

**Einfluss eines aus mesenchymalen Stammzellen
gewonnenem Hypoxie-konditionierten Mediums auf die
knöcherne Heilung bei osteoporotisch-metaphysären
Frakturdefekten an Rattenfemura**

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

vorgelegt von Jessica Grafe
aus Dresden

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

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

Gutachter: PD Dr. med. Ulrich Thormann

Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Schäffler

Tag der Disputation: 21.08.2023

Ich widme diese Arbeit in Liebe und Dankbarkeit
meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Osteoporose	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Epidemiologie	1
1.1.3	Ätiologie und Pathogenese	2
1.2	Der osteoporotische Knochen	2
1.3	Osteoporotische Frakturen	3
1.3.1	Lokalisation, Komplikationen der Frakturheilung	3
1.3.2	Metaphysäres Frakturdefektmodell	3
1.4	Frakturdefektheilung	5
1.5	Behandlung von Knochendefekten	6
1.6	Biomimetische Knochenersatzmaterialien	6
1.6.1	Theorien der Knochenneubildung	7
1.6.2	Heparin-modifiziertes Mineralisiertes Kollagen	7
1.6.3	Hypoxie-kultivierte Wachstumsfaktoren aus MSC	8
1.7	Zielstellung der Arbeit	8
2	Material und Methoden	10
2.1	Prüfsubstanz	10
2.1.1	Mineralisiertes Kollagen	10
2.1.2	Hypoxie-konditioniertes Medium	10
2.2	Versuchstiere	11
2.2.1	Tierschutzkommissionsvotum	11
2.3	Probenumfang	11
2.4	Versuchsanordnung	12
2.5	Ovarektomie V0	12
2.6	Implantation der Prüfsubstanzen V1	13
2.7	Euthanasie und Probenentnahme V2	14
2.8	Aufbereitung der Explantate	15
2.8.1	Einbettung in Technovit 9100	15
2.8.2	Dünnschnitt-Technik	16
2.9	Histologische Färbungen	17

2.9.1	Movat-Pentachromfärbung.....	17
2.9.2	Versilberung nach von Kossa / van Gieson	19
2.10	Enzymhistochemische Färbungen	21
2.10.1	Nachweis der alkalischen Phosphatase	21
2.10.2	Nachweis der tartrat-resistenten sauren Phosphatase.....	22
2.11	Immunhistochemische Färbungen	23
2.11.1	Nachweis des Bone Morphogenetic Protein-2	23
2.11.2	Nachweis des Vascular Endothelial Growth Factor.....	25
2.11.3	Nachweis des Receptor-activator-of-NF- κ B-Liganden	26
2.11.4	Nachweis des Alpha-Smooth Muscle Actin.....	27
2.11.5	Nachweis des Osteoprotegerin	28
2.11.6	Nachweis des ED1 Antikörpers	29
2.12	Histomorphometrische Untersuchung	30
2.13	Statistische Auswertung	31
3	Ergebnisse	32
3.1	Klinische Beobachtung.....	32
3.2	Histologische Färbungen	32
3.2.1	Movat-Pentachromfärbung.....	33
3.2.2	Versilberung nach von Kossa/van Gieson	36
3.3	Enzymhistochemische Färbungen	38
3.3.1	Nachweis der alkalischen Phosphatase	38
3.3.2	Nachweis der tartrat-resistenten sauren Phosphatase.....	40
3.4	Immunhistochemische Färbungen	42
3.4.1	Nachweis des Vascular Endothelial Growth Factor.....	42
3.4.2	Nachweis des α -smooth-muscle Aktins	43
3.4.3	Nachweis des Bone Morphogenetic Protein-2	45
3.4.4	ED1 Antigennachweis.....	47
3.4.5	RANKL-OPG Relation	48
4	Diskussion	50
4.1	Das In situ-Tissue-Engineering-Konzept	50
4.2	Das Knochendefektmodell	51
4.3	Hypoxie-konditioniertes Medium.....	51
4.4	Vaskularisierung, die Grundlage der Knochenbildung	52

4.5	Die Knochenneubildung	53
4.6	Knochen – Aufbau und Abbau, das Gleichgewicht	54
4.7	Anwendbarkeit.....	55
4.8	Ausblick.....	56
5	Zusammenfassung.....	57
6	Summary.....	58
7	Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	59
8	Literaturverzeichnis.....	63
9	Publikationsverzeichnis	74
10	Ehrenwörtliche Erklärung.....	75
11	Danksagung	76
12	Lebenslauf.....	77

