

**Knochen-Tissue-Engineering im *Critical Sized*  
Femurdefektmodell der Ratte nach Bestrahlung**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Ulrike Rottensteiner

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin, Klinik für Pferde der Justus-Liebig-  
Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. med. vet. Michael Röcken

und

der Plastisch- und Handchirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Erlangen  
Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Betreuer: PD Dr. med. Andreas Arkudas

**Knochen-Tissue-Engineering im *Critical Sized*  
Femurdefektmodell der Ratte nach Bestrahlung**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

Ulrike Rottensteiner  
Tierärztin aus Bozen (Italien)

Gießen 2016

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-  
Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Martin Kramer

1. Gutachter: Prof. Dr. Michael Röcken

2. Gutachter: PD Dr. med. Andreas Arkudas

Prüfer: Prof. Dr. Dr. Stefan Arnhold

Tag der Disputation: 21.04.2016

## *Für Benjamin*

Auch wenn  
Deine kleinen Füße  
die Erde  
nie berührten,  
sind Deine Spuren  
trotzdem da.

Überall.

## Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IX
Einheiten.....	XI
1 Einleitung .....	1
2 Literaturübersicht .....	2
2.1 Grundlagen .....	2
2.1.1 Physiologische Knochenheilung .....	2
2.1.2 Entstehung von Knochendefekten.....	4
2.2 Therapiemöglichkeiten .....	7
2.2.1 Knochentransplantate .....	7
2.2.2 Regenerative Medizin und Tissue Engineering.....	9
2.3 Grundlagen der Strahlenbiologie.....	15
2.3.1 Biochemische Auswirkungen ionisierender Strahlung.....	15
2.3.2 Auswirkungen ionisierender Strahlung auf den Knochen.....	16
2.4 Tiermodelle im Knochen Tissue Engineering .....	18
2.4.1 Bestrahlungsmodelle in der Ratte.....	18
2.4.2 Knochendefektmodelle in der Ratte .....	19
2.5 Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe.....	20
3 Zielsetzung .....	22
3.1 Phase I: Evaluation Bestrahlungsprotokoll.....	22
3.2 Phase II: Knochen Tissue Engineering im CSFD Modell nach Bestrahlung .....	22
4 Material und Methoden .....	23

4.1	Verwendete Tiere .....	23
4.2	Phase I: Evaluation Bestrahlungsprotokoll.....	23
4.2.1	Gruppen, Versuchsdesign.....	23
4.2.2	Bestrahlung Tiere .....	24
4.2.3	Bestrahlung Zellen.....	25
4.2.4	Perfusion Tiere .....	26
4.2.5	Explantation Tiere, weitere Verarbeitung .....	27
4.2.6	Molekularbiologische Auswertung.....	27
4.2.7	Mikro-Computertomographische Auswertung.....	29
4.2.8	Histologie .....	30
4.3	Phase II: Knochen Tissue Engineering im CSFD Modell nach Bestrahlung .....	33
4.3.1	Materialien.....	33
4.3.2	Gruppen, Versuchsdesign.....	34
4.3.3	Zellisolation und Zellkultur.....	36
4.3.4	Implantation der Konstrukte in Spendertiere.....	39
4.3.5	Bestrahlung der Empfängertiere.....	41
4.3.6	Setzen des CSFD im Empfängertier.....	41
4.3.7	Perfusion, Explantation und weitere Verarbeitung.....	45
4.3.8	RNA-Isolation und quantitative PCR.....	45
4.3.9	Histologie .....	45
4.3.10	Statistik.....	48
5	Ergebnisse .....	49
5.1	Phase I: Evaluation Bestrahlungsprotokoll.....	49
5.1.1	Klinische Evaluation .....	49

5.1.2	Makroskopische Beurteilung.....	49
5.1.3	Histologie .....	50
5.1.4	Quantitative PCR.....	53
5.1.5	Mikrocomputertomographische Untersuchung ( $\mu$ CT) .....	59
5.2	Phase II: Knochen-Tissue Engineering im CSFD Modell nach Bestrahlung.....	60
5.2.1	Zellkultur .....	60
5.2.2	Aufbereitung der Zellen .....	61
5.2.3	Implantation der Konstrukte in Spendertiere.....	61
5.2.4	Bestrahlung.....	62
5.2.5	Setzung des CSFD.....	62
5.2.6	Explantation, Röntgen .....	63
5.2.7	Histologie .....	64
5.2.8	Mikrocomputertomographische Auswertung .....	75
5.2.9	Quantitative PCR.....	76
6	Diskussion .....	79
6.1	Evaluation Bestrahlungsprotokoll (Phase I) .....	79
6.1.1	Strahlungsart.....	79
6.1.2	Klinische Verträglichkeit.....	80
6.1.3	Auswirkungen auf das Knochenmark.....	80
6.1.4	Auswirkungen auf die Kortikalis.....	82
6.1.5	Auswirkungen auf die Gefäßstrukturen.....	82
6.1.6	Untersuchung der Genexpressionen .....	83
6.1.7	Zusammenfassende Beurteilung.....	86
6.2	Knochen-Tissue Engineering im CSFD Modell nach Bestrahlung (Phase II) .....	86

6.2.1	Beurteilung des Tiermodells.....	86
6.2.2	Klinische Evaluation .....	88
6.2.3	Knochenbildung .....	89
6.2.4	Vaskularisation und Zellüberleben.....	94
6.2.5	Entzündungsreaktion .....	96
7	Zusammenfassung .....	98
8	Summary .....	100
9	Literaturverzeichnis.....	102
10	Anhang .....	118
10.1	Primersequenzen.....	118
10.2	Protokoll Real Time PCR.....	118
10.3	Durchflusszytometrie .....	120
11	Danksagung .....	121
12	Erklärung.....	122

**Abkürzungsverzeichnis**

$\alpha$ SMA	Alpha Smooth Muscle Actin
$\mu$ CT	Mikrocomputertomographie
Abb	Abbildung
adMSC	Adipose tissue derived mesenchymal stem cell
ALP	Alkalische Phosphatase
ANOVA	Analysis of variance
APC	Allophycocyanin
bmMSC	Bone marrow derived mesenchymal stem cell
BMP	Bone morphogenetic protein
BSA	Bovines Serum-Albumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
Coll I	Collagen I
CSFD	Critical sized Femurdefektmodell
DAB	Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DFDBA	Demineralized freeze-dried bone allograft
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat,
ESC	Embryonic stem cell
FCS	Fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FGF	Fibroblast growth factor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase
HA	Hydroxyapatit
HCl	Salzsäure
Hif1 $\alpha$	Hypoxia-inducible factor 1 alpha
HLA	Human leucocyte antigen
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
iPS cell	Induced pluripotent stem cell
MACS	Magnetic (activated) cell sorting
MCP-1	Monocyte chemotactic protein 1
M-CSF	Macrophage colony stimulating factor
MHC	Major histocompatibility complex
MOH	Modulares Osteosynthese-System zur Handchirurgie
MSC	Mesenchymal stem cell (mesenchymale Stammzelle)
NaCl	Natriumchlorid
OC	Osteocalcin
OP	Osteopontin
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCL	Polycaprolacton
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	Platelet derived growth factor
PE	Phycoerythrin

---

PerCP	Peridinin-Chlorophyll
PGA	Polyglykolsäure
PLA	Polylactid
PLGA	Polylactid-Co-Glycolid
PPF	Polypropylenfumarat
PPIA	Peptidyl-Prolyl-Isomerase A
PRP	Platelet rich plasma
rhBMP	rekombinantes humanes BMP
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time PCR
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
Tab	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TCP	Tricalciumphosphat
TdT	Terminal desoxynucleotidyl transferase
TGF $\beta$	Transforming growth factor beta
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
USP	United States Pharmacopoeia
UV	Ultraviolett
VEGF	Vascular endothelial growth factor

***Einheiten***

°C	Grad Celsius
μA	Mikroampere
μg	Mikrogramm
μL	Mikroliter
μm	Mikrometer
Cm	Centimeter
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
G	Gauge
G	Gramm
Gy	Gray
IE	internationale Einheiten
kb, kbp	Kilobasen/-paare
keV	Kiloelektronenvolt
kV	Kilovolt
mAs	Milliamperesekunden
MeV	Megaelektronenvolt
Mg	Milligramm
mGy	Milligray
min/'	Minute(n)
mL	Milliliter
Mm	Millimeter
mM	Millimol
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
Nm	Nanometer
nM	Nanomol
Rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
s/'	Sekunde(n)
V	Volt

## ***1 Einleitung***

Große Knochendefekte kommen in klinischen Fällen beispielsweise nach schweren Traumata, Tumorsektionen oder Osteomyelitiden vor. Als therapeutischer Gold-Standard wird in Human- und Veterinärmedizin derzeit der Transfer von autologem Knochenmaterial (Autografts) gesehen. Die Nachteile dieser Methode sind jedoch einerseits die limitierte Verfügbarkeit von geeignetem Material, andererseits die dadurch entstehende Hebedefektmorbidität (donor site morbidity). Diese Problematik kann durch die Verwendung von in der Regel gefriergetrocknetem Knochenmaterial aus einem toten Individuum (Allograft, Xenograft) umgangen werden, jedoch mit dem Risiko der Übertragung von Krankheiten, der Immunogenität des eingesetzten Grafts selbst und der schlechteren osteogenen Eigenschaften.

Alternativ zur Verwendung von Autografts oder Allografts stehen in Human- und Veterinärmedizin zunehmend Verfahren aus dem Tissue Engineering im Fokus der Forschung, in denen durch organische oder anorganische Matrizes, körpereigene Vorläuferzellen und osteogene Wachstumsfaktoren die Knochenbildung induziert werden soll. Die Vorteile dieser Verfahren liegen in der Vermeidung der Hebedefektmorbidität sowie in der prinzipiell unbegrenzten Verfügbarkeit der entsprechenden Materialien.

Zahlreiche Studien belegen die vielversprechenden Ansätze aus diesem Bereich der regenerativen Medizin zur Heilung von großen Knochendefekten. Häufig handelt es sich jedoch um Studien an gesundem Knochengewebe, im Gegensatz zum meist vorgeschädigten Gewebe in klinischen Fällen. In der Literatur finden sich zahlreiche Modelle zur Bestrahlung von Rattenknochen, die Anwendung des Tissue Engineerings in derartigen Modellen stellt jedoch einen noch zu erforschenden Bereich dar.

Ziel dieser Studie war die Etablierung eines geeigneten, reproduzierbaren Modells eines vorgeschädigten Knochens sowie in einem zweiten Schritt die Evaluation von Verfahren aus dem Tissue Engineering zur Heilung eines Knochendefekts kritischer Größe in eben diesem Modell.

## **2 Literaturübersicht**

### **2.1 Grundlagen**

#### **2.1.1 Physiologische Knochenheilung**

##### **2.1.1.1 Primäre Knochenheilung**

Eine primäre Knochenheilung (Dimitriou et al., 2005; Newton und Nunamaker, 1985; Oryan, 2013; Sfeir et al., 2005) ist nur bei entsprechender anatomischer Rekonstruktion und geringer mechanischer Belastung des Frakturspalts möglich (Dimitriou et al., 2005; Newton und Nunamaker, 1985). Man unterscheidet Fälle, in denen kein Frakturspalt vorhanden ist (*contact healing*) und solche, bei denen der Frakturspalt sehr klein ist (*gap healing*) (Newton und Nunamaker, 1985; Oryan, 2013). Beim *contact healing* kommt es zur Ausbildung von kegelförmig angeordneten Osteoklastenaggregaten, sog. *cutting cones*, die einen Kanal in das benachbarte Fragment bohren (Newton und Nunamaker, 1985; Oryan, 2013). In diese Kanäle wandern aus einwachsenden, dünnen Kapillaren Osteoblasten-Vorläuferzellen ein, die sich differenzieren und neue Knochengrundsubstanz bilden (Newton und Nunamaker, 1985). Das Endresultat ist ein neues Osteon, das den Frakturspalt überbrückt. Beim *gap healing* ist vor diesem Prozess die Bildung von Knochengewebe im dünnen Frakturspalt notwendig, das jedoch eine andere Ausrichtung der Collagenfasern und Knochenlamellen aufweist als der ursprüngliche Knochen (Newton und Nunamaker, 1985). Im Unterschied zur sekundären Knochenheilung wird kein Bindegewebe oder fibrocartilaginöses Gewebe als Zwischenstufe (Kallus) gebildet (Newton und Nunamaker, 1985; Sfeir et al., 2005).

##### **2.1.1.2 Sekundäre Knochenheilung**

Die sekundäre Knochenheilung (Dimitriou et al., 2005; Newton und Nunamaker, 1985; Oryan, 2013; Schindeler et al., 2008; Sfeir et al., 2005) ist weitaus häufiger als die primäre Form. Es werden im Allgemeinen drei Phasen unterschieden:

###### *Entzündungsphase*

Die Entzündungsphase hat ihr Maximum 48 Stunden nach Entstehung des Defekts und hält ungefähr eine Woche an (Sfeir et al., 2005). Nach einem initialen Trauma (Fraktur, Operation) kommt es in Knochenmarkshöhle, Knochendefekt und unter dem Periost zur Ausbildung eines Hämatoms (Newton und Nunamaker, 1985). Innerhalb dieses Hämatoms kommt es zu einer Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus Thrombozytengranula

(Sfeir et al., 2005). Die dadurch angelockten Leukozyten phagozytieren nekrotisches Material und sezernieren ihrerseits weitere Botenstoffe (Oryan, 2013). Das Hämatom wird durch Einsprossung von Blutgefäßen und Phagozytose von Debris langsam zu Granulationsgewebe umgebaut (Schindeler et al., 2008). Zentrale Zytokine in dieser Phase sind insbesondere TGF $\beta$ , PDGF, FGF-2, VEGF, IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , M-CSF, IGF I und II sowie BMPs (Oryan, 2013; Schindeler et al., 2008; Sfeir et al., 2005). Dadurch werden unter anderem multipotente mesenchymale Stammzellen rekrutiert, die sich zu Fibroblasten, Angioblasten, Chondroblasten und Osteoblasten differenzieren und in weiterer Folge den Kallus bilden (Oryan, 2013).

### *Reparative Phase*

Die reparative Phase beginnt noch während der Entzündungsphase und hält einige Wochen lang an (Sfeir et al., 2005). Während dieser Phase kommt es zur Bildung des Kallus und dadurch zu einer zunehmenden Stabilisierung der Knochenenden (Newton und Nunamaker, 1985). In einigen Literaturquellen wird sie in die Bildung des weichen Kallus und die Kallushärtung/Bildung des harten Kallus unterteilt (Schindeler et al., 2008).

Zu Chondroblasten differenzierte mesenchymale Stammzellen infiltrieren zunächst das Granulationsgewebe und bauen es langsam zu Faserknorpel um. An Stellen mit insuffizienter Chondrogenese wird das Granulationsgewebe durch Fibroblasten zu straffem Bindegewebe umgebaut. Sowohl Fibroblasten als auch Chondroblasten werden durch TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3, PDGF, FGF-1 und IGF zur Proliferation und Differenzierung angeregt (Schindeler et al., 2008). Die Anwesenheit von BMPs stimuliert in Chondroblasten die Bildung von Knorpelgrundsubstanz, die zunächst großteils aus Glykosaminoglykanen und im weiteren Verlauf zunehmend aus Collagen II und X besteht (Newton und Nunamaker, 1985; Oryan, 2013; Schindeler et al., 2008). Des Weiteren fördern die proangiogenen Zytokine VEGF, BMPs, FGF-1 und TGF $\beta$  die Vaskularisation des weichen Kallus (Schindeler et al., 2008). Nach Abschluss der Faserknorpelbildung hypertrophieren die Chondrozyten, mineralisieren die Knorpelmatrix und werden dann apoptotisch (Schindeler et al., 2008). Die Bildung des weichen Kallus hat in Ratten ihr Maximum nach 7-9 Tagen (Oryan, 2013).

Im zweiten Abschnitt der reparativen Phase wird der kalzifizierte Knorpel langsam abgebaut und durch Knochen ersetzt, ähnlich der endochondralen Ossifikation in den Epiphysenfugen (Newton und Nunamaker, 1985; Sfeir et al., 2005). Voraussetzung dafür ist eine ausreichende Stabilität im weichen Kallus (Schindeler et al., 2008). Aus den

einsprossenden Gefäßen wandern Osteoblasten ein, die Knochensubstanz bilden und die abgebaute Knorpelmatrix durch Geflechtknochen ersetzen (Sfeir et al., 2005).

### *Remodeling*

In der letzten Phase der Knochenheilung, die sich über Monate oder gar Jahre erstreckt, wird der Geflechtknochen im Kallus zu reifer Spongiosa oder Kortikalis umgebaut (Oryan, 2013). Die durch Zytokine wie  $TNF\alpha$ , BMPs,  $TGF\beta$  oder Interleukine angeregten Osteoklasten bauen den gebildeten Knochen teilweise ab, was unter anderem zu einer Abnahme des Durchmessers des Kallus führt (Oryan, 2013). Gleichzeitig lagern Osteoblasten neue Knochengrundsubstanz und Kalziumphosphat ab und steigern so die Knochendichte (Oryan, 2013; Schindeler et al., 2008). Die Knochen trabekel richten sich entlang der Zug- und Drucklinien aus, bis die vollständige Stabilität des Knochens wieder hergestellt ist (Newton und Nunamaker, 1985; Sfeir et al., 2005).

## **2.1.2 Entstehung von Knochendefekten**

### **2.1.2.1 Frakturen**

Größere Knochendefekte können im Rahmen von Frakturen durch Substanzverlust durch das initiale Trauma oder - bei stumpfen Traumata - durch Entfernen von devitalisiertem Knochenmaterial bei der chirurgischen Versorgung entstehen. In der Humanmedizin stellen Frakturen mit deutlichem Substanzverlust ein eher seltenes Problem dar, mit einer Inzidenz von 0,4% aller Frakturen und 11,8% der offenen Frakturen (Keating et al., 2005). In der Kleintiermedizin hingegen stellen Trümmerfrakturen beispielsweise durch Autounfälle eine häufige Frakturform dar (Newton und Nunamaker, 1985). Auch bei Pferden kommt es öfters zu sogenannten *high energy injuries* und zur Entstehung von Trümmerfrakturen (Kraus et al., 2004; McClure et al., 1998). Da die distalen Gliedmaße nur wenig durch Weichteile geschützt ist, kommt es hier außerdem häufiger zu offenen Frakturen mit einem entsprechend höherem Infektionsrisiko (McClure et al., 1998).

### **2.1.2.2 Osteomyelitiden**

Infektionen des Knochens sind in den meisten Fällen bakteriell verursacht, nur selten treten Mykosen auf (Schulz, 2013). Am häufigsten kommen beim adulten Tier und Menschen posttraumatische Osteomyelitiden nach offenen Frakturen, Infektionen der umliegenden Weichteile oder nach chirurgischer Versorgung von geschlossenen Frakturen vor (Hatzenbuehler and Pulling, 2011; Newton und Nunamaker, 1985). Hämatogene

Osteomyelitiden treten vor allem bei Kleinkindern und neugeborenen Tieren auf; sie sind beim Kleintier selten, stellen jedoch bei Fohlen in Zusammenhang mit Septikämie und septischen Polyarthritiden ein Problem dar (Hatzenbuehler and Pulling, 2011; Newquist and Baxter, 2009; Newton und Nunamaker, 1985; Schulz, 2013). Zusätzlich zur medikamentösen Therapie stellt das chirurgische Debridement osteomyelitischer Areale und die Entfernung entstandener Sequester einen wichtigen Behandlungspfeiler dar (Schulz, 2013), was wiederum eine Rekonstruktion der Knochenstruktur notwendig macht.

### **2.1.2.3 Ausbleiben der physiologischen Knochenheilung**

#### *Delayed union*

Die für die Heilung eines Knochendefekts benötigte Zeit ist abhängig vom Alter des Patienten, involviertem Knochen, Art der Fraktur, Vorliegen einer Infektion, Reduktion und Ruhigstellung, verabreichten Medikamenten, systemischen Faktoren wie Anämien und dem mit der Fraktur einhergehendem Weichteiltrauma sowie in der Veterinärmedizin Tierart und Rasse (Johnson, 2013; Lopez, 2012; Newton und Nunamaker, 1985). Von *delayed union* (verzögerter Heilung) spricht man, wenn nach einer an diese Faktoren angepassten Zeit noch keine Heilung eingetreten ist (Newton und Nunamaker, 1985). Röntgenologisch zeigt sich dies als persistierender Knochendefekt, geringe Kallusbildung und intramedulläre Sklerose (Lopez, 2012). Physiotherapeutische Maßnahmen, gepaart mit einer Stabilisierung der Fraktur und Implantation osteogener Substanzen (Knochengrafts, Knochenersatzstoffe etc.), können hier angezeigt sein (Johnson, 2013; Lopez, 2012).

#### *Nonunion*

Kommt die Knochenheilung vor der Wiederherstellung der knöchernen Struktur zum Erliegen, spricht man von *nonunion* (ausbleibender Heilung, häufig auch als Pseudoarthrose bezeichnet) (Lopez, 2012; Newton und Nunamaker, 1985). Der häufigste Grund für eine ausbleibende Knochenheilung ist eine inadäquate chirurgische Versorgung und dementsprechend hohe Instabilität im Bereich des Knochendefekts (Johnson, 2013). Die Differenzierung zwischen einer verzögerten und einer ausbleibenden Heilung basiert auf wiederholten Röntgenaufnahmen, auf denen sich bei einer Nonunion keine Veränderungen im Sinne einer fortschreitenden Heilung zeigen. Man unterscheidet hypervaskuläre/hypertrophische, oligotrophische und avaskuläre/atrophische Nonunions. Hypertrophischen Nonunions benötigen zumeist zusätzliche Stabilisierung, beispielsweise durch die Implantation einer Kompressionsplatte. Bei atrophischen Nonunions ist zusätzlich

die Implantation osteogener Substanzen notwendig, um die Knochenheilung zu stimulieren (Johnson, 2013; Lopez, 2012).

#### **2.1.2.4 Neoplasien**

Primäre maligne Knochentumoren kommen in der Humanmedizin entweder als primäre Knochenneoplasien (zumeist Sarkome) oder als Knochenmetastasen anderer maligner Tumoren vor (Moriceau et al., 2010). In der Veterinärmedizin treten vorwiegend primäre Neoplasien bei großen Hunderassen auf, Knochenmetastasen anderer Neoplasien sind selten (Misdorp and Van der Heul, 1976). Die weitaus häufigste Tumorform ist hier mit ungefähr 80% das Osteosarkom (Szewczyk et al., 2015), mit einer geschätzten Inzidenz von 7,9 - 13,9 Fällen pro 100.000 Tiere (Newton und Nunamaker, 1985; Rowell et al., 2011); seltener kommen Chondrosarkome, Hämangiosarkome, Fibrosarkome und Hämangiosarkome vor (Schulz, 2013). Aufgrund der Malignität der meisten Knochenneoplasien stellt die radikale chirurgische Exzision einen wichtigen Teil der Behandlung dar (Schulz, 2013; Szewczyk et al., 2015), was bei Gliedmaßen-erhaltenden Resektionen des Tumors (alternativ zur Amputation der Gliedmaße) eine anschließende Rekonstruktion des Knochens notwendig macht. Die teilweise mit der chirurgischen Tumorthherapie verbundene Bestrahlung kann außerdem zu Radionekrosen und damit ihrerseits zu Knochendefekten führen (Hosoya et al., 2008).

#### **2.1.2.5 Knochenzysten**

In der Veterinärmedizin kommen Knochenzysten bei Hunden und Katzen selten vor und verursachen häufig keine klinischen Symptome (Biller et al., 1987; Newton und Nunamaker, 1985). Größere Knochenzysten können jedoch eine chirurgische Entfernung nötig machen (Newton und Nunamaker, 1985). Weitaus häufiger sind subchondrale Knochenzysten bei Pferden, insbesondere im medialen Femurkondylus (45,8% der Fälle), aber auch in den Phalangen, den Karpalknochen und im Rohrbein (Rechenberg, 1998). Die Behandlung beinhaltet häufig die chirurgische Kürettage des Defekts (Fowlie, 2012; McIllwraith, 2010), was insbesondere bei großen Zysten zu einem empfindlichen Defekt in der Gelenkoberfläche führt.

In der Humanmedizin kommen Knochenzysten vorwiegend bei Kindern und Jugendlichen vor. Man unterscheidet unikamerale und aneurysmale Zysten, mit einer Prävalenz von je 0,3 auf 100.000 Individuen. Jungen haben ein geringfügig höheres Erkrankungsrisiko als Mädchen (Zehetgruber et al., 2005). Bei Erwachsenen kommen Knochenzysten

beispielsweise nach totalem Gelenkersatz in Tibia, Talus oder Fibula vor. Die chirurgische Resektion dieser Zysten in Verbindung mit einer Rekonstruktion stellt derzeit die Therapie der Wahl dar (Gross et al., 2015).

#### **2.1.2.6 Korrekturen von Malformationen**

Die Möglichkeiten zur Korrektur von angeborenen oder erworbenen Knochenmalformationen beinhalten unter anderen Osteotomien und Ostektomien (Johnson, 2013). Knochendefekte entstehen hierbei beispielsweise beim Entfernen von Knochenkeilen (*opening wedge osteotomy*) (Newton und Nunamaker, 1985).

### **2.2 Therapiemöglichkeiten**

Zur Behandlung ausgedehnter Knochendefekte stehen in Humanmedizin und Veterinärmedizin verschiedene Knochengrafts und Knochenersatzmaterialien zur Verfügung. Der Erfolg der Therapie ist abhängig von osteogenen, osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften des implantierten Materials. Osteogenität bezeichnet die Fähigkeit zur Knochenbildung im eingesetzten Material durch bereits darin enthaltene Knochenvorläuferzellen. Osteoinduktion bezeichnet die Knochenbildung im eingesetzten Material durch Anziehung, Stimulierung und Differenzierung mesenchymaler Vorläuferzellen, während bei der Osteokonduktion das eingesetzte Material als Grundlage für das Einwachsen des umgebenden Knochengewebes dient und die Geschwindigkeit der Osteointegration, d.h. das Überbrücken der Grenze zwischen eingesetztem Material und umgebendem Knochengewebe, bestimmt (Johnson, 2013).

#### **2.2.1 Knochentransplantate**

##### **2.2.1.1 Autografts**

Autografts bezeichnen Knochentransplantate aus einem Knochen desselben Individuums und stellen derzeit in Human- und Veterinärmedizin aufgrund ihrer exzellenten osteogenen, osteoinduktiven, osteokonduktiven und immunologischen Eigenschaften den Gold-Standard in der Behandlung ausgedehnter Knochendefekte dar (Johnson, 2013; Rosset et al., 2014; Sfeir et al., 2005). Autografts liefern Wachstumsfaktoren und einen Hydroxyapatit-Scaffold für die Knochenheilung im Defekt (Sfeir et al., 2005). Obgleich 90% der Knochenzellen im Graft die Transplantation nicht überleben, tragen die verbleibenden vitalen Osteoblasten zur Osteogenese im Defekt bei (Auer, 2012). Meist handelt es sich beim transplantierten Knochenmaterial um Spongiosa, die bei Kleintieren aus dem proximalen Humerus, der

proximalen Tibia oder dem Darmbeinflügel sowie beim Pferd aus dem Tuber coxae, dem Sternum oder der Tibia entnommen wird (Auer, 2012; Johnson, 2013). Beim Menschen erfolgt die Entnahme meist aus Becken oder Radius sowie bei vaskularisierten Knochengrafts aus der Fibula, Becken oder der Scapula (Finkemeier, 2002; Valentini et al., 2009). Kortikalis findet gelegentlich als struktureller Graft (sog. *strut graft*) zur Stabilisierung und Augmentation Verwendung, beispielsweise bei der Rekonstruktion einer Mandibulafraktur mithilfe eines Rippensegments (Johnson, 2013). Die Nachteile bei der Verwendung von Autografts sind die verlängerte Operationszeit, das Risiko der Hebedefektmorbidität (*donor site morbidity*; Schmerzen, Serombildung, Infektionen, Frakturen, Narbenbildung) sowie die limitierte Verfügbarkeit und Formbarkeit der Transplantate, insbesondere in kleinen und älteren Patienten (Johnson, 2013; Sfeir et al., 2005).

### 2.2.1.2 Allografts

Als Allograft wird Knochengewebe aus einem anderen Individuum der gleichen Spezies bezeichnet; diese Form des Knochentransplantats kann nicht nur aus lebenden Individuen, sondern innerhalb von 24 Stunden auch nach dem Tod des Spenders entnommen werden (Moucha et al., 2007), was die Problematik der Hebedefektmorbidität umgeht und zu einer hohen Verfügbarkeit führt. Außerdem verkürzt sich im Vergleich zur Verwendung von Autografts die Operationszeit (Johnson, 2013). Prinzipiell kann allogenes ebenso wie autologes Knochengewebe frisch transplantiert oder eingefroren werden; die meisten Allografts werden jedoch lyophilisiert und teilweise zusätzlich demineralisiert (*freeze-dried bone allograft*, FDBA; *demineralized freeze-dried bone allograft*, DFDBA; Grover et al., 2011), da eine Immunreaktion des Empfängers auf die eingesetzte fremde Knochensubstanz dadurch vermindert werden kann (Friedlaender et al., 1976). Bei korrekter Anwendung der Lyophilisation kann der Allograft außerdem jahrelang gelagert werden, ohne seine biologischen Eigenschaften zu verlieren (Moucha et al., 2007). Durch das Fehlen vitaler Zellen im Graft sind die osteoinduktiven Eigenschaften gering; dies kann durch Kombination mit einem Autograft teilweise ausgeglichen werden (Johnson, 2013). Alternativ dazu setzt die Demineralisation bei erhaltener Osteokonduktivität osteoinduktive Wachstumsfaktoren im Knochen (*bone morphogenetic proteins*) frei und reduziert außerdem die Immunogenität des Produkts (Grover et al., 2011; Johnson, 2013). Ein weiterer Nachteil von Allografts ist das Risiko der Krankheitsübertragung (Marx und Carlson, 1993); eine Sterilisation, z.B. durch Gammastrahlung, sowie Verarbeitungstechniken wie die Lyophilisation vermindern dieses

Risiko deutlich, verändern jedoch auch die mechanischen und biologischen Eigenschaften des Grafts (Moucha et al., 2007).

### **2.2.1.3 Xenografts**

Ein Knochengewebestransplantat aus einem Individuum einer anderen Spezies wird als Xenograft bezeichnet. Meist werden, bedingt durch die hohe Verfügbarkeit, Produkte porcinen oder bovinen Ursprungs verwendet (Laurencin und El-Amin, 2008), mit teils sehr guten Ergebnissen in Hinblick auf die Knochenregeneration (Athanasίου et al., 2010; Bigham et al., 2008). Wie bei Allografts scheinen jedoch die knochenbildenden Eigenschaften etwas schlechter zu sein als jene von Autografts (Athanasίου et al., 2010). Die Übertragung von Zoonosen, beispielsweise von Viren oder Prionen, stellt hierbei ebenso wie bei Allografts ein geringes, aber nicht völlig zu eliminierendes Sicherheitsrisiko dar (Sogal und Tofe, 1999; Yoo und Giulivi, 2000).

## **2.2.2 Regenerative Medizin und Tissue Engineering**

Die regenerative Medizin als relativ neues interdisziplinäres Gebiet der Biomedizin beschäftigt sich mit der Erforschung neuer Möglichkeiten zur Regeneration, Heilung oder zum Ersatz von Zellen, Geweben oder Organen mit dem Ziel der funktionellen Wiederherstellung. Einige Methoden aus der regenerativen Medizin sind der Einsatz löslicher Moleküle, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, Gentherapie, Stammzelltransplantation und das Reprogrammieren von Zellen (Greenwood et al., 2006).

Das Tissue Engineering (Gewebekonstruktion, Gewebezüchtung) stellt eine Sparte der regenerativen Medizin dar, mit dem Ziel der Anzüchtung eines vollständigen Gewebersatzes mithilfe einer Kombination von Biomaterialien, Zellen und biochemischen und biomechanischen Faktoren (Auer, 2012; Correia et al., 2014). Die Heilung von Knochendefekten stellt dabei eines der wichtigsten Anwendungsgebiete des Tissue Engineerings dar (Correia et al., 2014).

### **2.2.2.1 Biomaterialien**

Biomaterialien stellen im Knochen Tissue Engineering als dreidimensionales Grundgerüst (Scaffold) eine wichtige Komponente des neu gebildeten Gewebes dar. Der optimale Scaffold bietet dabei mechanische Unterstützung, ermöglicht die Zelladhäsion und -differenzierung und beeinflusst für die Osteogenese und Angiogenese wichtige zelluläre Signalwege (Alvarez,

2009; Kneser et al., 2006). Zentrale Faktoren sind hierbei die Biokompatibilität, mechanischen Eigenschaften, Porosität und biologische Abbaubarkeit (Bose et al., 2012).

Metalle, wie beispielsweise Titan oder Tantalum, weisen sehr gute mechanische Eigenschaften auf und können als poröse Scaffolds hergestellt werden (Balla et al., 2010; Dabrowski et al., 2010). Durch Oberflächenmodifikation kann dem Problem der mangelnden Bioaktivität begegnet werden (Bose et al., 2009). Der Nachteil von metallischen Scaffolds ergibt sich aus der mangelnden Abbaubarkeit. Dieses Problem umgehen Materialien aus resorbierbaren Magnesium-Legierungen, die gute osteoinduktive Eigenschaften bei gleichzeitig guter Biokompatibilität aufweisen (Witte et al., 2007a; Witte et al., 2007b).

Bioglass (bioaktives Glas) beschreibt eine Gruppe von Silicium-Oxid-Verbindungen, die in unterschiedlichem Ausmaß Calcium und Phosphat beinhalten. Die ursprüngliche Formulierung (45% Siliciumoxid, 24,5% Calciumoxid, 24,5% Natriumoxid, 6% Phosphorpentoxid) ist bereits kommerziell verfügbar (z.B. PerioGlas ®, Novabone). Bei Kontakt mit biologischen Flüssigkeiten bildet sich an ihrer Oberfläche rasch eine Hydroxyapatit-Schicht, die eine Angriffsfläche für das umliegende Gewebe bildet (Stevens, 2008). Bioglass stimuliert die Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten und die Produktion angiogener Wachstumsfaktoren wie VEGF und FGF in vitro und fördert die Knochen- und Gefäßbildung in vivo (Day, 2005; Detsch et al., 2014; Tsigkou et al., 2009; Valimaki et al., 2005; Xynos et al., 2000). Durch Dotierung mit Spurenelementen wie Kupfer oder Cobalt können die angiogenen und osteogenen Eigenschaften von Bioglass zusätzlich modifiziert werden (Rath et al., 2014; Wu et al., 2012; Zhao et al., 2015). Außerdem kann Bioglass mit Wachstumsfaktoren wie VEGF oder BMP beladen werden und somit als Release-System fungieren (s. auch Abschnitt „osteinduktive Faktoren“) (Liu et al., 2013; Wu et al., 2013). Ein großer Nachteil von Bioglass ist seine mangelnde mechanische Stabilität, was seinen Einsatz in gewichtstragenden Strukturen stark limitiert (Stevens, 2008).

Calciumphosphat-basierte Keramiken sind weit verbreitete Materialien im Knochen Tissue Engineering und bestehen meist aus Hydroxyapatit ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ), Tricalciumphosphat ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) oder einer Mischung aus diesen beiden Substanzen (Auer, 2012). Wie Bioglass sind einige dieser Keramiken bereits als Produkte für die klinische Anwendung auf dem Markt (z.B. Actifuse ®, Baxter; ChronOs ®, Synthes) (Horch et al., 2014).

Calciumphosphat-Keramiken imitieren die anorganische Komponente des Knochens, die zu 60-70% aus Hydroxyapatit besteht (Ng et al., 2005). Sie sind sehr spröde und besitzen daher eine geringe Festigkeit bei Zugbeanspruchung, bei gleichzeitig guter Druckfestigkeit. Die mechanischen Eigenschaften werden von Faktoren wie Porosität, chemischer Zusammensetzung und Kristallgröße wesentlich bestimmt und unterscheiden sich daher zwischen den einzelnen Materialien (Auer, 2012).

In vitro fördern Hydroxyapatit (HA) und Tricalciumphosphat (TCP) die osteogene Differenzierung von Stammzellen und wirken somit osteoinduktiv. Dabei scheint HA die Differenzierung stärker zu fördern als TCP, während auf TCP kultivierte Stammzellen stärker proliferieren (Lee et al., 2011; Lin et al., 2009). In Osteoblasten-Kulturen scheint HA sowohl die Proliferation als auch die Differenzierung stärker zu stimulieren als TCP (Shu et al., 2003; Wang et al., 2004). Calciumphosphat-Keramiken wirken in vivo außerdem gut osteokonduktiv. TCP scheint hierbei das Einwachsen von Knochengewebe besser zu ermöglichen als HA (Onodera et al., 2014; Roj bani et al., 2011). Durch die Zugabe von Silicium können Osteokonduktivität und Mineralisation von HA jedoch gesteigert werden (Hing et al., 2006). TCP kann vom Körper gut um- und eingebaut werden, wobei die Resorption von  $\alpha$ -TCP etwas schneller erfolgt als jene von  $\beta$ -TCP (Ng et al., 2005; Roj bani et al., 2011). HA hingegen wird nur langsam abgebaut (Hwang et al., 2012; Johnson, 2013; Roj bani et al., 2011). Die Kombination aus HA und TCP (biphasisches Calciumphosphat, BCP) scheint in Hinblick auf Abbauverhalten und Knochenbildung den jeweiligen Stoffen in Reinform überlegen zu sein (Hwang et al., 2012; Yang et al., 2014).

Eine Vielzahl von Polymeren wurde bisher als Matrix für die Schaffung von Knochenersatzgeweben eingesetzt. Natürliche Polymere inkludieren Collagen, Fibrin, Alginat, Seide, Hyaluronsäure und Chitosan (Lee und Shin, 2007). Synthetische Polymere sind zum Beispiel Polyglycolsäure (Polyglycolic acid, PGA), Polylactid (Polylactic acid, PLA), Polycaprolacton (PCL) oder Polypropylen-Fumarat (PPF) (Bose et al., 2012). Aufgrund der Vielzahl an Ausgangsstoffen sowie der mindestens ebenso großen Vielfalt der Verarbeitungstechniken (zusammengefasst in (Razak et al., 2012; Sabir et al., 2009) können ihre Eigenschaften nur schlecht miteinander verglichen werden. Während beispielsweise Alginat oder Fibrin ein Hydrogel bilden (Park et al., 2009; Rottensteiner et al., 2014), besitzen PGA und PLA eine hohe mechanische Festigkeit (Razak et al., 2012). Polymere können miteinander, mit Calciumphosphat-Keramiken oder Bioglass kombiniert (Kim et al., 2006; Kim und Kim, 2015; Rottensteiner et al., 2014; Wahl und Czernuszka, 2006), mit

osteoinduktiven Wachstumsfaktoren oder Zellen beladen werden (Blackwood et al., 2012; Ko und Cho, 2013).

### 2.2.2.2 Osteogene Zellen

Im Knochen Tissue Engineering kommen sowohl Primärzellen aus dem Zielorgan als auch Stammzellen zum Einsatz (Auer, 2012).

Primäre Osteoblasten können aus Knochenstückchen oder aus dem Periost isoliert werden (Bakker und Klein-Nulend, 2012; Wiesmann et al., 2003). Insbesondere Schädelknochen stellen eine gute Quelle für diese Zellart dar, während Osteoblasten aus Röhrenknochen ein schlechteres Wachstumsverhalten in vitro aufweisen (Declercq et al., 2004). Die Gewinnung von Knochengewebe am lebenden Individuum stellt jedoch eine relativ invasive Form der Zellgewinnung dar und umgeht bei einem autologen Ansatz nicht die Problematik der Hebedefekt morbidity. Zudem besitzen sie mit ungefähr 30 Zellteilungen eine vergleichsweise geringe Proliferationskapazität, was ihre Verwendung in größeren Defekten limitiert (De Bari et al., 2006; Marolt et al., 2010).

Weniger invasiv stellt sich die Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen dar (*mesenchymal stem cells*, MSCs, häufig auch als mesenchymale Stromazellen bezeichnet). Dies sind Vorläuferzellen im Bindegewebe praktisch aller Organe, werden aber meist aus Knochenmark, Fettgewebe oder Nabelschnurblut/-gewebe gewonnen (Auer, 2012; Fossum, 2013). Aufgrund dieser Heterogenität und der mitunter unklaren Begriffsverwendung wurden für humane MSCs Kriterien festgelegt, die sie als solche definieren (Dominici et al., 2006):

- Sie müssen unter Standard-Kulturbedingungen an Plastik adhärent wachsen.
- Sie müssen die Oberflächenmarker CD105, CD73 und CD90 exprimieren, bei gleichzeitiger Abwesenheit von CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 $\alpha$  oder CD19 und HLA-DR.
- Ihre osteogene, chondrogene und adipogene Differenzierungsfähigkeit muss nachweisbar sein (Multipotenz).

Diese osteogene Differenzierungsfähigkeit macht MSCs zu einer interessanten Option im Knochen Tissue Engineering. MSCs aus dem Knochenmark scheinen hierbei bei Menschen, Ratten und Pferden das höchste osteogene Potential zu besitzen, während beim Hund jene aus Fettgewebe und Nabelschnurblut bessere osteogene Kapazität zu haben scheinen (Burk et al., 2013; Peng et al., 2008; Shafiee et al., 2011; Toupadakis et al., 2010). Im Vergleich zu aus

Knochen isolierten Osteoblasten besitzen MSCs mit ungefähr 50 Zellteilungen ein höheres Proliferationsvermögen *in vitro*, was ihre Expansion für die Verwendung in größeren Defekten einfacher macht (Bianco et al., 2001).

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben zur Immunogenität von MSCs. Mesenchymale Stammzellen exprimieren Moleküle des MHC I sowie in unterschiedlichem Ausmaß Moleküle des MHC II und können diese Expression bei Anwesenheit proinflammatorischer Zytokine steigern (Schnabel et al., 2014). Aus diesem Grund können sie eine Immunreaktion im Sinne einer Abstoßung bei allogener Transplantation auslösen. Gleichzeitig scheinen sie jedoch starke immunmodulatorische Eigenschaften zu besitzen (Aggarwal und Pittenger, 2005; Di Nicola et al., 2002; Nasef et al., 2007). Einige Studien beurteilten ihre *in vivo* Verträglichkeit nach allogener Implantation als sehr gut (Arinzeh et al., 2003; Guest et al., 2008), was auf die Immunmodulation zurückzuführen sein könnte.

Pluripotente Stammzellen kommen natürlicherweise als embryonale Stammzellen in Blastozysten vor (*embryonic stem cells*, ESCs; Fossum, 2013), können aber seit einigen Jahren auch durch Reprogrammierung aus differenzierten Zellen induziert werden (*induced pluripotent stem cells*, iPS cells; Takahashi und Yamanaka, 2006). Die Gewinnung und Kultivierung von ESCs und iPS-Zellen stellt deutlich höhere Ansprüche als jene von MSCs (Okita et al., 2007; Schwartz et al., 2011).

ESCs und iPS Zellen besitzen jedoch unter geeigneten Kulturbedingungen eine praktisch unbegrenzte Proliferationskapazität und können auch nach langer Zeit in Kultur zu Zellen aller drei Keimblätter differenzieren, was sie immer mehr in den Fokus des Tissue Engineerings rücken lässt (Marion et al., 2009; Thomson et al., 1998). Pluripotente Stammzellen scheinen ein höheres osteogenes Potential zu besitzen als mesenchymale Stammzellen (Ardeshirylajimi et al., 2014). Die Methoden zur Gewinnung einer 100% differenzierten Reinkultur aus pluripotenten Zellen müssen derzeit jedoch noch verbessert werden, auch in Hinblick auf das Risiko der Teratombildung bei Implantation undifferenzierter Zellen (Li et al., 2008; Yu et al., 2015).

Im undifferenzierten Zustand exprimieren ESCs wenige MHC I Moleküle und praktisch keine MHC II Moleküle. Die Stimulation mit dem proinflammatorischen Zytokin Interferon  $\gamma$  sowie die spontane Differenzierung induzieren jedoch die Expression von MHC I Molekülen (Drukker et al., 2002). Die daraus resultierende Immunogenität ist jedoch wie bei MSCs noch nicht vollkommen klar: Während eine Arbeitsgruppe eine immunmodulatorische und kaum

vorhandenen immunogene Wirkung von ESCs beschreibt (Li et al., 2004a), kommen andere zum Ergebnis, dass ESCs sowohl im allogenen als auch im xenogenen Setting eine Immunreaktion hervorrufen (Grinnemo et al., 2006; Kofidis et al., 2005).

### 2.2.2.3 *Osteoinduktive Faktoren*

Osteoinduktive Faktoren besitzen die Fähigkeit, die Proliferation und Differenzierung vorhandener osteogener Zellen zu steuern und weitere Vorläuferzellen anzulocken (Kneser et al., 2006). Meist handelt es sich dabei um Wachstumsfaktoren. Diese können entweder als Mischung, wie beispielsweise als PRP (platelet rich plasma), oder einzeln angewendet werden, wie zum Beispiel BMPs oder VEGF (Kneser et al., 2006). Die Nachteile dieser Wachstumsfaktoren sind unter anderem der meist teure Herstellungsprozess und ihre mangelhafte Stabilität der Proteine (Aravamudhan et al., 2013). Alternativ werden sogenannte *small molecules* (niedermolekulare Verbindungen) eingesetzt, die in der Zelle bestimmte Signalwege initiieren und damit osteoinduktiv wirken können. In Bezug auf die Knochenregeneration sind dies beispielsweise Melatonin, Resveratrol oder Purmorphamin (Aravamudhan et al., 2013).

BMPs als bereits klinisch erprobte Wachstumsfaktoren sind Bestandteil des TGF $\beta$ -Signalwegs (Johnson, 2013). Von den ungefähr 20 bekannten BMPs besitzen BMP-2, 4, 6, und 7 starke osteoinduktive Eigenschaften (Ratko et al., 2010). Diese sind teilweise als rekombinante Form bereits kommerziell verfügbar und in klinischen Studien mit Erfolg getestet (Dimar et al., 2006; Khan und Lane, 2004). Ihre Immunogenität ist sehr niedrig und beeinflusst nicht ihre Wirkung in vivo (Hwang et al., 2009; Johnson, 2013). Bei einfacher Injektion diffundieren die Wachstumsfaktoren aber rasch in das umliegende Gewebe, was ihre Wirksamkeit limitiert, die für die Osteoinduktion notwendige Menge erhöht und somit auch das Risiko für Nebenwirkungen steigert (Carragee et al., 2011; Carter et al., 2008; Kneser et al., 2006). Dies versucht man durch die Verwendung eines Release-Systems zu verbessern, das den Wirkstoff über einen längeren Zeitraum freisetzt. Das derzeit am häufigsten in der Klinik verwendete Release-System besteht aus RinderCollagen (InductOs<sup>®</sup>, Pfizer; OP1<sup>®</sup>, Stryker Biotech; InFUSE<sup>®</sup>, Medtronic usw.), in der Literatur finden sich jedoch zahlreiche alternative Systeme, die teilweise auch als Scaffold fungieren, wie Fibrin (Buehrer et al., 2015), Alginat-Hydrogel (Kolambkar et al., 2011) oder Heparin-konjugiertem Fibrin (Yang et al., 2010) sowie synthetischen Materialien wie Polyurethan (Brown et al., 2011), PCL/Seide-Mischungen (Diab et al., 2012) oder PLGA (Polylactid-Co-Glycolid (Jung et al., 2012)).

Um die Problematik der teuren Herstellung und aufwendigen Lagerung von Wachstumsfaktoren zu umgehen, wurden verschiedene Methoden entwickelt, um Zellen im Defekt die benötigten Proteine produzieren zu lassen. Diese beruhen auf dem Einbringen von BMP-2 DNA in Form einer Transfektion oder Transduktion, entweder durch direkte Applikation der DNA in vivo oder durch Implantation von Zellen, die in vitro genetisch verändert wurden (Samee et al., 2008; Wegman et al., 2011; Zhu et al., 2004).

## **2.3 Grundlagen der Strahlenbiologie**

### **2.3.1 Biochemische Auswirkungen ionisierender Strahlung**

Der eigentliche strahlenempfindliche Ort einer Eukaryontenzelle ist der Zellkern. Durch Strahlung können die Moleküle der DNA direkt ionisiert werden (direkter Effekt); dieser Effekt tritt jedoch im Falle von Röntgenstrahlung kaum auf (Fajardo et al., 2001; Hall und Giaccia, 2006). Wesentlich häufiger geschieht die Schädigung indirekt durch die Bildung freier Radikale, beispielsweise Hydroxylradikale aus ubiquitären Wassermolekülen, die dann in weiterer Folge mit empfindlichen Biomolekülen wie der DNA oder der Kernmembran reagieren (Fajardo et al., 2001). Ungefähr zwei Drittel der DNA-Schädigung ist auf die Wirkung von Hydroxylradikalen zurückzuführen (Hall und Giaccia, 2006).

