischer Quantität an (mineralisiertem) Knochengewebe und Bindegewebe, der statistisch signifikant höhere Anteil des Kallus an hyalinem Knorpelgewebe. Die stärkere Entwicklung von chondrogenem Gewebe in der OPC-Gruppe, sowie dessen histologisch sichtbare, beginnende Kalzifizierung, wies dabei auf eine Initiierung der sekundären Knochenheilung durch den Einfluss der osteogenen Vorläuferzellen im Sinne enchondraler Ossifikation (Lane, 1998; Liebich, 1999) hin. Der erfasste Einfluss der OPCs muss hierbei dennoch innerhalb dieser Studie unter Berücksichtigung der applizierten osteogen vordifferenzierten Zellen und der in vivo folgenden vornehmlich chondrogenen statt vermuteten osteogenen Gewebedifferenzierung in seiner Art als unerwartet bezeichnet werden. Ebenso unvermutet war das in der lateralen periostalen und endostalen Osteotomiezone, dem Ort der ange-

strebten Zell-Applikation, vollständige Ausbleibenden einer knöchernen oder entsprechend der erfassten Ergebnisse ggf. auch knorpeligen Gewebeentwicklung nach Transplantation der OPCs.

Im Rahmen einer Ursachenanalyse soll hier zunächst die Aktivität, so wie auch die Überlebensrate der applizierten OPCs diskutiert und analysiert werden. In Verbindung mit dem natürlichen Zellmetabolismus sowie dem umgebende Mikromilieu ist eine Inaktivität oder Degeneration der Osteoprogenitorzellen dabei nicht auszuschließen. In neueren Untersuchungen wurde bewiesen, dass der Sauerstoffbedarf osteogen prädifferentzierter Zellen deutlich höher ist als der von MSCs (Chen et al., 2008). Chen und sein Team (2008) konnten zeigen, dass die Aktivität der Mitochondrien im Verlauf der Differenzierung nachweisbar ansteigt. Die Zelldifferenzierung bedarf im Falle einer Fraktur/Osteotomie eines gesteigerten Stoffwechsels (Hulth, 1989). Der Metabolismus der Stamm- resp. Vorläuferzellen wechselt entsprechend von einer anaeroben Energiegewinnung durch Glykolyse auf die energetisch effizientere oxidative Phosphorylierung (Chen et al., 2008). Die vaskuläre Versorgung der Stammzellen zur Aufrechterhaltung ihres Metabolismus und Gewährleistung einer ausreichenden Ernährung geht dabei physiologischer Weise sowohl von der Kambiumschicht des Periosts als auch vom Knochenmark aus (Cancedda et al., 2003). Beide Strukturen wurden innerhalb der Studie proximal und distal der Osteotomie gezielt zerstört, eine ausreichende Sauerstoff- sowie Nährstoffversorgung fehlte daher in der initialen Phase nach Zellapplikation. Überdies steigt in Folge des veränderten Metabolismus die Konzentration, durch den anaeroben Stoffwechsel freigesetzter, freier Radikale innerhalb der Zellen bereits zwei Tage nach Beginn einer osteogenen Differenzierung. Zu einer gesteigerten Produktion ausgleichender Antioxidativa kommt es jedoch zunächst nicht. Daneben ist die Konzentration freier Radikale bei geschädigtem Periost allgemein erhöht (Schaser et al., 2003). Bei zusätzlich aufgetretener mangelhafter Sauerstoffversorgung entstand in der vorliegenden Studie durch zellmetabolische Prozesse so wahrscheinlich ein Milieu, welches die Aktivität resp. weitere Differenzierung der osteogenen Zellen hemmen konnte (Chen et al., 2008). Zudem erfolgte die Applikation der Zell-Medium-Suspension zwei Tage post operationem in die inflammatorische Phase der Knochenheilung. Dies bedeutete ein saures Mikromilieu, welches die Zellen möglicherweise zusätzlich negativ beeinflusste.

In Folge einer massiv beeinträchtigten und erschwerten Energiegewinnung, in Kombination mit einer biochemisch suboptimalen Mikroumwelt, ist neben einer verminderten Zell-Aktivität auch die Degeneration (Bianchi et al., 2001; Chen et al., 2008) der applizierten osteogenen Vorläuferzellen in der Studie nicht auszuschließen. Vornehmlich vor dem Hintergrund der in der Versuchsgruppe fehlenden endostalen Entwicklung hyalinen Knorpelgewebes und/oder Knochengewebes im unmittelbaren Bereich des Osteotomie-spaltes ist die Degeneration der Osteoprogenitorzellen bei pathophysiologischer Analyse der Ergebnisse als wahrscheinliche Ursache zu berücksichtigen. Unterstützt wird dies durch die Tatsache, dass sich die Gewebeverhältnisse in der Versuchsgruppe im Bereich der Osteotomiezone des Markraums weder in ihrer Art, noch in ihrer Ausprägung von den Gegebenheiten in der Kontrollgruppe unterschieden. In beiden Tiergruppen wurde in diesem Areal ausschließlich fibrotisches Gewebe ohne erkennbare Anzeichen fortschreitender osteokonduktiver Gewebedifferenzierung lokalisiert. Qualitative und/oder quantitativ signifikante Unterschiede des ausschließlich osteotomiespaltfern entstandenen Kallus konnten ebenso in der OPC-Gruppe gegenüber der allein mit Kultivierungs-Medium behandelten Tiere endostal nicht festgestellt werden.

Das innerhalb der OPC-Gruppe bei der Hälfte der Tiere auftretende, mediale periostale Kallusgewebe über den deperiostierten Bereich hinaus, ebenso wie der hier signifikant höhere Anteil an Knorpelgewebe, war dennoch hinweisend auf eine erfolgreiche Initiierung der Knochenheilung in Folge des Einflusses der osteogen prädifferentierten Zellen. Entgegen der vorangegangenen Erwartungen erfolgte diese hier jedoch allein im Rahmen enchondraler Knochenregeneration. Eine direkte osteogene Gewebedifferenzierung konnte nur in Bereichen biologisch intakter, funktioneller Knochenstrukturen über desmale Ossifikation, jedoch nicht in den chirurgisch manipulierten Periost- und Knochenmark-Arealen, gesehen werden.

In Zusammenhang mit der vermehrten chondrogenen Gewebedifferenzierung nach Applikation der osteogenen Vorläufer war auch der Erfolg der *in vitro* (Prä-)Differenzierung genauer zu analysieren. Neuere Studienergebnisse weisen hierbei darauf hin, dass eine mögliche Prädifferenzierung von MSCs in determinierte, unipotente Progenitorzellen anhand der heute gängigen Methoden der Differenzierung und Kultivierung dennoch vorsichtig bewertet werden muss (Baksh et al., 2004; Beyer-Nardi, 2006; Kolf et al., 2007). Es kann zum jetzigen Stand der Wissenschaft nicht ausgeschlossen werden, dass sich, wenn

auch im Rahmen einer Hierarchie, zunächst multipotente Vorläuferzellen entwickeln, welche erst später resp. innerhalb dieser Studie *in vivo*, terminal ausdifferenzieren (Kassem et al., 2004). Yoo et al. (1998) und auch Muraglia und Kollegen (2000) gehen von der *ex vivo* Entwicklung osteo-chondrogener Progenitorzellen in 60 - 80 % der Fälle aus. Dass es sich bei den hier applizierten Zellen um bipotente, osteo-chondrogene Vorläuferzellen handelte, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden. Zweifelsfreie Kenntnisse über die Differenzierung von Vorläuferzellen *in vivo* sind nach den Ausführungen von Jones und Kollegen (2002) nur selten exakt und sehr schwer zu erfassen. Die Forschungsergebnisse von Pittenger und Kollegen (1999), Bianchi et al. (2001) sowie auch Izdapanah und seinem Team (2005) weisen jedoch darauf hin, dass etwa 60 % der MSCs, welche aus dem Knochenmark in osteogenem Medium kultiviert wurden, sich *in vivo* erfolgreich zu reifen Osteoblasten differenzierten.

Bei erfolgreicher osteogener Prädifferenzierung wäre die in der Studie periostal auftretende, chondrogene Zellentwicklung vornehmlich auf Basis perivaskulär immigrierender oder ortständiger multipotenter MSCs aus vitalen Gewebereichen der Kambiumschicht des Periosts sowie eventuell des Knochenmarks erfolgt. Diese MSCs dienen während der Knochenheilung als vornehmliches Stammzell-Depot (Einhorn, 2005). Die perivaskuläre Migration war jedoch als alleinige Ursache der vermehrten Knorpelentwicklung in der vorliegenden Studie auf Grund der Zerstörung beider Strukturen und der damit verbundenen Devaskularisation bei chirurgischer Induktion der aPA-Situation zunächst als unwahrscheinlich zu betrachten (vgl. Reed et al., 2003). Eine Differenzierung dennoch verbliebener, ortständiger multipotenter Stammzellen (Schweiberer et al., 1999) zu Knorpelzellen kann zwar nicht ausgeschlossen werden, jedoch auf Grund der prägnant höheren Menge an Knorpelgewebe in der OPC-Gruppe ebenso nicht allein für die chondrogene Zellentwicklung verantwortlich sein. Folglich muss die signifikant stärkere Entwicklung von Knorpelgewebe in der Versuchsgruppe, wenngleich in ihrer Art unerwartet, in Zusammenhang mit einem erfolgten Einfluss der lokal applizierten Osteoprogenitorzellen stehen.

Die terminale *in vivo* Differenzierung multipotenter Stammzellen ist dabei ein durch molekulare Gewebefaktoren empfindlich stimulierter und regulierter Prozess (Brownlow et al., 2001; Lind et al., 2001). Der essentielle osteoinduktive Einfluss zahlreicher Wachstumsfaktoren (z.B. TGF- β , BMPs), Zytokine sowie nicht-kollagener Matrixproteine (z.B. Osteokalzin, Osteopontin) im Verlauf osteoregenerativer Knochenprozesse wird in

der Literatur mehrfach beschrieben und anhaltend erforscht (Bruder et al., 1998b; Lind et al., 2001; Chaudhary et al., 2004; Chamberlain et al., 2007). Die Differenzierung der Zellen des Knochens erfolgt ebenso autoregulativ in Abhängigkeit von löslichen Faktoren, welche sie selbst synthetisieren und in ihre unmittelbare extrazelluläre Matrix abgeben (Jaiswal et al., 1997; Pittenger et al., 1999). Es wird deutlich, dass eine molekulare Signalgebung von Seiten der umliegenden Zell-/Gewebestrukturen für die Entwicklung von Progenitorzellen entlang determinierter Zelllinien *in vivo* für eine erfolgreiche Knochenregeneration von herausragender Bedeutung ist (Brownlow et al., 2001; Kassem et al., 2004). Bei im Rahmen dieser Studie als wahrscheinlich zu erachtender Degeneration der endostal platzierten OPCs könnte das Phänomen der ermittelten induzierten Knochenheilung im Studien-Modell so auch auf einer molekularen Signal-Transduktion durch freiwerdende extra- und/oder intrazelluläre Matrixbestandteile basieren (Gerstenfeld et al., 1996; Chamberlain et al., 2007). Eine daraus resultierende Gewebereaktion ist dennoch nur dann möglich, wenn sich Akzeptoren im Gewebe befinden, welche auf die gegebenen Reize adäquat reagieren können. Die Mehrheit der ortsständigen Stammzellen und deren periostalen/perivaskulären Migrationswege wurden jedoch in der vorliegenden Studie bewusst zerstört. Entsprechende, zelluläre Donatoren fehlten somit innerhalb der unmittelbaren Osteotomiezone, worauf das vollständige Ausbleiben osteoregenerativer Prozesse in diesem Bereich zurückzuführen ist. Mögliche reagierende Empfänger befanden sich demnach allein periostal, hier v.a. medial, in der OPC-Gruppe, da es in diesem Bereich zu einer signifikant stärkeren Gewebeneubildung auch im thermisch geschädigten Areal kam. Auf eine medial im Besonderen mögliche Lokalisation der applizierten Progenitorzellen wurde bereits hingewiesen.