1 Einleitung

1.1 Osteoporose

Laut der Weltgesundheitsorganisation gehört die Osteoporose zu den zehn wichtigsten chronischen Erkrankungen der Menschheit. Die unzureichende Knochenfestigkeit bei Osteoporose führt zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber pathologischen Frakturen. Zusätzlich ist die Frakturversorgung oft erschwert durch die Lokalisation und Versagen des Osteosynthesematerials. Eine Folge ist die Immobilisierung vieler Patienten vor allem im hohen Lebensalter, begleitet durch einen erheblichen Verlust an Lebensqualität [10, 18]. Vor allem Wirbelkörper- und Schenkelhalsfrakturen bedingen die primäre Krankheitslast. Durch die Folgen der Osteoporose sind die Morbidität und Mortalität wesentlich erhöht und insgesamt mit einer verringerten Lebenserwartung verbunden [1, 20].

1.1.1 Definition

Die Osteoporose ist eine systemische Knochenerkrankung. Sie geht einher mit einer Verschlechterung der Mikroarchitektur des Knochengewebes und insgesamt niedriger Knochenmasse. Die Knochenbrüchigkeit und damit das Frakturrisiko sind erhöht [89]. Mittels Knochendichtemessung kann der Verlust der Knochensubstanz quantifiziert werden. Die Abweichung der Knochendichte vom Kollektiv wird als T-Score bezeichnet. Die Osteoporose liegt dann vor, wenn der T-Score $< -2,5$ Standardabweichungen vom Mittelwert einer 20- bis 29-jährigen Frau abweicht. Das Gleiche gilt für das männliche Referenzkollektiv [22, 89].

1.1.2 Epidemiologie

Weltweit werden jährlich 8,9 Millionen pathologische Frakturen, bedingt durch Osteoporose, verzeichnet [42]. Etwa jede dritte Frau und jeder fünfte Mann über 50 Jahren erleidet eine osteoporotische Fraktur [43, 57, 58]. In Deutschland lag die 12-Monats-Prävalenz von Osteoporose laut Robert-Koch-Institut bei 5,0 %. Mit zunehmendem Alter steigt das Risiko an Osteoporose zu erkranken. Die Prävalenz bei Menschen über 64 Jahren lag zuletzt bei 24,0 % für die Frauen gegenüber 5,6 % bei den Männern [28].

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

Der als Knochenschwund bezeichnete Verlust an Knochensubstanz wird mit einem hohen Lebensalter in Zusammenhang gebracht. Im zweiten Lebensabschnitt nimmt die absolute Knochenmasse ab. Dieser Verlust der Architektur und der Substanz des Knochens kann sich individuell früher oder später anhand einer senilen Osteoporose manifestieren. Wichtige Aspekte im Prozess der Alterung sind der Muskelschwund, das Nachlassen der enteralen Kalziumabsorption und eine verminderte kutane Vitamin-D-Synthesekapazität [72]. Der Mangel an Geschlechtshormonen nach der Menopause, beziehungsweise eine kurze Östrogenexpositionszeit, verstärken den Knochenabbau bei Frauen [70]. In dem Fall wird die Osteoporose postmenopausal begründet. Beide Formen zählen zu den primären Osteoporosen. Bekannt sind weiterhin familiär-genetische Dispositionsfaktoren und Osteoporose-assoziierte Erkrankungen, wie die Rheumatoide Arthritis. Hereditäre Erkrankungen, zum Beispiel die Osteogenesis imperfecta, zählen ebenfalls zur Ätiologie. Ihr Auftreten ist jedoch äußerst selten.

Eine Osteoporose ist in etwa 5 % der Fälle sekundär bedingt. Ursachen sind Erkrankungen, die einen Effekt auf Knochenumbauprozesse oder den Kalziumphosphatstoffwechsel haben. Dazu zählen endokrine Störungen oder ein Malabsorptionssyndrom. Medikamentös verursachte Osteoporosen werden vor allem nach Kortikosteroidgabe beobachtet.

Ein leichter Knochenschwund wird diagnostisch als Osteopenie eingeordnet. Klinisch behält sie meist die nötige Knochenfestigkeit. Erst nach Auftreten erster Frakturen gilt eine Osteoporose als manifest [22]. Bei fortgeschrittener Osteoporose können sogenannte Spontanfrakturen auch ohne adäquates Trauma oder erkennbare Ursache auftreten.

