

Xenogene Transplantation humaner Rippenknorpel

Eine histomorphometrische Analyse der Osteoinduktivität im Kaninchenmodell

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Binger, Christian Hans Manfred

aus Saarbrücken

Gießen 2022

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie,
Labor für Experimentelle Unfallchirurgie

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thaqif El Khassawna

Gutachter: Prof. Dr. med. Markus Rickert

Tag der Disputation: 15.08.2023

Meinen Eltern und Großeltern in Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG	1
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN	2
2.1 DIE ENTWICKLUNG DES SKELETTS	2
2.2 MAKROSKOPIE DES KNOCHEN	2
2.3 KNOCHENGEWEBE	3
2.4 KNOCHENZELLEN.....	4
2.4.1 Osteoblasten	4
2.4.2 Osteoklasten.....	5
2.4.3 Osteozyten.....	7
2.4.4 Endostzellen (<i>Saumzellen, bone lining cells</i>)	8
2.4.5 Zell-Zell-Interaktion	8
2.5 KNOCHENGRUNDSUBSTANZ.....	9
2.6 OSSIFIKATION	10
2.6.1 Knochenremodeling unter physiologischen Bedingungen	10
2.7 REGULATION DES KNOCHENREMODELING	11
2.8 DEFEKTHEILUNG	13
2.8.1 Entzündung.....	13
2.8.2 Weicher Kallus	14
2.8.3 Harter Kallus.....	14
2.8.4 Remodeling.....	14
2.9 KNOCHENERSATZMATERIALIEN.....	15
2.10 STAND DER FORSCHUNG	16
3 FRAGESTELLUNG UND ZIELSETZUNG	17
4 MATERIAL UND METHODE.....	18
4.1 DAS VERSUCHSTIER.....	18
4.1.1 Herkunft der Tiere	18
4.1.2 Haltungsbedingungen.....	19
4.2 VERSUCHSABLAUF.....	20
4.2.1 Setzen der Knorpeldefekte	20
4.2.2 Transplantatvorbereitung.....	21
4.2.3 Anästhesie.....	22
4.2.4 Operationsdurchführung.....	22
4.2.5 Nachbehandlung.....	22

4.2.6	<i>Probenentnahme und Herstellung der Schnittpräparate</i>	23
4.3	HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN UND DEREN AUSWERTUNG	25
4.3.1	<i>Serienschnitte</i>	25
4.3.2	<i>Färbung und Fotomikroskopie</i>	25
4.3.3	<i>Movat-Pentachrom</i>	26
4.3.4	<i>Osteocalcin</i>	27
4.3.5	<i>Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)</i>	28
4.3.6	<i>ASMA</i>	29
4.3.7	<i>Immunhistologie</i>	30
4.3.8	<i>Digitale Nachbearbeitung</i>	30
4.3.9	<i>Histomorphometrie</i>	33
4.4	DESKRIPTIVE ANALYSE DER HISTOLOGISCHEN PRÄPARATE	34
4.5	STATISTIK UND GRAFISCHE AUSWERTUNG	34
5	ERGEBNISSE	35
5.1	GERINGERE OSSIFIKATION DURCH DEZELLULARISIERTE TRANSPLANTATE	36
5.2	HOHE OSTEOCALCINSYNTHESE DURCH DEZELLULARISIERTE TRANSPLANTATE.....	37
5.3	GERINGE OSTEOKLASTENAKTIVITÄT BEI DEZELLULARISIERTEN XENOGRAFTS.....	39
5.4	HOHER VASKULARISIERUNGSGRAD NACH 4 WOCHEN NACHWEISBAR	41
5.5	EXTRAZELLULARMATRIX.....	42
5.5.1	<i>Hoher Osteoidanteil durch dezellularisierte Transplantate</i>	42
5.5.2	<i>Solide Chondrogenese innerhalb der dezellularisierten Gruppe</i>	44
5.5.3	<i>Dezellularisierte Xenografts zeigten die geringste Mineralisation</i>	45
5.6	DESKRIPTIVE BEURTEILUNG DER TRANSPLANTATEINHEILUNG	47
6	DISKUSSION	48
6.1	VERKNÖCHERUNG ALS MAß DER OSSEOINTEGRATION DER IMPLANTATE	49
6.2	KATABOLE PROZESSE	51
6.3	KNORPELIGE EINHEILUNG DER XENOGRAFTS.....	51
6.4	DISKUSSION DES STUDIENDESIGNS	52
6.5	AUSBLICK	53
6.6	FAZIT	54
7	ZUSAMMENFASSUNG	55
8	ABSTRACT	56
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	57
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	57
11	TABELLENVERZEICHNIS	60
12	LITERATURVERZEICHNIS	61
13	ANHANG	69

13.1	POSTOPERATIVE NACHSORGE	69
13.2	PRÄPARATHERSTELLUNG	71
13.2.1	4%-PFA-Fixierung nach Lillie	71
13.2.2	EDTA-Entkalkung	72
13.2.3	Paraffineinbettung	73
13.2.4	Schnittherstellung Rotationsmikrotom	74
13.3	FÄRBUNGEN	75
13.3.1	Movat-Pentachrome	75
13.3.2	Enzymhistochemischer Nachweis der Tartrat-resistente saure Phosphatase	79
13.3.3	Enzymhistochemischer Nachweis von Osteocalcin	82
13.3.4	Enzymhistochemischer Nachweis von ASMA	83
14	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	84
15	DANKSAGUNG	85

1 Einleitung

Der demografische Wandel, immer höhere medizinische Ansprüche bzw. die Erwartungshaltung an kompetente, effiziente und komplikationslose Behandlungsmethoden stellen die Medizin vor aktuelle und zukünftige Herausforderungen, welche unablässig zu bewältigen sind. Knochen- und Knorpelschäden, Gelenkverschleiß, schnelle Rehabilitationen und nachhaltige, biokompatible Materialien sind nur wenige der zahlreichen Aspekte, die sowohl die Human- als auch die Zahnmedizin im Hinblick auf eine anhaltend verbesserte Lebensqualität der Patienten beschäftigen werden [19, 102]. Traumata, knöcherne Tumorresektionen, Osteomyelitiden, Knochen- bzw. Kieferkammathrophien und präimplantologisch-chirurgische Eingriffe stellen neben vielen weiteren Faktoren mögliche Indikationen zur Knochenaugmentation dar [38, 104, 114, 122]. Somit ist ein interdisziplinäres Interesse vorhanden, die jeweiligen knöchernen Rekonstruktionstechniken zu optimieren. Aus humanmedizinischer und vor allem unfallchirurgischer Sicht stellt die damit verbundene Optimierung bzw. die Wiederherstellung der Lebensqualität eine verkürzte Rekonvaleszenzzeit, eine frühzeitigere Mobilisation und eine damit verbundene, schnellere Reintegration in das alltägliche Leben dar. Auch innerhalb der Zahnmedizin spielen die genannten Gründe neben ästhetisch-funktionellen Aspekte eine große Rolle. Durch effizientere dentale Rehabilitationsmaßnahmen, wäre eine schnellere Resozialisierung im Alltag, aber auch eine effizientere Wiederherstellung des Lebensstandards möglich.

Das Ziel der vorliegenden Studie ist die Einheilungstendenz und die etwaige Optimierung von humanen (xenogenen) Rippenknorpeltransplantaten durch humane mesenchymale Stammzellen im Kaninchenmodell zu untersuchen. Durch die Auswahl dieser Versuchstiere können aufgrund der frühfunktionellen Belastung der Transplantate Rückschlüsse bzw. Prognosen auf die Einheilungsvorgänge beim humanen Individuum geschlossen werden. Hierbei wird auf histologischer Ebene die Verknöcherung, Knorpelsynthese, die Extrazellulärmatrix, sowie anabole und katabole Prozesse betrachtet und analysiert. Die Erkenntnisse dieser Studie könnten dazu beitragen, dass (autologe) Rippenknorpeltransplantate eine sinnvolle und vielversprechende Ergänzung zu den bereits klinisch etablierten Rekonstruktionsverfahren darstellen.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Die Entwicklung des Skeletts

Die Ausbildung des Skeletts stellt einen immensen Fortschritt der evolutionären Weiterentwicklung von Lebewesen dar. Nachdem die Pflanzen vor ca. 700 Mio. Jahren das Festland besiedeln konnten, folgten auch tierische Organismen. Um sich gegen die Herausforderung der Gravitation und den damit verbundenen Belastungen behaupten zu können, war eine Anpassung unabdingbar [5]. Knöcherne Strukturen erleichterten die Fortbewegung, sorgten für Stabilität und Schutz. Durch die Leichtbauweise, im Sinne der Entwicklung von Markhöhlen, Spongiosaräumen und Lamellenknochen, wurde der Grundstein für höher entwickelte Lebensformen gelegt. Oberste Maxime hierbei ist die hohe Eigenelastizität bzw. Widerstandskraft bei niedrigem Gesamtgewicht. Aufgrund dieser bedeutenden Entwicklung, steht dem erwachsenen Menschen ein ca. 10kg leichtes Knochengestüt mit rund 220 Einzelknochen zur Verfügung, welches u.a. empfindliche und lebensnotwendige Organe wie Gehirn, Herz und Lunge vor irreversiblen Schäden schützt. Des Weiteren beherbergt das Skelett Wachstumsfaktoren, Zytokine, ist am Säure-Base-Haushalt beteiligt und beeinflusst die Kalziumhomöostase [115].

2.2 Makroskopie des Knochens

Um den physiologischen Anforderungen gerecht zu werden, unterliegt das Knochengewebe im Hinblick auf die Skelettentwicklung als auch im Rahmen der knöchernen Regeneration einer Art „Reifung“. Der Geflechtknochen wird als unreifer, primärer Knochen bezeichnet und stellt die Vorstufe des strapazierfähigen Lamellenknochen dar. Durch den unstrukturierten, geflechtartigen Aufbau und Unterschiede im Hinblick auf einen erhöhten Wasseranteil im Gegensatz zum Lamellenknochen [4] weist diese Knochenart eine geringere Strukturfestigkeit auf [121]. Die Umgestaltung zum widerstandsfähigen Lamellenknochen stellt einen grundsätzlichen Teil des Remodeling dar. Zentrales Segment ist das Osteon bzw. Havers-System, welches einen zentral gelegenen Havers-Kanal mit einem darin befindlichen Blutgefäß aufweist [4]. Dieses Bauelement ist das Resultat eines effizient koordinierten Zellzusammenschlusses aus Knochenzellen, der sogenannten *basic multicellular unit* (BMU), welche im Rahmen des Knochenbaus die Havers-

Systeme gestalten [74]. Der Lamellenknochen (sekundärer Knochen) weist zwei deutliche Schichten auf: die Kompakta bzw. Kortikalis und die Spongiosa. Als Kompakta bezeichnet man die äußerste Schicht, welche mit einem Gewichtsanteil von ca. 80% an der eigentlichen Knochenmasse beteiligt ist und durch parallel angeordnete Kollagenfibrillen die biomechanische Stabilität des Knochen gewährleistet [22]. Die Spongiosa stellt hingegen das Innere des Lamellenknochen dar. Durch den Aufbau aus kleinen Knochenbälkchen ergibt sich ein dreidimensionales Netzwerk, in welches das Knochenmark für die Hämatopoese eingelagert ist [60]. Von besonderer Bedeutung ist hierbei das durch die Knochenbälkchen entstandene Trajektoriensystem, welches sich den Belastungen durch trajektorielle Ausrichtung anpasst und dem Knochen eine hohe Stabilität bei möglichst geringem Gewicht ermöglicht. Dies wird dadurch erzielt, dass die Trabekel nur auf Zug oder ausschließlich auf Druck belastet werden. Die innere Oberfläche des Knochens wird vom Endost ausgekleidet. Hierbei handelt es sich um eine Deckschicht aus unmineralisierten Kollagenfasern und Saumzellen. Die äußere Knochenoberfläche wird von vaskularisiertem und innerviertem Periost umgeben. Man unterscheidet das außen liegende stratum fibrosum (straffes Bindegewebe, elastische Fasern) und das innen befindliche stammzellreiche stratum osteogenicum (Kambiumschicht) [71].

2.3 Knochengewebe

Als tragender Teil des Bewegungsapparates nimmt das Knochengewebe eine signifikante Stellung ein. Aufgrund des speziellen Aufbaus ist dieses Gewebe in der Lage sowohl makroskopische als auch essentielle mikroskopische Funktionen im menschlichen Organismus zu übernehmen. Durch die hohe Druck-, Zug-, Biege- und Torsionsfestigkeit ist das unelastische Knochengewebe unter anderem im Stande, die durch aktive Muskelbewegung entstehenden Kräfte über Sehnen, Bänder und Knorpel aufzunehmen und ihnen zu widerstehen. Aufgrund der Calciumspeicherfunktion (mit bis zu 99% des gesamten Mineralstoffs) nimmt das Knochengewebe auch eine fundamentale Stellung innerhalb des Stoffwechsels ein. Auch hämatopoetische Eigenschaften werden dem Knochengewebe aufgrund des in den Knochen eingelagerte Knochenmarks zugeschrieben, weshalb es einen Hauptakteur der Hämatopoese darstellt [26]. Durch kontinuierliche Umbauprozesse (Remodeling) passt sich das Knochengewebe, durch im Gleichgewicht befindliche anabole und katabole Prozesse, an physiologische Belastungen an. Erst durch den speziellen mikroskopischen Aufbau werden die einzigartigen Merkmale des Knochengewebes

ermöglicht. Die vollständig mineralisierte Knochensubstanz besteht zu ca. 65% aus anorganischen Anteilen und zu ca. 35% aus organischer Grundsubstanz. Die anorganische Komponente besteht zu 99% aus Hydroxylapatit, wohingegen die organische Phase zu ca. 90% aus Kollagen-Typ-I und zu 10% aus Glykoproteinen wie Fibronectin, Osteopontin, Bone Sialoprotein und Osteokalzin aufgebaut ist [5]. Die gegensätzlichen Eigenschaften (Elastizität und Rigidität) werden durch die Interaktion der lamellär angeordneten Kollagenfibrillen und den eingelagerten Hydroxylapatitkristallen $[3 \text{ Ca}_3 (\text{PO}_4)_2 \bullet \text{Ca}(\text{OH})_2]$ vereint [71]. Die Gefäßversorgung des Knochengewebes wird durch Mikrogefäße, welche von der Arteria nutricia gespeist werden, gewährleistet [71].

2.4 Knochenzellen

Im Knochenmark befinden sich hämatopoetische und mesenchymale Stammzellen. Osteoklasten entspringen der hämatopoetischen Stammlinie, wohingegen Saumzellen, Osteoblasten und Osteozyten mesenchymaler Abstammung sind. Durch Zytokine ist die effektive Steuerung der Differenzierung der Knochenzellen und damit die Anpassung an unterschiedliche Stoffwechsellagen des Knochengewebes möglich [71].

2.4.1 Osteoblasten

Die Osteoblasten entwickeln sich aus mesenchymalen Stammzellen und können sich zu Endostzellen, Osteozyten oder Adipozyten differenzieren. Mithilfe des Wnt-Signaltransduktionsweges ist die Weiterentwicklung der Stammzellen zu reifen Osteoblasten beschrieben und demnach essenziell für die Knochenneubildung [15]. Dies wird dadurch ersichtlich, dass ein gestörter Wnt-Signalweg mit Osteoporose in Verbindung gebracht wird [65]. Maßgeblich sind sie für den Knochenaufbau bzw. die Synthese der organischen Matrix verantwortlich. Die Osteoblasten sind mononukleär und variieren in ihrem Erscheinungsbild je nach Aktivitätszustand von flach (inaktiver) bis hin zu voluminös (sekretorisch aktiv). Eine fundamentale Aufgabe stellt die Synthese von Kollagen-Typ-I, Osteonectin, Osteokalzin und BMP's (Bone morphogenetic protein) dar, weshalb dieser Zellart eine Schlüsselfunktion im Rahmen der Osteosynthese zugesprochen wird. *Osteokalzin* ist ein spezifisches Enzym und gleichzeitig Indikator der Osteoblastenaktivität, welche auf die Anwesenheit von 1,25-(OH)₂-Vitamin D angewiesen ist [60, 90]. Es sorgt für die parallele Anlagerung von biologischem Apatit an Kollagenfasern und dient der Stabilisierung des Knochengewebes im Rahmen der Knochenneubildung [63]. Weiterhin

sind sie in der Lage in die Regulation der knochenabbauenden Zellen (Osteoklasten) einzugreifen und diese zu regulieren [72]. Mit Hilfe des RANKL-Proteins und des Osteoprotegerins (OPG) sind die Osteoblasten im Stande die Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten zu steuern. Charakteristikum der Osteoblasten ist die alkalische Phosphatase, ein phosphatspaltendes Enzym, das anorganisches Phosphat durch die Spaltung von organischem Phosphat und Pyrophosphat für die Mineralisation bereitstellt. Außerdem besitzen die knochenbildenden Zellen Rezeptoren für Parathormon, Östrogen und Wachstumsfaktoren. Dadurch können sie im Sinne einer physiologischen Osteogenese bzw. Remodeling effektiv gesteuert werden [45]. Mittels EGF, Insulin und IGFs differenzieren sich die Stammzellen zu mesenchymalen Stammzellen. Anschließend wird durch para-, auto- und endokrinen Einfluss die mesenchymale Stammzelle über diverse Wachstumsfaktoren zum Präosteoblasten, welcher sich anschließend zum reifen Osteoblasten differenziert.

2.4.2 Osteoklasten

Ausgehend vom mononukleären-phagozytären System (MPS) des Knochenmarks entstehen die Osteoklasten durch Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen unter dem autokrinen Einfluss von CSF-1 und FOS zur Osteoklastenvorläuferzelle [44]. Durch parakrine Sezernierung von CSF-1 durch die Osteoblasten wird die Differenzierung zum reifen Osteoklasten unterstützt (vgl. Abb. 1). Schließlich wird durch die Wirkung von SRC und CBL der reife Osteoklast zum resorbierenden Osteoklasten differenziert [3, 49, 81]. Die mehrkernigen knochenabbauenden Zellen messen zwischen 50 – 100µm, besitzen ca. 2 bis 10 Zellkerne und sind in der Regel in den Resorptionslakunen (Howship-Lakunen) lokalisiert. Charakteristisch ist das stark basophile Zytoplasma mit unzähligen, zwischen ruffled border und Zellkern lokalisierten Vakuolen [3]. Als Syntheseprodukte stehen dem Osteoklasten eine Reihe von Enzymen zur Verfügung, mit dem er effektiv in der Lage ist, Knochenmatrix zu degradieren. Zu den lysosomalen Enzymen gehören unter anderem die tartratresistente saure Phosphatase (TRAP), Arylsulfatase, Cystein-Proteasen und die β - Glycerolphosphatase. Kollagenase (B), Stromelysin und der Gewebsplasminogenaktivator werden den nichtlysosomalen osteoklastären Enzymen zugeschrieben [3]. Um der hohen Syntheseleistung nachzukommen, ist dieser Zelltyp mit zahlreichen Zellorganellen ausgestattet. Eng gepackte Golgi-Apparate rund um den Zellkern ermöglichen die Synthesefähigkeit, wobei die trans-Seite des Golgi-Apparates den Zellkernen

abgewandt sind [3]. Durch die hohe Synthesefähigkeit des Osteoklasten ist er außerdem im Stande Osteopontin, Bone Sialoprotein (BSP), und TGF- β als Proteine zu sezernieren. Verpackt in Vesikel gelangen die genannten Enzyme bzw. Proteine zur Zellmembran bzw. zur ruffled-border, eine durch unzählige Einstülpungen vergrößerte Oberfläche am apikalen Pol des Osteoklasten. Weiterhin wird durch die Aktivität von Protonenpumpen in diesem Areal ein negativer pH-Wert geschaffen. Dadurch werden die Hydroxylapatitkristalle aufgelöst und das Kollagengeflecht freigelegt, sodass die lysosomalen Enzyme in ihrem pH-Optimum wirken können. Schließlich degradieren die Kollagenasen die Kollagenfasern [3, 99]. Ein wesentliches Enzym ist die *tartratresistente saure Phosphatase* (TRAP 5b). Es ist ein osteoklastenspezifisches Metalloenzym, welches aus Osteoklasten-aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen stammt [90]. Die optimale Enzymaktivität liegt im sauren Milieu, welches die Osteoklasten eigens durch einen Protonengradienten sicherstellen.

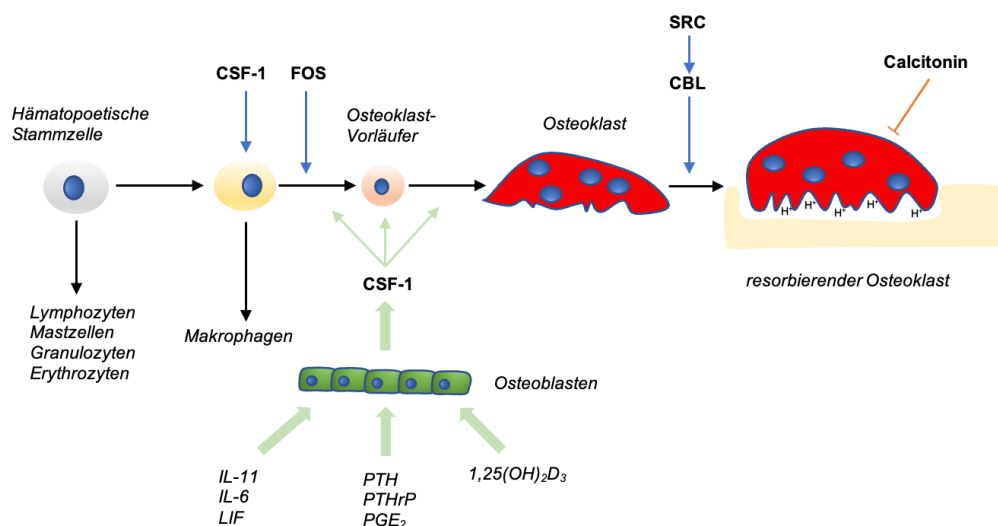


Abbildung 1 : Differenzierung eines Osteoklasten. Eigene Darstellung nach [3]. *blau*: autokrine Regulation; *grün*: parakrine, durch Osteoblasten vermittelte Regulation; *orange*: direkte Wirkung von Calcitonin. Ausgehend von einer hämatopoetischen Stammzelle entwickeln sich reife Osteoblasten durch autokrinen Einfluss von CSF-1 und FOS zum Osteoklastenvorläufer. Ferner stellt die parakrine Komponente durch die Osteoblasten (CSF-1) einen weiteren Schritt der Differenzierung zum Osteoklasten dar. Erst durch den Einfluss von SRC und CBL wird aus einem Osteoklasten ein reifer Osteoklast mit ruffled-border, welcher durch direkte Calcitoninwirkung inhibiert werden kann.

2.4.3 Osteozyten

Die Osteozyten sind im Gegensatz zu den Osteoblasten und Osteoklasten in die Knochenmatrix eingebettet und elektrochemisch über annähernd 50 dendritische Fortsätze und gap junctions miteinander vernetzt [113] [96]. Connexin 43 (Cx43) ist als grundlegendes Protein für diese Art des zellulären Austauschs zuständig und hat dadurch eine bedeutende Rolle im Rahmen der Skelettentwicklung inne [95]. Dieses Netzwerk erstreckt sich dreidimensional durch die canaliculi osseae und dient der Kommunikation und Abstimmung im Hinblick auf eine adäquate, belastungsadaptierte Knochenstruktur und -metabolismus [9]. Dadurch kommunizieren die Osteozyten mit den Osteoblasten, den Endostzellen und untereinander – so entsteht ein funktionelles, multizelluläres Synzytium [61]. Nach der Sekretion der Extrazellulärmatrix durch die Osteoblasten differenzieren sich ca. 10-20% der Osteoblasten zu Osteozyten [93]. Durch morphologische Veränderungen im Hinblick auf Volumen, Größe und Anzahl der Zellorganellen büßt der neu entstandene Osteozyt auch eine Verringerung des Synthese- und Stoffwechselfpotenzials ein [33]. Rezeptoren für Parathormon, 1,25-Dihydroxycholecalciferol, Östrogen, Glukokortikoide und TGF- β verdeutlichen den Stellenwert des Osteozyten im Rahmen des Knochenstoffwechsels [6, 8, 12, 110, 111]. Als mechanosensitive Zellen sind die Osteozyten in der Lage mechanische in biochemische Signale umzuwandeln und dementsprechend den Knochenstoffwechsel bei Be- oder Entlastung zu koordinieren (Abbildung 2).

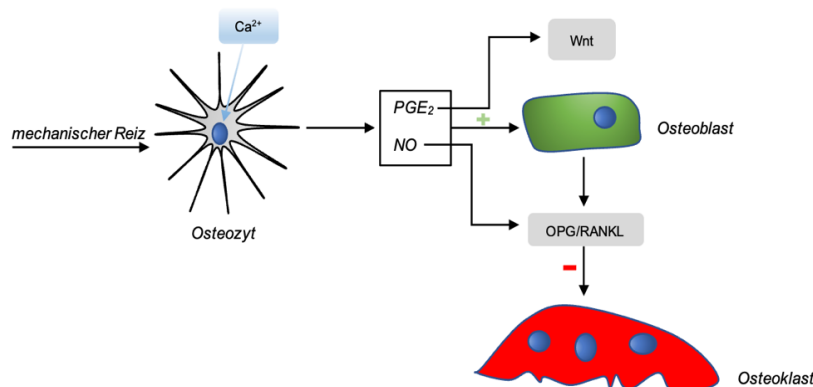


Abbildung 2: Signaltransduktion eines Osteozyten durch mechanische Stimuli. Eigene Darstellung nach [89]. Ein mechanischer Reiz löst durch einen Kalziumeinstrom in die Zelle eine Depolarisierung aus. Folglich wird Prostaglandin E₂ (PGE₂) sezerniert, worüber der Wnt-Signalweg und damit die Osteoblastogenese aktiviert wird. Stickstoffmonoxid hat durch die Inhibition von RANKL und OPG einen passiven Einfluss auf die Osteoklastenaktivität.

2.4.4 Endostzellen (Saumzellen, bone lining cells)

Diese Zellen sind vermutlich eine inaktive Stufe der Osteoblasten bzw. Osteoprogenitorzellen, welche eine, die Knochenoberfläche bedeckende, Schutzschicht bilden. Diese Ebene ist durch eine nicht-mineralisierte Kollagenmembran von der umgebenden, vollständig mineralisierten Knochenmatrix getrennt. Die stetige Kommunikation zwischen Endostzellen, Osteoblasten und Osteozyten ist durch gap junctions gewährleistet [80].