Während einer in der Radiotherapie typischen Bestrahlungssitzung von 2 Gray (Gy) entstehen pro Zelle ungefähr 3000 DNA-Läsionen (Lomax et al., 2013). Entscheidend für die biologische Wirkung der ionisierenden Strahlung ist, in welcher Dichte diese Veränderungen induziert werden. Zwei oder mehr Schädigungen innerhalb von 1-2 helikalen Schleifen werden als „clustered DNA damage“ bezeichnet und stellen ein signifikantes Hindernis für die zellulären Reparaturmechanismen dar, da die jeweiligen Reparaturmechanismen durch das Vorliegen anderer Schäden gehemmt werden (Lomax et al., 2013; Shikazono et al., 2009). Ein Beispiel für einen solchen „clustered DNA damage“ sind Doppelstrangbrüche sowie nahe beieinander liegende Einzelstrangbrüche, Basenmodifikationen, Veränderungen des Zuckergerüsts oder AP-Stellen (apurinic/apyrimidinic site, Verlust einer Purin- oder Pyrimidinbase) (Shikazono et al., 2009).

Durch die Akkumulierung von nicht reparierten DANN-Schäden wird ein Teil der bestrahlten Zellen apoptotisch, andere verlieren ihre Fähigkeit, sich zu teilen (Fajardo et al., 2001). Die Empfindlichkeit der jeweiligen Zelle ist abhängig von der mitotischen Aktivität (Pacheco und Stock, 2013). Die empfindlichste Phase der Mitose sind hierbei die M- und G2

Phase, weniger sensibel sind Zellen in der G1- und S-Phase sowie ruhende Zellen (Hall und Giaccia, 2006). Somit ergeben sich für unterschiedlich mitotisch aktive Gewebe unterschiedliche Strahlenempfindlichkeiten.

### **2.3.2 Auswirkungen ionisierender Strahlung auf den Knochen**

Da im Knochen Zellpopulationen mit zum Teil stark variierendem Turnover vorkommen, unterscheiden sie sich in ihrer Strahlenempfindlichkeit erheblich voneinander.

#### *Knochengewebe*

Bei der Bestrahlung von Knochengewebe muss unterschieden werden zwischen einmaligen niedrigdosierten Bestrahlungen im Bereich von 1 Gy, die die Kallusbildung, Mineralisierung und Frakturheilung fördern (Chen et al., 2014; Zhou et al., 2009), und höheren Strahlendosen wie im Rahmen einer Strahlentherapie, die negative Auswirkungen auf die Knochensubstanz haben. Insbesondere im Orthovoltage-Bereich kommt es hierbei mit der Zeit zu einer röntgenologisch feststellbaren Atrophie des Knochengewebes (Howland et al., 1975). Diese resultiert aus einer Kombination aus einer Schädigung der knochenbildenden Zellen und der Gefäßstrukturen (Ergun und Howland, 1980). Die im Periosteum und Endosteum lokalisierten Knochenvorläuferzellen besitzen eine relativ lange Turnover-Zeit von über 8 Wochen. Dabei scheint es eine kritische Grenze von 13 Gy zu geben, ab der diese Zielpopulation unter ein für die Regeneration ausreichendes Level (0,1% überlebende Zellen) reduziert wird (Arnold et al., 1998). Auf mikroskopischer Ebene zeigt sich die Schädigung in Form einer Abnahme der Osteozyten, Hypozellularität in den Knochenlakunen, vergrößerten und nicht konzentrischen Haversschen Kanälen und einer nicht organisierten Knochenmatrix (Desmons et al., 2009). Die geschädigten Zellen produzieren weniger Knochengrundsubstanz, was sich nach einiger Zeit als lokalisierte Osteopenie bemerkbar macht (Ergun und Howland, 1980). Latente Strahlenschäden werden im Knochen klinisch häufig erst nach Setzen eines adäquaten Stimulus, wie beispielsweise einem chirurgischer Eingriff, sichtbar (Arnold et al., 1998) und prädisponieren den Knochen für Komplikationen wie Frakturen, Infektionen und Nekrosen (Ergun und Howland, 1980; Pacheco und Stock, 2013; Williams und Davies, 2006).

#### *Wachstumsfugen*

Bei juvenilen Menschen und Tieren stellen die mitotisch stark aktiven Epiphysenfugen eine sehr strahlungsempfindliche Zone des Knochens dar (Williams und Davies, 2006). Die strahlenbedingte Schädigung der Epiphysenfuge wird hierbei klinisch erst nach einiger Zeit

sichtbar (Alheid, 1995). Bis zu einer Dosis von 18 Gy wurde in juvenilem Knochen eine dosis-abhängige Hemmung des Wachstums gefunden, ab 18 Gray kann es sogar zu einem kompletten Wachstums-Stopp kommen (Alheid, 1995). Unterhalb einer Dosis von 5 Gy sind keine oder nur geringe Auswirkungen auf das Wachstum zu erwarten (Alheid, 1995). Die Gefahr der Schädigung der Epiphysenfugen nimmt mit zunehmendem Alter des Individuums ab (Alheid, 1995). Durch Fraktionierung der Bestrahlung kommt es wie in anderen Geweben zu einer geringeren Wachstumshemmung (Alheid, 1995).

### *Knochenmark*

Das Knochenmark ist als teilungsaktivstes Organ eines der empfindlichsten Gewebe im Körper gegenüber Strahlung überhaupt. Nach einer Bestrahlung mit höheren Dosen kommt es im Knochenmark bereits innerhalb von 1-3 Tagen zu einem Knochenmarksödem und innerhalb der ersten Wochen zu einer fettigen Degeneration und Hypozellularität (Huang et al., 2009; Rubin und Casarett, 1968). Diese Veränderungen können nicht-invasiv mittels Magnetresonanz-Untersuchung festgestellt werden (Daldrup-Link et al., 2007). Niedrig-dosierten Bestrahlungen im Bereich von 75 mGy können wie im Knochengewebe einen stimulatorischen Effekt auf die Vorläuferzellen im Knochenmark haben (Li et al., 2004b).

### *Gefäßstrukturen*

Auch die im Knochen vorhandenen Gefäße werden durch Bestrahlung merklich geschädigt (Desmons et al., 2009). Kleine Gefäße scheinen dabei radiosensitiver zu sein als größere (Rubin und Griem, 1998). Die Endothelzellen stellen die empfindlichsten Zellen innerhalb eines Gefäßes dar: Innerhalb von 24 Stunden kommt es durch die Bestrahlung zu einer Dilatation des perinukleären Raums und des endoplasmatischen Retikulum, einem Anschwellen der Zelle, einer Auflockerung des Zytoplasmas und zum Abschilfern der Plasmamembran (Daldrup-Link et al., 2000; Shiota und Tavassoli, 1992) sowie einer Thrombosierung der kleineren Gefäße (Rubin und Griem, 1998). Die Restitution der Endothelschicht bleibt nach einer Dosis von 40 Gy für mehrere Wochen insuffizient (Fonkalsrud et al., 1977). Das Resultat dieser endothelialen Veränderungen in den Knochenmark-Sinusoiden ist eine erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Knochenmarks-Schranke, die therapeutisch beispielsweise im Rahmen von Knochenmarktransplantationen genutzt wird (Daldrup-Link et al., 2000; Shiota und Tavassoli, 1992). In der Gefäßwand kommt es anfänglich zu einem Ödem und in weiterer Folge zur Fibrosierung oder zur Teleangiektasie durch das Absterben der glatten Muskelzellen (Rubin und Griem, 1998). Durch die

Bestrahlung kommt es initial zu einem gesteigerten Blutfluss der den Knochen versorgenden Gefäße, die Anzahl der den Knochen versorgenden Gefäße nimmt dann aber innerhalb der ersten 3 Wochen deutlich ab und bleibt für mehrere Wochen bis Monate niedrig (Desmons et al., 2009; Xu et al., 2012).

Zusätzlich zur Schädigung der bestehenden Gefäßstrukturen kommt es durch ionisierende Strahlung nicht nur im Knochen, sondern auch im umliegenden Gewebe zu einer Hemmung der Gefäßneubildung, welche entweder durch Aussprossen aus bestehenden Gefäßen (Angiogenese, Arteriogenese) oder durch Bildung neuer Gefäße mithilfe eingewanderter endothelialer Vorläuferzellen erfolgt (Vaskulogenese) (Aghi und Chiocca, 2005). Die Angiogenese stellt hierbei in adulten Individuen die bedeutsamere Form dar (Ribatti et al., 2001) und wird durch ionisierende Strahlung signifikant gehemmt (Dicker et al., 2001; Imaizumi et al., 2010). Im Gegensatz dazu wird das Einwandern endothelialer Vorläuferzellen nach einer Bestrahlungstherapie angeregt (Allan et al., 2009), was beispielsweise zur Wiederherstellung der Blutgefäßversorgung von Tumoren führen kann (Brown, 2014).

## **2.4 Tiermodelle im Knochen Tissue Engineering**

### **2.4.1 Bestrahlungsmodelle in der Ratte**

Eine Vielzahl von verschiedenen Bestrahlungsmodellen an Rattenknochen ist in der Literatur beschrieben. Die Protokolle unterscheiden sich jedoch in der verwendeten Strahlungsart (Orthovoltage, Linearbeschleuniger, Gamma-Strahlung), der Strahlungsquelle (External Beam, Brachytherapie), der applizierten Dosis (10 Gy bis 45 Gy), der Energie der Strahlung (250 keV bis 5 MeV), der Anzahl der Bestrahlungssitzungen (einmalig, fraktioniert) sowie der Lokalisation des bestrahlten Knochens (Femur, Tibia, Mandibula) (Arnold et al., 1998; Cohen et al., 2011; Fenner et al., 2010; Lehner et al., 2004; Lerouxel et al., 2006; Lerouxel et al., 2009; Nyaruba et al., 1998; Schultze-Mosgau et al., 2005). Bedingt durch diese Unterschiede sind die Modelle untereinander nur schwer vergleichbar. Eine Bestrahlung der Kopfregion mit über 10-15 Gy führt zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke (Trnovec et al., 1990) sowie ab 40 Gy zum Tod des Tieres (Little, 1993). Dem gegenüber können Rattenfemora mit nur geringen Nebenwirkungen mit bis zu 60 Gy bestrahlt werden (Lerouxel et al., 2009).

Im für diese Studie relevanten Bereich der Hinterextremität der Ratte verwenden die meisten Gruppen Röntgenstrahlung im Orthovoltage-Bereich (200-500 kV). Arnold et al.

(1998) wiesen nach, dass eine einmalige präoperative Bestrahlung (320 kV) des Femurs eine dosisabhängige Verminderung der Knochenheilung bewirkt, mit einer praktisch vollständigen Hemmung bei 22 Gy; der zeitliche Abstand zwischen präoperativer Bestrahlung und chirurgischem Eingriff scheint hierbei wenig Einfluss zu haben. Ein ähnliches Modell, jedoch mit fraktionierter Bestrahlung von Ratten-Tibiae (5 mal 10 Gy, 250 kV) führte nach 4 Wochen zu einem signifikant schlechteren Einheilen eines gestielten Knochenlappens (Lehner et al., 2004), einer verminderten Expression von BMP-2/4 und Osteocalcin sowie einer gesteigerten Expression von TGF $\beta$ 1 und Collagen I (Schultze-Mosgau et al., 2005). Höhere Dosen (40 und 60 Gy; 150 kV) führten in einem Modell von Nyaruba et al. (Nyaruba et al., 1998) bei einmaliger Bestrahlung zu einer Abnahme der mechanischen Knochenstabilität; bei Fraktionierung war dieser Effekt schwächer ausgeprägt. Die einmalige Bestrahlung der Metaphyse von juvenilen Rattenfemora mit 17,5 Gy (bei 250 kV) führt zu einer steigenden Knochendichte über 6 Wochen und einem initialen Abfall von Osteoklasten und Chondroklasten mit darauffolgendem Anstieg auf supraphysiologische Werte (Margulies et al., 2003) sowie zu einer Wachstumshemmung in der Epiphysenfuge (Tamurian et al., 1999).

#### **2.4.2 Knochendefektmodelle in der Ratte**

Unzählige Knochendefektmodelle an Ratten zur Untersuchung der Knochenheilung werden in der Literatur beschrieben. Von besonderem Interesse sind hierbei sogenannte *critical sized* Defektmodelle. Als *critical sized* wird ein Defekt bezeichnet, wenn er während der Lebenszeit des betreffenden Tieres nicht spontan heilt (Schmitz und Hollinger, 1986). Als Anhaltspunkt wird hierfür eine Defektgröße angegeben, die mehr als dem 2,5fachen des Knochendurchmessers entspricht (Lindsey et al., 2006). Im Bereich des Rattenfemurs wurden Defekte von 4 mm bis 1 cm als *critical sized* beschrieben (Jäger et al., 2005; Vögelin et al., 2005). Die kritische Größe wird jedoch durch zahlreiche Faktoren beeinflusst, wie z.B. Spezies, Alter des Tieres, metabolischer und systemischer Allgemeinzustand, anatomische Lage, Weichteilummantelung des betreffenden Knochens und mechanische Belastung (Lindsey et al., 2006), und kann dementsprechend nicht allein durch die Größe definiert werden. Das in dieser Studie verwendete Femurdefektmodell in eigenen Vorarbeiten bereits als *critical sized* definiert und eingehend untersucht (Balzer, 2013), wodurch Ergebnisse dieser Studie mit eigenen Vorstudien gut vergleichbar sind.

In der Literatur finden sich zahlreiche Studien zur Rekonstruktion von bestrahlten Knochendefekten. Aus dem Bereich des Tissue Engineerings wurde zu diesem insbesondere BMP-2 in derartigen Bestrahlungsmodellen angewandt; zum Einsatz kam dabei

rekombinantes BMP-2 aus Gelatinschwämmen (Wurzler et al., 1998), Adenovirus/BMP-2 cDNA-beladene Gelatinschwämme als Möglichkeit der Gentherapie (Hu et al., 2010) sowie eine Kombination aus  $\beta$ -TCP, BMP-2 in einem Gelatin-Schwamm und autologem Knochengewebe (Yamamoto et al., 2015). VEGF und BMP-7 kamen ebenfalls zum Einsatz (Kaigler et al., 2006; Nussenbaum et al., 2005). Auch Calciumphosphat-Keramiken in Verbindung mit Knochenmark und/oder mesenchymalen Stammzellen wurden bereits in derartigen Modellen evaluiert (Blery et al., 2014; Espitalier et al., 2009; Lerouxel et al., 2006). Die Implantation eines ektopisch generierten Konstrukts aus einer Calciumphosphat-Keramik, BMP-2 und osteogen differenzierten mesenchymalen Stammzellen in einem Bestrahlungsmodell wurde jedoch, soweit der Autorin bekannt, noch nicht beschrieben.

## **2.5 Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe**

Der vorliegenden Studie zur Untersuchung der Knochenheilung am bestrahlten Rattenknochen gingen mehrere Studien der eigenen Arbeitsgruppe zur Etablierung einer geeigneten Matrixzusammensetzung und eines Femurdefektmodells voraus.

Die Angiogenese und Vaskularisation von gezüchteten Knochenkonstrukten bildet einen wichtigen Grundpfeiler der laufenden Arbeiten. Zu diesem Zweck wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Körner (Werkstoffkunde und Technologie der Metalle, Universität Erlangen-Nürnberg) eine perforierte Titankammer entwickelt, die eine extrinsische Vaskularisation ermöglicht (Arkudas et al., 2012) und auch in dieser Studie zum Einsatz kam. Einen weiteren zentralen Punkt stellt die intrinsische Vaskularisation der Konstrukte über einen chirurgisch generierten arteriovenösen Loop dar, der insbesondere bei größeren Konstrukten die ausreichende Nährstoffversorgung der zentralen Anteile ermöglichen soll (Arkudas et al., 2012; Beier et al., 2010). Eine Stimulation der Angiogenese konnte durch die Zugabe von VEGF-A und bFGF zu einer Fibrinmatrix erreicht werden (Arkudas et al., 2009; Arkudas et al., 2007). Zur Untersuchung der Vaskularisation wurde neben der quantitativen histologischen Auswertung (Weis et al., 2015) auch die Micro-Computertomographie als dreidimensionale Darstellungsmöglichkeit etabliert (Arkudas et al., 2010).

Die osteogenen und osteokonduktiven Eigenschaften mehrerer Scaffolds wurden in unterschiedlichen in vivo Vorversuchen untersucht (Publikationen in Vorbereitung). Basierend auf diesen Ergebnissen erfolgte die Verwendung von silikatsubstituiertem Hydroxyapatit als Hartmatrix sowie Fibrinogen und Thrombin als Release-Matrix. Eine Optimierung der Osteogenese wurde durch eine Mischung aus BMP-2 und osteogenen Zellen

erzielt; hierbei lieferten die Besiedelung der Konstrukte mit primären Osteoblasten und mit MSCs ähnliche Resultate (Buehrer et al., 2015; Strobel et al., 2014). Das beschriebene Defektmodell wurde ebenfalls in Vorstudien entwickelt und im Rahmen einer Studie erfolgreich angewandt (Balzer, 2013). Hierbei wurde die Heilung eines Knochendefekts kritischer Größe mithilfe vaskularisierter und nicht vaskularisierter Konstrukte, bestehend aus einer biphasischen Calciumphosphat-Keramik (Hydroxyapatit und  $\beta$ -TCP), osteogenen Zellen und BMP-2, in unbestrahlten Femora untersucht. Die vorliegende Arbeit stellt somit eine Weiterentwicklung dieses Modells dar, in der zusätzlich zur Knochenregeneration in gesundem Gewebe auch jene in Gewebe mit limitierter Osteogenese und Vaskularisierung evaluiert werden soll.

### **3 Zielsetzung**

#### **3.1 Phase I: Evaluation Bestrahlungsprotokoll**

Ziel dieses Studienabschnitts war es, die Auswirkungen verschiedener Bestrahlungsprotokolle auf den Knochen zu evaluieren. Die Ergebnisse sollten als Grundlage für ein Modell des vorgeschädigten Knochens dienen, wie er unter klinischen Bedingungen nach z.B. Tumorresektionen mit darauffolgender Bestrahlung zu finden ist. Zielgrößen waren Knochenmarksschädigung (Knochenmarksödem, Fibrose, Ersatz durch Fettgewebe, Hypozellularität), Schädigung der Osteozyten und Osteoblasten (Hypozellularität), Schädigung der bestehenden Gefäßstrukturen und Up-/Downregulation von Markern der Osteogenese, Angiogenese, Fibrose und Entzündung. Das Bestrahlungsprotokoll mit der deutlichsten Auswirkung auf diese Parameter bei gleichzeitig klinisch vertretbaren Schäden sollte nachfolgend im CSFD-Modell (Critical-sized-Femurdefekt-Modell) verwendet werden. Zur besseren Interpretation der Ergebnisse wurden außerdem Primärzellen (osteogene und endotheliale Vorläuferzellen) *in vitro* bestrahlt und mit den *in vivo* Ergebnissen verglichen.

#### **3.2 Phase II: Knochen Tissue Engineering im CSFD Modell nach Bestrahlung**

Ziel dieses Studienabschnitts war es, die Heilung eines Critical-sized-Femurdefekts (CSFD) nach vorheriger Bestrahlung des Knochens mithilfe von mittels Methoden des Tissue Engineerings generiertem Ersatz-Knochengewebe zu unterstützen sowie den Einfluss der Bestrahlung auf die Knochenheilung in diesem Modell zu untersuchen. Das hierfür verwendete Ersatzgewebe wurde vor der Defektsetzung in einer Titankammer in einem gesunden, isogenen Spendertier subkutan generiert. Es wurden verschiedene Zusammensetzungen des Ersatzgewebes getestet und die Ergebnisse mit unbestrahlten Kontrolldefekten verglichen.

## **4 *Material und Methoden***

### **4.1 *Verwendete Tiere***

Es wurden für alle Studien ausschließlich männliche Lewis-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Inzuchtstamm, der für Transplantationsforschung besonders geeignet ist. Die Tiere hatten bei Anlieferung ein Körpergewicht von 300-320 Gramm. Vor Versuchsbeginn wurde für einige Tage eine Akklimatisierung der Tiere durchgeführt.

Die Haltung erfolgte in S1 Räumen unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur 20-22°C, relative Luftfeuchtigkeit 46-48%, Hell-Dunkel-Zyklus von je 12 Stunden). Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere in Gruppen zu maximal 5 Tieren in Typ 4 Käfigen gehalten. Nach Versuchsbeginn wurden die Tiere einzeln in Typ 3 Käfigen gehalten, um das gegenseitige Benagen der Operationswunden zu verhindern. Die Tiere hatten unbegrenzten Zugang zu Futter (Ssniff, Atromin, Lage, Deutschland) und Wasser.

### **4.2 *Phase I: Evaluation Bestrahlungsprotokoll***

#### **4.2.1 *Gruppen, Versuchsdesign***

Es wurden für diese Studie 24 Tiere verwendet, die in Gruppen zu je 6 Tieren unterteilt wurden. Das linke Bein eines jeden Tieres wurde im Bereich des Femurs mithilfe einer Röntgenröhre bestrahlt. Das jeweilige rechte Femur diente als unbestrahlte Kontrolle.

Zwölf Tiere wurden 1 Mal mit 20 Gy bestrahlt (unfraktionierte Bestrahlung); 6 Tiere davon wurden nach 4 Wochen euthanasiert und 6 Tiere nach 8 Wochen. Bei zwölf Tieren wurde eine fraktionierte Bestrahlung (3 Bestrahlungen zu je 10 Gy) durchgeführt; auch hier wurden 6 Tiere nach 4 Wochen euthanasiert und 6 Tiere nach 8 Wochen. Die unterschiedlichen Gruppen/Bestrahlungsprotokolle sowie der zeitliche Ablauf der Studie sind zum besseren Verständnis in Tab. 1 und Abb. 1 abgebildet.

Tabelle 1: Gruppen und Versuchsdesign – Phase I - Evaluation Bestrahlungsprotokoll

Gruppe	Anzahl Bestrahlungen	Dosis pro Bestrahlung	Zeit bis Explantation	Anzahl Tiere
A	1	20 Gy	4 Wochen	6
B	1	20 Gy	8 Wochen	6
C	3	10 Gy	4 Wochen	6
D	3	10 Gy	8 Wochen	6

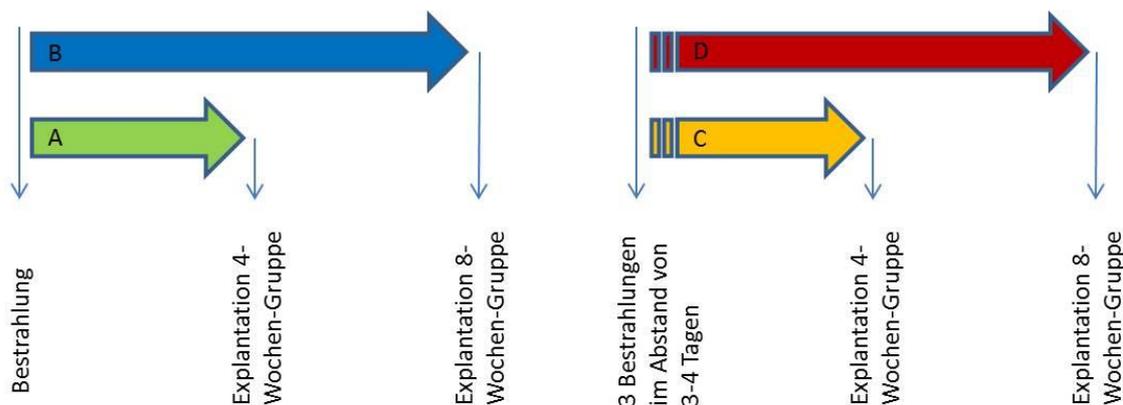


Abbildung 1: Zeitlicher Ablauf –Phase I - Evaluation Bestrahlungsprotokoll

#### 4.2.2 Bestrahlung Tiere

Zur Bestrahlung wurden die Tiere in Kurznarkose gelegt. Hierfür erhielten sie 9 mg Ketamin (Ketavet 100 mg/mL, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) und 1,8 mg Xylazin (Rompun 2%, Bayer, Leverkusen, Deutschland) intramuskulär in die rechte kaudale Oberschenkelmuskulatur. Nach Erreichen einer guten Narkosetiefe (i.A. nach 2-4 Minuten) wurde zum Verlängern der Narkose 2 mg Medetomidin subkutan verabreicht (Domitor, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland).

Die Tiere wurden in Isolationskäfigen (IVCs, isolated ventilated cages) in Bauchlage fixiert. Das linke Hinterbein wurde weit nach lateral abgespreizt und mithilfe einer Unterlage parallel zum Käfigboden in ca. 1 cm Höhe gelagert (s. Abb. 2). Die Oberschenkelregion wurde ausgeschoren; zur Orientierung wurden das Kniegelenk, das Hüftgelenk und der bei der Ratte sehr weit distal sitzende Trochanter major an der Haut angezeichnet. Die Käfige wurden anschließend luftdicht verschlossen und außerhalb der Haltungsräume nicht mehr geöffnet, um den SPF Status (specific pathogen free) aufrechterhalten zu können.

Die Bestrahlung wurde an der Strahlenklinik Erlangen mithilfe einer Röntgenröhre (0,3 mm Kupfer gefiltert) durchgeführt. Die Röhrenspannung betrug 120 kV, die Ladung 24,2 mAs. Die Strahlung wurde mithilfe von zwei 1 cm dicken Bleiblenen auf das Gebiet des linken Oberschenkels begrenzt. Die im IVC ankommende Dosis betrug 1 Gy pro Minute.

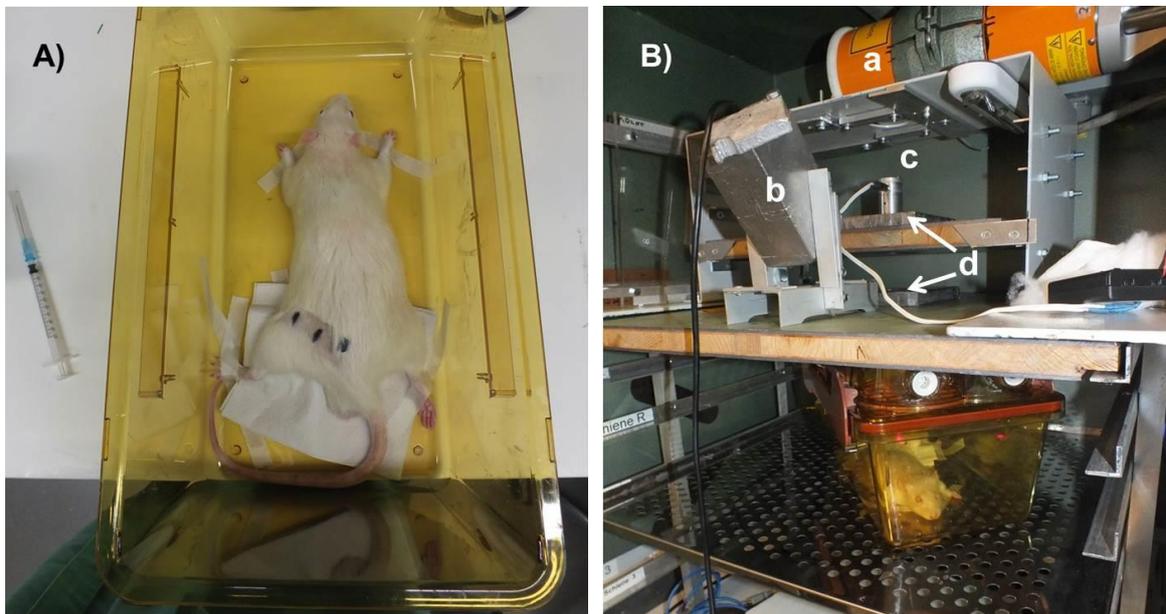


Abbildung 2: Bild A) Lagerung der Ratte im IVC für den Bestrahlungsvorgang; die schwarzen Punkte markieren das zu bestrahlende Feld. Bild B) Aufbau der für die Bestrahlung verwendeten Röntgenröhre; a: Röntgenröhre; b: Überwachungskamera für die Narkoseüberwachung; c: Laser zum Einblenden des Strahlenfeldes; d: Bleiblenen zum Eingrenzen des Strahlenfeldes.

Nach Abschluss der Bestrahlung wurden die Tiere wieder in die Rattenhaltung verbracht und bis zum Erwachen aus der Narkose auf einer Wärmeplatte (39°C) gelagert. Die Tiere wurden in Abständen von 2-3 Tagen auf eventuelle Komplikationen (starke Hautrötungen, Schuppung, Ulzeration, Lahmheit, Schmerzen) kontrolliert. Die Verabreichung von Medikamenten war nicht nötig.

#### 4.2.3 Bestrahlung Zellen

*Osteogene Vorläuferzellen.* Es wurden mesenchymale Stammzellen aus Knochenmark wie unter Punkt 4.3.3 beschrieben kultiviert. In Passage 4 wurde das Wachstumsmedium durch osteogenes Differenzierungsmedium ersetzt. Der Nachweis der osteogenen Differenzierung erfolgte nach 9 Tagen in Form einer positiven ALP-Färbung. Die Bestrahlung erfolgte 12 Tage nach Beginn der Differenzierung.

*Endotheliale Vorläuferzellen.* Die Isolation erfolgte wie unter Punkt 4.3.3 beschrieben. Im Unterschied zur Isolation von mesenchymalen Stammzellen (bone marrow derived mesenchymal stem cells, bmMSC) wurde jedoch für die Kultur anstelle des DMEM/Ham's F-12 Mediums ein spezielles Endothelzellmedium (Endothelial Cell Growth Medium MV-2; Promocell, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Am Tag nach der Isolation wurden die nicht adhärennten mononukleären Zellen in eine neue, mit Gelatine (Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland) beschichtete Well-Platte transferiert. Die weitere Kultur erfolgte analog zur bmMSC Kultur.

Die jeweiligen Zellen wurden vor der Bestrahlung auf 10 cm Petrischalen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert. Anschließend wurden je drei Petrischalen mit einer Dosis von 5 Gy mit derselben Röntgenröhre, mit der auch die Tiere bestrahlt wurden, behandelt. Drei Petrischalen derselben Zellisolation dienten als unbestrahlte Kontrolle. Nach einer Woche wurden die Zellen abgelöst und wie unter Punkt 4.2.6.4 beschrieben für die quantitative PCR aufbereitet.

#### **4.2.4 Perfusion Tiere**

Nach 4 bzw. 8 Wochen wurden die bestrahlten Tiere nach einer kurzen klinischen Inspektion erneut in Narkose gelegt (Narkosebox mit 5% Isofluran in Sauerstoff, anschließend Erhaltung über Maske; Forene, Abbott, Wiesbaden, Deutschland; zusätzlich 1,6 mg Xylazin intramuskulär), und die Bauchhöhle wurde über eine mediane Laparotomie eröffnet. Nach Vorverlagern des Darmtrakts wurden Aorta abdominalis und Vena cava kaudalis aufgesucht, stumpf voneinander und vom retroperitonealen Fett getrennt, und je eine Ligatur um den kranialen Abschnitt der Aorta sowie um beide Gefäße im Bereich der Aufzweigung in die Iliacalgefäße vorgelegt. Eine 24G Venenverweilkanüle wurde in kraniokaudaler Richtung in die Aorta gesetzt, und die vorgelegte Ligatur wurde darüber festgezogen. Die Vena cava caudalis wurde im kranialen Bereich eröffnet und das Gefäßsystem über die gesetzte Venenverweilkanüle mit 100 mL vorgewärmter Heparinlösung (100 IE/mL Heparin; Ratiopharm, Ulm, Deutschland; in 0,9% NaCl-Lösung) perfundiert. Anschließend wurde das Gefäßsystem mit 20 mL einer röntgendichten Silikonmischung (Microfil ® Yellow, MV-122; Flow Tech Inc., Carver, MA, USA) gefüllt und die Gefäße mithilfe der zweiten vorgelegten Ligatur verschlossen. Die Kadaver wurden über Nacht im Kühlschrank bei +4°C gelagert, um die Mischung vollständig aushärten zu lassen.

#### **4.2.5 *Explantation Tiere, weitere Verarbeitung***

Am nächsten Tag wurden beide Oberschenkelknochen entnommen und makroskopisch beurteilt. Anschließend wurden die proximale und distale Epiphyse mit einer oszillierenden Säge abgesetzt, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -80°C bis zur RNA-Isolation gelagert.

Die Diaphyse wurde für 24 Stunden in 4% Formaldehydlösung (Roti ® Histofix 4%, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gelegt und anschließend in 20% EDTA Lösung (Ethylendiamin-Tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) entkalkt. Zur Beschleunigung des Entkalkungsvorgangs wurde ein Ultraschall-Gerät verwendet (Sonocool 255, Bandelin, Berlin, Deutschland). Der Entkalkungsvorgang dauerte jeweils ca. 2 Wochen.

#### **4.2.6 *Molekularbiologische Auswertung***

##### **4.2.6.1 *RNA Isolation aus Knochengewebe***

Die distale Epiphyse wurde zur RNA Isolation herangezogen. In den Fällen, in denen aus diesem Knochenabschnitt keine ausreichende RNA-Qualität erzielt werden konnte (siehe Abschnitt 5.1.4.1), wurde die proximale Epiphyse als Reserve verwendet.

Für die RNA-Isolation wurde die sog. Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode verwendet. Das Knochenstück (ca. 300-350 mg) wurde in einem autoklavierten, RNase-freien Mahlbecher für einige Minuten in flüssigen Stickstoff gegeben und anschließend für 5 Minuten in einem automatischen Schüttler bei einer Frequenz von 22/s homogenisiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis das Knochengewebe zu einem feinen Pulver zermahlen war (in der Regel 1-2 Mal). Das zermahlene Knochengewebe wurde in ein 15 mL Falcon Tube mit 7 mL TRIzol ® Reagent (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland; saures Phenol und Guanidin Isothiocyanat) gegeben, kräftig geschüttelt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 1,5 mL Chloroform (Th. Geyer GmbH, Renningen, Deutschland) zugegeben, das Gemisch erneut kräftig geschüttelt und für weitere 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (2.500 rpm, 10 Minuten, RT) wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und in ein neues 15 mL Falcon Tube überführt. Zur RNA-Präzipitation wurden 3,5 mL Isopropanol (Th. Geyer GmbH) zugesetzt und das Gemisch für 10 Minuten bei RT inkubiert. Die Mischung wurde für 20 Minuten bei 4°C und 4600 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das entstandene RNA-

Pellet zum Waschen in 1,5 mL Ethanol (70%; Merck, Darmstadt, Deutschland) in einem 2 mL Eppendorf Reaktionsgefäß aufgenommen und erneut bei 10.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig abpipettiert und das RNA-Pellet für 10 Minuten luftgetrocknet.

#### **4.2.6.2 RNA Aufreinigung aus Knochengewebe**

Der DNA Verdau erfolgte laut Herstellerangaben mittels „RNase free DNase Set“ (Qiagen, Venlo, Niederlande), die RNA Aufreinigung mittels „RNeasy Mini Kit“ (Silika-Säulen; Qiagen). Die an die Säulen gebundene RNA wurde am Schluss mit 30 µL Nuclease-freiem Wasser eluiert. Der RNA Gehalt wurde mittels UV Spektrophotometer (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gemessen, und die RNA Lösung wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### **4.2.6.3 RNA Gel-Elektrophorese**

Die RNA Qualität wurde mithilfe einer nicht denaturierenden Gel-Elektrophorese überprüft. Hierfür wurde 1 g Agarose (Top Vision Agarose, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland) in 100 mL 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (mit DEPC behandeltem Wasser angesetzt) gelöst, mit 10 µL einer Nukleinsäure-Färbelösung (SYBR® Safe DNA Gel Stain; Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) versetzt und die Mischung zum Auskühlen in einen Gelträger gegossen (Gel-Länge 7 cm, Gel-Dicke ca. 1 cm). Jeweils 1 µg RNA wurden mit RNase freiem Wasser und Xylencyanol-Lösung vermischt (resultierendes Gesamtvolumen: 25 µL) und in die Gel-Taschen geladen. In eine Tasche wurde anstelle der RNA ein Längenstandard gegeben (1kb DNA Ladder, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland). Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 100 V für 30 Minuten. Die Auswertung erfolgte durch Anregung mit UV-Licht bei 302 nm (ChemiDoc MP, Bio-Rad, München, Deutschland). Nur Proben mit deutlich abgrenzbaren 18S und 28S Banden (1,9 bzw 4,7 kbp) wurden in weiterer Folge für reverse Transkription und RT-PCR verwendet.

#### **4.2.6.4 RNA Isolation aus Zellen**

Die Zellen wurden wie beim Passagieren abgelöst und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff kurz tiefgefroren. Die RNA-Isolation erfolgte mithilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (RNeasy Mini Kit, Qiagen, Venlo, Niederlande). Das Pellet wurde hierfür in Lysis-Puffer (RLT Buffer, Qiagen) und β-Mercaptoethanol (Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland) aufgenommen und mithilfe einer QIA Shredder Säule (Qiagen) homogenisiert.

Die anschließende Aufreinigung mittels Silika-Säule und DNase Verdau sowie die Integritätsprüfung mittels Agarosegel erfolgten wie unter Punkt 4.2.6.2 und 4.2.6.3 beschrieben.

#### **4.2.6.5 Reverse Transkription**

Die reverse Transkription von je 1 µg RNA erfolgte laut Herstellerangaben mittels „Revert Aid First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland). Es wurden Random Hexamer Primer verwendet. Die resultierende cDNA (Gesamtvolumen 20µL) wurde mit Nuclease-freiem Wasser auf 40 µL verdünnt und bei -80°C bis zur RT-PCR gelagert.

#### **4.2.6.6 Quantitative PCR/Real Time PCR**

Für die relative Quantifizierung wurden GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase) und PPIA (Peptidyl-Prolyl-Isomerase A) als interne Kontrolle („housekeeping genes“) verwendet. Die Expression folgender Gene wurden bestimmt:

- Osteogenese: Runt-related transcription factor 2 (RUNX2), alkalische Phosphatase (ALP), Osteocalcin (OC), Osteopontin (OP), Collagen I (Coll I)
- Fibrose: Transforming growth factor beta 1 (TGFβ1)
- Entzündung: Tumor necrosis factor alpha (TNFα)
- Angiogenese, Vaskulogenese: Vascular endothelial growth factor A (VEGF-A), Hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF1α)

Die quantitative PCR erfolgte mittels SYBR Green Detektion (C1000 Touch, CFX96 Real Time System, BioRad Laboratories, München, Deutschland; Mastermix: SSO Advanced, BioRad Laboratories).

Sequenzen der Primer und PCR-Protokoll: s. Anhang

#### **4.2.7 Mikro-Computertomographische Auswertung**

Nach abgeschlossener Entkalkung wurden die Femurdiaphysen in mit PBS (PBS: phosphate buffered saline; Biochrom, Berlin, Deutschland) gefüllten Plastikröhrchen stabilisiert und die mit Microfil ® gefüllten und somit röntgendichten Gefäßstrukturen microcomputertomographisch ausgewertet (µCT). Hierfür wurde eine hoch auflösende Röntgenröhre (Skyscan 1172; Bruker microCT, Kontich, Belgien) verwendet. Die Spannung betrug 80 kV, der Röhrenstrom 100 µA und die Voxelgröße (Auflösung) 6,78 µm.

Die Rohdaten wurden mithilfe einer Rekonstruktionssoftware (NRecon Client and Server, Skyscan, Kontich, Belgien; sowie Amira, Visage Imaging, Berlin, Deutschland) ausgewertet. Das Gefäßnetzwerk wurde hierfür in einzelne Segmente mit einem definierten Durchmesser unterteilt und daraus die akkumulierte Gefäßlänge für jeden Durchmesser berechnet. Das Gefäßnetzwerk wurde außerdem optisch in einem dreidimensionalen Bild dargestellt.

#### **4.2.8 Histologie**

Im Anschluss an die  $\mu$ CT Untersuchung wurden die Knochen der Länge nach halbiert (sagittal) und mittels Alkoholreihe entwässert. Die entwässerten Knochenhälften wurden in Paraffin eingebettet und mittels Mikrotom geschnitten (3-5  $\mu$ m Schichtdicke). Anschließend wurden sie in einer umgekehrten Alkoholreihe (Xylol, 99% Ethanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol) entparaffiniert und wie folgt gefärbt (Waschvorgänge zwischen den einzelnen Schritten sind nicht eigens aufgeführt):

##### Hämatoxylin-Eosin Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung erfolgte automatisiert in einem Färbeautomaten (Shandon, Astmore, UK). Die entparaffinierten Schnitte wurden zunächst in Hämatoxylin-Lösung (Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland) eingelegt und nach einem Waschschrift in alkoholische Eosin Y Lösung (Sigma Aldrich).

##### Hif1 $\alpha$ -Färbung

Die Hif1 $\alpha$ -Färbung erfolgte mithilfe des Polymersystems POLAP-100 (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland). Die entparaffinierten Schnitte wurden zunächst in Target Retrieval Solution (Dako GmbH, Hamburg, Deutschland) für 1 Minute bei 121°C gekocht. Anschließend wurden die Schnitte für 5 bzw. 30 Minuten in Blockierungslösungen (Blocking solution, Zytomed Systems sowie Rodent Block R, Biocare Medical/Zytomed Systems) eingelegt, um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers bzw. durch endogene IgG Antikörper zu verhindern. Die Schnitte wurden mit Primär-Antikörper-Lösung überschichtet (monoklonaler Maus-Antikörper, Hif1 $\alpha$  Antibody NB 100-123, Novus Biologicals, Cambridge, UK; Verdünnung: 1:10.000) und über Nacht bei +4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte für 30 Minuten in ein Verstärkungsreagenz (Postblock Solution, Zytomed Systems) eingelegt und anschließend das AP-Polymer (Sekundärantikörper, gekoppelt an alkalische Phosphatase) für 30 Minuten aufgetragen. Die Visualisierung erfolgte

mithilfe von Fast Red, die Gegenfärbung mithilfe von Hämalan (Mayers Hämalan, Merck, Darmstadt, Deutschland).

#### *αSMA-Färbung (α-Smooth-Muscle-Actin)*

Die immunhistochemische Färbung des α-Smooth-Muscle-Actins erfolgte wie die Hif1α-Färbung mittels POLAP-100 Polymersystem (Zytomed Systems). Es wurde jedoch normaler Citratpuffer (pH 6,0) anstelle der Retrieval Solution verwendet, die Anwendung des Rodent Blocks entfiel. Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler Maus-Antikörper verwendet (Clone 1A4, Zytomed Systems; Verdünnung 1:300).

#### *CD31-Färbung*

Auch die CD31-Färbung erfolgte wie die αSMA-Färbung. Als Primär-Antikörper wurde ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper verwendet (Anti-CD31-Pecam-1, Zytomed Systems; Verdünnung 1:50).

#### *Lectin-Färbung*

Die entparaffinierten Schnitte wurden in Citratpuffer (pH 6,0) für 1 Minute bei 121°C gekocht. Nach 10 Minuten in 3%iger Wasserstoffperoxidlösung (Merck) wurden die Schnitte in einer Avidin- und Biotin-blockierenden Lösung (Avidin/Biotin Blocking Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) für je 15 Minuten inkubiert. Nach 30 Minuten in 10%igem Ziegen Serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) wurde der Primärantikörper zugegeben (biotinylierter Lectin Antikörper; Isolectin B4 Biotin-labeled, Sigma-Aldrich, Seelze, Deutschland; 1:270 in TRIS Puffer) und die Schnitte über Nacht bei +4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Detektion mittels Streptavidin-HRP (Dako GmbH, Hamburg, Deutschland; Inkubation für 30 Minuten) und DAB+ Chromogen (Dako GmbH; Inkubation für 10 Minuten). Eine Gegenfärbung erfolgte mittels einer 1:10 Hämalan-Lösung (Mayers Hämalan, Merck).

#### *DAPI Färbung*

Die entparaffinierten Schnitte wurden mit DAPI-Lösung (4',6-Diamidin-2-phenylindol; Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland; Verdünnung 1:1000) überschichtet und für 5 Minuten inkubiert. Die Färbung und Lagerung erfolgte im Dunkeln.

### Auswertung Histologie

Alle Schnitte wurden unter 10-facher Vergrößerung fotografiert, bei speziellen Fragestellungen (z.B. qualitative Beurteilung tubulärer Lectin- und  $\alpha$ SMA-positiver Strukturen) wurden auch höhere Vergrößerungen (20fach) angewandt. Die Anfertigung der Fluoreszenz-Bilder erfolgte an einem Leitz DRMBE Mikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) und einer Leica DFC420 Kamera unter 100facher Vergrößerung. Die restlichen Färbungen wurden mit einem Olympus IX81 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) fotografiert.

Die Auswertung der Bilder erfolgte mittels ImageJ Software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; Version 1.47v) entsprechend der folgenden Kriterien mit hierfür definierten Threshold-Werten:

#### Hämatoxylin-Eosin-Färbung

- Auszählen der Vakuolen in einem 5 mm langen, möglichst zentralen Abschnitt des Knochenmarks („Anzahl Vakuolen“)
- Berechnung der durchschnittlichen Größe und der Gesamtfläche der Vakuolen in diesem Abschnitt („Größe Vakuolen“, „Fläche Vakuolen“)
- Auszählen der schwarz perfundierten Gefäße in einem 5 mm langen, möglichst zentralen Abschnitt des Knochenmarks („Anzahl Gefäße“), Berechnung der Gesamt-Gefäßfläche („Fläche Gefäße“)

#### DAPI Färbung

- Auszählung der DAPI positiven Zellen in der Kortikalis eines 5 mm langen, möglichst zentralen Abschnitts (dorsale und ventrale Kortikalis) („DAPI positiv“)

#### Hif1 $\alpha$ - und CD31-Färbung

- Auszählung der Hif1 $\alpha$ - bzw CD31-positiven Zellen in einem 5 mm langen, möglichst zentralen Abschnitt des Knochenmarks („Hif1 $\alpha$  positiv“, „CD31 positiv“)

Die immunhistochemischen Färbungen für Lectin und  $\alpha$ SMA wurden ausschließlich qualitativ im Hinblick auf Vaskularisation der Femora beurteilt.

### 4.3 Phase II: Knochen Tissue Engineering im CSFD Modell nach Bestrahlung

#### 4.3.1 Materialien

Grundlage der Studie war die Prävascularisation und –ossifikation einer osteogenen Matrix in einer Titankammer (s. Abb. 3) in einem gesunden Spendertier vor Implantation in einen Femurdefekt. Die hierfür verwendete Titankammer wurde mittels Electron Beam Melting Technik (Selective Electron Beam Melting-Anlage S12, Arcam AB, Mölndal, Schweden) am Lehrstuhl für Werkstoffkunde und Technologie der Metalle der Universität Erlangen-Nürnberg hergestellt (Prof. Carolin Körner - Leichtbauwerkstoffe). Die Kammerwand besteht aus einem Gitter mit einer Porengröße von 2 mm, durch die aus dem umliegenden Gewebe Gefäße einsprossen können. Zusätzlich besitzt die Kammer zwei 6 mm lange Flügel mit je zwei Löchern (1,3 mm Durchmesser), durch die die Kammer operativ am Oberschenkelknochen fixiert werden kann. Der Kammerdurchmesser beträgt 12 mm, die Kammerhöhe mit Boden und Deckel 10,5 mm. Die Gesamtlänge der Kammer inklusive Flügel beträgt 27 mm.

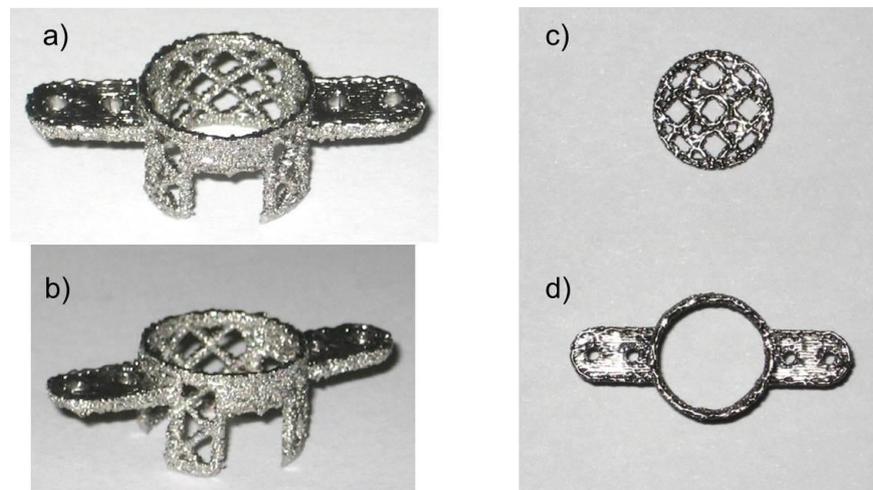


Abbildung 3: Verwendete Titankammer (a, b, d) mit Deckel/Boden (c).