Die Rezidivrate bei Wirbelkörperfrakturen nach Erstereignis ist fünffach erhöht [73]. Rückenschmerzen und die Verkürzung der betroffenen Wirbelsäulenabschnitte führen zu einer Fehlhaltung und erhöhen folglich das Sturzrisiko. Das Frakturrisiko für Wirbelsäulenfrakturen verdoppelt sich ab dem 50. Lebensjahr in etwa nach jeder Lebensdekade [22].

1.2 Der osteoporotische Knochen

Eine ausgeglichene Balance zwischen Knochenauf- und -abbau spielt eine entscheidende Rolle für einen gesunden biomechanisch belastbaren Knochen. Osteoblasten und

Osteoklasten sind im Wechsel aktiv, regenerieren den Knochen und sorgen für einen Knochenumbau [19]. Die Osteoklasten sind mehrkernige Makrophagen. Am Knochen bilden sie eine Resorptionslakune aus, in der sie Säuren und proteolytische Enzyme sezernieren. In ihrer aktiven Phase geben Osteoklasten stimulierende Faktoren ab, die über Mediatoren wiederum Osteoblasten aktivieren können [79]. Diese enge Kopplung bleibt in der Anfangsphase der Osteoporose mit hohem Knochenumsatz noch erhalten, später entkoppelt dieser Mechanismus zunehmend und die Knochenmasse nimmt ab [40]. Monozytäre Vorläuferzellen tragen den Receptor Activator of NF- κ B (RANK). Wird der zugehörige Ligand (RANKL) gebunden, differenzieren und fusionieren die Zellen zu einem aktiven Osteoklasten [82]. Produziert wird RANKL vor allem von Osteozyten und Osteoblasten [19, 40]. Dem entgegen können Osteoblasten den Rezeptor Osteoprotegerin (OPG) sezernieren, der an RANKL bindet und ihn antagonisiert [47]. Durch die zu geringe Aktivierung der Osteoblasten im osteoporotischen Knochen kann OPG jedoch nicht in ausreichender Menge produziert werden.

1.3 Osteoporotische Frakturen

1.3.1 Lokalisation, Komplikationen der Frakturheilung

Ein erhöhtes Frakturrisiko lässt sich vor allem metaphysär an langen Röhrenknochen feststellen. Dazu zählen Femur, Humerus, Ulna, Tibia und Radius. Das Auftreten osteoporotischer Frakturen am metaphysären Knochen ist kennzeichnend. Diaphysäre Bereiche sind hingegen seltener betroffen. Die Frakturheilung unterscheidet sich metaphysär mit einer geringeren Ausbildung des Bindegewebskallus. Vor allem der Verlust an Spongiosa ist ausschlaggebend für die erworbene Instabilität des Knochens [81, 84]. Schwierigkeiten in der operativen Versorgung und der Implantatstabilität sind die Folge. Refrakturen durch Implantatversagen treten signifikant häufiger bei Patienten mit osteoporotischem Knochenstatus gegenüber Patienten mit normaler Knochendichte auf [35].

1.3.2 Metaphysäres Frakturdefektmodell

Die oben benannten Unterschiede osteoporotischer Frakturen und deren Heilung bedürfen eines geeigneten Tiermodells, an dem die positiven Effekte bereits *in vitro*

getesteter Biomaterialien auf die Knochenheilung untersucht werden können. Dazu wurde ein Frakturdefektmodell entwickelt und an einer Ratte mit induziert-verminderter Knochendichte umgesetzt [4].

Zur Induktion der Osteoporose erfährt eine Sprague-Dawley-Ratte die Entfernung der Eierstöcke (Ovarektomie). Der so induzierte Hormonmangel mimt den Status einer postmenopausalen Frau. Zusätzlich erfolgt eine Diät mit dem Ziel, die Knochendichte bis zum Versuchszeitpunkt weiter zu senken. Das Futter ist arm an Vitamin D, Calcium und Phosphat. Die Knochendichtemessung mittels Dual Energy X-Ray Absorptiometry (DEXA) ergab sechs Wochen nach der Ovarektomie eine Reduktion der Knochenmasse um durchschnittlich 21 %. Osteoporotische Frakturen unterscheiden sich in der Lokalisation und der Regeneration von Frakturen im gesunden Knochen. Durch die reduzierte Knochendichte ist die Metaphyse deutlich häufiger betroffen. Sie bildet den Übergang zum Knochenschaft und ist größeren Kräften ausgesetzt. In der Regel entstehen Frakturdefekte die nicht durch eine Fragmentrekonstruktion wiederhergestellt werden können.