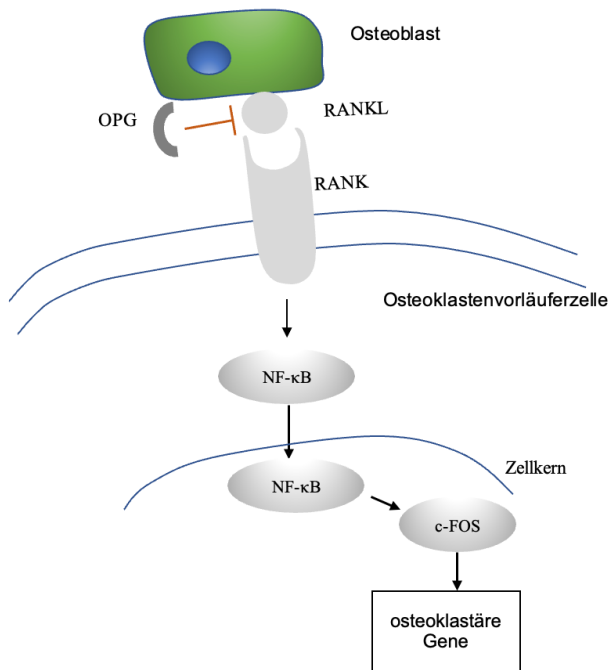


Abbildung 3: Zell-Zell-Interaktion von Osteoblast und Osteoklast. Eigene Darstellung nach [11]. Das von den Osteoblasten gebildete RANKL bindet an das RANK-Protein, welches auf den Osteoklastenvorläuferzellen exprimiert wird. Die damit ausgelöste Signaltransduktion führt zur Aktivierung und Translokation von NF-κB in den Nukleolus. Dadurch kommt es zu einer erhöhten Expression von c-FOS und schließlich zur verstärkten Expression osteoklastärer Gene.

2.4.5 Zell-Zell-Interaktion

Damit das physiologische Gleichgewicht zwischen katabolen und anabolen Stoffwechselprozessen innerhalb des Knochengewebes aufrechterhalten wird, ist eine präzise Kommunikation der Knochenzellen untereinander essenziell. Durch verschiedene Rezeptoren an den Zellmembranen der jeweiligen Zellen ist es möglich diese vielfältigen biochemischen Signale effektiv umzusetzen. So ist das *RANK-RANKL-Osteoprotegerin-System* von entscheidender Bedeutung im Rahmen der Steuerung des Knochenstoffwechsels. Das *Osteoprotegerin* (OPG) hemmt die Differenzierung der Osteoklasten und somit die

effektive Knochenresorption. *RANKL* hingegen wirkt antagonistisch zu OPG, stimuliert die Reifung der Osteoklasten und wird maßgeblich von Osteoblasten gebildet. In Abbildung 8 ist die Signaltransduktion zur Aktivierung osteoklastärer Gene dargestellt. Das von den Osteoblasten produzierte RANK bindet an den RANKL-Rezeptor der Osteoklasten-Vorläuferzellen, welcher die Signaltransduktion über NF- κ B weiterleitet. NF- κ B erhöht die c-Fos Expression, wobei c-Fos die Transkription der osteoklastären Gene hochreguliert. Im Gegensatz dazu inhibiert OPG die Expression, indem es RANKL inhibiert [67] [11]. Ferner regulieren die Osteozyten sowohl die Osteoblasten als auch die Osteoklasten. Die essenzielle Funktion der Osteozyten im Rahmen der Knochenhomöostase kommt durch die Sekretion verschiedener Botenstoffe zum Tragen (Abbildung 4).

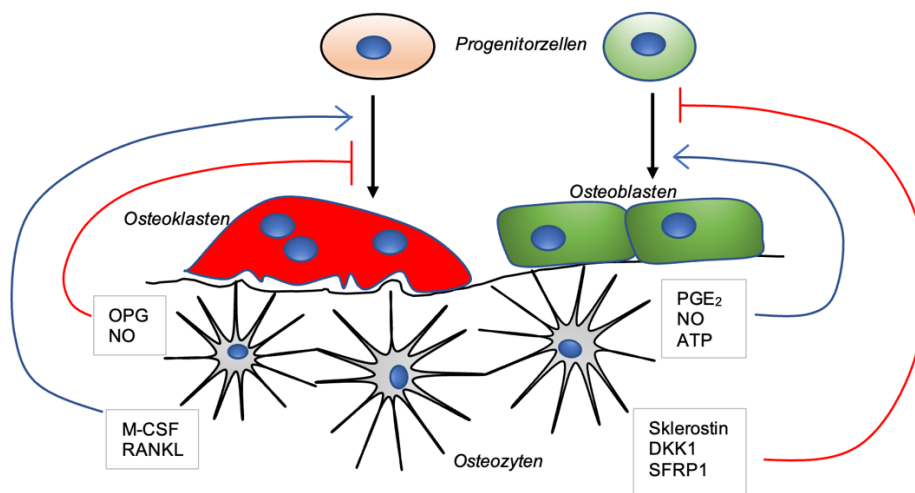


Abbildung 4: Osteozytäre Regulation des Knochenremodeling. Eigene Darstellung nach [24]. Durch die osteozytäre Sekretion von RANKL und M-CSF wird die Differenzierung der osteoklastären Vorläuferzellen angeregt, wohingegen OPG und NO diese inhibieren. Zudem sind die Osteozyten in der Lage mittels PGE₂, NO und ATP die Osteoblastenaktivität zu stimulieren und mittels Sklerostin, DKK1 und SFRP1 zu reduzieren. Das Sklerostin nimmt hier eine Sonderstellung ein, da die Expression bei Belastung des Knochens abnimmt und bei Entlastung zunimmt.

2.5 Knochengrundsubstanz

Die Knochengrundsubstanz des reifen Knochens besteht zu ca. 65% aus anorganischer und zu 35% aus organischer Matrix. Der anorganische Hauptbestandteil ist Hydroxylapatit [Ca₅(PO₄)₃(OH)], wohingegen der organische Teil von Proteoglykanen, Glykoproteinen (Osteokalzin, Osteonektin, Osteopontin) und diversen Kollagenfasertypen gebildet wird.

2.6 Ossifikation

Im Rahmen der Osteogenese unterscheidet man die desmale und die chondrale Ossifikation, welche zeitlebens einen wichtigen Faktor für die Knochenneubildung und die Frakturheilung darstellen.

Im Rahmen der *desmalen Ossifikation* differenzieren sich Mesenchymzellen an gut vaskularisierten Ossifikationszentren zu Osteoblasten, welche daraufhin mit der Produktion des Osteoids und der Einlagerung von Kollagenfibrillen vom Typ-1-Kollagen beginnen. Diese organische Grundsubstanz des Knochens wird fortwährend durch Einlagerung von Kalzium und Phosphat mineralisiert und verbindet sich durch appositionelles Wachstum zu vorerst kleineren Knocheninseln, welche sich bei fortgeschrittener Ossifikation zu größeren Knochenarealen zusammenlagern [71]. Die in die Knochenmatrix eingebetteten Osteoblasten differenzieren sich zu Osteozyten und regulieren fortan mitunter den Knochenmetabolismus [103]. Die Bildung des os frontale, os parietale, Mandibula, Maxilla und der Clavicula basieren auf der desmalen Ossifikation.

Die (en-)chondrale Ossifikation basiert auf einer knorpeligen Zwischenstufe bzw. einem Knorpelmodell, die die Chondroblasten vorerst als Grundgerüst synthetisieren, welches danach zu Knochen umgewandelt wird [118]. Mesenchymzellen, Progenitorzellen, Chondroklasten und Endothelzellen werden durch einspritzende Blutgefäße in die hypertrophe Knorpelmatrix eingelagert, welche anschließend resorbiert wird. Eingewanderte Progenitorzellen differenzieren sich zu knochenbildenden Osteoblasten. Endothel- und hämatopoetische Zellen bilden das Knochenmark bzw. das primäre Ossifikationszentrum [7, 73]. Dieses zentral im Knochen liegende Ossifikationszentrum wird durch das sekundäre, an den Knochenenden liegende, Ossifikationszentrum komplementiert. Osteoprogenitorzellen differenzieren sich im Perichondrium zu Osteoblasten. Diese formieren kortikalen Knochen um die Knorpelanlage [73]. Dieser Prozess ist vor allem für das Längenwachstum der Knochen von Bedeutung [54, 66].

2.6.1 Knochenremodeling unter physiologischen Bedingungen

Eine exakte Steuerung des Knochenremodelings ist unerlässlich für die Sicherung der Integrität des Knochengewebes, welches sich stetig an verschiedene Belastungen anpassen muss. Durch die bereits beschriebenen Kommunikations- und Regulationsmöglichkeiten der Zellen untereinander ist eine Adaptation des Knochengewebes an äußere als auch innere Veränderungen zeitlebens möglich. Besonders bemerkenswert ist, dass das

Knochengewebe das einzige Gewebe im menschlichen Körper ist, welches vollständig narbenfrei ausheilen kann. Beim Remodeling fusionieren anabole und katabole Prozesse, die durch Bildung von *basic multicellular units*, sog. BMU [23], effizient umgesetzt werden. Eine BMU besteht aus Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Osteozyten, Saumzellen und Osteoklasten [109]. Das Remodeling unterteilt sich in diverse Phasen, welche mit der Aktivierung der Osteoklasten und Resorption von Knochensubstanz beginnt. In der „Reversal-“ oder Umkehrungsphase differenzieren sich Osteoprogenitorzellen osteozytengesteuert zu reifen Osteoblasten, die das vorher resorbierte Knochenareal mit neuer Knochenmatrix auffüllen und mineralisieren. Die Ruhe- oder Stillstandsphase („quiescence“) ist von inaktiven Osteoblasten und Saumzellen geprägt, welche bei erneuter Stimulation zum Remodeling reaktiviert werden können [109].

2.7 Regulation des Knochenremodeling

Genetische Faktoren spielen eine große Rolle im Rahmen des Knochenstoffwechsels. Man geht davon aus, dass 60% bis 80% der Knochenmasse genetisch determiniert ist [60]. Dies wird dadurch untermauert, dass Kinder von osteoporotisch erkrankten Müttern eine erhöhte Prädisposition haben als vergleichbare Kontrollgruppen [42] [97].

Auf *mechanische Reize* reagiert das Knochengewebe mit anabolen oder katabolen Prozessen. Inaktives, nicht benötigtes Knochengewebe wird im Sinne der Inaktivitätsatrophie abgebaut, wohingegen stärker beanspruchte knöcherne Strukturen durch anabole Knochenaufbauprozesse verstärkt werden. Durch diese Dynamik ist eine kontinuierliche Anpassung an äußere Faktoren fortwährend gewährleistet. Die Entwicklung und das Remodeling des Knochen wird unter anderem von physikalischen, belastungsabhängigen Reizen induziert. Kräfte, welche über die Sehne vom Muskel auf den Knochen einwirken, werden von Osteozyten detektiert und in biochemische Signale transmittiert [60].

Hormonelle Komponenten sind im Rahmen der Knochenhomöostase von großem Belangen. Beispielsweise regulieren die *Schilddrüsenhormone* (T_3, T_4) die Knochenbildung und -resorption und sind von hoher Bedeutung im Rahmen des Knochenumbaus [55]. Durch die Synthese von IGF-1 werden mesenchymale Stammzellen zu Präosteoblasten differenziert, welche zu Osteoblasten reifen und so zur Osteogenese beitragen [60, 123]. Das sowohl anabol als auch katabol wirkende Nebenschilddrüsenhormon (*Parathormon*) *PTH* reguliert mitunter die Kalzium- und Phosphatkonzentration im Serum [30]. Kommunikationsgrundlage spielt hierbei der RANK-OPG Signalweg. Dadurch wird die

osteoklastäre, katabole Aktivität verstärkt, was zu einer erhöhten Knochenresorption und der damit einhergehenden verstärkten Freisetzung von Kalziumionen aus Hydroxylapatit führt [39]. Antagonistisch wirkt *Calcitonin* durch die Inhibition der Osteoklasten und wirkt entsprechend senkend auf den Kalzium- und Phosphatspiegel im Serum [29]. *Vitamin D₃ (Calcitriol, 1,25(OH)₂)* stellt als Steroidhormon einen fundamentalen Bestandteil der Knochenmineralisation, Skelettbildung und Kalziumhomöostase dar. Es reguliert die Rekrutierung der Osteoklasten und nimmt somit eine koordinative Funktion im Hinblick auf die Knochenzellen ein [5]. Die Relevanz der hormonellen Regulation wird durch die menopausale Osteoporose verdeutlicht. Hierbei führt ein verringerter Östrogenspiegel zu einem beschleunigten, aus dem Gleichgewicht geratenen Knochenabbau, welcher physiologisch durch Östrogen gehemmt wird. Dieses Sexualhormon sorgt durch Östrogenrezeptoren auf Osteoblasten, -klasten und -zyten für eine Förderung der Knochenbildung und eine Reduktion der Knochenresorption, indem es die Osteoklastogenese hemmt und die Apoptose der Osteoklasten fördert [13, 60, 109].

Wachstumsfaktoren sind elementarer Bestandteil der Stoffwechsellistung des Knochengewebes. IGF-I und IGF-II erhöhen die Osteoblastenzahl und verstärken die Kollagensynthese [21, 60], wohingegen TGF- β die Osteoblastendifferenzierung und die Osteoidproduktion fördert, gleichzeitig auch katabole Komponenten wie die Matrix-Metalloproteasen inhibiert [10]. Als osteoinduktiver Faktor sind die BMP's (Bone morphogenetic proteins) aufgrund ihrer stimulierenden Wirkung auf die Stammzellendifferenzierung zu Adipozyten, Knorpel- und Knochenzellen anzuführen [105]. Ferner bewirken diese Proteine eine effizientere Osteoblastogenese, während die Differenzierung der Osteoklasten supprimiert wird [16, 17]. Neovaskularisierung, Kollagensynthese eine verstärkte Proliferationsrate von Fibroblasten und glatten Muskelzellen sind Effekte des Platelet-derived growth factor (PDGF) [87, 100], welcher in Kombination mit VEGF (vascular endothelial growth factor), einer der wichtigsten Wachstumsfaktoren zur Koordination der Gefäßneubildung, anabole Prozess im Rahmen der Osteogenese initiiert [50].

2.8 Defektheilung

Trotz der robusten Eigenschaften des Knochens können durch direkte oder indirekte Gewalteinwirkung Frakturen im Sinne einer Kontinuitätsunterbrechung entstehen. Ruptierte Blutgefäße führen zu einer Einblutung in den Frakturspalt [20].

Im Rahmen der *primären Frakturheilung* sprießen Osteone direkt in die Bruchenden ein und gewährleisten somit eine direkte Verknöcherung des Frakturspalts, vorausgesetzt die Fragmente weisen eine minimale interfragmentäre Beweglichkeit und eine geringe Dimension des Frakturspalts auf. Ist die interfragmentäre Beweglichkeit erhöht und der Frakturspalt vergrößert, spricht man von der *sekundären Frakturheilung*. Hierbei wird der Defekt mittels Kallusbildung überbrückt, resorbiert, organisiert und verknöchert [20].

2.8.1 Entzündung

Diese initiale, inflammatorische Phase ist geprägt von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und Proteinen der Extrazellulärmatrix. Durch Einblutung in den Frakturspalt kommt es zu einem Hämatom und aufgrund der gestörten Blutversorgung zu einem hypoxischen und sauren Zustand [20, 62]. Aufgrund diverser Wundheilungsmediatoren werden Zellen, die für die Knochenheilung essentiell sind, stimuliert und rekrutiert. Das von Makrophagen im akuten Entzündungszustand gebildete IL-1 stimuliert mesenchymale Stammzellen zur Migration in den Frakturspalt, fördert die IL-6-Synthese in Osteoblasten und begünstigt die Bildung des weichen Kallus. TNF-alpha, IL-6, IL-11 und IL-18 unterstützen die Angiogenese und rekrutieren weiterhin Entzündungszellen [79]. Polymorphkernige neutrophile Granulozyten beherrschen das Entzündungsgeschehen [20]. Die angelockten mesenchymalen Stammzellen differenzieren sich zu Chondrozyten und Osteoblasten [34], welche im Rahmen der Reparationsphase für die Bildung eines frakturstabilisierenden, avaskulären, *weichen Kallus* verantwortlich sind, der später als knorpeliges Grundgerüst der Knochenheilung dient [107].

2.8.2 Weicher Kallus

Durch Differenzierung von Vorläuferzellen zu Chondrozyten und Fibroblasten wird der Kallus durch eine knorpelhaltige Matrix und Anteile von Faserknorpel mechanisch stabilisiert und gesichert. [34, 107]. PDGF, TGF- β und FGF-1 stimulieren die Differenzierung der Fibroblasten und Chondrozyten [107]. Letztere sind im Stande Proteine der Extrazellulärmatrix, vor allem Kollagen-Typ-II zur Stabilisierung zu produzieren [1]. Das durch die Einblutung entstandene Granulationsgewebe wird kontinuierlich durch Knorpel ersetzt. Die hohe Stoffwechselaktivität bedarf einer ausreichenden Nährstoffversorgung und wird durch einwandernde Endothelzellen, eine durch VEGF, BMP's, TGF-beta und FGF1, Angiopoietin I/II angeregte Angiogenese, begünstigt [1, 28, 37, 52].

2.8.3 Harter Kallus

Kennzeichnend für die Periode der harten Kallusbildung ist die hohe Osteoblastenaktivität und die damit einhergehende Bildung von mineralisierter Knochenmatrix [107]. Der hohen Nachfrage an Osteoblasten wird durch die Differenzierung der Osteoprogenitorzellen in Anwesenheit von osteogenetischen Faktoren nachgekommen. BMP's tragen auch in dieser Phase zur Neubildung von Knochengewebe bei [18, 85]. Weiterhin ist eine adäquate Nährstoffversorgung unabdingbar, welche durch die in Kapitel 2.8.2 beschriebenen Faktoren nach wie vor aufrecht erhalten wird. Der ursprünglich gebildete weiche Kallus wird fortwährend resorbiert und im Rahmen der enchondralen Ossifikation durch die knochenbildenden Zellen in Knochengewebe umgewandelt. Hierbei handelt es sich um Geflechtknochen, welcher nachteilig im Hinblick auf mechanische Belastbarkeit und Bruchzähigkeit zu bewerten ist. Demnach bedarf das neu gebildete Knochengewebe einer Umstrukturierung.

2.8.4 Remodeling

In dieser terminalen Phase der Defektheilung wird der periostale Kallus resorbiert bzw. reduziert und an die vorausgegangene anatomische Struktur angepasst [37]. Durch die Synergie von resorbierenden Osteoklasten und modellierenden Osteoblasten wird der Geflechtknochen in stabilen, hochstrukturierten Lamellenknochen umgewandelt. Molekulare Mechanismen der Osteoblasten-Osteoklasten-Koordination sind in Kapitel 2.4.2 und 2.4.5 beschrieben.

2.9 Knochenersatzmaterialien

Selbst der effektiv abgestimmten und koordinierten Defektheilung sind Grenzen gesetzt. Bis zu einem gewissen Volumen ist der Körper eigenständig in der Lage knöcherne Defekte effizient aufzufüllen. Darüber hinaus kann die Knochenheilung mithilfe von Knochenersatzmaterialien unterstützt werden, sollte diese jedoch keineswegs behindern. Hierbei spielt die Biokompatibilität bzw. die Verträglichkeit des Knochenersatzmaterials eine wesentliche Rolle im Rahmen der Integration in das umliegende Gewebe. Hierzu kann das Transplantat eines oder mehrere der nachfolgend genannten Charakteristika aufweisen.

Osteoinduktion beschreibt die Differenzierung von pluripotenten Mesenchymzellen, die unter der Wirkung von BMP's mit einsprossenden Blutgefäßen in das Transplantat befördert werden, um sich zu knochen- bzw. knorpelbildenden Zellen differenzieren zu können und somit osteogenetische Eigenschaften aufweisen [47].

Osteogenese beschreibt den Vorgang der Knochenbildung durch im Transplantat verbliebene vitale Osteoblasten.

Im Rahmen der *Osteokonduktion* dient das inserierte Transplantat als Leitschiene für neu synthetisierten Knochen. Dabei wird neuer Knochen aus dem angrenzendem Knochengewebe auf das Transplantat aufgelagert.

Osseointegrative Transplantate haben die Fähigkeit zur direkten Integration des Transplantates in das bestehende Knochengewebe ohne Ausbildung einer bindegewebigen Trennschicht, die erst zu Knochengewebe umgebaut werden müsste.

Ein ideales Transplantat weist alle vier oben genannten Merkmale auf. Dazu zählt lediglich das *autologe Transplantat*, welches aus dem gleichen Individuum stammt und die Komplikationsrate im Hinblick auf Abstoßung und Inflammation auf ein Minimum reduziert. Es stellt dadurch den Goldstandard in der traumatologischen und orthopädischen Chirurgie dar [47].

Allogener Knochenersatz besitzt aufgrund seiner Herkunft (gleiche Spezies, genetisch nicht identisch) ein erhöhtes Risiko für Infektionen und damit einhergehenden Abstoßungsreaktionen, Frakturen und Pseudarthrosen. Vorteilhaft zu bewerten ist das hohe Maß an Verfügbarkeit und die geringe Morbidität des Donors [88]. Im klinischen Alltag finden kortikale Knochenchips (Granulat, Blöcke) Anwendung, welche in Kombination mit

modernsten Aufbereitungsprozessen die Gefahr von Krankheitsübertragungen und Infektion vermindern [57].

Xenogene Knochenersatzmaterialien entstammen anderen Spezies z.B.: Rind (bovin), Schwein (porcin) und Pferd (equin). Durch thermisch-chemische Aufbereitung und Prozessierung werden immunologische Faktoren weitestgehend eliminiert und Komplikationsraten reduziert. In der vorliegenden Arbeit wurde auf xenogene Transplantate aus der Sicht der Versuchstiere zurückgegriffen. Dabei wurde Rippenknorpel aus einer anderen Spezies entnommen und in die Versuchstiere transplantiert. Das detaillierte Vorgehen und die Aufbereitung der Präparate ist in Kapitel 4 beschrieben.

Alloplastische Transplantate sind synthetisch hergestellte osteokonduktive Knochenersatzmaterialien. Dazu zählen Präparate aus Kalziumsulfat, Kalziumphosphatkeramiken, Kalziumphosphatzemente und bioaktive Gläser [47].

2.10 Stand der Forschung

Knorpeltransplantate finden aufgrund der guten Einheilung mit ästhetisch ansprechenden Ergebnissen erfolgreich Anwendung in der rekonstruktiven Kieferchirurgie zur Wiederherstellung von Ohren, Nasen und Gelenkflächen [35, 94, 116]. Auch Rekonstruktionen ankylosierter Kiefergelenke mit autologen, Rippenknorpeltransplantaten konnten beschrieben werden [70]. Erfolgreiche Rippenknorpeltransplantationen in das Capitulum humeri, Handgelenk und den Fingergelenken konnten schon beschrieben werden [91, 108, 116]. An lasttragenden Gelenken sind bis dato keine klinischen Ergebnisse publiziert worden. Tierexperimentelle Untersuchungen an Schafen und Kaninchen konnten zeigen, dass Rippenknorpel aufgrund seiner hyalinen Eigenschaften einen soliden und beständigen Knorpelersatz im menschlichen Organismus darstellen kann [31, 51]. Es wurden Arbeiten mit dem Schwerpunkt der Knorpeltransplantation und Stammzelltherapie zur Knorpelregeneration publiziert. Diese beschränken sich jedoch auf autologe bzw. industriell gefertigte Stammzellen und Implantate [56, 119, 120, 124].

Mögliche Alternativen zur Knorpeltransplantation im Rahmen der knöchernen Defektfüllung stellen eine Vielzahl verschiedener Knochenersatzmaterialien dar, welche im Hinblick auf Infektionsrisiko, Abstoßungsreaktionen und Einheilungspotenzial patientengerecht individuell abgewogen werden müssen. Derzeit gibt es noch keine klaren Indikations- bzw. Anwendungsgrundsätze [47].

3 Fragestellung und Zielsetzung

Die Etablierung von Rippenknorpeltransplantaten und gleichzeitig die Beurteilung, ob durch Modifikation der Transplantate mit mesenchymalen Stammzellen die biologischen Eigenschaften nachhaltig optimiert werden können ist die zentrale Frage der vorliegenden Studie. Aufgrund der im geringen Umfang publizierten Datenlage zum Thema „Knorpeltransplantate“ besteht ein hohes medizinisches Interesse an der weiteren Erforschung und Etablierung von Methoden zur Knorpelrekonstruktion im Sinne des Patientenwohles. Sowohl die Knochen- als auch die Knorpelrekonstruktion bildet eine große interdisziplinäre Schnittmenge, die sowohl die Human- als auch die Zahnmedizin tangiert. Vor allem die Schonung von gesunden Gelenkflächen, die Minimierung der Entnahmemorbidität und auch der damit verbundene Erhalt der Gewebeintegrität an der Entnahmestelle steht bei dieser Methode im Vordergrund und bewahrt den Patienten vor einem invasiven Eingriff in eine gesunde Gelenkfläche. Neben der Schonung von gesundem Gewebe und Gelenkflächen ist das ausreichende Reservoir des Rippenknorpels in Kombination mit der im Vergleich zu anderen Verfahren relativ simplen Transplantatentnahme von großem Vorteil. Das Modell der Knorpeltransplantation dient der Analyse der Heilung von Knorpel- und Knochendefekten (Kontrollgruppe) und der Evaluierung neuer Transplantate (dezellularisierte bzw. rezellularisierte Transplantate) zur Therapie von Knorpel- und Knochendefekten. Erst durch *in vivo* Experimente können realitätsnahe Rückschlüsse auf die frühfunktionelle Belastung im menschlichen Organismus gezogen werden. Dies ist Grundvoraussetzung für das Erreichen hinreichender und befriedigender klinischer Ergebnisse in der Human- und Zahnmedizin.

Somit lassen sich die folgenden, zentralen Fragenstellungen formulieren:

Lässt sich durch den Einfluss mesenchymaler Stammzellen das Einheilungspotential von Rippenknorpeltransplantaten vorteilhaft beeinflussen?

Stellen Rippenknorpeltransplantate eine vielversprechende, im Klinikalltag sinnvolle Ergänzung zu den bereits etablierten Rekonstruktionsmaterialien dar?