Als Hartmatrix wurde Actifuse® (Baxter Healthcare GmbH, Wien, Österreich) verwendet. Hierbei handelt es sich um silikatsubstituiertes Hydroxyapatit (0,8% Silikat laut Herstellerangabe) mit einer Granula-Größe von 2-5 mm. Die Auswahl der Hartmatrix erfolgte basierend auf Vorversuchen der eigenen Arbeitsgruppe (Publikation in Vorbereitung). Als osteogener Wachstumsfaktor wurde basierend auf eigenen Vorversuchen rekombinantes humanes Bone morphogenetic protein 2 (rhBMP-2; Induct Os/Diboterminalfa, Wyeth/Pfizer, Berlin, Deutschland) in einer Release-Matrix aus Fibrinogen (10 mg/mL) und Thrombin (2

IE/mL; beides Tisseel Fibrin Sealant, Baxter Healthcare GmbH, Wien, Österreich) zur langsamen Freisetzung des Proteins verwendet. Als zusätzlicher osteogener Stimulus wurden in einigen Gruppen osteogen differenzierte mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark syngener Ratten implantiert (bmMSCs, bone marrow derived mesenchymal stem cells; s. Abschnitt 4.3.3).

#### 4.3.2 Gruppen, Versuchsdesign

Es wurden für diese Studie 137 Ratten verwendet, die in 8 Gruppen unterteilt wurden (s. Tab. 2). Basierend auf dem Kammerinhalt wurden die Gruppen mit E (Gemisch aus MSCs, BMP und silikatsubstituiertem Hydroxyapatit), F (silikatsubstituiertes Hydroxyapatit) und G (leer) bezeichnet. In Gruppe E wurden hierbei anhand des Intervalls bis zur Explantation eine Kurzzeitgruppe (E10d) und eine Langzeitgruppe (E12Wo) unterschieden. Die präoperativ bestrahlten Gruppen wurden zusätzlich mit einem „b“ bezeichnet.

*Tabelle 2: Gruppen und Versuchsdesign - Phase II – Knochen Tissue Engineering im CSFD Modell nach Bestrahlung.*

Gruppe	Kammerinhalt	Zeit Prävascularisation (im Spendertier)	Bestrahlung (Empfänger, 4 Wochen vor CSFD)	Zeit CSFD – Explantation (Empfängertier)	Anzahl Tiere
E10d	Silikatsubstituiertes Hydroxyapatit, Fibrinogen, Thrombin, rhBMP-2, bmMSCs	6 Wochen	Nein	10 Tage	10
bE10d	Silikatsubstituiertes Hydroxyapatit, Fibrinogen, Thrombin, rhBMP-2, bmMSCs	6 Wochen	Ja	10 Tage	10
E12Wo	Silikatsubstituiertes Hydroxyapatit, Fibrinogen, Thrombin, rhBMP-2, bmMSCs	6 Wochen	Nein	12 Wochen	10
bE12Wo	Silikatsubstituiertes Hydroxyapatit, Fibrinogen, Thrombin, rhBMP-2, bmMSCs	6 Wochen	Ja	12 Wochen	10
F	Silikatsubstituiertes Hydroxyapatit, Fibrinogen, Thrombin	6 Wochen	Nein	12 Wochen	10
bF	Silikatsubstituiertes Hydroxyapatit, Fibrinogen, Thrombin	6 Wochen	Ja	12 Wochen	10
G	Leer	Keine	Nein	12 Wochen	7
bG	Leer	Keine	Ja	12 Wochen	10

Die Konstrukte der Gruppen E10d, bE10d, E12Wo, bE12Wo, F und bF wurden 6 Wochen vor Setzen des CSFD in ein gesundes Spendertier eingesetzt, um dort eine Prävasikularisation und erste Osteogenese zu ermöglichen. In Gruppe E10d, E12Wo, bE10d und bE12Wo wurde dabei ein Gemisch aus Hartmatrix (silikatsubstituiertes Hydroxyapatit), rhBMP-2 und osteogen differenzierten bmMSCs (bone marrow derived mesenchymal stem cells, dt. Knochenmarks-Stammzellen), aufgenommen in Fibrin (10 mg/mL Fibrinogen + 2 IE/mL Thrombin), in die Kammer gegeben. Nach 6 Wochen Prävasikularisation im Spendertier erfolgte der Transfer in den CSFD im Empfängertier. Die Explantation der Konstrukte aus dem Empfängertier erfolgte 10 Tage (Gruppe E10d/bE10d) bzw. 12 Wochen nach Setzung des CSFD (Gruppe E12Wo/bE12Wo). Die Gruppen E10d und E12Wo stellten die unbestrahlten Gruppen dar, die Empfängertiere der Gruppen bE10d und bE12Wo wurden entsprechend dem Bestrahlungsprotokoll aus der Vorstudie vor der Transplantation bestrahlt.

In Gruppe F bzw. bF wurde die Kammer mit der Hartmatrix befüllt. Um Einflüsse der Release-Matrix auf die Knochenbildung auszuschließen sowie die Granula-Matrix zu stabilisieren, wurde zusätzlich Fibrin in die Kammern gegeben. Die Kammern wurden nach 6 Wochen Prävasikularisation auf das jeweilige Empfängertier übertragen. Die Explantation erfolgte 12 Wochen nach Setzung des CSFD. Die Gruppe F stellt hierbei die unbestrahlte Gruppe dar, die Femora der Tiere der Gruppe bF wurden bestrahlt.

In den Kontrollgruppen (Gruppe G bzw. bG) wurde je eine leere Kammer ohne vorherige Prävasikularisation in den Femurdefekt eingesetzt. Hierbei lag das Augenmerk auf der Heilung des Knochens ohne Unterstützung in Form von implantiertem Gewebe und auf dem Nachweis der kritischen Größe des Femurdefekts. Die Gruppe G stellte hierbei die unbestrahlte Kontrollgruppe dar, die Gruppe bG die bestrahlte. Zur Minimierung der Tierzahl stammten die Tiere der Gruppe G dabei bis auf ein Tier aus einer Vorläuferstudie (Balzer, 2013), in der dasselbe Operationsprotokoll verwendet wurde. Die Explantation erfolgte 12 Wochen nach Femurdefektsetzung.

Die Bestrahlung der Empfängertiere der Gruppen bE10d, bE12Wo, bF und bG erfolgte basierend auf der Vorstudie 4 Wochen vor Setzung des CSFD einmalig mit 20 Gy.

Der zeitliche Ablauf sowie der jeweilige Kammerinhalt in den einzelnen Gruppen sind in Abb. 4 und 5 bzw. Tab. 2 abgebildet.

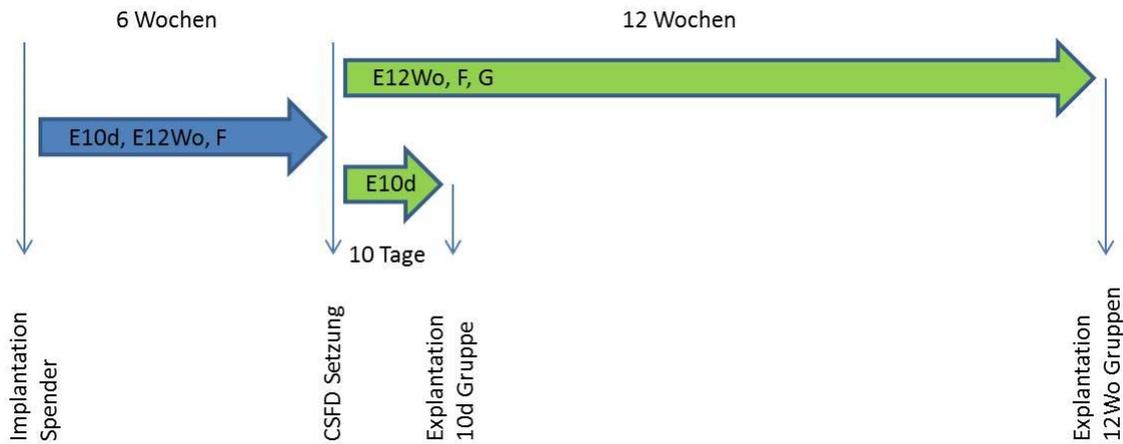


Abbildung 4: Zeitlicher Ablauf - Phase II – Knochen Tissue Engineering im CSFD Modell nach Bestrahlung; unbestrahlte Gruppen. Blau = Spendertiere. Grün = Empfängertiere.

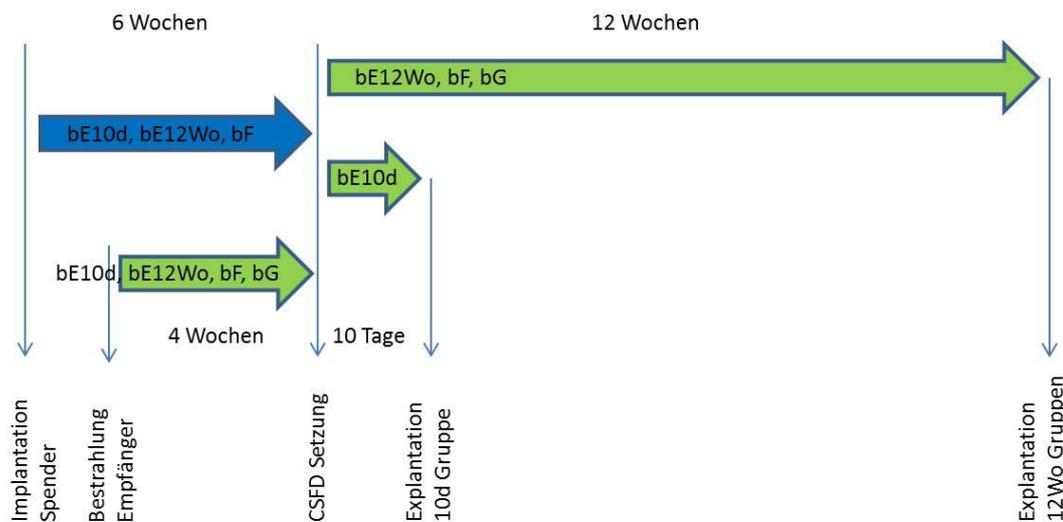


Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf - Phase II – Knochen Tissue Engineering im CSFD Modell nach Bestrahlung – bestrahlte Gruppen. Blau = Spendertiere. Grün = Empfängertiere.

#### 4.3.3 Zellisolation und Zellkultur

**Zellisolation.** Die in dieser Studie verwendeten mesenchymalen Stammzellen (bone marrow derived mesenchymal stem cells, bmMSCs) wurden aus dem Knochenmark eines syngenen, gesunden, adulten Tieres isoliert. Hierfür wurde das Tier in tiefe Vollnarkose gelegt, an beiden Hinterbeinen die Haut abpräpariert, die Beine im Hüftgelenk und im Sprunggelenk exartikuliert, mit sterilem PBS (Biochrom, Berlin, Deutschland) gewaschen

und in einem sterilen Falcon auf Eis ins Zellkulturlabor transportiert. Das Tier wurde nach Abnahme der Beine euthanasiert (T61, Intervet, Unterschleißheim, Deutschland).

Im Zellkulturlabor wurden unter einer sterilen Werkbank beide Femora und Tibiae voneinander getrennt und von Muskelresten befreit. Der gesamte Isolationsprozess erfolgte bei Raumtemperatur. Nach Absetzen der Epiphysen wurde das Knochenmark mit insgesamt 30 mL MACS Puffer (PBS, Biochrom; + 2% FCS Superior, Biochrom; FCS = fötales Kälberserum) ausgespült. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (1400 rpm, 5'), der Überstand abgesaugt und die Zellen in 10 mL frischem Wachstumsmedium resuspendiert (Zusammensetzung Wachstumsmedium: DMEM/Ham's F-12 Medium, Biochrom; +1% L-Glutamin, Gibco/Life Technologies, Darmstadt, Deutschland; +20% FCS Superior, Biochrom). Die resultierende Suspension wurde durch ein 100 µm Zellsieb gefiltert und mit 5 mL Ficoll Lösung (Histopaque® -1077, Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland) unterschichtet. Nach der anschließenden Zentrifugation (20', 2000 rpm) wurden die über der Ficoll-Lösung liegenden mononukleären Zellen abgenommen, in ein frisches Falcon Tube überführt und ausgezählt. Das Aussäen erfolgte auf eine 24-Well-Platte bei  $2 \times 10^6$  mononukleären Zellen pro Well. 36 Stunden nach der Zellisolation wurden die nicht adhärenen Zellen abgenommen und verworfen sowie die adhärenen Zellen mit frischem Medium überschichtet.

*Zellkultur.* In weiterer Folge wurde das Wachstumsmedium drei Mal pro Woche gewechselt. Bei einer Konfluenz von ungefähr 80% (in der Regel nach 5-6 Tagen, cell doubling time 2,9 – 3,6 Tage) wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurde das Wachstumsmedium abgesaugt, die Zellen zweimal mit PBS (w/o  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ; Biochrom) gewaschen und mit Trypsin/EDTA Lösung (Biochrom) überschichtet. Nach einer Inkubationszeit von 4' wurde die Reaktion mit der doppelten Menge an Wachstumsmedium abgestoppt, die abgelösten Zellen in ein Falcon überführt, zentrifugiert (1000 rpm, 4') und in frischem Wachstumsmedium resuspendiert. Die Zellen wurden bei einer Dichte von 5000 Zellen/cm<sup>2</sup> (Passage 1, Passage 2) bzw. 3000 Zellen/cm<sup>2</sup> (ab Passage 3) ausgesät.

*Einfrieren.* Beim 4. Passagiervorgang wurden die bmMSCs nach dem Ablösen gezählt und nach der Zentrifugation in Einfriermedium aufgenommen. Dies bestand aus 90% fötalem Kälberserum (FCS Superior, Biochrom), das mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO; Sigma Aldrich) versetzt war. Die Zellsuspension wurde in Cryoröhrchen überführt (1 mL Zellsuspension bzw.  $1,5 \times 10^6$  bmMSCs pro Röhrchen), in einen auf 4°C vorgekühlten Einfriercontainer (Nalgene® Mr. Frosty, Sigma Aldrich) gegeben und bei -20°C bei einer

Abkühl-Geschwindigkeit von 1°C/Minute eingefroren. Die weitere Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

*Auftauen.* Zum Auftauen wurden die Cryoröhrchen im Wasserbad erwärmt und die Zellsuspension nach Schmelzen sofort in ein Falcon mit angewärmtem Wachstumsmedium überführt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in frischem Wachstumsmedium resuspendiert. Der Inhalt eines Cryoröhrchens wurde auf eine T75 Zellkulturflasche ausgesät.

*Durchflusszytometrie.* In Passage 4 wurde die Expression von für bmMSCs typischen Oberflächenmarkern mittels Durchflusszytometrie überprüft. Hierfür wurden die Zellen einer gut konfluenten T75 Flasche mit Trypsin/EDTA abgelöst und in Pufferlösung (PBS w/o Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>, Biochrom; + 2% FCS Superior, Biochrom; + 0,05% Natriumazid, Sigma Aldrich) aufgenommen. Die Inkubation mit den jeweiligen Antikörpern erfolgte für jeweils 30' bei 4°C. Als positive Stammzellmarker wurden CD90, CD29, CD73 und CD54 gewählt. Als Negativmarker dienten CD45 (Leukozytenmarker) und CD31 (Endothelzellmarker).

Antikörper und Verdünnungsstufen: s. Anhang.

Die Messung erfolgte am FACScalibur™ Durchflusszytometer (BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland). Die Auswertung erfolgte mittels FlowJo Software (TreeStar, Ashland, OR, USA).

*Differenzierung.* In Passage 6 wurde das für bmMSCs typische und für das Knochen-Tissue-Engineering wichtige osteogene Differenzierungsvermögen überprüft. Hierfür wurde das Wachstumsmedium durch osteogenes Differenzierungsmedium ersetzt (Wachstumsmedium + 25 µg/mL L-Ascorbinsäure + 10 mM Glycerol-2-Phosphat + 100 nM Dexamethason; alle drei Zusätze Sigma Aldrich). Die erfolgreiche osteogene Differenzierung der Zellen wurde mittels ALP Färbung nachgewiesen (Alkalische Phosphatase; Leucocyte Alkaline Phosphatase Kit, Sigma Aldrich).

*Aufbereitung zur in vivo Implantation in Spendertiere.* Vor der in vivo Implantation wurden bmMSCs in Passage 6 für 5-6 Tage in osteogenem Differenzierungsmedium kultiviert. Zur Implantation wurden die Zellen mittels Accutase (Gibco/Life Technologies; Inkubationszeit 15' bei 37°C) abgelöst, abzentrifugiert (1000 rpm, 4') und danach in Collagenase II Lösung resuspendiert (Biochrom; 1 mg/mL in Wachstumsmedium gelöst). Nach 6-7 Minuten Inkubationszeit lag eine Einzelzellsuspension vor. Die Zellen wurden

durch ein Zellsieb mit Porengröße 70µm gefiltert und mittels Trypanblaufärbung (Sigma Aldrich) ausgezählt. Drei Millionen lebende bmMSCs wurden in 5 mL Medium aufgenommen und mit 25 µg DiI Cell Tracker versetzt (Life Technologies, Darmstadt, Deutschland). Die Zellen wurden für 15 Minuten in der Färbelösung inkubiert, nach zweimaligem Waschen mit PBS in 550 mL Fibrinogen-Lösung aufgenommen (Tisseel Fibrin Sealant, Baxter, Wien, Österreich; Konzentration 10 mg Fibrinogen/mL) und auf Eis gelagert. Dem Fibrinogen-Zell-Gemisch wurden 100 µL einer BMP-2 Lösung (verdünnt in PBS, End-Konzentration im Gemisch 100 µg/mL). Das Fibrinogen-BMP-Zell-Gemisch wurde auf Eis und dunkel bis zur Implantation (ca. 30 Minuten lang) gelagert.

#### ***4.3.4 Implantation der Konstrukte in Spendertiere***

*Narkose, Medikation.* Zum Einleiten der Narkose wurden die Tiere in eine Induktionsbox gesetzt, in die 5% Isofluran (Forene, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) in reinem Sauerstoff eingeleitet wurde. Nach Gewichtskontrolle wurden sie mit 1,4-1,6 mg Xylazin (intramuskulär; Rompun 2%, Bayer, Leverkusen, Deutschland), 0,2 ml Veracin compositum (entsprechend 16.000 IE Benzathin-Benzylpenicillin, 24.000 IE Procain-Penicillin, 51,6 mg Dihydrostreptomycin; subkutan; Albrecht, Aulendorf, Deutschland), 0,2 mg Meloxicam (subkutan; Metacam 2 mg/mL, Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, Deutschland) sowie 4 mg Tramadolhydrochlorid (subkutan; Tramal Ampullen 50 mg, Grünenthal, Aachen, Deutschland) prämediziert. Die Narkoseerhaltung erfolgte mittels Isofluran in reinem Sauerstoff über eine Maske. Die Tiere wurden auf einer Heizplatte (39°C) in Rückenlage gelagert, und die Innenseite des linken Hinterbeins wurde ausgeschoren und aseptisch für die Operation vorbereitet.

*Operation.* Mit einem Skalpell wurde ein Hautschnitt über A. und V. femoralis gesetzt und mit der Metzenbaumschere stumpf eine subkutane Tasche in der Leiste und medial am Oberschenkel präpariert. Die beiden Gefäße wurden unter einem Operationsmikroskop vorsichtig vom daneben liegenden Nerv getrennt. Größere Abgänge wurden mithilfe einer bipolaren Pinzette verschlossen, und beide Gefäße wurden in der Leiste sowie in der Kniekehle nach vorherigem Kautern abgesetzt, um Probleme mit Blutungen durch das Aufsetzen der Kammer auf diese Gefäße zu vermeiden und ein späteres Einsprossen von diesen Gefäßen ausgehend zu verhindern. Die Wundhöhle wurde gespült und vor Implantation der Kammer auf kleinere Blutungen überprüft.

*Zusammensetzen und Befüllen der Kammer.* Zunächst wurde der Boden der Kammer mit 3 Einzelknopfheften (USP 4/0, Polypropylen) fixiert. Die Kammer wurde anschließend in eine eigens angefertigte Teflonform gesetzt, die zum Befüllen mit der flüssigen Fibrinmatrix notwendig war. Es wurden 4 Plastikstifte (Mandrins für Venenverweilkanülen, 18 G) in die Löcher im Boden gesetzt.

Gruppe F bzw. bF: Die Hartmatrix wurde gleichmäßig rund um die Plastikstifte geschichtet. Anschließend wurde Fibrinogen mit Thrombin vermischt und die noch flüssige Mischung in die Kammer pipettiert. Nach Gelieren der Mischung (ca. 3 Minuten) wurde der Deckel der Kammer aufgesetzt, fixiert und die Kammer subkutan implantiert.

Gruppe E10d, E12Wo, bE10d und bE12Wo: Vor Befüllen der Kammer mit BMP-2 haltiger Matrix wurde diese nach dem Zusammensetzen mit PBS-0,1%BSA Lösung (BSA: Bovines Serumalbumin, Sigma Aldrich) beschichtet, um eine Inaktivierung des Wachstumsfaktors durch Kontakt mit den Materialien zu verhindern. Nach Absaugen der PBS-BSA Lösung wurde die Hartmatrix gleichmäßig rund um die Plastikstifte geschichtet. Die Fibrinogen/BMP-2/MSK Mischung wurde mit Thrombin versetzt und das Gemisch in die Kammer pipettiert. Nach Gelieren der Mischung wurde der Deckel aufgesetzt, mit 3 Einzelknopfheften fixiert und die Kammer unverzüglich implantiert, um ein gutes Zellüberleben zu gewährleisten.

Die Kammer wurde mit der Deckelseite nach unten in die subkutane Tasche gesetzt; Die beiden Flügel zeigten dabei nach kranial und kaudal. Es wurde darauf geachtet, die Kammer nicht direkt auf den Nerv zu nähen. Nach genauer Positionierung wurde die Kammer mit 3 Einzelknopfnähten (USP 4/0, Polypropylen) am Muskel fixiert. Der Wundverschluss erfolgte zweischichtig (Subkutannaht einfach fortlaufend, Hautnaht einfach fortlaufend, beides mit USP 4/0, Polyglactin 910). Abschließend wurde ein Sprühverband aufgetragen.

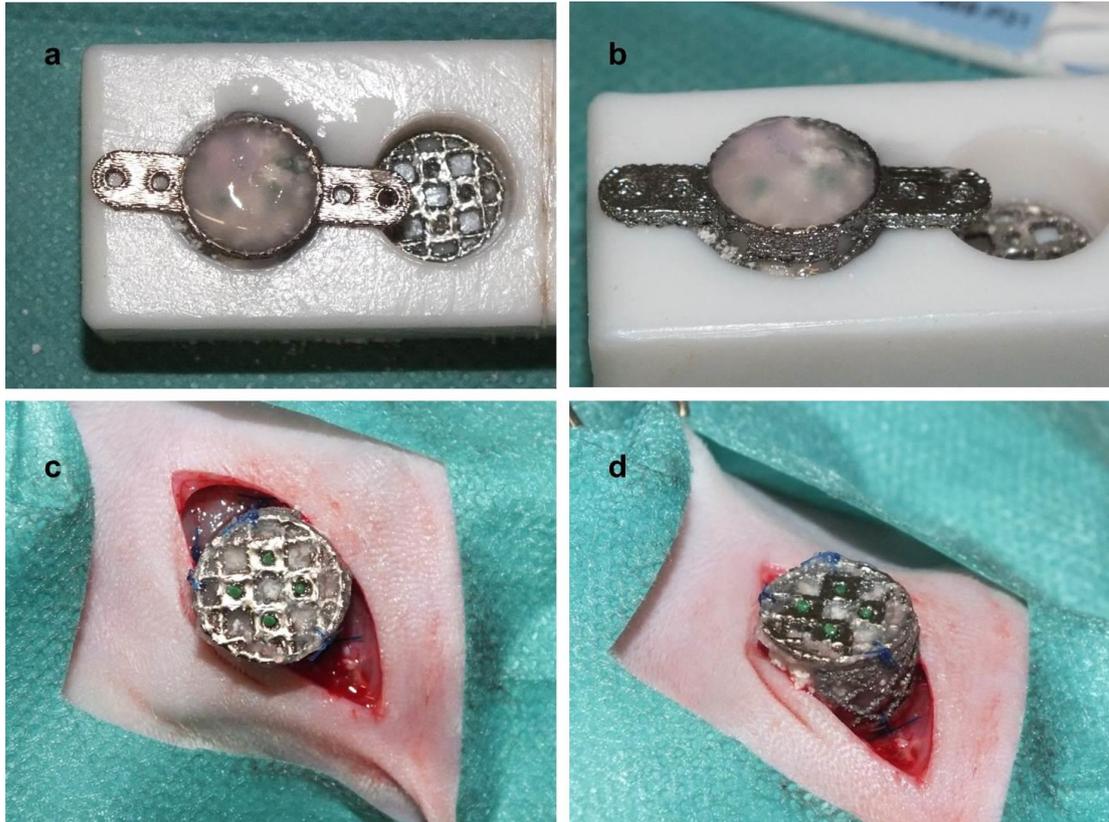


Abbildung 6: Subkutane Implantation eines Konstrukts in die Leiste eines Spendertieres. a, b: Titankammer nach Befüllen und vor Aufsetzen des Deckels. c, d: Operationssitus nach Einsetzen und Festnähen der befüllten Kammer; links oben im Bild jeweils proximal (kraniomedial), links unten distal.

*Postoperative Versorgung.* Nach der Operation erhielten die Tiere Tramadolhydrochlorid (Tramal Tropfen, Grünenthal, Aachen, Deutschland) über das Trinkwasser (75 mg pro Liter Trinkwasser) für 10 Tage, danach wurde die Dosis über einen Zeitraum von 4 Tagen langsam ausgeschlichen. Es wurde postoperativ keine Antibiose verabreicht.

#### **4.3.5 Bestrahlung der Empfängertiere**

Die Bestrahlung erfolgte wie unter Punkt 4.2.2 beschrieben. Basierend auf den Ergebnissen der Vorstudie wurden die Empfängertiere der Gruppen bE12Wo, bE10d, bF und bG einmalig mit 20 Gy bestrahlt. Die Zeit bis zum Setzen des Femurdefekts betrug 4 Wochen.

#### **4.3.6 Setzen des CSFD im Empfängertier**

*Operationsvorbereitung.* Zum Einleiten der Narkose wurden die Empfängertiere in eine Induktionsbox gesetzt, in die 5% Isofluran (Forene, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) in

reinem Sauerstoff eingeleitet wurde. Nach Gewichtskontrolle wurden die Tiere mit Xylazin (1,6 mg intramuskulär; Rompun 2%, Bayer, Leverkusen, Deutschland), Buprenorphin (12 µg subkutan; Temgesic Ampullen, RB Pharmaceuticals, Berkshire, UK), Meloxicam (0,2 mg subkutan; Metacam 2 mg/mL, Boehringer-Ingelheim, Ingelheim, Deutschland) und Clindamycin (10 mg subkutan; Clindamycin 150 mg/mL, Hameln Pharma, Hameln, Deutschland) prämediziert. Die Narkoseerhaltung erfolgte mittels Isofluran in reinem Sauerstoff über eine Maske. Die Tiere wurden auf einer Heizplatte (39°C) in rechter Seitenlage positioniert, die linke Hinterextremität wurde ausgeschoren und aseptisch für die Operation vorbereitet.

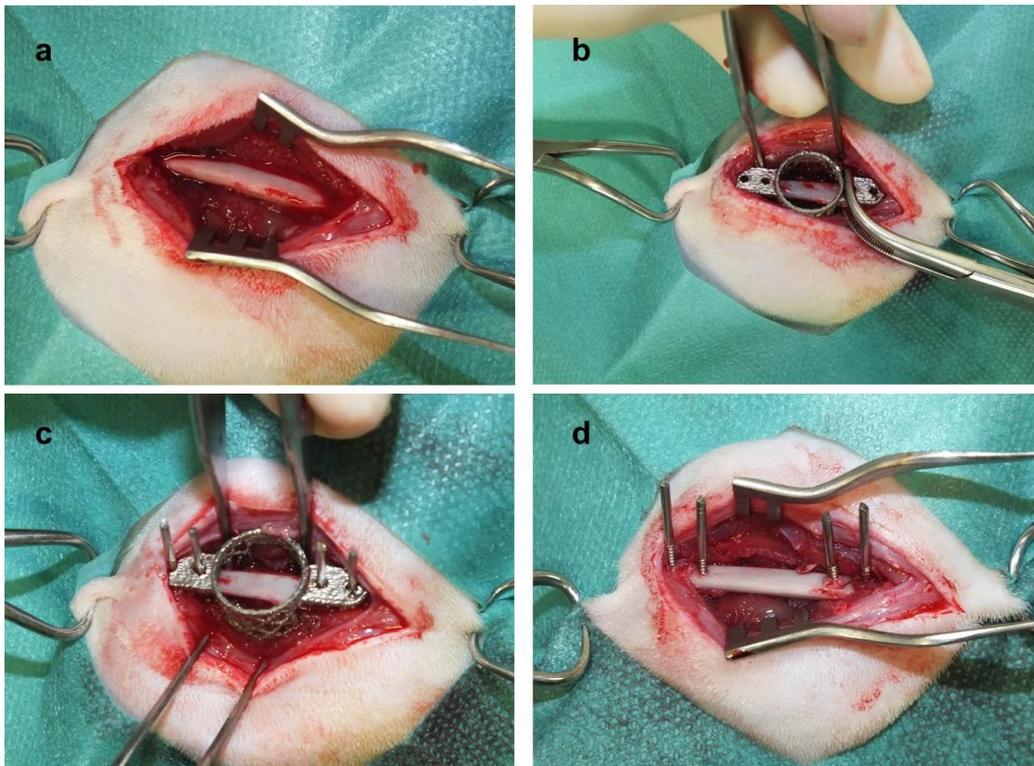
Parallel dazu wurde das jeweilige Spendertier (Gruppen E10d, E12Wo, F, bE10d, bE12Wo, bF) ebenfalls in Narkose gelegt und mit 1,6 mg Xylazin prämediziert. Der Bereich rund um das Konstrukt wurde ausgeschoren und aseptisch für die Entnahme vorbereitet.

*Operation.* Die Haut des Empfängertiers wurde mit einem Skalpell über dem linken Femur eröffnet und die Oberschenkelmuskulatur wurde stumpf voneinander getrennt, um den Oberschenkelknochen freizulegen. Die Muskelansätze wurden bis auf den Trochanter major mit einem Skalpell abpräpariert, Muskelreste wurden mithilfe einer sterilen Kompresse entfernt. Der Trochanter major wurde mitsamt der dort ansetzenden Sehnen in einem Stück mit einer Schere abgesetzt (s. Abb. 7a). Eine leere Template-Kammer wurde auf den Knochen gesetzt und fixiert (s. Abb. 7b). Mithilfe einer Universal-Akkumaschine mit Bohraufsatz (Colibri, Synthes, Umkirch, Deutschland) wurden durch die Löcher in den Flügeln der Template-Kammer die späteren Schraubenlöcher mithilfe von 4 Kirschnerdrähten vorgebohrt (1,2 mm Durchmesser, 8 mm Gewinde; Intercus, Bad Blankenburg, Deutschland; s. Abb. 7c). Die Kammer wurde abgenommen (s. Abb. 7d), der Bohraufsatz durch einen oszillierenden Sägeaufsatz (Sägeblatt: 15 mm Länge, 6,0 mm Breite, 0,4 mm Schnittdicke; Synthes, Umkirch, Deutschland) ersetzt und der Defekt unter Einhaltung eines definierten Abstands von den Pins (Pinzette als Abstandhalter) herausgesägt (s. Abb. 7e).

Gruppen E10d, E12Wo und F, bzw. bE10d, bE12Wo und bF: Am Spendertier wurde die Haut über dem prävaskularisierten Konstrukt mit einer Schere eröffnet. Das umliegende Bindegewebe wurde scharf vom Konstrukt abpräpariert und die Kammer entnommen. Anschließend wurde das Spendertier in tiefer Narkose euthanasiert (T61; Intervet, Unterschleißheim, Deutschland).

Gruppe G bzw. bG: Eine leere, autoklavierte Kammer wurde anstelle des prävaskularisierten Konstrukts verwendet.

Die Kammer wurde im Empfängertier über die vorgebohrten Kirschnerdrähte in den Defekt gesetzt und mithilfe einer großen Klemme fixiert (s. Abb. 7f). Die Drähte wurden nacheinander entfernt und durch Osteosynthese-Schrauben ersetzt (1,0 mm Durchmesser, Schraube 1 = proximale Schraube: 9 mm Länge; Schraube 2-4: 7 mm Länge; MOH Modulares Osteosynthese-System zur Handchirurgie, KLS Martin, Tuttlingen, Deutschland; s. Abb. 7g). Abschließend wurde proximal und distal je eine Drahtcerclage zwischen den beiden Schrauben gesetzt, um die Kammerflügel zusätzlich zu stabilisieren (s. Abb. 7h). Der Wundverschluss erfolgte mit Polyglactin 910 (USP 4/0) in drei Schichten (Faszie, Subcutis, Haut). Abschließend wurde ein Sprühverband aufgetragen.



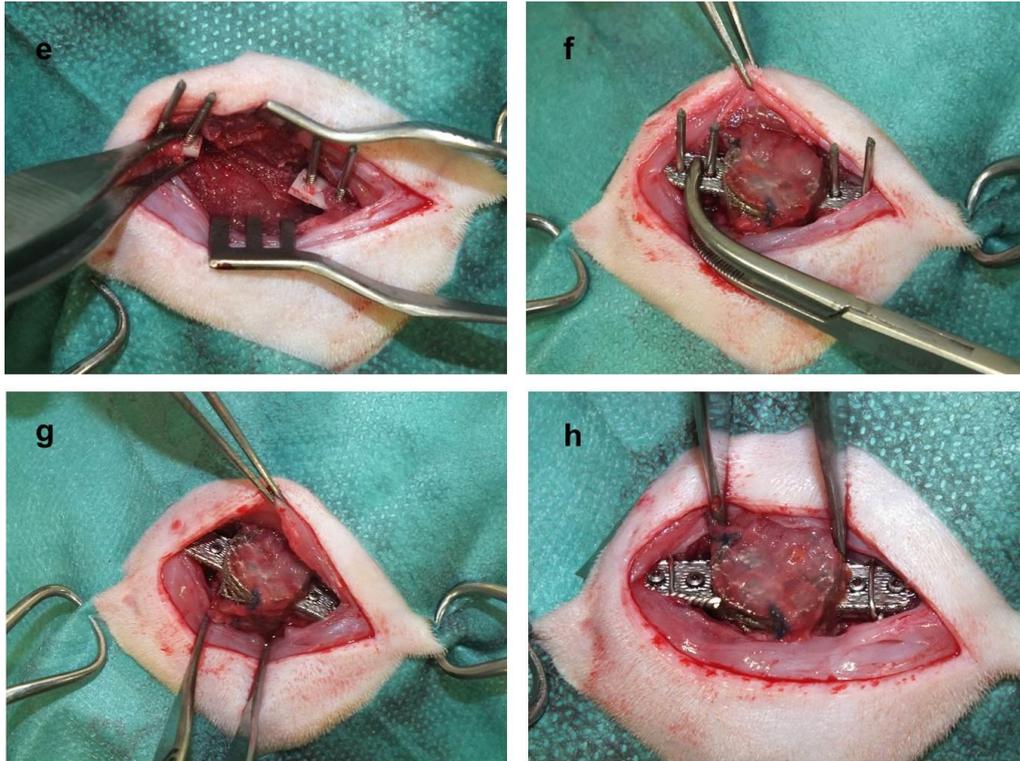


Abbildung 7: Operationsablauf bei Setzung des Critical-sized-Femurdefekts (CSFD). a-d: Einbohren der Pins anhand einer Template-Kammer; e: Heraussägen des Defekts; f-h: Einsetzen und Fixieren des Konstrukts.

*Postoperative Versorgung.* Nach Abschluss der Operation erhielten die Tiere für die Aufwachphase weitere 6 µg Buprenorphin subkutan. Postoperativ wurde den Tieren bis zum 3. postoperativen Tag zweimal täglich 18 µg Buprenorphin und 10 mg Clindamycin sowie einmal täglich 0,2 mg Meloxicam subkutan verabreicht. Am dritten postoperativen Tag erfolgte die Umstellung auf orale Medikation über das Trinkwasser (100 mg Enrofloxacin pro Liter TW; Baytril 5%, Bayer, Leverkusen, Deutschland; 75 mg Tramadolhydrochlorid pro Liter TW; Tramal Tropfen, Grünenthal, Aachen, Deutschland), die bis zum 8. postoperativen Tag erfolgte. Am 8. postoperativen Tag wurde das Antibiotikum abgesetzt, vom 13.-17. postoperativen Tag wurde die Tramadol-Dosis langsam reduziert und abgesetzt.

Ein Tier der Gruppe G wurde nach dem beschriebenen Analgesie- und Antibiotikaschema behandelt. Die restlichen Leerdefekte wurden aus einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe (Balzer, 2013) übernommen; die Tiere wurden mit der dort beschriebenen perioperativen Medikation versorgt.

#### **4.3.7 Perfusion, Explantation und weitere Verarbeitung**

Vor der Perfusion erfolgte eine kurze Lafevaluation und manuelle Palpation des Defekts. Die Perfusion erfolgte wie unter Punkt 4.2.3 beschrieben. Am Tag nach der Perfusion wurden zwei Röntgenaufnahmen (Multix Compact K, Siemens Aktiengesellschaft, München, Deutschland; 45 kV, 2,8 mAs) des Femurdefekts (lateromedial, anteroposterior) angefertigt, um den Sitz der Kammer zu überprüfen. Anschließend wurde der Oberschenkel freipräpariert, im Kniegelenk und Hüftgelenk exartikuliert und fotografiert. Anschließend wurden Deckel und Boden abgenommen, teilweise die äußeren Kanten des Konstrukts mithilfe eines Skalpell abgetrennt und in flüssigem Stickstoff für die RNA Isolation tiefgefroren. Der restliche Defekt wurde mit Kammer für 24 Stunden in 4%ige Formaldehydlösung gelegt. Nach 24 Stunden wurde die Kammer entfernt und Knochen/Konstrukt wie unter Punkt 4.2.5 beschrieben entkalkt.

Bei je zwei Konstrukten pro Gruppe wurde nach der Entkalkung wie unter Punkt 4.2.7 beschrieben ein Micro-CT angefertigt. Je ein Konstrukt pro Gruppe wurde nicht perfundiert, sondern direkt nach Euthanasie des Tieres explantiert, komplett in Stickstoff tiefgefroren und für die RNA-Isolation verwendet (s. Abschnitt 4.2.6).

#### **4.3.8 RNA-Isolation und quantitative PCR**

Folgende Konstrukte wurden für die quantitative PCR verwendet:

- Gruppe E10d, bE10d, E12Wo, bE12Wo, F, bF,: je ein ganzes Konstrukt;
- Gruppe E12Wo und bE12Wo: zusätzlich RNA aus den Außenkanten von je 5 Konstrukten. In den Gruppen E10d, bE10d, F und bF konnte hingegen keine ausreichende Menge an RNA aus den abgetrennten Kanten gewonnen werden.

RNA-Isolation, reverse Transkription und quantitative PCR erfolgten wie in der Vorstudie beschrieben (Abschnitt 4.2.6). Die Expression derselben Marker wie in der Vorstudie wurde bestimmt. Als Vergleich dienten unbestrahlte, native Knochen aus der Vorstudie (unbestrahltes rechtes Femur).

#### **4.3.9 Histologie**

Nach Abschluss der Entkalkung und ggf. im Anschluss an die  $\mu$ CT Untersuchung wurden die Konstrukte der Länge nach halbiert (sagittal) und mittels Alkoholreihe entwässert. Die entwässerten Knochenhälften wurden in Paraffin eingebettet und mittels Mikrotom

geschnitten (3-5  $\mu\text{m}$  Schichtdicke). Anschließend wurden sie in einer umgekehrten Alkoholreihe (Xylol, 99% Ethanol, 96% Ethanol, 70% Ethanol) entparaffiniert und wie folgt gefärbt:

Hämatoxylin-Eosin Färbung,  $\alpha$ SMA-Färbung ( $\alpha$ -Smooth-Muscle-Actin), Lectin-Färbung

Siehe Abschnitt 4.2.8.

Masson-Goldner Färbung (Masson Trichrom Färbung)

Das Präparat wurde für 6 Minuten in Eisenhämatoxylin-Lösung nach Weigert (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingelegt. Nach kurzem Spülen mit destilliertem Wasser, kurzem Eintauchen in 1% HCl-Alkohol und erneutem ausgiebigerem Spülen mit Leitungswasser (3-5 Minuten) erfolgte die Dreifachfärbung mit Azophloxin-Lösung (15 Minuten; Chroma-Waldeck GmbH, Münster, Deutschland), Phosphormolybdänsäure (Orange G; 3 Minuten Merck) und Lichtgrün (4 Minuten; Merck); zwischen den einzelnen Färbeschritten wurden die Präparate kurz in 1%ige Essigsäure getaucht. Abschließend wurden die Schnitte durch eine Alkoholreihe wieder entwässert (96% Alkohol, 100% Alkohol, Xylol) und eingedeckt.

ED1 Färbung (CD68 Färbung)

Wie bei der Hif1 $\alpha$ -Färbung (s. Abschnitt 4.2.8) wurde auch für diese immunhistochemische Methode das Polymersystems POLAP-100 verwendet (Zytomed Systems, Berlin, Deutschland). Die entparaffinierten Schnitte wurden zunächst Target Retrieval Solution (Dako GmbH, Hamburg, Deutschland) für 1 Minute bei 121°C gekocht. Anschließend wurden die Schnitte für 5 Minuten in Blockierungslösung (Blocking solution, Zytomed Systems) eingelegt, um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu verhindern. Die Schnitte wurden mit Primär-Antikörper-Lösung überschichtet (monoklonaler mouse anti rat CD68, Serotec; Verdünnung: 1:300) und über Nacht bei +4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte für 30 Minuten in ein Verstärkungsreagenz (Postblock Solution, Zytomed Systems) eingelegt und anschließend das AP-Polymer (Sekundärantikörper, gekoppelt an alkalische Phosphatase) für 30 Minuten aufgetragen. Die Visualisierung erfolgte mithilfe von Fast Red (Sigma Aldrich, Seelze, Deutschland), die Gegenfärbung mithilfe von Hämalaun (Merck).

### DAPI Färbung und TUNEL Assay

Bei Konstrukten aus den Gruppen E10d, bE10d, E12Wo und bE12Wo wurde zur Visualisierung des Zellüberlebens eine TUNEL Färbung durchgeführt (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling). Bei dieser Färbung werden freie 3'-OH-Gruppen in apoptotischen Zellkerne mithilfe des Enzyms TdT (terminal desoxynucleotidyl transferase) visualisiert. Für den TUNEL Assay wurde das „FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Fluorescent TdT Enzyme“ (Calbiochem/Merck-Millipore, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Die Schnitte wurden nach dem Entparaffinieren mit Proteinase K (2 mg/ml in TRIS Puffer, pH 8) überschichtet und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert (Permeabilisierung). Nach zweimaligem Waschen wurden die Schnitte mit TdT Equilibration-Puffer für 20 Minuten bei Raumtemperatur bedeckt. Nach Abziehen des Equilibration-Puffers wurden die Schnitte mit TdT-Reaktionsmix überschichtet und für 1,5 Stunden bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte die Gegenfärbung der vitalen Zellkerne mit DAPI (s. Abschnitt 4.2.8).

### Auswertung Histologie

Das Fotografieren der Präparate erfolgte wie unter Punkt 4.2.8 beschrieben. Die Auswertung erfolgte anschließend mittels Image J Software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA; Version 1.47v) mit hierfür definierten Threshold-Werten:

- Gesamtkonstruktgröße (Hämatoxylin-Eosin Färbung), 10x Vergrößerung;
- Knochenfläche absolut und relativ zur Gesamtkonstruktgröße (Hämatoxylin-Eosin Färbung), 10x Vergrößerung;
- Gefäßanzahl absolut und relativ zur Gesamtkonstruktgröße: Auszählen der perfundierten und somit schwarz erscheinenden Gefäße (Hämatoxylin-Eosin Färbung), 10x Vergrößerung;
- Anzahl der überlebenden implantierten bmMSCs (Gruppen E10d, bE10d, E12Wo und bE12Wo): Auszählen der rot fluoreszierenden Zellen im Präparat im Overlay (TUNEL/DAPI/DiI), 100x Vergrößerung.

Die immunhistochemischen Färbungen sowie die Masson-Goldner-Färbung wurden ausschließlich qualitativ ausgewertet. Hierbei wurde die Gefäßbildung (Lectin-Färbung,

$\alpha$ SMA-Färbung) sowie die Immunreaktion (ED1/CD68-Färbung) im Konstrukt und in den Femurstümpfen beurteilt.

#### **4.3.10 Statistik**

Die statistische Auswertung erfolgte mittels SPSS (Version 21). Die Daten wurden mittels Kolmogorov-Smirnov-Test auf Normalverteilung überprüft.

##### Phase I

Der Vergleich zwischen bestrahlten und unbestrahlten Knochen der Vorstudie erfolgte für alle Parameter (Histologie, quantitative PCR,  $\mu$ CT) mittels T-Test. Der Vergleich der histologischen Parameter der bestrahlten Knochen der vier Gruppen erfolgte mittels ANOVA.

Da in der Vorstudie für die quantitative PCR einer Gruppe (Gruppe B) die proximale Epiphyse anstelle der distalen verwendet wurde, wurde hier von einem Vergleich der Gruppen untereinander abgesehen, da ein unterschiedliches Expressionsmuster zwischen proximaler und distaler Epiphyse nicht ausgeschlossen werden kann.

##### Phase II

Der Vergleich der histologischen Parameter der unbestrahlten Konstrukte und der entsprechenden bestrahlten Konstrukte (z.B. Gruppe E12Wo gegen Gruppe bE12Wo) erfolgte mittels T-Test. Die unbestrahlten bzw. die bestrahlten Gruppen untereinander wurden mittels ANOVA verglichen.

Die Expression der unterschiedlichen Marker in der quantitativen PCR der Gruppen E12Wo und bE12Wo wurde mittels ANOVA mit jener der unbestrahlten Knochen aus der Vorstudie (=Kontrolle) verglichen.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Phase I: Evaluation Bestrahlungsprotokoll

#### 5.1.1 Klinische Evaluation

Der Bestrahlungsvorgang wurde von allen Tieren gut vertragen. In den Wochen bis zur Explantation nahmen sie im Durchschnitt  $74,8 \pm 2,5$  g (Gruppe A),  $110,7 \pm 16,2$  g (Gruppe B),  $60,2 \pm 15,1$  g (Gruppe C) und  $103,2 \pm 14,5$  g zu (Gruppe D). In den Wochen nach der Bestrahlung entwickelten einige Tiere eine leichte, selbstlimitierende Hautrötung, oft verbunden mit einem leichten Schuppen der Haut; diese Reaktionen waren ausgeprägter in den einmal bestrahlten Gruppen (A und B). Der Fellwuchs an der bestrahlten Körperstelle war deutlich reduziert (s. Abb. 8), und die Haut erschien hier häufig pergamentartig. Analgetische oder antibiotische Medikation war nach der Bestrahlung nicht nötig, das Allgemeinbefinden war unverändert.

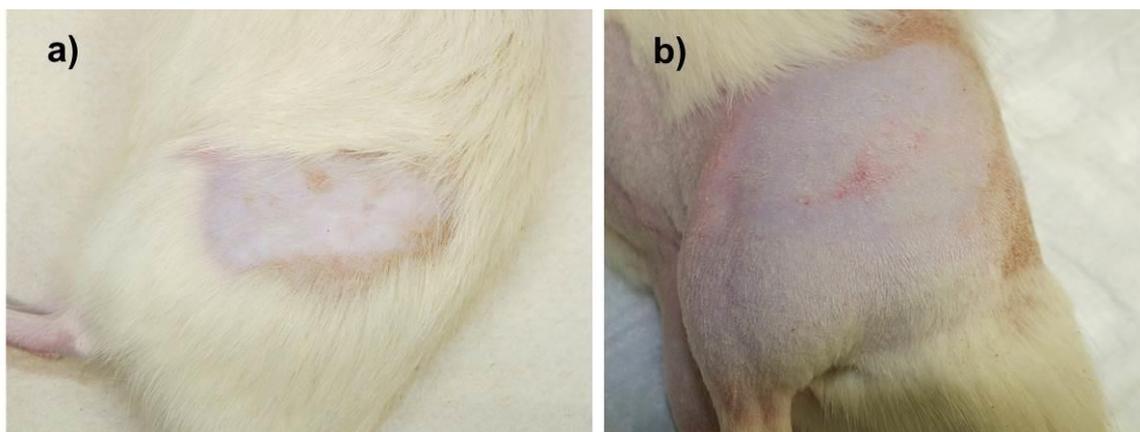


Abbildung 8: Hautreaktionen bei Explantation; a) pergamentartige Haut und reduzierter Fellwuchs im bestrahlten Bereich (Bild: Gruppe B); b) fleckige Rötung (Bild: Gruppe A).