Der sich mehrheitlich in Form von prominenten Knorpelkappen darstellende signifikant höhere Anteil chondralen Kallusgewebes, war medial in der OPC-Gruppe histologisch deutlich sichtbar entlang der Bindegewebs-Faserschicht ausgerichtet. Diese verlief mehrlagig an der Oberfläche des kortiko-parallelen Kallus im intakten Knochenbereich sowie darüber hinaus, in Richtung des Osteotomiespaltes. Bei Betrachtung der Ergebnisse ist daher ein Einfluss des hier lokalisierten Periosts bzw. dessen rekonstruktiver Strukturen in der Osteotomiezone innerhalb der erfassten Gewebereaktionen denkbar. Die Strukturfasern des Bindegewebes und deren Verlauf deuten hier zum Einen auf eine beginnende Periostrekonstruktion hin, zum Anderen auf eine strukturelle Funktion der Wiederherstellung der

äußeren Knochenhaut als Leitstruktur der auftretenden Kallusentwicklung im geschädigten Periostbereich (O'Driscoll et al., 2001). Das Periost und dessen Rekonstruktion nimmt bei Zusammenhangstrennung des Knochens während der Regeneration eine strukturelle und funktionelle Sonderstellung ein (Volpon, 1994; Remedios, 1999). Die Kambiumschicht der äußeren Knochenhaut stellt innerhalb dessen gleichermaßen die Versorgung der geschädigten Vaskularisation des Gewebes wieder her und dient als Depot multipotenter Stammzellen (Braun et al., 1996; Ito et al., 2000, O'Driscoll et al., 2001). Deren Proliferation und Differenzierung zu Knorpel und/oder Knochenzellen stellt eine der tragenden Säulen der Knochenregeneration dar (Carter et al., 1998; Bianchi et al., 2001). Saris und Kollegen (1999) kultivierten Periostproben des Kaninchen-Femurs unter unterschiedlichen mechanischen bzw. hydrostatischen Druckverhältnissen, um eine Aussage über die Differenzierung der enthaltenen, multipotenten Vorläuferzellen treffen zu können. Das Team konnte dabei feststellen, dass es sich bei den in der Kambiumschicht des Periost lokalisierten Zellen vornehmlich um bipotente, osteo-chondrogene Vorläufer handelt, welche unter steigendem hydrostatischen Druck eine erhöhte chondrogene Proliferations-Kapazität zeigten. Auch Ito und Kollegen (2000) kamen zu diesem Ergebnis. Ferner findet chondrogene Zelldifferenzierung an Orten verminderter vaskulärer Gewebeversorgung resp. erniedrigtem Sauerstoffgehalt statt (Caplan, 1991). Bezüglich der Vaskularisation wiesen die analysierten Präparate der OPC-Tiere im periostalen medialen Bereich eine geringere Gefäßdichte resp. Sauerstoffversorgung gegenüber dem lateralen Areal auf. Ebenso lag insgesamt medial die Gefäßdichte niedriger als in der Medium-Gruppe, signifikant war der Gruppenunterschied jedoch nicht. Entsprechend zeigte sich in der OPC-Gruppe medial eine markant stärkere chondrogene Gewebedifferenzierung in Folge der verminderten Sauerstoffversorgung (Carter et al., 1998) gegenüber dem lateralen Areal. Dies war sowohl innerhalb der OPC-Gruppe als auch im Vergleich zur Medium-Gruppe zu erkennen. In der Kontrollgruppe entwickelte sich im medialen Bereich durch die verbesserte Sauerstoffversorgung weniger Knorpelgewebe. Im lateralen periostalen Knochenareal wies die OPC-Gruppe jedoch trotz der auch gegenüber der Medium-Gruppe erhöhten Gefäßdichte keine vermehrte osteogene Gewebedifferenzierung auf. Wie auch Saris et al. (1999) postuliert das Forschungsteam um Claes (1999), dass, in Abhängigkeit der Höhe auftretender lokaler mechanischer Kräfte und hydrostatischen Drucks, die Differenzierung von mesenchymalen Vorläuferzellen im Kallusgewebe empfindlich beeinflusst werden kann. Ein hoher hydrostatischer Druck und

vermehrte mechanische Belastung führen zur Chondrogenese. Ein ansteigender hydrostatischer Druck wurde innerhalb der genannten Studien (Claes et al., 1999b; Saris et al., 1999) durch mechanische Bewegung erzeugt. Ähnliche, wenn auch nur geringgradig veränderte, mechano-physikalische Verhältnisse entstanden u. U. in der vorliegenden Studie bedingt durch die unilaterale Fixation. Der Auslöser der vermehrten medialen Gewebereaktion könnte dem zur Folge hier ebenso die unterschiedliche mechanische Belastung und damit verbundene biologische Reizgebung auf das Gewebe aufgrund des genutzten Stabilisationssystems sein (vgl. Choi et al., 2004). Die unilaterale, externe Fixation führte im medialen Bereich, kontralateral der Pin-Verankerung, zu einer gegenüber dem lateralen Areal möglicherweise leicht erhöhten Beweglichkeit. Ein damit verbundener, geringgradig gesteigerter hydrostatischer Druck könnte die mediale Knorpelgewebekonstruktion hier zusätzlich getriggert haben (vgl. Hietaniemi et al., 1996; Carter et al., 1998). Hinweise darauf zeigten sich bereits in der allgemeinen Übersichtsbetrachtung in der größeren Menge entstandenen knorpeligen Kallusgewebes medial. Der Grund liegt hier möglicherweise in der im medialen periostalen Bereich insgesamt niedrigeren Gefäßdichte resp. Sauerstoffversorgung, in Verbindung mit einer durch leicht abweichende mechanische/physikalische Belastungsverhältnisse zusätzlich stimulierten Gewebereaktion, auch in Hinblick auf die periostalen Rekonstruktionsvorgänge. Unterstützt wird diese Theorie durch die Anordnung der innerhalb der Studie in der OPC-Gruppe in großer Menge detektierten, hypertrophen Chondrozyten. Das für die frühe Osteogenese langer Röhrenknochen charakteristische Phänomen der »Säulenknorpel«-Bildung wird u.a. durch einwirkende Zug-/Druckkräfte ausgelöst (siehe 2.1.4). Das eine säulenförmige Organisation hypertropher Chondrozyten im mikroskopischen Bild vornehmlich an der osteotomieseitigen Front der medialen, periostalen Knorpelkappen gesehen werden konnte, untermauert die Wahrscheinlichkeit der medial in etwas stärkerer Form auftretenden mechano-physikalischen Belastung des Knochengewebes. Das Gewebe wies medial zusätzlich eine im Verhältnis größere Bioaktivität auf als lateral (s.o.). Der dargestellte Einfluss des Periosts und die damit verbundene chondrogene Gewebekonstruktion, welche allein auf medialer Seite des Knochens stattfand, erklären sich wahrscheinlich über beide genannten Aspekte. Dass die Entwicklung von Kallusgewebe dabei nur bei der Hälfte der OPC-Tiere bis nahe an den Osteotomiespalt heranreichte, ist hier möglicherweise in bestehenden individuellen Schwankungen bezüglich Belastung und erhaltender Gewebekonstruktion sowie innerhalb des technischen Applikationserfolges begrün-

det. Es bleibt jedoch zu beachten, dass sich im ausgewerteten medialen periostalen Knochenareal gegenüber dem lateralen Bereich dennoch in beiden Tiergruppen mehr Knorpelgewebe bei sich weitgehend entsprechenden niedrigen Gefäßdichten entwickelte. Überdies wurde innerhalb des Modells durch das eingesetzte Fixationssystem und die standardisierte Operationstechnik eine zwischen den Tiergruppen vergleichbare Stabilisation der Osteotomie erreicht. Die ermittelte, signifikant stärkere Knorpelentwicklung binnen der Versuchsgruppe kann demnach nicht alleinige Ursache einer mechano-physikalischen Gewebestimulation und verminderten Sauerstoffversorgung sein, sondern muss ferner in Verbindung mit den applizierten OPCs stehen.

Neben einer molekularen Signalgebung durch die eventuell degenerierten OPCs bzw. bei Zerfall der Zellen freiwerdenden stimulierenden, bioaktiven Faktoren lag der vermehrten medialen periostalen Knorpelentwicklung der Versuchsgruppe überdies wahrscheinlich eine weitere unterstützende Komponente auf Basis der periostalen Rekonstruktion zu Grunde.

Es besteht ein deutlicher funktioneller Zusammenhang zwischen dem Stratum fibrosum des Periost und der Zell-Proliferation und -Differenzierung innerhalb der Kambiumschicht (Saris et al., 1999; Ito et al., 2000). Saris und sein Team postulieren, dass Zellen der Faserschicht, induziert über mechanische Einflüsse/steigende hydrostatische Druckverhältnisse, Wachstumsfaktoren freisetzen, welche die Progenitorzellen des Stratum cambium mittels interzellulärer, molekularer Signal-Transduktion zur Differenzierung anregen. Diese innerhalb des Stratum fibrosum synthetisierten und exprimierten bioaktiven Faktoren (TGF- β 1, Insulinlike Growth Factor-1, Differenzierungs-Faktor-5), bewirken überwiegend chondrogene Zelldifferenzierung (Saris et al., 1999; O'Driscoll et al., 2001). Eine Trennung des Periosts von der kortikalen Verbindung, wie sie auch in der vorliegenden Studie bestand, ist dabei zusätzlicher Induktions- und Stimulations-Reiz der Proliferations- und Differenzierungsprozesse (Saris et al., 1999). Untersuchungen zur periostalen Rekonstruktion und deren Einfluss auf die Heilung im Falle einer Zusammenhangstrennung des Knochens zeigten, dass eine vollständige Wiederherstellung der äußeren Knochenhaut keine Voraussetzung für eine fortwährende Regeneration des Gewebes ist (Ito et al., 2000). Vielmehr wurde kenntlich, dass bei Restauration der äußeren Knochenhaut im Verlauf der Heilung zunächst, und innerhalb der Knochenheilung in einer sehr frühen Phase, die zellarme Faserschicht rekonstruiert wird. Hierbei dient das parallel bereits entstehende Kallusge-

webe im Weiteren als strukturelle und funktionelle Stütze einer vollständigen Regeneration der Kambiumschicht (Ito et al., 2000). Eine determinierte zeitliche Abfolge hinsichtlich einer periostalen Rekonstruktion mit anschließender Geweberegeneration kann dabei kaum exakt definiert werden (Ito et al., 2000). Es handelt sich hierbei vielmehr um für den gesamten Knochenheilungsprozess charakteristische zeitlich vernetzte und sich überschneidende Vorgänge. Im vorliegenden Studien-Modell wies der Faserverlauf des gerade in der OPC-Gruppe in großer Menge detektierten, fibrotischen Gewebes auf die beginnende Wiederherstellung des Stratum fibrosum der äußeren Knochenhaut hin. Das histologische Bild zeigte eine mehrlagige Faserschicht, die, ausgehend von der Oberfläche des periostalen Kallus, in die deperiostierte Osteotomiezone einzog. Der entstehende Kallus an der osteotomieseitigen Front richtete sich sichtbar entlang dieses Faserverlaufs aus. Ito und Kollegen (2000) sprechen von einer charakteristisch in Richtung des Stratum fibrosum ausgerichteten chondrogenen Gewebe-Neubildung, was die Theorie einer Beteiligung der periostalen Rekonstruktion und zusätzliche Stimulation der heilungsinduzierenden Vorgänge dieser Studie unterstützt.