4 Material und Methode

Das Einheilen von Implantaten ist ein multifaktorieller Vorgang, der sich nur bedingt mit *in vitro* Experimenten nachvollziehen bzw. analysieren lässt. Im Tiermodell ist die biologische Integration unter physiologischen Rahmenbedingungen und immunologischen Aspekten möglich. Somit können aussagekräftige Rückschlüsse auf die Verträglichkeit und Einheilungstendenz im menschlichen Organismus gezogen werden. Die perioperative Belastung der Versuchstiere wird durch gute intra- und postoperative Schmerzmedikation auf ein Minimum beschränkt. Da jedes Kaninchen zeitversetzt mit einer Einheilungsphase zwischen beiden Operationen an jeweils beiden Hinterläufen operiert wurde, konnte die benötigte Anzahl der Tiere minimiert werden. Daher ist die über die Versuchsdauer mittelgradige Belastung der Versuchstiere im Rahmen der Studie ethisch vertretbar.

4.1 Das Versuchstier

Als Versuchstiere eigneten sich weiße Neuseeländer Kaninchen (Weibchen, 8-12 Monate alt, Gewicht: 4,5 – 5 kg). Aufgrund der Größe des Kniegelenks können Knorpeldefekte von 6mm Durchmesser gesetzt werden, ohne die natürliche Mobilität der Tiere einzuschränken. Zudem wird durch die Bodenhaltung in Kleingruppen die Bewegungsaktivität eines normal aktiven Erwachsenen annähernd simuliert.

Die Anzahl der Tiere beläuft sich zu Beginn des Versuchs auf 24 weibliche Kaninchen mit einem Alter von acht bis zwölf Monaten. Zwei der Kaninchen mussten trotz intensiver Wundnachsorge und Analgesie aufgrund postoperativer Beeinträchtigungen und Wundheilungsstörungen vorzeitig euthanasiert werden. Somit standen 22 Tiere zur Probeentnahme zur Verfügung.

4.1.1 Herkunft der Tiere

Die Tiere wurden eigens für diesen Versuch bei Thomas Bauer Kaninchen (Thomas Bauer Kaninchenzucht, Lohe 7, 74632 Neuenstein) gezüchtet und bis zum erforderlichen Alter artgerecht in Gruppen gehalten.

Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Versuchstiere

Gruppe	Proben pro Versuchszeitpunkt	
	4 Wochen (2. OP Knie links)	12 Wochen (1.OP Knie rechts)
Leerdefekt, Kontrollgruppe	7	7
Defektfüllung mittels dezellularisiertem Transplantat	8	8
Defektfüllung mittels rezellularisiertem Transplantat	7	7
Tiere insgesamt	22	

4.1.2 **Haltungsbedingungen**

Die Tiere wurden in den Tierhaltungs- bzw. OP-Räumen der mfd Diagnostics GmbH, (Raum 9.120 – 9.150) gehalten. Dort wurden die Kaninchen in Gruppen mit jeweils sechs Tieren in strukturierten, mit Versteckmöglichkeiten und Futterstellen versehenen Ställen á 5,52m² betreut. Holzspäne und Stroh wurde als Einstreu verwendet und die Versorgung der Tiere wurde mittels Heu, pelletiertem Alleinfuttermittel und Trinkwasser nach Belieben gesichert. Postoperativ wurden die Tiere aufgrund der verbesserten Beobachtungs- und Behandlungsmöglichkeit kurzzeitig (maximal für drei Tage) getrennt, um anschließend wieder in ihrer ursprünglichen Gruppenkonstellation bis zum Versuchsende gehalten zu werden.



Abbildung 5: **Haltungsbedingungen der Versuchstiere**

4.2 Versuchsablauf

Die Tiere wurden in eine Kontrollgruppe ohne Operation (7 Tiere), eine Versuchsgruppe mit unbehandelten Transplantaten (8 Tiere) und eine Therapiegruppe mit Transplantaten, welche mit mesenchymalen Stammzellen (7 Tiere), die aus 20 ml Vollblut gewonnen wurden, gruppiert.

4.2.1 Setzen der Knorpeldefekte

Es wurden am rechten Knie Knorpeldefekte von 4,1mm Durchmesser mittels dentalem Implantatbohrer (BEGO RI, BEGO Implant, Bremen, Deutschland) gesetzt. Um die Anzahl der Tiere möglichst gering zu halten, wurde am linken Knie der Tiere das identische Vorgehen acht Wochen nach der ersten Operation an der rechten Seite durchgeführt. Nach weiteren 4 Wochen wurde die Euthanasie der Tiere durchgeführt. Dadurch können Aussagen über die Integration des Implantates nach 4 und 12 Wochen getroffen werden.

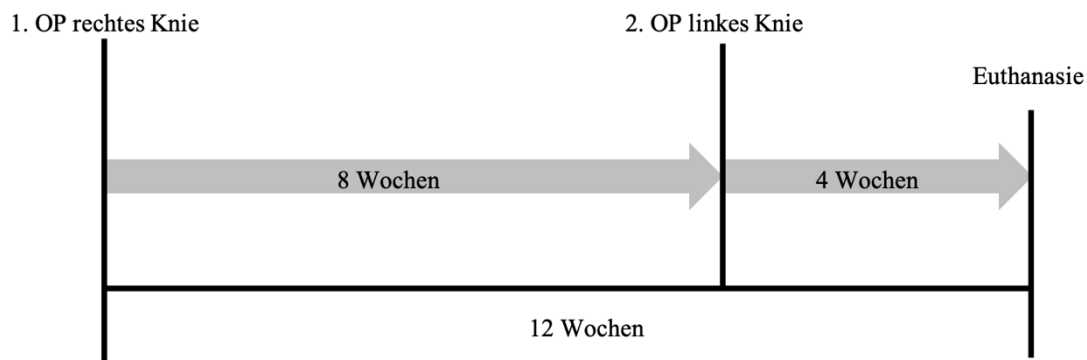


Abbildung 6: Chronologie des Versuchsaufbaus. Die erste Operation fand zu Beginn der Zeitachse statt. Nach 8 Wochen erfolgte die zweite Operation am rechten Knie. Nach weiteren 4 Wochen wurden die Versuchstiere euthanasiert, sodass zwei zu vergleichende Zeitpunkte (4 Wochen und 12 Wochen) für die weitere Analyse zur Verfügung stehen.

4.2.2 Transplantatvorbereitung

Die Knorpeltransplantate stammen von humanen Körperspendern. Die xenogenen Transplantate wurden nach dem Marburger Knochenbanksystem thermodesinfiziert und bei -20°C eingefroren [98]. Immunologisch aktive Faktoren der Knorpelgrafts wurden durch den Aufreinigungsprozess inaktiviert. Eine Dezellularisierung als auch eine Rezellularisierung waren für die anstehende Verwendung von Nöten.

Die Dezellularisierung fand gemäß dem von Kheir et al. etablierten Protokoll statt [58]. Die Knorpelgrafts wurden zwei „trocken“ und zwei „nass“ Gefrier-Auftau-Zyklen ausgesetzt. Im Laufe der Trockenzyklen wurden die Proben auf -20°C eingefroren, aufgetaut, um danach erneut auf -20°C eingefroren zu werden. Beim Nasszyklus hingegen wurden die Grafts bei Raumtemperatur aufgetaut, mit frischer hypotoner Pufferlösung (10mMtris-HCL) versetzt und die Proben über die Nacht auf -20°C eingefroren. Die Knorpeltransplantate wurden auf 48-well Platten mit flachem Boden aufgebracht und verweilten mit 220 U/min im Orbitalschüttler. Die Weiterbehandlung beinhaltete drei anionische Reinigungszyklen mit jeweils zwei Schritten:

1. Inkubation mit hypotonem Puffer bei 45°C für 24 Stunden
2. Inkubation in 0,1% (v/v) Natrium dodecyl Sulfat (SDS-Lösung) bei 45°C für 24h

Anschließend wurden die Knorpeltransplantate mit PBS-Puffer gespült, mit 0,1% (v/v) Peressigsäure dekontaminiert und mit PBS-Puffer in drei Zyklen gespült. Die Knorpeltransplante wurden in 24-well Platten für die Rezellularisierung transferiert und 24 Stunden in einem mit 10%-igem FBS (fetal bovine serum) versetzten Kulturmedium eingelegt. Die angestrebte Zelldichte innerhalb des Präparats betrug 30 Millionen MSCs/Kubikzentimeter. Die Zellaussaat erfolgte in zwei Schritten. Zuerst wurden die Präparate in 1,5 ml Eppendorfgefäße eingebracht. Danach wurde die Oberfläche des jeweiligen Knorpelpräparats mit der Hälfte des Aussaatvolumens behandelt. Im Rahmen des zweiten Schritts wurde die restliche Zellsuspension auf die gegenüberliegende Oberfläche des Knorpeltransplantats aufgebracht. Im Abstand von zwei bis drei Tagen wurde 50% des Mediums ersetzt. Die Dauer der Zellkultivierung betrug 28 Tage.

4.2.3 Anästhesie

Die Tiere wurden mit Ketamin/Xylazin 50/5 mg/kg Körpergewicht, welches intramuskulär injiziert wurden, anästhesiert. Zusätzlich wurde 0,05mg/kg Körpergewicht Buprenorphin appliziert. Ein venöser Zugang durch die Ohrvene ermöglichte eine bedarfsorientierte Nachdosierung von Narkosemitteln (Ketamin 25mg/kg KG, Midazolam 0,5-1mg/kg KG). Herzfrequenz und Sauerstoffsättigung wurden während der Operation mittels Pulsoxymetrie überwacht. Die Lagerung erfolgte auf einer Wärmedecke.

4.2.4 Operationsdurchführung

Nach erfolgreicher Anästhesie wurde das zu operierende Bein im Kniebereich geschoren. Die Operation wurde unter aseptischen Kautelen in einem getrennten Operationsraum durchgeführt. Mittels Braunol[®] wurde das Operationsfeld gründlich desinfiziert. Die Inzision erfolgte längs der Patella, welche danach nach lateral disloziert wurde. Artikuläre osteochondrale Defekte wurden femoral gesetzt. Die Tiefe des zentral in der Trochlearinne lokalisierten Defektes betrug 10 mm und der Durchmesser 4,1mm. Jede Defektsetzung wurde standardisiert mit einem dentalen Implantatbohrer durchgeführt. Bei der Kontrollgruppe blieb der Defekt ungefüllt, wohingegen den Tieren der Interventionsgruppen dezellularisierte oder rezellularisierte Knorpeltransplantate implantiert wurden. Die Gelenkkapsel wurde nach erfolgreicher Implantation per Naht verschlossen und die Patella reponiert. Der Weichgewebsdefekt wurde mittels Einzelknopfnähten verschlossen (Vicryl 3-0) und die oberflächliche Haut mit einem Sprühpflaster versorgt.

4.2.5 Nachbehandlung

Die operierten Gliedmaßen konnten postoperativ vollständig belastet werden. Am ersten postoperativen Tag wurde zweimal, im Abstand von zwölf Stunden, bei allen Tieren 0,05mg/kg KG Buprenorphin zur Ausschaltung der Schmerzen subkutan injiziert. Überdies wurden den Kaninchen nach Narkoseeinleitung 0,5mg/kg KG Meloxicam (ein NSAR) s.c. injiziert. Die darauf folgenden (fünf) Tage wurde das Schmerzmittel oralisiert. Die Tiere wurden in den ersten sieben Tagen aufmerksam untersucht. Lahmheit, gestörtes Allgemeinbefinden und Wundheilungsstörungen wurden täglich mit Hilfe eines Scoresheets dokumentiert (vgl. Kapitel 13.1). Faktoren wie drastische Gewichtsabnahme um mehr als 20%, totale Verweigerung der Nahrungsaufnahme, ausgeprägte

Wundheilungsstörungen, Isolierung und Apathie sind Indizien für ein gestörtes Allgemeinbefinden und führten zur vorzeitigen Euthanasie von zwei Tieren.

4.2.6 Probenentnahme und Herstellung der Schnittpräparate

Nach ausreichend tiefer Allgemeinanästhesie (Ketamin/Xylazin 50/5 mg/kg KG i.m.) wurde intravenös die Euthanasie mittels T61 eingeleitet. Die distalen Femora wurden zur histologischen Untersuchung entnommen. Danach wurden die Proben gemäß der 4%-PFA-Fixierung nach Lillie über 48 Stunden bei 4°C fixiert (näheres zur PFA-Fixierung nach Lillie vgl. Kapitel 13.2.1). Dazu wurde eine 4%-Paraformaldehydlösung in 0,1M Natriumphosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,2-7,4 hergestellt. Bezugsquellen und verwendete Reagenzien können dem Anhang entnommen werden (vgl. Tabelle 12). Durch sechsmaliges Spülen mit 0,1M Natriumphosphatpuffer wurde die Paraformaldehydlösung restlos aus den Proben entfernt. Zum Herauslösen der Kalksalze aus den Präparaten wurden die entnommenen Proben in Einbettkassetten platziert und in EDTA-Lösung (3,4% TRIS und 10% Titriplex III, pH=7,0-7,4) bei 4°C entkalkifiziert. Die Lösung wurde alle zwei Tage erneuert, sodass eine konstante Kalziumkonzentration vorhanden war. Nach erfolgreichem Entkalken wurde das EDTA in fließendem Leitungswasser eine Stunde herausgespült und anschließend die Proben für die Einbettung entwässert. Die Paraffineinbettung erfolgte mit dem Gewebeinfiltrationsautomaten Leica TP1020 und der Paraffinausgießstation Leica HistoCore Arcadia. Der Ablauf des Programms ist Tabelle 2 zu entnehmen. Der letzte Schritt der Gewebeinfiltration bestand in der Positionierung der in flüssigem Paraffin befindlichen Proben in Metallformen. Diese wurden zum Abkühlen über Nacht auf eine Kühlplatte positioniert, ehe sie nachgeschnitten werden konnten. Die erhärteten Proben konnten nun am Rotationsmikrotom Thermo Scientific HM355S zu fertigen Objektträgern verarbeitet werden. Mit Hilfe scharfer Mikrotomklingen wurden 5µm dünne Schnitte vom Paraffinblock abgetrennt und über eine Wasserbrücke in ein temperiertes Wasserbad (40°C) geleitet. Durch die Oberflächenspannung des Wassers war ein leichtes Aufbringen der Schnitte auf die Objektträger möglich. Danach wurden die Schnitte bei 37°C im Wärmeschrank gründlich getrocknet. Die Randschnitte wurden in der Regel verworfen, da hier kaum histologische Informationen vorhanden waren. Es wurde solange geschnitten, bis alle relevanten Strukturen erkennbar waren, sodass die Transplantate einschließlich umliegendem Gewebe vollumfänglich betrachtet werden können.

Tabelle 2 : Ablauf der Paraffineinbettung. Leica TP1020 Gewebeinfiltrationsautomat

70% Ethanol I	30 Minuten	Raumtemperatur
70% Ethanol II	1 Stunde	Raumtemperatur
80% Ethanol	1 Stunde 30 Minuten	Raumtemperatur
96% Ethanol	1 Stunde 30 Minuten	Raumtemperatur
100% Ethanol I	1 Stunde 30 Minuten	Raumtemperatur
100% Ethanol II	1 Stunde 30 Minuten	Raumtemperatur
100% Ethanol III	1 Stunde 30 Minuten	Raumtemperatur
Xylol I	1 Stunde 30 Minuten	Raumtemperatur
Xylol II	1 Stunde 30 Minuten	Raumtemperatur
Xylol III	1 Stunde 30 Minuten	Raumtemperatur
Paraffin I	1 Stunde 30 Minuten	58°C
Paraffin II	1 Stunde 30 Minuten	58°C

4.3 Histologische Färbungen und deren Auswertung

4.3.1 Serienschritte

Zur standardisierten Erfassung der Versuchsergebnisse wurden die mittleren Präparaten einer jeden Schnittserie so gewählt, dass alle wesentlichen Strukturen in annähernd der gleichen Schnittebene dargestellt werden. Nur durch die Auswahl vergleichbarer Präparate können sinnvolle Rückschlüsse auf die frühfunktionelle Einheilung der Transplantate bzw. Regeneration der Leerdefekte gezogen werden.

4.3.2 Färbung und Fotomikroskopie

Damit die Präparate histologisch untersucht werden konnten, bedurfte es mehreren Färbungen, sodass relevante Strukturen und Enzyme quantifizierbar wurden. Die Einzelschritte der jeweiligen Färbung können Kapitel 13.3 im Anhang entnommen werden.

Mit Hilfe des Leica Fotomikroskopes DM5500B (Fa. Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland), der extern angebrachten Kamera „Leica DCF 7000 T“ (Fa. Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) und der Software „LAS X“ (Version 3.0, Fa. Leica Microsystems CMS GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurden die verschiedenen Färbungen als „.tif“-Dateien folgendermaßen digitalisiert:

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der histologischen Färbungen

Färbung	Vergrößerung	Darstellung	ROI [μm]
Movat-Pentachrome	x40	Übersichtsfärbung	40,51
Osteocalcin	x10	Anabol	161,29
TRAP	x40	Katabol	40,51
ASMA	x10	Anabol/katabol	161,29

4.3.3 Movat-Pentachrom

Als Übersichtsfärbung bietet die Movat-Pentachrome eine gute Grundlage für die Analyse verschiedener Gewebe auf einem Objektträger. Da sich Muskelgewebe und Osteoid im gleichen Farbton darstellen, wurde im Voraus die irrelevante Muskulatur rausgeschnitten. Das somit klar abgrenzbare Färbeergebnis erlaubt durch die Verwendung verschiedener Farbstoffe wie Alcianblau, Brillant-Crocein, Säurefuchsin und Safron du Gatinais eine sich anschließende histomorphometrische Untersuchung. Die Auswahl der Movat-Pentachrome-Färbung hat sich im Vergleich zur Masson-Goldner-Färbung als vorteilhafter erwiesen. Nach anfänglicher Verwendung beider Färbungen entschied man sich im Hinblick auf eine bessere histomorphometrische Auswertung für die Movat-Pentachrome-Färbung.

Tabelle 4: Färbeergebnisse der Movat-Pentachrome-Färbung

Ergebnis der Mehrfachfärbung	
Zellkerne	blauschwarz
Zytoplasma	rötlich
elastische Fasern	rot
kollagenes Bindegewebe	hellgelb
Muskulatur	rot
Knorpelgewebe	grün
mineralisierter Knochen	dunkelgelb
Osteoid	dunkelrot
saure Glykosaminglykane	leuchtend hellblau

Anhand lichtmikroskopischer Übersichtsdarstellungen in vierzigfacher Vergrößerung konnten die verschieden gefärbten Gewebearten detailliert abgegrenzt werden. Die Verknöcherung (TOT, dunkelgelb), Knorpelgewebe (TCT, blau-grün) und die nicht-mineralisierte Matrix wurde prozentual anhand der von ImageJ ermittelten Daten berechnet.

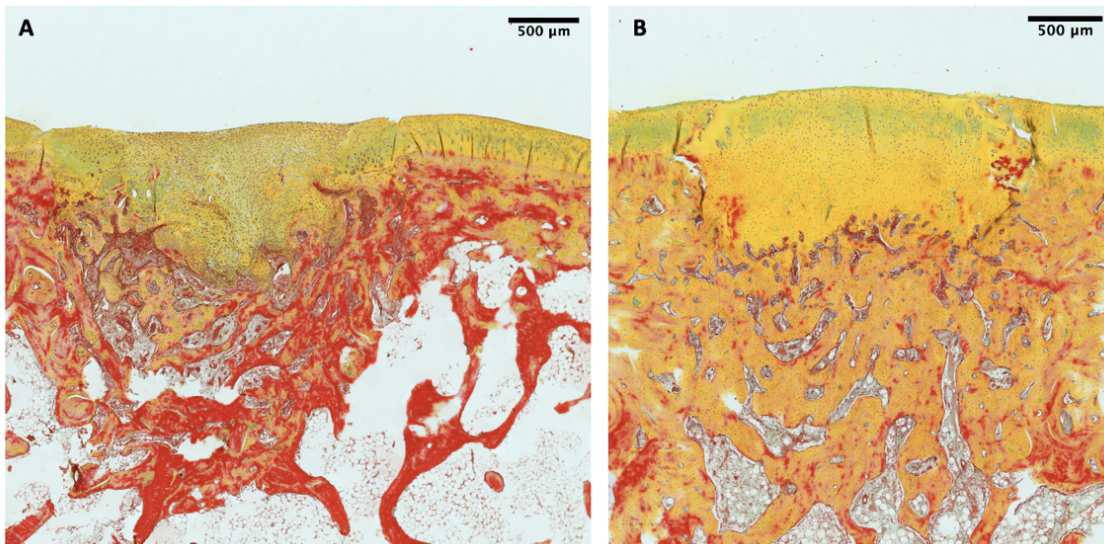


Abbildung 7: Beispielhafte Bilder der Movat-Pentachrome-Färbung. Dargestellt ist die Kontrollgruppe nach 4 Wochen (A) und 12 Wochen (B).

4.3.4 Osteocalcin

Als anabole Komponente dient die Osteocalcin-Färbung der Darstellung der Knochenneubildung und der Syntheseleistung der Osteoblasten. Als immunhistochemische Färbung basiert sie auf dem in Kapitel 4.3.7 beschriebenen Prinzip. Das Osteocalcin ist ein nicht-kollagenes Matrixprotein [64] und wird überwiegend von Osteoblasten und Odontoblasten im Rahmen der Zelldifferenzierung und der folgenden Mineralisation synthetisiert. Auch klinisch zählt das Osteocalcin - als spezifischer Marker der Osteoblastenaktivität [117] - zu einem fundamentalen Diagnostikwert zur Beurteilung des Knochenstoffwechsels. Zur Analyse wurde in Osteocalcin-positiv und -negativ unterschieden. Anhand des unten aufgeführten Falschfarbenbild (Abb. 9) wurde im Voraus überprüft, ob die Farbcodierung in ImageJ korrekt war. Dem schloss sich die histomorphometrische Untersuchung an. Die Ergebnisse wurden zur weiteren Aufbereitung tabellarisch erfasst und in SPSS übertragen.

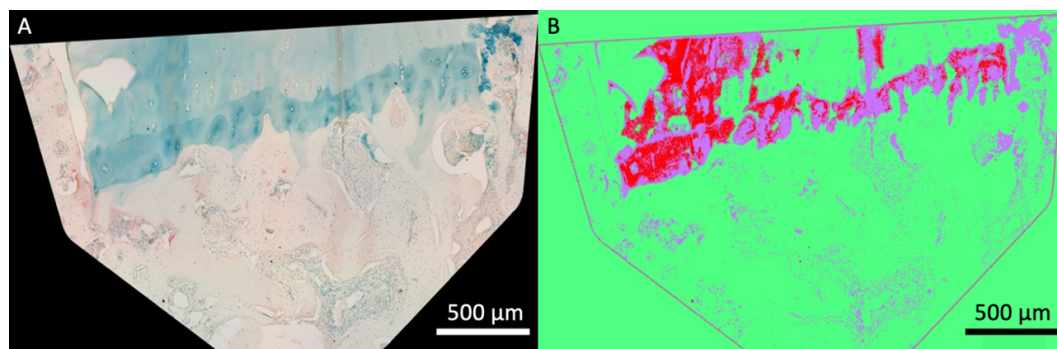


Abbildung 8 : Falschfarbenbild der Osteocalcin-Färbung vor der histomorphometrischen Auswertung. Das Falschfarbenbild (B) auf der rechten Seite, entstehend aus dem Ausgangsbild (A), dient der Kontrolle der richtigen Farbcodierung im Rahmen des „Trainable Weka Segmentation“.

4.3.5 Tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP)

Diese Färbung bietet eine spezifische Darstellung der markant rot gefärbten, resorbierenden Osteoklasten. Als Kriterien wurde festgelegt, dass sich die Zellen innerhalb der region of interest an einer Knochenoberfläche befinden und sich mehrkernig darstellen.

Die ROI ist im Rahmen der TRAP-Färbung (x40) mit der Movat-Pentachrome-Färbung (x40) gleichzusetzen (vgl. Abb. 12). Mit Hilfe der o.g. Kriterien wurden die TRAP⁺-Osteoklasten ausgezählt, mit Excel tabellarisch festgehalten, um anschließend durch SPSS statistisch ausgewertet und grafisch dargestellt zu werden.

Die Kenngrößen dabei waren die Länge eines jeden Osteoklasten und die Gesamtzahl der im histologischen Bild dargestellten, katabolen Knochenzellen. Daraus konnte die Gesamtlänge der aktiv resorbierenden Osteoklasten bestimmt werden. Um Rückschlüsse auf die katabolen Vorgänge ziehen zu können, wurden die Osteoklasten manuell ausgezählt. Dabei wurde die Anzahl und die Länge bzw. Oberfläche der aktiv resorbierenden Osteoklasten händisch erfasst, um dadurch die Osteoklastenaktivität gemäß nachfolgender Rechnung zu bestimmen:

$$\frac{\text{Osteoklastenanzahl}}{\text{Länge resorbierender Osteoklasten}}$$

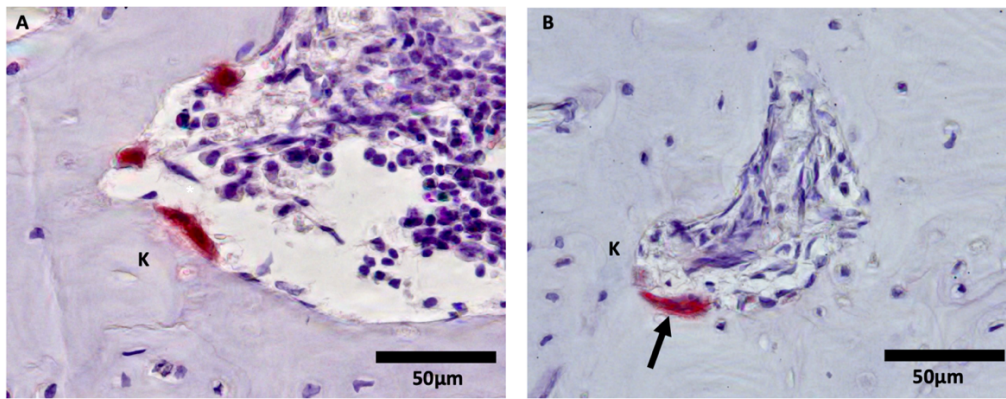


Abbildung 9: Lichtmikroskopische Darstellung mehrkerniger TRAP⁺-Osteoklasten (A,B) mit klar erkennbarer, intensiver Rotfärbung. Die zahlreichen Fortsätze (Pfeil) deuten auf die ruffled border des an der Knochenoberfläche (K) befindlichen, katabol aktiven Osteoklasten hin.

4.3.6 ASMA

Grundlage dieser Färbung ist das in den Gefäßen bzw. glatten Muskelzellen befindliche „alpha-smooth-muscle-actin“. Durch den Antikörper-Antigen-Komplex können Gefäße rund um das Transplantat bzw. Leerdefekt spezifisch angefärbt werden. Gemäß der in Tabelle 3 angegebenen ROI wurden angefärbte Gefäße lichtmikroskopisch ausgezählt und tabellarisch in Excel fixiert. Die grafische Darstellung erfolgte mit SPSS.