Die mit der Bestrahlung verbundene Injektionsnarkose führte jedoch in 5 Fällen zu einem Atemstillstand und dem Tod des Tieres in Narkose; diese Tiere wurden für die Studie ersetzt, um wieder die Gruppengröße von 6 Tieren pro Gruppe zu erreichen.

#### 5.1.2 Makroskopische Beurteilung

Es konnte bei der Explantation kein makroskopischer Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Femora sowie zwischen den unterschiedlichen Bestrahlungsprotokollen festgestellt werden, die benötigte Zeit für die vollständige Entkalkung war ebenfalls gleich.

### 5.1.3 Histologie

#### 5.1.3.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Bereits auf den ersten Blick zeigte sich in sämtlichen bestrahlten Präparaten eine deutliche Vakuolisierung des Knochenmarks (s. Abb. 9). Die quantitative Auswertung (s. Abb. 10) ergab eine hoch signifikante Zunahme der Gesamtvakuolenfläche ( $P \leq 0,001$ ) der bestrahlten im Vergleich zu den unbestrahlten Femora. Bei Aufteilung in die einzelnen Gruppen ergab sich eine statistische Signifikanz für die 4-Wochen-Gruppen (Gruppe A und C:  $P \leq 0,01$ ) und eine Tendenz zur statistischen Signifikanz für die Gruppe D ( $P = 0,069$ ). Weniger deutlich war die Zunahme der Vakuolenanzahl, die zwar insgesamt statistisch signifikant war ( $P \leq 0,05$ ), bei Aufteilung in die einzelnen Gruppen jedoch nur in der Gruppe B ( $P \leq 0,05$ ), mit einer Tendenz zur Signifikanz in Gruppe C ( $P = 0,068$ ). Die aus diesen beiden Parametern errechnete Durchschnittsgröße der Vakuolen war ebenfalls bei bestrahlten Proben signifikant größer als bei unbestrahlten ( $P \leq 0,05$ ); bei Aufteilung in die einzelnen Gruppen war dieser Parameter in beiden 4-Wochen-Gruppen sowie in der Gruppe D signifikant (Gruppe A:  $P \leq 0,01$ ; Gruppe C und Gruppe D:  $P \leq 0,05$ ). Die bestrahlten Knochen der unterschiedlichen Gruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

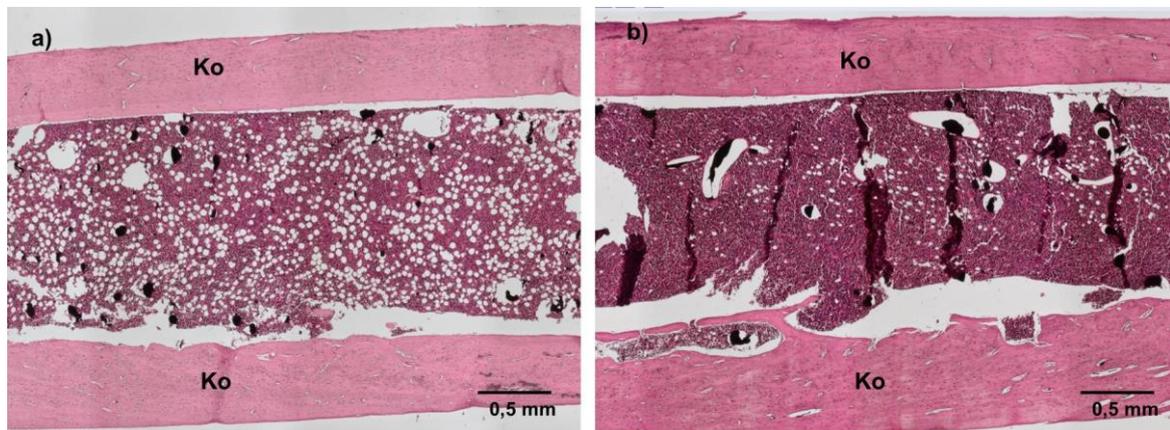


Abbildung 9: Knochenpräparate der Phase I (Evaluation Bestrahlungsprotokoll). a) bestrahlter Knochen, Gruppe A; b) unbestrahlter Knochen, Gruppe A. Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Ko = Kortikalis; dazwischen Knochenmark. Deutliche Vakuolisierung des Knochenmarks im bestrahlten Knochen.

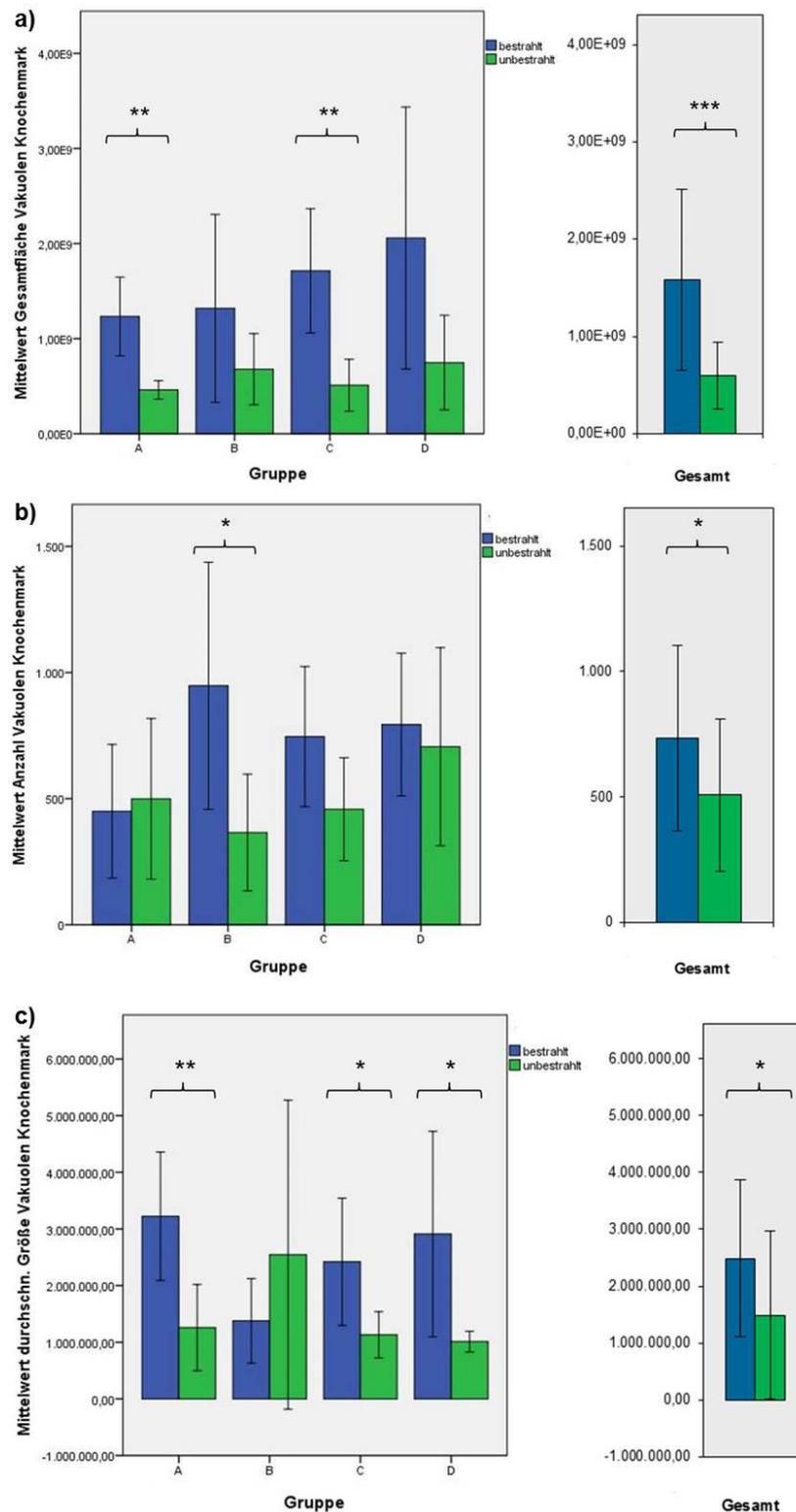


Abbildung 10: Quantitative Auswertung der Vakuolen im Knochenmark (Hämatoxylin-Eosin-Färbung): Gesamtfläche (a), Anzahl (b) und durchschnittliche Größe (c). blaue Balken = bestrahlt; grüne Balken = unbestrahlt. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ .

In der Gefäßauswertung (Anzahl und durchschnittliche Größe der Microfil®-perfundierten Gefäße) war kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Proben feststellbar. Der Grad an Perfusion war jedoch nicht konstant in den einzelnen Gefäßen, sodass beide Parameter eine hohe Standardabweichung aufwiesen.

### 5.1.3.2 DAPI Färbung

Die Auszählung der DAPI positiven Zellen in der Kortikalis ergab eine signifikante Abnahme der Zellzahl zwischen den bestrahlten und unbestrahlten Proben ( $P \leq 0,05$ ). Bei Aufteilung in die einzelnen Gruppen war dieser Effekt jedoch nicht signifikant. Die bestrahlten Knochen der verschiedenen Gruppen unterschieden sich nicht voneinander.

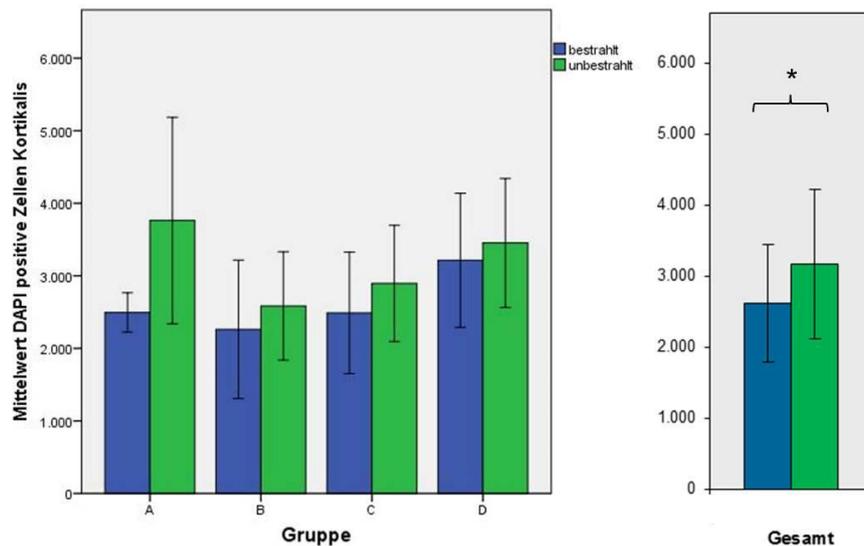


Abbildung 11: Auszählung der DAPI positiven Zellen in der Kortikalis. Blaue Balken = bestrahlt; grüne Balken = unbestrahlt. \*  $P \leq 0,05$ .

### 5.1.3.3 Hif1 $\alpha$ Färbung

Die Auszählung der Hif1 $\alpha$ -positiven Zellen im Knochenmark ergab eine signifikante Abnahme durch die Bestrahlung ( $P \leq 0,01$ ). Bei Aufteilung in die einzelnen Gruppen war dieser Effekt in Gruppe C ( $P \leq 0,05$ ) signifikant. Die bestrahlten Knochen der verschiedenen Gruppen unterschieden sich nicht voneinander.

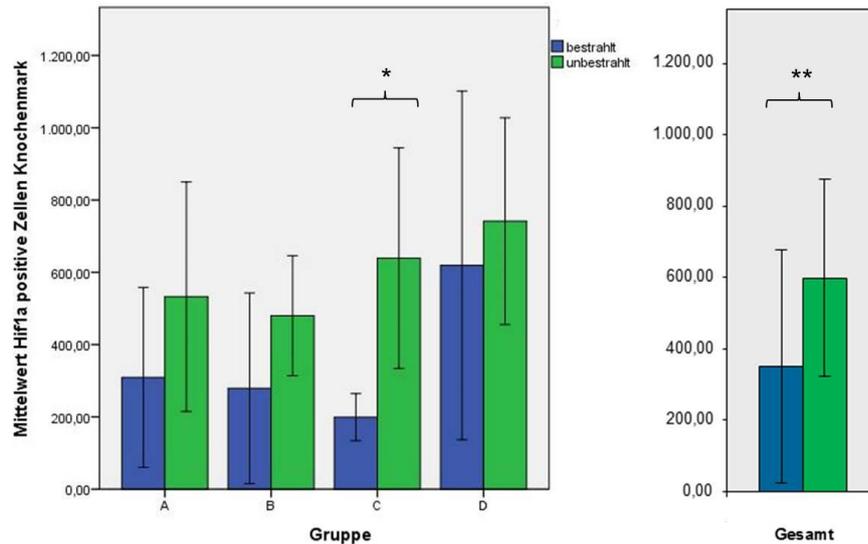


Abbildung 12: Auszählung der Hif1 $\alpha$  positiven Zellen im Knochenmark. Blaue Balken = bestrahlt; grüne Balken = unbestrahlt. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ .

#### 5.1.3.4 CD31 Färbung

Die Auszählung der CD31-positiven Zellen im Knochenmark ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Knochen.

#### 5.1.4 Quantitative PCR

##### 5.1.4.1 RNA Isolation aus Knochen

Es konnte in allen Fällen eine für die quantitative PCR ausreichende Menge an RNA aus den verwendeten Epiphysenstücken gewonnen werden. In Gruppe A, C und D waren bei jeweils 3-4 unbestrahlten und 3-4 bestrahlten Proben (Gruppe A: 3 bestrahlte, 4 unbestrahlte; Gruppe C: 3 bestrahlte, 3 unbestrahlte; Gruppe D: 3 bestrahlte, 4 unbestrahlte) deutliche 18S und 28S Banden in der Gel-Elektrophorese zu sehen. Im Gegensatz dazu waren viele Proben der Gruppe B stark degradiert; aus diesem Grund wurde in dieser Gruppe aus der proximalen Epiphyse RNA isoliert, was ebenfalls zu deutlichen Banden bei einer ausreichenden Anzahl an Proben (4 bestrahlte, 3 unbestrahlte) führte. Für die folgende reverse Transkription wurden nur intakte Proben verwendet. Die Integritätsprüfung mittels Gelelektrophorese ist in Abb. 13 exemplarisch für eine Gruppe abgebildet.

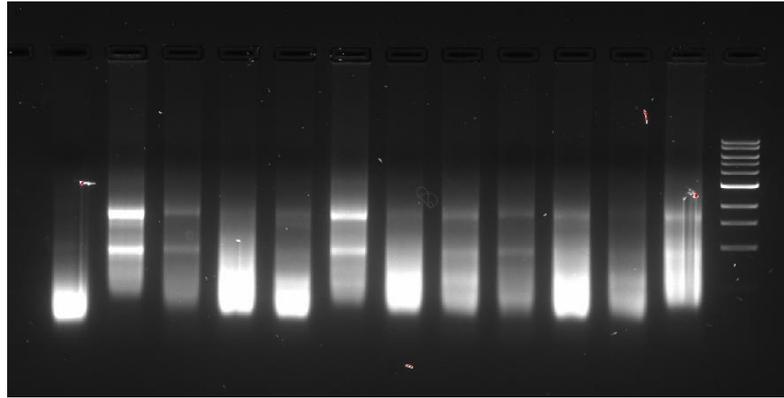


Abbildung 13: RNA Integritätsprüfung, Gruppe D, 1%iges Agarose-Gel, 1xTAE-Puffer. Tasche 13 (rechts im Bild): 1 kb Standard; Taschen 1-6: unbestrahlte Proben Gruppe D, Taschen 7-12: bestrahlte Proben Gruppe D (je 1 µg RNA in Xylencyanol).

#### 5.1.4.2 RNA Isolation aus Zellen (osteogen differenzierte bmMSCs, endotheliale Vorläuferzellen)

Es konnte in allen Fällen eine ausreichende Menge an RNA gewonnen werden, die bei der Integritätsprüfung am RNA Gel sehr deutliche Banden zeigte (s. Abb. 14).

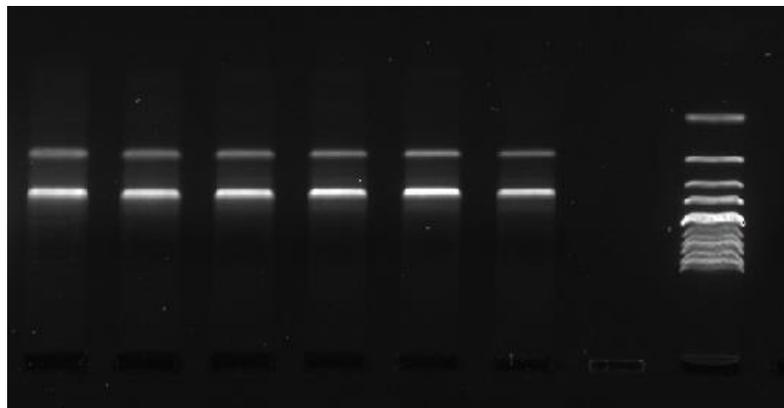


Abbildung 14: RNA Integritätsprüfung, osteogen differenzierte bmMSCs 1 Woche nach Bestrahlung, 1%iges Agarose-Gel, 1xTAE Puffer; Tasche 1-3: bestrahlte Proben; Tasche 4-6: unbestrahlte Proben; Tasche 8: 1kb Standard. Integritätsprüfung der RNA aus endothelialen Vorläuferzellen nicht abgebildet.

#### **5.1.4.3 Genexpression nach Bestrahlung: osteogen differenzierte bmMSCs**

Durch die Bestrahlung zeigte sich keine signifikante Veränderung der Expression der untersuchten Gene in vitro. Die Expression von TNF $\alpha$  war zu niedrig, um verlässliche Ergebnisse zu liefern.

#### **5.1.4.4 Genexpression nach Bestrahlung: endotheliale Vorläuferzellen**

Durch die Bestrahlung war in endothelialen Vorläuferzellen die Expression von Osteocalcin, ALP, Hif1 $\alpha$  und VEGF-A bezogen auf GAPDH sowie die Expression von Osteocalcin und RUNX2 bezogen auf PPIA signifikant vermindert (s. Abb. 15). Die verminderte Expression von RUNX2 bezogen auf GAPDH zeigte einen Trend zur Signifikanz ( $P = 0,056$ ). Auch hier war die Expression von TNF $\alpha$  zu niedrig, um verlässliche Ergebnisse zu liefern.

#### **5.1.4.5 Genexpression nach Bestrahlung: Knochen**

In Gruppe A zeigten die bestrahlten Knochen im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen eine verminderte Expression mehrerer untersuchter Gene (s. Abb. 16). Der Vergleich mittels T-Test ergab bezogen auf GAPDH für RUNX2 ( $P \leq 0,05$ ), TGF $\beta$ 1 ( $P \leq 0,05$ ), TNF $\alpha$  ( $P \leq 0,05$ ) und VEGF-A ( $P \leq 0,01$ ) eine signifikant verminderte Expression in den bestrahlten Proben. Bezogen auf PPIA war die Expression von Hif1 $\alpha$  ( $P \leq 0,05$ ), Osteocalcin ( $P \leq 0,05$ ) und VEGF-A ( $P \leq 0,05$ ) gegenüber den unbestrahlten Kontrollen signifikant vermindert, jene von Collagen I und TGF $\beta$ 1 zeigte einen Trend zur Signifikanz ( $P = 0,059/0,060$ ).

In Gruppe B hingegen zeigten die bestrahlten Knochen einen Trend zur verstärkten Produktion mehrerer Marker im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen (ALP, OC, OP bezogen auf GAPDH; Hif1 $\alpha$  bezogen auf PPIA). Der statistische Vergleich der einzelnen  $\Delta$ Ct-Werte war jedoch nicht signifikant ( $P = 0,071/0,076/0,073$  und  $0,079$ ).

In Gruppe C zeigte sich keine Veränderung der Genexpressionen durch die dreimalige Bestrahlung. In Gruppe D zeigte die Verminderung von Osteocalcin (bezogen auf PPIA) eine Tendenz zur Signifikanz ( $P = 0,054$ ).

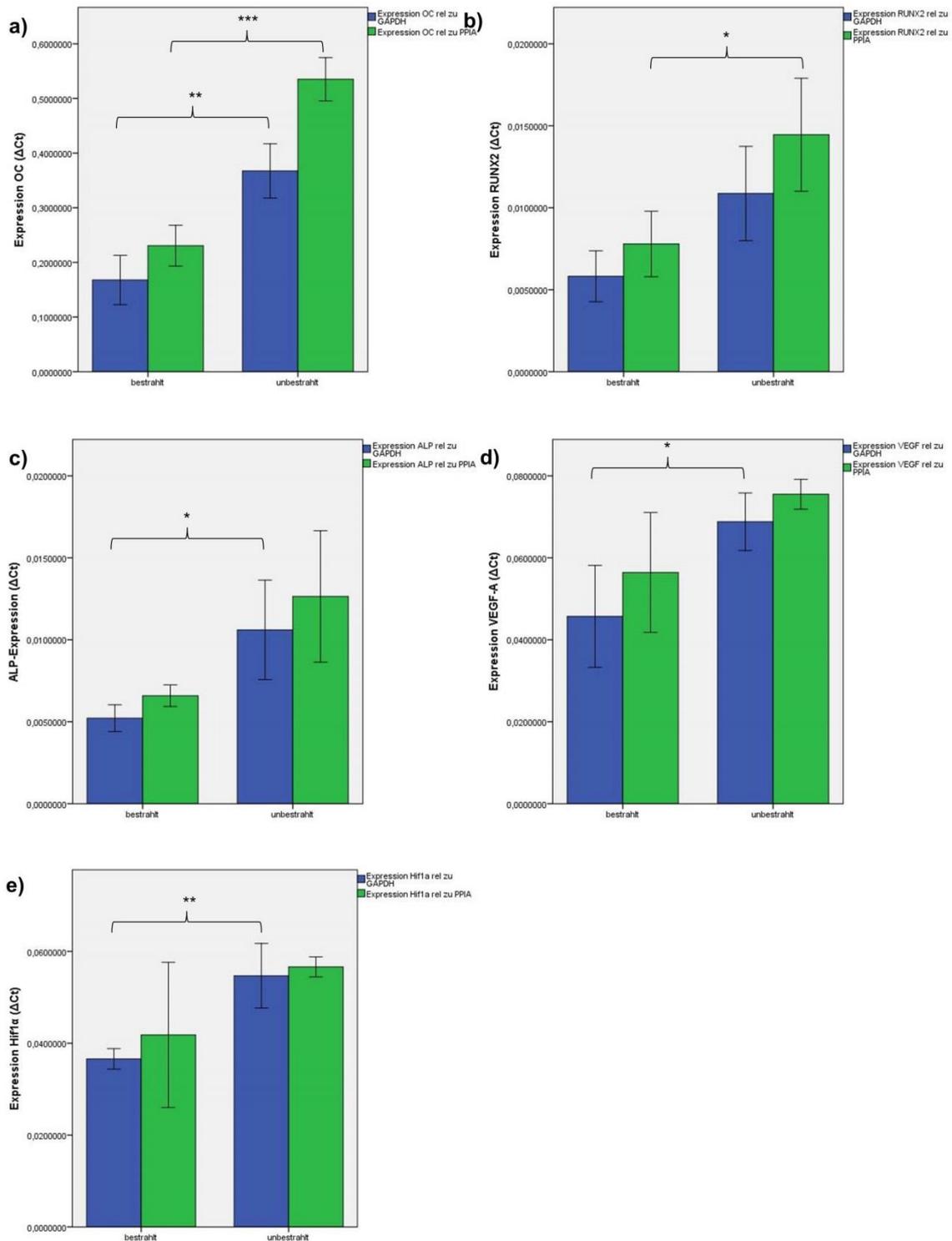
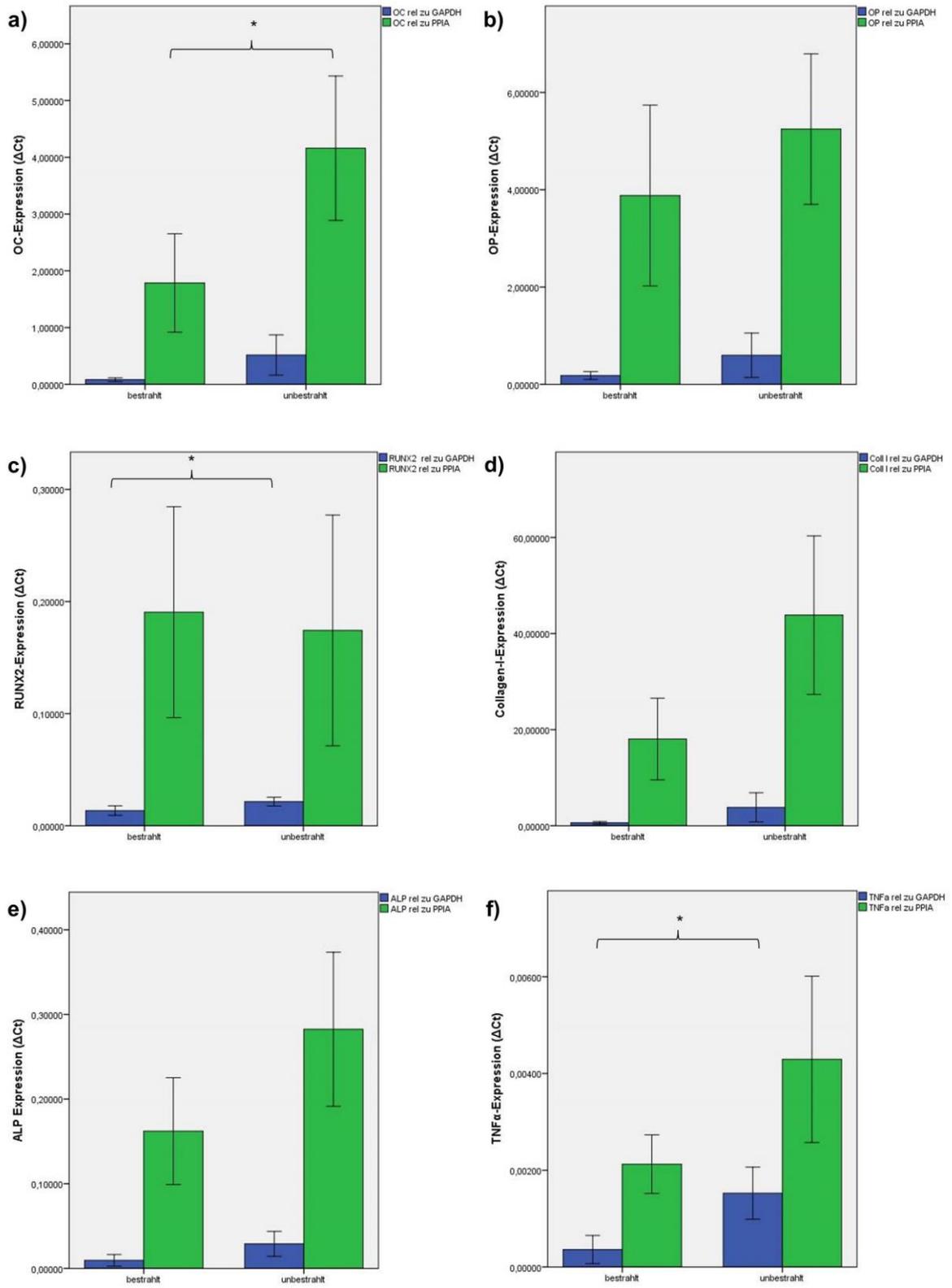


Abbildung 15: Genexpression in bestrahlten (links) und unbestrahlten (rechts) endothelialen Vorläuferzellen in vitro. Osteocalcin (a), RUNX2 (b), ALP (c), VEGF-A (d), Hif1α (e). Blaue Balken = Expression relativ zu GAPDH; grüne Balken = Expression relativ zu PPIA.

Osteopontin, Collagen I, TGFβ1 und TNFα nicht abgebildet.

\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ .



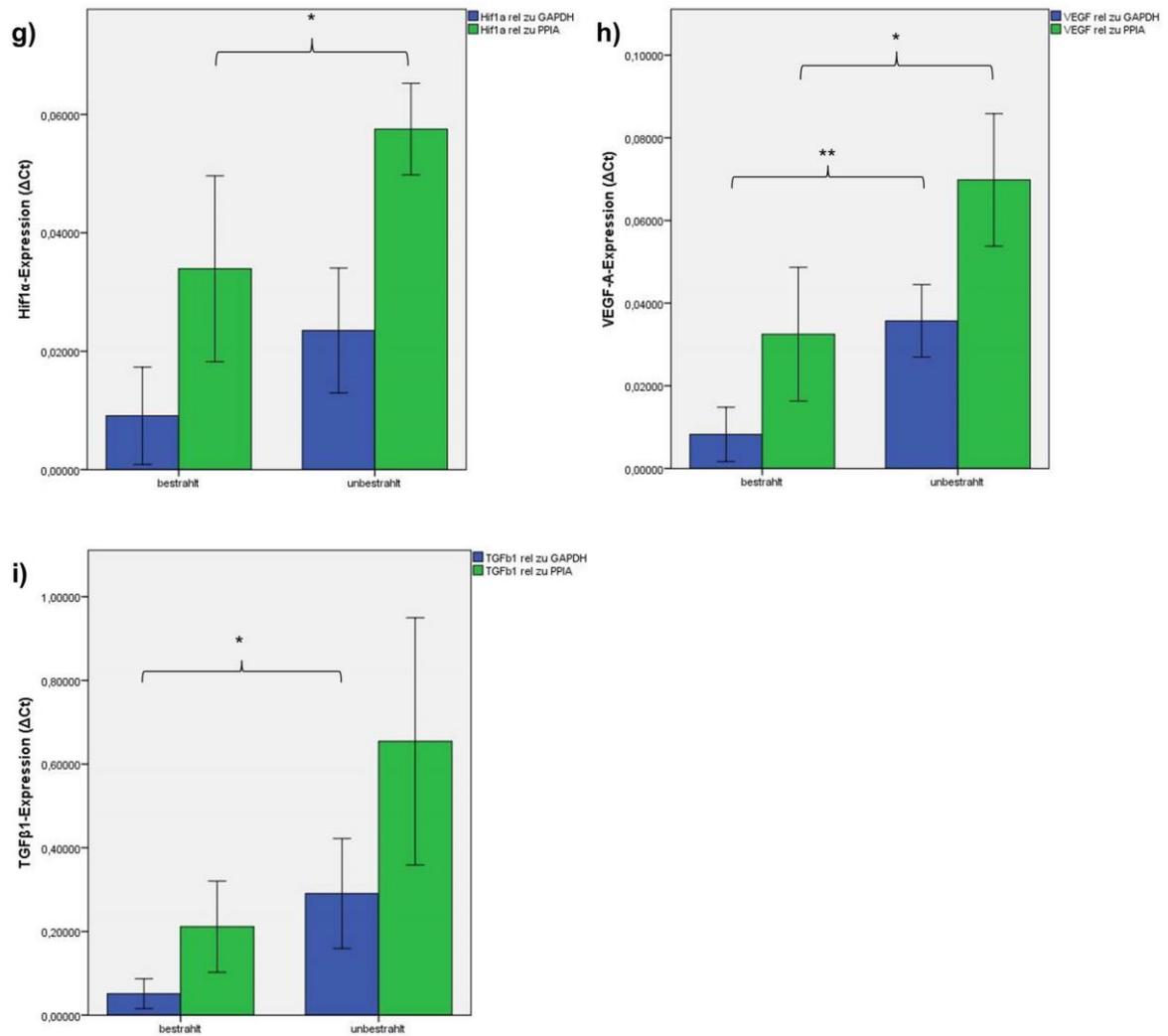


Abbildung 16: Genexpressionen in bestrahlten (links) und unbestrahlten Knochen (rechts) der Gruppe A ( $\Delta$ Ct-Werte). Osteocalcin (a), Osteopontin (b), RUNX2 (c), Collagen I (d), ALP (e), TNF $\alpha$  (f), Hif1 $\alpha$  (g), VEGF-A (h), TGF $\beta$ 1 (i). Blaue Balken = Expression relativ zu GAPDH; grüne Balken = Expression relativ zu PPIA. \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ .

### 5.1.5 Mikrocomputertomographische Untersuchung ( $\mu$ CT)

Durch die Bestrahlung kam es zu einer Abnahme der kleinen Blutgefäße (bis ca. 40  $\mu$ m Durchmesser). Statistisch signifikant war dieser Effekt in Gruppe A und D (s. Abb 17).

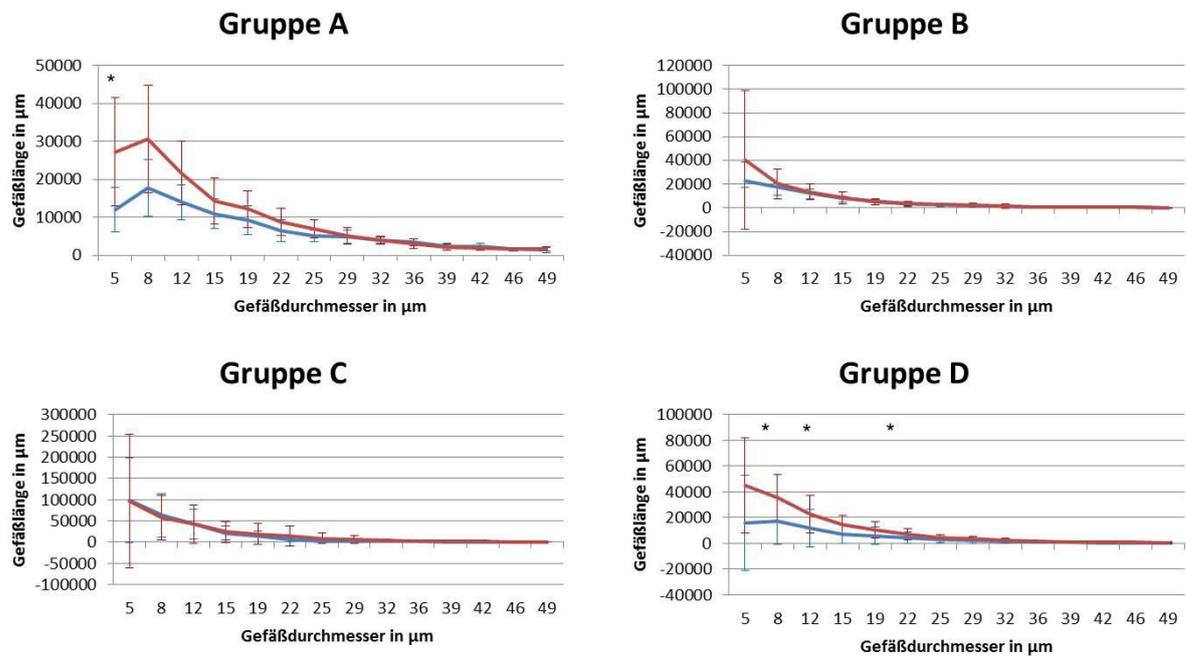


Abbildung 17: Microcomputertomographische Auswertung der Gefäßstrukturen. Blaue Kurve = bestrahlte Knochen; rote Kurve = unbestrahlte Kontrollen. Auflösung 6,78  $\mu$ m.

\*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ .

## 5.2 Phase II: Knochen-Tissue Engineering im CSFD Modell nach Bestrahlung

### 5.2.1 Zellkultur

Die isolierten Zellen zeigten von Anfang an gutes Wachstum und in zunehmendem Maße eine gleichmäßige Morphologie (s. Abb 18).

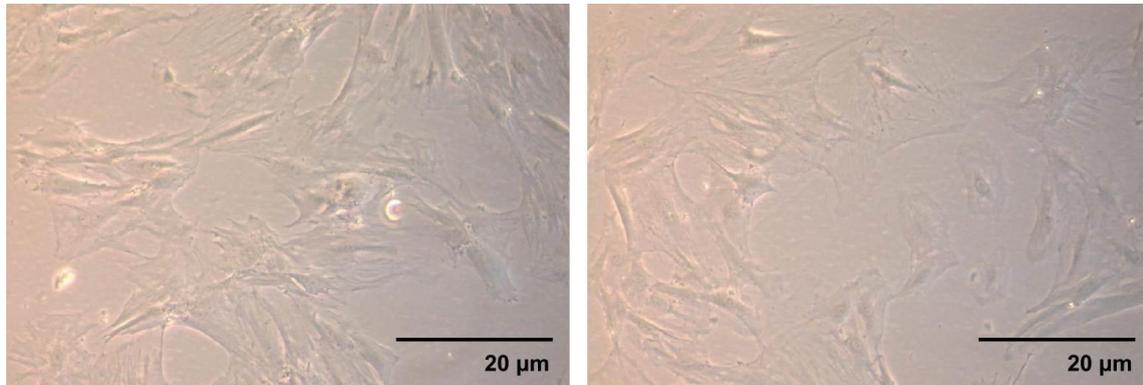


Abbildung 18: Zellkultur der isolierten bmMSCs vor Implantation (Passage 5), 10x Vergrößerung.

Die osteogene Differenzierung konnte nach 8 Tagen in osteogenem Differenzierungsmedium mittels ALP Färbung nachgewiesen werden (s. Abb. 19).

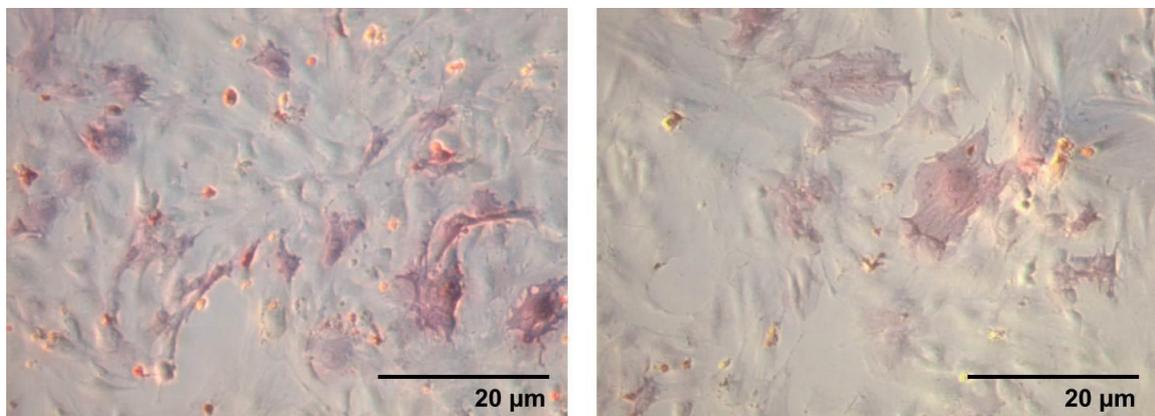


Abbildung 19: ALP Färbung nach 8 Tagen Differenzierungsmedium; rötlich gefärbte Zellen = positiv; ungefärbte Zellen = negativ; 10x Vergrößerung.

Basierend auf den Ergebnissen der Durchflusszytometrie (s. Abb. 20) lag in Passage 4 eine Reinkultur von mesenchymalen Stammzellen vor: 99,6% der Zellen exprimierten CD90, 99,8% der Zellen exprimierten CD29, 98,3% exprimierten CD73 und 88,4% exprimierten CD54. Der Leukozytenmarker CD45 wurde hingegen nur von 3,68% exprimiert, der Endothelzellmarker CD31 von 0,66%.

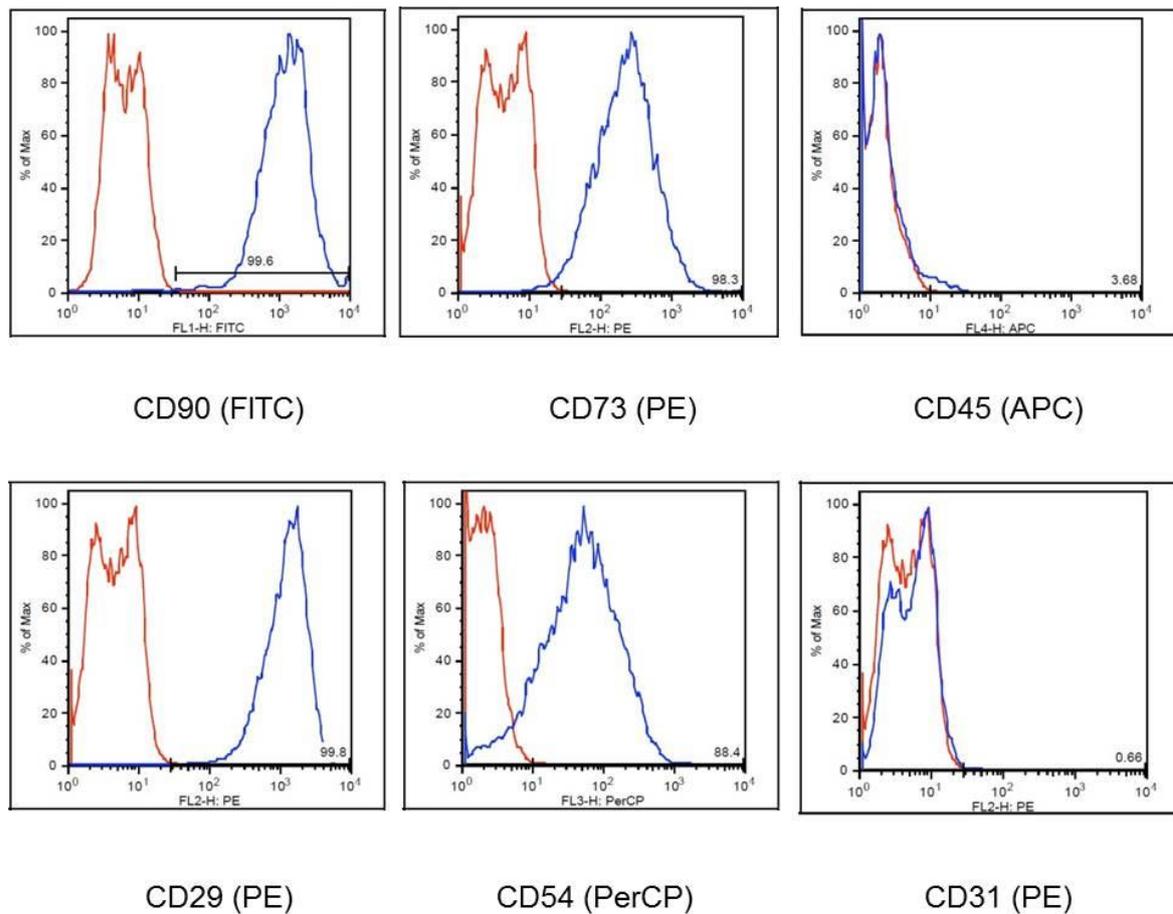


Abbildung 20: Ergebnisse der Durchflusszytometrie der implantierten bmMSC (Passage 4). Rot = ungefärbte Zellen; blau = gefärbte Zellen.

### 5.2.2 Aufbereitung der Zellen

Alle Zellen zeigten am Tag der Implantation eine gute Morphologie sowie eine ausreichende Konfluenz. Das Ablösen von der Plastikflasche mittels Accutase und Lösen der Zellen voneinander mittels Collagenase führte zu einer guten Einzelzellsuspension mit guten Überlebensraten der Zellen in der Trypanblaufärbung. Die gesamte Zellaufbereitung gestaltete sich problemlos, die Gesamtdauer zwischen Ablösen und Implantation betrug 2-3 Stunden.

### 5.2.3 Implantation der Konstrukte in Spendertiere

Es wurden insgesamt 60 Konstrukte zur Prävasikularisation in Spendertiere implantiert. In der Prävasikularisationszeit nahmen die Tiere durchschnittlich  $74,7 \pm 11,3$  g (Gruppe E10d),  $65,6 \pm 17,4$  g (Gruppe bE10d),  $76,5 \pm 25,1$  g (Gruppe E12Wo),  $140,8 \pm 17,5$  g (Gruppe

bE12Wo),  $72,8 \pm 26,8$  g (Gruppe F) und  $115,9 \pm 17,1$  g (Gruppe bF) zu. Bei Explantation unterschieden sich die Gruppen nicht signifikant im Gewicht.

Die Operationen verliefen in allen Fällen ohne Probleme. Die Tiere zeigten bereits vom ersten postoperativen Tag an ein gutes Allgemeinbefinden, die Medikation wurde sehr gut vertragen. Zum Zeitpunkt der Transplantation in den CSFD war bei 6 Tieren ein Stück der Kammer durch die Haut hindurch sichtbar, kein Konstrukt zeigte jedoch Anzeichen einer Infektion.

#### **5.2.4 Bestrahlung**

In der Zeit zwischen Bestrahlung und Setzung des CSFD nahmen die Tiere durchschnittlich  $45,5 \pm 11,2$  g (Gruppe bE10d),  $30,8 \pm 11,7$  g (Gruppe bE12Wo),  $50,6 \pm 6,5$  g (Gruppe bF) und  $47,7 \pm 8,5$  g zu (Gruppe bG). Es konnte im Vergleich zu unbestrahlten Tieren keine Auswirkung der Bestrahlung auf das Gewicht der Tiere festgestellt werden. Der Bestrahlungsvorgang und die damit verbundene Narkose wurden von allen Empfängertieren gut vertragen.

#### **5.2.5 Setzung des CSFD**

Es wurden insgesamt 77 CSFD gesetzt. In der Zeit zwischen Setzen des CSFD und Explantation kam es in den beiden 10-Tages-Gruppen zu einem Gewichtsverlust von  $23,1 \pm 10,5$  g (Gruppe E10d) bzw.  $26,2 \pm 8,2$  g (Gruppe bE10d). In den anderen Gruppen kam es zu einer Gewichtszunahme von  $84,0 \pm 18,7$  g (Gruppe E12Wo),  $48,8 \pm 19,2$  g (Gruppe bE12Wo),  $73,7 \pm 23,2$  g (Gruppe F),  $55,8 \pm 9,4$  g (Gruppe bF),  $56,6 \pm 16,6$  g (Gruppe G) und  $61,7 \pm 12,0$  g (Gruppe bG). Ein signifikanter Einfluss der präoperativen Bestrahlung konnte nicht festgestellt werden.

Intraoperativ kam es in zwei Fällen zu einer Fraktur des Femurs durch das Einbohren der Pins; diese beiden Tiere mussten euthanasiert werden. In beiden Fällen handelte es sich um ein bestrahltes Empfängertier. Alle anderen Operationen wurden erfolgreich beendet. Die postoperative Medikation wurde sehr gut vertragen.

Ungefähr die Hälfte der Tiere zeigte am Tag nach der Operation ein geringgradig vermindertes Allgemeinbefinden, das sich jedoch schnell besserte. Ein Tier entwickelte am 2. postoperativen Tag eine akute Atemnot und ein deutlich vermindertes Allgemeinverhalten und musste euthanasiert werden. Ein weiteres Tier entwickelte eine ähnliche, jedoch schwächer ausgeprägte Symptomatik, die sich nach 2 Tagen besserte.

Das Laufbild war meist bereits am Tag nach der Operation annähernd normal. Die Wundschwellung nahm innerhalb der ersten postoperativen Woche ab. In den Wochen bis zur Explantation (12-Wochen-Gruppen) entwickelten die meisten Tiere eine unterschiedlich starke Atrophie der Oberschenkelmuskulatur, unabhängig davon, ob die Tiere bestrahlt waren oder nicht. Störungen der Wundheilung wurden nicht beobachtet.

### **5.2.6 Explantation, Röntgen**

Insgesamt überlebten 74 der Empfängertiere (96,1%) bis zum geplanten Explantationszeitpunkt. Am Tag der Explantation zeigten die meisten Tiere ein normales Gangbild oder nur eine leichte Asymmetrie im Laufen. Bei einem Tier war die Infektion des Konstrukts bereits makroskopisch sichtbar; dieses Konstrukt wurde aus der Studie ausgeschlossen. Ein Tier belastete das operierte Bein nicht und wies eine hochgradige Muskelatrophie auf.

Bei 20 unbestrahlten Tieren waren beide Röntgenbilder am Tag der Explantation unauffällig (57%). Bei den anderen 15 Tieren wurden folgende Abweichungen vom Normalbefund festgestellt: Lysezone um eine oder mehrere Schrauben oder Cerclagendrähte (4), aufgetriebene Femurstümpfe (7), gebrochene Femurstümpfe (1), eine oder mehrere gelockerte Schrauben (10).

Bei 19 bestrahlten Tieren waren beide Röntgenbilder am Tag der Explantation unauffällig (50%). Bei den anderen 19 Tieren wurden folgende Abweichungen vom Normalbefund festgestellt: Achsknick (5 Tiere), Lysezone um eine oder mehrere Schrauben oder Cerclagendrähte (Gross et al.), aufgetriebene Femurstümpfe (Gross et al.), gebrochene Femurstümpfe (4), eine oder mehrere gelockerte Schrauben (13).