Die medial periostal prägnanten hyalinen Knorpelkappen des osteotomieseitigen Kallusgewebes in der OPC-Gruppe sowie deren abaxiale Ausrichtung entwickelte sich somit wahrscheinlich in Anlehnung der beschriebenen periostalen Rekonstruktion. Denkbar ist hier die Kombination einer molekularen Signal-Transduktion der applizierten, degenerierten OPCs, unterstützt durch die Faserschicht des Periosts und der schnellst möglich angestrebten Rekonstruktion der zerstörten Knochenhaut zur Wiederherstellung einer strukturellen/funktionellen Integrität, hinsichtlich Vaskularisation und Stammzellen-Depot. Die Immigration der benötigten vitalen Stammzellen in das Gewebe erfolgte hierbei voraussichtlich perivaskulär aus der verbliebenen, intakten bzw. sich rekonstruierenden Kambiumschicht des Periosts. Der im periostalen Bereich in beiden Tiergruppen immunhistologisch detektierte höhere Anteil an Gefäßstrukturen unterstützte dies ebenso wie die durch Saris et al.(1999), Devine und Kollegen (2002) und auch Chamberlain et al. (2007) beschriebene Migrations-Fähigkeit lokaler multipotenter Stammzellen in den Bereich geschädigten Gewebes. In der lateralen periostalen Osteotomiezone, mit hier gegenüber der medialen Seite insgesamt erhöhten Gefäßdichten, entwickelte sich jedoch im Median kein Knorpelgewebe und ein im Verhältnis geringerer Anteil Kallusgewebe. Dies steht wahrscheinlich in Zusammenhang mit der Lokalisation der OPCs nach Applikation.

Eine Platzierung der Zellen endostal oder medial periostal war hierbei, wie bereits diskutiert, wahrscheinlicher. Darüber hinaus wies das mediale Knochenareal gegenüber der lateralen Seite eine im Verhältnis erhöhte Gewebektivität auf (s.o.), was die Wiederherstellungsprozesse der äußeren Knochenhaut wahrscheinlich hier wesentlich unterstützte.

Der osteoinduktive Einfluss der lokal applizierten OPCs auf die aPA-Situation zeigte sich vornehmlich durch das Erscheinen nach Art enchondraler Osteogenese entwickelten Regenerationsgewebes innerhalb der medialen periostalen Osteotomiezone. Der Studienerfolg stellte sich folglich bezüglich der medullären Transplantation osteogen prä-differenzierter Stammzellen in einer unerwarteten Art und lokalen Ausprägung ein. Vor allem die Ergebnisse im endostalen Areal des Knochens weisen hier gegenüber dem periostal erfassten Einfluss der untersuchten zellulären Behandlung auf die Knochenheilung nicht den erwarteten Erfolg auf.

Eine erwartete Knochenformation mittels zellinduzierter, direkter osteogener Gewebedifferenzierung in der OPC-Gruppe konnte innerhalb der Studie nicht eindeutig bewiesen werden. Das detektierte (mineralisierte) Knochengewebe des endostalen/periostalen Kallus der Versuchsgruppe unterschied sich im histomorphometrisch bestimmten Gesamtflächenanteil nicht statistisch signifikant von dem der Kontrolltiere. Den ungerichteten Geflechtknochenstrukturen des entwickelten Kallus liegt hier die Beteiligung der innerhalb der Studie abseits des deperiostierten Osteotomiebereiches ungeschädigten Strukturen des Periosts sowie des Knochenmarks zugrunde. Das biologische Potenzial des Knochengewebes blieb hier erhalten und besaß so die Fähigkeit über desmale und/oder enchondrale Ossifikation Kallusgewebe aufzubauen (vgl. Yoo et al., 1998, Saris et al., 1999). Im Areal der thermisch zerstörten funktionellen Knochenstrukturen war hingegen in beiden Tiergruppen endostal/periostal keine Entwicklung von mineralisiertem, osteogenem Gewebe feststellbar.

Gemäß der Lokalisation des mineralisierten Anteils an Kallusgewebe zeigten sich resorptionsaktive Osteoklasten vornehmlich ausserhalb der direkten Osteotomiezone, unmittelbar am Geflechtknochen. Die Osteoklastendichte (OD) war dabei innerhalb beider Tiergruppen insgesamt endostal/periostal hoch. Das vermehrte Auftreten der Zellen innerhalb des Knochenheilungsprozesses weist periostal bereits nach zwei Wochen auf einen beginnenden Ersatz des primitiven Geflechtknochen durch Lamellenknochen sowie eine anfängliche Wiederherstellung der Knochenkontur, gemäß der »Remodeling«-Phase sekundärer Frakturheilung hin (Cruess et al., 1975; Frost, 1989a, Schell et al., 2006). Im endostalen Areal wurde ebenso in Versuch- und Kontrollgruppe generell eine hohe Osteoklastendichte (OD) detektiert, welche insgesamt höher als im periostalen Auswertungsbereich war. Das vermehrt endostale Auftreten von Osteoklasten ist hier in Hinblick auf knochenresorptive Prozesse ein erwartetes Phänomen, da die strukturelle, rasche Rekonstruktion des Markraums im Verlauf der Knochenheilung als wichtige Voraussetzung für eine fortschreitende und erfolgreiche Wiederherstellung der physiologischen, zentrifugalen Gefäß- resp. Sauerstoff- und Nährstoffversorgung des Knochengewebes gilt (Braun et al., 1996; Brinker, 1997). Neben den energetischen Aspekten wird so die perivaskuläre Immigration mesenchymaler Stammzellen aus dem Depot des Knochenmarks als einer der Schlüsselprozesse der Geweberegeneration wesentlich verbessert und unterstützt (Carter et al., 1998; Reed et al., 2002). Die Aktivität von Osteoklasten steht in direkter Verbindung mit einem unmittelbaren Kontakt zu mineralisiertem Gewebe (Bonewald et al., 2007). Das die OPC-Gruppe hierbei endostal eine signifikant geringere ($p < 0,01$) OD aufwies, steht zum Einen in Zusammenhang mit dem in diesem Bereich prozentual, wenn auch nicht signifikant ($p = 0,10$), geringeren Anteil mineralisierten Knochengewebes (9 %) gegenüber der Kontrollgruppe (12,9 %). Ferner ist die signifikant erniedrigte OD der OPC-Gruppe möglicherweise auch darin begründet, dass die Osteoklasten bei reduzierter Aktivität in Folge der energetisch suboptimalen Sauerstoffversorgung des Gewebes nicht eindeutig angefärbt wurden und so in der Auszählung nicht erfasst werden konnten. Die endostale Dichte an Sauerstoff liefernden Gefäßen war insgesamt geringer als im periostalen Bereich und überdies in der OPC-Gruppe kleiner als in der Kontrollgruppe. Die damit verbundene, eingeschränkte endostale energetische Versorgung führte hier wahrscheinlich zu einer geringen Aktivität der Osteoklasten. Die zur Auszählung der Zellen genutzte TRAP-Färbung erbringt jedoch nur bei bestehender Zellaktivität ein positives Ergebnis.

Die fehlende osteoregenerative Organisation des Bindegewebes, welches die endostale Osteotomiezone vollständig ausfüllte, war in Verbindung mit einer gleichzeitig insgesamt hohen endostal detektierten Gefäßdichte (GD) resp. energetischen Versorgung sowie den hier lokal applizierten OPCs in der Versuchsgruppe zunächst überraschend. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die Dichte der vaskulären Strukturen in Bezug auf die hier enthaltene (Bindegewebs-)Fläche ermittelt wurde. Die hohen Werte der Berechnung resultieren aus der kleinen Gesamt-Fläche, auf die Bezug genommen wurde. Die detektierten Gefäße stammten dabei vermutlich vornehmlich aus der kompensatorischen Angiogenese von Seiten des umliegenden Weichteilgewebes.

In der Studie konnte, wie bereits angesprochen, anhand der Analyse der GD in beiden Tiergruppen eine höhere Dichte, v.a. kleiner Gefäßeinsprossungen im periostalen gegenüber dem endostalen Bereich in beiden Tiergruppen ermittelt werden. Neben einer zentripetalen Vaskularisation, ausgehend vom Periost (Braun et al., 1996), ist bei massiven Schädigungen der äußerer Knochenhaut und des Markraums/Knochenmarks, wie sie in dieser Studie vorlag, ebenso eine kompensatorische Gefäßeinsprossung ausgehend vom umliegenden Weichteilgewebe dokumentiert (Reed et al., 2003). Diese ausgleichende und so das Gewebe erhaltende, periphere Versorgung unterstützt eine Initiierung der Knochenheilung (Brownlow et al, 2001; Schaser et al., 2003). Die bei der Auswertung ermittelte, insgesamt höheren GD im periostalen Areal resultiert wahrscheinlich aus einer Kombination beider oben genannter Aspekte. Die Gefäßstrukturen blieben bis an die Front des intakten Periosts unbeschädigt und waren so zu einer adäquaten Reaktion und Teilnahme am physiologischen Knochenheilungsprozess (Carter et al. 1998) fähig. Signifikante Unterschiede der GD zeigten sich zwischen den beiden Tiergruppen nicht. In Hinblick auf das aPA-Modell beeinflussten die applizierten OPCs folglich die Angiogenese resp. (Re-)Vaskularisation des Osteotomiebereiches nicht.

Über die oben bereits diskutierten Ergebnisse/Gewebestrukturen hinaus zeigten sich bei Auswertung der Studie histologische Phänomene, welche so im Vorfeld der Überlegungen in keinster Weise vermutet wurden. Zunächst waren unmittelbar angrenzend an die proximale und distale endostale Osteotomiezone Überreste eines Osteotomie-Hämatoms im mikroskopischen Bild erkennbar, welche sich zwischen den Tiergruppen weder im Auftreten noch ihrer Ausdehnung unterschieden. Vereinzelt zeigten sich hier histologisch degenerierende Erythrozyten und Lymphozyten sowie Zelldetritus. Die sich darstellenden

Hämatomreste zum Zweiwochen-Zeitpunkt bei gleichzeitig bereits aufgetretener knöcherner Kallusentwicklung periostal und endostal erschweren zum Einen die genaue zeitliche Einordnung der vorliegenden Heilungsprozesse in eine der physiologischen Regenerationsphasen des Knochengewebes (siehe 2.2.2), zum Anderen unterstützen sie jedoch auch das Bild einer massiv verminderten biologischen Gewebeaktivität innerhalb der aPA-Situation.

In seiner Art vollkommen unerwartet zeigte sich bei drei Tieren der OPC-Gruppe sowie auch zwei Medium-Tieren innerhalb der endostalen Osteotomiezone eine bullöse Struktur, welche den Markraum in diesem Bereich beherrschte. Sie erstreckte sich über die gesamte Breite des Knochenmarkshöhle von der medialen zur lateralen endostalen Kortikalis bzw. den dortigen Osteotomieenden. Im Inneren der endostalen Blase konnten vereinzelt Erythrozyten sowie Lymphozyten in der mikroskopischen Vergrößerung gesehen werden. Hinweise auf die applizierten OPCs oder den Einfluss der Zellen auf die Entstehung der endostalen Struktur fanden sich jedoch histologisch nicht. Dieses innerhalb der Studie vollkommen unerwartete Phänomen einer endostalen bullösen Struktur steht nicht in Verbindung mit einer biologische Reaktion des Gewebes auf die injizierten Zellen oder das verwendete Medium. Die enthaltenen, nur vereinzelt in Erscheinung tretenden Lymphozyten sprechen gegen eine inflammatorische Reaktion. Bei den lokalisierten einzelnen roten Blutkörperchen handelte es sich vermutlich um versprengte, dislozierte Zellen des Osteotomiehämatoms. Das eingesetzte Medium erwies sich in identischer Zusammensetzung bereits in zahlreichen wissenschaftlichen Studien (z.B. Shao et al., 2007) als biologisch inert und kann demnach hier ebenso nicht für die Entwicklung der bullösen Struktur verantwortlich sein. Die Ursache bleibt unklar, basiert jedoch, da sie sich in beiden Tiergruppen zeigte, wahrscheinlich auf der Technik der Suspensions-Applikation.