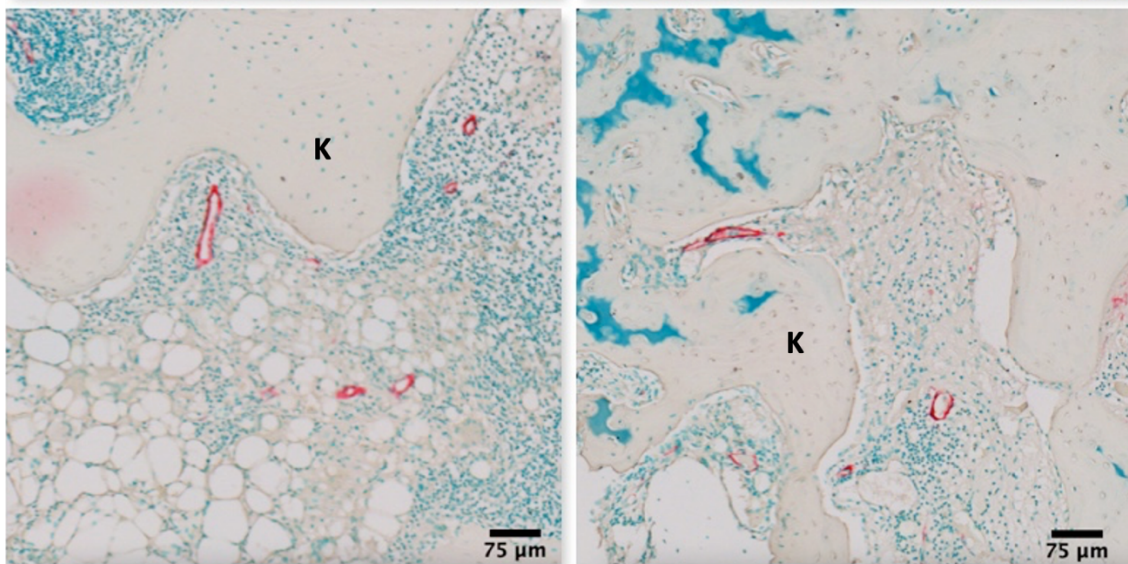


Abbildung 10: Histologische Darstellung der Gefäße; ASMA-Färbung. Innerhalb der ROI (vgl. Abb. 12) deutlich erkennbare, rot gefärbte Blutgefäße. K: Knochengewebe.

4.3.7 Immunhistologie

Zur histologischen Diagnostik und gleichzeitig hochspezifischem Nachweis von Proteinen, gegen die Antikörper gebildet werden können, macht man sich die Immunhistochemie zu Nutze. Diese kann in direkte und indirekte Methoden eingeteilt werden, wobei übersichtshalber nur auf die in dieser Arbeit verwendeten, indirekten ABC-Methode eingegangen wird.

Die Avidin-Biotin-Complex-Methode basiert auf der hohen Affinität des Avidins (bzw. Streptavidins) zum Biotin. Dadurch ist eine starke Komplexbildung zwischen einem unkonjugierten Primärantikörper, welcher mit hoher Affinität an das darzustellende Antigen bindet und einem biotinylierten Sekundärantikörper möglich. Diese Methode zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus.

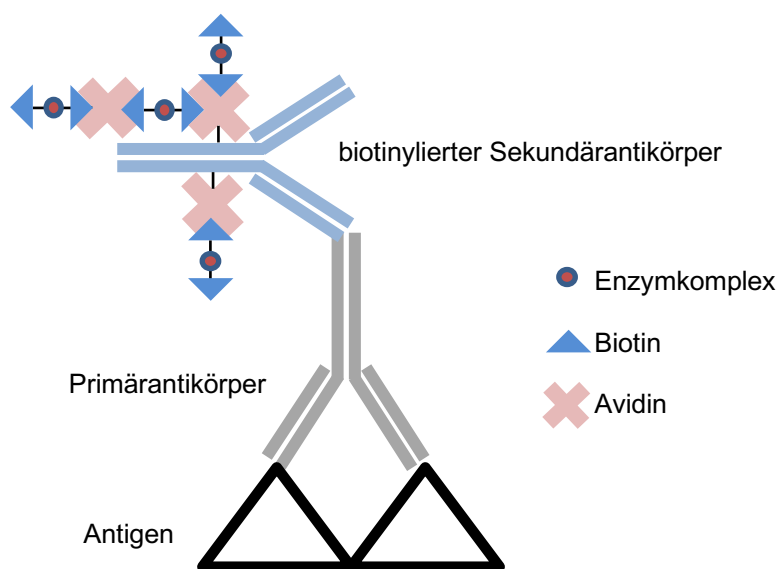


Abbildung 11: Schematische Darstellung des (Strept-) Avidin-Biotin-Komplexes. Eigene Darstellung nach [2].

4.3.8 Digitale Nachbearbeitung

Da die komplette Betrachtung bzw. Analyse eines histologischen Präparates zu Fehlinformationen geführt hätte, wurde die ROI (region of interest) genau festgelegt. Mit den in ImageJ (Version 1.47) integrierten Funktionen „Set Scale“ und „Make Band“ wurde der relevante Bereich um jedes Transplantat bzw. Leerdefekt vollautomatisch berechnet und gemäß Tabelle 3 exakt abgezeichnet.

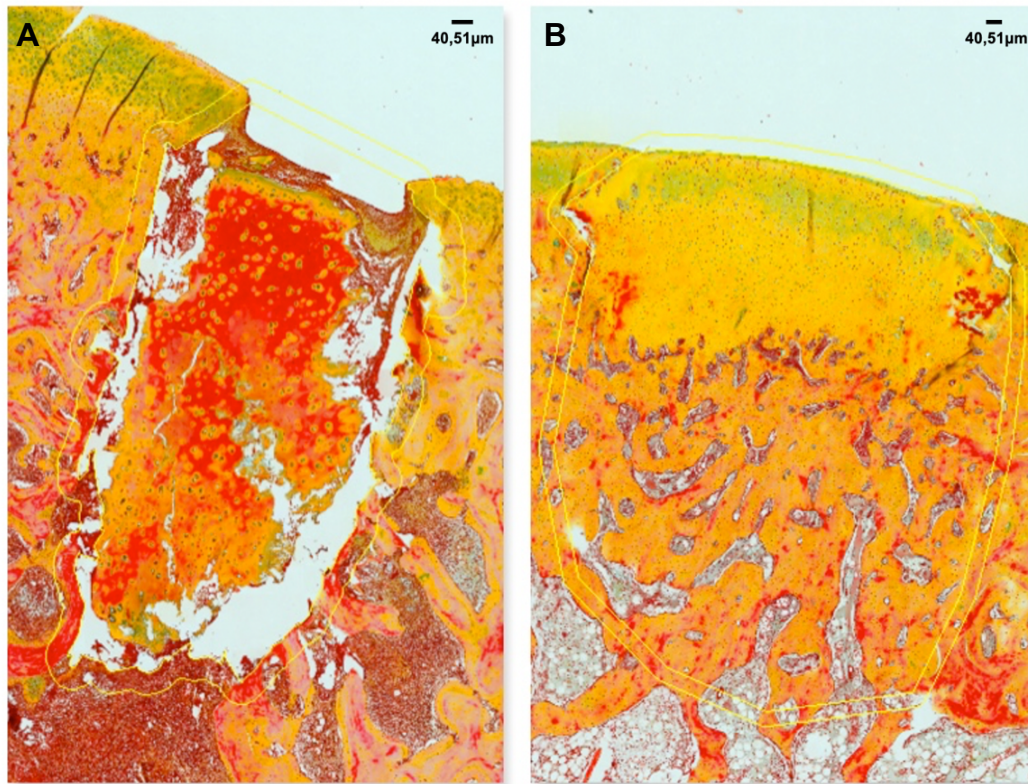


Abbildung 12: Visualisierung der ROI (region of interest) in 40-facher Vergrößerung. Hier: Movat-Pentachrome-Färbung. Der Maßstab (schwarzer Balken) entspricht genau der vorher mit $40,51\mu\text{m}$ definierten, periimplantären region of interest. Diese ist durch die gelbe Linie visualisiert. In der linken Bildhälfte (A) ist eine dezellularisiertes Transplantat mit einer Einheilzeit von 4 Wochen dargestellt. Hierbei ist eine klare Abgrenzung der Grenzfläche Transplantat - umliegendes Gewebe möglich. In der rechten Bildhälfte (B) ist ein Leerdefekt zum Zeitpunkt 2 (12 Wochen) dargestellt. Eine exakte Defektmarkierung ist aufgrund der diffusen Defektgrenzen nicht gänzlich möglich.

Bestandteil der histologischen Untersuchung war das Transplantat bzw. der Defekt selbst und die Grenzstrukturen, welche innerhalb der regio of interest lagen. So stand eine standardisierte ROI, unabhängig von der Vergrößerung, zur weiteren Untersuchung zur Verfügung.

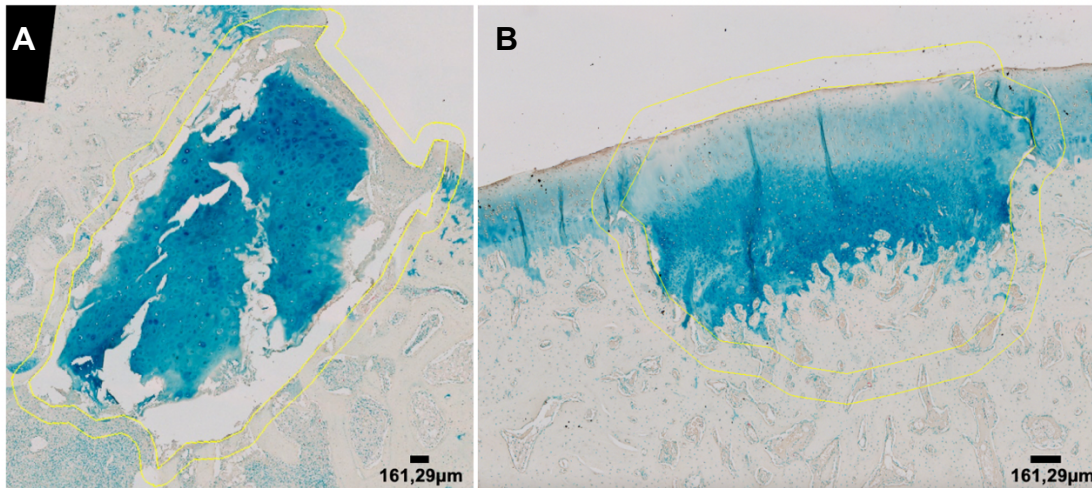


Abbildung 13: Darstellung der ROI in 10-facher Vergrößerung. Hier: ASMA-Färbung. Der schwarze Balken stellt die mit 161,29µm definierte ROI dar. Die linke Bildhälfte (A) stellt ein dezellularisiertes Transplantat mit einer Standzeit von 4 Wochen dar. Die rechte Bildhälfte (B) ist ein Präparat der Kontrollgruppe (Leerdefekt) nach 12 Wochen Einheilzeit. Hier lässt sich erkennen, dass die Definition der ROI in der Kontrollgruppe aufgrund der vorangeschrittenen Einheilung nicht klar abgrenzbar war.

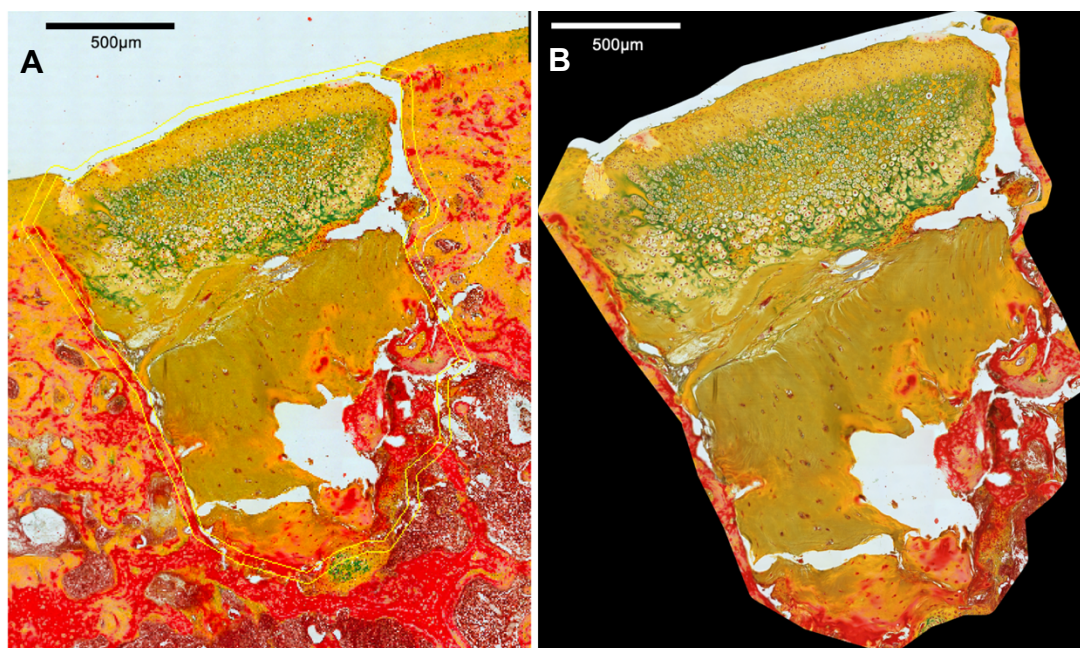


Abbildung 14: Darstellung der untersuchten ROI. In der linken Bildhälfte (A) ist das Ausgangsbild zu sehen, welches wie im obigen Abschnitt beschrieben, mit den o.g. Funktionen „Set Scale“ und „Make Band“ bearbeitet wurde. Hierbei stellt sich die gesamte ROI aus Transplantat bzw. Defekt(-füllung) und der angrenzenden, in diesem Fall mit 40,51µm deklariertem Abstand zum Transplantat, dar. In der rechten Bildhälfte (B) ist das endgültig prozessierte, zur histomorphometrischen Analyse fertiggestellte, digitalisierte, histologische Präparat sichtbar.

4.3.9 Histomorphometrie

Histomorphometrische Analysen mithilfe des Programms „Image J“, dienen der Quantifizierung der Movat-Pentachrome- und Osteocalcin-Färbung. Hierbei wurde gemäß dem von Malhan et al. publizierten Protokoll vorgegangen [77]. Dem integrierten, halbautomatischen Plugin „Trainable Weka Segmentation“ werden verschiedene Kategorien bzw. Farbsegmente manuell zugeordnet. So kann anhand eines repräsentativen histologischen Bildes, welches alle relevanten Farbinformationen enthält, eine gesamte Färberei anhand gleicher Parameter ausgewertet werden. Zur Kontrolle wird hierzu ein Falschfarbenbild erstellt, aus dem ersichtlich wird, inwiefern die verschiedenen Kategorien korrekt zugeordnet wurden. Der für die Analyse nicht relevante Hintergrund wurde vorher mittels Photoshop CS6 (Adobe Systems Incorporated San José, USA) ausgeschnitten. Nach erfolgter Analyse der Färbungen konnten die Daten mit Hilfe von Excel (Version 16.53) geordnet werden, sodass diese schließlich in IBM SPSS Statistics (Version 28.0) endgültig ausgewertet werden konnten. Näheres zur jeweiligen Auswertung kann den Unterkapiteln der Färbungen entnommen werden.

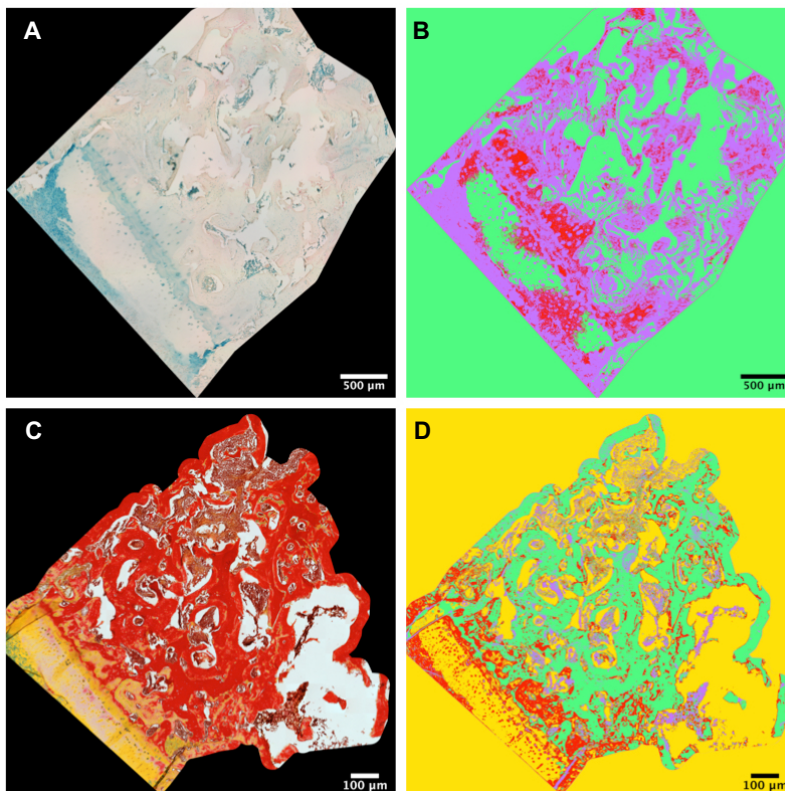


Abbildung 15: Falschfarbenbilder der Osteocalcin(A,B)- und Movat-Pentachrome(C,D)-Färbung. Erstellt durch ImageJ im Rahmen der Histomorphometrie. Jeder einzelne Farbton erhält eine Falschfarbendarstellung. Dadurch kann überprüft werden ob im Voraus die einzelnen Farbsegmente zufriedenstellend ausgewählt bzw. definiert wurden.

4.4 Deskriptive Analyse der histologischen Präparate

Die deskriptive Auswertung diente der qualitativen Beurteilung des Einheilungspotenzials der Transplantate mit Hilfe der Movat-Pentachrome-Übersichtsfärbung. Nicht nur die rein histologische Bewertung und histomorphometrische Analyse gilt zu berücksichtigen, sondern auch die optische Vereinigung der Transplantate mit dem umliegenden Gewebe. Demnach kann die Biokompatibilität im Sinne einer Einheilung bzw. Überbrückung des Defektes zwischen der dezellularisierten und rezellularisierten Gruppe verglichen werden. Mit Hilfe des folgenden Scores wird die Gewebeintegration bewertet:

0 – keine Integration

1 – vereinzelt integriert

2 – mindestens eine Transplantatseite integriert

3 – beide Transplantatseiten integriert

4.5 Statistik und grafische Auswertung

Die Gesamtheit der ermittelten Daten wurde tabellarisch in Microsoft Excel (Version 16.57) zusammengestellt. Anschließend wurde mittels Datenimport alle Werte in eine Übersichtstabelle eingefügt, um danach statistisch mit dem Programm „SPSS“ (IBM, SPSS Statistics 21) ausgewertet zu werden. Die Verknöcherung, die Chondrogenese, der Anteil an Osteocalcin, nicht mineralisierter Matrix und Osteoid wurde prozentual errechnet. Die Funktion bzw. Berechnung der „deskriptiven Statistik“ bildete die Grundlage der grafischen Darstellung der einzelnen Parameter. Im vorliegenden Fall waren die Daten nicht normalverteilt. Somit wurde zur weiteren Berechnung der Statistik der Mann-Whitney-U Test benutzt (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$). Anhand von Balkendiagrammen werden alle Ergebnisse visualisiert, wobei hier der Standardfehler mit ± 1 durch Fehlerbalken angezeigt wird. Zur grafischen Darstellung der nachfolgenden Ergebnisse wurden gruppierte Balkendiagramme zur Visualisierung ausgewählt. Dabei steht die Kontrollgruppe (Leerdefekt, Gruppe 3) an erster Stelle, gefolgt von Gruppe 1 (Knorpel dezellularisiert) und Gruppe 2 (Knorpel rezellularisiert). Sofern signifikante Unterschiede bestehen, werden diese mittels gestrichelter (Signifikanz zwischen zwei Gruppen innerhalb eines Zeitpunktes) und durchgezogener Linie (Signifikanz zwischen Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe) dargestellt.

5 Ergebnisse

Zur Einführung in die Ergebnisse eignet sich die untenstehende Abbildung (Abb. 16). Hierbei handelt es sich um Zusammenstellung der Movat-Pentachrome-Übersichtsfärbung der jeweiligen Gruppen zu jeweils beiden Zeitpunkten. In Anlehnung an Tabelle 4 lässt sich somit ein erster visueller Eindruck der Einheilungstendenzen der jeweiligen Präparate gewinnen.

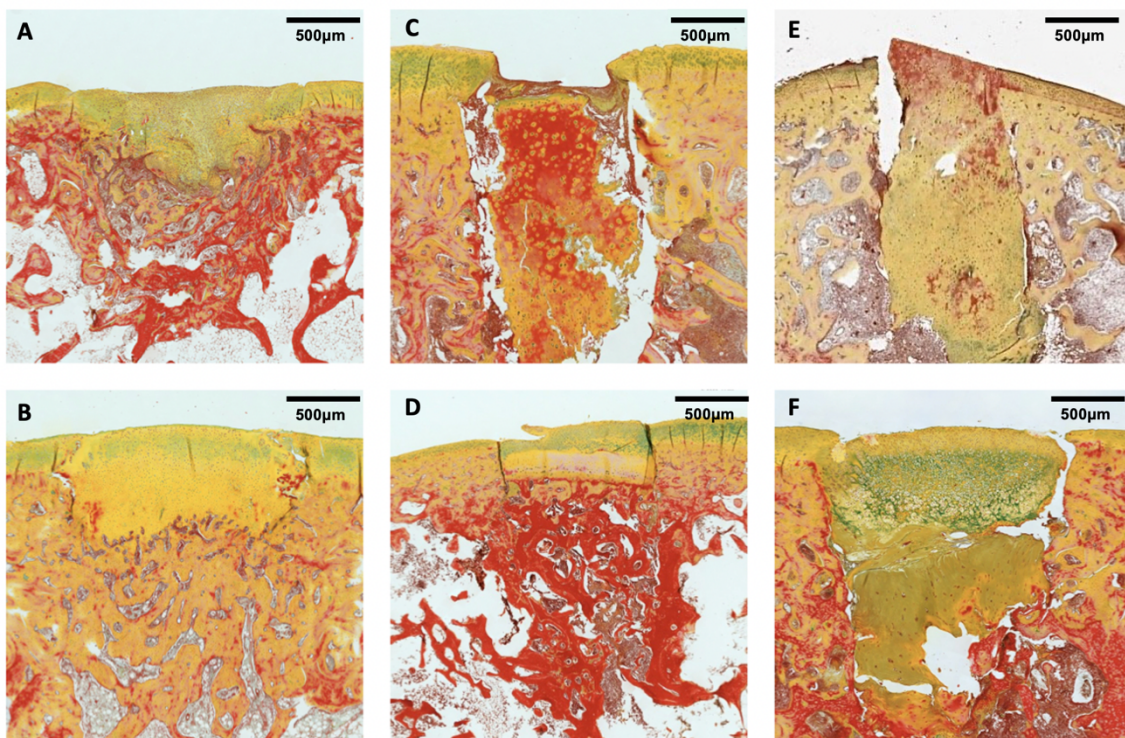


Abbildung 16 : Ergebnisse der Movat-Pentachrome-Färbung. In Anlehnung an das in Tabelle 4 hinterlegte Färberegebnis stellen sich die verschiedenen Präparate aufgrund der unterschiedlichen Zeitpunkte und Gruppenzuordnung folgendermaßen dar:

A: Leerdefekt, Standzeit 4 Wochen. **B:** Leerdefekt, Standzeit 12 Wochen.

C: Knorpel dezellularisiert, Standzeit 4 Wochen. **D:** Knorpel dezellularisiert, Standzeit 12 Wochen.

E: Knorpel rezellularisiert, Standzeit 4 Wochen. **F:** Knorpel rezellularisiert, Standzeit 12 Wochen.

5.1 Geringere Ossifikation durch dezellularisierte Transplantate

Auf histologischer Ebene ist der prozentuale Anteil gemeint, welcher sich innerhalb der gesamten ROI (region of interest) im Rahmen der Übersichtsfärbung als mineralisierter Knochen darstellte. Allgemein ist eine erhöhte Ossifikationsrate innerhalb der Kontrollgruppe und der rezellularisierten Gruppe zu jeweils beiden Zeitpunkten auffällig. Der Höchstwert liegt nach 4 Wochen bei 70,04% im Leerdefekt. Die geringste Verknöcherung ist in der dezellularisierten Gruppe zum Zeitpunkt 1 (4 Wochen) mit 40,72% und zum Zeitpunkt 2 (12 Wochen) mit 43,13% erkennbar. Hierbei besteht mit $p=0,002$ ein signifikanter Unterschied.

Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der statischen Auswertung der Verknöcherung (TOT).

TP	Gruppenart		Minimum	Maximum	Mittelwert	Std.-Abweichung
1	dezellularisiert	TOT in %	12,03	72,23	40,7200	19,78251
	rezellularisiert	TOT in %	16,97	90,22	58,9308	21,51455
	Leerdefekt	TOT in %	48,73	95,46	70,0362	12,72495
2	dezellularisiert	TOT in %	14,70	91,28	43,1322	22,36888
	rezellularisiert	TOT in %	13,67	82,70	47,6791	24,38750
	Leerdefekt	TOT in %	19,75	91,62	47,1253	23,02132

Eine nennenswerte Signifikanz besteht auch zwischen der Kontrollgruppe und der rezellularisierten Gruppe nach 4 Wochen mit $p=0,002$. Eine annähernd gleiche Verknöcherung nach 12 Wochen weist die Kontrollgruppe (47,13%) und die rezellularisierte Gruppe (47,68%) auf. Eine stabile Ossifikation ist auch nach 4 Wochen mit 58,93% innerhalb der rezellularisierten Gruppe erkennbar.