Die Infektionsrate betrug in den unbestrahlten Gruppen 11% (Gruppe E10d), 20% (Gruppe E12Wo), 30% (Gruppe F) sowie 14% (Gruppe G), und in den bestrahlten Gruppen 0% (Gruppe bE10d), 33% (Gruppe bE12Wo), 22% (Gruppe bF) sowie 0% (Gruppe bG). Signifikant infizierte Konstrukte wurden aus der weiteren Auswertung ausgeschlossen.

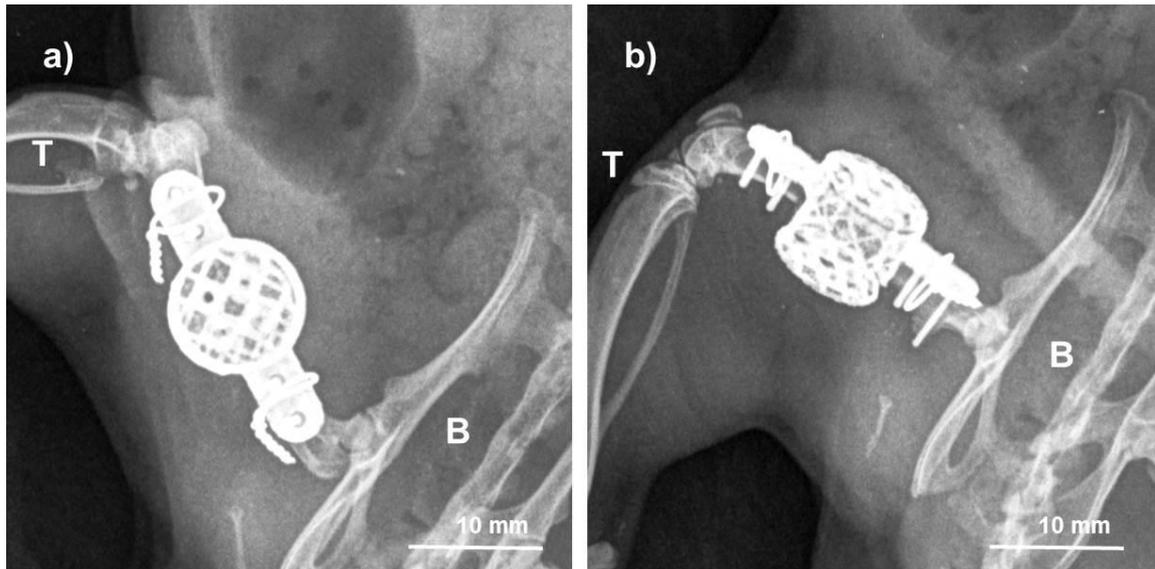


Abbildung 21: Röntgenbilder eines CSFD vor Explantation (Gruppe bE10d). a) kraniokaudaler Strahlengang; b) lateromedialer Strahlengang. T = Tibia, B = Becken.

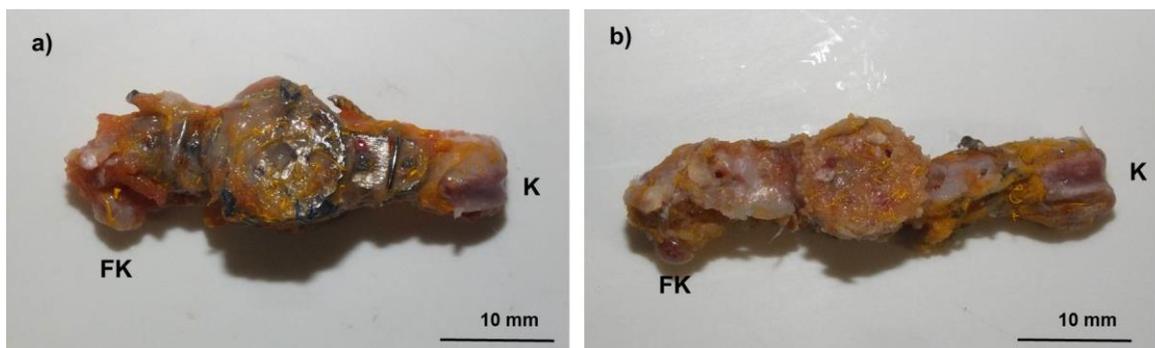


Abbildung 22: CSFD-Präparat nach Microfil®-Perfusion und Explantation (Gruppe E12Wo). a) nach Exartikulation im Hüft- und Kniegelenk; b) nach Abnahme der Titankammer. FK = Femurkopf, K = Kondylen.

### 5.2.7 Histologie

Insgesamt wurden nach Ausschluss infizierter, gebrochener oder qualitativ schlechter Konstrukte und nach Abzug des für die PCR verwendeten kompletten Konstrukts 51 Präparate für die histologische Evaluation verwendet und fließen in die nachfolgende Auswertung mit ein (Gruppe E10d: 7 Konstrukte; Gruppe bE10d: 8 Konstrukte; Gruppe E12Wo: 7 Konstrukte; Gruppe bE12Wo: 6 Konstrukte; Gruppe F: 6 Konstrukte; Gruppe bF: 6 Konstrukte; Gruppe G: 5 Konstrukte; Gruppe bG: 6 Konstrukte).

Der Entkalkungsvorgang mittels EDTA und Ultraschall dauerte  $19,6 \pm 1,0$  Tage (Gruppe E10d),  $17,3 \pm 3,9$  Tage (Gruppe bE10d),  $22,9 \pm 2,2$  Tage (Gruppe E12Wo),  $19,5 \pm 2,5$  Tage (Gruppe bE12Wo),  $19,3 \pm 0,5$  Tage (Gruppe F),  $17,0 \pm 1,1$  Tage (Gruppe bF) sowie  $17,7 \pm 2,6$  Tage (Gruppe bG). Die Konstrukte der Gruppe G wurden im Rahmen einer Vorläuferstudie (Balzer, 2013) ohne Ultraschall entkalkt und wurden deshalb nicht in die Berechnung statistischer Signifikanzen mit eingeschlossen. Die Entkalkungszeit war in der Gruppe E12Wo signifikant länger als in den bestrahlten Gruppen bE10d, bF und bG ( $P \leq 0,01$ ).

### 5.2.7.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

#### 5.2.7.1.1 Qualitative Beurteilung

Auffällig war in allen bestrahlten Defekten der 12-Wochen-Gruppen (bE12Wo, bF, bG) der mehr oder weniger ausgeprägte Verlust der physiologischen Knochenmarkstruktur (Hypozellularität, Ersatz durch lockeres Bindegewebe) und das Einwachsen von Bindegewebe aus dem Femurdefekt (s. Abb. 23). Dies betraf in allen Fällen den distalen und in 4 Fällen zusätzlich den proximalen Femurstumpf. Derartige Umbauvorgänge im Knochenmark konnten in keinem der unbestrahlten 12-Wochen-Defekte festgestellt werden.

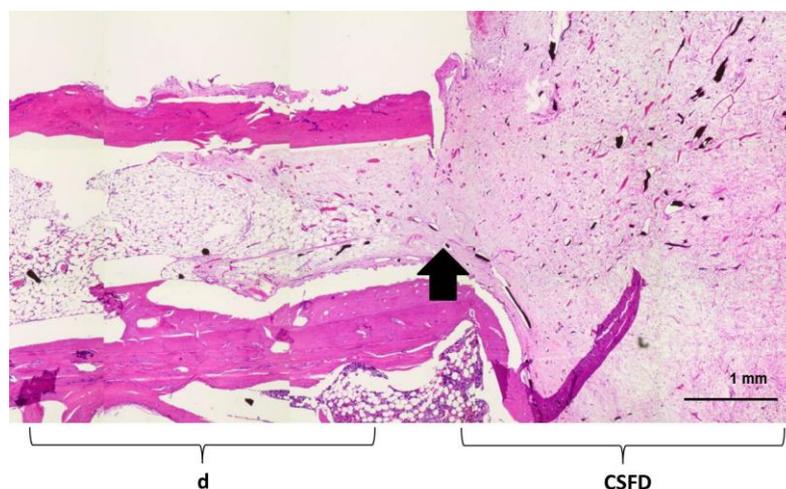


Abbildung 23: Bestrahlter Defekt 12 Wochen nach CSFD Setzung (Gruppe bG), Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Links im Bild distaler Femurstumpf (d), rechts Defekt (CSFD). Einwachsen von Bindegewebe aus dem Defekt ins Knochenmark, fehlendes Auswachsen des Stumpfes in Richtung Defekt und Verlust der physiologischen Knochenmarkstruktur.

In den unbestrahlten 10-Tages-Defekten (Gruppe E10d) kam es hingegen zu einer Zunahme der Dichte des Knochenmarks mit Verdrängung der Fettvakuolen durch zellreiche Grundsubstanz; dies war insbesondere am proximalen Stumpf ausgeprägt. In den bestrahlten 10-Tages-Defekten (Gruppe bE10d) hingegen war diese Zunahme der Dichte deutlich schwächer ausgeprägt, und einige Stümpfe zeigten eine Hypozellularität im Knochenmark und beginnenden bindegewebigen Umbau (deutlich eosinophileres Gewebe durch das Fehlen basophiler Zellkerne).

#### 5.2.7.1.2 Knochenbildung

In beiden 10-Tages-Gruppen (Gruppe E10d und bE10d) war eine deutliche Knochenneubildung im Konstrukt sichtbar (s. Abb. 24); die relative Knochenfläche betrug hier  $8,8 \pm 4,5\%$  (Gruppe E10d) bzw.  $7,6 \pm 3,6\%$  (Gruppe bE10d). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war nicht signifikant. Ein beginnendes Heranwachsen von Knochengewebe an das Konstrukt ausgehend von den Knochenstümpfen konnte in 2 von 7 unbestrahlten Defekten und in keinem der 8 bestrahlten Defekte beobachtet werden. Eine knöcherne Überbrückung zwischen Femurstumpf und Konstrukt fand nicht statt.

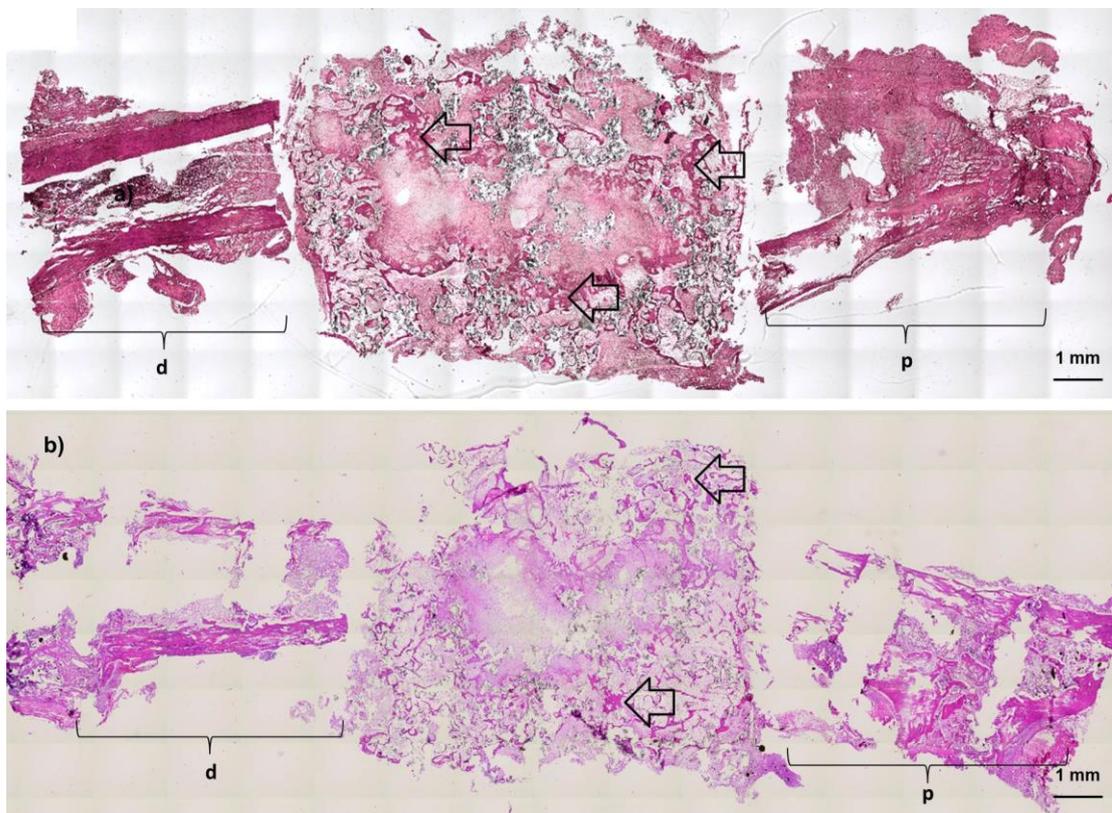


Abbildung 24: Defekte der Gruppen E10d (a) und bE10d (b). Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Jeweils links im Bild distaler Femurstumpf (d), rechts im Bild proximaler Femurstumpf (p). In beiden

Gruppen gute Knochenbildung im Konstrukt (Pfeile), v.a. in der Peripherie. Keine Verbindung zwischen Knochenstümpfen und Konstrukt.

In den Gruppen E12Wo und bE12Wo war ebenfalls eine deutliche Knochenbildung im Konstrukt sichtbar; die relative Knochenfläche betrug  $14,2 \pm 6,8\%$  (Gruppe E12Wo) bzw.  $6,1 \pm 2,2\%$  (Gruppe bE12Wo). Der Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen war statistisch signifikant ( $P \leq 0,05$ ). In der unbestrahlten Gruppe E12Wo kam es in 6 von 7 Defekten zu einem Heranwachsen des knöchernen Gewebes an das Konstrukt (1x nur proximal, 5x proximal und distal) und in 2 Fällen zu einer knöchernen Überbrückung zwischen Femurstumpf und Konstrukt (beide distal; s. Abb. 25). In der bestrahlten Gruppe bE12Wo hingegen kam es nur in 2 von 6 Defekten zu einem Heranwachsen des Knochens an das Konstrukt und in keinem Fall zu einer knöchernen Überbrückung.

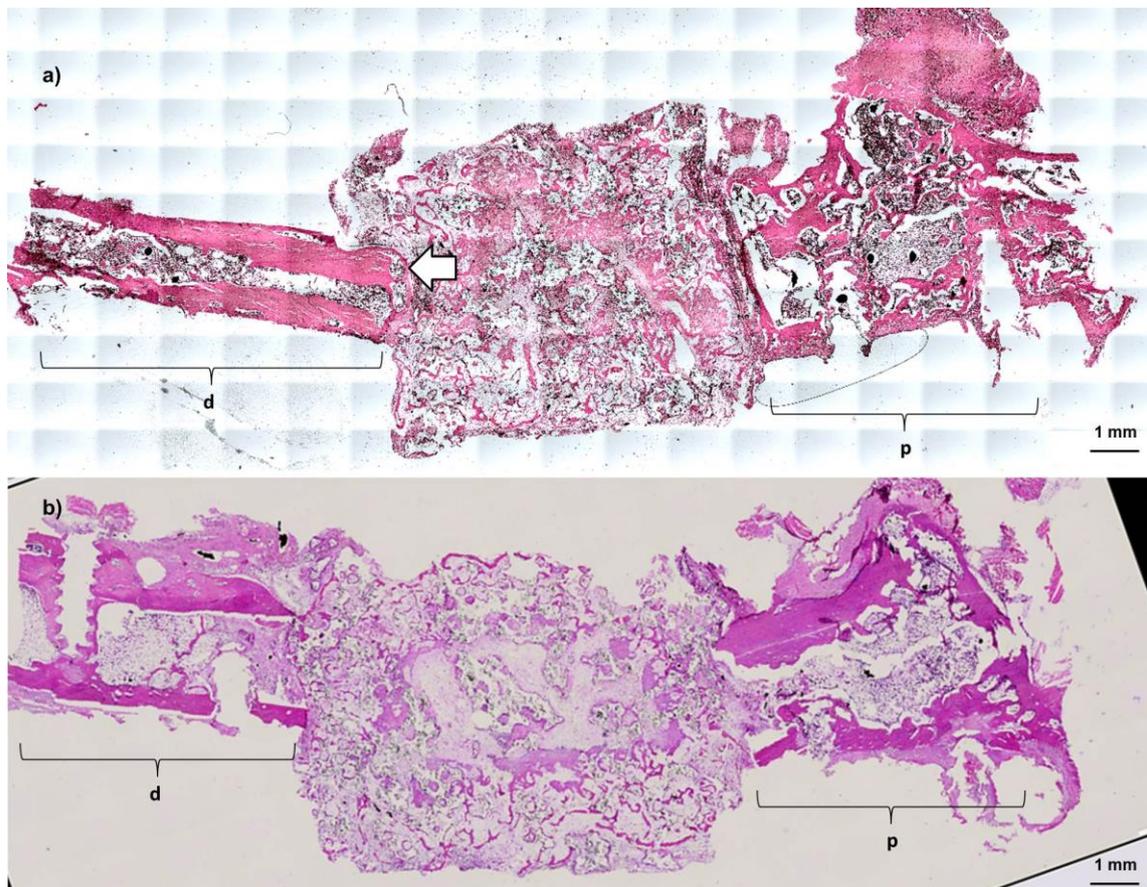


Abbildung 25: Defekte der Gruppen E12Wo (a) und bE12Wo (b). Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Jeweils links im Bild distaler Femurstumpf (d), rechts im Bild proximaler Femurstumpf (p). In beiden Gruppen gute Knochenbildung im Konstrukt. Im unbestrahlten Defekt feste Verbindung zwischen Konstrukt und Femurstümpfen und Einwachsen des Knochens mit beginnender knöcherner

Überbrückung (Pfeil). Im bestrahlten Defekt nur bindegewebige Verbindung, kein Einwachsen der Knochenstümpfe.

In den nur mit Hartmatrix gefüllten Defekten der Gruppen F und bF war keine Knochenneubildung im Konstrukt vorhanden (s. Abb. 26). In der unbestrahlten Gruppe F war in 3 von 6 Konstrukten ein Heranwachsen der Knochenstümpfe an das Konstrukt sichtbar, (2x proximaler Stumpf, 1x proximaler und distaler Stumpf), in der bestrahlten Gruppe bF in 4 von 6 Fällen (3x proximal, 1x distal), jedoch in keinem Fall zu einem Einwachsen in den Defektbereich. Die relative Knochenfläche im Defekt betrug daher in beiden Gruppen 0%. Es kam in keinem Fall zu einer knöchernen Überbrückung zwischen Femurstümpfen und Konstrukt.

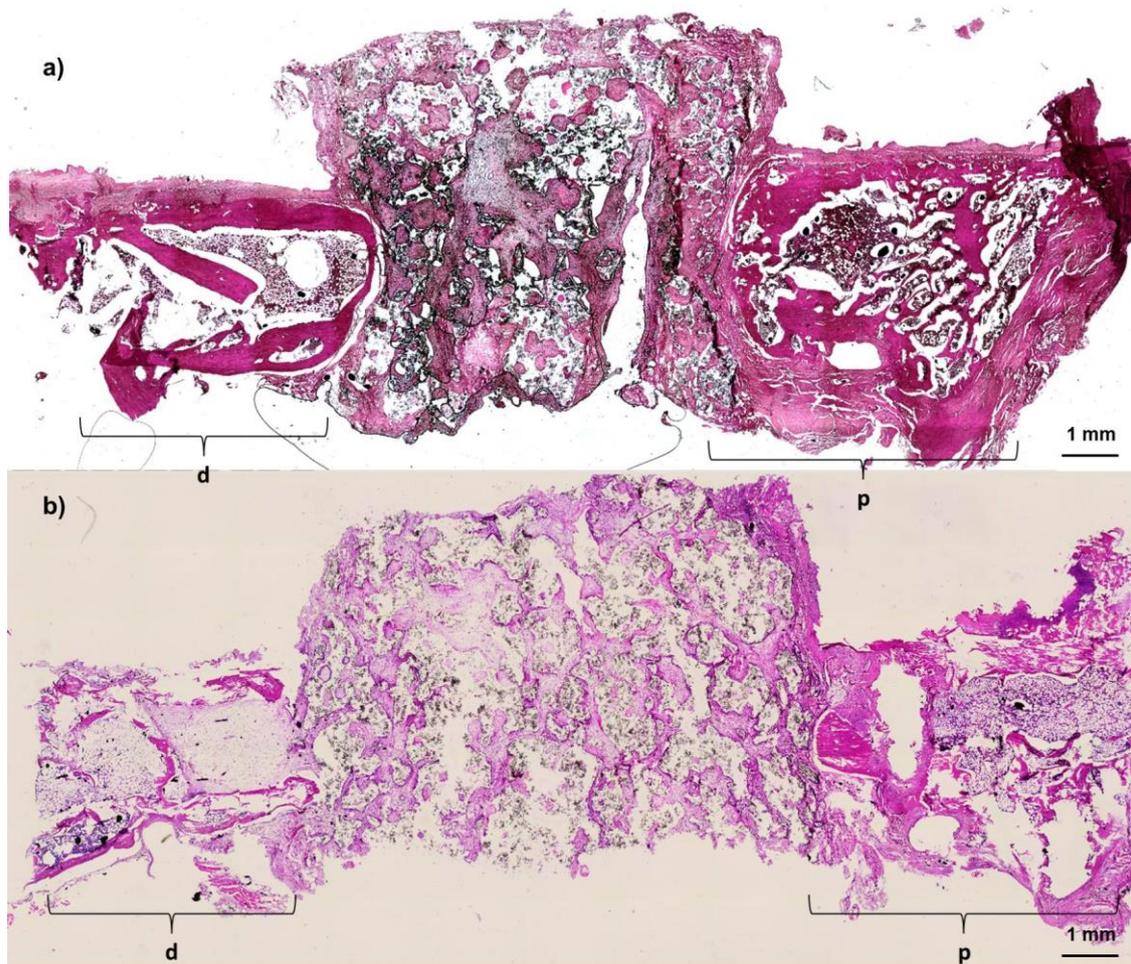


Abbildung 26: Defekte der Gruppe F (a) und bF (b). Hämatoxylin-Eosin-Färbung. Jeweils links im Bild distaler Femurstumpf (d), rechts im Bild proximaler Femurstumpf (p). Keine Knochenbildung im Konstrukt; Heranwachsen, jedoch kein Einwachsen von Knochen aus den Femurstümpfen (Gruppe F). In Gruppe bF kaum Auswachsen der Knochenstümpfe.

In allen unbestrahlten Leerdefekten (Gruppe G) konnte ein Einwachsen von Knochengewebe in den Defekt, ausgehend von beiden Femurstümpfen, beobachtet werden (s. Abb. 27). Die neu gebildete Knochenfläche betrug dabei  $5,3 \pm 3,4\%$  des Defekts. Im Gegensatz dazu konnte nur in 2 von 6 bestrahlten Leerdefekten (Gruppe bG) ein Einwachsen von Knochen in den Defekt beobachtet werden; die neu gebildete Knochenfläche betrug hier nur  $0,6 \pm 1,0\%$  des Defekts. Der Unterschied des neu gebildeten Knochengewebes zwischen Gruppe G und Gruppe bG war statistisch signifikant ( $P \leq 0,05$ ). In keiner der beiden Gruppen kam es zu einer vollständigen Überbrückung des Femurdefekts.

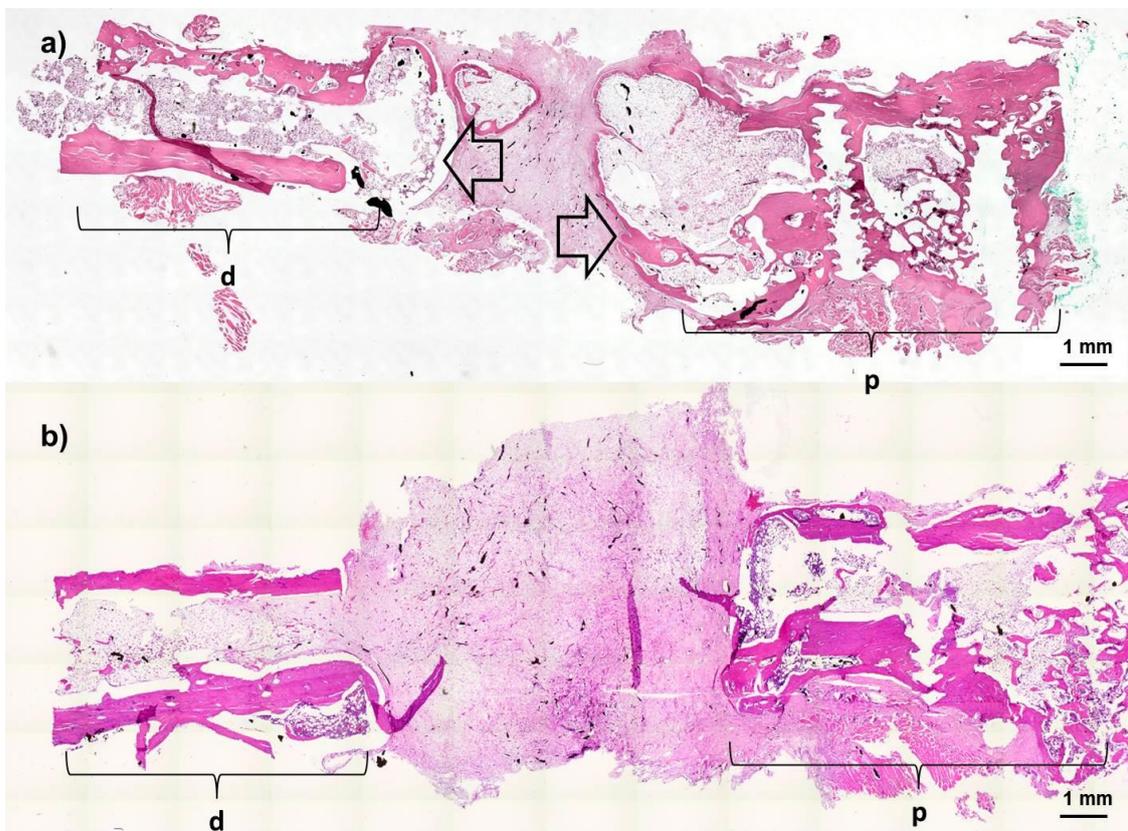


Abbildung 27: Defekte der Gruppen G (a) und bG (b). Hämatoxylin-Eosin-Färbung, 4x Vergrößerung. Jeweils links im Bild distaler Femurstumpf (d), rechts im Bild proximaler Femurstumpf (p). Gruppe G: Einwachsen beider Femurstümpfe in den Defekt (Pfeile). Gruppe bG: kein Auswachsen der Femurstümpfe, Knochenmarkshöhle bleibt offen.

Der Vergleich der unbestrahlten Gruppen untereinander ergab eine signifikant größere relative Knochenfläche in der Gruppe E12Wo im Vergleich zur Gruppe G sowie eine signifikant niedrigere relative Knochenfläche in der Gruppe F im Vergleich zu den Gruppen E10d und E12W0 (alle  $P \leq 0,01$ ). Der Vergleich der bestrahlten Gruppen untereinander ergab

eine signifikant höhere relative Knochenfläche in der Gruppe bE10d als in den Gruppen bG und bF (beide  $P \leq 0,05$ ).

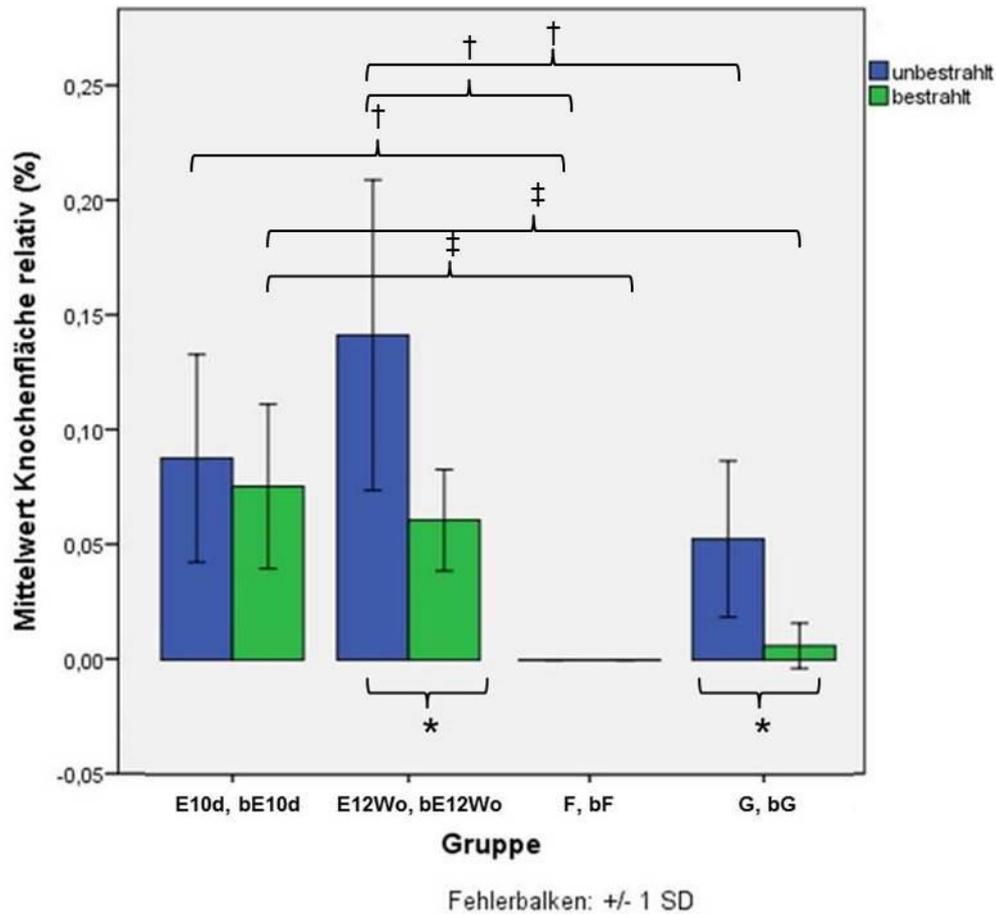


Abbildung 28: Relative Knochenfläche in % des Gesamtkonstrukts.

\* Unterschied zwischen bestrahlter (grüne Balken) und unbestrahlter Gruppe (blau;  $P \leq 0,05$ ).

† Unterschied zwischen unbestrahlten Gruppen ( $P \leq 0,01$ ).

‡ Unterschied zwischen bestrahlten Gruppen ( $P \leq 0,05$ ).

### 5.2.7.1.3 Vaskularisation

Die Auszählung der mit Microfil® perfundierten Gefäße ergab in den 12-Wochen-Gruppen  $74,9 \pm 37,2$  (Gruppe E12Wo),  $55,5 \pm 41,0$  (Gruppe bE12Wo),  $48,7 \pm 28,8$  (Gruppe F),  $62,4 \pm 12,7$  (Gruppe bF),  $50,8 \pm 37,1$  (Gruppe G) und  $46,5 \pm 25,4$  Gefäße pro Konstrukt (Gruppe bG). Der Unterschied zwischen den bestrahlten Gruppen und den jeweiligen unbestrahlten Kontrollgruppen war nicht signifikant. In den 10-Tages-Gruppen ergab die Auszählung  $35,3 \pm 31,0$  (Gruppe E10d) bzw.  $7,3 \pm 6,0$  Gefäße pro Konstrukt (Gruppe

bE10d); dieser Unterschied war statistisch signifikant ( $P \leq 0,05$ ). Die aus der Gefäßanzahl und der Gefäßgesamtfläche berechnete durchschnittliche Gefäßgröße unterschied sich in keinem Fall zwischen bestrahlten Konstrukten und den jeweiligen unbestrahlten Kontrollkonstrukten.

Der Vergleich der unbestrahlten Gruppen untereinander ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Gefäßanzahl oder durchschnittlichen Gefäßgröße. Bei den bestrahlten Gruppen zeigte die Gruppe bE10d eine annähernd signifikant niedrigere Gefäßanzahl als die Gruppe bF ( $P = 0,057$ ).

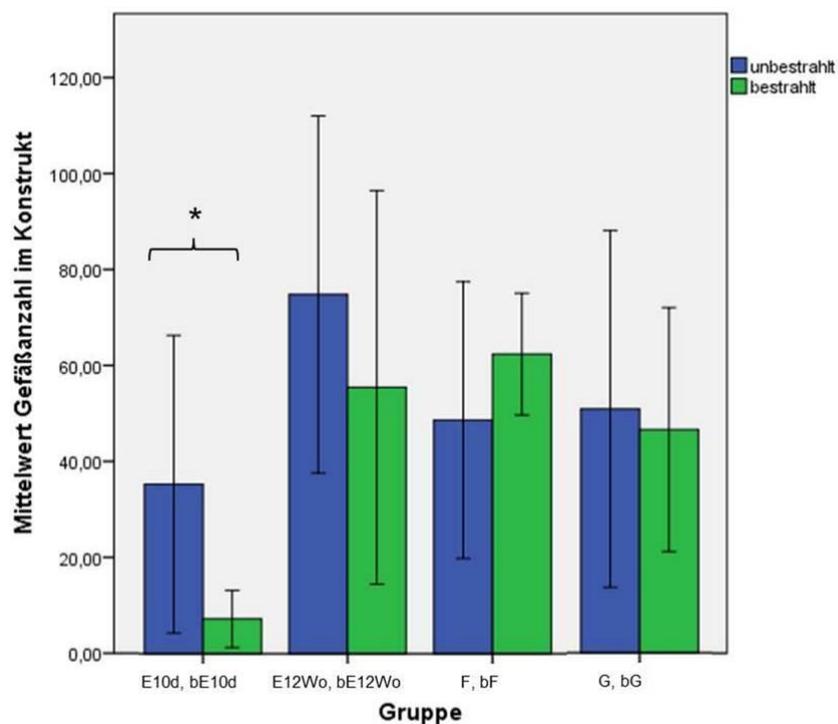


Abbildung 29: Gefäßanzahl im Konstrukt. Grüne Balken = bestrahlt; blaue Balken = unbestrahlt.

\*  $P \leq 0,05$ .

### 5.2.7.2 Masson-Goldner-Färbung

Die bereits in der HE-Färbung sichtbare Einsprossung von Bindegewebe in das Knochenmark bestrahlter Femora war auch in der Masson-Goldner-Färbung deutlich erkennbar. Im distalen Femurstumpf waren dabei die Hypozellularität und der bindegewebige Umbau der Knochenmarkstruktur deutlicher ausgeprägt als im proximalen.

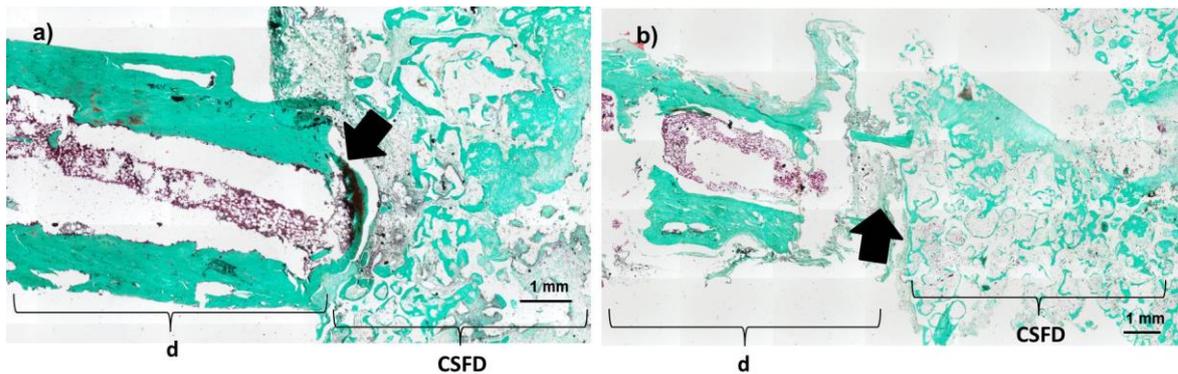


Abbildung 30: Defekte der Gruppen E12Wo (a) und bE12Wo (b), Masson-Goldner-Färbung. Jeweils links im Bild distaler Femurstumpf (d), rechts im Bild Femurdefekt (CSFD). Im unbestrahlten Defekt Heranwachsen des Knochens an den Defekt, zellreiches Knochenmark (Pfeil). Im bestrahlten Defekt kein Heranwachsen des Knochens, Hypozellularität und Fibrosierung im Knochenmark (Pfeil).

In den unbestrahlten 10-Tages-Defekten (Gruppe E10d) erschien das Knochenmark rund um das Konstrukt homogener als in normalem Knochen, mit einer Abnahme der Vakuolen und einer Zunahme von Bindegewebe. In bestrahlten 10-Tages-Defekten war diese Verdichtung des Knochenmarks wenig ausgeprägt, meist waren die Vakuolen noch vorhanden. Das Knochenmark wies eine Hypozellularität sowie eine beginnende Einlagerung von Bindegewebsfasern auf.

### 5.2.7.3 Immunhistochemische Färbungen

#### 5.2.7.3.1 ED1 (CD68) Färbung

Während in den 10-Tages-Gruppen (E10d und bE10d) die ED1 positiven Zellen diffus besonders im Übergangsbereich zwischen Femurstumpf und Konstrukt angesiedelt waren, war in den 12-Wochen-Gruppen (E12Wo, bE12Wo, F, bF) jeweils im Bereich rund um die Hartmatrix-Granula eine dünne ED1 positive Zone sichtbar (s. Abb. 31), die vereinzelt mehrkernige Zellen enthielt. Vereinzelt war eine derartige Zone auch um die Schraubenlöcher zu sehen. Insgesamt schien die Reaktion in den bestrahlten Konstrukten etwas weniger stark ausgeprägt zu sein als in den unbestrahlten.

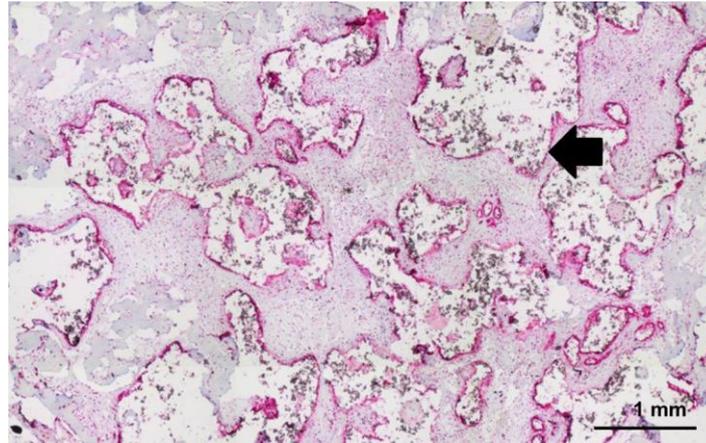


Abbildung 31: Konstrukt der Gruppe E12Wo, ED1 (CD68) Färbung. Dünne, ED1 positive Zone rund um Granula (Pfeil).

#### 5.2.7.3.2 Lectin-Färbung, $\alpha$ -Smooth Muscle Actin-Färbung

Gefäßwände im Konstrukt und in den Femurstümpfen waren als sowohl Lectin-positive als auch  $\alpha$ -SMA-positive tubuläre Strukturen zu erkennen (s. Abb. 32). Im Konstrukt waren dabei in der Peripherie mehr dieser Strukturen vorhanden als im Zentrum. Rund um die Hartmatrix-Granula befand sich in den 12-Wochen-Konstrukten eine leicht  $\alpha$ -SMA- und Lectin-positive Zone. Im Knochenmark waren in den bestrahlten 12-Wochen-Gruppen weniger Lectin-positive Zellen vorhanden als in unbestrahlten.

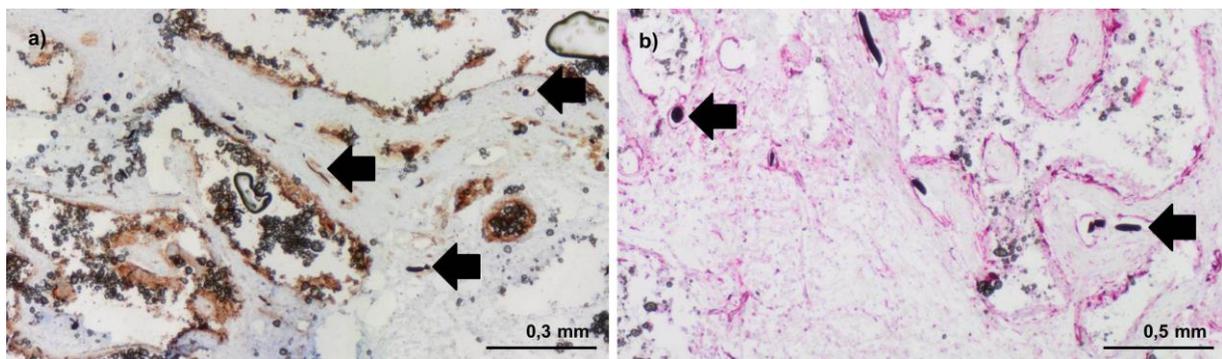


Abbildung 32: Defekte der Gruppe F; Lectin Färbung (a),  $\alpha$ -Smooth muscle actin-Färbung (b). Zirkuläre, mit Microfil gefüllte Strukturen, deren Wände sowohl Lectin- als auch  $\alpha$ -SMA-positiv sind (Pfeile).

In der Gruppe E10d waren sowohl die  $\alpha$ -SMA- als auch die Lectin-positiven Zellen ähnlich wie die ED1-positiven Zellen diffus im Granulationsgewebe verteilt. Das verdichtete Knochenmark rund um den Femurdefekt wies einen hohen Anteil an Lectin-positiven Zellen

auf. In der Gruppe bE10d waren weniger  $\alpha$ -SMA- und Lectin-positive Zellen im insgesamt deutlich schwächer ausgeprägten Granulationsgewebe vorhanden.

#### 5.2.7.4 Fluoreszenzfärbung (DAPI/TUNEL/DiI)

In den 10-Tages-Gruppen wurden im Zentrum der Konstrukte durchschnittlich  $628,4 \pm 305,5$  (Gruppe E10d) bzw.  $402,0 \pm 343,7$  DiI-positive Zellen (Gruppe bE10d) gezählt; dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant. In der Peripherie der Konstrukte waren es durchschnittlich  $1974,4 \pm 1177,0$  (Gruppe E10d) bzw.  $778,3 \pm 422,9$  Zellen (Gruppe bE10d). Dieser Unterschied war statistisch ebenso signifikant wie die aus beiden Werten resultierende Gesamtzellzahl pro Konstrukt ( $P \leq 0,05$ ). In der Gruppe E10d war die Anzahl DiI-positiver Zellen in der Peripherie der Konstrukte signifikant höher als im Zentrum ( $P \leq 0,05$ ), in der Gruppe bE10d zeigte sich eine Tendenz zur Signifikanz ( $P = 0,07$ ).

Nach 12 Wochen wurden im Zentrum der Konstrukte durchschnittlich  $817,3 \pm 503,9$  (Gruppe E12Wo) bzw.  $436,8 \pm 432,2$  (Gruppe bE12Wo) sowie in der Peripherie  $1809,4 \pm 1702,6$  (Gruppe E12Wo) bzw.  $1540,8 \pm 1264,6$  (Gruppe bE12Wo) DiI-positive Zellen ausgezählt. Diese Unterschiede zwischen unbestrahlten und bestrahlten Konstrukten waren nicht signifikant, ebenso wenig wie die resultierende Gesamtzellzahl. Die Anzahl DiI-positiver Zellen war in keiner der beiden Gruppen in der Peripherie signifikant höher als im Zentrum.

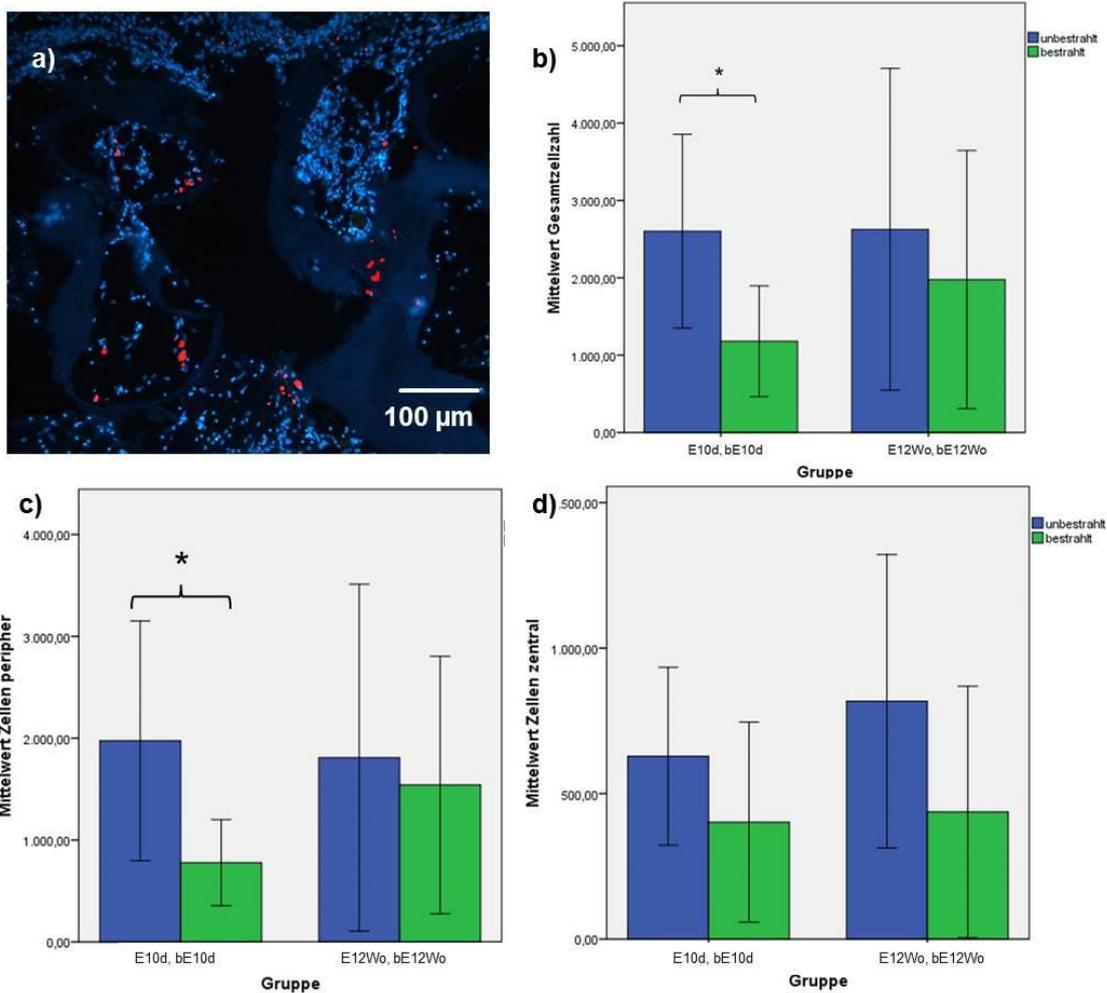


Abbildung 33: Auszählung der DiI-positiven Zellen im Konstrukt.

a) Fluoreszenz-Overlay, Gruppe E12Wo (100x Vergrößerung); rot = DiI gefärbte bmMSCs; blau = DAPI positive Zellen.

Diagramme: DiI-positive Zellen gesamt (b), peripher (c) und zentral (d) im Konstrukt. Grüne Balken = bestrahlt; blaue Balken = unbestrahlt. \*  $P \leq 0,05$ .

### 5.2.8 Mikrocomputertomographische Auswertung

Die Rekonstruktion der Gefäßstrukturen gestaltete sich aufgrund der starken Signalgebung der Hartmatrix auch nach langem Entkalken äußerst schwierig. Aus diesem Grund wurde auf eine quantitative Auswertung verzichtet. In der Rekonstruktion war nach 12 Wochen eine deutlich stärkere Vaskularisation in der Gruppe E12Wo als in der Gruppe F zu sehen.

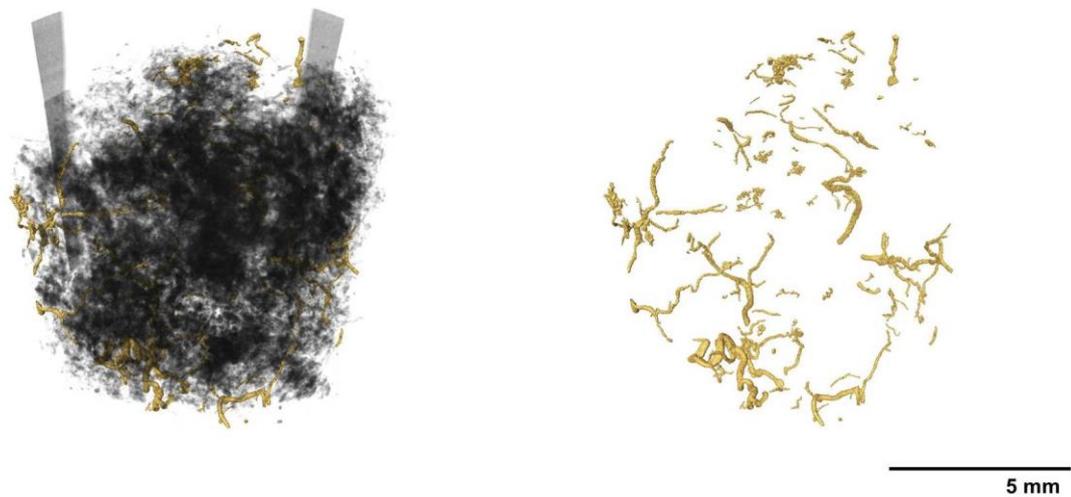


Abbildung 34: Micro-CT eines Konstrukts der Gruppe F. Gelb: Gefäße; schwarz: Matrix.