Ebenso unerwartet wie die Blasenstruktur im endostalen Areal wurden intrakortikal grünliche, homogene Strukturen sichtbar. Sie zeigten sich histologisch in den Movat Pentachrom gefärbten Präparaten und traten analog dazu in den Kollagen II gefärbten Schnittpräparaten in einer rosa-roten Anfärbung in Erscheinung. Beide Farbgebungen waren innerhalb der genutzten Färbemethoden spezifisch für Knorpelstrukturen. Sie traten in beiden Tiergruppen gleichermaßen in Erscheinung und standen daher nicht in Kontext mit den applizierten OPCs. Histologisch auffällig war eine scheinbar lakunäre Formgebung der homogen gefärbten Bereiche sowie teilweise darin aufzufindende osteozytäre oder chondroblastäre Zellstrukturen. Die Unregelmäßigkeiten der kortikalen Struktur traten überdies

ebenso in gruppenfremden Femurpräparaten von Ratten auf, welche innerhalb eines diese Studie einschließenden Projektes angefertigt wurden. Die dort untersuchten Tiere erhielten eine Suspension aus autologen mesenchymalen Stammzellen und Kulturmedium lokal in den Osteotomiespalt des identischen aPA-Modells. Um einen Zusammenhang mit den durchgeführten Manipulationen und Behandlungstechniken des Knochenheilungs-Modells auszuschließen, wurden daher vergleichend Knochenpräparate herangezogen, welche außerhalb des vorliegenden Projektes angefertigt worden waren. Bei diesen Präparaten handelte es sich um Probeschnitte bzw. -färbungen (Movat-Pentachrom) von unbehandelten Knochenproben oder solchen, die einer Untersuchung zur physiologischen Knochenheilung unterstanden. Die untersuchten Ratten-Femora und -Tibiae wiesen innerhalb der Kortikalis ebenso homogene grünliche Strukturen in vergleichbarer Menge und Ausdehnung auf. Es handelt sich daher also wahrscheinlich um ein allgemeines, rattenspezifisches Phänomen. Auch nach eingehender Recherche konnten hierzu keine Aufzeichnungen gefunden werden. Harrison et al. (2003) beschreiben zwar ein lebenslanges Wachstums der Röhrenknochen bei der Ratte, mit charakteristischen Um- und Abbauvorgängen, geben aber keine Hinweise auf eine mögliche Erklärung der ermittelten intrakortikalen Strukturen. Eine eindeutige Erläuterung des Phänomens kann hier nicht erfolgen. Auch in Hinblick auf die teilweise innerhalb des Gefüges sichtbaren osteozyten- und chondroblasten-ähnlichen Zellstrukturen handelt es sich wahrscheinlich um eine physiologische Erscheinung in Zusammenhang mit chondrogener Matrixsynthese, wie sie innerhalb von Knochenum- und -aufbauprozessen charakteristischer Weise auftritt. Um jedoch eine gesicherte Definition und ebenso Aussage über die strukturelle und funktionelle Bedeutung zu erlauben, bedarf es weiterer wissenschaftlicher Untersuchungen.

5.2.4 Vergleich mit anderen Studien

Die vorliegende Studie entstand im Rahmen eines Gesamtprojektes, in welchem auch der Einsatz autologer in vitro expandierter, jedoch nicht prädifferentierter MSCs zur **Therapie der erliegenden Knochenheilung** im identischen Tiermodell untersucht wurde (MSC-Studie). Die Anzahl der applizierten MSCs sowie der Applikationszeitpunkt waren ebenso äquivalent wie die hier verwendeten Materialien und Methoden. In der genannten Studie konnte zum Zweiwochen-Zeitpunkt kein klinisch relevanter Einfluss der MSCs auf die Knochenheilung festgestellt werden (Peters, 2008). Auch nach der lokalen Applikation der MSCs in den Osteotomiespalt wurde endostal und periostal die Entwick-

lung von Kallusgewebe mikroskopisch-histologisch erkennbar und histomorphometrisch detektiert. Der Kallus lokalisierte sich dabei entgegen der vorliegenden OPC-Studie jedoch hier in Versuchs-(MSC-Gruppe) und Kontrollgruppe allein fern des Osteotomiespaltes, im vitalen Gewebeareal. Das periostale Kallusgewebe erreichte, anders als in der vorliegenden Studie, das thermisch zerstörte Periostareal binnen der Versuchsgruppe nicht, was auf einen verbesserten Einfluss der applizierten OPCs gegenüber der MSCs hinweist. In Bezug auf die Zusammensetzung des Kallusgewebes entsprachen die Ergebnisse der MSC-Studie in ihrer Art den Ergebnissen der vorliegenden OPC-Studie weitgehend. Die endostale Osteotomiezone war auch bei den mit MSCs behandelten Tieren vollständig mit Bindegewebsstrukturen ausgefüllt, welche keine osteokonduktiven Prozesse erkennen ließen (Peters, 2008). Der im endostalen Bereich ausbleibende Effekt der applizierten Zellen konnte so entsprechend der vorliegenden Studie auch innerhalb der MSC-Studie festgestellt werden. Es zeigte sich ferner innerhalb der MSC-Studie äquivalent zur vorliegenden OPC-Studie eine vermehrte periostale Kallusentwicklung im medialen Knochenareal, welche auch hier auf eine verbesserte Bioaktivität des medialen Knochenareals gegenüber dem lateralen Bereich zurückgeführt wurde (Peter, 2008). Überdies wurde periostal medial ebenso eine stärkere, chondrogene Ausdifferenzierung der MSCs binnen der Versuchsgruppe (MSC-Gruppe) gegenüber den Kontrolltieren ermittelt. Signifikant waren die Ergebnisse der MSC-Studie im Gegensatz zu der vorliegenden Studie jedoch nicht. Die vermehrte Differenzierung von Knorpelgewebe in der MSC-Studie resultierte hier wahrscheinlich aus dem chondrogenen Entwicklungs-Stimulus auf die multipotenten MSCs, in Folge verminderter Gefäß- resp. Sauerstoffversorgung (siehe 5.2.3) (Caplan, 1991; Peters, 2008). Der periostale mediale Kallus der OPC-Tiere zeigte sowohl in Bezug auf die Knorpelflächen-Anteile (OPC-Gruppe: 4,6 %, MSC-Gruppe: 2,4 %), als auch in Hinblick auf den Anteil an Kollagen II (OPC-Gruppe: 12,0 %, MSC-Gruppe: 2,7 %) im Vergleich der Studienergebnisse deutlich höhere Werte als binnen der MSC-Tiere von Peters (2008) detektiert wurden. Die Versuchsgruppe der OPC-Studie wies ferner medial auch innerhalb der deperiostierten Osteotomiezone Kallusgewebe auf, welches sich überdies weiter in Richtung des Osteotomiespaltes ausdehnte als in der MSC-Gruppe/-Studie. In Verbindung mit dem quantitativ höhere Anteil [%] sich bereits kalzifizierendem hyalinem Knorpelgewebes gegenüber der MSC-Gruppe ist dies hinweisend auf eine erfolgreiche Initiierung der Knochenheilung nach Art enchondraler Ossifikation durch den Einsatz der OPCs (siehe

5.2.3). Bei identischer Ausgangssituation kann daher auf Basis der genannten Ergebnisse zwei Wochen nach Osteotomie von einem Einfluss der injizierten OPCs auf die Knochenheilung gesprochen werden, welcher nach Applikation der MSCs im identischen Studienmodell und Zeitrahmen weitgehend ausblieb.

Um den Vorteil des Einsatzes von *in vitro* prädifferentzierten OPCs gegenüber MSCs hier eindeutig unter Beweis zu stellen, bedarf es dennoch genaueren Untersuchungen in Hinblick auf die weitere zeitliche und strukturelle Regeneration des Knochengewebes im identischen Tiermodell. Entsprechende Studien zum Einfluss von autologen MSCs und *in vitro* vordifferentzierten OPCs innerhalb eines Zeitraumes von acht Wochen werden derzeit im Centrum für muskuloskeletale Chirurgie (CMSC)/Charité Berlin durchgeführt.

Eine Gegenüberstellung der gegebenen Studie mit weiteren vergleichbaren Studien kann hier kaum vorgenommen werden, da bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Untersuchungen zum Einfluss von autologen *in vitro* vordifferentzierten Osteoprogenitorzellen auf eine Initiierung der Knochenheilung in einer aPA-Situation durchgeführt wurden. Abgeschlossene **Studien zum Einsatz von OPCs** in der osteoregenerativen Medizin standen bisher vor allem in Zusammenhang mit möglichen Therapieansätzen auf dem Gebiet der chirurgischen Knochendistraktion und segmentalen Knochendefekten kritischer Größe (»critical size defects«) (Takushima et al., 1998; Tsubota et al., 1999; Srouji et al., 2005; Schliephake et al., 2005; Shao et al., 2007). Wie bereits erwähnt, können diese jedoch nicht zu einer adäquaten Gegenüberstellung herangezogen werden, da sich das Knochengewebe bei Vorliegen der genannten Defekte primär in einem biologisch aktiven Status befindet (Kokubu et al., 2003). Sowohl im Falle einer Distraktions- als auch einer Segmentalfraktur erscheinen die Fragmentenden vaskularisiert, und das physiologische Stammzell-Depot bleibt weitgehend unversehrt. In Abhängigkeit der Defektweite ist hier allenfalls die Entwicklung von hypertrophen Pseudarthrosen zu beobachten. Der Knochen besitzt weiterhin das Potenzial zur Autoregeneration. Der avitale Gewebestatus einer aPA entsteht in dieser Situation gegebenenfalls allein durch das Überschreiten der osteogenen Regenerationskapazität des Gewebes, in deren Folge dessen biologische Aktivität erliegt. Im vorliegenden Studienmodell bestand jedoch bereits initial eine massiv geschädigte, annähernd avitale Gewebesituation.

Dennoch konnten die erfolgten Studien im Gesamtergebnis unter Beweis stellen, dass der Einsatz von OPCs zur Stimulation der Knochenheilung zu einer zeitlich verbesserten und extensiveren Knochenformation führt (Takamine et al., 2002; Shao et al., 2007) und ferner die Qualität des entstehenden Kallus, wie auch in der vorliegenden Untersuchung, deutlich erhöht wird (Tsubota et al., 1999). Hervorzuheben ist dabei die Studie von Shao et al. (2007). Das Team untersuchte den Einfluss in vitro vordifferenzierter OPCs nach lokaler Applikation in den Spalt einer mandibulären Distraktionsfraktur beim Kaninchen. Die Kultivierung und osteogene Prädifferenzierung der MSCs entsprach in Technik sowie qualitativer Zusammensetzung der genutzten Medien der vorliegenden Studie. Ferner erhielt die Kontrollgruppe hier ebenfalls allein Kultivierungsmedium in den Distraktionspalt und auch das Applikations-Volumen der Zell-/Medium-Suspension war identisch. Entsprechend der hier dargelegten Untersuchung entwickelte sich der Kallus innerhalb der Versuchsgruppe in größerer Menge und war gegenüber den Kontrolltieren von verbesserter Qualität. Bereits zum Zweiwochen-Zeitpunkt konnte hier eine signifikant höhere Mineralisationsdichte des Kallusgewebes in der Versuchs- gegenüber der Kontrollgruppe ermittelt werden. Takamine et al. (2002) nutzten überdies erfolgreich das bereits angesprochene Kollagen-Gel als Trägermaterial, um eine Diffusion der OPCs in das umliegende Gewebe zu verhindern und erzielten gegenüber einer Zell-Medium-Kombination verbesserte osteokonduktive Ergebnisse. Auch Srouji et al. (2005) konnten durch den Einsatz eines mit OPCs beladenen Hydrogel-Gerüsts in eine Segmental-Fraktur äquivalent positive Ergebnisse erreichen.