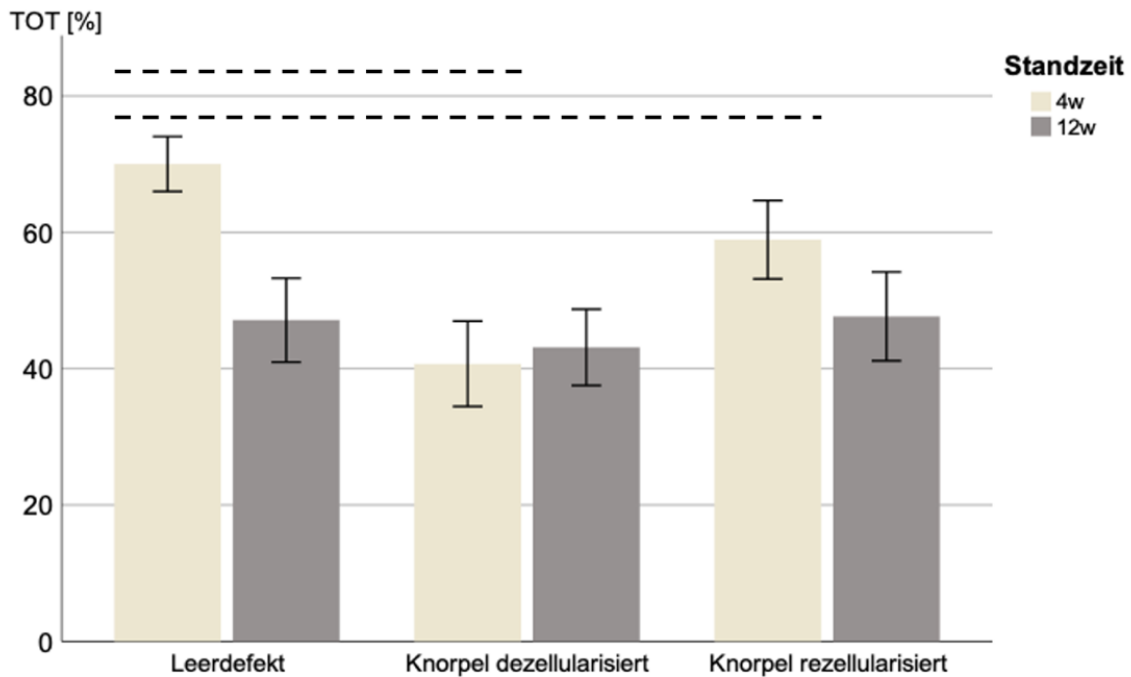


Abbildung 17: Erhöhte TOT-Anteile durch rezellularisierte Transplantate. Nach 4 Wochen ist die Verknöcherung in der Leerdefekt-Kontrollgruppe am höchsten (70,04%), wohingegen nach 12 Wochen der Höchstwert in der rezellularisierten Gruppe (47,68%) vorliegt. Die gestrichelte Linie beschreibt einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen innerhalb eines Zeitpunktes. Signifikanz besteht zwischen der Kontrollgruppe (Leerdefekt) und der Gruppe „Knorpel dezellularisiert“, sowie zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe „Knorpel rezellularisiert“ jeweils nach 4 Wochen mit $p=0,002$.

5.2 Hohe Osteocalcinsynthese durch dezellularisierte Transplantate

Als weiteres Maß für die Bewertung und Einordnung der anabolen Vorgänge wurde der Osteocalcingehalt mithilfe der gleichnamigen Färbung und Histomorphometrie untersucht. Die höchste Osteocalcinsynthese ist in der „dezellularisierten“ Gruppe mit 5,25% (4 Wochen) und 5,60% (12 Wochen) zu verzeichnen. In der „rezellularisierten“ Gruppe ist ein Osteocalcinwert von 4,06% nach 4 Wochen und 5,14% nach 12 Wochen ermittelt worden. Der geringste Anteil ist in der Kontrollgruppe mit 1,43% nach 4 Wochen und 3,48% nach 12 Wochen ermittelt worden.

Tabelle 6: Statische Auswertung der Osteocalcin-Färbung

TP	Gruppenart		Minimum	Maximum	Mittelwert	Std.-Abweichung
1	dezellularisiert	Osteocalcin positiv in %	,47	13,43	5,2418	4,45414
	rezellularisiert	Osteocalcin positiv in %	,18	12,16	4,0615	4,19180
	Leerdefekt	Osteocalcin positiv in %	,11	3,32	1,4273	1,14642
2	dezellularisiert	Osteocalcin positiv in %	,33	17,96	5,6015	4,70292
	rezellularisiert	Osteocalcin positiv in %	,16	22,45	5,1359	6,94811
	Leerdefekt	Osteocalcin positiv in %	,27	8,98	3,4794	2,89887

Signifikante Unterschiede sind nach 4 Wochen zwischen der Kontrollgruppe und der „dezellularisierten“ Gruppe mit $p=0,009$ und zwischen der Kontrollgruppe und der „rezellularisierten“ Gruppe mit $p=0,007$ ermittelt worden. Allgemein lässt sich eine erhöhte Osteocalcinsynthese durch dezellularisierte Transplantate festhalten.

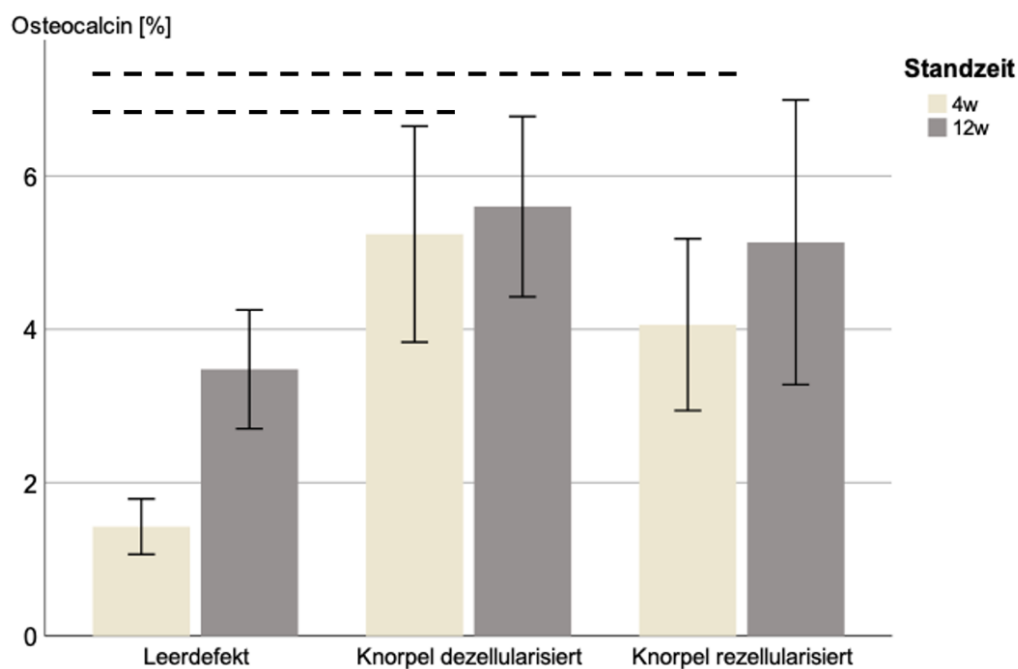


Abbildung 18: Hoher Osteocalcinanteil durch dezellularisierte Transplantate. Mit 5,6% nach 12 Wochen und 5,24% nach 4 Wochen finden sich in der dezellularisierten Gruppe die Höchstwerte. Die gestrichelte Linie beschreibt einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen innerhalb eines Zeitpunktes. Signifikanz ist mit $p=0,009$ zwischen der Kontrollgruppe und der „dezellularisierten“ Gruppe beschrieben. Ein weiterer signifikanter Unterschied konnte zwischen der Kontrollgruppe und der „rezellularisierten“ Gruppe mit $p=0,007$ ermittelt werden.

5.3 Geringe Osteoklastenaktivität bei dezellularisierten Xenografts

Die Gesamtlänge verhält sich analog zur Osteoklastenanzahl und wird im Folgenden zusammen betrachtet (Abb. 19).

Es lässt sich festhalten, dass die größte Resorptionsoberfläche die Kontrollgruppe mit 511,3µm und 16 Osteoklasten nach 12 Wochen aufweist. Nach 4 Wochen ist hingegen eine sehr geringe Gesamtlänge von 29,99µm und einem Osteoklasten zu verzeichnen. Auffällig in der „dezellularisierten“ Gruppe ist, dass nach 12 Wochen keine Resorption erkennbar war. Nach 4 Wochen weist diese Gruppe eine Resorptionslänge von 264,5µm und 4 Osteoklasten auf. In der „rezellularisierten“ Gruppe ist zu beiden Zeitpunkten eine Resorption erkennbar: nach 4 Wochen Standzeit bilden 15 Osteoklasten eine gesamte Resorptionsoberfläche von 505,1µm, wobei nach 12 Wochen eine Oberfläche von 209,1µm durch 5 Osteoklasten gebildet wird.

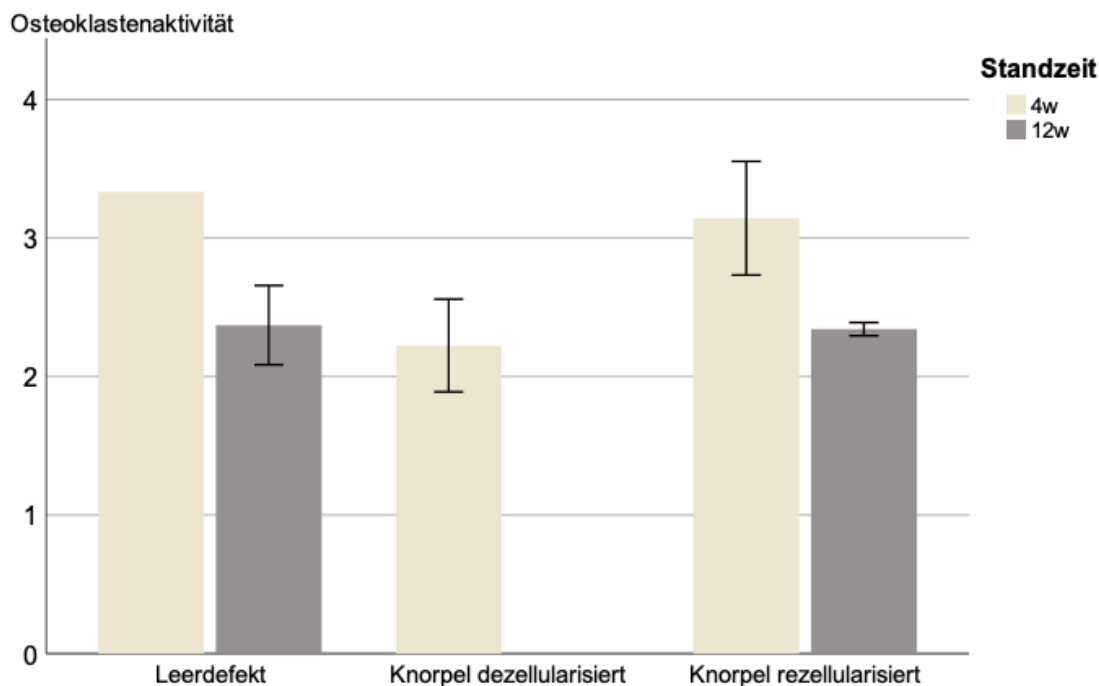


Abbildung 19: Hohe Osteoklastenaktivität innerhalb der rezellularisierten Gruppe. Dargestellt ist die osteoklastäre Aktivität. Nach 4 Wochen ist im Vergleich zu 12 Wochen jeweils eine erhöhte Osteoklastenaktivität erkennbar, zumal nach 12 Wochen in der dezellularisierten Gruppe kein Osteoklast und somit keine Aktivität festgestellt werden konnte.

Die Abbildung 19 zeigt das Verhältnis von Länge und Anzahl zueinander. Die höchste osteoklastäre Aktivität weist die Kontrollgruppe nach 4 Wochen mit 3,33 und nach 12 Wochen mit 2,37 auf. Mit 3,14 nach 4 Wochen und 2,34 nach 12 Wochen zeigt die „rezellularisierte“ Gruppe einen ähnlichen, jedoch leicht verringerten Aktivitätszustand im Vergleich zur Kontrollgruppe. Den geringsten Aktivitätszustand weist die „dezellularisierte“ Gruppe auf. Nach 4 Wochen wird eine Aktivität von 2,22 und nach 12 Wochen eine Inaktivität beobachtet.

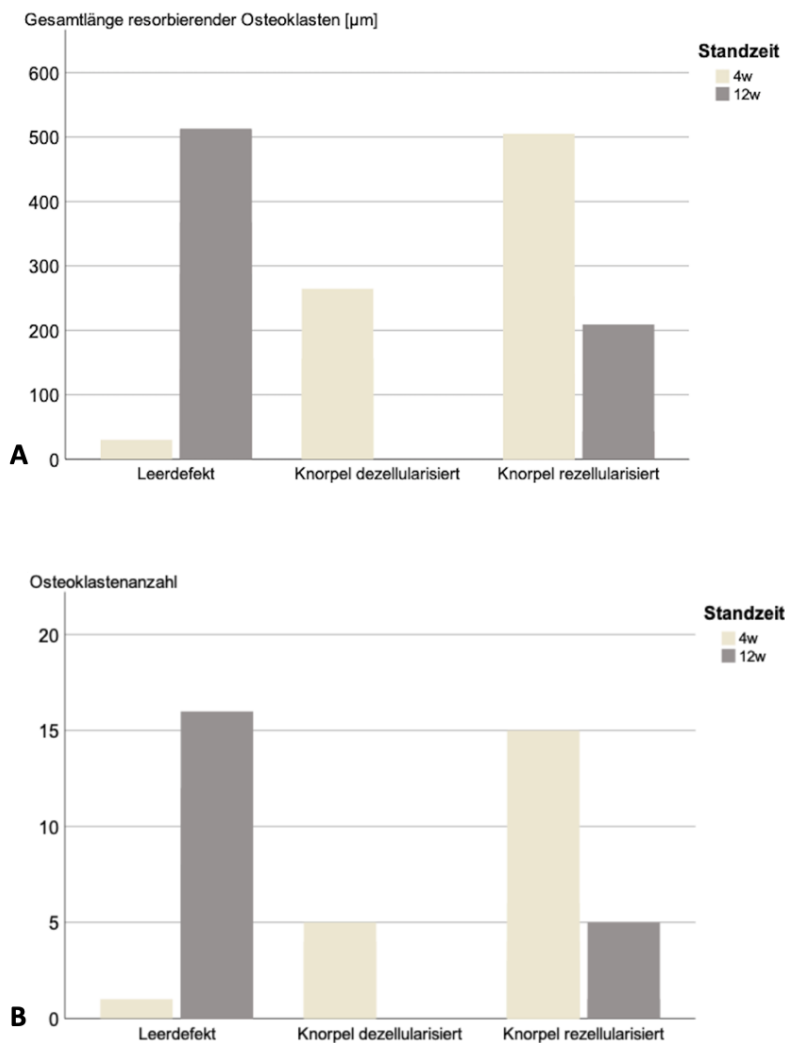


Abbildung 20: Hohe Resorptionsoberfläche und Osteoklastenanzahl innerhalb der rezellularisierten Gruppe. Da es sich hier um Absolutwerte und nicht um Mittelwerte handelt, entfallen die Fehlerbalken. Zu A: Der Höchstwert liegt nach 4 Wochen in der „rezellularisierten“ Gruppe mit (505,1 μm), wohingegen nach 12 Wochen die Kontrollgruppe mit 511,3 μm den Spitzenwert darstellt. Auffällig ist, dass nach 12 Wochen keine Osteoklasten und somit auch keine Resorptionsfläche erkennbar war. Zu B: Die Werte verhalten sich analog zu A. Erkennbar ist die hohe Osteoklastenanzahl (16) nach 4 Wochen in der „rezellularisierten“ Gruppe.

5.4 Hoher Vaskularisierungsgrad nach 4 Wochen nachweisbar

Die katabole und anabole Analyse findet in der Vaskularisation einen gemeinsamen Nenner. Beide Stoffwechselprozesse sind auf eine adäquate Nährstoffversorgung angewiesen. Hierbei hat die ASMA-Färbung eine grundlegende Aussagekraft inne, welche in nachfolgender Abbildung (Abb. 20) grafisch dargestellt wird.

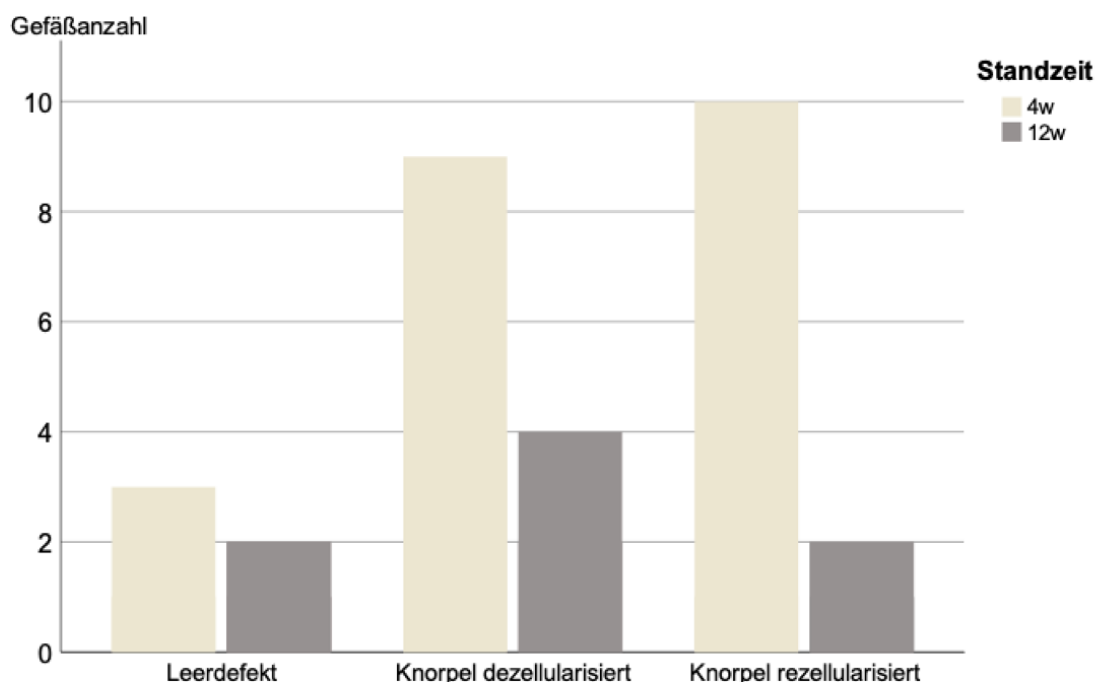


Abbildung 19: Hohe Vaskularisierung innerhalb der dezellulierten Gruppe in beiden Zeitpunkten. Da es sich hier um Absolutwerte und nicht um Mittelwerte handelt, entfallen die Fehlerbalken. Eine erhöhte Vaskularisation findet sich in jeder Gruppe nach 4 Wochen. Nach 12 Wochen ist der Vaskularisationsgrad jeweils geringer. Die höchste Gefäßanzahl weist die „rezellularisierte“ Gruppe nach 4 Wochen mit 10 Gefäßen auf. Nach 12 Wochen ist der Höchstwert mit 4 Gefäßen in der „dezellulierten“ Gruppe feststellbar. Mit jeweils 2 Gefäßen ist in der Kontrollgruppe und in der „rezellularisierten“ Gruppe nach 12 Wochen die geringste Gefäßanzahl beschrieben.

Die höchste Gefäßanzahl weist die „rezellularisierte“ Gruppe nach 4 Wochen mit 10 angefärbten Gefäßen, gefolgt von der „dezellulierten“ Gruppe mit 9 Gefäßen und der Kontrollgruppe mit 3 Gefäßen, auf. Nach 12 Wochen halten sich die Kontrollgruppe und die „rezellularisierte“ Gruppe mit 2 Gefäßen die Waage, wobei nach 12 Wochen in der „dezellulierten“ Gruppe mit 4 Gefäßen doppelt so viele vorliegen.

Tabelle 7: Statische Auswertung der ASMA-Färbung

TP	Gruppenart		Minimum	Maximum	Mittelwert	Std.-Abweichung
1	dezellularisiert	Gefäßanzahl	0	9	2,60	3,975
	rezellularisiert	Gefäßanzahl	0	10	1,57	3,735
	Leerdefekt	Gefäßanzahl	0	3	,80	1,304
2	dezellularisiert	Gefäßanzahl	0	4	,75	1,488
	rezellularisiert	Gefäßanzahl	0	2	,86	,900
	Leerdefekt	Gefäßanzahl	0	2	1,14	,900

5.5 Extrazellulärmatrrix

Die Extrazellulärmatrrix ist ein wesentlicher Baustein der Integrität des Knochengewebes und wird aufgrund dessen gesondert betrachtet. Hierbei wird die Osteoidproduktion, die Knorpelsynthese und der nicht mineralisierte Anteil betrachtet.

5.5.1 Hoher Osteoidanteil durch dezellularisierte Transplantate

Der prozentuale Anteil des Osteoids ist nach 4 Wochen in der Kontrollgruppe mit 22,06% am niedrigsten, wobei nach 12 Wochen ein erhöhter Anteil mit 42,53% ermittelt wurde. Auffällig ist, dass zu beiden Zeitpunkten in der „dezellularisierten“ Gruppe ein annähernd gleicher Wert auftritt: nach 4 Wochen 41,28% und nach 12 Wochen 41,66%. In der „rezellularisierten“ Gruppe liegt nach 4 Wochen ein Osteoidanteil von 28,89% und nach 12 Wochen ein prozentualer Anteil von 39,53% vor.

Tabelle 8: Statische Auswertung der Osteoid-Färbung.

TP	Gruppenart		Minimum	Maximum	Mittelwert	Std.-Abweichung
1	dezellularisiert	Osteoid in %	18,19	58,56	41,2804	12,82350
	rezellularisiert	Osteoid in %	7,13	59,62	28,8931	14,78980
	Leerdefekt	Osteoid in %	2,05	37,05	22,0564	10,32435
2	dezellularisiert	Osteoid in %	2,91	73,06	41,6635	19,84889
	rezellularisiert	Osteoid in %	12,82	66,56	39,5345	18,09805
	Leerdefekt	Osteoid in %	5,63	66,82	42,5340	20,09340

Nach 4 Wochen bestehen signifikante Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der „dezellularisierten“ Gruppe mit $p=0,003$, zwischen der Kontrollgruppe und der „rezellularisierten“ Gruppe mit $p=0,034$ und zwischen der „dezellularisierten“ und „rezellularisierten“ Gruppe mit $p=0,036$. Innerhalb der „dezellularisierten“ Gruppe ist eine Signifikanz mit $p=0,008$ festzuhalten. Auch in der „rezellularisierten“ Gruppe ist mit $p=0,009$ ein signifikanter Unterschied feststellbar.

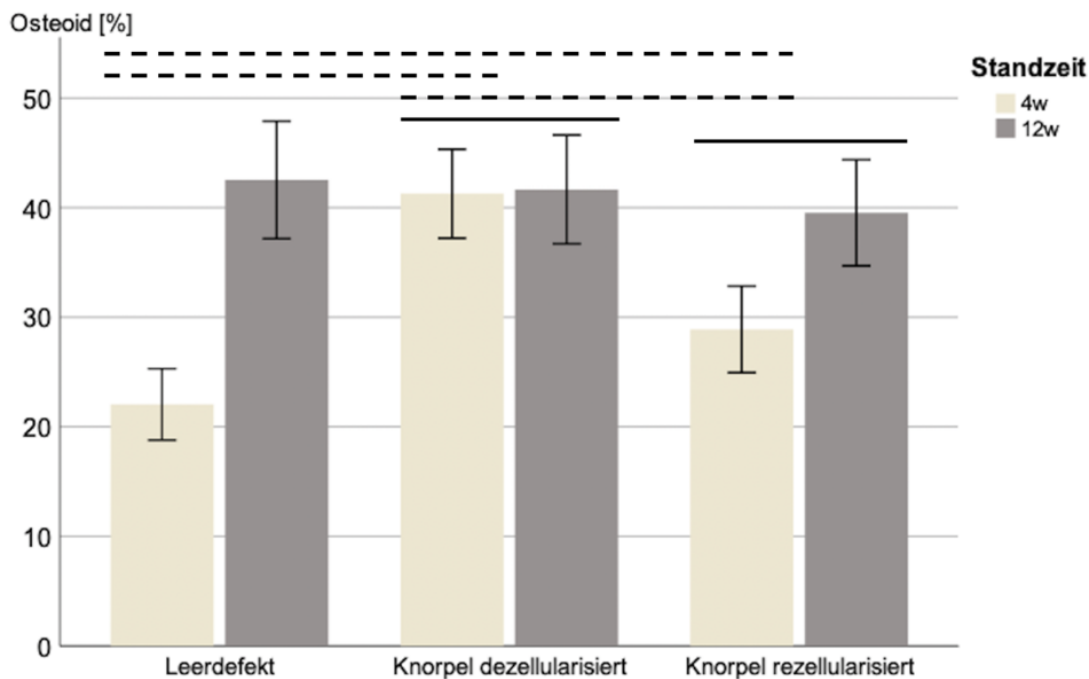


Abbildung 20: Grafische Darstellung der prozentualen Anteile an Osteoid innerhalb der jeweiligen Gruppe. Der höchste (nach 12 Wochen, 42,53%) und der niedrigste (nach 4 Wochen, 22,06%) Osteoidgehalt ist in Kontrollgruppe erkennbar. Die gestrichelte Linie beschreibt einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen innerhalb eines Zeitpunktes, wobei die durchgezogene Linie einen signifikanten Unterschied innerhalb einer Gruppe zwischen zwei Zeitpunkten symbolisiert. Mit $p=0,003$ besteht ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der „dezellularisierten“ Gruppe nach 4 Wochen. Zwischen der Kontrollgruppe und der „rezellularisierten“ Gruppe wurde mit $p=0,034$ und zwischen der „dezellularisierten“ und „rezellularisierten“ Gruppe mit $p=0,036$ Signifikanz nachgewiesen. Innerhalb der „dezellularisierten“ Gruppe ist eine Signifikanz mit $p=0,008$ festzuhalten. Auch in der „rezellularisierten“ Gruppe ist mit $p=0,04$ ein signifikanter Unterschied feststellbar.

5.5.2 Solide Chondrogenese innerhalb der dezellularisierten Gruppe

Die Knorpelsynthese war zu jedem Zeitpunkt innerhalb jeder Gruppe gegeben. Nach 4 Wochen ist die höchste Knorpelproduktion in der „dezellularisierten“ Gruppe mit 18,00%, wohingegen nach 12 Wochen ein mit 15,20% reduzierter Knorpelanteil feststellbar war. Die „rezellularisierte“ Gruppe stellt mit 12,18% nach 4 Wochen und 12,79% nach 12 Wochen eine moderate Knorpelsynthese dar. Den geringsten Anteil lässt sich innerhalb der Kontrollgruppe nach 4 Wochen mit 7,9% und mit 10,34% nach 12 Wochen erkennen.