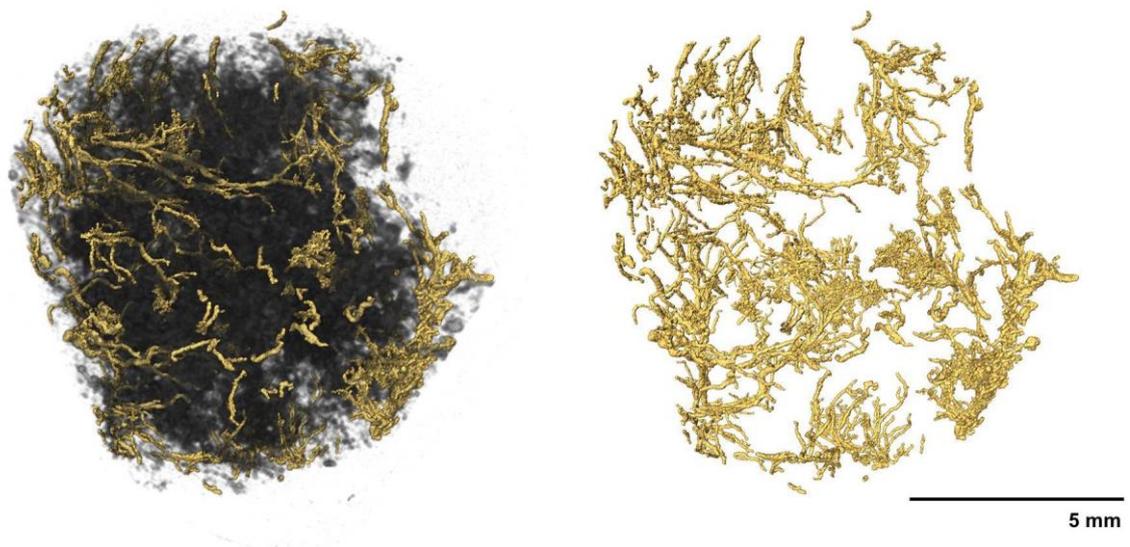


Abbildung 35: Micro-CT eines Konstrukts der Gruppe E12Wo. Gelb: Gefäße; schwarz: Matrix.

## 5.2.9 Quantitative PCR

### 5.2.9.1 RNA Isolation

In den Gruppen E12Wo und bE12Wo konnte sowohl aus dem vollständigen Konstrukt als auch aus kleinen Stückchen von der Außenkante ausreichend viel RNA gewonnen werden. Nach Auswertung der RNA Gelelektrophorese wurden 6 Konstrukte der Gruppe E12Wo und

6 Konstrukte der Gruppe bE12Wo weiter verwendet, bei denen deutlich die beiden Banden der 18S-rRNA und 28S-rRNA sichtbar waren.

Da in den Gruppen E10d, bE10d, F und bF aus Kantenstückchen der Konstrukte keine ausreichende Menge an RNA gewonnen werden konnte, wurde in diesen Gruppen nur jeweils ein komplettes Konstrukt für die Ermittlung der Genexpression verwendet.

Als Kontrolle dienten die 14 unbestrahlten rechten Femora der Vorstudie (Gruppe A-D).

### 5.2.9.2 *Genexpression*

Die Expression von Osteocalcin und ALP war in unbestrahlten und bestrahlten Femurdefekten (Gruppe E12Wo, bE12Wo) im Vergleich zu gesundem Knochengewebe vermindert (Osteocalcin:  $P \leq 0,01$  bezogen auf PPIA,  $P \leq 0,05$  bezogen auf GAPDH; ALP:  $P \leq 0,05$  bezogen auf PPIA;  $P = 0,09$  bezogen auf GAPDH). Bestrahlte Femurdefekte (Gruppe bE12Wo) unterschieden sich jedoch nicht signifikant von unbestrahlten (Gruppe E12Wo).

Die Expression von Osteopontin war in bestrahlten Femurdefekten (Gruppe bE12Wo) im Vergleich zu normalem Knochengewebe gesteigert ( $P \leq 0,001$  bezogen auf GAPDH,  $P \leq 0,01$  bezogen auf PPIA). Die Expression in unbestrahlten Defekten (Gruppe E12Wo) zeigte eine Tendenz zur Signifikanz ( $P = 0,059$  bezogen auf GAPDH).

Die Produktion von Hif1 $\alpha$  war in bestrahlten Femurdefekten im Vergleich zu gesundem Knochengewebe gesteigert ( $P \leq 0,001$  bezogen auf PPIA,  $P = 0,06$  bezogen auf GAPDH). Ebenso war die Expression von TNF $\alpha$  in bestrahlten und unbestrahlten Femurdefekten deutlich höher als in Knochengewebe (Gruppe E12Wo:  $P \leq 0,01$  bezogen auf GAPDH,  $P \leq 0,05$  bezogen auf PPIA; Gruppe bE12Wo:  $P \leq 0,001$  bezogen auf GAPDH und PPIA). Unbestrahlte und bestrahlte Defekte unterschieden sich auch bei diesen beiden Markern nicht signifikant voneinander.

Da für die Gruppen E10d, bE10d, F und bF nur jeweils ein Konstrukt für die RNA-Isolation verwendet wurde, können hierfür keine statistischen Signifikanzen errechnet werden, und die Ergebnisse können nur als Anhaltspunkt für die Genexpression in diesen Gruppen dienen. Als erhöhte oder verminderte Expression werden nachfolgend jene Werte bezeichnet, bei denen die Abweichung vom jeweiligen Vergleichswert eine Zehnerpotenz oder mehr beträgt.

Die Expression der untersuchten Gene lag in den Gruppen F und bF im Bereich der jeweiligen Expression in den Gruppen E12Wo bzw. bE12Wo. Die Expression von TNF $\alpha$  war im bestrahlten Konstrukt der Gruppe bF etwas höher als im unbestrahlten der Gruppe F. In den 10-Tages-Defekten (Gruppe E10d und bE10d) waren Osteocalcin und ALP im Vergleich zu gesundem Knochen niedrig exprimiert, Hif1 $\alpha$  hingegen höher exprimiert. Im Konstrukt der Gruppe bE10d war dies deutlicher als im unbestrahlten Konstrukt (Gruppe E10d), zusätzlich waren auch RUNX2 und Collagen I schwächer exprimiert als in normalem Knochen.

## **6 Diskussion**

### **6.1 Evaluation Bestrahlungsprotokoll (Phase I)**

#### **6.1.1 Strahlungsart**

Die in dieser Studie verwendete Röntgenstrahlung von 120 keV fällt in den niedrigen Orthovoltage-Bereich. Damit handelt es sich um relativ niedrigerenergetische Strahlung und liegt knapp unterhalb der Energie von Vergleichsstudien an der Hinterextremität von Ratten (Arnold et al., 1998; Lehner et al., 2004; Nyaruba et al., 1998). Spannung und Stromstärke wurden dabei vom verwendeten Gerät limitiert. Die in der klinischen Strahlentherapie verwendeten hochenergetischen Strahlenquellen wurden damit nicht erreicht. Dies hat den Nachteil, dass ein großer Teil der Strahlungsenergie bereits in der Haut abgegeben wird (Hall und Giaccia, 2006). Die verwendete Kupfer-Filterung der Strahlung führt zu einer Aufhärtung und damit zu einer Reduktion der Strahlenbelastung der Haut (Janker und Rossmann, 1958). Dennoch führt niedrigerenergetische Strahlung innerhalb weniger Stunden durch Vasodilatation zu einer Hautrötung sowie nach 2-3 Wochen zu einem schuppigen Erythem durch das Absterben der Basalzellen der Epidermis. Außerdem kommt es innerhalb von 3 Wochen zu einem Verlust der Haare im bestrahlten Bereich (Hall und Giaccia, 2006). Diese Effekte wurden in unterschiedlichem Ausmaß auch an den Tieren in der vorliegenden Studie beobachtet. Dabei konnte nur ein leichter Unterschied zwischen den unterschiedlichen Bestrahlungsprotokollen festgestellt werden. Die Effekte an der Haut waren jedoch selbstlimitierend und erforderten keine medikamentöse Versorgung. Zum Zeitpunkt der CSFD-Setzung lagen bei keinem Tier offene, ulzerierte Stellen vor, die eine Operation in diesem Feld verhindert hätten. Außerdem kam es in keinem Fall zu postoperativen Wundheilungsstörungen in den bestrahlten Tieren nach Setzen des CSFD. Dies weist darauf hin, dass das evaluierte Modell gut geeignet ist, um nachfolgend chirurgische Eingriffe im bestrahlten Bereich durchzuführen.

Ein weiterer Nachteil der niedrigerenergetischen Röntgenstrahlung ist die geringe Eindringtiefe, die ihre Verwendung in der Human- und Veterinärmedizin auf oberflächlich liegende Ziele beschränkt. In Wasser besitzt Röntgenstrahlung mit einer Energie von 100 keV eine Halbwertsschichtdicke (HWS) von 4,4 cm; bei höherenergetischer Strahlung von 1 MeV beträgt die HWS bereits 13 cm. Wasser und Weichteilgewebe weisen dabei in etwa das selbe Absorptionsverhalten auf (Schnepper, 1968). Je nach Lokalisation befindet sich der

Oberschenkelknochen der Ratte in einer Tiefe von wenigen Millimetern bis ca. 1,5 cm. Damit war im vorliegenden Modell im Bereich des Knochengewebes eine für biologische Effekte ausreichende Energie zu erwarten.

### **6.1.2 *Klinische Verträglichkeit***

Alle Protokolle wurden nach Abschluss der Bestrahlungen klinisch gleich gut vertragen. Auch die höhere einmalige Strahlungs-dosis in Gruppe A und B führte abgesehen von lokalen Hautreizungen zu keinen klinischen Symptomen. In den mehrfach bestrahlten Gruppen kam es jedoch in den zweiten und dritten Bestrahlungssitzungen zu mehreren Atemstillständen kurz nach der Narkoseeinleitung. Ketamin führt nach intramuskulärer Injektion zu einer lokalen Entzündung, die bis hin zur Nekrose reichen kann (Albrecht et al., 2014a). Eine erneute Injektion in diesem Bereich kann möglicherweise zu einer veränderten Resorptionskinetik und dadurch zum Atemstillstand geführt haben. Durch die relativ lange und schwer steuerbare Aufwachphase nach der Ketamin/Xylazin-Narkose (Albrecht et al., 2014b) sind außerdem Auswirkungen auf den Allgemeinzustand der Tiere (Temperaturhaushalt, Flüssigkeitshaushalt) denkbar, die in der zweiten und dritten Narkose zu Problemen geführt haben.

### **6.1.3 *Auswirkungen auf das Knochenmark***

Das Knochenmark stellt eines der radiosensitivsten Organe des Körpers dar. Seine TD50/5 Dosis, also jene Dosis, die innerhalb von 5 Jahren zu maximal 50% schweren Komplikationen führt, liegt bei nur 4,5 Gy (Hall und Giaccia, 2006). In der vorliegenden Studie wurde allen Gruppen eine deutliche Vakuolisierung des Knochenmarks beobachtet. Als Ursache kommen hierfür ein Knochenmarksödem sowie eine längerfristige fettige Degeneration des Knochenmarks in Frage. In menschlichen Knochen kommt es innerhalb von 2 Wochen zu einem in der Magnetresonanztomographie feststellbaren Knochenmarksödem und innerhalb der ersten 3-6 Wochen zu einer zunehmenden fettigen Degeneration des Knochenmarks (Stevens et al., 1990). In Mäusefemora ist nach 4 Wochen eine deutliche Adipogenese sichtbar (Cao et al., 2011). In der vorliegenden Studie war die Vakuolisierung nach 4 Wochen ausgeprägter als nach 8 Wochen, ausgedrückt als deutliche Zunahme der Vakuolengesamtfläche. Dies könnte auf eine Überschneidung dieser beiden pathologischen Vorgänge zurückzuführen sein, mit einer Abnahme des Ödems nach 8 Wochen. Die fettige Degeneration ist prinzipiell ein reversibler Vorgang; eine Regeneration ist jedoch beispielsweise bei humanen pädiatrischen Patienten erst nach 11-30 Monaten zu erwarten

(Cavenagh et al., 1995). Die automatisierte Bestimmung der Anzahl und daraus resultierend die Berechnung der durchschnittlichen Größe gestaltete sich bei Überlappung der Vakuolen teilweise als schwierig, weshalb die Gesamtvakuolenfläche ein besseres Maß für die Ausprägung des Knochenmarksödems und der fettigen Degeneration darstellt.

Aufgrund der hohen Dichte war eine Auszählung der Zellen im Knochenmark mittels DAPI Färbung nicht möglich. Stattdessen wurden zwei einzelne Zellpopulationen (CD31 positive und Hif1 $\alpha$  positive Zellen) ausgezählt. CD31, auch als PECAM-1 (platelet/endothelial cell adhesion molecule 1) bezeichnet, wird in Mäusen von 34% aller Knochenmarkszellen exprimiert. Dabei findet man diesen Oberflächenmarker sowohl auf hämatopoetischen als auch auf endothelialen Vorläuferzellen (Kim et al., 2010). Somit stellt diese Färbung einen guten Anhaltspunkt für die Auswirkungen der Bestrahlung auf die hämatopoetischen und endothelialen Vorläuferzellen im Knochenmark dar. Die absolute Anzahl der CD31 positiven Zellen war in bestrahlten Knochen in allen Gruppen niedriger als in unbestrahlten, dieser Effekt war jedoch nicht signifikant. Ein Grund für die mangelnde Signifikanz könnten die in allen Gruppen auftretende hohe Standardabweichung sein. Eine Optimierung der Färbung und Auswertung könnte hier in zukünftigen Experimenten verlässlichere Ergebnisse liefern.

Die Anzahl der Hif1 $\alpha$  positiven Zellen im Knochenmark war signifikant niedriger in bestrahlten Knochen als in unbestrahlten Kontrollen. Dies erscheint überraschend, da durch die Bestrahlung und die daraus resultierende Schädigung der Gefäßstrukturen ein hypoxisches Milieu und somit eine erhöhte Expression von Hif1 $\alpha$  zu erwarten wäre. In der Literatur finden sich jedoch Hinweise, dass einige Tage nach der Bestrahlung der Sauerstoffgehalt im Knochenmark steigt (Spencer et al., 2014). Als mögliche Ursache führen Spencer et al. die durch die Bestrahlung entstehende Hypozellularität und den daraus reduzierten Sauerstoffverbrauch, den überraschend hohen Blutfluss in den zuführenden Gefäßen und die geringere Teilungsrate der Zellen im Knochenmark an. In gesundem Knochenmark wird Hif1 $\alpha$  hingegen in einigen Bereichen konstitutiv exprimiert, was das physiologischerweise hypoxische Milieu zeigt. Eine Mobilisierung von Stammzellen und die damit verbundene erhöhte Teilungsrate hingegen erhöht diese Hypoxie und damit verbunden auch die Expression von Hif1 $\alpha$  (Levesque et al., 2007). In den einzelnen Gruppen erreichte die Verringerung der Hif1 $\alpha$  positiven Zellen in Gruppe C Signifikanz, was auf den anfänglich erhöhten pO<sub>2</sub> zurückzuführen sein könnte. Da in Gruppe D keine Signifikanz mehr vorhanden war, ist davon auszugehen, dass sich 8 Wochen nach der Bestrahlung die Sauerstoffzufuhr

wieder normalisiert hatte. Da in Gruppe C die Entnahme der Femora 4 Wochen nach der ersten Bestrahlung und somit 3 Wochen nach der letzten Bestrahlung entnommen wurden, kann spekuliert werden, dass die initiale Erhöhung des pO<sub>2</sub> hier noch vorhanden war, wohingegen sich in Gruppe A, in der die Femora 4 Wochen nach der (einzigen) Bestrahlung entnommen wurden, der Sauerstoffpartialdruck möglicherweise bereits wieder normalisiert hatte.

#### **6.1.4 Auswirkungen auf die Kortikalis**

Knochenzellen stellen eine relativ strahlenresistente Zellpopulation dar. Ionisierende Bestrahlung inhibiert in diesen Zellen *in vitro* das Wachstum und steigert ihre Empfindlichkeit für apoptogene Signale (Levesque et al., 2007). Die Expression des Suppressorgens p53 ist zwar in Folge einer Bestrahlung erhöht, es wird jedoch keine direkte Apoptose induziert (Midgley et al., 1995). *In vivo* kann ein herabgesetzter Metabolismus festgestellt werden, ausgedrückt durch eine verminderte RNA-Synthese in bestrahltem Knochengewebe (Sugimoto et al., 1993). Die Auswirkung ionisierender Strahlung auf die absolute Anzahl an Knochenzellen *in vivo* scheint noch unklar zu sein: Während sie in mehreren *in vivo* Studien nicht vermindert war (Rabelo et al., 2010; Sugimoto et al., 1993), stellten andere eine mehrere Wochen anhaltende Hypozellularität in Kortikalis und Spongiosa nach Bestrahlung fest (Cao et al., 2011; Maeda et al., 1988; Takahashi et al., 1994). Auch in dieser Studie war der Effekt der Bestrahlung auf die Zellzahl in der Kortikalis nachweisbar und spricht für eine nachhaltige Schädigung der Knochenstruktur. Bei Aufteilung in die einzelnen Gruppen war die Abnahme nicht signifikant, zeigte jedoch eine Tendenz zur Signifikanz in Gruppe A ( $P = 0,081$ ). Dies könnte als Hinweis darauf gewertet werden, dass die Zellpopulation in der Kortikalis durch die einmalige Bestrahlung stärker geschädigt wurde als durch das fraktionierte Protokoll. Die mangelnde Signifikanz nach 8 Wochen (Gruppe B) könnte für eine teilweise Regeneration der Zellpopulation sprechen.

#### **6.1.5 Auswirkungen auf die Gefäßstrukturen**

In der vorliegenden Studie war in der histologischen Auswertung kein signifikanter Unterschied zwischen bestrahlten und unbestrahlten Knochen festzustellen. Der Grad an Perfusion war jedoch nicht konstant in den einzelnen Gefäßen, sodass beide Parameter eine hohe Standardabweichung aufwiesen. Insbesondere kleine Gefäßstrukturen wurden von der Auswert-Software häufig nicht erkannt oder mit Zellkernen verwechselt. Da die Auswertung

der Schädigung der Kapillaren jedoch einen zentralen Punkt dieser Studie darstellte, wurde das Hauptaugenmerk der Gefäßauswertung auf die  $\mu$ CT-Untersuchung gelegt.

Die dreidimensionale Darstellung des Gefäßnetzwerks mittels Mikrocomputertomographie ( $\mu$ CT) stellt eine sehr gute Ergänzung der histologischen Auswertung dar und wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen in dieser oder ähnlicher Form verwendet (Arkudas et al., 2010; Jing et al., 2012). Durch diese Methode konnte nicht nur eine definierte Schnittebene, wie in der Histologie, sondern die gesamte bestrahlte Diaphyse quantitativ ausgewertet werden. Wichtig für die Auswertung der Gefäßstrukturen mittels  $\mu$ CT ist ein konstanter Perfusionsgrad der Gefäße mit einem röntgendichten Kontrastmittel. Aufgrund der manuellen Injektion im Rahmen dieser Studie über eine Spritze und ein Schlauchsystem war eine genaue Messung des Infusionsdrucks nicht möglich, und kleinere Abweichungen zwischen den einzelnen Tieren sind nicht auszuschließen. Da jedoch beide Hinterbeine eines jeden Tieres verwendet und miteinander verglichen wurden, ist eine Auswirkung von eventuellen Schwankungen des Perfusionsdrucks auf die Gegenüberstellung von bestrahlten und unbestrahlten Femora nicht zu erwarten.

Im  $\mu$ CT zeigte sich in Gruppe A sowie in Gruppe D eine signifikante Abnahme der kleinen Gefäße (bis ca. 40  $\mu$ m) in den bestrahlten Femurknochen im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen. In Gruppe B war der Effekt zwar sichtbar, jedoch nicht statistisch signifikant. Die sichtbare Schädigung der Mikrovaskulatur entspricht den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Cao et al., 2011; Farberg et al., 2012), die 4 Wochen nach Bestrahlung ebenfalls eine Abnahme der kleinen Gefäße feststellten. Bereits innerhalb der ersten Stunden nach einer Bestrahlung kommt es in den Kapillaren zur Adhäsion und Extravasation von Leukozyten sowie zu einer Abnahme des Blutflusses (Jacobsson et al., 1987). Mit der Zeit folgen eine fortschreitende Obliteration der kleinen Gefäße sowie eine Abnahme der Gefäßdichte (Marx und Johnson, 1987; Xie et al., 1998). In ausgeprägten Fällen kommt es dadurch zur Osteoradionekrose (Xie et al., 1998). Die Schädigung der Blutzufuhr führt zu einer Reduktion der Osteogenese im Rahmen der Knochenheilung (Farberg et al., 2012) und stellt somit einen zentralen Punkt in der Rekonstruktion von Defekten dar.

### **6.1.6 Untersuchung der Genexpressionen**

Die Untersuchung der Genexpressionen im Knochen nach Bestrahlung und in Knochendefekten stellt einen wichtigen Grundpfeiler bei der Suche nach neuen Therapiezielen dar. Veränderte Expressionen können beispielsweise durch gezieltes

Einbringen von Genen (Gentherapie) oder Einbringen von siRNAs (small interfering RNAs) reguliert werden (Baksh et al., 2004; Lewis et al., 2002; Zhu et al., 2004) und so die Knochenbildung aktiv moduliert werden. Außerdem können sie einen guten Anhaltspunkt für die Effektivität applizierter Therapiemöglichkeiten sein.

In der Literatur finden sich zahlreiche Studien zur Auswirkung von ionisierender Strahlung auf osteogene Zelllinien. So wird beispielsweise durch Bestrahlung die osteogene Differenzierung von C2C12-Zellen vermindert, ausgedrückt als eine geringere Expression von ALP und Collagen I (Sakurai et al., 2007). Im Gegensatz dazu wird in der Osteoblasten-Zelllinie MC3T3 ALP stärker exprimiert, was eine terminale Differenzierung suggeriert, Collagen I hingegen in geringerem Ausmaß (Dudziak et al., 2000). Über die Auswirkungen auf die Produktion von TGF $\beta$ 1 finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben (Dudziak et al., 2000; Gal et al., 2000). Die VEGF-Synthese pro Zelle nimmt in Folge der Bestrahlung nach ungefähr einer Woche zu (Dudziak et al., 2000). In osteogen differenzierten MSCs ist eine erhöhte Ablagerung von Calciumkristallen, verbunden mit einer erhöhten Expression von ALP und Osteopontin beschrieben, bei unveränderter Expression von Osteocalcin und Collagen I (Cruet-Hennequart et al., 2015). In der vorliegenden Studie war in vitro keiner dieser Marker signifikant gegenüber den unbestrahlten Kontrollen verändert. Ein Grund dafür könnte die im Vergleich zu anderen Studien relativ niedrig gewählte Dosis sein, die in der Studie von Cruet-Hennequart et al. beispielsweise 10 Gy statt der in dieser Studie verwendeten 5 Gy betrug (Cruet-Hennequart et al., 2015). Mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark stellen außerdem eine relativ strahlenresistente Zellpopulation innerhalb des Knochenmarks dar (Chen et al., 2006), und der hohe Differenzierungsgrad sowie die damit verbundene geringe Teilungsrate im Rahmen dieser Studie dürften diese Strahlenresistenz noch weiter verstärkt haben. Auch wurde in der vorliegenden Studie nur an einem Zeitpunkt die Genexpression bestimmt. Eine Verlaufsuntersuchung mit mehreren Zeitpunkten und unterschiedlichen Strahlendosen könnte interessante Einblicke in die Regulation der verschiedenen Marker nach der Bestrahlung bringen.

Im Gegensatz zu den osteogen differenzierten MSCs war eine Woche nach Bestrahlung der endothelialen Vorläuferzellen eine signifikante Verminderung der Expression von Osteocalcin, ALP, RUNX2 sowie VEGF-A feststellbar. Dies zeigt, dass diese Zellpopulation radiosensitiver war als osteogen differenzierte MSC, vermutlich aufgrund der höheren Teilungsrate durch den geringeren Differenzierungsgrad. Die verminderte Produktion von VEGF durch EPCs nach Bestrahlung wurde von Lee et al. beschrieben (Lee et al., 2012) und

wird auf die Aktivierung des Tumorsuppressors P53 zurückgeführt. Die geringe Expression der osteogenen Marker Osteocalcin, ALP und RUNX2 wurde bisher, soweit der Autorin bekannt, noch nicht in der Literatur beschrieben. CD34-positive Zellen stellen eine Untergruppe der hämatopoetischen und endothelialen Vorläuferzellen im Knochenmark dar; in EPC-Kulturen weisen sie *in vitro* eine hohe Expression endothelialer Marker sowie *in vivo* vielversprechende Eigenschaften in der Neovaskularisation ischämischer Bezirke auf (Yang et al., 2011). Ein Teil dieser CD34 positiven Zellen können jedoch zu Osteoblasten differenzieren (Chen et al., 1997). Auch zirkulierende EPCs im peripheren Blut exprimieren zum Teil osteogene Marker wie Osteocalcin (Gossl et al., 2008). Die verminderte Expression der osteogenen Marker könnte somit auf eine Untergruppe der EPC-Population mit Osteoblasten-ähnlichen Eigenschaften zurückzuführen sein. Da durch dasselbe Bestrahlungsprotokoll in osteogen differenzierten MSCs keine Veränderungen der Genexpression erzielt wurden, scheint es sich hierbei um eine relativ strahlenempfindliche Zellpopulation zu handeln.

In der Vorstudie zeigte sich *in vivo* 4 Wochen nach einmaliger Bestrahlung (Gruppe A) eine verminderte Expression sämtlicher untersuchter Gene. Signifikant war dieser Unterschied bei den osteogenen Markern Osteocalcin und RUNX2, dem Fibrosemarker TGF $\beta$ 1, dem Entzündungsmarker TNF $\alpha$ , dem Angiogenesemarker VEGF-A und dem Hypoxiemarker Hif1 $\alpha$  sowie einen Trend zur verminderten Expression von Collagen I. Nach 8 Wochen hingegen zeigten sämtliche Gene eine erhöhte Expression in bestrahlten Knochen; die osteogenen Marker ALP, Osteocalcin und Osteopontin einen Trend zur Signifikanz, ebenso der Hypoxiemarker Hif1 $\alpha$ . Eine generell mögliche Ursache für einen derartigen Effekt könnte eine Regulation der Expression der Housekeeping-Gene durch die ionisierende Bestrahlung sein. GAPDH als Enzym der Glykolyse und PPIA als Enzym für die Proteinfaltung in der Zelle zeigen jedoch *in vitro* ein relativ konstantes Expressionsmuster nach Bestrahlung unterschiedlicher Zelltypen und wurden deshalb für diese Studie gewählt (Banda et al., 2008; Ponnaiya et al., 2013; Sharunbam et al., 2012). Eine Regulation der Referenzgene scheint daher unwahrscheinlich. Auch die Ergebnisse der *in vitro* Bestrahlungsversuche osteogen differenzierten MSCs lassen nicht auf eine Regulation der Housekeeping-Gene schließen.

Ein weiterer möglicher Interpretationsansatz ist ein verminderter Metabolismus des Knochengewebes in Folge der Bestrahlung nach 4 Wochen mit darauf folgender Reparatur. In bestrahlten Zellen kommt es infolge der DNA Schädigung zu einem Mitose-Stopp in der G1- oder in der G2-Phase des Zellzyklus, zur DNA-Reparatur oder zur Apoptose (Teyssier et

al., 1999). Während dieser Zeit kommt es zu einer Hemmung der Transkription (Luchnik et al., 1988). Es ist denkbar, dass in dieser Phase vorwiegend die für den Erhalt der Zellfunktion nötigen Proteine synthetisiert wurden, wie beispielsweise GAPDH und PPIA, während andere, nicht unmittelbar für das Zellüberleben notwendige Moleküle vermindert waren. Insgesamt schien die Regulation der Transkription in den einmal bestrahlten Gruppen deutlicher ausgeprägt zu sein als in den fraktioniert bestrahlten Knochen, was aufgrund der schwächeren Schädigung von gesundem Gewebe bei Fraktionierung den Erwartungen entsprach (Hall und Giaccia, 2006).

### **6.1.7 Zusammenfassende Beurteilung**

Protokoll A zeigte eine deutlichen Zunahme der Gesamtvakuolenfläche und durchschnittlichen Vakuolengröße im Knochenmark, eine signifikant verminderten Anzahl an kleinkalibrigen Gefäßen in der  $\mu$ CT-Untersuchung und einen deutlichen Einflusses auf die Genexpression in den Epiphysen. Die Abnahme der Gesamtzellzahl in der Kortikalis war deutlich sichtbar, wenngleich nicht statistisch signifikant. Damit führte dieses Protokoll insgesamt zur deutlichsten Schädigung des Knochens und wurde für den weiteren Verlauf der Studie verwendet.

## **6.2 Knochen-Tissue Engineering im CSFD Modell nach Bestrahlung (Phase II)**

### **6.2.1 Beurteilung des Tiermodells**

Die Ratte ist eines der am häufigsten verwendeten Tiere in der Forschung. In Studien zur Knochenheilung stellen sie mit 38% sogar die am häufigsten eingesetzte Tierart dar (O'Loughlin et al., 2008). Die in dieser Studie verwendete Inzucht-Linie LEW/Crl (Lewis-Charles River) wurde in den frühen 50er Jahren aus Wistar-Ratten gezüchtet. Die Tiere besitzen den MHC-Haplotypen RT<sub>1</sub>(I) und werden häufig für Transplantations-Experimente eingesetzt ([www.criver.com](http://www.criver.com)). Rattenmodelle sind aufgrund der ausreichenden Größe für chirurgische Eingriffe am Knochen, der geringen Kosten im Vergleich zu Großtiermodellen sowie der Verfügbarkeit von immundefizienten Stämmen, die auch den Einsatz von xenogenem Material erlauben, gut für Studien im Knochen Tissue Engineering geeignet. Ein Nachteil dieses Tiermodells liegt jedoch in der im Vergleich zu größeren Tieren und Menschen abweichende Knochenheilung. Auch für Studien zu den biomechanischen Eigenschaften von Implantaten sind Rattenmodelle nur bedingt geeignet (O'Loughlin et al., 2008). Häufig ist daher die Überprüfung der Ergebnisse aus Kleintiermodellen in größeren Tierarten nötig, um eine verlässliche Translation in die klinische Praxis zu ermöglichen.

Insbesondere in Hinblick auf die biomechanische Belastung der Implantate und die Vaskularisation größerer Konstrukte sind im Großtiermodell höhere Ansprüche gestellt als in Rattenmodellen. Die vorliegenden Ergebnisse stellen somit einen ersten Schritt zur in vivo Evaluation der beschriebenen bioartifiziellen Knochenkonstrukte in bestrahlten Knochen dar, die in weiterer Folge in Großtiermodellen überprüft werden.

Zur kritischen Größe eines Knochendefekts in der Ratte werden in der Literatur unterschiedlichste Angaben gemacht. Im Bereich des Rattenfemurs werden Defekte von 4 mm bis 1 cm beschrieben (Jäger et al., 2005; Vögelin et al., 2005). Die für die Heilung eines Knochendefekts benötigte Zeit ist abhängig vom Alter des Patienten, Tierart, Rasse, involviertem Knochen, Art der Fraktur, Vorliegen einer Infektion, Reduktion und Ruhigstellung, verabreichten Medikamenten, systemischen Faktoren wie Anämien und dem mit der Fraktur einhergehendem Weichteiltrauma (Johnson, 2013; Lopez, 2012; Newton und Nunamaker, 1985). Das im Rahmen dieser Studie verwendete Defektmodell wurde in modifizierter Form aus einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe übernommen. Bereits in dieser Studie konnte ein deutliches Auswachsen der Knochenstümpfe in Leerdefekte, jedoch keine vollständige Überbrückung während der 12-wöchigen Heilungszeit gezeigt werden, was die kritische Größe belegt (Balzer, 2013). Die Leerdefekte der Gruppe G wurden bis auf ein zusätzlich operiertes Tier aus dieser Studie übernommen, um die benötigte Anzahl an Tieren so gering wie möglich zu halten.

Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden am Modell von Balzer lediglich kleinere Änderungen der perioperativ verabreichten Medikamente vorgenommen. Einerseits wurde den Spendertieren einmalig präoperativ sowie den Empfängertieren präoperativ und drei Tage postoperativ Meloxicam zur Ergänzung der Opioid-Analgesie verabreicht. Andererseits wurde bei Empfängertieren präoperativ sowie während der ersten 3 postoperativen Tage aufgrund der stärkeren analgetischen Wirkung Buprenorphin anstelle von Tramadol verwendet (McKeon et al., 2011). Die dritte Modifikation des ursprünglichen Behandlungsprotokolls bestand in der postoperativen Verabreichung von Enrofloxacin nach Absetzen von Clindamycin. Eine Beeinflussung der Osteogenese und Angiogenese durch nichtsteroidale Entzündungshemmer ist in der Literatur beschrieben (Jones et al., 1999; Vuolteenaho et al., 2008) und kann auch für Meloxicam in dieser Studie nicht ausgeschlossen werden. Ebenso wurden bei perioperativer Verwendung von Opioiden eine Hemmung der Kallusbildung und des Remodelings sowie eine schädigende Wirkung auf Endothelzellen beschrieben (Chrastil et al., 2013; Hsiao et al., 2009). Die nur kurzzeitige Verwendung von Meloxicam und

Buprenorphin sollte jedoch in beiden Fällen keinen signifikanten Einfluss auf die Knochenbildung zur Folge haben.

Aufgrund der guten Knochengängigkeit wurde in dieser Studie Enrofloxacin über das Trinkwasser verabreicht. Über den Einfluss von Fluorchinolonen auf die Knochenbildung finden sich in der Literatur unklare Angaben. Eine Inhibition der Knochenheilung in Ratten durch verwandte Antibiotika dieser Gruppe ist beschrieben und wird auf eine Schädigung der Chondrozyten und eine daraus resultierende Hemmung der enchondralen Ossifikation während der Knochenheilung zurückgeführt (Huddleston et al., 2000; Tuncay et al., 2005). Das Ausmaß der Hemmung unterscheidet sich jedoch zwischen den einzelnen Substanzen; für Enrofloxacin stehen keine der Autorin bekannten Studien zur Verfügung.

### **6.2.2 *Klinische Evaluation***

Die Implantation der Konstrukte in die Spendertiere gestaltete sich unkompliziert und stellte für die Tiere einen kleinen Eingriff dar, was sich an der guten Gewichtszunahme postoperativ zeigte. Eine geringgradige entzündliche Reaktion in Form einer leichten Wundschwellung und Rötung in den Tagen unmittelbar nach Implantation kann als normale Reaktion im Rahmen eines chirurgischen Eingriffs gesehen werden. Hinweise auf eine Abstoßungsreaktion auf die implantierte Kammer traten nicht auf.

Die Defektsetzung stellte für die Empfängertiere einen deutlich größeren Eingriff dar, was sich in der anfänglichen Gewichtsabnahme der Tiere äußerte. Das geringgradig verminderte Allgemeinbefinden in den ersten zwei bis drei Tagen dürfte hierfür verantwortlich sein. Die Verabreichung von Buprenorphin schien während dieser Zeit einen leicht sedierenden Effekt zu haben. Alle Tiere belasteten sofort nach Erwachen aus der Narkose das operierte Bein und erholten sich rasch vom chirurgischen Eingriff.

Die verwendete Titankammer, die mittels MOH Schrauben und Cerclagen am Knochen fixiert wurde, führte in der palpatorischen Untersuchung zu einer guten Stabilität des Femur-Kammer-Konstrukts über die gesamten 12 Wochen. In der Röntgenuntersuchung konnten jedoch bei Explantation bei 28% der unbestrahlten und 34% der bestrahlten Tiere eine Lockerung einer oder mehrerer Schrauben festgestellt werden, wobei nur ein kleiner Teil dieser Konstrukte Anzeichen einer Infektion aufzeigten. In den nicht infizierten Knochen dürfte die Lockerung der Schrauben auf die zyklische Belastung der Implantate im Rahmen der Bewegung zurückzuführen sein. Obgleich die Tiere klinisch in den wenigsten Fällen eine

merkliche Instabilität oder Lahmheit zeigten, unterstreicht die Anzahl der gelockerten Implantate die Notwendigkeit einer stabilen knöchernen und somit tragfähigen Überbrückung des Defekts.

### **6.2.3 Knochenbildung**

#### **6.2.3.1 Osteokonduktion**

Osteokonduktivität bezeichnet die Fähigkeit eines Stoffes, das Einwachsen von Knochengewebe aus der Umgebung zu fördern. Beim Einsetzen eines osteokonduktiven Scaffolds in knöchernes Gewebe wandern hierbei Zellen in diesen ein und induzieren eine Knochenneubildung und eine Integration des Scaffolds in den umliegenden Knochen (Cornell und Lane, 1998). Die Osteokonduktivität von Hydroxyapatit wird in der Literatur als sehr gut beschrieben, wobei jene von biologischem Hydroxyapatit etwas besser zu sein scheint als von synthetisch hergestelltem (Carvalho et al., 2007; Rojbani et al., 2011). Durch Silikat-Substitution wie im Falle der in dieser Studie verwendeten Hartmatrix kann das Einwachsen von Knochen und das Ablagern von mineralisierter Substanz zusätzlich gefördert werden (Hing et al., 2006). Trotz der allgemein beschriebenen guten osteokonduktiven Eigenschaften von Hydroxyapatit konnte in der vorliegenden Studie kein derartiges Einwachsen von Knochen nachgewiesen werden. Eine mögliche Erklärung dafür wäre in diesem Modell die ektopische Implantation des Konstrukts vor dem Einsetzen in das Femur. Das während dieser Zeit rund um die Granula gebildete Bindegewebe könnte beim Einsetzen in den CSFD den Kontakt zwischen Knochengewebe und Scaffold vermindert haben. Zwar wurden die Kontaktstellen vor Implantation in den Defekt durch Abschaben des Bindegewebes angefrischt, dennoch ist denkbar, dass die dadurch freiliegende Hydroxyapatit-Oberfläche nicht ausreichend Angriffsfläche für eine ausreichende Osteokonduktion bot. Für die Verwendung in klinischen Fällen scheint daher die direkte orthotopische Implantation vorteilhaft. Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie - die mangelnde knöcherne Verbindung zwischen Konstrukt und Femur sowie die fehlende Verknöcherung zwischen den Granula - scheint eine Verwendung in gewichtstragenden Lokalisationen ohne zusätzliche Stabilisierung nur eingeschränkt empfehlenswert, da eine ausreichende Festigkeit durch die Hartmatrix und den neu gebildeten Knochen erst sehr spät zu erwarten ist.

#### **6.2.3.2 Osteoinduktion**

Über die osteoinduktiven Eigenschaften von Hydroxyapatit-Keramiken finden sich in der Literatur widersprüchliche Angaben. Während in vitro die osteogene Differenzierung von

Zellen stimuliert wird (Lee et al., 2011; Lin et al., 2009), konnten einige Arbeitsgruppen in vivo keinerlei Osteoinduktion feststellen (Habibovic et al., 2008). Andere wiederum beschreiben einen osteoinduktiven Effekt, der von der Herstellung und der daraus resultierenden Mikrostruktur der Keramik abhängig ist (Yamasaki und Sakai, 1992; Yuan et al., 1999). Durch die Substitution mit Silikat konnte das osteoinduktive Potential in einer Studie deutlich gesteigert werden; dabei wird das neue Knochengewebe vornehmlich in den Poren der Hartmatrix gebildet (Coathup et al., 2011). In der vorliegenden Studie konnte durch die Hartmatrix alleine ohne die Beigabe von Wachstumsfaktoren oder osteogenen Zellen jedoch keine Knochenbildung im Inneren des Konstrukts stimuliert werden.

Durch die Kombination aus silikatsubstituiertem Hydroxyapatit, BMP-2 und osteogen differenzierten MSCs konnte in der vorliegenden Studie eine sehr gute Osteoinduktion erzielt werden, was nicht nur in der histologischen Auswertung der relativen Knochenfläche, sondern auch in der Entkalkungszeit ersichtlich war, die in Gruppe E12Wo signifikant verlängert war. Dies entspricht den Ergebnissen ähnlicher Vorstudien der eigenen Arbeitsgruppe zur Kombination aus BMP-2, MSCs und einer biphasischen Calciumphosphat-Keramik (Balzer, 2013; Buehrer et al., 2015). BMP-2 und MSCs zeigen dabei einen synergistischen Effekt und sind somit den einzeln zugesetzten Komponenten überlegen, was auf die durch BMP-2 vorangetriebene osteogene Differenzierung der implantierten MSCs zurückzuführen sein dürfte (Dorman et al., 2012).

Mesenchymale Stammzellen sind aufgrund ihres Wachstumsvermögens, ihrer einfachen Kulturbedingungen und ihres osteogenen Differenzierungsvermögens zu verschiedenen Zelllinien im Knochen Tissue Engineering weit verbreitet. Aufgrund der vielen Quellen, aus denen MSCs gewonnen werden können, und der daraus resultierenden Heterogenität empfiehlt die ISCT (International Society for Cellular Therapy) für humane Zellen minimale Kriterien, um sie als mesenchymale Stammzellen zu identifizieren (Dominici et al., 2006). Die Adhärenz an Plastik sowie die Expression definierter Oberflächenmarker wurden in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen. Die für die Durchflusszytometrie beschriebenen Oberflächenmarker unterscheiden sich jedoch von Spezies zu Spezies und wurden in dieser Studie leicht abgeändert. Neben den von der ISCT empfohlenen Markern CD90 und CD73 (positiv) und CD45 (Leukozytenmarker, negativ) wurden CD29 und CD54 als Positivkontrollen sowie CD31 als Negativkontrolle (Endothelzellmarker) verwendet. Sämtliche Marker wurden in mehreren Literaturstellen hinreichend beschrieben (Harting et

al., 2008; Miyahara et al., 2006; Zhang und Chan, 2010) und können daher als beweisend für das Vorliegen einer MSC-Kultur angesehen werden.

Die osteogene Differenzierungsfähigkeit wurde im Rahmen dieser Studie mittels ALP-Färbung nach 8 Tagen im osteogenen Differenzierungsmedium untersucht. ALP stellt einen frühen Marker der Knochenbildung dar, der innerhalb der ersten 1-2 Wochen nach Beginn der in-vitro-Differenzierung hochreguliert wird (Hayashi et al., 2008). Ein weiterer Hinweis auf die voranschreitende Differenzierung war das Verklumpen der Zellen beim Ablösen mittels Accutase für die in vivo Implantation; hierbei lag eine Einzelzellsuspension erst nach Verwendung von Collagenase II vor, was auf die Produktion von Collagen durch die Zellen schließen lässt. Collagen I stellt einen sehr frühen osteogenen Marker dar, der innerhalb der ersten Tage verstärkt exprimiert wird (Franceschi, 1999). Spätere Phasen der osteogenen Differenzierung wurden im Rahmen dieser Studie nicht nachgewiesen. Die Kombination der Zellen mit BMP-2 bei Implantation der Konstrukte ließ jedoch ein weiteres Voranschreiten dieses Prozesses erwarten.

BMP-2 stellt einen der am besten erforschten osteogenen Wachstumsfaktoren im Knochen-Tissue-Engineering dar. Seine osteoinduktiven Eigenschaften in vitro und in vivo wurden bereits in unterschiedlichen Spezies nachgewiesen (Buehrer et al., 2015; Kobayashi et al., 1999; Kübler et al., 1998; Yamaguchi et al., 1991). Das rekombinante Protein besitzt aufgrund geringer Unterschiede zwischen unterschiedlichen Spezies kaum immunogene Eigenschaften und kann daher prinzipiell in jeder Tierart angewandt werden (Hwang et al., 2009). Die klinische Anwendung wird jedoch insbesondere bei größeren Konstrukten durch den Preis des kommerziell verfügbaren Produkts limitiert. Des Weiteren wird das Protein auch trotz Verwendung einer Release-Matrix relativ schnell freigesetzt und entfaltet daher nur eine kurze osteoinduktive Wirkung. In der vorliegenden Studie wurde basierend auf eigenen Vorarbeiten Fibrin als Carrier verwendet; durch die Bindung von BMP-2 an eine Heparin-bindende Domäne im Fibrin kommt es zwar zu einer verlangsamten Freisetzung des Wachstumsfaktors; innerhalb der ersten 7 Tage werden jedoch knapp 70% des Proteins eluiert (Martino et al., 2013). Eine konstante Expression des Wachstumsfaktors durch Transfektion implantierter Zellen (MSCs) könnte die Knochenbildung insbesondere in den Langzeitgruppen weiter anregen, was auch zu einer höheren Produktion der in dieser Studie gering exprimierten Osteoblastenmarker Osteocalcin (Lian und Gundberg, 1988) und ALP (Volpin et al., 1986) führen sollte.

### 6.2.3.3 *Abbau und Remodeling*

Die Integration eines Scaffolds in den heilenden Knochen mit nachfolgendem Remodeling und Umbau zu physiologischem Knochengewebe (Osseointegration) stellt einen der grundlegenden Schritte in der Heilung von Knochendefekten dar. Idealerweise sollte dabei die Abbaugeschwindigkeit des Scaffolds der Knochenneubildung entsprechen (Gerhardt und Boccaccini, 2010). Durch Unterschiede in der Herstellung, Porosität und chemischen Zusammensetzung kann Hydroxyapatit jedoch stark variierende biologische Eigenschaften aufweisen. So bildet beispielsweise die gesinterte Form (Sintern = Erhitzen auf hohe Temperaturen unterhalb der Schmelztemperatur) eine nur sehr schlecht resorbierbare Struktur (Schmitz et al., 1999). Auch die im Rahmen dieser Studie verwendete Hartmatrix zählt zu den keramischen und somit gesinterten Hydroxyapatit-Verbindungen. Durch die Substitution mit Silikatgruppen erhöht sich die Hydrophilität der Matrix, mit daraus resultierender erhöhter Proteinadsorption (Rashid et al., 2008); in vivo zeigt es dadurch ein schnelleres Remodeling als reines Hydroxyapatit (Patel et al., 2002; Porter et al., 2004). Der Abbau der Keramik erfolgt dabei durch Phagozytose und Resorption durch Osteoklasten (Wenisch et al., 2003).

Bei Verwendung von silikatsubstituiertem Hydroxyapatit war in einer Studie von Hing et al. (2007) 12 Wochen nach Implantation in Kaninchenknochen noch ein großer Teil der ursprünglichen Hartmatrix nachweisbar. Auch in der vorliegenden Studie war ein Abbau der Granula in den 12-Wochen-Gruppen makroskopisch noch nicht ersichtlich. Diese waren bei Explantation hart und benötigten dementsprechend lange für die Entkalkung. Auch mikroskopisch war die implantierte Matrix noch deutlich sichtbar. In der ED1 (CD68) Färbung waren vereinzelt mehrkernige Zellen in der Umgebung der Matrix-Granula zu sehen. Osteoklasten weisen als Vertreter des mononukleär-phagozytären Systems eine deutliche Expression dieses Markers auf (Sminia und Dijkstra, 1986). Die erhöhte Expression von Osteopontin in Konstrukten im Vergleich zu normalem Knochen kann als Hinweis auf den Abbau der Hartmatrix gewertet werden, da dieses Protein von Makrophagen als Opsonin während der Resorption von Hydroxyapatit sezerniert wird (Pedraza et al., 2008). Die beobachteten ED1-positiven mehrkernigen Zellen können somit als Anzeichen der fortschreitenden Degradation des Scaffolds interpretiert werden. Im Vergleich zur Knochenregeneration, die innerhalb einiger Wochen zur Produktion von Geflechtknochen führen kann (Sfeir et al., 2005), verlief der Abbau jedoch sehr langsam und könnte die vollständige Wiederherstellung der Knochenstruktur im Zuge des Remodelings behindern.