5.2.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die Hypothese der Studie konnte durch die histologischen und histomorphometrischen Untersuchungen bestätigt und bewiesen werden. Wenngleich nicht im Sinne erwarteter, vornehmlich endostaler, direkter osteokonduktiver Effekte, ließ sich dennoch in Zusammenhang mit den lokal applizierten autologen OPCs eine Initiierung der Knochenheilung in der atrophischen Pseudarthrose-Situation via enchondraler Ossifikation im periostalen Knochenareal unter Beweis stellen.

Ob die durch die lokale Applikation autologer in vitro prädifferenzierter OPCs in dieser Studie induzierte Knochenheilung bei bestehender aPA-Situation im weiteren zeitlichen Verlauf zu einer abgeschlossenen Heilung des Knochens führen wird, kann zum

untersuchten Zweiwochen-Zeitpunkt nicht sicher vorausgesagt werden. Reicht die Menge bei Zelldegeneration freigesetzten bioaktiven Faktoren, um die induzierte Knochenheilung so lange zu triggern, dass eine zur vollständigen Knochenregeneration ausreichende Revascularisierung zur adäquaten Versorgung und perivaskulären Zell-Immigration des geschädigten Gewebes periostal und endostal fortschreiten kann, tritt möglicherweise im Weiteren eine Heilung auf. Ist dies nicht der Fall, wird das entstandene neu gebildete Gewebe mit hoher Wahrscheinlichkeit degenerieren und eine aPA des Knochens in Erscheinung treten. Die Vaskularisation als Basis energetischer Gewebeversorgung und Migrationsweg weiterer, zur Gewebeneubildung wesentlicher, multipotenter Stammzellen ist unverzichtbarer Bestandteil einer Wiederherstellung der vollständigen Integrität des Knochens (Schweiberer et al., 1999). Fortschreitende Regenerationsprozesse sind dementsprechend stark abhängig von einer progressiv fortschreitenden Revaskularisierung des Osteotomieareals. Dass diese Möglichkeit hier besteht, wird durch die Forschungsergebnisse von Reed et al. (2003) untermauert. Deren Untersuchungen konnten beweisen, dass sich im Falle einer aPA die Vaskularisation innerhalb eines Zeitraums von acht Wochen den bei physiologischer Knochenheilung auftretenden Gefäßverhältnissen weitgehend angleicht.

Überdies wäre eine weiter fortschreitende Heilung im Modell ebenso durch die hier auftretende hypertrophen Chondrozyten möglich. Nach wissenschaftlichen Erkenntnissen geht von hypertrophen Chondrozyten, welche in der OPC-Gruppe in deutlich größerer Menge auftreten, eine osteogene Signalgebung aus. Während der Entwicklung von Knorpelgewebe, bzw. dessen Abbau, und Aufbau von Knochengewebe nimmt die Entwicklungsstufe der hypertrophen Chondrozyten maßgeblichen Anteil. Die Knorpelzellen proliferieren zunächst und richten sich interfragmentär aus, um in der frühen Phase der Heilung eine anfängliche Stabilität zu gewähren. Dabei synthetisieren sie Knorpelgrundsubstanz sowie spezifische Matrix-Proteine (z.B. AP, Kollagen Typ X) und hypertrophieren in Folge der stetig vermindert möglichen Versorgung via Diffusion. In diesem Stadium sind sie über die Expression von knochenspezifischen Signalproteinen, zunächst Osteopontin, später auch Osteokalzin und Bone-Sialo-Protein, an der Matrix-Mineralisation sowie Rekrutierung von Osteoblasten beteiligt (Lian et al., 1993; Gerstenfeld et al., 1996). So initiieren sie im Rahmen der enchondralen Ossifikation die Knochenregeneration (Roach, 1992; Carter et al. 1998). Die Expression der knochenspezifischen Signalproteine wurde bislang nur in vitro untersucht. Auf Basis einer maßgeblichen Beteiligung von hypertro-

phen Chondrozyten an der Knochenformation untersuchten Stringer et al. (2007) das osteoinduktive Potenzial immortalisierter, humaner hypertropher Chondrozyten sowie auch das deren zellfreier extrazellulären Matrix. Sie detektieren dabei molekulare Signale reifer sowie hypertropher Chondrozyten, welche ex vivo die Differenzierung aus dem humanem Knochenmark fraktionierter MSCs zu Osteoblasten induzierten. Applizierte, zellfreie Matrixbestandteile der hypertrophen Chondrozyten führten in vivo im Ratten-Modell zu einer Knochenformation (Stringer et al., 2007).

Zunächst bleibt zu untersuchen, ob in vivo die Synthese der oben genannten Signal-Proteine durch hypertrophe Chondrozyten auch eine alleinige, gezielte Stimulation und Induktion von osteogenen Vorläuferzellen ermöglicht. In diesem Fall wäre eine fortschreitende Heilung in der vorliegenden Studie, in Verbindung mit der zu erwartenden voranschreitenden Revaskularisierung (Reed et al., 2003) sowie dargestellter Bio(re)aktivität der Periostrekonstruktion (Saris et al., 1999; Ito et al., 2000) denkbar. Überdies könnte hier ebenso eine wiederholte lokale Applikation von OPCs zu einer weiterführenden Knochenregeneration beitragen.

Eine Applikation der OPCs zu einem späteren Zeitpunkt hätte eine Degeneration voraussichtlich vermindern oder gänzlich verhindert können und so möglicherweise zu einem verbesserten osteoregenerativen Einfluss der Progenitorzellen geführt. Bei Gewährleistung des aeroben Zellmetabolismus durch die progressive Revaskularisierung der aPA (Reed et al., 2003) sowie Vorliegen eines, außerhalb der Entzündungsphase bestehenden basischerem Mikromilieus wäre eine Degeneration der Zellen wahrscheinlich nicht erfolgt. Die OPCs hätten somit osteogen ausdifferenzieren können und die Knochenformation möglicherweise in entsprechend höherem Maße stimuliert und verbessert. Der optimale Applikationszeitpunkt ist jedoch abhängig von biochemischen und biologischen Verhältnissen im Fraktur-/Osteotomie-Gewebe sowie auch an die Wirkungsdauer innerhalb des Frakturgebietes freigesetzter, molekularer Signale gebunden. Der optimale zeitliche Applikations-Rahmen ist wissenschaftlich noch undefiniert und kann nur durch weiterführende Grundlagenforschung eruiert werden. Ebenso wesentlich ist es, weitere Kenntnisse über benötigte und spezifische Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle sowie Matrix-Zusammensetzungen in Verbindung mit deren Wirkungsmechanismen zu sammeln (Bianchi et al., 2001), um den Differenzierungsweg der Zellen in vivo besser verstehen, vorhersagen und so therapeutisch nutzen zu können.

6 Zusammenfassung

Diaphysäre atrophe Pseudarthrosen weisen oftmals ungünstige biologische Ausgangsbedingungen zur Heilung auf. Der Grund liegt in einer häufig erheblich beeinträchtigten vaskulären Versorgung des Knochengewebes in Folge des vorangegangenen Traumas (Kasperczyk et al., 1996). Eine Heilung des Knochens kann in dieser Situation nur nach chirurgischer Intervention erreicht werden (Gebauer et al., 2005). Der derzeitige »Goldstandard« der Behandlung besteht in einer stabilisierenden Osteosynthese in Kombination mit allogener/autologer Spongiosa-Transplantation (Braun et al., 1996). Die Therapie führt jedoch oftmals nur nach wiederholten Eingriffen zum Erfolg. Neben hohen sozioökonomischen Kosten bedeutet dies vor allem eine lange Rekonvaleszenz für den betroffenen Patienten, welche mit erheblichen physischen sowie nicht selten auch psychischen Belastungen verbunden ist. Darüber hinaus sind wiederholt erforderliche Operationen stets mit einem erhöhten Risiko, besonders für gesundheitlich vorbelastete Personen, verbunden. Der Erforschung alternativer, minimal invasiver Therapiemethoden gestörter Knochenheilung gilt daher die besondere wissenschaftliche Aufmerksamkeit. Der Einsatz mesenchymaler Stammzellen (MSCs) wird in diesem Zusammenhang praktisch, ethisch und immunologisch als unbedenklich angesehen (Rauner et al., 2007) und stellt somit einen hoffnungsvollen Ansatz im Bereich minimal invasiver osteoregenerativer Medizin dar (Izadpanah et al., 2005). Innerhalb der vorliegenden Studie wurde der Einsatz autologer osteogen prädifferentzierter mesenchymaler Stammzellen auf die Knochenheilung untersucht. Die Zielsetzung der Studie bestand in einer Untersuchung des Einflusses der daraus resultierenden Osteoprogenitorzellen (OPCs) auf die Osteoregeneration bei massiv verminderter Bioaktivität des Knochengewebes, wie sie im Falle einer atropen Pseudarthrose vorliegt.

Zur Durchführung der Studie wurden 32 männliche, adulte Ratten randomisiert in zwei gleichgroße Gruppen (Versuchsgruppe, Kontrollgruppe) eingeteilt. Allen Tieren wurde Knochenmark aus der Tibia entnommen. Aus dem Aspirat der Versuchsgruppe wurden MSCs fraktioniert, *in vitro* expandiert und zu osteogenen Vorläuferzellen (OPCs) prädifferentziert. Im Anschluss erfolgte die standardisierte Osteotomie des Femurs in der Diaphysenmitte bei allen Tieren, welche mittels unilateralem Fixateur extern stabilisiert wurde. Zur Induktion einer atropen Pseudarthrose-Situation erfolgte die thermische Zerstörung des Periosts 2 mm proximal und distal des Osteotomiespaltes sowie die Entnahme des Knochenmarks im Bereich der Osteotomie. Zwei Tage post operationem (p.o.) wurde

den Tieren der Versuchsgruppe perkutan eine Suspension bestehend aus ca. 2×10^6 autologen OPCs/0,1 ml Expansionsmedium lokal in den Osteotomiespalt appliziert (OPC-Gruppe). Den Kontrolltieren wurde allein ein äquivalentes Volumen des Expansionsmediums lokal injiziert (Medium-Gruppe). Am Tag der Osteotomie sowie auch im Rahmen einer wöchentlich vorgenommenen Wundkontrolle wurden radiologische Aufnahmen angefertigt. Zwei Wochen p.o. wurden die Femora aller Tiere gewonnen und histologischen, histomorphometrischen sowie immunhistologischen Untersuchungen unterzogen. Die radiologische und histologische Auswertung ließ eine erfolgreich induzierte Verzögerung der Knochenheilung nach Art einer beginnenden atrophen Pseudarthrose erkennen. Die Untersuchungen erbrachten im Weiteren eine signifikant größere Fläche periostalen Kallusgewebes [%] binnen der OPC-Gruppe sowie innerhalb dessen einen ebenso signifikant größeren Anteil hyalinen Knorpelgewebes [%] im medialen periostalen Knochenareal der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe. Die detektierten Anteile (mineralisierten) Knochen- und Bindegewebes entsprachen sich hingegen zwischen den Gruppen.

Anhand der ermittelten Ergebnisse konnte durch die lokale Applikation autologer osteogen vordifferenzierter Zellen in den Spalt einer Osteotomie bei massiv beeinträchtigter Vitalität des Knochengewebes zwei Wochen nach Transplantation der OPCs eine Stimulation der Knochenregeneration festgestellt werden. Der Einfluss der Zellen beschränkte sich dabei jedoch auf das mediale periostale Knochenareal und erfolgte ausschließlich nach Art beginnender enchondraler Ossifikation. Darüber hinaus deutete sich eine Beteiligung des sich rekonstruierenden Periosts am ermittelten Effekt der OPCs an. Die Applikation der Zell-Medium-Suspension zu einem späteren Zeitpunkt und/oder auch eine wiederholte Injektion der OPCs in Verbindung mit dem Einsatz eines visköseren Suspensions-Mediums könnten hier zur Optimierung des osteokonduktiven Stimulus beitragen.