Aus diesem Grund wird im Modell ein keilförmiger Frakturdefekt am metaphysären Femur gesetzt, siehe *Abbildung 1*. Eine Platte stabilisiert den Defektbereich im Sinne einer traditionellen Frakturversorgung. Eine kritische Defektgröße wurde experimentell bestimmt, bei der ohne Knochenersatzmaterial keine ausreichende Knochenheilung in der Versuchszeit erkennbar war [4]. Der keilförmige Frakturdefekt hat lateral eine Länge von 4 mm und medial von 0,35 mm.

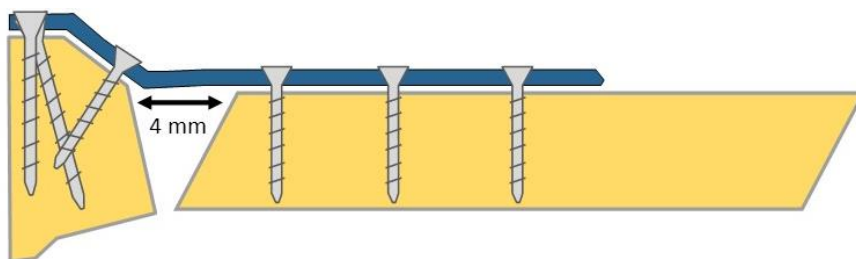


Abbildung 1: Knochendefektmodell. Metaphysär, keilförmiger Frakturdefekt am distalen Femur. Versorgung mittels Plattenosteosynthese.

Das Knochendefektmodell soll die Grundlage für die in dieser Arbeit getesteten Biomaterialien sein.

1.4 Frakturdefektheilung

Grundlegend lässt sich die primäre Frakturheilung in drei Phasen unterteilen: Entzündung, Reparatur und Remodeling. Streng biomechanisch und morphologisch ist die Frakturheilung gut charakterisiert. Die lokalen Mechanismen und Regulierungen sind Gegenstand intensiver Forschung [24]. Eine objektivierbare Beschreibung der drei Phasen setzt eine unkomplizierte Fraktur mit stabiler Versorgung und Konnektierung der Frakturrenden voraus. Ein Frakturdefekt tritt häufig bei osteoporotischen Knochenverhältnissen auf und entsteht durch das Impaktieren der Knochen trabekel. Die Morphologie der Frakturrenden ist irreversibel verändert. Damit ist es oft unmöglich eine anatomische Reposition des Knochens ohne Defekt vorzunehmen. Entsprechend individuell unterschiedlich ist die Heilung derartiger Frakturen. Auszugehen ist von einer biomechanischen Instabilität, gefolgt von dem Mechanismus der sekundären Frakturheilung [25, 38].

Im Rahmen der Frakturstellung kommt es zur Zerstörung von Spongiosa, Periost und umgebenden Weichteilen. Deren nekrotische Zersetzung löst eine aseptische Entzündung aus [71]. Die Beschädigung der Blutgefäße sowie der Weichteile bestimmt die Ausprägung der Blutung und fibrinreichen Exsudation durch vaskuläre Dilatation. Dabei wandern auch die Blutzellen der Leukozyten, wie Monozyten, Makrophagen, Mastzellen und Granulozyten in das Frakturhämatom ein [8, 33]. Eine wichtige Bedeutung kommt den Faktoren der Angiogenese zu, besonders dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) [80]. Mit neugebildeten Gefäßen können erforderliche pluripotente Stammzellen einwandern. Die Zellen sind mesenchymaler Herkunft und differenzieren unter anderem zu Fibroblasten, Chondroblasten und Osteoblasten [41, 88]. Gesteuert wird dieser Prozess durch Zytokine und Wachstumsfaktoren [54, 87]. In summa kann von der Entzündungsphase gesprochen werden.