#### **6.2.3.4 Auswirkung der Bestrahlung auf die Knochenbildung**

Infolge einer Bestrahlung kommt es im Knochen zu einer deutlich verminderten Heilung von knöchernen Defekten (Arnold et al., 1998; Lehner et al., 2004; Lerouxel et al., 2009). Da in der Vorstudie zur Etablierung des Bestrahlungsprotokolls keine Knochenläsion gesetzt wurde, konnten hier nur Parameter für die Beurteilung herangezogen werden, die eine verminderte Reparatur vermuten ließen. Im zweiten Teil der Studie konnte dieser Effekt in Form des fehlenden Auswachsens der Femurstümpfe in Richtung Defekt jedoch deutlich nachgewiesen werden. Zusätzlich zur verminderten Knochenbildung kam es in der offen bleibenden Markhöhle zu einem Einwachsen von Bindegewebe aus dem umliegenden Gewebe und eine daraus resultierende Verdrängung des physiologischen Knochenmarks. Eine herabgesetzte Knochenheilung kann durch präoperative Bestrahlungen zwischen 1 und 180 Tagen vor Defektsetzung erzielt werden (Arnold et al., 1998). Die ionisierende Strahlung führt hierbei zu einem latenten Schaden durch die herabgesetzte Proliferationskapazität von Vorläuferzellen. Dies tritt ab einer Dosis von 13 Gray auf, da hierbei die Population der Vorläuferzellen auf unter 0,1% reduziert wird (Arnold et al., 1998). Außerdem kommt es durch die Bestrahlung zu einer verminderten Produktion osteogener Wachstumsfaktoren, wie BMP-2 und BMP-4, die die Knochenbildung durch die verbleibenden Zellen zusätzlich hemmen (Schultze-Mosgau et al., 2005). Durch einen chirurgisch gesetzten Knochendefekt werden diese Zellen zur Proliferation angeregt, die jedoch insuffizient bleibt, wodurch der Strahlenschaden sichtbar wird (Arnold et al., 1998).

Nach Transplantation in den CSFD schritt die Ossifikation der Konstrukte in gesundem Gewebe voran, was sich in einer Zunahme der relativen Knochenfläche zwischen Gruppe E10d und E12Wo bemerkbar machte. In den bestrahlten Defekten hingegen kam es zu keiner Zunahme, sondern sogar zu einer leichten Abnahme der Knochenfläche im CSFD. Ein direkter inhibitorischer Effekt von ionisierender Strahlung auf die Aktivität von Osteoblasten ist bekannt (Dare et al., 1997) und dürfte in dieser Studie auf die im Femur vorhandenen Zellen zutreffen. Li et al. (2015) beschreiben jedoch auch eine indirekte Hemmung der Osteoblastenaktivität *in vitro* durch konditioniertes Medium von bestrahlten, was im vorliegenden Modell die fehlende Aktivität der mit dem Konstrukt transplantierten, unbestrahlten Knochenvorläuferzellen verursacht haben könnte. Die leichte Abnahme der Knochenfläche zwischen Gruppe bE10d und bE12Wo weist nicht nur auf eine Hemmung der Osteoblasten, sondern auch auf eine Aktivierung der Osteoklastenaktivität hin. Der Einfluss

von ionisierender Strahlung auf die Funktion von Osteoklasten ist noch nicht vollständig geklärt. In vitro kommt es zwar zu einer vermehrten Aktivität von Osteoklasten-Vorläuferzellen, jedoch nicht von differenzierten Osteoklasten (Yang et al., 2012). In vivo führt die Bestrahlung zu einer erhöhten Osteoklasten-Anzahl und einer vermehrten Produktion von TRAP-5b, einem spezifischen Osteoklastenmarker, im Knochen, weshalb Willey et al. eine Beteiligung dieser Zellen an der Pathogenese der strahlungsinduzierten Osteopenie postulieren (Willey et al., 2008). In dieser Studie könnten aktivierte Osteoklasten für eine Resorption von Teilen des bereits im Spender gebildeten Knochengewebes verantwortlich sein, obgleich die Abnahme der Knochenfläche nur sehr gering war.

#### **6.2.4 Vaskularisation und Zellüberleben**

Die Vaskularisation eines künstlich hergestellten Gewebersatzes stellt einen zentralen Faktor im Tissue Engineering dar. Die Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen ist in vivo nur über eine Distanz von maximal 200 – 300 µm möglich (Horch et al., 2012). Ein ischämisches Milieu führt bereits nach sechs Tagen zu einer Abnahme der ATP-Produktion, zu einem verminderten Zellüberleben osteogener Zellen und zu einer Aktivierung von Osteoklasten (Arnett et al., 2003; Deschepper et al., 2011; Utting et al., 2006). In gesundem Rattengewebe ist ein durchschnittliches Gefäßwachstum von 180 µm pro Tag zu erwarten (Yamaura und Matsuzawa, 1980). Dies bedeutet bei einer Kammerhöhe von 10,5 mm, dass eine vollständige Vaskularisation des Konstrukts nach frühestens 29 Tagen zu erwarten ist.

In der vorliegenden Studie war eine mangelhafte Gefäßversorgung in den Konstrukten der 10-Tages-Gruppen ersichtlich. Ausgehend vom beschriebenen Gefäßwachstum von ca. 180 µm pro Tag war hier in unbestrahlten Konstrukten eine Vaskularisation eines Randsaums von knapp 2 mm zu erwarten. Dementsprechend war das Zellüberleben hier in der ausreichend mit Nährstoffen versorgten Peripherie höher als im hypoxischen Zentrum. Eine Folge der rein extrinsischen Vaskularisation der Konstrukte nach Implantation in die Spendertiere dürfte auch die verminderte Knochenbildung im Zentrum der 10-Tages-Konstrukte sein. In einer Studie von Bührer et al. konnte gezeigt werden, dass osteogen differenzierte MSCs rund um größere Gefäße auch ohne weitere Wachstumsfaktoren Knochen bilden können (Buehrer et al., 2015). Durch die von außen einsprossende Gefäßversorgung war die Versorgung der osteogenen Zellen im Zentrum anfangs nicht gewährleistet, wodurch die knochenbildende Aktivität dieser Zellen gehemmt worden sein dürfte. In einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe konnte dieser Effekt durch die Implantation einer zentralen Gefäßschleife (intrinsische Vaskularisation) aufgehoben und dadurch eine gute Knochenbildung im

gesamten Konstrukt erzielt werden (Balzer, 2013). Da 83% der von außen einsprossenden Gefäße (extrinsische Vaskularisation) innerhalb von 2 Wochen Anschluss an das zentrale Gefäß finden (Arkudas et al., 2012), kann eine derart vaskularisiertes Konstrukt beim Transfer in einen Knochendefekt außerdem durch Anastomosierung mit einem naheliegenden größeren Gefäß eine gute Nährstoffversorgung des gesamten Transplantats gewährleisten. In diesem Fall wäre das Zellüberleben im Konstrukt nach Transplantation nicht auf eine erneute extrinsische Vaskularisation angewiesen.

Die dreidimensionale Darstellung des Gefäßnetzwerks im  $\mu$ CT zeigte in der vorliegenden Studie eine vermehrte Vaskularisation in Gruppe E12Wo im Vergleich zu Gruppe F. Dies konnte jedoch nur qualitativ bewertet werden; im Gegensatz zur Vorstudie, in der durch ausreichend lange Entkalkung der Knochen ein guter Kontrast und eine hohe Auflösung erzielt werden konnte, waren in den Konstrukten der Hauptstudie auch nach langer Entkalkung noch kalkhaltige Reste der Hartmatrix vorhanden, die im  $\mu$ CT die Darstellung des Gefäßnetzwerks erschwerten und eine quantitative Auswertung verhinderten. Ein ähnlicher, wenngleich nicht signifikanter Trend zur verstärkten Vaskularisation der zellhaltigen Konstrukte konnte in der histologischen Gefäßauswertung festgestellt werden. Eine Produktion von VEGF, MCP-1 und anderen angiogenen Zytokinen durch MSCs und eine daraus resultierende Stimulation endothelialer Vorläuferzellen ist in der Literatur beschrieben (Boomsma und Geenen, 2012; Chen et al., 2008; Kagiwada et al., 2008). Auch für primäre Osteoblasten sowie osteogen differenzierte adMSCs ist eine proangiogene Wirkung bekannt (Buschmann et al., 2014) und könnte in dieser Studie für die verbesserte Vaskularisation der zellhaltigen Konstrukte verantwortlich sein. Eine Optimierung der Gefäßauswertung ist jedoch in zukünftigen Studien nötig, um diesen Mechanismus genauer erforschen zu können.

Deutlich sichtbar war der Einfluss der Bestrahlung auf die Vaskularisation, die zu einer niedrigeren Gefäßanzahl sowie daraus resultierend einem niedrigeren Zellüberleben in Gruppe bE10d, verglichen mit Gruppe E10d, führte. Nach 12 Wochen unterschied sich die in der Histologie festgestellte Gefäßanzahl zwischen bestrahlten und unbestrahlten Konstrukten nicht mehr, was darauf schließen lässt, dass die Vaskularisation auch in bestrahltem Gewebe deutlich vorangeschritten war. Die weiterhin bestehende Hypoxie, impliziert durch eine signifikant erhöhte Expression von Hif1 $\alpha$  in Gruppe bE12Wo, deutet jedoch auf einen weiterhin insuffizienten Gefäßversorgung hin. Eine Erklärung hierfür könnte eine Abnahme der kleinkalibrigen Gefäße sein, die im histologischen Präparat aufgrund ihrer Größe nicht von der Software erkannt wurden und im  $\mu$ CT aufgrund der Matrixreste nicht darstellbar

waren. Kleinere Gefäße weisen eine höhere Radiosensitivität auf als großkalibrige (Rubin und Griem, 1998; Xie et al., 1998) und wurden dementsprechend bereits im Rahmen der Bestrahlung geschädigt. Außerdem hemmt ionisierende Strahlung die Proliferationskapazität endothelialer Zellen sowie das Sprouting von Kapillaren aus größeren Gefäßen (Dicker et al., 2001). Die Kombination dieser beiden Effekte dürfte in dieser Studie zu einer mangelhaften Versorgung der bestrahlten Konstrukte geführt haben, was in weiterer Folge für das Sistieren der Knochenbildung verantwortlich sein dürfte.

Neben der intrinsischen Vaskularisation stellen der Einsatz angiogener Wachstumsfaktoren, Zellen und Scaffolds vielversprechende Ansätze zur Stimulation der Gefäßneubildung im Tissue Engineering dar (Santos und Reis, 2010). Durch kapillarenähnliche Strukturen im verwendeten Scaffold kann beispielsweise implantierten Zellen eine Leitstruktur für die Bildung von Gefäßen gegeben werden (Santos und Reis, 2010), Scaffolds wie bioaktives Glas besitzen selbst eine proangiogene Wirkung (Leu und Leach, 2008), und aus dem Scaffold freigesetzte Stoffe wie Kupfer (Hu, 1998) können die Proliferation von Endothelzellen stimulieren. Durch die Zugabe von Wachstumsfaktoren wie VEGF und bFGF kann das Einsprossen von Gefäßen in eine Matrix gesteigert (Arkudas et al., 2007) und dadurch sowohl in unbestrahlten als auch gegebenenfalls in bestrahlten Knochendefekten die Angiogenese gefördert und die Knochenbildung optimiert werden (Kaigler et al., 2006; Lv et al., 2015). Die Zugabe von exogenen Wachstumsfaktoren zum Zeitpunkt der Implantation erschien jedoch in diesem Modell nicht sinnvoll, da sie die extrinsische Vaskularisation im Spendertier zwar fördern würden, die Proteine zum Zeitpunkt der Transplantation in den CSFD aufgrund der kurzen Halbwertszeit aber bereits abgebaut wären und hier somit keinen Vorteil bieten würden. Die konstante Expression von Wachstumsfaktoren im Konstrukt, wie beispielsweise durch Transfektion mesenchymaler Stammzellen mit VEGF (Kasten et al., 2012), könnte hingegen auch in diesem Modell in zukünftigen Projekten zum Einsatz kommen. Denkbar wäre auch die Co-Implantation osteogener und endothelialer Vorläuferzellen. Hierbei scheinen endotheliale Vorläuferzellen auch die Expression osteogener Marker zu fördern (Li und Wang, 2013), was neben einer verbesserten Vaskularisation auch eine erhöhte Knochenbildung mit sich ziehen könnte.

### **6.2.5 Entzündungsreaktion**

Die in vivo Biokompatibilität eines Konstrukts stellt eine grundlegende Anforderung im Knochen Tissue Engineering dar. In der vorliegenden Studie konnte klinisch und makroskopisch keine Unverträglichkeit der implantierten Konstrukte festgestellt werden.

Auch mikroskopisch zeigte sich nur eine leichte Entzündungsreaktion in den 10-Tages-Defekten in Form einer geringen Infiltration des Gewebes mit ED1 positiven mononukleären Zellen, die im Rahmen einer normalen inflammatorischen Reaktion auf das implantierte Konstrukt gesehen werden kann. Nach 12 Wochen waren mit Ausnahme der einzelnen, aufgrund der erhöhten Osteopontin-Expression als Osteoklasten interpretierten Zellen in unmittelbarer Umgebung der Granula kaum mehr ED1 positive Zellen zu sehen. Dies deutet auf eine sehr geringe Entzündungsreaktion durch die implantierten Stoffe hin und spricht für deren gute Biokompatibilität.

Die Expression von TNF $\alpha$  war in der vorliegenden Studie in Konstrukten nach 12 Wochen im Vergleich zu normalem Knochengewebe deutlich gesteigert. TNF $\alpha$  wird vorwiegend von Makrophagen sezerniert. Es wirkt chemotaktisch auf Leukozyten, stimuliert die Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine und erhöht die Gefäßwandpermeabilität (Janeway et al., 2002). Das Protein kann somit als einer der zentralen Faktoren im Rahmen einer Entzündungsreaktion gesehen werden. Neben seiner Funktion als proinflammatorisches Zytokin nimmt es jedoch auch eine Rolle in der Aktivierung von Osteoklasten ein (Lam et al., 2000). Im Rahmen dieser Studie konnten in der Umgebung der Hartmatrix vereinzelt mehrkernige Riesenzellen festgestellt werden, die aufgrund ihres Färbeverhaltens in der ED1 Färbung als Osteoklasten identifiziert wurden. Die erhöhte Expression von TNF $\alpha$  kann somit – insbesondere durch das Fehlen einer histologisch feststellbaren deutlichen Entzündungsreaktion - im Zusammenhang mit der Osteoklastogenese interpretiert werden und muss daher nicht als Hinweis auf eine mangelnde Biokompatibilität der implantierten Strukturen gewertet werden.

## 7 Zusammenfassung

Ziel der ersten Phase dieser Arbeit war die Untersuchung der Auswirkung unterschiedlicher Bestrahlungsprotokolle auf Rattenknochen zur Etablierung eines reproduzierbaren Modells eines vorgeschädigten Femurs. Das Modell sollte anschließend in der zweiten Phase verwendet werden, um die Knochenheilung durch einen heterotop gezüchteten artifiziellen Knochengewebersatz in einem Femurdefekt kritischer Größe (*critical sized femoral defect*, CSFD) nach Bestrahlung zu untersuchen.

In der ersten Phase wurden 4 Bestrahlungsprotokolle verglichen: einmalige Bestrahlung mit 20 Gy und Explantation nach 4 Wochen (Gruppe A), einmalige Bestrahlung mit 20 Gy und Explantation nach 8 Wochen (Gruppe B), dreimalige fraktionierte Bestrahlung mit je 10 Gy und Explantation nach 4 Wochen (Gruppe C) sowie dreimalige fraktionierte Bestrahlung mit je 10 Gy und Explantation nach 8 Wochen. Als Vergleich diente das jeweilige kontralaterale, unbestrahlte Bein. Die Auswertung erfolgte neben der klinisch-makroskopischen Evaluation mittels Histologie, Mikrocomputertomographie ( $\mu$ CT) und quantitativer PCR. Zusätzlich wurden zwei im Knochenmark vertretene Zelllinien – osteogen differenzierte mesenchymale Stammzellen und endotheliale Vorläuferzellen – bestrahlt und die Genexpression mittels quantitativer PCR ausgewertet.

In der Histologie zeigte sich besonders in den 4-Wochen-Gruppen (A und C) infolge der Bestrahlung eine deutliche Vakuolisierung des Knochenmarks, die als Ödem und fettige Degeneration interpretiert werden kann. Weiters kam es zu einer Abnahme der Zellzahl in der Kortikalis sowie der Anzahl an Hif1 $\alpha$  positiven Zellen im Knochenmark. Die durch die Bestrahlung bedingte Abnahme der Gefäßanzahl sowie der Anzahl der CD31 positiven Zellen im Knochenmark waren nicht signifikant. Die quantitative PCR zeigte eine verminderte Expression mehrerer Zielgene in Gruppe A (Osteocalcin, RUNX2, TGF $\beta$ 1, TNF $\alpha$ , VEGF-A, Hif1 $\alpha$ ) sowie einen Trend zur vermehrten Expression von Hif1 $\alpha$ , ALP, Osteocalcin und Osteopontin in Gruppe B, was auf einen verminderten Metabolismus mit anschließender Reparatur hinweist. Das  $\mu$ CT ergab eine signifikante Abnahme der kleinkalibrigen Gefäße infolge der Bestrahlung in Gruppe A und D. Für die zweite Phase dieser Arbeit wurde das Protokoll der Gruppe A gewählt.

In der zweiten Phase wurde zunächst in Spendertiere eine Titankammer subkutan in die Leiste eingesetzt. Diese enthielt in den Gruppen E10d, E12Wo, bE10d und bE12Wo eine Mischung aus silikatsubstituiertem Hydroxyapatit, rekombinantem humanem BMP-2, osteogen

differenzierten mesenchymalen Stammzellen und Fibrin. In den Gruppen F und bF enthielt die Kammer nur silikatsubstituiertes Hydroxyapatit und Fibrin. Nach 6 Wochen wurden die Kammern entnommen und in einen CSFD in syngenem Empfängertieren eingesetzt. Als Kontrolle dienten Defekte, die durch eine leere Kammer überbrückt wurden (Gruppe G, bG). In den Gruppen bE10d, bE12Wo, bF und bG wurden die Empfängertiere 4 Wochen vor der Defektsetzung bestrahlt, die Gruppen E10d, E12Wo, F und G dienten als unbestrahlte Kontrollen. Die Explantation der Konstrukte (Kammer und Femur) erfolgte 10 Tage (E10d, bE10d) oder 12 Wochen nach Defektsetzung (E12Wo, bE12Wo, F, bF, G, bG). Die Auswertung bestand neben der klinisch-makroskopischen Evaluation aus Röntgenaufnahmen, Histologie,  $\mu$ CT und quantitativer PCR.

In den Gruppen E10d, bE10d, E12Wo und bE12Wo war eine deutliche Knochenbildung sichtbar. In den bestrahlten Defekten der Gruppe bE12Wo war die Knochenfläche signifikant niedriger als in Gruppe E12Wo. In zwei Konstrukten der Gruppe E12Wo kam es zu einer knöchernen Überbrückung zwischen Konstrukt und Femur. In den Gruppen F und bF konnte weder eine Knochenbildung im Konstrukt noch eine knöcherne Überbrückung festgestellt werden. In den unbestrahlten Leerdefekten der Gruppe G zeigte sich ein Einwachsen der Femurstümpfe in den Defekt, jedoch keine Überbrückung desselben. In Gruppe bG kam es nur in zwei Defekten zu einem geringen Auswachsen der Femurstümpfe. Das Zellüberleben der implantierten MSCs war signifikant niedriger in Konstrukten der Gruppe bE10d, verglichen mit der Gruppe E10d, ebenso wie die Gefäßanzahl. In der quantitativen PCR zeigte sich im Vergleich zu gesundem Knochen eine signifikant verminderte Expression von Osteocalcin und ALP sowie eine gesteigerte Expression von Osteopontin und  $Hif1\alpha$ .

Sowohl die kritische Größe des Femurdefekts als auch die effiziente Hemmung der Knochenbildung wurden anhand der Leerdefekte nachgewiesen. Durch Kombination aus Hartmatrix, rhBMP-2 und MSCs konnte eine gute Knochenbildung erzielt werden; die Bestrahlung führte hier zu einer signifikanten Verminderung der Knochenbildung in der Langzeitgruppe im Vergleich zur unbestrahlten Gruppe. Die Verwendung von silikatsubstituiertem Hydroxyapatit alleine hingegen führte zu keiner Förderung der Heilung. Die geringe Expression der Osteoblastenmarker ALP und Osteocalcin deuten auf eine geringe Osteoblastenaktivität hin, die in zukünftigen Projekten verbessert werden sollte. Die verminderte initiale Vaskularisation durch die Bestrahlung führte zu einem verminderten Überleben der implantierten MSCs sowie zu einer langfristig gesteigerten Expression des Hypoxiemarkers  $Hif1\alpha$  und sollte einen zentralen Punkt zukünftiger Studien darstellen.

## 8 Summary

Aim of the present study was the establishment of an efficient and reproducible model for irradiation of rat femora as a model for impaired osteogenesis and angiogenesis (part I). This protocol should then be used to evaluate bone healing using a tissue engineered bone substitute in a critical sized femoral defect after irradiation (part II).

Four different irradiation protocols were compared in part I of the study: single irradiation of the left femur with 20 Gy and explantation after 4 weeks (group A); single irradiation with 20 Gy and explantation after 8 weeks (group B); three irradiation fractions with 10 Gy and explantation after 4 weeks (group C); three irradiation fractions with 10 Gy and explantation after 8 weeks. The contralateral, unirradiated femur served as control. Evaluation included histology, microcomputertomography ( $\mu$ CT) and quantitative PCR. Furthermore, gene expression in two cell types present in bone marrow (mesenchymal stem cells after osteogenic differentiation and endothelial progenitor cells) was assessed after in vitro irradiation.

Histology showed a pronounced increase of vacuoles in bone marrow after irradiation, especially after 4 weeks (group A and C), demonstrating bone marrow edema and fatty degeneration. Irradiation provoked a significant decrease of total cell numbers in cortical bone and a decrease in Hif1 $\alpha$  positive cells in bone marrow. The number of vessels counted in histological evaluation and the number of CD31 positive cells in bone marrow did not change after irradiation. The expression of several markers (osteocalcin, RUNX2, TGF $\beta$ 1, TNF $\alpha$ , VEGF-A, Hif1 $\alpha$ ) was decreased in group A after irradiation, whereas in group B a trend towards an increase in expression of Hif1 $\alpha$ , ALP, osteocalcin and osteopontin was noted. This might suggest a decreased metabolism after irradiation, followed by a reparative phase. A significant decrease in small-sized vessels could be seen in  $\mu$ CT evaluation. The protocol of group A was chosen for part II of the present study.

In part II, a custom made titanium cage was implanted subcutaneously in donor rats for prevascularization and preliminary osteogenesis. The cage contained a mixture of silicate substituted hydroxyapatite, recombinant human BMP-2, rat bone marrow derived mesenchymal stem cells after osteogenic differentiation and fibrin in groups E10d, bE10d, E12Wo and bE12Wo, or hydroxyapatite and fibrin alone in groups F and bF. After 6 weeks, cages were transferred into a critical sized femoral defect in syngenic recipient animals. Empty cages served as controls (groups G and bG). Recipient animals in groups bE10d, bE12Wo, bF and bG were irradiated 4 weeks prior to CSFD surgery according to the results

of part I of the present study. Constructs were explanted after 10 days (groups E10d and bE10d) or 12 weeks (groups E12Wo, bE12Wo, F, bF, G, bG). After clinical and macroscopical evaluation, radiographs were taken and histology,  $\mu$ CT and quantitative PCR were performed. Marked bone formation was evident in groups E10d, bE10d, E12Wo and bE12Wo. The relative bone area was significantly lower in group bE12Wo, compared to E12Wo. Bony bridging of the gap between femur and construct was achieved in two constructs of group E12Wo. Neither bone formation within the construct nor bony bridging of the gap occurred in groups F and bF. Ingrowth of bone into the defect occurred in group G, but failed to completely bridge the gap. In group bG, limited ingrowth was visible in only two defects. Cell survival of implanted bmMSCs and number of vessels were significantly lower in group bE10d, compared to group E10d. Immunohistochemistry showed multinucleated, ED1 positive cells, consistent with osteoclasts, adjacent to the hydroxyapatite granules. Quantitative PCR revealed a low expression of osteocalcin and ALP and an increased expression of osteopontin and Hif1 $\alpha$ , compared to healthy bone tissue.

Both the critical size of the defect model and impaired bone healing and angiogenesis due to irradiation were confirmed in empty defects. The combination of hydroxyapatite, rhBMP-2, and bmMSCs induced marked bone formation, however, impaired bone formation was evident after irradiation after 12 weeks. The use of hydroxyapatite alone did not support healing of the defect. The low expression of osteoblast markers osteocalcin and ALP show a limited activity of bone producing cells which should be addressed in future studies. The limited initial angiogenesis after irradiation led to decreased cell survival and an increase in long term Hif1 $\alpha$  expression; improvement of vascularization should therefore be a major target in future projects.

## 9 Literaturverzeichnis

Aggarwal, S., Pittenger, M.F., 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105 (4), 1815-1822.

Aghi, M., Chiocca, E.A., 2005. Contribution of bone marrow-derived cells to blood vessels in ischemic tissues and tumors. *Mol Ther* 12 (6), 994-1005.

Albrecht, M., Henke, J., Tacke, S., Markert, M., Guth, B., 2014a. Influence of repeated anaesthesia on physiological parameters in male Wistar rats: a telemetric study about isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl. *BMC Vet Res* 10, 310.

Albrecht, M., Henke, J., Tacke, S., Markert, M., Guth, B., 2014b. Effects of isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl on physiological variables continuously measured by telemetry in Wistar rats. *BMC Vet Res* 10, 198.

Alheid, H., 1995. Late sequelae in oncology. In: Dunst, J., Sauer, R. (Hrsg.): *Radiation Oncology*; Springer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 245-250.

Allan, D.S., Morgan, S.C., Birch, P.E., Yang, L., Halpenny, M.J., Gunanayagam, A., Li, Y., Eapen, L., 2009. Mobilization of circulating vascular progenitors in cancer patients receiving external beam radiation in response to tissue injury. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 75 (1), 220-224.

Alvarez, K., Nakajima, H., 2009. Metallic Scaffolds for Bone Regeneration. *Materials* 2 (3), 790-832.

Aravamudhan, A., Ramos, D.M., Nip, J., Subramanian, A., James, R., Harmon, M.D., Yu, X., Kumbar, S.G., 2013. Osteoinductive small molecules: growth factor alternatives for bone tissue engineering. *Curr Pharm Des* 19 (19), 3420-3428.

Ardeshiryajimi, A., Soleimani, M., Hosseinkhani, S., Parivar, K., Yaghmaei, P., 2014. A comparative study of osteogenic differentiation human induced pluripotent stem cells and adipose tissue derived mesenchymal stem cells. *Cell J* 16 (3), 235-244.

Arinzech, T.L., Peter, S.J., Archambault, M.P., van den Bos, C., Gordon, S., Kraus, K., Smith, A., Kadiyala, S., 2003. Allogeneic Mesenchymal Stem Cells Regenerate Bone in a Critical-Sized Canine Segmental Defect. *J Bone Joint Surg Am* 85-A (10), 1927-1935.

Arkudas, A., Tjiawi, J., Bleiziffer, O., Grabinger, L., Polykandriotis, E., Beier, J.P., Sturzl, M., Horch, R.E., Kneser, U., 2007. Fibrin gel-immobilized VEGF and bFGF efficiently stimulate angiogenesis in the AV loop model. *Mol Med* 13 (9-10), 480-487.

Arkudas, A., Prymachuk, G., Hoereth, T., Beier, J.P., Polykandriotis, E., Bleiziffer, O., Horch, R.E., Kneser, U., 2009. Dose-finding study of fibrin gel-immobilized vascular endothelial growth factor 165 and basic fibroblast growth factor in the arteriovenous loop rat model. *Tissue Eng Part A* 15 (9), 2501-2511.

Arkudas, A., Beier, J.P., Prymachuk, G., Hoereth, T., Bleiziffer, O., Polykandriotis, E., Hess, A., Gulle, H., Horch, R.E., Kneser, U., 2010. Automatic quantitative micro-computed tomography evaluation of angiogenesis in an axially vascularized tissue-engineered bone construct. *Tissue Eng Part C Methods* 16 (6), 1503-1514.

Arkudas, A., Prymachuk, G., Beier, J.P., Weigel, L., Korner, C., Singer, R.F., Bleiziffer, O., Polykandriotis, E., Horch, R.E., Kneser, U., 2012. Combination of extrinsic and intrinsic pathways significantly accelerates axial vascularization of bioartificial tissues. *Plast Reconstr Surg* 129 (1), 55e-65e.

Arnett, T.R., Gibbons, D.C., Utting, J.C., Orriss, I.R., Hoebertz, A., Rosendaal, M., Meghji, S., 2003. Hypoxia is a major stimulator of osteoclast formation and bone resorption. *J Cell Physiol* 196 (1), 2-8.

- Arnold, M., Stas, P., Kummermehr, J., Schultz-Hector, S., Trott, K.R., 1998. Radiation-induced impairment of bone healing in the rat femur: effects of radiation dose, sequence and interval between surgery and irradiation. *Radiother Oncol* 48 (3), 259-265.
- Athanasίου, V.T., Papachristou, D.J., Panagopoulos, A., Saridis, A., Scopa, C.D., Megas, P., 2010. Histological comparison of autograft, allograft-DBM, xenograft, and synthetic grafts in a trabecular bone defect: an experimental study in rabbits. *Med Sci Monit* 16 (1), BR24-31.
- Auer, J.A.von Rechenberg, B.; Bohner, M., Hofmann-Antenbrink, M., 2012. Bone Grafts and Bone Replacements. In: Auer, J.A., Stick, J.A. (Hrsg.): *Equine Surgery*; 4. Auflage, Elsevier Saunders, St. Louis, MO, USA, 1081-1096.
- Bakker, A.D., Klein-Nulend, J., 2012. Osteoblast isolation from murine calvaria and long bones. *Methods Mol Biol* 816, 19-29.
- Baksh, D., Song, L., Tuan, R.S., 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med* 8 (3), 301-316.
- Balla, V.K., Bodhak, S., Bose, S., Bandyopadhyay, A., 2010. Porous tantalum structures for bone implants: fabrication, mechanical and in vitro biological properties. *Acta Biomater* 6 (8), 3349-3359.
- Balzer, A.F. 2013. Tissue engineering von axial vaskularisiertem bioartifiziellem Knochen im critical size Femurdefektmodell der Ratte. Dissertation, LMU München, Deutschland.
- Banda, M., Bommineni, A., Thomas, R.A., Luckinbill, L.S., Tucker, J.D., 2008. Evaluation and validation of housekeeping genes in response to ionizing radiation and chemical exposure for normalizing RNA expression in real-time PCR. *Mutat Res* 649 (1-2), 126-134.
- Beier, J.P., Horch, R.E., Hess, A., Arkudas, A., Heinrich, J., Loew, J., Gulle, H., Polykandriotis, E., Bleiziffer, O., Kneser, U., 2010. Axial vascularization of a large volume calcium phosphate ceramic bone substitute in the sheep AV loop model. *J Tissue Eng Regen Med* 4 (3), 216-223.
- Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., Robey, P.G., 2001. Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 19 (3), 180-192.
- Bigham, A.S., Dehghani, S.N., Shafiei, Z., Torabi Nezhad, S., 2008. Xenogenic demineralized bone matrix and fresh autogenous cortical bone effects on experimental bone healing: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. *J Orthop Traumatol* 9 (2), 73-80.
- Biller, D.S., Johnson, G.C., Birchard, S.J., Fingland, R.B., 1987. Aneurysmal bone cyst in a rib of a cat. *J Am Vet Med Assoc* 190 (9), 1193-1195.
- Blackwood, K.A., Bock, N., Dargaville, T.R., Ann Woodruff, M., 2012. Scaffolds for Growth Factor Delivery as Applied to Bone Tissue Engineering. *Int J Polymer Sci* 10, DOI 10.1155/2012/174942.
- Blery, P., Corre, P., Malard, O., Sourice, S., Pilet, P., Amouriq, Y., Guicheux, J., Weiss, P., Espitalier, F., 2014. Evaluation of new bone formation in irradiated areas using association of mesenchymal stem cells and total fresh bone marrow mixed with calcium phosphate scaffold. *J Mater Sci Mater Med* 25 (19), 2711-2720.
- Boomsma, R.A., Geenen, D.L., 2012. Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PLoS One* 7 (4), e35685.
- Bose, S., Roy, M., Das, K., Bandyopadhyay, A., 2009. Surface modification of titanium for load-bearing applications. *J Mater Sci Mater Med* 20 Suppl 1, S19-24.
- Bose, S., Roy, M., Bandyopadhyay, A., 2012. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol* 30 (10), 546-554.
- Brown, K.V., Li, B., Guda, T., Perrien, D.S., Guelcher, S.A., Wenke, J.C., 2011. Improving bone formation in a rat femur segmental defect by controlling bone morphogenetic protein-2 release. *Tissue Eng Part A* 17 (13-14), 1735-1746.

- Brown, J.M., 2014. Vasculogenesis: a crucial player in the resistance of solid tumours to radiotherapy. *Br J Radiol* 87 (1035), 20130686.
- Buehrer, G., Balzer, A., Arnold, I., Beier, J.P., Koerner, C., Bleiziffer, O., Brandl, A., Weis, C., Horch, R.E., Kneser, U., Arkudas, A., 2015. Combination of BMP2 and MSCs significantly increases bone formation in the rat arterio-venous loop model. *Tissue Eng Part A* 21 (1-2), 96-105.
- Burk, J., Ribitsch, I., Gittel, C., Juelke, H., Kasper, C., Staszky, C., Brehm, W., 2013. Growth and differentiation characteristics of equine mesenchymal stromal cells derived from different sources. *Vet J* 195 (1), 98-106.
- Buschmann, J., Siebert, T., Welti, M., Giovanoli, P., 2014. Angiogenic Properties of Primary Cells Intended at Bone Regeneration: A Comparison to Differentiated Cells Using the CAM Assay. *Current Angiogenesis* 3 (3), 144-151.
- Cao, X., Wu, X., Frassica, D., Yu, B., Pang, L., Xian, L., Wan, M., Lei, W., Armour, M., Tryggestad, E., Wong, J., Wen, C.Y., Lu, W.W., Frassica, F.J., 2011. Irradiation induces bone injury by damaging bone marrow microenvironment for stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 (4), 1609-1614.
- Carragee, E.J., Hurwitz, E.L., Weiner, B.K., 2011. A critical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 trials in spinal surgery: emerging safety concerns and lessons learned. *Spine J* 11 (6), 471-491.
- Carter, T.G., Brar, P.S., Tolas, A., Beirne, O.R., 2008. Off-label use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) for reconstruction of mandibular bone defects in humans. *J Oral Maxillofac Surg* 66 (7), 1417-1425.
- Carvalho, A.L., Faria, P.E., Grisi, M.F., Souza, S.L., Taba, M.J., Palioto, D.B., Novaes, A.B., Fraga, A.F., Ozyegin, L.S., Oktar, F.N., Salata, L.A., 2007. Effects of granule size on the osteoconductivity of bovine and synthetic hydroxyapatite: a histologic and histometric study in dogs. *J Oral Implantol* 33 (5), 267-276.
- Cavenagh, E.C., Weinberger, E., Shaw, D.W., White, K.S., Geyer, J.R., 1995. Hematopoietic marrow regeneration in pediatric patients undergoing spinal irradiation: MR depiction. *AJNR Am J Neuroradiol* 16 (3), 461-467.
- Chen, J.L., Hunt, P., McElvain, M., Black, T., Kaufman, S., Choi, E.S., 1997. Osteoblast precursor cells are found in CD34+ cells from human bone marrow. *Stem Cells* 15 (5), 368-377.
- Chen, M.F., Lin, C.T., Chen, W.C., Yang, C.T., Chen, C.C., Liao, S.K., Liu, J.M., Lu, C.H., Lee, K.D., 2006. The sensitivity of human mesenchymal stem cells to ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 66 (1), 244-253.
- Chen, L., Tredget, E.E., Wu, P.Y., Wu, Y., 2008. Paracrine factors of mesenchymal stem cells recruit macrophages and endothelial lineage cells and enhance wound healing. *PLoS One* 3 (4), e1886.
- Chen, M., Huang, Q., Xu, W., She, C., Xie, Z.G., Mao, Y.T., Dong, Q.R., Ling, M., 2014. Low-dose X-ray irradiation promotes osteoblast proliferation, differentiation and fracture healing. *PLoS One* 9 (8), e104016.
- Chrastil, J., Sampson, C., Jones, K.B., Higgins, T.F., 2013. Postoperative opioid administration inhibits bone healing in an animal model. *Clin Orthop Relat Res* 471 (12), 4076-4081.
- Coathup, M.J., Samizadeh, S., Fang, Y.S., Buckland, T., Hing, K.A., Blunn, G.W., 2011. The osteoinductivity of silicate-substituted calcium phosphate. *J Bone Joint Surg Am* 93 (23), 2219-2226.
- Cohen, M., Nishimura, I., Tamplen, M., Hokugo, A., Beumer, J., Steinberg, M.L., Suh, J.D., Abemayor, E., Nabili, V., 2011. Animal model of radiogenic bone damage to study mandibular osteoradionecrosis. *Am J Otolaryngol* 32 (4), 291-300.
- Cornell, C.N., Lane, J.M., 1998. Current understanding of osteoconduction in bone regeneration. *Clin Orthop Relat Res*, 355 Suppl, S267-273.

- Correia, S.I., Pereira, H., Silva-Correia, J., Van Dijk, C.N., Espregueira-Mendes, J., Oliveira, J.M., Reis, R.L., 2014. Current concepts: tissue engineering and regenerative medicine applications in the ankle joint. *J R Soc Interface* 11 (92), 20130784.
- Cruet-Hennequart, S., Drougard, C., Shaw, G., Legendre, F., Demoor, M., Barry, F., Lefaix, J.L., Galera, P., 2015. Radiation-induced alterations of osteogenic and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *PLoS One* 10 (3), e0119334.
- Dabrowski, B., Swieszkowski, W., Godlinski, D., Kurzydowski, K.J., 2010. Highly porous titanium scaffolds for orthopaedic applications. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 95 (1), 53-61.
- Daldrup-Link, H.E., Link, T.M., Rummeny, E.J., August, C., Konemann, S., Jurgens, H., Heindel, W., 2000. Assessing permeability alterations of the blood-bone marrow barrier due to total body irradiation: in vivo quantification with contrast enhanced magnetic resonance imaging. *Bone Marrow Transplant* 25 (1), 71-78.
- Daldrup-Link, H.E., Henning, T., Link, T.M., 2007. MR imaging of therapy-induced changes of bone marrow. *Eur Radiol* 17 (3), 743-761.
- Dare, A., Hachisu, R., Yamaguchi, A., Yokose, S., Yoshiki, S., Okano, T., 1997. Effects of ionizing radiation on proliferation and differentiation of osteoblast-like cells. *J Dent Res* 76 (2), 658-664.
- Day, R.M., 2005. Bioactive glass stimulates the secretion of angiogenic growth factors and angiogenesis in vitro. *Tissue Eng* 11 (5-6), 768-777.
- De Bari, C., Dell'Accio, F., Vanlauwe, J., Eyckmans, J., Khan, I.M., Archer, C.W., Jones, E.A., McGonagle, D., Mitsiadis, T.A., Pitzalis, C., Luyten, F.P., 2006. Mesenchymal multipotency of adult human periosteal cells demonstrated by single-cell lineage analysis. *Arthritis Rheum* 54 (4), 1209-1221.
- Declercq, H., Van den Vreken, N., De Maeyer, E., Verbeeck, R., Schacht, E., De Ridder, L., Cornelissen, M., 2004. Isolation, proliferation and differentiation of osteoblastic cells to study cell/biomaterial interactions: comparison of different isolation techniques and source. *Biomaterials* 25 (5), 757-768.
- Deschepper, M., Oudina, K., David, B., Myrtil, V., Collet, C., Bensidhoum, M., Logeart-Avramoglou, D., Petite, H., 2011. Survival and function of mesenchymal stem cells (MSCs) depend on glucose to overcome exposure to long-term, severe and continuous hypoxia. *J Cell Mol Med* 15 (7), 1505-1514.
- Desmons, S., Heger, M., Delfosse, C., Falgayrac, G., Sarrazin, T., Delattre, C., Catros, S., Mordon, S., Penel, G., 2009. A preliminary investigation into the effects of X-ray radiation on superficial cranial vascularization. *Calcif Tissue Int* 84 (5), 379-387.
- Detsch, R., Stoor, P., Grunewald, A., Roether, J.A., Lindfors, N.C., Boccaccini, A.R., 2014. Increase in VEGF secretion from human fibroblast cells by bioactive glass S53P4 to stimulate angiogenesis in bone. *J Biomed Mater Res A* 102 (11), 4055-4061.
- Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., Gianni, A.M., 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99 (10), 3838-3843.
- Diab, T., Pritchard, E.M., Uhrig, B.A., Boerckel, J.D., Kaplan, D.L., Guldberg, R.E., 2012. A silk hydrogel-based delivery system of bone morphogenetic protein for the treatment of large bone defects. *J Mech Behav Biomed Mater* 11, 123-131.
- Dicker, A.P., Williams, T.L., Grant, D.S., 2001. Targeting angiogenic processes by combination rofecoxib and ionizing radiation. *Am J Clin Oncol* 24 (5), 438-442.
- Dimar, J.R., Glassman, S.D., Burkus, K.J., Carreon, L.Y., 2006. Clinical outcomes and fusion success at 2 years of single-level instrumented posterolateral fusions with recombinant human bone morphogenetic protein-2/compression resistant matrix versus iliac crest bone graft. *Spine* 31 (22), 2534-2540.
- Dimitriou, R., Tsiridis, E., Giannoudis, P.V., 2005. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36 (12), 1392-1404.

- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., Horwitz, E.M., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8 (4), 315-317.
- Dorman, L.J., Tucci, M., Benghuzzi, H., 2012. In vitro effects of BMP-2, BMP-7, and BMP-13 on proliferation and differentiation of mouse mesenchymal stem cells. *Biomed Sci Instrum* 48, 81-87.
- Drukker, M., Katz, G., Urbach, A., Schuldiner, M., Markel, G., Itskovitz-Eldor, J., Reubinoff, B., Mandelboim, O., Benvenisty, N., 2002. Characterization of the expression of MHC proteins in human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sciences USA* 99 (15), 9864-9869.
- Dudziak, M.E., Saadeh, P.B., Mehrara, B.J., Steinbrech, D.S., Greenwald, J.A., Gittes, G.K., Longaker, M.T., 2000. The effects of ionizing radiation on osteoblast-like cells in vitro. *Plast Reconstr Surg* 106 (5), 1049-1061.
- Ergun, H., Howland, W.J., 1980. Postradiation atrophy of mature bone. *CRC Crit Rev Diagn Imaging* 12 (3), 225-243.
- Espitalier, F., Vinatier, C., Lerouxel, E., Guicheux, J., Pilet, P., Moreau, F., Daculsi, G., Weiss, P., Malard, O., 2009. A comparison between bone reconstruction following the use of mesenchymal stem cells and total bone marrow in association with calcium phosphate scaffold in irradiated bone. *Biomaterials* 30 (5), 763-769.
- Fajardo, L.F., Berthrong, M.; Anderson, R.E., 2001. Basic radiation, physics, chemistry, and biology. In: Fajardo, L.F., Berthrong, M.; Anderson, R.E. (Hrsg.): *Radiation Pathology*. Oxford University Press, New York, USA, 3-17.
- Farberg, A.S., Jing, X.L., Monson, L.A., Donneys, A., Tchanque-Fossuo, C.N., Deshpande, S.S., Buchman, S.R., 2012. Deferoxamine reverses radiation induced hypovascularity during bone regeneration and repair in the murine mandible. *Bone* 50 (5), 1184-1187.
- Fenner, M., Park, J., Schulz, N., Amann, K., Grabenbauer, G.G., Fahrig, A., Karg, J., Wiltfang, J., Neukam, F.W., Nkenke, E., 2010. Validation of histologic changes induced by external irradiation in mandibular bone. An experimental animal model. *J Craniomaxillofac Surg* 38 (1), 47-53.
- Finkemeier, C.G., 2002. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *J Bone Joint Surg Am* 84-A (3), 454-464.
- Fonkalsrud, E.W., Sanchez, M., Zerubavel, R., Mahoney, A., 1977. Serial changes in arterial structure following radiation therapy. *Surg Gynecol Obstet* 145 (3), 395-400.
- Fossum, T.W., Schulz, K.S., 2013. Regenerative Medicine and Stem Cell Therapy. In: Fossum, T.W. (Hrsg.): *Small Animal Surgery*, 4. Auflage, Elsevier Mosby, St. Louis, MO, USA, 167-175.
- Fowlie, J.G., Stick, J.A., Nickels, F.A., 2012. Stifle. In: Auer, J.A., Stick, J.A. (Hrsg.): *Equine Surgery*; 4. Auflage, Elsevier Saunders, St. Louis, MO, USA, 1419-1442.
- Franceschi, R.T., 1999. The developmental control of osteoblast-specific gene expression: role of specific transcription factors and the extracellular matrix environment. *Crit Rev Oral Biol Med* 10 (1), 40-57.
- Friedlaender, G.E., Strong, D.M., Sell, K.W., 1976. Studies on the antigenicity of bone. I. Freeze-dried and deep-frozen bone allografts in rabbits. *J Bone Joint Surg Am* 58 (6), 854-858.
- Gal, T.J., Munoz-Antonia, T., Muro-Cacho, C.A., Klotch, D.W., 2000. Radiation effects on osteoblasts in vitro: a potential role in osteoradionecrosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 126 (9), 1124-1128.
- Gerhardt, L.-C., Boccaccini, A.R., 2010. Bioactive Glass and Glass-Ceramic Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Materials* 3 (7), 3867-3910.
- Gossl, M., Modder, U.I., Atkinson, E.J., Lerman, A., Khosla, S., 2008. Osteocalcin expression by circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 52 (16), 1314-1325.

- Greenwood, H.L., Thorsteinsdottir, H.; Perry, G., Renihan, J., Singer, P.A., Daar, A.S., 2006. Regenerative medicine: new opportunities for developing countries. *Int. J. Biotechnology* 8 (1-2), 60-77.
- Grinnemo, K.H., Kumagai-Braesch, M., Mansson-Broberg, A., Skottman, H., Hao, X., Siddiqui, A., Andersson, A., Stromberg, A.M., Lahesmaa, R., Hovatta, O., Sylven, C., Corbascio, M., Dellgren, G., 2006. Human embryonic stem cells are immunogenic in allogeneic and xenogeneic settings. *Reprod Biomed Online* 13 (5), 712-724.
- Gross, C.E., Huh, J., Green, C., Shah, S., DeOrio, J.K., Easley, M., Nunley, J.A. 2nd, 2015. Outcomes of Bone Grafting of Bone Cysts After Total Ankle Arthroplasty. *Foot Ankle Int*, DOI 10.1177/1071100715609055.
- Grover, V., Kapoor, A., Malhotra, R., Sachdeva, S., 2011. Bone allografts: a review of safety and efficacy. *Indian J Dent Res* 22 (3), 496.
- Guest, D.J., Smith, M.R., Allen, W.R., 2008. Monitoring the fate of autologous and allogeneic mesenchymal progenitor cells injected into the superficial digital flexor tendon of horses: preliminary study. *Equine Vet J* 40 (2), 178-181.
- Habibovic, P., Kruyt, M.C., Juhl, M.V., Clyens, S., Martinetti, R., Dolcini, L., Theilgaard, N., van Blitterswijk, C.A., 2008. Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes. *J Orthop Res* 26 (10), 1363-1370.
- Hall, E.J., Giaccia, A.J., 2006. *Radiobiology for Radiologists*, 6. Auflage, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA.
- Harting, M.T., Jimenez, F., Pati, S., Baumgartner, J., Cox, C.S., Jr., 2008. Immunophenotype characterization of rat mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 10 (3), 243-253.
- Hatzenbuehler, J., Pulling, T.J., 2011. Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am Fam Physician* 84 (9), 1027-1033.
- Hayashi, O., Katsube, Y., Hirose, M., Ohgushi, H., Ito, H., 2008. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif Tissue Int* 82 (3), 238-247.
- Hing, K.A., Revell, P.A., Smith, N., Buckland, T., 2006. Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicate-substituted porous hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials* 27 (29), 5014-5026.
- Hing, K.A., Wilson, L.F., Buckland, T., 2007. Comparative performance of three ceramic bone graft substitutes. *Spine J* 7 (4), 475-490.
- Horch, R.E., Kneser, U., Polykandriotis, E., Schmidt, V.J., Sun, J., Arkudas, A., 2012. Tissue engineering and regenerative medicine - where do we stand? *J Cell Mol Med* 16 (6), 1157-1165.
- Horch, R.E., Beier, J.P., Kneser, U., Arkudas, A., 2014. Successful human long-term application of in situ bone tissue engineering. *J Cell Mol Med* 18 (7), 1478-1485.
- Hosoya, K., Poulson, J.M., Azuma, C., 2008. Osteoradionecrosis and radiation induced bone tumors following orthovoltage radiation therapy in dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 49 (2), 189-195.
- Howland, W.J., Loeffler, R.K., Starchman, D.E., Johnson, R.G., 1975. Postirradiation atrophic changes of bone and related complications. *Radiology* 117 (3), 677-685.
- Hsiao, P.N., Chang, M.C., Cheng, W.F., Chen, C.A., Lin, H.W., Hsieh, C.Y., Sun, W.Z., 2009. Morphine induces apoptosis of human endothelial cells through nitric oxide and reactive oxygen species pathways. *Toxicology* 256 (1-2), 83-91.
- Hu, G.F., 1998. Copper stimulates proliferation of human endothelial cells under culture. *J Cell Biochem* 69 (3), 326-335.
- Hu, W.W., Ward, B.B., Wang, Z., Krebsbach, P.H., 2010. Bone Regeneration in Defects Compromised by Radiotherapy. *J Dent Res* 89 (1), 77-81.