7 Summary

The impact of autologous mesenchymal stem cells predifferentiated into the osteogenic lineage on bone healing in a rodent atrophic non-union model

Diaphyseal atrophic non-unions often show biologically disadvantageous conditions for healing. An insufficient vascular supply of the fractured bone as a result of a preceding trauma is considered the main cause (Kasperczyk et al., 1996). In such a situation, bone regeneration cannot be achieved without surgical intervention (Gebauer et al., 2005). The current »golden standard« for treatment is to provide a stabilizing osteosynthesis in combination with transplantation of autologous/allogeneic spongiosa (Braun et al., 1996). However, this kind of therapy does not always guarantee healing. Besides high socio-economic costs, a failure in bone healing is associated with a prolonged recovery time and therefore patient suffering. Moreover repeated surgical interventions may be a risk factor, especially for medically compromised patients. Therefore, over the past years medical science has focused on minimally invasive methods for treatment of delayed and non-unions. In this context, the use of mesenchymal stem cells (MSCs) is considered to be practically, ethically and immunologically inoffensive (Rauner et al., 2007). Thus MSCs represent a promising approach for minimally invasive therapies to enhance bone regeneration (Izdapanah et al., 2005). The present study analyzed the influence of autologous MSCs predifferentiated into the osteogenic lineage *in vitro* on bone healing. The aim of this study was to examine the therapeutic potential of locally transplanted autologous osteoprogenitor cells (OPCs) in a biologically unreactive fracture situation.

Therefore, 32 male adult Sprague DawleyTM rats were randomly divided into two groups, each 16 animals (experimental group, control group). All animals received a tibial bone marrow aspiration. Isolated MSCs were cultured *in vitro* and predifferentiated into the osteogenic lineage. In all animals, a standardized midshaft osteotomy of the femur diaphysis was performed and stabilized with a monolateral external fixator. An atrophic non-union was induced by thermal destruction of the periosteum 2 mm proximally and distally to the osteotomy gap and bone marrow removal. Two days after surgery, the experimental group received a percutaneous injection of approximately 2×10^6 OPCs/0,1ml expansion medium into the osteotomy gap, whilst the control group was treated with an

equivalent volume of pure expansion medium. X-rays were taken directly postoperatively as well as at one and two weeks after surgery. After two weeks, the femora of all animals were explanted and processed for histological/histomorphometrical and immunohistochemical analysis. Radiological and histological examination demonstrated a delay in bone healing. By histomorphometrical analysis, a significantly higher area of the periosteal callus and a higher fraction of cartilage in the periosteal callus at the medial side was found in the experimental compared to the control group. However, there was no difference in the fraction of (mineralized) bone and connective tissue between both groups.

The present study demonstrates that percutaneously injected autologous OPCs slightly improved the healing of an atrophic non-union. But, the effect was limited to an incipient endochondral ossification in the periosteal callus on the medial side. The results further illustrate a participation of the beginning reconstruction of the periosteum in the effect of the OPCs. Application of OPCs at a later time point after osteotomy or re-injection of the cells, combined with a more viscous suspension medium, might lead to a more pronounced osteogenic effect.

8 Literatur

- Arinzeh, T.L.** (2005): Mesenchymal stem cells for bone repair: preclinical studies and potential orthopedic applications. *Foot Ankle Clin.*, 10(4): 651-665.
- Aubin, J.E.** (1999): Osteoprogenitor cell frequency in rat bone marrow stromal populations: role for heterotypic cell-cell interactions in osteoblast differentiation. *J Cell Biochem.*, 72(3): 396-410.
- Babhulka, S., Pande, K.** (2005): Nonunion of the diaphysis of long bones. *Clin Orthop Relat Res.*, (431): 50-56.
- Baksh, D., Song, L., Tuan, R.S.** (2004): Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J. Cell. Mol. Med.*, 8(3): 301-316.
- Basso, N., Jia, Y., Bellows, C.G., Heersche, J.N.** (2005): The effect of reloading on bone volume, osteoblast number, and osteoprogenitor characteristics: studies in hind limb unloaded rats. *Bone*, 37(3): 370-378.
- Betz, O.B., Betz, V.M., Nazarian, A., Pilapil, C.G., Vrahas, M.S., Bouxsein, M.L., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A., Evans, C.H.** (2006): Direct percutaneous gene delivery to enhance healing of segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am.*, 88(2): 355-365.
- Beyer-Nardi, N., da Silva Meirelles, L.** (2006): Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb Exp Pharmacol.*, (174): 249-282.
- Bianchi, G., Muraglia, A., Daga, A., Corte, G., Cancedda, R., Quarto, R.** (2001): Microenvironment and stem properties of bone marrow-derived mesenchymal cells. *Wound Repair Regen.*, 9(6): 460-466.
- Boenisch, T.** (2003): Handbuch immunhistochemischer Färbemethoden. 3.Auflage, Kalifornien, *Dako Cytomation*, S. 14ff..
- Bonewald, L.F.** (2007): Osteocytes as dynamic, multifunctional cells. *Ann NY Acad Sci.*, (1116): 281-290.

- Bosch, U., Skutek, M., Kasperczyk, W.J., Tscherne, H.** (1999): Nonunion of the humeral diaphysis – operative and nonoperative treatment. *Chirurg.*, 70(11): 1202-1208.
- Boskey, A.L., Posner, A.S.** (1984): Bone structure, composition and mineralization. *Clin Orthop North Am.*, 15(4): 597-612.
- Boyan, B.D., Caplan, A.I., Heckman, J.D., Lennon, D.P., Ehler, W., Schwartz, Z.** (1999): Osteochondral progenitor cells in acute and chronic canine nonunions. *J Orthop Res.*, 17(2): 246-255.
- Bradley, R.L., Rouse, G.P.** (1980): External skeletal fixation using the through-and-through Kirschner splint. *J Am Anim Hosp Assoc.*, (16): 523-530.
- Braun, W., Rüter, A.** (1996): Frakturheilung: Morphologische und Physiologische Gesichtspunkte. *Unfallchirurg*, 99(1): 59-67.
- Brighton, C.T.** (1984): The biology of fracture repair. *Instr Course Lect.*, (33): 60-82.
- Brinker, M.R., Bailey, D.E. Jr.** (1997): Fracture healing in tibia fractures with an associated vascular injury. *J Trauma*, 42(1): 11-19.
- Brosius, F.** (2004): SPSS 12, 1.Auflage, Frechen, *Mitp-Verlag*.
- Brownlow, H.C., Reed, A., Simpson, A.H.** (2001): Growth factor expression during the development of atrophic non-union. *Injury*, 32(7): 519-524.
- Bruder, S.P., Kurth, A.A., Shea, M., Hayes, W.C., Jaiswal, N., Kadiyala, S.** (1998a): Bone regeneration by implantation of purified, cultur-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res.*, 16(2): 155-162.
- Bruder, S.P., Jaiswal, N., Ricalto, N.S., Mosca J.D., Kraus K.H., Kadiyala, S.** (1998b): Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res.*, (355Suppl): 247-256.
- Bucher, O., Wartenberg, H.** (1997): Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 12. Auflage, Bern, *Hans Huber Verlag*, S. 183-200.
- Burck, H.G.** (1988): Histologische Techniken. Leitfaden für die Herstellung mikroskopischer Präparate in Unterricht und Praxis. 6. Auflage, Stuttgart/New York, *Thieme Verlag*, S. 118-119, S. 152-161.

- Cancedda, R., Bianchi G., Derubeis, A., Quarto, R.** (2003): Cell therapy for bone disease: a review of current status. *Stem Cells*, 21(5): 610-619.
- Caplan, A.I.** (1991): Mesenchymal Stem Cells. *J Orthop Res.*, 9(5): 641-650.
- Carter, D.R., Beaupré, G.S., Giori N.J., Helms, J.A.** (1998): Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clin Orthop Relat Res.*, (355Suppl): 41-55.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., Middleton, J.** (2007): Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features and potential for homing. *Stem Cells*, 25(11): 2739-2749.
- Chaudhary, L.R., Hofmeister, A.M., Hruska, K.A.** (2004): Differential growth factor control of bone formation through osteoprogenitor differentiation. *Bone*, 34(3): 402-411.
- Chen, C.T., Shih, Y.V., Tuo, T.K., Lee, O.K., Wei, Y.H.** (2008): Coordinated changes of mitochondrial biogenesis and antioxidant enzymes during osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 26(4): 960-968.
- Choi, P., Ogilvie, C., Thompson, Z., Miclau, T., Helms, J.A.** (2004): Cellular and molecular characterization of a murine non-union model. *J Orthop Res.*, 22(5): 1100-1107.
- Claes, L., Heitemeyer, U., Krischak, G., Braun, H. Hierholzer, G.** (1999a): Fixation technique influences osteogenesis of comminuted fractures. *Clin Orthop Relat Res.*, (365): 221-229.
- Claes, L.E., Heigele, C.A.** (1999b): Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing. *J Biochem.*, 32(3): 255-266.
- Connolly, J.F., Shindell, R.** (1986): Percutaneous marrow injection for an ununited tibia. *Nebr Med J.*, 71(4): 105-107.
- Connolly, J.F., Guse, R., Tiedemann, J., Dehne, R.** (1989): Autologous marrow injection for delayed unions of the tibia: a preliminary report. *J Orthop Trauma*, 3(4): 276-282.
- Connolly, J.F.** (1998): Clinical use of marrow osteoprogenitor cells to stimulate osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res.*, (355Suppl): 257-266.

- Cornell, C.N., Lane, J.M.** (1998): Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res.*, (355Suppl): 267-273.
- Cruess, R.L., Dumont, J.** (1975): Fracture Healing. *Can J Surg.*, 18(5): 403-413.
- D'Ippolito, G., Schiller, P.C., Ricordi, C., Roos, B.A., Howard, G.A.** (1999): Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res.*, 14(7): 1115-1122.
- Einhorn, T.A.** (1998): The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.*, (355Suppl): 7-21.
- Einhorn, T.A.** (2005): Science of fracture healing. *J Orthop Trauma*, 19(10Suppl): 4-6.
- Fenton, A.J., Rowe, D.J., Kent, G.N., Nicholson, G.** (1990): The differentiation and function of the osteoclast. *Bone and Mineral*, (10): 265.
- Friedenstein, A.J., Chailakhjan, R.K., Lalykina, K.S.** (1970): The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.*, 3(4): 393-403.
- Frost, H.M.** (1989a): The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop Relat Res.*, (284): 283-293.
- Frost, H.M.** (1989b): The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II. *Clin Orthop Relat Res.*, (284): 294-309.
- Gao, K., Lu, Y., Li, S., Cong, C., Yuan, J., Zhang, J., Cheng, J., Li, H., Wang, L.** (2007): Isolation, culturing and growth characteristics of mesenchymal stem cells from bone marrow of Rhesus monkey, *Macaca mulatta*. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi.*, 24(6): 1343-1347.
- Gebauer, D., Mayr, E., Orthner, E., Ryaby, J.P.** (2005): Low-intensity pulsed ultrasound: effects on nonunions. *Ultrasound Med Biol.*, 31(10): 1391-1402.
- Gerstenfeld, L.C., Shapiro, F.D.** (1996): Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implication of the complex functions of the hypertrophic chondrocyte during enchondral bone development. *J Cell Biochem.*, 62(1): 1-9.
- Goodship, A.E., Kenwright, J.** (1985): The influence of induced microenvironment upon the healing of experimental tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br.*, 67(4): 650-655.