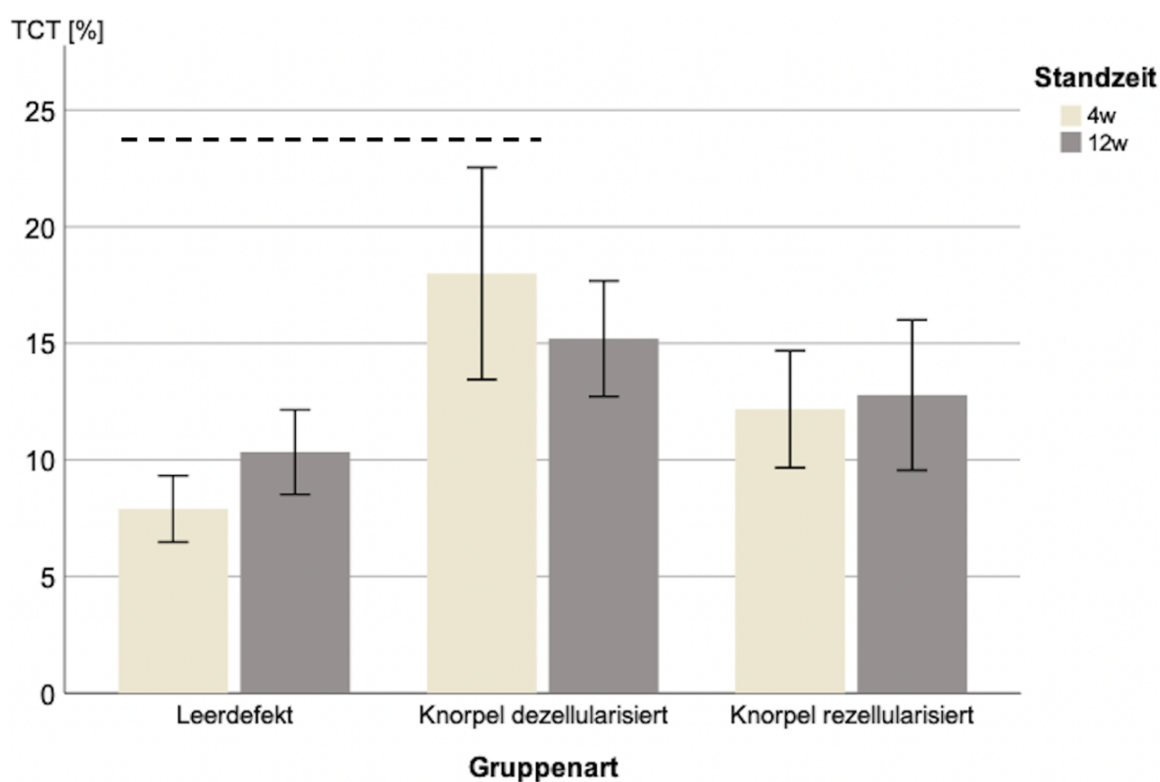


Abbildung 21: Erhöhte Knorpelsynthese innerhalb der dezellularisierten Gruppe. TCT: total cartilage tissue. Die gestrichelte Linie beschreibt einen signifikanten Unterschied nach 4 Wochen zwischen der Kontrollgruppe und der „dezellularisierten“ mit $p=0,035$. Nach 12 Wochen konnte kein signifikanter Unterschied gefunden werden. Der höchste Knorpelanteil ist nach 4 Wochen in der „dezellularisierten“ Gruppe mit 18% erkennbar. Der niedrigste Wert mit 7,9% liegt in der Kontrollgruppe 4 Wochen vor.

Einen signifikanten Unterschied lässt sich $p=0,035$ nach 4 Wochen zwischen der Kontrollgruppe und der dezellularisierten Gruppe festhalten.

Tabelle 9: Statische Auswertung der Chondrogenese.

TP	Gruppenart		Minimum	Maximum	Mittelwert	Std.-Abweichung
1	dezellularisiert	TCT in %	7,51	53,57	17,9996	14,38610
	rezellularisiert	TCT in %	1,45	27,02	12,1761	9,39561
	Leerdekt	TCT in %	1,92	14,23	7,9041	4,52016
2	dezellularisiert	TCT in %	1,60	42,39	15,2018	9,89988
	rezellularisiert	TCT in %	3,43	45,44	12,7864	12,04878
	Leerdekt	TCT in %	2,75	22,35	10,3407	6,78364

5.5.3 Dezellularisierte Xenografts zeigten die geringste Mineralisation

Areale, welche aufgrund des Färbeergebnisses innerhalb der Movat-Pentachrome-Färbung „als nicht mineralisiert“ bewertet wurden, sind in nachfolgender Abbildung grafisch dargestellt.

Tabelle 10: Statische Auswertung der nicht mineralisierten Anteile.

TP	Gruppenart		Minimum	Maximum	Mittelwert	Std.-Abweichung
1	dezellularisiert	nicht mineralisiert in %	27,77	87,97	59,2800	19,78251
	rezellularisiert	nicht mineralisiert in %	9,78	83,03	41,0692	21,51455
	Leerdekt	nicht mineralisiert in %	4,54	51,27	29,9605	12,72297
2	dezellularisiert	nicht mineralisiert in %	8,72	85,30	56,8653	22,37324
	rezellularisiert	nicht mineralisiert in %	17,30	86,33	52,3209	24,38750
	Leerdekt	nicht mineralisiert in %	8,38	80,25	52,8747	23,02132

Der höchste Anteil an nicht mineralisiertem Gewebe ist jeweils zu beiden Zeitpunkten (4 Wochen 59,28%, 12 Wochen 56,87%) in der „dezellularisierten“ Gruppe zu finden. Innerhalb der Kontrollgruppe liegt mit 29,96% nach 4 Wochen der geringste Anteil an nicht mineralisiertem Gewebe vor. Auf etwa gleicher Ebene befindet sich die Kontrollgruppe mit 52,87% und die „rezellularisierte“ Gruppe mit 52,32% nach 12 Wochen. Nach 4

Wochen zeigt sich innerhalb der „rezellularisierten“ Gruppe mit 41,07% nicht mineralisierte Areale. Signifikante Unterschiede bestehen jeweils nach 4 Wochen zwischen der Kontrollgruppe und der „dezellularisierten“ Gruppe mit $p=0,002$ und zwischen dem Leerdefekt und der „rezellularisierten“ Gruppe mit $p=0,04$.

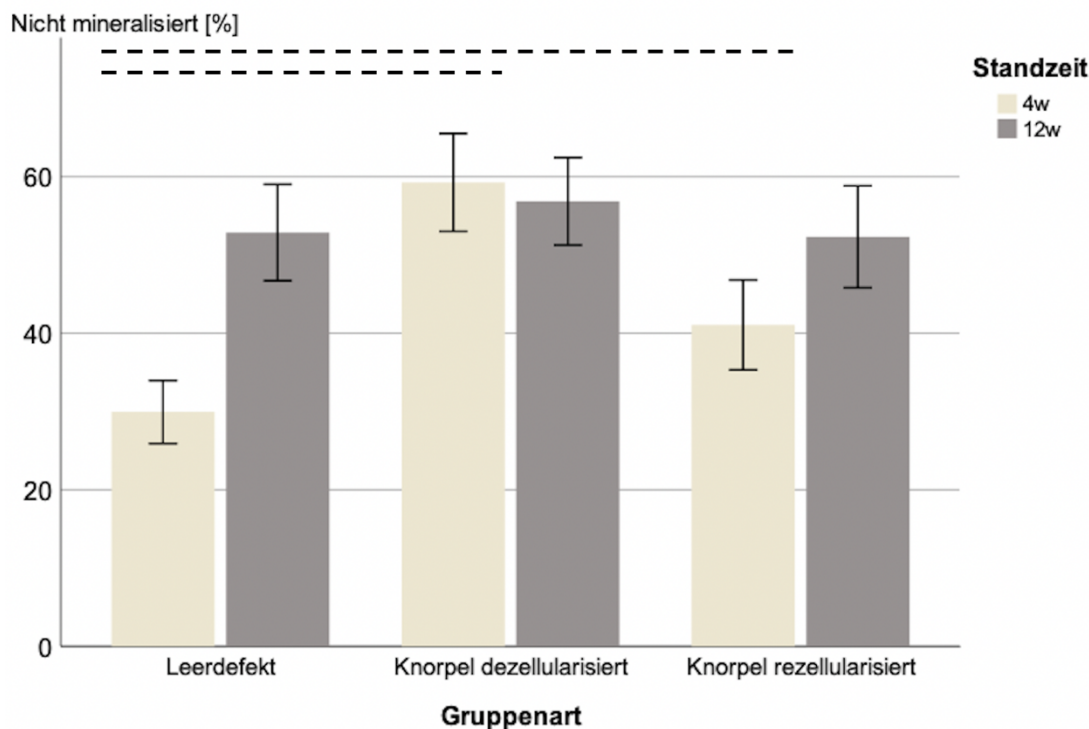


Abbildung 22: Hoher Anteil nicht mineralisierter Substanz innerhalb der dezellularisierten Gruppe. Die gestrichelte Linie beschreibt einen signifikanten Unterschied zwischen zwei Gruppen innerhalb eines Zeitpunktes. Ein erhöhten Anteil nicht mineralisierter Substanz weist die „dezellularisierte“ Gruppe mit 59,28% nach 4 Wochen und 56,87% nach 12 Wochen auf. Den niedrigsten Wert bildet die Kontrollgruppe nach 4 Wochen mit 29,96%. Signifikanz besteht zwischen der Kontrollgruppe und der „dezellularisierten“ ($p=0,002$) und der „rezellularisierten“ Gruppe ($p=0,04$) jeweils nach 4 Wochen.

5.6 Deskriptive Beurteilung der Transplantateinheilung

In der Kontrollgruppe zeigten sich in 83,3% (n=10) der Fälle eine beidseitige Integration des Xenografts in das umliegende Gewebe. In zwei Fällen (16,7%) war eine einseitige Integration erkennbar. Die dezellularisierte Xenografts waren zu 7,7% (n=1) vollständig in die Umgebung integriert. Eine einseitige Verbindung zeigte sich in 30,8% (n=4) der untersuchten Präparate, in 23,1% (n=3) eine vereinzelte Integration, wohingegen in 5 Präparaten (38,5%) keine Gewebeintegration erkennbar war. Die rezellularisierten Transplantate zeigten zu 28,6% (n=4) keine Integration. In 50% (n=7) der Fälle konnten vereinzelte Verbindungen zwischen Xenograft und umliegendem Gewebe histologisch nachgewiesen werden. In zwei Präparaten (14,3%) zeigte sich eine einseitige Integration, wohingegen in einem Präparat (7,1%) eine beidseitige Gewebeintegration erkennbar war.

Tabelle 11: Gewebeintegration

Gruppenart		Häufigkeit	Prozent
Knorpel dezellularisiert	,00	5	38,5
	1,00	3	23,1
	2,00	4	30,8
	3,00	1	7,7
	Gesamt	13	100,0
Knorpel rezellularisiert	,00	4	28,6
	1,00	7	50,0
	2,00	2	14,3
	3,00	1	7,1
	Gesamt	14	100,0
Leerdefekt	2,00	2	16,7
	3,00	10	83,3
	Gesamt	12	100,0

6 Diskussion

Die Medizin unterliegt einem stetigen Wandel und muss sich immer mehr den Bedürfnissen, Anforderungen und Erwartungshaltungen der modernen Gesellschaft anpassen. Chirurgische Rekonstruktionen von Hart- und Weichgewebsdefekten stellen seit geraumer Zeit ein zentrales Element der Human- und Zahnmedizin dar [70, 94, 116]. Weiterhin, spielt die ästhetische Rekonstruktion, aufgrund moderner Schönheitsideale und der Wert der Patientenzufriedenheit einen erheblichen Part im Rahmen der gesamten Patientenversorgung [94]. Nichtsdestotrotz steht die funktionelle Rehabilitation im Vordergrund der chirurgischen Versorgung. Daher stellt die Therapie von ossären Defekten durch biodegradierbare Transplantate eine biomechanische Herausforderung dar. Hierbei soll die strukturelle und biomechanische Stabilität solange erhalten bleiben, bis der Organismus eigenständig die Resorptions- und Umbauvorgänge übernehmen kann [48]. Daher wurden die Konzepte der osteokonduktiven, osteogenen und osteoinduktiven Materialien untersucht, um einen optimalen Therapieansatz zu finden.

Zielsetzung dieser Studie war die Beurteilung und Optimierung der Einheilungsprozesse von humanen Rippenknorpeltransplantaten zur Rekonstruktion von Knorpel- bzw. Knochendefekten zu untersuchen. Das hierbei verwendete Kaninchenmodell ermöglichte eine frühfunktionelle Belastung und Untersuchung der de- bzw. rezellularisierten, xenogenen (humanen) Rippenknorpeltransplantate. Dem Studiendesign standen drei verschiedene Gruppen (Leerdefekt, dezellularisierte Transplantate und rezellularisierte Transplantate) zu zwei verschiedenen Zeitpunkte (Zeitpunkt 1= 4 Wochen, Zeitpunkt 2 = 12 Wochen) zur Analyse und Bewertung zur Verfügung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation zeigen innerhalb der Kontrollgruppe und der rezellularisierten Gruppe eine erhöhte Ossifikationsrate, aber auch eine geringere Osteoidsynthese und verringerte Knorpelbildung auf. Eine befriedigende Knorpelsynthese und geringe Anteile von mineralisiertem Gewebe konnte in der dezellularisierten Gruppe nachgewiesen werden.

6.1 Verknöcherung als Maß der Osseointegration der Implantate

Zur Bewertung der Osseointegration der Rippenknorpeltransplantate ist die Betrachtung der Verknöcherung, aber auch die Bewertung der Extrazellulärmatrix von Nöten. In der vorliegenden Dissertation wurde die EZM durch die Betrachtung der nicht mineralisierten Areale, sowie den Knorpel- und Osteoidanteil analysiert. Dazu wurden alle Anteile, die sich in der MPC-Färbung als grün, dunkelrot und hellblau darstellten, zusammengefasst betrachtet und analysiert. Histologisch konnte in der dezellularisierten Gruppe bereits nach 4 Wochen vereinzelt eine Osseointegration nachgewiesen werden. Nach 12 Wochen waren die dezellularisierten Xenografts nahezu vollständig in das Restgewebe integriert, jedoch zeigte sich eine geringe Ossifikation zu beiden Zeitpunkten. Ergänzend hierzu zeigte sich auch jeweils zu beiden Zeitpunkten der höchste Anteil nicht mineralisierter Substanz und Osteoid in der dezellularisierten Gruppe. Eine gleichmäßige Trabekelstruktur war nicht vorhanden, wobei in Anbetracht der Untersuchungszeitpunkte (4, 12 Wochen) noch nicht mit einem vollständigen Remodeling zu rechnen ist. Rudolph et. al untersuchten die Einheilung von transplantiertem, autologem und homologem Rippenknorpel in geschädigten Epiphysenfugen der Femurkondyli im Kaninchenmodell. Es konnte gezeigt werden, dass vollständig mineralisierte Knochenareale in das Transplantat hineinreichten [101]. Darüber hinaus konnte Lane et. al im Schafsmodell mithilfe osteochondraler Transplantationen eine Osseointegration dieser belegen [68, 69]. Dieser Sachverhalt untermauert die Integration der hier verwendeten Xenografts in das umliegende Gewebe, zeigt aber auch gleichzeitig, dass eine vollständige Ossifikation ausbleibt. Aufgrund des unterschiedlichen Tiermodells und des unterschiedlichen Transplantattypes in den o.g. Studien sind die Ergebnisse nur bedingt auf die vorliegende Dissertation übertragbar.

Sowohl die Kontrollgruppe als auch die rezellularisierte Gruppe wiesen einen erhöhten Ossifikationsgrad sowie eine erhöhte Osteoklastenaktivität auf. Damit verbunden konnten auch, im Vergleich zur dezellularisierten Gruppe, verringerte Anteile an nicht mineralisierter Substanz und Osteoid beschrieben werden. Nakaruma et. al konnten im Rattenmodell eine erhöhte Ossifikation durch MSC-Transplantation aufzeigen. Hierzu wurde jeweils ein Frakturspalt durch Osteotomie im Femur simuliert und anschließend kultivierte, mesenchymale Stammzellen dem Osteotomiespalt hinzugegeben; die Kontrollgruppe blieb unbehandelt. Die histologische Auswertung ergab eine effizientere knöcherne Regeneration und Überbrückung des Frakturspalts nach 8 Wochen innerhalb der

MSC-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Obwohl die Kontrollgruppe eine befriedigende Ossifikation aufwies, blieb eine vollständige knöcherne Überbrückung des simulierten Frakturspaltes aus. Es fanden sich lediglich - selbst 8 Wochen postoperativ - Chondrozyten und fibröses Gewebe [84]. Diese Rückschlüsse bestätigen die Resultate dieser Studie, dass rezellularisierte Transplantate durch die Anwesenheit von MSC eine effizientere und geordnetere Ossifikation im Vergleich zu dezellularisierten Transplantaten bewirken. Damit verbunden ist die erhöhte Osteoklastenaktivität der rezellularisierten Gruppe einzuordnen, welche durch die TRAP-Färbung anhand der Osteoklastenzahl und -oberfläche berechnet wurde. Angesichts der benötigten Stoffwechselleistung ist die hohe Gefäßanzahl innerhalb der rezellularisierten Gruppe anzuführen. Die ASMA-Färbung ergab den Maximalwert an histologisch dargestellten Blutgefäßen in der rezellularisierten Gruppe. Deckers et al. berichteten, dass Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen gleichzeitig mit Endothelzellen in Arealen, in denen neuer Knochen gebildet wird, anzutreffen sind [27]. Weiterhin wurde von Street et al. nachgewiesen, dass die Anwesenheit des Angiogenesefaktors VEGF in der terminalen Differenzierungsphase der Osteoblastenreifung stark erhöht ist und damit die Osteoblastendifferenzierung fördert [112].

Osteocalcin – als ein Marker der Osteoblastenaktivität [78] - wird überwiegend durch Osteoblasten und Odontoblasten im Rahmen der Differenzierung sowie während der Matrixmineralisation sezerniert [92]. Interessant ist dahingehend die erhöhte Osteocalcinsynthese in der dezellularisierten Gruppe. Sowohl nach 4 als auch nach 12 Wochen ist hier der höchste Osteocalcinanteil erkennbar. Ducy et. al konnten allerdings nachweisen, dass in Osteocalcin-defizienten Mäusen eine erhöhte Knochenbildung erkennbar war [32]. Außerdem zeigte Komori et. al, dass Osteocalcin nicht die Menge der Osteogenese, sondern lediglich die geometrische Ausrichtung der Apatitkristalle im Rahmen der Knochenbildung reguliert [64]. Die erhöhte Ossifikation innerhalb der rezellularisierten Gruppe und Kontrollgruppe stehen demnach im Einklang mit der verminderten Anwesenheit des Osteocalcins und untermauern dementsprechend, dass dezellularisierte Rippenknorpeltransplantate, verbunden mit einer verstärkten Osteocalcinsynthese, eine verminderte Verknöcherung bewirken. Jedoch belaufen sich die beiden genannten Studien auf das Mausmodell und sind daher nicht vollständig auf die vorliegenden Ergebnisse übertragbar.

6.2 Katabole Prozesse

Die zentrale Funktion der katabolen Stoffwechsellage innerhalb des Knochengewebes wird den Osteoklasten zugeschrieben [25, 43]. Die höchste osteoklastäre Aktivität wurde innerhalb der Kontrollgruppe nach 4 und 12 Wochen verzeichnet. Diese Beobachtung machten auch Kamadjaja et al. im Kaninchenmodell. Sie evaluierten die Osteoklastenaktivität nach Defektfüllung mittels DFDBBX (demineralized freeze-dried bovine bone xenograft) und DBBM (Deproteinized bovine bone mineral). Es zeigte sich in der Kontrollgruppe, zu beiden Zeitpunkten (2 und 4 Wochen) die höchste Osteoklastenaktivität [53]. Untersuchungen von Schell et al. im Hinblick auf die Frakturheilung im Schafmodell beschreiben eine konstante Osteoklastenanzahl im Verlauf der Frakturheilung [106]. Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit nicht beschrieben werden. Nach 12 Wochen ist keine Osteoklastenaktivität innerhalb der dezellularisierten Gruppe zu finden. Jedoch handelt es sich bei Schell et al. um ein anderes Tiermodell und Studiendesign, woraufhin die Beobachtungen nur bedingt vergleichbar sind. In Anbetracht der mit dem Katabolismus notwendigen Vaskularisierung zeigte sich auch eine erhöhte Gefäßanzahl und Osteoklastenaktivität in der rezellularisierten Gruppe. Hierbei ist nach 4 Wochen die größte Anzahl an ASMA-positiven Gefäßen erkennbar. Diese Erkenntnis wird von den Beobachtungen von Cackowski et al. unterstützt. Sie beschreiben, dass Osteoklasten MMP-9 freisetzen, um VEGF aus der kalzifizierten Knorpelmatrix zu lösen und so eine effiziente Angiogenese gewährleisten [14].

Die geringe Osteoklastenaktivität in der dezellularisierten Gruppe lässt vermuten, dass katabole Prozesse durch dezellularisierte Transplantate auf osteoklastärer Ebene reduziert bzw. minimiert werden können.

6.3 Knorpelige Einheilung der Xenografts

In allen drei Gruppen zeigte nach 4 Wochen jeweils nur ein histologisches Präparat eine beginnende knorpelige Einheilung. Eine zufriedenstellende Überbrückung bzw. Einheilung des Transplantates konnte erst 12 Wochen postoperativ festgestellt werden. Dabei war in ca. 75% der Fälle eine rekonstruierte und integrierte Knorpeloberfläche erkennbar. Hierbei zeigte sich gruppenunabhängig im Großteil der histologischen Präparate ein homogener Übergang zwischen der Grundsubstanz und dem Xenograft, wobei hier mit einer

sicheren Einheilung des Transplantates zu rechnen ist. Nach 4 Wochen zeigte sich in der dezellularisierten Gruppe der höchste Anteil an Knorpelgewebe sowie am meisten nicht mineralisiertes Gewebe. Im Kaninchenmodell konnte Nam et al. in der Hälfte der untersuchten histologischen Präparate eine Integration des transplantierten Knorpels (hier: osteochondrale Transplantate) zum angrenzenden Knorpelgewebe nach 12 Wochen feststellen [86]. Eine weitere Untersuchung von Makino et al. zum Einheilungsverhalten osteochondraler Transplantate nach 24 Wochen im Kaninchen ergab eine zufriedenstellende Integration und Adaptation ins umliegende Knorpelgewebe [75]. Auch Untersuchungen am Großtiermodell bekräftigen die in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Ergebnisse. Im Schweinmodell zeigte Harman et al. nach 6 Wochen, 3 und 6 Monaten in 75-100% der untersuchten Fällen eine befriedigende Einheilung der osteochondralen Autografts im medialen Femurkondylus [46].

6.4 Diskussion des Studiendesigns

Die Rippenknorpeltransplantation stellt ein bereits etabliertes Verfahren der Knorpeltransplantation dar. Da es sich beim Einheilungsvorgang um ein multifaktorielles Geschehen handelt, welches eine mechanische Belastung der Xenografts voraussetzt, um aussagekräftige Ergebnisse erzielen zu können, entschied man sich für ein *in vivo* Tiermodell. Ein *in vitro* Experiment hätte diese Rahmenbedingungen zur Untersuchung nicht liefern können. Im hier vorliegenden Kaninchenmodell ist eine frühfunktionelle Belastung und natürliche Integration der Rippenknorpeltransplantate gewährleistet. Weiterhin können Knorpeldefekte von 6mm Durchmesser gesetzt werden, ohne das Tier nachhaltig in seiner Fortbewegung und damit verbundenen Lebensqualität einzuschränken. Wie bereits vorausgegangene Untersuchungen bestätigen, bietet das Kaninchenmodell aufgrund seines Bewegungsapparates gute Bedingungen zur Untersuchung im Hinblick auf Implantateinheilung und -testungen [36, 41, 59, 76, 86].

Eine direkte Übertragung, der durch das Tiermodell gewonnenen Ergebnisse auf den Menschen, sollte allerdings kritisch betrachtet werden, da das Kleintiermodell eine erhöhte Stoffwechselrate und damit verbundene erhöhte Fähigkeit zur Selbstheilung aufzeigt [40].

Die Erstellung der ROI's innerhalb der Leerdefekte stellte sich aufgrund der physiologischen Einheilung als schwierig dar. Im Gegensatz zur gut erkennbaren Defektmarkierung und Implantatgrenzen der de- und rezellularisierten Transplantate war die Grenze der Leerdefekte aufgrund der guten physiologischen Defektheilung nur schwer abgrenzbar. Durch die histologische Fixierung und Bearbeitung der Präparate wurden durch Artefakte die exakte Beurteilung der ROI in wenigen Präparaten erschwert.

Die untersuchten Zeitpunkte beschränken sich auf 4 und 12 Wochen. Um langfristige Einheilungsergebnisse analysieren zu können, wäre eine Ausweitung der Zeiträume in zukünftigen Arbeiten sinnvoll, da das Remodelling bzw. die Knochenreifung bis zu einigen Monaten in Anspruch nehmen kann.

6.5 Ausblick

Die vorliegende Dissertation ermöglicht als Fundament für weitere Arbeiten bzw. klinische Studien einen etwaigen Ausblick im Hinblick auf Biokompatibilität, Gewebeintegration und Einheilungsverhalten der de- bzw. rezellularisierten Rippenknorpeltransplantate. Dennoch sollte beachtet werden, dass in potenziellen klinischen Studien im Menschen mit autologen Rippenknorpeltransplantaten immunologische Reaktion weitestgehend minimiert werden können, was eine bessere Prognose, Akzeptanz und Einheilungsverhalten bedeuten könnte.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass auch größere Defekte (4,1mm Durchmesser) effizient durch Rippenknorpeltransplantate behandelt werden können, wohingegen Dajiang et. al lediglich 2,5mm messende Defekte mit Hilfe der Mosaikplastik therapierten [31]. Somit ist die Grundlage zur Behandlung größerer Defekte in zukünftigen klinischen Studien bzw. Dissertationen gegeben.

Eine umfängliche Betrachtung der Kollagen-Synthese sollte für weitere Untersuchungen angedacht werden, da sowohl die geometrische Darstellung der verschiedenen Kollagen-Typen als auch die Anzahl, Dicke und Länge für eine angemessene Beurteilung der Extrazellulärmatrix unumgänglich sein wird. Außerdem wäre die weiterführende Analyse der alkalischen Phosphatase, als Markerenzym der Osteoblasten, für den Anabolismus sinnvoll. Auch im Hinblick auf die präimplantologisch-oralchirurgische Anwendung sind aufgrund der hier dargestellten, vielversprechenden Untersuchungsergebnisse weiterführende Studien zur Knochenaugmentation bei Kieferkammatrophy, traumatisch und

entzündlich bedingtem Knochenverlust und Knochenhöhlräume durch exkochleierte zystische Raumforderungen erstrebenswert.