- Huang, W., Yang, Y., Sun, Z., Zeng, X., 2009. Early radiation-induced bone marrow injury: serial MR imaging during initial 4 weeks after irradiation. *Acad Radiol* 16 (6), 733-738.
- Huddleston, P.M., Steckelberg, J.M., Hanssen, A.D., Rouse, M.S., Bolander, M.E., Patel, R., 2000. Ciprofloxacin inhibition of experimental fracture healing. *J Bone Joint Surg Am* 82 (2), 161-173.
- Hwang, C.J., Vaccaro, A.R., Lawrence, J.P., Hong, J., Schellekens, H., Alaoui-Ismaili, M.H., Falb, D., 2009. Immunogenicity of bone morphogenetic proteins. *J Neurosurg Spine* 10 (5), 443-451.
- Hwang, J.W., Park, J.S., Lee, J.S., Jung, U.W., Kim, C.S., Cho, K.S., Lee, Y.K., Choi, S.H., 2012. Comparative evaluation of three calcium phosphate synthetic block bone graft materials for bone regeneration in rabbit calvaria. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 100 (8), 2044-2052.
- Imaizumi, N., Monnier, Y., Hegi, M., Mirimanoff, R.O., Rugg, C., 2010. Radiotherapy suppresses angiogenesis in mice through TGF-betaRI/ALK5-dependent inhibition of endothelial cell sprouting. *PLoS One* 5 (6), e11084.
- Jacobsson, M., Nannmark, U., Turesson, I., 1987. Acute microvascular reactions to ionizing irradiation in bone-anchored titanium implants: a vital microscopic study. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2 (4), 193-196.
- Jäger, M., Sager, M., Lensing-Höhn, S., Krauspe, R., 2005. The critical size bony defect in a small animal for bone healing studies (II): implant evolution and surgical technique on a rat's femur. *Biomed Tech (Berl)* 50 (5), 137-142.
- Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M., 2002. Die angeborene Immunität. In: Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. (Hrsg.): *Immunologie*, 5. Auflage. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Deutschland, 37-96.
- Janker, R., Rossmann, K., 1958. *Grundriss der Röntgentherapie*. Springer Verlag, Heidelberg, Deutschland.
- Jing, X.L., Farberg, A.S., Monson, L.A., Donneys, A., Tchanque-Fossuo, C.N., Buchman, S.R., 2012. Radiomorphometric quantitative analysis of vasculature utilizing micro-computed tomography and vessel perfusion in the murine mandible. *Cranio-maxillofac Trauma Reconstr* 5 (4), 223-230.
- Johnson, A.L., 2013. Fundamentals of orthopedic surgery and fracture management. In: Fossum, T.W. (Hrsg.): *Small Animal Surgery*, 4. Auflage, Elsevier Mosby, St. Louis, MO, USA, 1033-1105.
- Jones, M.K., Wang, H., Peskar, B.M., Levin, E., Itani, R.M., Sarfeh, I.J., Tarnawski, A.S., 1999. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med* 5 (12), 1418-1423.
- Jung, M.R., Shim, I.K., Chung, H.J., Lee, H.R., Park, Y.J., Lee, M.C., Yang, Y.I., Do, S.H., Lee, S.J., 2012. Local BMP-7 release from a PLGA scaffolding-matrix for the repair of osteochondral defects in rabbits. *Journal of Controlled Release* 162 (3), 485-491.
- Kagiwada, H., Yashiki, T., Ohshima, A., Tadokoro, M., Nagaya, N., Ohgushi, H., 2008. Human mesenchymal stem cells as a stable source of VEGF-producing cells. *J Tissue Eng Regen Med* 2 (4), 184-189.
- Kaigler, D., Wang, Z., Horger, K., Mooney, D.J., Krebsbach, P.H., 2006. VEGF scaffolds enhance angiogenesis and bone regeneration in irradiated osseous defects. *J Bone Miner Res* 21 (5), 735-744.
- Kasten, P., Beverungen, M., Lorenz, H., Wieland, J., Fehr, M., Geiger, F., 2012. Comparison of platelet-rich plasma and VEGF-transfected mesenchymal stem cells on vascularization and bone formation in a critical-size bone defect. *Cells Tissues Organs* 196 (6), 523-533.
- Keating, J.F., Simpson, A.H., Robinson, C.M., 2005. The management of fractures with bone loss. *J Bone Joint Surg Br* 87 (2), 142-150.
- Khan, S.N., Lane, J.M., 2004. The use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) in orthopaedic applications. *Expert Opin Biol Ther* 4 (5), 741-748.

- Kim, S.-S., Sun Park, M., Jeon, O., Yong Choi, C., Kim, B.-S., 2006. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 27 (8), 1399-1409.
- Kim, H., Cho, H.J., Kim, S.W., Liu, B., Choi, Y.J., Lee, J., Sohn, Y.D., Lee, M.Y., Houge, M.A., Yoon, Y.S., 2010. CD31+ cells represent highly angiogenic and vasculogenic cells in bone marrow: novel role of nonendothelial CD31+ cells in neovascularization and their therapeutic effects on ischemic vascular disease. *Circ Res* 107 (5), 602-614.
- Kim, Y.B., Kim, G.H., 2015. PCL/alginate composite scaffolds for hard tissue engineering: fabrication, characterization, and cellular activities. *ACS Comb Sci* 17 (2), 87-99.
- Kneser, U., Schaefer, D.J., Polykandriotis, E., Horch, R.E., 2006. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med* 10 (1), 7-19.
- Ko, E., Cho, S.-W., 2013. Biomimetic Polymer Scaffolds to Promote Stem Cell-Mediated Osteogenesis. *Int J of Stem Cells* 6 (2), 87-91.
- Kobayashi, M., Takiguchi, T., Suzuki, R., Yamaguchi, A., Deguchi, K., Shionome, M., Miyazawa, Y., Nishihara, T., Nagumo, M., Hasegawa, K., 1999. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic differentiation in cells isolated from human periodontal ligament. *J Dent Res* 78 (10), 1624-1633.
- Kofidis, T., deBruin, J.L., Tanaka, M., Zwierzchoniewska, M., Weissman, I., Fedoseyeva, E., Haverich, A., Robbins, R.C., 2005. They are not stealthy in the heart: embryonic stem cells trigger cell infiltration, humoral and T-lymphocyte-based host immune response. *Eur J Cardiothorac Surg* 28 (3), 461-466.
- Kolambkar, Y.M., Boerckel, J.D., Dupont, K.M., Bajin, M., Huebsch, N., Mooney, D.J., Hutmacher, D.W., Goldberg, R.E., 2011. Spatiotemporal delivery of bone morphogenetic protein enhances functional repair of segmental bone defects. *Bone* 49 (3), 485-492.
- Kraus, B.M., Richardson, D.W., Nunamaker, D.M., Ross, M.W., 2004. Management of comminuted fractures of the proximal phalanx in horses: 64 cases (1983-2001). *J Am Vet Med Assoc* 224 (2), 254-263.
- Kübler, N.R., Reuther, J.F., Faller, G., Kirchner, T., Ruppert, R., Sebald, W., 1998. Inductive properties of recombinant human BMP-2 produced in a bacterial expression system. *Int J Oral Maxillofac Surg* 27 (4), 305-309.
- Lam, J., Takeshita, S., Barker, J.E., Kanagawa, O., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L., 2000. TNF-alpha induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest* 106 (12), 1481-1488.
- Laurencin, C.T., El-Amin, S.F., 2008. Xenotransplantation in orthopaedic surgery. *J Am Acad Orthop Surg* 16 (1), 4-8.
- Lee, S.H., Shin, H., 2007. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* 59 (4-5), 339-359.
- Lee, J.T.Y., Wang, K., Tsang, W.H., Chow, K.L., 2011. Comparative In Vitro Osteoinductivity Study of CaP Ceramics (HA, a-TCP, b-TCP) using 10T1/2 Cells with Different Controls and Possible Correlations with Other Systems. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology* 2, 163-172.
- Lee, M.O., Song, S.H., Jung, S., Hur, S., Asahara, T., Kim, H., Kwon, S.M., Cha, H.J., 2012. Effect of ionizing radiation induced damage of endothelial progenitor cells in vascular regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32 (2), 343-352.
- Lehner, B., Bauer, J., Rodel, F., Grabenbauer, G., Neukam, F.W., Schultze-Mosgau, S., 2004. Radiation-induced impairment of osseous healing with vascularized bone transfer: experimental model using a pedicled tibia flap in rat. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33 (5), 486-492.
- Lerouxel, E., Weiss, P., Giumelli, B., Moreau, A., Pilet, P., Guicheux, J., Corre, P., Bouler, J.M., Daculsi, G., Malard, O., 2006. Injectable calcium phosphate scaffold and bone marrow graft for bone reconstruction in irradiated areas: an experimental study in rats. *Biomaterials* 27 (26), 4566-4572.

- Lerouxel, E., Moreau, A., Bouler, J.M., Giunelli, B., Daculsi, G., Weiss, P., Malard, O., 2009. Effects of high doses of ionising radiation on bone in rats: a new model for evaluation of bone engineering. *Br J Oral Maxillofac Surg* 47 (8), 602-607.
- Leu, A., Leach, J.K., 2008. Proangiogenic potential of a collagen/bioactive glass substrate. *Pharm Res* 25 (5), 1222-1229.
- Levesque, J.P., Winkler, I.G., Hendy, J., Williams, B., Helwani, F., Barbier, V., Nowlan, B., Nilsson, S.K., 2007. Hematopoietic progenitor cell mobilization results in hypoxia with increased hypoxia-inducible transcription factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor A in bone marrow. *Stem Cells* 25 (8), 1954-1965.
- Lewis, D.L., Hagstrom, J.E., Loomis, A.G., Wolff, J.A., Herweijer, H., 2002. Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 32 (1), 107-108.
- Li, L., Baroja, M.L., Majumdar, A., Chadwick, K., Rouleau, A., Gallacher, L., Ferber, I., Lebkowski, J., Martin, T., Madrenas, J., Bhatia, M., 2004a. Human embryonic stem cells possess immune-privileged properties. *Stem Cells* 22 (4), 448-456.
- Li, W., Wang, G., Cui, J., Xue, L., Cai, L., 2004b. Low-dose radiation (LDR) induces hematopoietic hormesis: LDR-induced mobilization of hematopoietic progenitor cells into peripheral blood circulation. *Exp Hematol* 32 (11), 1088-1096.
- Li, J.-Y., Christophersen, N.S., Hall, V., Soulet, D., Brundin, P., 2008. Critical issues of clinical human embryonic stem cell therapy for brain repair. *Trends in Neurosciences* 31 (3), 146-153.
- Li, Q., Wang, Z., 2013. Influence of mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells in co-culture on osteogenesis and angiogenesis: an in vitro study. *Arch Med Res* 44 (7), 504-513.
- Li, X.F., Zhu, G.Y., Wang, J.P., Wang, Y., 2015. Inhibitory effects of autologous gamma-irradiated cell conditioned medium on osteoblasts in vitro. *Mol Med Rep* 12 (1), 273-280.
- Lian, J.B., Gundberg, C.M., 1988. Osteocalcin. Biochemical considerations and clinical applications. *Clin Orthop Relat Res* (226), 267-291.
- Lin, L., Chow, K.L., Leng, Y., 2009. Study of hydroxyapatite osteoinductivity with an osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 89A (2), 326-335.
- Lindsey, R.W., Gugala, Z., Milne, E., Sun, M., Gannon, F.H., Latta, L.L., 2006. The efficacy of cylindrical titanium mesh cage for the reconstruction of a critical-size canine segmental femoral diaphyseal defect. *J Orthop Res* 24 (7), 1438-1453.
- Little, J.B., 1993. Cellular, molecular, and carcinogenic effects of radiation. *Hematol Oncol Clin North Am* 7 (2), 337-352.
- Liu, X., Rahaman, M.N., Liu, Y., Bal, B.S., Bonewald, L.F., 2013. Enhanced bone regeneration in rat calvarial defects implanted with surface-modified and BMP-loaded bioactive glass (13-93) scaffolds. *Acta Biomater* 9 (7), 7506-7517.
- Lomax, M.E., Folkes, L.K., O'Neill, P., 2013. Biological consequences of radiation-induced DNA damage: relevance to radiotherapy. *Clin Oncol (R Coll Radiol)* 25 (10), 578-585.
- Lopez, M.J.M., M.D., 2012. Bone biology and fracture healing. In: Auer, J.A., Stick, J.A. (Hrsg.): *Equine Surgery*; 4. Auflage, Elsevier Saunders, St. Louis, MO, USA, 1025-1040.
- Luchnik, A.N., Hisamutdinov, T.A., Georgiev, G.P., 1988. Inhibition of transcription in eukaryotic cells by X-irradiation: relation to the loss of topological constraint in closed DNA loops. *Nucleic Acids Res* 16 (11), 5175-5190.

- Ly, J., Xiu, P., Tan, J., Jia, Z., Cai, H., Liu, Z., 2015. Enhanced angiogenesis and osteogenesis in critical bone defects by the controlled release of BMP-2 and VEGF: implantation of electron beam melting-fabricated porous Ti6Al4V scaffolds incorporating growth factor-doped fibrin glue. *Biomed Mater* 10 (3), 035013.
- Maeda, M., Bryant, M.H., Yamagata, M., Li, G., Earle, J.D., Chao, E.Y., 1988. Effects of irradiation on cortical bone and their time-related changes. A biomechanical and histomorphological study. *J Bone Joint Surg Am* 70 (3), 392-399.
- Margulies, B., Morgan, H., Allen, M., Strauss, J., Spadaro, J., Damron, T., 2003. Transiently increased bone density after irradiation and the radioprotectant drug amifostine in a rat model. *Am J Clin Oncol* 26 (4), e106-114.
- Marion, R.M., Strati, K., Li, H., Tejera, A., Schoeftner, S., Ortega, S., Serrano, M., Blasco, M.A., 2009. Telomeres acquire embryonic stem cell characteristics in induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 4 (2), 141-154.
- Marolt, D., Knezevic, M., Novakovic, G.V., 2010. Bone tissue engineering with human stem cells. *Stem Cell Res Ther* 1 (2), 10.
- Martino, M.M., Briquez, P.S., Ranga, A., Lutolf, M.P., Hubbell, J.A., 2013. Heparin-binding domain of fibrin(ogen) binds growth factors and promotes tissue repair when incorporated within a synthetic matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 110 (12), 4563-4568.
- Marx, R.E., Johnson, R.P., 1987. Studies in the radiobiology of osteoradionecrosis and their clinical significance. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 64 (4), 379-390.
- Marx, R.E., Carlson, E.R., 1993. Tissue banking safety: caveats and precautions for the oral and maxillofacial surgeon. *J Oral Maxillofac Surg* 51 (12), 1372-1379.
- McClure, S.R., Watkins, J.P., Glickman, N.W., Hawkins, J.F., Glickman, L.T., 1998. Complete fractures of the third metacarpal or metatarsal bone in horses: 25 cases (1980-1996). *J Am Vet Med Assoc* 213 (6), 847-850.
- McIllwraith, W., 2010. Management of subchondral cystic lesions of medial femoral condyle - an evolution based on research and clinical evidence. *Pferdeheilkunde* 26 (4), 591-597.
- McKeon, G.P., Pacharinsak, C., Long, C.T., Howard, A.M., Jampachaisri, K., Yeomans, D.C., Felt, S.A., 2011. Analgesic effects of tramadol, tramadol-gabapentin, and buprenorphine in an incisional model of pain in rats (*Rattus norvegicus*). *J Am Assoc Lab Anim Sci* 50 (2), 192-197.
- Midgley, C.A., Owens, B., Briscoe, C.V., Thomas, D.B., Lane, D.P., Hall, P.A., 1995. Coupling between gamma irradiation, p53 induction and the apoptotic response depends upon cell type in vivo. *J Cell Sci* 108, 1843-1848.
- Misdorp, W., Van der Heul, R.O., 1976. Tumours of bones and joints. *Bull World Health Organ* 53 (2-3), 265-282.
- Miyahara, Y., Nagaya, N., Kataoka, M., Yanagawa, B., Tanaka, K., Hao, H., Ishino, K., Ishida, H., Shimizu, T., Kangawa, K., Sano, S., Okano, T., Kitamura, S., Mori, H., 2006. Monolayered mesenchymal stem cells repair scarred myocardium after myocardial infarction. *Nat Med* 12 (4), 459-465.
- Moriceau, G., Ory, B., Gobin, B., Verrecchia, F., Gouin, F., Blanchard, F., Redini, F., Heymann, D., 2010. Therapeutic approach of primary bone tumours by bisphosphonates. *Curr Pharm Des* 16 (27), 2981-2987.
- Moucha, C.S., Renard, R.L.; Gandhi, A.; Lin, S.S.; Tuan, R.S., 2007. Bone Allograft Safety and Performance. In: Bronner, F.; Farach-Carson, M.C.; Mikos, A.G. (Hrsg.): *Engineering of Functional Skeletal Tissue*. Springer-Verlag, London, UK, 46-54.
- Nasef, A., Mathieu, N., Chapel, A., Frick, J., Francois, S., Mazurier, C., Boutarfa, A., Bouchet, S., Gorin, N.C., Thierry, D., Fouillard, L., 2007. Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation* 84 (2), 231-237.

- Newquist, J.M., Baxter, G.M., 2009. Evaluation of plasma fibrinogen concentration as an indicator of physeal or epiphyseal osteomyelitis in foals: 17 cases (2002-2007). *J Am Vet Med Assoc* 235 (4), 415-419.
- Newton, C.D., Nunamaker, D.M., 1985. *Textbook of Small Animal Orthopaedics*. Lippincott, Philadelphia, PA, USA.
- Ng, A.M., Saim, A.B., Tan, K.K., Tan, G.H., Mokhtar, S.A., Rose, I.M., Othman, F., Idrus, R.B., 2005. Comparison of bioengineered human bone construct from four sources of osteogenic cells. *J Orthop Sci* 10 (2), 192-199.
- Nussenbaum, B., Rutherford, R.B., Krebsbach, P.H., 2005. Bone regeneration in cranial defects previously treated with radiation. *Laryngoscope* 115 (7), 1170-1177.
- Nyaruba, M.M., Yamamoto, I., Kimura, H., Morita, R., 1998. Bone fragility induced by X-ray irradiation in relation to cortical bone-mineral content. *Acta Radiol* 39 (1), 43-46.
- O'Loughlin, P.F., Morr, S., Bogunovic, L., Kim, A.D., Park, B., Lane, J.M., 2008. Selection and development of preclinical models in fracture-healing research. *J Bone Joint Surg Am* 90 Suppl 1, 79-84.
- Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S., 2007. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 448 (7151), 313-317.
- Onodera, J., Kondo, E., Omizu, N., Ueda, D., Yagi, T., Yasuda, K., 2014. Beta-tricalcium phosphate shows superior absorption rate and osteoconductivity compared to hydroxyapatite in open-wedge high tibial osteotomy. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 22 (11), 2763-2770.
- Oryan, A.A., S.; Moshiri, A., 2013. Current concerns regarding healing of bone defects. *Hard Tissue*, 2 (2), 13-25.
- Pacheco, R., Stock, H., 2013. Effects of radiation on bone. *Curr Osteoporos Rep* 11 (4), 299-304.
- Park, K.-H., Kim, H., Moon, S., Na, K., 2009. Bone morphogenic protein-2 (BMP-2) loaded nanoparticles mixed with human mesenchymal stem cell in fibrin hydrogel for bone tissue engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 108 (6), 530-537.
- Patel, N., Best, S.M., Bonfield, W., Gibson, I.R., Hing, K.A., Damien, E., Revell, P.A., 2002. A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules. *J Mater Sci Mater Med* 13 (12), 1199-1206.
- Pedraza, C.E., Nikolcheva, L.G., Kaartinen, M.T., Barralet, J.E., McKee, M.D., 2008. Osteopontin functions as an opsonin and facilitates phagocytosis by macrophages of hydroxyapatite-coated microspheres: implications for bone wound healing. *Bone* 43 (4), 708-716.
- Peng, L., Jia, Z., Yin, X., Zhang, X., Liu, Y., Chen, P., Ma, K., Zhou, C., 2008. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev* 17 (4), 761-773.
- Ponnaiya, B., Amundson, S.A., Ghandhi, S.A., Smilenov, L.B., Geard, C.R., Buonanno, M., Brenner, D.J., 2013. Single-cell responses to ionizing radiation. *Radiat Environ Biophys* 52 (4), 523-530.
- Porter, A.E., Patel, N., Skepper, J.N., Best, S.M., Bonfield, W., 2004. Effect of sintered silicate-substituted hydroxyapatite on remodelling processes at the bone-implant interface. *Biomaterials* 25 (16), 3303-3314.
- Rabelo, G.D., Beletti, M.E., Dechichi, P., 2010. Histological analysis of the alterations on cortical bone channels network after radiotherapy: A rabbit study. *Microsc Res Tech* 73 (11), 1015-1018.
- Rashid, N., Harding, I.S., Buckland, T., Hing, K.A., 2008. Nano-scale manipulation of silicate-substituted apatite chemistry impacts surface charge, hydrophilicity, protein adsorption and cell attachment. *International Journal of Nano and Biomaterials* 1 (3), 299-319.

- Rath, S.N., Brandl, A., Hiller, D., Hoppe, A., Gbureck, U., Horch, R.E., Boccaccini, A.R., Kneser, U., 2014. Bioactive copper-doped glass scaffolds can stimulate endothelial cells in co-culture in combination with mesenchymal stem cells. *PLoS One* 9 (12), e113319.
- Ratko, T.A., Belinson, S.E., Samson, D.J., Bonnell, C., Ziegler, K.M., Aronson, N., 2010. Bone Morphogenetic Protein: The State of the Evidence of On-Label and Off-Label Use, Rockville, MD, USA: Agency for Healthcare Research and Quality, Technology Assessment.
- Razak, S.I.A., Sharif, N.F.A., Rahman, W.A.W.A., 2012. Biodegradable Polymers and their Bone Applications: A Review. *Int J of Basic & Appl Sci*, 31-49.
- Rechenberg, B.V., McIlwraith, C.W.; Auer, J.A., 1998. Cystic bone lesions in horses and humans: A comparative review. *Vet Comp Orthop Traumatol*, (1) 13-23.
- Ribatti, D., Vacca, A., Nico, B., Roncali, L., Dammacco, F., 2001. Postnatal vasculogenesis. *Mechanisms of Development* 100 (2), 157-163.
- Rojbani, H., Nyan, M., Ohya, K., Kasugai, S., 2011. Evaluation of the osteoconductivity of  $\alpha$ -tricalcium phosphate,  $\beta$ -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 98A (4), 488-498.
- Rosset, P., Deschaseaux, F., Layrolle, P., 2014. Cell therapy for bone repair. *Orthop Traumatol Surg Res* 100 (1 Suppl), S107-112.
- Rottensteiner, U., Sarker, B., Heusinger, D., Dafinova, D., Rath, S.N., Beier, J.P., Kneser, U., Horch, R.E., Detsch, R., Boccaccini, A.R., 2014. In vitro and in vivo biocompatibility of alginate dialdehyde/gelatin hydrogels with and without nanoscaled bioactive glass for bone tissue engineering applications. *Materials* 7 (3), 1957-1974.
- Rowell, J.L., McCarthy, D.O., Alvarez, C.E., 2011. Dog models of naturally occurring cancer. *Trends Mol Med* 17 (7), 380-388.
- Rubin, P., Casarett, G.W., 1968. *Clinical radiation pathology*. Band 2, Saunders, Philadelphia, PA, USA.
- Rubin, D.B., Griem, M.L., 1998. *The radiation biology of the vascular endothelium*. CRC Press LLC, Boca Raton, FL, USA, 13-38.
- Sabir, M., Xu, X., Li, L., 2009. A review on biodegradable polymeric materials for bone tissue engineering applications. *Journal of Materials Science* 44 (21), 5713-5724.
- Sakurai, T., Sawada, Y., Yoshimoto, M., Kawai, M., Miyakoshi, J., 2007. Radiation-induced reduction of osteoblast differentiation in C2C12 cells. *J Radiat Res* 48 (6), 515-521.
- Samee, M., Kasugai, S., Kondo, H., Ohya, K., Shimokawa, H., Kuroda, S., 2008. Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) transfection to human periosteal cells enhances osteoblast differentiation and bone formation. *J Pharmacol Sci* 108 (1), 18-31.
- Santos, M.I., Reis, R.L., 2010. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. *Macromol Biosci* 10 (1), 12-27.
- Schindeler, A., McDonald, M.M., Bokko, P., Little, D.G., 2008. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 19 (5), 459-466.
- Schmitz, J.P., Hollinger, J.O., 1986. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Relat Res* (205), 299-308.
- Schmitz, J.P., Hollinger, J.O., Milam, S.B., 1999. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. *J Oral Maxillofac Surg* 57 (9), 1122-1126.

- Schnabel, L.V., Pezzanite, L.M., Antczak, D.F., Felipe, M.J., Fortier, L.A., 2014. Equine bone marrow-derived mesenchymal stromal cells are heterogeneous in MHC class II expression and capable of inciting an immune response in vitro. *Stem Cell Res Ther* 5 (1), 13.
- Schnepper, E., 1968. Chirurgie und Strahlentherapie. In: Sunder-Plassmann, P., Kümmerle, F., Brüner, H., Dietrich, K.F., Menges, G., Schink, W., Hernández-Richter, H.J., Schnepper, E. (Hrsg.): *Lehrbuch der Chirurgie*. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, Deutschland, 515-570.
- Schultze-Mosgau, S., Lehner, B., Rodel, F., Wehrhan, F., Amann, K., Kopp, J., Thorwarth, M., Nkenke, E., Grabenbauer, G., 2005. Expression of bone morphogenic protein 2/4, transforming growth factor-beta1, and bone matrix protein expression in healing area between vascular tibia grafts and irradiated bone-experimental model of osteonecrosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 61 (4), 1189-1196.
- Schulz, K.S., 2013. Other Diseases of Bones and Joints. In: Fossum, T.W. (Hrsg.): *Small Animal Surgery*, 4. Auflage, Elsevier Mosby, St. Louis, MO, USA, 1391-1410.
- Schwartz, P.H., Brick, D.J., Nethercott, H.E., Stover, A.E., 2011. Traditional human embryonic stem cell culture. *Methods Mol Biol* 767, 107-123.
- Sfeir, C., Ho, L., Doll, B., Azari, K., Hollinger, J., 2005. Fracture Repair. In: Lieberman, J.R., Friedlaender, G.E. (Hrsg.): *Bone Regeneration and Repair*. Humana Press, New York, NY, USA, 21-44.
- Shafiee, A., Seyedjafari, E., Soleimani, M., Ahmadbeigi, N., Dinarvand, P., Ghaemi, N., 2011. A comparison between osteogenic differentiation of human unrestricted somatic stem cells and mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue. *Biotechnol Lett* 33 (6), 1257-1264.
- Sharungbam, G.D., Schwager, C., Chiblak, S., Brons, S., Hlatky, L., Haberer, T., Debus, J., Abdollahi, A., 2012. Identification of stable endogenous control genes for transcriptional profiling of photon, proton and carbon-ion irradiated cells. *Radiat Oncol* 7, 70.
- Shikazono, N., Noguchi, M., Fujii, K., Urushibara, A., Yokoya, A., 2009. The yield, processing, and biological consequences of clustered DNA damage induced by ionizing radiation. *J Radiat Res* 50 (1), 27-36.
- Shirota, T., Tavassoli, M., 1992. Alterations of bone marrow sinus endothelium induced by ionizing irradiation: implications in the homing of intravenously transplanted marrow cells. *Blood Cells* 18 (2), 197-214.
- Shu, R., McMullen, R., Baumann, M.J., McCabe, L.R., 2003. Hydroxyapatite accelerates differentiation and suppresses growth of MC3T3-E1 osteoblasts. *J Biomed Mater Res A* 67 (4), 1196-1204.
- Sminia, T., Dijkstra, C.D., 1986. The origin of osteoclasts: an immunohistochemical study on macrophages and osteoclasts in embryonic rat bone. *Calcif Tissue Int* 39 (4), 263-266.
- Sogal, A., Tofe, A.J., 1999. Risk assessment of bovine spongiform encephalopathy transmission through bone graft material derived from bovine bone used for dental applications. *J Periodontol* 70 (9), 1053-1063.
- Spencer, J.A., Ferraro, F., Roussakis, E., Klein, A., Wu, J., Runnels, J.M., Zaher, W., Mortensen, L.J., Alt, C., Turcotte, R., Yusuf, R., Cote, D., Vinogradov, S.A., Scadden, D.T., Lin, C.P., 2014. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature* 508 (7495), 269-273.
- Stevens, S.K., Moore, S.G., Kaplan, I.D., 1990. Early and late bone-marrow changes after irradiation: MR evaluation. *AJR Am J Roentgenol* 154 (4), 745-750.
- Stevens, M.M., 2008. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today* 11 (5), 18-25.
- Strobel, L.A., Rath, S.N., Maier, A.K., Beier, J.P., Arkudas, A., Greil, P., Horch, R.E., Kneser, U., 2014. Induction of bone formation in biphasic calcium phosphate scaffolds by bone morphogenetic protein-2 and primary osteoblasts. *J Tissue Eng Regen Med* 8 (3), 176-185.
- Sugimoto, M., Takahashi, S., Kotoura, Y., Shibamoto, Y., Takahashi, M., Abe, M., Ishizaki, K., Yamamuro, T., 1993. Osteocyte viability after high-dose irradiation in the rabbit. *Clin Orthop Relat Res* (297), 247-252.

- Szewczyk, M., Lechowski, R., Zabielska, K., 2015. What do we know about canine osteosarcoma treatment? Review. *Vet Res Commun* 39 (1), 61-67.
- Takahashi, S., Sugimoto, M., Kotoura, Y., Sasai, K., Oka, M., Yamamuro, T., 1994. Long-term changes in the haversian systems following high-dose irradiation. An ultrastructural and quantitative histomorphological study. *J Bone Joint Surg Am* 76 (5), 722-738.
- Takahashi, K., Yamanaka, S., 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126 (4), 663-676.
- Tamurian, R.M., Damron, T.A., Spadaro, J.A., 1999. Sparing radiation-induced damage to the physis by radioprotectant drugs: laboratory analysis in a rat model. *J Orthop Res* 17 (2), 286-292.
- Teysier, F., Bay, J.O., Dionet, C., Verrelle, P., 1999. Cell cycle regulation after exposure to ionizing radiation. *Bull Cancer* 86 (4), 345-357.
- Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., Jones, J.M., 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282 (5391), 1145-1147.
- Toupadakis, C.A., Wong, A., Genetos, D.C., Cheung, W.K., Borjesson, D.L., Ferraro, G.L., Galuppo, L.D., Leach, J.K., Owens, S.D., Yellowley, C.E., 2010. Comparison of the osteogenic potential of equine mesenchymal stem cells from bone marrow, adipose tissue, umbilical cord blood, and umbilical cord tissue. *Am J Vet Res* 71 (10), 1237-1245.
- Trnovec, T., Kállay, Z., Bezek, Š., 1990. Effects of ionizing radiation on the blood brain barrier permeability to pharmacologically active substances. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 19 (6), 1581-1587.
- Tsigkou, O., Jones, J.R., Polak, J.M., Stevens, M.M., 2009. Differentiation of fetal osteoblasts and formation of mineralized bone nodules by 45S5 Bioglass conditioned medium in the absence of osteogenic supplements. *Biomaterials* 30 (21), 3542-3550.
- Tuncay, I., Ozbek, H., Kosem, M., Unal, O., 2005. A comparison of effects of fluoroquinolones on fracture healing (an experimental study in rats). *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg* 11 (1), 17-22.
- Utting, J.C., Robins, S.P., Brandao-Burch, A., Orriss, I.R., Behar, J., Arnett, T.R., 2006. Hypoxia inhibits the growth, differentiation and bone-forming capacity of rat osteoblasts. *Exp Cell Res* 312 (10), 1693-1702.
- Valentini, V., Gennaro, P., Torroni, A., Longo, G., Aboh, I.V., Cassoni, A., Battisti, A., Anelli, A., 2009. Scapula free flap for complex maxillofacial reconstruction. *J Craniofac Surg* 20 (4), 1125-1131.
- Valimaki, V.V., Yrjans, J.J., Vuorio, E., Aro, H.T., 2005. Combined effect of BMP-2 gene transfer and bioactive glass microspheres on enhancement of new bone formation. *J Biomed Mater Res A* 75 (3), 501-509.
- Vögelin, E., Jones, N.F., Huang, J.I., Brekke, J.H., Lieberman, J.R., 2005. Healing of a critical-sized defect in the rat femur with use of a vascularized periosteal flap, a biodegradable matrix, and bone morphogenetic protein. *J Bone Joint Surg Am* 87 (6), 1323-1331.
- Volpin, G., Rees, J.A., Ali, S.Y., Bentley, G., 1986. Distribution of alkaline phosphatase activity in experimentally produced callus in rats. *J Bone Joint Surg Br* 68 (4), 629-634.
- Vuolteenaho, K., Moilanen, T., Moilanen, E., 2008. Non-steroidal anti-inflammatory drugs, cyclooxygenase-2 and the bone healing process. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102 (1), 10-14.
- Wahl, D.A., Czernuszka, J.T., 2006. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *Eur Cell Mater* 11, 43-56.
- Wang, C., Duan, Y., Markovic, B., Barbara, J., Howlett, C.R., Zhang, X., Zreiqat, H., 2004. Phenotypic expression of bone-related genes in osteoblasts grown on calcium phosphate ceramics with different phase compositions. *Biomaterials* 25 (13), 2507-2514.

- Wegman, F., Bijenhof, A., Schuijff, L., Oner, F.C., Dhert, W.J., Alblas, J., 2011. Osteogenic differentiation as a result of BMP-2 plasmid DNA based gene therapy in vitro and in vivo. *Eur Cell Mater* 21, 230-242.
- Weis, C., Covi, J.M., Hilgert, J.G., Leibig, N., Arkudas, A., Horch, R.E., Kneser, U., Schmidt, V.J., 2015. Automatic quantification of angiogenesis in 2D sections: a precise and timesaving approach. *Journal of Microscopy*, 259(3):185-96.
- Wenisch, S., Stahl, J.P., Horas, U., Heiss, C., Kilian, O., Trinkaus, K., Hild, A., Schnettler, R., 2003. In vivo mechanisms of hydroxyapatite ceramic degradation by osteoclasts: fine structural microscopy. *J Biomed Mater Res A* 67 (3), 713-718.
- Wiesmann, H.P., Nazer, N., Klatt, C., Szuwart, T., Meyer, U., 2003. Bone tissue engineering by primary osteoblast-like cells in a monolayer system and 3-dimensional collagen gel. *J Oral Maxillofac Surg* 61 (12), 1455-1462.
- Willey, J.S., Lloyd, S.A., Robbins, M.E., Bourland, J.D., Smith-Sielicki, H., Bowman, L.C., Norrdin, R.W., Bateman, T.A., 2008. Early increase in osteoclast number in mice after whole-body irradiation with 2 Gy X rays. *Radiat Res* 170 (3), 388-392.
- Williams, H.J., Davies, A.M., 2006. The effect of X-rays on bone: a pictorial review. *Eur Radiol* 16 (3), 619-633.
- Witte, F., Ulrich, H., Rudert, M., Willbold, E., 2007a. Biodegradable magnesium scaffolds: Part I: appropriate inflammatory response. *J Biomed Mater Res A* 81 (3), 748-756.
- Witte, F., Ulrich, H., Palm, C., Willbold, E., 2007b. Biodegradable magnesium scaffolds: Part II: peri-implant bone remodeling. *J Biomed Mater Res A* 81 (3), 757-765.
- Wu, C., Zhou, Y., Fan, W., Han, P., Chang, J., Yuen, J., Zhang, M., Xiao, Y., 2012. Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering. *Biomaterials* 33 (7), 2076-2085.
- Wu, C., Fan, W., Chang, J., Xiao, Y., 2013. Mesoporous bioactive glass scaffolds for efficient delivery of vascular endothelial growth factor. *J Biomater Appl* 28 (3), 367-374.
- Wurzler, K.K., DeWeese, T.L., Sebald, W., Reddi, A.H., 1998. Radiation-induced impairment of bone healing can be overcome by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Craniofac Surg* 9 (2), 131-137.
- Xie, X.T., Qiu, W.L., Yuan, W.H., Wang, Z.H., 1998. Experimental study of radiation effect on the mandibular microvasculature of the guinea pig. *Chin J Dent Res* 1 (2), 46-51.
- Xu, J., Zheng, Z., Fang, D., Gao, R., Liu, Y., Fan, Z.P., Zhang, C.M., Wang, S.L., 2012. Early-stage pathogenic sequence of jaw osteoradionecrosis in vivo. *J Dent Res* 91 (7), 702-708.
- Xynos, I.D., Hukkanen, M.V., Batten, J.J., Buttery, L.D., Hench, L.L., Polak, J.M., 2000. Bioglass 45S5 stimulates osteoblast turnover and enhances bone formation In vitro: implications and applications for bone tissue engineering. *Calcif Tissue Int* 67 (4), 321-329.
- Yamaguchi, A., Katagiri, T., Ikeda, T., Wozney, J.M., Rosen, V., Wang, E.A., Kahn, A.J., Suda, T., Yoshiki, S., 1991. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol* 113 (3), 681-687.
- Yamamoto, M., Hokugo, A., Takahashi, Y., Nakano, T., Hiraoka, M., Tabata, Y., 2015. Combination of BMP-2-releasing gelatin/beta-TCP sponges with autologous bone marrow for bone regeneration of X-ray-irradiated rabbit ulnar defects. *Biomaterials* 56, 18-25.
- Yamasaki, H., Sakai, H., 1992. Osteogenic response to porous hydroxyapatite ceramics under the skin of dogs. *Biomaterials* 13 (5), 308-312.
- Yamaura, H., Matsuzawa, T., 1980. Decrease in capillary growth during aging. *Experimental Gerontology* 15 (2), 145-150.

- Yang, H.S., La, W.G., Bhang, S.H., Jeon, J.Y., Lee, J.H., Kim, B.S., 2010. Heparin-conjugated fibrin as an injectable system for sustained delivery of bone morphogenetic protein-2. *Tissue Eng Part A* 16 (4), 1225-1233.
- Yang, J., Ii, M., Kamei, N., Alev, C., Kwon, S.M., Kawamoto, A., Akimaru, H., Masuda, H., Sawa, Y., Asahara, T., 2011. CD34+ cells represent highly functional endothelial progenitor cells in murine bone marrow. *PLoS One* 6 (5), e20219.
- Yang, B., Zhou, H.U.I., Zhang, X.-D., Liu, Z., Fan, F.-Y., Sun, Y.-M., 2012. Effect of radiation on the expression of osteoclast marker genes in RAW264.7 cells. *Mol Med Rep* 5 (4), 955-958.
- Yang, C., Unursaikhan, O., Lee, J.S., Jung, U.W., Kim, C.S., Choi, S.H., 2014. Osteoconductivity and biodegradation of synthetic bone substitutes with different tricalcium phosphate contents in rabbits. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 102 (1), 80-88.
- Yoo, D., Giulivi, A., 2000. Xenotransplantation and the potential risk of xenogeneic transmission of porcine viruses. *Can J Vet Res* 64 (4), 193-203.
- Yu, Y., Al-Mansoori, L., Opas, M., 2015. Optimized osteogenic differentiation protocol from R1 mouse embryonic stem cells in vitro. *Differentiation* 89 (1-2), 1-10.
- Yuan, H., Kurashina, K., de Bruijn, J.D., Li, Y., de Groot, K., Zhang, X., 1999. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 20 (19), 1799-1806.
- Zehetgruber, H., Bittner, B., Gruber, D., Krepler, P., Trieb, K., Kotz, R., Dominkus, M., 2005. Prevalence of aneurysmal and solitary bone cysts in young patients. *Clin Orthop Relat Res* 439, 136-143.
- Zhang, L., Chan, C., 2010. Isolation and Enrichment of Rat Mesenchymal Stem Cells (MSCs) and Separation of Single-colony Derived MSCs. *J Vis Exp* (37), 1852.
- Zhao, S., Wang, H., Zhang, Y., Huang, W., Rahaman, M.N., Liu, Z., Wang, D., Zhang, C., 2015. Copper-doped borosilicate bioactive glass scaffolds with improved angiogenic and osteogenic capacity for repairing osseous defects. *Acta Biomater* 14, 185-196.
- Zhou, X.Z., Zhang, G., Dong, Q.R., Chan, C.W., Liu, C.F., Qin, L., 2009. Low-dose X-irradiation promotes mineralization of fracture callus in a rat model. *Arch Orthop Trauma Surg* 129 (1), 125-132.
- Zhu, W., Rawlins, B.A., Boachie-Adjei, O., Myers, E.R., Arimizu, J., Choi, E., Lieberman, J.R., Crystal, R.G., Hidaka, C., 2004. Combined bone morphogenetic protein-2 and -7 gene transfer enhances osteoblastic differentiation and spine fusion in a rodent model. *J Bone Miner Res* 19 (12), 2021-2032.

## 10 Anhang

### 10.1 Primersequenzen

Gen	Forward-Primer	Reverse-Primer
GAPDH1	5'-TGGCCTCCAAGGAGTAAGAA-3'	5'-TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-3'
GAPDH2	5'-AATGCATCCTGCACCACCAACT-3'	5'-TCCACAGTCTTCTGAGTGGCAGT-3'
OC	5'-CATGAGGACCCTCTCTCTGC-3'	5'-TTCACCACCTTACTGCCCTC-3'
OP	5'-GATCGATAGTGCCGAGAAGC-3'	5'-TGAAACTCGTGGCTCTGATG-3'
ALP	5'-GCTGATCACTCCCACGTTTT-3'	5'-GCTGTGAAGGGCTTCTTGTC-3'
RUNX2	5'-CCACCACTCACTACCACACG-3'	5'-TATGGAGTGCTGCTGGTCTG-3'
HIF1 $\alpha$	5'-TGCTTGGTGCTGATTTGTGA-3'	5'-GGTCAGATGATCAGAGTCCA-3'
VEGF-A	5'-GCCCATGAAGTGGTGAAGTT-3'	5'-TATGTGCTGGCTTTGGTGAG-3'
TGF $\beta$ 1	5'-ATACGCCTGAGTGGCTGTCT-3'	5'-GTTTGGGACTGATCCCATTG-3'
Collagen I	5'-AGCTTGGTCCTCTTGCTTGA-3'	5'-AAGGAACAGAAAAGGCAGCA-3'
TNF $\alpha$	5'-GTCTGTGCCTCAGCCTCTTC-3'	5'-GCTTGGTGGTTTGCTACGAC-3'

### 10.2 Protokoll Real Time PCR

10  $\mu$ L Sso Advanced SYBR Green Mastermix  
 je 1  $\mu$ L Forward- und Reverse-Primer  
 1  $\mu$ L cDNA (Wasser bei Non template controls)  
 7  $\mu$ L Wasser  
 Primer-Endkonzentration im Well: 250 nM

#### Osteocalcin, Osteopontin, RUNX2 (+GAPDH1, PPIA)

95°C, 30"  
 95°C, 5"  
 64°C, 30"  
 95°C, 10" } 40x  
 55°C bis 95°C in 0,5°C/5" Schritten (Schmelzkurve)  
 4°C  $\infty$

Effizienz GAPDH1: 114,4%  
 Effizienz PPIA: 111,8%  
 Effizienz Osteocalcin: 109,6%  
 Effizienz Osteopontin: 111,2%  
 Effizienz RUNX2: 108,8%

#### ALP, Collagen I (+GAPDH1, PPIA)

95°C, 30"  
 95°C, 5"  
 63°C, 30"  
 95°C, 10" } 40x

55°C bis 95°C in 0,5°C/5“ Schritten (Schmelzkurve)  
4°C ∞

Effizienz GAPDH1: 112,2%  
Effizienz PPIA: 102,8%  
Effizienz ALP: 105,8%  
Effizienz Collagen I: 107,1%

**Hif1 $\alpha$ , VEGF-A, TGF $\beta$ 1 (+GAPDH2, PPIA)**

95°C, 30“  
95°C, 5“  
59,5°C, 30“ } 40x  
95°C, 10“  
55°C bis 95°C in 0,5°C/5“ Schritten (Schmelzkurve)  
4°C ∞

Effizienz GAPDH2: 103,4%  
Effizienz PPIA:  
Effizienz Hif1 $\alpha$ : 106,1%  
Effizienz VEGF-A: 110,8%  
Effizienz TGF $\beta$ 1: 109,2%

**TNF $\alpha$  (+GAPDH2, PPIA)**

95°C, 30“  
95°C, 5“  
63°C, 30“ } 40x  
95°C, 10“  
55°C bis 95°C in 0,5°C/5“ Schritten (Schmelzkurve)  
4°C ∞

Effizienz GAPDH2: 104,0%  
Effizienz PPIA: 102,8%  
Effizienz TNF $\alpha$ : 107,6%

**10.3 Durchflusszytometrie**

Marker	Antikörper	Verdünnung
CD90 FITC	Klon OX-7; Mouse Anti Rat, IgG1 $\kappa$ , BD Biosciencie	1:200
CD29 PE	Klon eBioHmb1-1, Hamster Anti-Mouse/Rat IgG, eBioscience	1:500
CD73	Primärantikörper: Klon 5F/B9, Mouse Anti-Rat, IgG1 $\kappa$ , BD Pharmingen	1:200
	Sekundärantikörper: Klon A85-1, Rat Anti-Mouse, IgG1 $\kappa$ , BD Pharmingen	1:200
CD54 PerCP	Klon 1A29, Mouse Anti-Rat, IgG1 $\kappa$ , eBioscience	1:100
CD45 APC	Klon OX-1, Mouse Anti-Rat, IgG1 $\kappa$ , eBioscience	1:100
CD31 PE	Klon TLD-3A12, Mouse Anti-Rat, IgG1 $\kappa$ , BD Pharmingen	1:100

## ***11 Danksagung***

Bedanken möchte ich mich hiermit beim gesamten Forschungsteam des Plastisch- und Handchirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Erlangen, insbesondere bei:

- Prof. Dr. med. Dr. hc. Raymund E. Horch für die Ermöglichung dieser Arbeit im Forschungslabor der Plastisch- und Handchirurgischen Klinik,

- PD Dr. med. Andreas Arkudas, nicht nur für die wissenschaftliche Betreuung dieser Projekts, sondern auch und insbesondere für die gute persönliche Zusammenarbeit,

- meinem Doktorvater Prof. Dr. med. vet. Michael Röcken für die wissenschaftliche Betreuung und Korrektur dieser Arbeit,

- Ulf Bertram, Katrin Köhn (MSc), Lara Lingens, Diana Dafinova, Gregor Bühner, Marina Milde, Ilse Arnold und Laura Fischer für ihre Unterstützung in der täglichen Laborarbeit, im OP und bei der histologischen Auswertung der Präparate,

- sowie all jene, die kurzfristig Hilfe angeboten haben, wenn die Arbeitskraft mal nicht ausreichte.

Außerdem gebührt mein Dank

- Herrn PD Dr. med. Luitpold Distel sowie Prof. Dr. med. Rainer Fietkau von der Strahlenklinik Erlangen für die überaus freundliche Unterstützung bei Planung und Durchführung der Bestrahlungssitzungen,

- der Arbeitsgruppe von Prof. Dr.-Ing. habil. Carolin Körner des Lehrstuhls für Werkstoffkunde, Technologie der Metalle für die Herstellung der Titankammern,

- Dr. Tobias Fey sowie Prof. Dr. rer. nat. Peter Greil vom Lehrstuhl für Werkstoffkunde, Glas und Keramik für die Durchführung und Auswertung der  $\mu$ CTs,

- der Firma Baxter Healthcare GmbH für die Bereitstellung der Actifuse® und Fibrin Matrix,

- sowie dem Team des Präklinischen Experimentellen Tierzentrums Erlangen für die Versorgung der Ratten und die gute Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt gebührt der allergrößte Dank meinem Partner, meiner Mutter, meiner Familie und meinen Freunden – all denjenigen, die mich dazu ermutigt haben, diese Doktorarbeit in Angriff zu nehmen, die mich in dieser Zeit persönlich unterstützt und mir immer wieder Energie und Zuversicht gegeben haben.

## ***12 Erklärung***

Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

Ulrike Rottensteiner