- Haas, N.P.** (2000): Callus modulation – Fiction or reality ? *Chirurg*, 71(9): 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(1): 11-21.
- Hayda, R.A., Brighthon, C.T., Esterhai, J.L. Jr.** (1998): Pathophysiology of delayed healing. *Clin Orthop Relat Res.*, (355Suppl): 31-40.
- Hietaniemi, K., Paavolainen, P., Peltonen, J.** (1995): An experimental model for non-union in rats. *Injury*, 26(10): 681-686.
- Hietaniemi, K., Paavolainen, P., Penttinen, R.** (1996): Connective tissue parameters in experimental nonunion. *J Orthop Trauma*, 10(2): 114-118.
- Hulth, A.** (1989): Current concepts of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.*, (249): 265-284
- Ito, Y., Fitzsimmons, J.S., Sanyal, A., Mello, M.A., Mukherjee, N., O'Driscoll, S.W.** (2001): Localization of chondrocyte precursors in periosteum. *Osteoarthritis Cartilage*, 9(3): 215-223.
- Izadpanah, R., Joswig, T., Tsien, F., Dufour, J., Kirijan, J.C., Bunnell, B.A.** (2005): Characterization of multipotent mesenchymal stem cells from the bone marrow of rhesus macaques. *Stem Cells Dev.*, 14(4): 440-451.
- Jäger, M., Westhoff, B., Wild, A., Krauspe, R.** (2005): Bone harvesting from the iliac crest. *Orthopade*, 34(10): 976-994.
- Jaiswal, N., Haynesworth, S.E., Caplan, A.I., Bruder, S.P.** (1997): Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.*, 64(2): 295-312.
- Jaquiéry, C., Schaeren, S, Farhadi, J., Mainil-Varlet, P., Kunz, C., Zeilhofer, H.F., Heberer, M., Martin, I.** (2005): In vitro osteogenic differentiation and in vivo bone-forming capacity of human isogenic jaw periosteal cells and bone marrow stromal cells. *Ann Surg.*, 242(6): 859-867.

- Jones, E.A., Kinsey, S.E., English, A., Jones, R.A., Straszynski, L., Meredith, D.M., Markham, A.F., Jack, A., Emery, P., McGonagle, D.** (2002): Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum.*, 46(12): 3349-3360.
- Jones, S., Horwood, N., Cope, A., Dazzi, F.** (2007): The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J Immunol.*, 179(5): 2824-2831.
- Josten, C., Kremer, M., Muhr, G.** (1996): Ilizarov procedure in pseudarthrosis. *Orthopade*, 25(5): 405-415.
- Kadiyala, S., Jaiswal, N., Bruder, S.P.** (1997): Culture-expanded bone marrow-derived mesenchymal stem cells can regenerate critical-sized segmental bone defects. *Tissue Eng.*, 3(2): 173-185.
- Kasperczyk, W.J., Mahlke, L., Tscherne, H.** (1996): Diaphyseal pseudarthroses. Epidemiology and outcome. *Orthopade*, 25(5): 416-428.
- Kassem, M., Kristiansen, M., Abdallah, B.M.** (2004): Mesenchymal stem cells: cell biology and potential use in therapy. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 95(5): 209-214.
- Klaushofer, K., Peterlik, M.** (1994): Pathophysiologie der Knochenheilung. *Radiologe*, 34(12): 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(3): 503-510.
- Kolf, C.M., Cho, E., Tuan, R.S.** (2007): Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis Res Ther.*, 9(1): 204.
- Kuner E.H., Berwarth, H., Lücke, S.V.** (1996): Behandlungsprinzipien bei aseptischen Psearthrosen. *Orthopade*, 25(5): 394-404.
- Lane, J.M.** (1998): Breakout Session. 2: Fracture repair process. *Clin Orthop Relat Res.*, (355Suppl): 354-355.

- LeBlanc, K., Ringdén, O.** (2006): Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. *Curr Opin Immunol.*, 18(5): 586-591.
- Lian, J.B., McKee, M.D., Todd, A.M., Gerstenfeld, L.C.** (1993): Induction of bone-related proteins, osteocalcin and osteopontin, and their matrix ultrastructural localization with development of chondrocyte hypertrophy in vitro. *J Cell Biochem.*, 52(2): 206-219.
- Liebermann, J.R., Daluiski, A., Stevenson, S., Wu, L., McAllister, P., Lee, Y.P., Kabo, J.M., Finerman, G.A., Berk, A.J., Witte, O.N.** (1999): The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. *J Bone Joint Surg Am.*, 81(7): 905-917.
- Liebich, H.G.** (1999): Funktionelle Histologie der Haussäugetiere. Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis. 3. Auflage, Stuttgart/New York, *Schattauer Verlag*, S. 72-84 .
- Lind, M.** (1998): Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl.*, (283): 2-37.
- Lind, M., Bünger, C.** (2001): Factors stimulating bone formation. *Eur. Spine J.*, (10): 102-109.
- Liu, T.M., Martina, M., Hutmacher, D.W., Hui, J.H.** (2007): Identification of common pathways mediating differentiation of bone marrow- and adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells into three mesenchymal lineages. *Stem Cells*, 25(3): 750-760.
- Lu C., Mielau, T., Hu, D., Marcucio, R.S.** (2007): Ischemia leads to delayed union during fracture healing: a mouse model. *J Orthop Res.*, 25(1): 51-61.
- 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(7): 448-454.
- Mann, F.A., Payne, J.T.** (1989): Bone healing. *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animal)*, 4(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(4): 476-482.

- Marsh, D.** (1998): Concepts of fracture union, delayed union, and nonunion. *Clin Orthop Relat Res.*, (355Suppl): 22-30.
- McKibbin, B.** (1978): The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br.*, 60B(2): 150-162.
- Muraglia, A., Cancedda, R., Quarto, R.** (2000). Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *J Cell Sci.*, 113(pt 7): 1161-1166.
- Nijweide, P.J., Burger, E.H., Feyen, J.H.**, (1986): Cells of bone: proliferation, differentiation, and hormonal regulation. *Physiol Rev.*, 66(4): 855-886.
- Nunamaker, D.M., Rhinelander, F.W., Heppenstall, R.B.** (1985): Delayed Union, Nonunion, and Malunion. Textbook of small animal orthopaedics. *IVIS*, http://www.ivis.org/special_books/ortho/chapter_38/IVIS.pdf
- O'Driscoll, S.W., Fitzsimmons, J.S.** (2001): The role of periosteum in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res.*, (391 Suppl): 190-207.
- Paniushin, O.V., Domaratskaia, E.I., Starostin, V.I.** (2006): Mesenchymal stem cells: sources, phenotype, and differentiation potential. *Izv Akad Nauk Ser Biol.*, (1): 6-25.
- Peremans, K.** (2004): Kompendium der Allgemeinen Veterinärchirurgie: Kapitel 3.4. Szintigraphie, Hrsg. Martin Kramer, Hannover, Schlütersche Verlagsgesellschaft, S.118-125.
- Peters, A.** (2008): Dissertation: Einfluss autologer mesenchymaler Stammzellen auf die Knochenheilung im Modell der atrophen Pseudarthrose der Ratte, unter Berücksichtigung der periostalen Rekonstruktion. www.diss.fu-berlin.de/2008/145/.
- Pietschmann, P.** (2006): Knochenbiologie: Neuste Erkenntnisse. *J Mineral Stoffwechs* 13(S1): 4.
- Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., Marshak, D.R.** (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284(5411): 143-147.

- Qi, M., Hu, J., Zou, S., Zhou, H., Han, L.** (2006): Mandibular distraction osteogenesis enhanced by bone marrow mesenchymal stem cells in rats. *J Craniomaxillofac Surg.*, 34(5): 283-289.
- Rauner, M., Sipos, W., Pietschmann P.** (2007): Osteoimmunology. *Int Arch Allergy Immunol.*, 143(1): 31-48.
- Reed, A.A., Joyner, C.J., Brownlow, H.C., Simpson, A.H.** (2002): Human atrophic fracture non-unions are not avascular. *J Orthop Res.*, 20(3): 593-599.
- Reed, A.A., Joyner, C.J., Isefuku, S., Brownlow, H.C., Simpson, A.H.** (2003): Vascularity in a new model of atrophic nonunion. *J Bone Joint Surg Br.*, 85(4): 604-610.
- Remedios, A.** (1999): Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.*, 29(5): 1029-1044.
- Rhineland, F.W.** (1974): Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clin Orthop Relat Res.*, (105): 34-81.
- Roach, H.I.** (1992): Trans-differentiation of hypertrophic chondrocytes into cells capable of producing a mineralized bone matrix. *Bone Miner.*, 19(1): 1-20.
- Romeis, B.** (1989): Mikroskopische Technik. 17.Auflage, München, *Urban und Fischer Verlag*, Kapitel 1-4.
- Rompe, J.D., Schöllner, C., Heine, J.** (2004): Operative und nicht-operative Behandlungen bei Pseudarthrosen: Hochenergetische Stoßwellentherapie. *Trauma Berufskrankh* 6(3S): 357-367.
- Rose, F.R., Oreffo, R.O.** (2002): Bone tissue engineering: hope vs. hype. *Biochem Biophys Res Commun.*, 292(1): 1-7.
- Runkel, M., Rommens, P.M.** (2000): Pseudarthrosis. *Unfallchirurg*, 103(1): 51-63.
- Rüter, A., Mayr, E.** (1999): Pseudarthrosis. *Chirurg*, 70(11): 1239-1245.
- Saris, D.B., Sanyal, A., An, K.N., Fitzsimmons, J.S., O'Driscoll, S.W.** (1999): Periosteum responds to dynamic fluid pressure by proliferating in vitro. *J Orthop Res.*, 17(5): 668-677.

- Schaser, K.D., Zhang, L., Haas, N.P., Mittlmeier, T., Duda, G., Bail, H.J.** (2003): Temporal profile of microvascular disturbances in rat tibial periosteum following closed soft tissue trauma. *Langenbecks Arch Surg.*, 388(5): 323-330.
- 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(4): 547-554.
- Schenk, R.K.** (1975): Histology of primary bone healing. *Fortsch Kiefer Gesichtschir.*, (19): 8-12.
- Schiebler, T.H.** (1986): Histologie: Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen; unter Berücksichtigung der Histophysiologie; nach der amerikanischen Ausgabe von L.C. Junqueira und J.Carneiro/ übers., überarb. und ergänzt von T.H. Schiebler, U.Peiper und Fr. Schneider.- 2. korr. Auflage, Berlin/Heidelberg/New York, *Springer Verlag*.
- Schleberger, R., Senge, T.** (1992): Non-invasive treatment of long bone pseudarthrosis by shockwaves (ESWT). *Arch Orthop Trauma Surg.*, (111): 224-227.
- Schliephake, H., Knebel, J.W., Aufderheide, M., Tauscher, M.** (2001): Use of cultivated osteoprogenitor cells to increase bone formation in segmental mandibular defects: an experimental pilot study in sheep. *Int J Oral Maxillofac Surg.*, 30(6): 531-537.
- Schnorr, B.** (1996): Embryologie der Haustiere: ein Kurzlehrbuch, 3. überarbeitete Auflage, Stuttgart, *Ferdinand Enke Verlag*, S. 202-204.
- 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(11): 1193-1201.
- Shao, Z., Lui, B., Peng, Q., Liu, W., Liu, Y., Liu, R., Xu, J., Liu, L.** (2007): Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in the rabbit mandible. *Plast Reconstr Surg.*, 119(2): 500-507.
- Sidappa, R., Fernandes, H., Liu, J., van Blitterwijk, C., de Boer, J.** (2007). The response of human mesenchymal stem cells to osteogenic signals and its impact on bone tissue engineering. *Curr Stem Cell Res Ther.*, 2(3): 209-220.