6.6 Fazit

In Anbetracht der o.g., formulierten Fragestellungen lässt sich abschließend festhalten, dass durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden konnte, dass sowohl knöcherner als auch knorpelige Rekonstruktionen mit Hilfe von Rippenknorpeltransplantaten möglich sind. Die dezellularisierten Rippenknorpeltransplantate zeigen zu jeweils beiden Zeitpunkten wenig mineralisiertes Gewebe und eine befriedigende Knorpelsynthese. Aufgrund dessen lässt sich ableiten, dass dezellularisierte Rippenknorpeltransplantate eine vielversprechende Alternative zu den bereits etablierten Rekonstruktionsmaterialien darstellen.

Die Bewertung der Optimierung des Einheilungspotenzials durch rezellularisierte Transplantate bedarf einer ambivalenten Betrachtung. Zum einen zeigte sich eine erhöhte Ossifikation innerhalb der rezellularisierten Gruppe, welche im Hinblick auf die Osteoinduktivität vielversprechendere Ergebnisse liefern konnte als die dezellularisierten Transplantate. Zum anderen konnte dargelegt werden, dass die rezellularisierte Gruppe weniger Matrixbestandteile wie Osteoid und Knorpel aufwies. Dahingehend kann man schlussfolgern, dass rezellularisierte Rippenknorpeltransplantate für die Behandlung umschriebener knöcherner Defekte in Frage kommen. Auch die erfolgreiche Optimierung der Transplantate durch mesenchymale Stammzellen im Hinblick auf eine effizientere Ossifikation konnte bestätigt werden.

7 Zusammenfassung

Eine tragende Säule innerhalb der Human- und Zahnmedizin bildet die Wiederherstellung der Gewebeintegrität und Rekonstruktionen von Weich- und Hartgewebe, welche u.a. durch Traumata, Tumore, Entzündungen und Fehlbildungen verursacht werden. Neben zufriedenstellenden ästhetischen Aspekten fordert die moderne Gesellschaft unkomplizierte, nachhaltige und effektive Behandlungskonzepte mit geringer Entnahmemorbidity. Humaner Rippenknorpel stellt, neben seiner ausreichenden Verfügbarkeit, eine komplikationsarme Entnahmemöglichkeit dar. Die zentralen Aspekte dieser Arbeit waren die Bewertung der Optimierung von Rippenknorpeltransplantaten mit humanen Stammzellen und die Analyse der Einheilungstendenz der Xenografts zu untersuchen.

Im Rahmen dieser Studie wurde die Einheilung humanen Rippenknorpels als Xenograft im Kaninchenmodell in Bezug auf Verknöcherung, Chondrogenese und etwaige Optimierung durch humane Stammzellen analysiert. Hierzu wurden standardisierte Defekte im Knie gesetzt und humaner Rippenknorpel transplantiert. Dabei wurden insgesamt 22 Versuchstiere zweizeitig operiert, um so die Anzahl möglichst gering zu halten. Drei Gruppen standen der Analyse zur Verfügung: Kontrollgruppe bzw. Leerdefekte, eine Gruppe, welche mit dezellularisiertem Rippenknorpel versorgt wurde, und eine Gruppe, welche mit rezellularisierten Rippenknorpeltransplantaten behandelt wurde.

Die rezellularisierten Transplantate weisen eine erhöhte Ossifikationsrate ($p=0,002$) und eine verminderte Osteoidsynthese ($p=0,034$) auf. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Knorpelsynthese innerhalb der dezellularisierte Gruppe, im Vergleich zur Kontrollgruppe, signifikant erhöht ist ($p=0,035$).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass rezellularisierte Rippenknorpeltransplantate zur Versorgung von kleineren knöchernen Defekten verwendet werden können. Auch zeigte sich eine Optimierung mit Hilfe mesenchymaler Stammzellen im Hinblick auf eine effizientere Verknöcherung. Weiterhin stellen dezellularisierte Rippenknorpeltransplantate eine Möglichkeit zu den bereits klinisch etablierten autologen Rekonstruktionsverfahren im Hinblick auf eine befriedigende Knorpelsynthese dar.

8 Abstract

A mainstay within human and dental medicine is the restoration of tissue integrity and reconstruction of soft and hard tissue caused by trauma, tumors, inflammation and malformations, among other things.

In addition to satisfactory aesthetic aspects, modern society demands uncomplicated, sustainable and effective treatment concepts with low harvest morbidity. Human rib cartilage, in addition to its sufficient availability, represents a low-complication harvesting option. The main aspects of this work were to evaluate the optimization of rib cartilage grafts with human stem cells and to analyze the healing tendency of xenografts.

In this study, the healing of human rib cartilage as a xenograft in a rabbit model was analyzed in terms of ossification, chondrogenesis and possible optimization by human stem cells. For this purpose, standardized defects were placed in the knee and human rib cartilage was transplanted. A total of 22 experimental animals were operated on twice in order to keep the number as small as possible. Three groups were available for analysis: Control group or rather empty defects, one group which was supplied with decellularized rib cartilage and one group which was treated with recellularized rib cartilage grafts.

The recellularized grafts showed an increased ossification rate ($p=0.002$) and decreased osteoid synthesis ($p=0.034$). In addition, cartilage synthesis was shown to be significantly higher within the decellularized group, compared to the control group ($p=0.035$).

In conclusion, recellularized rib cartilage grafts can be used to repair smaller bony defects. Also, optimization using mesenchymal stem cells was depicted in terms of more efficient ossification. Furthermore, decellularized rib cartilage grafts represent a possibility to the already clinically established autologous reconstruction procedures with regard to a satisfying cartilage synthesis.

9 Abkürzungsverzeichnis

(v/v).....	Volumenprozent
ASMA.....	<i>alpha-smooth-muscle-actin</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
BMP	<i>bone morphogenetic protein</i>
BMU	<i>bone multicellular unit</i>
BSP	<i>Bone Sialoprotein</i>
CBL.....	<i>Ubiquitin-Protein-Ligase</i>
CSF-1	<i>colony stimulating factor</i>
DKK1	<i>Dickkopf related protein 1</i>
EDTA.....	<i>Ethylendiamintetraessigsäure</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
FBS.....	<i>fetal bovine serum</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
IGF	<i>Insulin-Like Growth Factor</i>
IGF-1.....	<i>Insulin growth factor</i>
IL	<i>Interleukin</i>
kg	<i>Kilogramm</i>
KG.....	<i>Körpergewicht</i>
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MPS	<i>mononukleäres-phagozytäres System</i>
MSC	<i>mesenchymale Stammzellen</i>
NO	<i>Stickstoffmonoxid</i>
NSAR.....	<i>nicht-steroidalen Antirheumatika</i>
OPG	<i>Osteoprotegerin</i>
PBS	<i>phosphat-gepufferte Salzlösung</i>
PDGF.....	<i>platelet-derived growth factor</i>
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
PGE ₂	<i>ProstaglandinE2</i>
PTH.....	<i>Parathormon</i>
RANKL.....	<i>Receptor Activator of NF-κB Ligand</i>
ROI.....	<i>region of interest</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
s.c.	<i>subkutan</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfat</i>
SFRP1.....	<i>secreted frizzled related protein 1</i>

Abkürzungsverzeichnis

SOP	<i>standard operating procedure</i>
SRC	<i>SRC-Kinase</i>
T61.....	<i>tierärztliches Euthanasiemittel</i>
TCT	<i>total cartilage tissue, total cartilage tissue</i>
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TNF	<i>Tumornekrosefaktor</i>
TOT	<i>total osseous tissue</i>
TRAP	<i>tartratresistente saure Phosphatase, tartratresistente Phosphatase</i>
TRIS.....	<i>Trishydroxymethylaminomethan</i>
U/min	<i>Umdrehungen pro Minute</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Differenzierung eines Osteoklasten	6
Abbildung 2: Signaltransduktion eines Osteozyten durch mechanische Stimuli	7
Abbildung 3: Zell-Zell-Interaktion von Osteoblast und Osteoklast	8
Abbildung 4: Osteozytäre Regulation des Knochenremodeling	9
Abbildung 5: Haltungsbedingungen der Versuchstiere	19
Abbildung 6: Chronologie des Versuchsaufbaus	20
Abbildung 7: Beispielhafte Bilder der Movat-Pentachrome-Färbung	27
Abbildung 8 : Falschfarbenbild der Osteocalcin-Färbung	28
Abbildung 9: Lichtmikroskopische Darstellung mehrkerniger TRAP ⁺ -Osteoklasten	29
Abbildung 10: Histologische Darstellung der Gefäße	29
Abbildung 11: Schematische Darstellung des (Strept-) Avidin-Biotin-Komplexes	30
Abbildung 12: Visualisierung der ROI (region of interest) in 40-facher Vergrößerung	31
Abbildung 13: Darstellung der ROI in 10-facher Vergrößerung	32
Abbildung 14: Darstellung der untersuchten ROI	32
Abbildung 15: Falschfarbenbilder der Osteocalcin(A,B)- und Movat-Pentachrome(C,D)-Färbung	33
Abbildung 16 : Ergebnisse der Movat-Pentachrome-Färbung	35
Abbildung 17: Erhöhte TOT-Anteile durch rezellularisierte Transplantate	37
Abbildung 18: Hoher Osteocalcinanteil durch dezellularisierte Transplantate	38
Abbildung 19: Hohe Osteoklastenaktivität innerhalb der rezellularisierten Gruppe	40
Abbildung 20: Hohe Resorptionsoberfläche und Osteoklastenzahl	39
Abbildung 21: Hohe Vaskularisierung innerhalb der dezellularisierten Gruppe	41
Abbildung 22: Grafische Darstellung der prozentualen Anteile an Osteoid	43
Abbildung 23: Stabile Knorpelsynthese innerhalb der dezellularisierten Gruppe	44
Abbildung 24: Hoher Anteil nicht mineralisierter Substanz innerhalb der dezellularisierten Gruppe	46
Abbildung 25: Scoresheet: Postoperative Dokumentation der Wohlbefinden der Versuchstiere	69
Abbildung 26: Perioperative Dokumentation	70

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppenaufteilung der Versuchstiere	19
Tabelle 2 : Ablauf der Paraffineinbettung. Leica TP1020 Gewebeeinfiltrationsautomat	24
Tabelle 3: Tabellarische Darstellung der histologischen Färbungen	25
Tabelle 4: Färberegebnisse der Movat-Pentachrome-Färbung	26
Tabelle 5: Tabellarische Darstellung der statischen Auswertung der Verknöcherung (TOT).	36
Tabelle 6: Statische Auswertung der Osteocalcin-Färbung	38
Tabelle 7: Statische Auswertung der ASMA-Färbung	42
Tabelle 8: Statische Auswertung der Osteoid-Färbung.	42
Tabelle 9: Statische Auswertung der Chondrogenese.	45
Tabelle 10: Statische Auswertung der nicht mineralisierten Anteile.	45
Tabelle 11: Gewebeintegration	47
Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle - PFA-Fixierung.	71
Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle - EDTA-Entkalkung	72
Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle – Paraffineinbettung	73
Tabelle 15: Befüllungsschema der einzelnen Stationen des Gewebeeinfiltrationsautomaten	73
Tabelle 16: Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle – Schnittherstellung	74
Tabelle 17: Entparaffinieren - MPC-Färbung	75
Tabelle 18: Färbeprotokoll der MPC-Färbung	75
Tabelle 19: Herstellung der Lösungen der MPC-Färbung	77
Tabelle 20: Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle – MPC-Färbung	78
Tabelle 21: Herstellung der Lösungen der TRAP-Färbung	79
Tabelle 22: Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle der TRAP-Färbung	80
Tabelle 23: Entparaffinieren im Rahmen der TRAP-Färbung	80
Tabelle 24: Färbeprotokoll der TRAP-Färbung	81
Tabelle 25: Färbeprotokoll der Osteocalcin-Färbung	82
Tabelle 26: Färbeprotokoll der ASMA-Färbung	83

12 Literaturverzeichnis

1. Ai-Aql, Z.S., et al., *Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis*. J Dent Res, 2008. **87**(2): p. 107-18.
2. Al-Timimi, A.H. and A.O. Hossain, *Immunohistological Study of ER, PR, and Her2/neu Status in Breast Carcinoma*. Indian Journal of Public Health, 2019. **10**(6): p. 969.
3. Amling, M. and G. Delling, *[Cell biology of osteoclasts and molecular mechanisms of bone resorption]*. Pathologe, 1996. **17**(5): p. 358-67.
4. Aumüller, G., et al., *Duale Reihe Anatomie*. 2020: Thieme.
5. Bartl, R., *Klinische Osteologie: Entstehung, Diagnostik, Prävention und Therapie aller Knochenerkrankungen*. 2014: Georg Thieme Verlag.
6. Beavan, S., et al., *Colocalization of glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in human bone*. J Bone Miner Res, 2001. **16**(8): p. 1496-504.
7. Berendsen, A.D. and B.R. Olsen, *Bone development*. Bone, 2015. **80**: p. 14-18.
8. Boivin, G., et al., *Ultrastructural immunocytochemical localization of endogenous 1,25-dihydroxyvitamin D3 and its receptors in osteoblasts and osteocytes from neonatal mouse and rat calvaria*. Bone Miner, 1987. **3**(2): p. 125-36.
9. Bonewald, L.F., *Establishment and characterization of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4*. J Bone Miner Metab, 1999. **17**(1): p. 61-5.
10. Bonewald, L.F. and S.L. Dallas, *Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation*. J Cell Biochem, 1994. **55**(3): p. 350-7.
11. Boyce, B.F. and L. Xing, *Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin*. Arthritis Res Ther, 2007. **9 Suppl 1**: p. S1.
12. Braidman, I.P., et al., *Localization of estrogen receptor beta protein expression in adult human bone*. J Bone Miner Res, 2001. **16**(2): p. 214-20.
13. Briot, K. and C. Roux, *[Post-menopausal osteoporosis: Up-to-date]*. Rev Med Interne, 2016. **37**(3): p. 195-200.
14. Cackowski, F.C., et al., *Osteoclasts are important for bone angiogenesis*. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 2010. **115**(1): p. 140-149.
15. Caetano-Lopes, J., H. Canhão, and J.E. Fonseca, *Osteoblasts and bone formation*. Acta Reumatol Port, 2007. **32**(2): p. 103-10.
16. Canalis, E., A.N. Economides, and E. Gazzerro, *Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton*. Endocr Rev, 2003. **24**(2): p. 218-35.
17. Carreira, A.C., et al., *Bone Morphogenetic Proteins: structure, biological function and therapeutic applications*. Arch Biochem Biophys, 2014. **561**: p. 64-73.

18. Chen, D., M. Zhao, and G.R. Mundy, *Bone morphogenetic proteins*. Growth Factors, 2004. **22**(4): p. 233-41.
19. Cheung, W.H., et al., *Fracture healing in osteoporotic bone*. Injury, 2016. **47**: p. S21-S26.
20. Claes, L., S. Recknagel, and A. Ignatius, *Fracture healing under healthy and inflammatory conditions*. Nat Rev Rheumatol, 2012. **8**(3): p. 133-43.
21. Conover, C.A., *Insulin-like growth factor-binding proteins and bone metabolism*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2008. **294**(1): p. E10-4.
22. Cooper, D.M., et al., *Quantitative 3D analysis of the canal network in cortical bone by micro-computed tomography*. Anat Rec B New Anat, 2003. **274**(1): p. 169-79.
23. Courpron, P., P. Meunier, and G. Vignon, [*Dynamics of bone remodeling explained by Harold Frost. Theory of the B. M.U. (basic multicellular unit)*]. Nouv Presse Med, 1975. **4**(6): p. 421-4.
24. Dallas, S.L., M. Prideaux, and L.F. Bonewald, *The osteocyte: an endocrine cell ... and more*. Endocr Rev, 2013. **34**(5): p. 658-90.
25. Datta, H.K., et al., *The cell biology of bone metabolism*. J Clin Pathol, 2008. **61**(5): p. 577-87.
26. de Baat, P., M.P. Heijboer, and C. de Baat, [*Development, physiology, and cell activity of bone*]. Ned Tijdschr Tandheelkd, 2005. **112**(7): p. 258-63.
27. Deckers, M.M., et al., *Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation*. Endocrinology, 2000. **141**(5): p. 1667-1674.
28. Deckers, M.M., et al., *Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A*. Endocrinology, 2002. **143**(4): p. 1545-53.
29. Deftos, L., *Calcium and phosphate homeostasis, chapter 2*. Clinical essentials of calcium and skeletal metabolism, 1st edn. Professional Communication Inc, 1998: p. 1-208.
30. Dobnig, H. and R.T. Turner, *The effects of programmed administration of human parathyroid hormone fragment (1-34) on bone histomorphometry and serum chemistry in rats*. Endocrinology, 1997. **138**(11): p. 4607-12.
31. Du, D., et al., *Repairing Osteochondral Defects of Critical Size Using Multiple Costal Grafts: An Experimental Study*. Cartilage, 2015. **6**(4): p. 241-51.
32. Ducy, P., et al., *Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice*. Nature, 1996. **382**(6590): p. 448-52.
33. Dudley, H.R. and D. Spiro, *THE FINE STRUCTURE OF BONE CELLS*. J Biophys Biochem Cytol, 1961. **11**(3): p. 627-49.
34. El-Khassawna, T., *Cellular and molecular analysis of fracture healing in a neurofibromatosis type 1 conditional knockout mice model*. 2013, Humboldt-Universität zu Berlin, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät I.
35. Fedok, F.G., *Costal Cartilage Grafts in Rhinoplasty*. Clin Plast Surg, 2016. **43**(1): p. 201-12.

36. Furukawa, T., et al., *Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee*. J Bone Joint Surg Am, 1980. **62**(1): p. 79-89.
37. Gerstenfeld, L.C., et al., *Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation*. J Cell Biochem, 2003. **88**(5): p. 873-84.
38. Gierloff, M. and J. Wiltfang, *Methoden zur Knochenaugmentation in der Zahnarztpraxis und Komplikationsmanagement*. wissen kompakt, 2011. **5**(1): p. 21-32.
39. Goltzman, D., M. Mannstadt, and C. Marcocci, *Physiology of the Calcium-Parathyroid Hormone-Vitamin D Axis*. Front Horm Res, 2018. **50**: p. 1-13.
40. Gotterbarm, T., et al., *Einwachsverhalten von periostgedeckten Knochendübeln mit und ohne autologe Knorpelzellen*. Der Orthopäde, 2003. **32**(1): p. 65-73.
41. Grande, D.A., et al., *The repair of experimentally produced defects in rabbit articular cartilage by autologous chondrocyte transplantation*. J Orthop Res, 1989. **7**(2): p. 208-18.
42. Grant, S.F. and S.H. Ralston, *Genes and osteoporosis*. Trends Endocrinol Metab, 1997. **8**(6): p. 232-6.
43. Greenfield, E.M., Y. Bi, and A. Miyauchi, *Regulation of osteoclast activity*. Life Sci, 1999. **65**(11): p. 1087-102.
44. Grigoriadis, A.E., et al., *c-Fos: a key regulator of osteoclast-macrophage lineage determination and bone remodeling*. Science, 1994. **266**(5184): p. 443-8.
45. Harada, S. and G.A. Rodan, *Control of osteoblast function and regulation of bone mass*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 349-55.
46. Harman, B.D., et al., *Osteochondral Autograft Transplantation in the Porcine Knee*. The American Journal of Sports Medicine, 2006. **34**(6): p. 913-918.
47. Heiß, C., M. Rupp, and G. Knapp, *Knochenersatz und Knochenaufbau*. Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie, 2019. **157**(06): p. 715-728.
48. Holzapfel, B.M., M. Rudert, and D.W. Hutmacher, *[Scaffold-based Bone Tissue Engineering]*. Orthopade, 2017. **46**(8): p. 701-710.
49. Horne, W.C., et al., *The role(s) of Src kinase and Cbl proteins in the regulation of osteoclast differentiation and function*. Immunol Rev, 2005. **208**: p. 106-25.
50. Hu, K. and B.R. Olsen, *The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration*. Bone, 2016. **91**: p. 30-8.
51. Huwe, L.W., et al., *Characterization of costal cartilage and its suitability as a cell source for articular cartilage tissue engineering*. J Tissue Eng Regen Med, 2018. **12**(5): p. 1163-1176.
52. Kalfas, I.H., *Principles of bone healing*. Neurosurg Focus, 2001. **10**(4): p. E1.
53. Kamadjaja, D.B., et al., *In vivo analyses of osteogenic activity and bone regeneration capacity of demineralized freeze-dried bovine bone xenograft: a potential candidate for alveolar bone fillers*. International Journal of Dentistry, 2021. **2021**.

54. Karsenty, G. and E.F. Wagner, *Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development*. Dev Cell, 2002. **2**(4): p. 389-406.
55. Kawaguchi, H., C.C. Pilbeam, and L.G. Raisz, *Anabolic effects of 3,3',5-triiodothyronine and triiodothyroacetic acid in cultured neonatal mouse parietal bones*. Endocrinology, 1994. **135**(3): p. 971-6.
56. Khalilifar, M.A., et al., *In Vitro and In Vivo Comparison of Different Types of Rabbit Mesenchymal Stem Cells for Cartilage Repair*. Cell J, 2019. **21**(2): p. 150-160.
57. Khan, S.N., et al., *The biology of bone grafting*. JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2005. **13**(1): p. 77-86.
58. Kheir, E., et al., *Development and characterization of an acellular porcine cartilage bone matrix for use in tissue engineering*. J Biomed Mater Res A, 2011. **99**(2): p. 283-94.
59. Kim, H.K., M.E. Moran, and R.B. Salter, *The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits*. J Bone Joint Surg Am, 1991. **73**(9): p. 1301-15.
60. Kini, U. and B. Nandeesh, *Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism*.
61. Knothe Tate, M.L., *"Whither flows the fluid in bone?" An osteocyte's perspective*. J Biomech, 2003. **36**(10): p. 1409-24.
62. Kolar, P., et al., *Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia*. Clin Orthop Relat Res, 2011. **469**(11): p. 3118-26.
63. Komori, T., *Functions of Osteocalcin in Bone, Pancreas, Testis, and Muscle*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(20).
64. Komori, T., *What is the function of osteocalcin?* J Oral Biosci, 2020. **62**(3): p. 223-227.
65. Krishnan, V., H.U. Bryant, and O.A. Macdougald, *Regulation of bone mass by Wnt signaling*. J Clin Invest, 2006. **116**(5): p. 1202-9.
66. Kronenberg, H.M., *Developmental regulation of the growth plate*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 332-6.
67. Lacey, D.L., et al., *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. Cell, 1998. **93**(2): p. 165-76.
68. Lane, J.G., et al., *Follow-Up of Osteochondral Plug Transfers in a Goat Model: A 6-Month Study*. The American Journal of Sports Medicine, 2004. **32**(6): p. 1440-1450.
69. Lane, J.G., et al., *A morphologic, biochemical, and biomechanical assessment of short-term effects of osteochondral autograft plug transfer in an animal model*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2001. **17**(8): p. 856-863.
70. Lindqvist, C., et al., *Autogenous costochondral grafts in temporo-mandibular joint arthroplasty. A survey of 66 arthroplasties in 60 patients*. J Maxillofac Surg, 1986. **14**(3): p. 143-9.

71. Lüllmann-Rauch, R. and E. Asan, *Taschenlehrbuch Histologie*. 2019: Thieme.
72. Mackie, E.J., *Osteoblasts: novel roles in orchestration of skeletal architecture*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(9): p. 1301-5.
73. Maes, C., et al., *Osteoblast precursors, but not mature osteoblasts, move into developing and fractured bones along with invading blood vessels*. Dev Cell, 2010. **19**(2): p. 329-44.
74. Maggiano, I.S., C.M. Maggiano, and D.M. Cooper, *Osteon circularity and longitudinal morphology: Quantitative and qualitative three-dimensional perspectives on human Haversian systems*. Micron, 2021. **140**: p. 102955.
75. Makino, T., et al., *Histologic analysis of the implanted cartilage in an exact-fit osteochondral transplantation model*. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery, 2001. **17**(7): p. 747-751.
76. Makino, T., et al., *The effect of the small and unstable autologous osteochondral graft on repairing the full-thickness large articular cartilage defect in a rabbit model*. Kobe J Med Sci, 2002. **48**(3-4): p. 97-104.
77. Malhan, D., et al., *An optimized approach to perform bone histomorphometry*. Frontiers in endocrinology, 2018. **9**: p. 666.
78. Marks, S.C., Jr. and S.N. Popoff, *Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton*. Am J Anat, 1988. **183**(1): p. 1-44.
79. Marsell, R. and T.A. Einhorn, *The biology of fracture healing*. Injury, 2011. **42**(6): p. 551-5.
80. Miller, S.C. and W.S. Jee, *The bone lining cell: a distinct phenotype?* Calcif Tissue Int, 1987. **41**(1): p. 1-5.
81. Miyazaki, T., et al., *The role of c-Src kinase in the regulation of osteoclast function*. Mod Rheumatol, 2006. **16**(2): p. 68-74.
82. Mulisch, M. and U. Welsch, *Romeis - Mikroskopische Technik*. 2015: Springer Berlin Heidelberg.
83. Mulisch, M. and U. Welsch, *Romeis - Mikroskopische Technik*. 2010: Spektrum Akademischer Verlag.
84. Nakamura, A., et al., *Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model*. Bone, 2010. **46**(2): p. 418-424.
85. Nakase, T. and H. Yoshikawa, *Potential roles of bone morphogenetic proteins (BMPs) in skeletal repair and regeneration*. J Bone Miner Metab, 2006. **24**(6): p. 425-33.
86. Nam, E.K., et al., *Biomechanical and histological evaluation of osteochondral transplantation in a rabbit model*. Am J Sports Med, 2004. **32**(2): p. 308-16.
87. Nash, T., et al., *Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits*. Bone, 1994. **15**(2): p. 203-208.
88. Neukam, F.W. and M. Bergler, *Zahnärztliche Implantologie unter schwierigen Umständen: 20 Tabellen*. 2007: Thieme.

89. Neve, A., A. Corrado, and F.P. Cantatore, *Osteocytes: central conductors of bone biology in normal and pathological conditions*. Acta Physiol (Oxf), 2012. **204**(3): p. 317-30.
90. Obermayer-Pietsch, B. and V. Schwetz, [*Biochemical markers of bone metabolism and their importance*]. Z Rheumatol, 2016. **75**(5): p. 451-8.
91. Obert, L., et al., *Post-traumatic malunion of the distal radius treated with autologous costal cartilage graft: a technical note on seven cases*. Orthop Traumatol Surg Res, 2011. **97**(4): p. 430-7.
92. Ohsawa, K., et al., *The expression of bone matrix protein mRNAs around beta-TCP particles implanted into bone*. J Biomed Mater Res, 2000. **52**(3): p. 460-6.
93. Palumbo, C., *A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos*. Cell Tissue Res, 1986. **246**(1): p. 125-31.
94. Park, J.H. and H.R. Jin, *Use of autologous costal cartilage in Asian rhinoplasty*. Plast Reconstr Surg, 2012. **130**(6): p. 1338-1348.
95. Paznekas, W.A., et al., *Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia*. Am J Hum Genet, 2003. **72**(2): p. 408-18.
96. Plotkin, L.I., S.C. Manolagas, and T. Bellido, *Transduction of cell survival signals by connexin-43 hemichannels*. J Biol Chem, 2002. **277**(10): p. 8648-57.
97. Pocock, N.A., et al., *Genetic determinants of bone mass in adults. A twin study*. J Clin Invest, 1987. **80**(3): p. 706-10.
98. Pruss, A., et al., *Validation of the 'Marburg bone bank system' for thermosinfection of allogenic femoral head transplants using selected bacteria, fungi, and spores*. Biologicals, 2003. **31**(4): p. 287-94.
99. Ravesloot, J.H., et al., *Role of Na-H exchangers and vacuolar H⁺ pumps in intracellular pH regulation in neonatal rat osteoclasts*. J Gen Physiol, 1995. **105**(2): p. 177-208.
100. Ross, R., E.W. Raines, and D.F. Bowen-Pope, *The biology of platelet-derived growth factor*. Cell, 1986. **46**(2): p. 155-169.
101. Rudolph, R.D., M. Dallek, and K.H. Jungbluth, *Zum Verhalten künstlich erzeugter Epiphysenfugendefekte beim Kaninchen nach Transplantation von autologem und homologem Rippenknorpel*. Unfallchirurgie, 1987. **13**(3): p. 123-128.
102. Rupp, M., et al., *Knochen transplantation oder Biomaterial? Der Unfallchirurg*, 2021. **124**(2): p. 146-152.
103. Rupp, M., et al., *Osteocytes*. Z Orthop Unfall, 2019. **157**(2): p. 154-163.
104. Sagheb, P.D.D.K., et al., *Knochenaugmentation mit individueller Titangitterschale*.
105. Sakou, T., *Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches*. Bone, 1998. **22**(6): p. 591-603.
106. Schell, H., et al., *Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing*. Bone, 2006. **38**(4): p. 547-554.

107. Schindeler, A., et al., *Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture*. Semin Cell Dev Biol, 2008. **19**(5): p. 459-66.
108. Shimada, K., et al., *Cylindrical costal osteochondral autograft for reconstruction of large defects of the capitellum due to osteochondritis dissecans*. J Bone Joint Surg Am, 2012. **94**(11): p. 992-1002.
109. Siddiqui, J.A. and N.C. Partridge, *Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement*. Physiology (Bethesda), 2016. **31**(3): p. 233-45.
110. Stanislaus, D., et al., *In vivo regulation of apoptosis in metaphyseal trabecular bone of young rats by synthetic human parathyroid hormone (1-34) fragment*. Bone, 2000. **27**(2): p. 209-18.
111. Steinbrech, D.S., et al., *Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats*. Plast Reconstr Surg, 2000. **105**(6): p. 2028-38.
112. Street, J., et al., *Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. **99**(15): p. 9656-9661.
113. Sugawara, Y., et al., *Three-dimensional reconstruction of chick calvarial osteocytes and their cell processes using confocal microscopy*. Bone, 2005. **36**(5): p. 877-83.
114. Täger, G., et al., *Knochenaugmentation bei hypo-und atrophien Pseudarthrosen*. Trauma und Berufskrankheit, 2016. **18**(2): p. 203-208.
115. Taichman, R.S., *Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche*. Blood, 2005. **105**(7): p. 2631-9.
116. Thomsen, N.O., et al., *Costal osteochondral graft for total metacarpal head replacement due to extensive osteochondral lesion*. J Orthop Sci, 2014. **19**(6): p. 1036-9.
117. Wada, S., T. Fukawa, and S. Kamiya, *[Osteocalcin and bone]*. Clin Calcium, 2007. **17**(11): p. 1673-7.
118. Wagner, E.F. and G. Karsenty, *Genetic control of skeletal development*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(5): p. 527-32.
119. Wang, J., et al., *Biomimetic cartilage scaffold with orientated porous structure of two factors for cartilage repair of knee osteoarthritis*. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019. **47**(1): p. 1710-1721.
120. Wang, J., et al., *Combined Autologous Chondrocyte and Bone Marrow Mesenchymal Stromal Cell Implantation in the Knee: An 8-year Follow Up of Two First-In-Man Cases*. Cell Transplant, 2019. **28**(7): p. 924-931.
121. Weiner, S., W. Traub, and H.D. Wagner, *Lamellar bone: structure-function relations*. J Struct Biol, 1999. **126**(3): p. 241-55.
122. Wellmann, M., et al., *Therapie der posterioren Schulterinstabilität mit glenoidaler Knochenaugmentation*. Obere Extremität, 2022: p. 1-6.
123. Williams, G.R. and J.H.D. Bassett, *Thyroid diseases and bone health*. J Endocrinol Invest, 2018. **41**(1): p. 99-109.

124. Xia, C., et al., *Decellularized cartilage as a prospective scaffold for cartilage repair*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl, 2019. **101**: p. 588-595.

13 Anhang

13.1 Postoperative Nachsorge

1. Ernährungszustand (ggf. BCS)	Score
Gewichtsverlust <5%, normale Futter- und Wasseraufnahme	A
Gewichtsverlust 5% - 15 %, normale bis leicht reduzierte Futter- und Wasseraufnahme	B
Gewichtsverlust > 15 %, deutlich reduzierte Futter- und Wasseraufnahme	C
2. Pflegezustand	
Grundsätzlich gepflegtes Fell	A
Reduzierte Fellpflege, mattes/struppiges Fell	B
Stark reduzierte Fellpflege, verklebte Fußsohlen/Afterregion	C
3. Wundheilung	
Dem Eingriff entsprechend: trockene Wundverhältnisse, keine Infektion/kein Abszess erkennbar, kein Benagen der Wunde	A
Leicht gestört: nässend, gerötet, geschwollen, die Wunde wird beleckt oder benagt	B
Gestört: stark nässend, Hinweise auf Infektion oder Abszess (Eiter), stark gerötet, geschwollen, intensives Benagen der Wunde	C
4. Belastung des operierten Beines	
Vollbelastung oder Teilbelastung bei weitgehend normalem Bewegungsablauf	A
Teilbelastung mit auffälligem / gestörtem Bewegungsablauf	B
Aktive Schonung / Verstecken des operierten Beines	C
5. Verhalten	
Aktiv, aufmerksam, interessiert	A
Reduzierte Aktivität, verspätete oder überzogene Reaktion auf Reize, vermindertes Interesse an der Umwelt	B
Zurückgezogen, apathisch, von der Gruppe isoliert	C

Handlungsanweisungen

A (ausschließlich)	Keine besonderen Maßnahmen erforderlich
B (mindestens einmal)	Das Tier ist einem Tierarzt vorzustellen. Es ist eine Anpassung der Interventionen (z.B.: Analgesie, Wundnachsorge) und der Überwachungsfrequenz notwendig.
C (mindestens einmal)	Das Tier ist umgehend einem Tierarzt vorzustellen. Intensive Interventionen (z.B.: Analgesie, Wundreinigung, Wundnachversorgung) bzw. die Euthanasie des Tieres sind bezüglich der Heilungsaussichten mit dem Tierarzt abzusprechen. Besteht keine Aussicht auf kurzfristige Verbesserung des Gesundheitszustandes und des Allgemeinbefindens erfolgt die sofortige Euthanasie des Tieres.

Abbildung 23: Scoresheet: Postoperative Dokumentation der Wohlbefinden der Versuchstiere

13.2 Präparatherstellung

Die im Folgenden beschriebenen Methoden sind den SOP's (Standardarbeitsanweisungen) der Experimentellen Unfallchirurgie der Justus-Liebig-Universität Gießen entnommen. Zum Abwiegen wurde eine Feinwaage benutzt. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mittels pH-Meter.

13.2.1 4%-PFA-Fixierung nach Lillie

Erst durch das Einfrieren von etwaigen Stoffwechselprozessen und Sicherung des „status quo“ eines histologischen Präparates wird das Fundament für eine ausführliche Analyse gelegt. Aufgrund des vorteilhaften Penetrationsverhalten des Paraformaldehyds wird eine tiefe Fixierung von Gewebe ermöglicht [83].

Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle

Tabelle 12: Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle - PFA-Fixierung.

Paraformaldehyd	Fa. Roth, Nr. 0335
Filterpapiere HK83	Fa. Roth, Nr. 175511148
Plastikpipette, 5ml	Fa. Alpha Laboratories, Nr. LW4728

Ansetzen einer 8%igen PFA-Lösung

1. 5l-Becherglas mit 4600ml Aqua bidest füllen. Mit Magnetprüher inkl. Kontaktthermometer erwärmen, bis die Lösung siedet.
2. Zugabe von 400g Paraformaldehyd und bei 75°C kontinuierlich mittels Magnetprüher vermischen, bis der Bodensatz aufgelöst ist.
3. Zugabe von 10M NaOH-Lösung (tropfenweise, ca. 5-6 Tropfen) bis die Lösung aufklart.
4. Filtrierung

Ansetzen einer 4%igen PFA-Lösung

1. 500ml PFA mit 500ml 0,2M Na-Phosphat-Puffer mischen

Fixierung der biologischen Proben

Bei 4°C für 48h.

Abspülen der fixierten Proben

Hierbei werden die fixierten Proben mit 0,1M-Na-Phosphatpuffer sechsmal gespült. Dazu müssen die Proben mindesten 5 Minuten im Puffer auf einem Rüttler verbleiben. Ist der Spülvorgang beendet, werden die Proben bei 4°C im Puffer bis zur weiteren Verarbeitung belassen.

13.2.2 EDTA-Entkalkung

Ein Herauslösen von Kalksalzen ist zur lichtmikroskopischen Auswertung unabdingbar. Durch Kontakt mit Säuren können die Kalziumverbindungen effektiv gelöst werden, so dass sie als Niederschlag am Boden des Gefäßes erkennbar werden. Wichtig hierbei ist, dass es sich in ein offenes chemisches System handeln muss, da bei der Reaktion Gas in Form von CO₂ freigesetzt wird. Zur effizienten Entkalkung ist die kontinuierliche Erneuerung der (ggf. verbrauchten) Entkalkungsflüssigkeit und eine Temperaturerhöhung (30 °C – 45°C) empfohlen [82].

Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle

Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle - EDTA-Entkalkung

Tris	Fa. Roth, Nr. 4855.2
Titriplex III	Fa. Merck, Nr. 1.08418
Natriumhydroxid	Fa. Roth, Nr. 6771.1

Methodik

1. Herstellung einer 10M NaOH-Lösung
2. Ansetzen der EDTA-Lösung (3,4% TRIS (17g) und 10% (50g) Titriplex III in 500ml Aqua dest, pH=7,0-7,4 (mit NaOH eingestellt))
3. Umbetten der Präparate auf den Einbettungskasten
4. Beschriftung der Proben
5. Einlegen der Proben in EDTA-Lösung. (auf dem Schüttler, Raumtemperatur)
6. Wechseln der EDTA-Lösung jeden zweiten Tag
7. Nach Entkalkung folgt das 60-minütige Abspülen unter fließendem Leitungswasser
8. Aufbewahren der Proben in 70% Ethanol (in Aqua dest. vergällt)

13.2.3 Paraffineinbettung

Mit Hilfe des Gewebeeinfiltrationsautomaten Leica TP1020 und der Paraffinausgießstation Leica HistoCore Arcadia wurden die Probe zur weiteren Bearbeitung in Paraffin eingebettet.

Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle

Tabelle 14: Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle – Paraffineinbettung

Ethanol 522 vergällt mit 1% Petroläther	Fa. Stockmeier Chemie, Nr. 1001043227002
Xylol	Fa. Roth, Nr. 9713
Paraffin	Fa. Roth, Nr. 6642
Einbettkasten ActivFlo Routine	Fa. Leica, Nr. 39LC-500

Methodik

1. Vorbereiten des Gewebeeinfiltrationsautomaten
 - a. 10 Stunden vor Gebrauch anschalten
 - b. mit Paraffin befüllen
 - c. Lösungsmittel kurz vor Gebrauch befüllen
2. Paraffinausgießstation fünf Stunden vor Gebrauch anschalten
3. Kühlplatte 30min vor Gebrauch anschalten
4. Beladen des Infiltrationsautomaten gemäß folgendem Schema:

Tabelle 15: Befüllungsschema der einzelnen Stationen des Gewebeeinfiltrationsautomaten

Nr. 1 und Nr. 2	70% Ethanol vergällt
Nr. 3	80% Ethanol vergällt
Nr. 4	96% Ethanol vergällt
Nr. 5 bis Nr. 7	100% Ethanol vergällt
Nr. 8 bis Nr. 10	Xylol
Nr. 11 und Nr. 12	Paraffin

5. Vollautomatisches Programm starten
6. Programmablauf siehe Tabelle 2
7. Nach Beendigung des Programms und erfolgt die Ausbettung

13.2.4 Schnittherstellung am Rotationsmikrotom

Das Rotationsmikrotom HM355S stand zur Herstellung von in Paraffin eingebetteten histologischen Proben zur Verfügung.

Tabelle 16: Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle – Schnittherstellung

Mikrotomklingen	Fa. Feather, Typ R35
Objektträger	Fa. Langenbrinck, Nr. 03-0060
Essigsäure 4%	Fa. Merck, Nr. 100063

Methodik

1. Ablassen der Brücke ins warme Wasserbad
2. Schnitt der vorher eingespannten Paraffinblöcke (Schnittdicke $5\mu\text{m} \pm 1\mu\text{m}$)
3. Ableitung der Schnitte ins Wasserbad
4. Aufnahme mittels Präpariernadel oder Pinsel auf einen vorher beschrifteten Objektträger
5. Trocknen der Objektträger vorerst an der Raumluft
6. über Nacht bei 37°C im Brutschrank trocknen

13.3 Färbungen

Dem Abwiegen der Feststoffe diente eine Analysewaage. Hierbei wurde ein Plastikspatel benutzt. Das Abmessen der Lösungen erfolgte mittels Eppendorfpipetten bzw. Standzylinder. Der pH-Wert wurde mit Hilfe eines pH-Meters eingestellt.

13.3.1 Movat-Pentachrome

Entparaffinieren in absteigender Alkoholreihe

Tabelle 17: Entparaffinieren - MPC-Färbung

Xylol 1	5 Minuten
Xylol 2	5 Minuten
100% Alkohol	5 Minuten
96% Alkohol	5 Minuten
70% Alkohol	5 Minuten
Aqua dest.	2 x 5 Minuten

Färbung

Tabelle 18: Färbeprotokoll der MPC-Färbung

Färben mit Alcianblau	10 Minuten
Spülen in Leitungswasser	5 Minuten
Stabilisieren in alkalischem Ethanol	60 Minuten
Spülen in fließendem Leitungswasser	10 Minuten
Eintauchen in Aqua dest.	
Kernfärbung in Weigerts Eisenhämatoxylin (liegend)	10 Minuten
Spülen in Aqua dest. bis keine Schlieren mehr zu erkennen sind	
Wässern in Leitungswasser	15 Minuten
Färben mit Brillant-Crocein-Säurefuchsin	12,5 Minuten

Differenzieren in 0,5%iger Essigsäure, bis keine Schlieren mehr zu erkennen sind	
100%iges Ethanol 1	5 Minuten
100%iges Ethanol 2	5 Minuten
100%iges Ethanol 3	5 Minuten
Färben mit Safran du Gâtinais	60 Minuten
100%iges Ethanol 1	5 Minuten
100%iges Ethanol 2	5 Minuten
100%iges Ethanol 3	5 Minuten
Xylol 1	5 Minuten
Xylol 2	5 Minuten

Eindecken mit VitroClud

Nachdem die Objektträger mit Xylol behandelt wurden, gab man 1-3 Tropfen VitroClud auf die Objektträger, um anschließend luftblasenfrei ein Deckglas aufzulegen und nach funfminütigem Antrocknen mit einem Gewicht zu beschweren. Die Präparate wurden 24 Stunden unter dem Abzug getrocknet.

Vorbereiten der Lösungen

Tabelle 19: Herstellung der Lösungen der MPC-Färbung

Alkalisches Ethanol	10ml 25% Ammoniak (Ammonium Hydroxid) + 180 ml 96% EtOH pH>8 25% Ammoniak = 78 ml Ammoniak + 22 ml Aqua dest.
Hämatoxylinlösung A nach Weigert und Hämatoxylinlösung B nach Weigert	1 Teil A + 1 Teil B
Lösung A	Brillant Crocein-R: 0,1g Brillant Crocein R in 99,5 ml Aqua dest lösen, dann 0,5 ml Essigsäure zugeben und filtrieren
Lösung B	Säurefuchsin: 0,1 g Säurefuchsin in 99,5ml Aqua dest. lösen, dann 0,5 ml Essigsäure zugeben und filtrieren
Phosphorwolframsäure	5 g Phosphorwolframsäure in 100 ml Aqua dest. lösen
Safran du Gâtinais	6g in 100 ml 100%igem Ethanol lösen, bei 50°C für 48 Stunden im Wärmeschrank inkubieren, anschließend vor Gebrauch filtrieren

Verbrauchsmaterialien und Reagenzien mit Bezugsquelle

Tabelle 20: Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle – MPC-Färbung

Ethanol 522 vergällt mit 1 % Petroläther	Fa. Stockmeier Chemie, Nr. 1001043227002
Xylol	Fa. Roth, Nr. 9713.3
DePex	Fa. Serva, Nr. 18243.02
Essigsäure	Fa. Merck, Nr. 1.00063
Eisenhämatoxylin nach Weigert: Lösung A	Fa. Roth, Nr. X906
Eisenhämatoxylin nach Weigert: Lösung B	Fa. Roth, Nr. X907
Filterpapiere HK83,1, MN 615 ¼; Ø 185 mm	Fa. Roth, Nr. 175511148
Ammoniaklösung 32%	Fa. Roth, Nr. P093.1
Alcianblau	Fa. Chroma, Nr. 2C-005
Brilliant Crocein R	Fa. Chroma, Nr. 1B-109
Säurefuchsin	Fa. Chroma, Nr. 1B-525
Phosphorwolframsäure (Tungstonphosphoracid)	Fa. Merck, Nr. 1.00583
Safran du Gâtinais	Fa. Chroma, Nr. 5A-394

13.3.2 Enzymhistochemischer Nachweis der Tartrat-resistente saure Phosphatase

Vorbereiten der Lösungen

Tabelle 21: Herstellung der Lösungen der TRAP-Färbung

0,1M Na-Acetatpuffer pH 5,2	<p>Stammlösung (1M): 82,03g/l Natriumacetat in Aqua dest. gelöst; pH mit 25% HCL auf 5,2 eingestellt.</p> <p>Gebrauchslösung (0,1M): Puffer 1+9 in Aqua dest. 25ml in einem Zentrifugen-Röhrchen bereitgestellt und beschriftet.</p>
Substrat-Lösung 1	35mg Naphthol-AS-TR-Phosphat in 125µl N-N-Dimethylformamid lösen (Eppendorf-Tube)
Substrat-Lösung 2	<p>57,5mg di-Natriumtartrat-Dihydrat in 1ml Na-Acetatpuffer gelöst (Eppendorf-Tube)</p> <p>35mg Echtrotsalz in 1ml Na-Acetatpuffer gelöst (Eppendorf-Tube)</p> <p>Beide Ansätze wurden in dem Rest des Na-Acetatpuffers gelöst</p>
Lösung 1 wurde in Lösung 2 pipettiert. Die Lösung wies eine schwach rötliche Färbung auf und musste vor Gebrauch durch einen Spritzenfilter gefiltert werden.	
Instant Hämatoxylin	<p>Stammlösung: Teil A und Teil B in 1l Aqua bidest eingerührt und gemischt.</p> <p>Gebrauchslösung: 1 Teil Stammlösung + 3 Teile Aqua bidest.</p>
Kaisers Glyceringelatine	kurz vor Gebrauch im Wasserbad verflüssigt

Verbrauchsmaterialien und Reagenzien mit Bezugsquelle

Tabelle 22: Verbrauchsmaterialien mit Bezugsquelle der TRAP-Färbung

Pap-Pen	Fa. Kisker, Nr. MKP-2
Spritzenfilter: 32 mm mit 0,2 µm Membran	Fa. Pall Corporation, Nr. 4652
Ethanol 522 vergällt mit 1 % Petroläther	Fa. Stockmeier Chemie, Nr. 1001043227002
Xylol	Fa. Roth, Nr. 9713
di-Natriumtartrat-Dihydrat	Fa. Merck, Nr. 1.06663
Natriumacetat p.a.	Fa. Merck, Nr. 1.062680
Naphthol-AS-TR-Phosphat	Fa. Sigma-Aldrich, Nr. N6125
N-N-Dimethylformamid	Fa. Sigma-Aldrich, Nr. D4551
Echtrotsalz	Fa. Sigma-Aldrich: Nr. 368881
Shandon Instant Hämatoxylin	Fa. Thermo Scientific, Nr. 6765015
Kaisers Glyceringelatine	Fa. Roth, Nr. 6474
Salzsäure, 25%	Fa. Roth, Nr. X879
Plastikspatel, Rührspatel	Fa. Sarstedt, Nr. 32420090
Eppendorf-Tube, 2ml	Fa. Sarstedt, Nr. 72.695.400
Zentrifugenröhrchen mit Stehrand, 50ml	Fa. Sarstedt, Nr. 62.559.001
Filterpapiere HK83,1, MN 615 ¼; Ø 185 mm	Fa. Roth, Nr. 175511148
Deckgläser:	Fa. R. Langenbrinck:
21 x 26	Nr. 01-2126/1
22 x 22	Nr. 01-2222/1
24 x 26	Nr. 01-2426/1

Entparaffinieren

Tabelle 23: Entparaffinieren im Rahmen der TRAP-Färbung

Xylol 1	5 Minuten
Xylol 2	5 Minuten
100% Ethanol	5 Minuten
96% Ethanol	5 Minuten

70% Ethanol	5 Minuten
Aqua dest.	5 Minuten

Färben

Tabelle 24: Färbeprotokoll der TRAP-Färbung

0,1M Na-Acetatpuffer1 pH 5,2	10 Minuten
Pap-Pen	Schnitte eingekreist
Substrat-Lösung, gefiltert	30 Minuten feuchte Kammer, 37°C Brut-schrank
Spülen in Aqua dest.	3 x 5 Minuten
Gegenfärben mit Hämatoxylin	1 Minute
Aqua dest.	1 Minute
Bläuen in fließendem Leitungswasser	10 Minuten
Aqua dest.	5 Minuten

Eindecken

Es wurde mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt. 2-3 Tropfen wurden auf den Objektträger gegeben und ein passendes Deckglas luftblasenfrei aufgelegt. Nach fünfminütiger Antrocknung wurde ein Gewicht auf das Deckglas gelegt und 24 Stunden unter dem Abzug getrocknet.

13.3.3 Enzymhistochemischer Nachweis von Osteocalcin

Tabelle 25: Färbeprotokoll der Osteocalcin-Färbung

Xylol 1	5 Minuten
Xylol 2	5 Minuten
Aceton	10 Minuten
Aceton + Waschpuffer	10 Minuten
Waschpuffer	2 x 10 Minuten
BLOXALL	10 Minuten
Waschpuffer	5 Minuten
75µl Pferdeserum in 5ml TBS	20 Minuten
1. Antikörper Osteocalcin (1:1200)	60 Minuten bei RT
Waschpuffer	
ABC-AP Komplex	30 Minuten
2. Antikörper (40µl anti mouse + 40µl rabbit serum + 1920µl TBS)	
Waschpuffer	2 x 5 Minuten
ABC-AP Komplex	30 Minuten bei RT
Waschpuffer	2 x 5 Minuten
Aqua dest.	5 Minuten
Magenta Red Vector	5 Minuten 30 Sekunden
Aqua dest.	2 x 5 Minuten
Gegenfärbung (Methyl-Grün)	
70% Ethanol	kurz eintauchen
100% Ethanol	10 Minuten
Trocken bei 60°C (Inkubator)	30 Minuten

13.3.4 Enzymhistochemischer Nachweis von ASMA

Tabelle 26: Färbeprotokoll der ASMA-Färbung

Xylol 1	5 Minuten
Xylol 2	5 Minuten
Aceton	10 Minuten
Aceton + Waschpuffer	10 Minuten
Waschpuffer	2 x 10 Minuten
BLOXALL	10 Minuten
Waschpuffer	5 Minuten
75µl Pferdeserum in 5ml TBS	20 Minuten
1. Antikörper ASMA (1:300)	60 Minuten bei RT
Waschpuffer	
ABC-AP Komplex	30 Minuten
2. Antikörper (20µl anti mouse + 20µl rabbit serum + 960µl TBS)	
Waschpuffer	2 x 5 Minuten
ABC-AP Komplex	30 Minuten bei RT
Waschpuffer	2 x 5 Minuten
Aqua dest.	5 Minuten
Magenta Red Vector	8 Minuten 15 Sekunden
Aqua dest.	2 x 5 Minuten
Gegenfärbung (Methyl-Grün)	
70% Ethanol	kurz eintauchen
100% Ethanol	10 Minuten
Trocken bei 60°C (Inkubator)	30 Minuten

14 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus- Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

15 Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Thaqif El Khassawna, sowie Herrn PD Dr. Sameh Attia für die Bereitstellung des interessanten Themas.

Bei Frau Annette Stengel bedanke ich mich herzlich für die tolle und nette Zusammenarbeit. Durch ihre Hilfe fand ich schnell Anschluss an die Laborarbeiten und konnte dadurch das Thema mit viel Freude aufbereiten.

Fr. Dr. Sabine Stötzel danke ich dafür, dass sie stets als Ansprechpartnerin für Fragen und Anregungen zur Verfügung stand, immer ein offenes Ohr bei Problemen hatte und mir ihren Rechner für die histomorphometrische Analyse zur Verfügung stellte.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Theresa Luna Sophie Maneg für die kontinuierliche Unterstützung und motivierenden Worte während der gesamten Zeit als Doktorand.