- Srouji, S., Livne, E.** (2005): Bone marrow stem cells and biological scaffold for bone repair in aging and disease. *Mech Ageing Dev.*, 126(2): 281-287.
- Stringer, B., Waddington, R., Sloan, A., Phillips, I., Telford, G., Hughes, D., Craig, G., Gangemi, L., Brook, I., Freeman, C., Cao, X., et al.** (2007): Bespoke human hypertrophic chondrocytic cell lines provide the osteoinductive signals required for vascularized bone formation. *Tissue Eng.*, 13(1): 133-145.
- Stürmer, K.M.** (1996): Pathophysiology of disrupted bone healing. *Orthopade*, 25(5): 386-393.
- Takamine, Y., Tsuchiya, H., Kitakoji, T., Kurita, K., Ono, Y., et al.** (2002): Distraction osteogenesis enhanced by osteoblastlike cells and collagen gel. *Clin Orthop Relat Res.*, (399): 240-246.
- Takushima, A., Kitano, Y., Harii, K.** (1998): Osteogenic potential of cultured periosteal cells in a distracted bone gap in rabbits. *J Surg Res.*, 78(1): 68-77.
- Tscherne, H.** (1996): Pseudarthrose. *Orthopade*, 25(5): 385.
- Tsubota, S., Tsuchiya, H., Shinokawa, Y., Tomita, K., Minato, H.** (1999): Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in rabbits. *J Bone Joint Surg Br.*, 81(1): 125-129.
- Volpon, J.B.** (1994): Nonunion using a canine model. *Arch Orthop Trauma Surg.*, 113(6): 312-317.
- Webb, J.C.J., Tricker, J.** (2000): Bone biology: a review of fracture healing. *Current Orthopaedics*, 14(6): 457-463.
- Weber, B.** (1982): Klassifizierung der Pseudarthrosen nach morphologischen und klinischen Gesichtspunkten. *Z Orthop.*, (120): 528-531.
- Yoo, J.U., Johnstone, B.** (1998): The role of osteochondral osteoprogenitor cells in fracture repair. *Clin Orthop.*, (355Suppl): 73-81.
- Zhou, S., Greenberger, J.S., Epperly, M.W., Goff, J.P., Adler, C., Lebhoff, M.S., Glowacki, J.** (2008): Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell.*, 7(3): 335-343.

Anhang

Färbeprotokolle der histologischen Schnitte

Histomorphologische Färbungen

Kombinierte Safranin Orange/von Kossa Färbung

Färbeprotokoll:

1. Entplasten der Schnittpräparate und Verbringen in
 - a) absteigende Alkoholreihe (Ethanol): 100- 96- 80- 70% *je 2 Min.*
 - b) Aqua dest. *2 Min.*
2. Färben in 3%iger Silbernitratlösung *5 Min.*
3. Spülen mit Aqua dest. *3 x kurz*
4. Reduzieren in Natrium-Formaldehydlösung *2 Min.*
5. Wässern mit Leitungswasser *10 Min.*
6. Natriumthiosulfat 5% *5 Min.*
7. Wässern mit Leitungswasser *10 Min.*
8. Spülen in Aqua dest. *kurz*
9. Färben in Saffranin–Orange *8 Min.*
10. Spülen in Aqua dest. *kurz*
11. Entwässern durch verbringen in:
 - a) 2 x 96% Ethanol
 - b) 2 x 100% Ethanol *je 2 Min.*
12. Verbringen in Xylol *2 x 5Min.*
13. Eindecken mit Vitro-Clud®

Movat Pentachrom-Färbung

Färbeprotokoll:

1. Entparaffinieren der Schnittpräparate und Verbringen in
 - a) absteigende Alkoholreihe (Ethanol): 100- 96- 80- 70% *je 2 Min.*
 - b) Aqua dest. *2 Min.*
1. Färben in Alcianblau-Lösung (8GX, Fa. Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Steinheim/Deutschland) *10 Min.*
2. Spülen in Leitungswasser *5 Min.*
3. Stabilisieren in alkalischem Alkohol (180 ml 96 % Ethanol auf 10 ml 25 % Ammoniak) (Merck,Darmstadt/Deutschland) *60 Min.*
4. Spülen in Aqua dest. *kurz*
5. Kernfärbung mit Weigerts Eisenhämatoxilin (Eisenhämatoxilin A und B im Verhältnis 1: 1) (Waldeck GmbH, Dicsion Chroma®, Münster/Deutschland) *10 Min.*
6. Spülen in Aqua dest. *kurz*
7. Wässern mit Leitungswasser *15 Min.*
8. Färben mit Brilliant-Croceinsäurefuchsin (Brilliant-Crocein R, Waldeck GmbH, Münster/Deutschland) *10-15 Min.*
9. Spülen mit 0,5%iger Essigsäure *kurz*
10. Differenzieren in 5 % Phosphormolybdänsäure (Fa. Sigma Aldrich, Seelze/Deutschland) *5 Min.*
11. Unter Bewegung mit 0,5%iger Essigsäure spülen *2 Min.*

- | | |
|---|------------------|
| 12. Dehydrieren in 100% Ethanol | <i>3x 3 Min.</i> |
| 13. Färben mit Saffron du Gatinais
(Waldeck GmbH, Münster/Deutschland) | <i>60 Min.</i> |
| 14. Auswaschen in 100% Ethanol | <i>3x 3 Min.</i> |
| 15. Xylol | <i>kurz</i> |
| 16. Eindecken mit Vitro-Clud® | |

Enzymhistochemische Färbung

TRAP – Färbung

Herstellungsprotokoll der Gebrauchslösungen:

TRAP-Puffer (pH 5):

- 3,28 g Natrium-Acetat (Fa. Merck, Darmstadt/Deutschland)
- 46 g Natrium-Tartrat (Fa. Merck, Darmstadt/Deutschland)
- Einstellen des pH-Wertes mit einem pH-Meter (inoLab®, pH Level 1, WTW, Weilheim/Deutschland)

TRAP-Färbelösung:

- 40 mg Naphtol AS-Mix Phosphat (N 5000, Fa. Sieigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland)
- 240 mg Fast Red Violett LB Salt (F 3381, Fa. Sieigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland)
- 4 ml Dimethylformamid (D 4551, Fa. Sieigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland)
- 2 ml Triton X (Fa. Sieigma-Aldrich, Steinheim/Deutschland)

Färbeprotokoll:

1. Entparaffinieren der Schnittpräparate und verbringen in
absteigende Alkoholreihe (2 x 100-, 96-, 80-, 70 %) *je 2 Min.*
2. Spülen in TRAP-Puffer *10 Min.*
3. Inkubation in TRAP-Färbelösung bei 37°C *2 Std.*
4. Spülen in Aqua dest. *kurz*
5. Kerngegenfärbung mit Methylgrün
(CERTISTAIN®, Merck, Darmstadt/Deutschland) *8-10 x eintauchen*
6. Spülen in Aqua dest. *kurz*
7. Eindecken mit Vitro-Clud®

Immunhistochemische Färbungen ***α -Smooth Muscle Actin (α -SMA)***

Vorbehandlung: keine

Verdünnung des Primär-AK: 1:100

Kollagen II

Vorbehandlung: Hyaluronidase: 4 Stunden

Pepsin (0,1 %) 40 Minuten

Verdünnung des Primär-AK: 1:100

Färbeprotokoll:

1. Entparaffinieren der Schnittpräparate und verbringen in

a) absteigende Alkoholreihe (Ethanol): 100- 96- 80- 70% je 2 Min.

b) Aqua dest. 2 Min.

2. Spülen in Puffer (pH 7,4)

(Aqua dest. und Phosphatpuffer-Lösung, 9:1)

(Fa. Waldeck GmbH, Münster/Deutschland) 2 x 5 Min.

3. Falls erforderlich, zur Demaskierung der Antigene,

mit Hyaluronidase u./o. Pepsin inkubieren (37 °C)

und spülen mit Puffer 2 x 5 Min.

4. Inkubation mit Normalserum

(Vector® Laboratories, Burlingame/USA)

bei Raumtemperatur 20 Min.

5. Inkubation mit dem Primärantikörper

(Biologo, Kronshagen/Deutschland) bei 4 °C über Nacht

6. Spülen in Puffer 2 x 5 Min.

7. Inkubation mit biotinyliertem Sekundärantikörper
(Vector® Laboratories, Burlingame/USA),
bei Raumtemperatur *30 Min.*
8. Spülen in Puffer *2 x 5 Min.*
9. Inkubation mit Avidin-Biotin-Komplex
(Alkaline Phosphatase Standard Kit AK 5000,
Vector ® Laboratories, Burlingame/USA)
bei Raumtemperatur *50 Min.*
10. Spülen in Puffer *2 x 5 Min.*
11. Inkubation in Chromogen-Puffer (pH 8,2) *2 x 5 Min.*
12. Inkubation mit AP-Substrat
(Vector ® Red Alkaline Phosphatase Substrat Kit 1,
Burlingame/USA), mikroskopische Überwachung
der Farbreaktion (Axioskop, Zeiss, Jena/Deutschland) *5 x 30 Min.*
13. Spülen in Puffer *kurz*
14. Spülen in Aqua dest. *kurz*
15. Kerngegenfärbung mit
 - a) Hämalan (Merck, Darmstadt/Deutschland) *4-6 x eintauchen*
 - b) Spülen in Aqua dest. *kurz*
 - c) Spülen in Leitungswasser *1-2 Min.*
16. Aufsteigende Alkoholreihe
(70-, 80-,96-,2 x 100 %) *je 1 Min. max.*
17. Entparaffinieren in Xylol *2 x 5 Min.*
18. Eindecken mit Vitro-Clud®

Danksagung

Frau Prof. Dr. med. vet. A. Sterner-Kock möchte ich für die Betreuung meiner Dissertation und ihre Erstbegutachtung danken.

Herrn Prof. Dr.-Ing. G.N. Duda danke ich für die Bereitstellung des Themas. Ein zweites Dankeschön an Sie sowie auch das gesamte Team des CMSC/Berlin, dass ich an ihrem Institut die Möglichkeit hatte, in einer wissenschaftlich motivierten und motivierenden Atmosphäre meine Dissertation zu erarbeiten.

Ein besonderes Dankeschön möchte ich Gabriele Hardung und Martin Wolny aussprechen, für eine Engelsgeduld und die wirklich tolle Unterstützung mit Rat und Tat im Labor.

Ein besonderes Dankeschön auch an Dr. Anja Peters, für die wissenschaftliche Betreuung, das immer offene Ohr und die Antwort auf jede noch so kleinste Frage. Danke für das unermüdliche Lesen meiner teilweise chaotischen Entwürfe und des gesamten Manuskripts.

Vielen Dank an Dr. Jasmin Lienau und Dr. Hanna Schell für all die Denkanstöße und immer schnelle Hilfe.

Vielen Dank auch an Frau Dr. G. Arndt und das Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung der veterinärmedizinischen Fakultät/FU Berlin, für die Unterstützung und Beratung während der statistischen Auswertung.

Mein ganz persönlicher Dank geht an meine Eltern Margret und Michael Bach. Danke, dass ihr mir meinen Traum ermöglicht, danke für euer Vertrauen, den Halt und die Sicherheit die ihr mir seid. *Danke!*

Ein riesiger und herzlicher Dank geht an Oliver & Wendy, für all das Verständnis, die unerschütterliche Zuversicht und eure unglaubliche, grenzenlose Unterstützung.

Keiner ist so verrückt, dass er nicht noch einen Verrückteren fände, der ihn versteht.

(H. Heine)

Danke !!!

Selbständigkeitserklärung

Die vorliegende Arbeit ist ohne Hilfe Dritter von mir persönlich verfasst worden. Hiermit versichere ich, allein die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet zu haben.

Barbara Bach

Berlin, den 28. April 2008