Eine primäre osteonale Rekonstruktion kann nur bei direktem Kontakt des Knochens oder einer schmalen Frakturlücke bis etwa 1 mm stattfinden. An Letzteren bildet vaskularisiertes Bindegewebe die Überbrückung vor der Verknöcherung [62]. Ein Kallus wird nicht gebildet [2]. Größere Frakturdefekte weisen eine höhere Instabilität auf. Die Frakturheilung läuft hier indirekt, beziehungsweise sekundär ab. Das im Frakturhämatom enthaltene Granulationsgewebe proliferiert zu einem weichen Kallus um die Frakturrenden. Die pluripotenten Stammzellen können zu Knorpel- sowie Knochenvorläuferzellen differenzieren. Sie füllen den Frakturspalt zunächst mit

faserreichem Binde- und Knorpelgewebe [26]. Die Phase der Umbauten kann mehrere Wochen andauern. In der Zeit ist die Bruchzone mechanisch geschwächt. Bei ausreichend stabilen Frakturverhältnissen kann sich der Knorpel knöchern in den „harten“ Kallus umwandeln [16].

Bei zu starker Instabilität bleiben eine suffiziente Verknöcherung und damit die Frakturheilung aus. Eine Pseudarthrose entsteht [7].

1.5 Behandlung von Knochendefekten

Sind die Regenerationskapazität des Knochens und chirurgische Interventionen ausgereizt, können Knochentransplantate oder Knochenersatzmaterialien genutzt werden, um die Knochendefekte zu füllen. Das „diamond concept“ beschreibt die Voraussetzungen für eine erfolgreiche Knochenheilung. Neben einer mechanisch stabilen Umgebung braucht es Zellen mit osteogenem Potential und einem osteoinduktiven Stimulus. Die letzte Voraussetzung ist die osteokonduktive Matrix als Basis für die Heilung des Frakturdefekts [34]. Autologe, körpereigene Transplantate gelten immer noch als Goldstandard für die Knochenersatztherapie. Die guten osteoinduktiven Eigenschaften ergeben sich aus den enthaltenen Wachstumsfaktoren im Transplantat, unter anderem das Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) und -4, der Platelet-derived Growth Factor (PDGF), der Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1), sowie der VEGF [75]. Große Defekte können jedoch durch das limitierte Entnahmevolumen oft nicht gedeckt werden. Insbesondere bei Osteoporosepatienten ist es oft nicht möglich geeignetes Knochenmaterial zu gewinnen. Eine Entnahme der Transplantate birgt zudem ein Risiko für Infektionen und Frakturen im Entnahmebereich [53, 63].

Das Ziel synthetischer Knochenersatzmaterialien ist, die positiven Eigenschaften autologer und allogener Transplante zu imitieren. Dazu werden auch, wie in der vorliegenden Studie, Wachstumsfaktoren hinzugegeben.

1.6 Biomimetische Knochenersatzmaterialien

Synthetische sowie kombiniert synthetisch-biomimetische Materialien zählen zu den Alloplastiken. Vordringlich sollen sie den osteokonduktiven Anforderungen entsprechen und demnach eine Leitstruktur für die Kapillarisation und Einwanderung von

mesenchymalen Stammzellen (MSC) bieten. Gleichzeitig ist eine zeitgerechte Degradation entscheidend. Bereits klinisch etabliert sind Materialien aus Hydroxylapatit und Trikalziumphosphat [66]. Ähnlich dem natürlichen Knochen weisen sie eine hohe Druckfestigkeit bei eher geringer Zugfestigkeit auf [78].

1.6.1 Theorien der Knochenneubildung

Die Entstehung von Knochen ist direkt abhängig von differenzierten Knochenzellen, die aus MSC osteoinduktiv rekrutiert werden [56]. Nach Wilson-Hench ist die Osteoinduktion der Prozess, durch den Osteogenese induziert wird [90]. Die Osteokonduktion ist daher zu einem großen Teil abhängig von der vorherigen Osteoinduktion. Neben der Differenzierung von Osteoprogenitor-Zellen ist auch die vollständige Vaskularisation entscheidend [3]. Aus dem Grund ist die Hauptwirkung vieler Knochenwachstumsfaktoren sowohl mitogen als auch angiogen [86]. Biomimetische Knochenersatzmaterialien sollen den Defektraum stabilisieren und als eine Matrix fungieren. Eine gewisse Porosität ermöglicht das Einwandern von Blutgefäßen und vergrößert die Oberfläche, an der mineralisiertes Gewebe anwachsen kann. Angestrebt wird ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen Aufbau des Knochens und Resorption des Materials.

1.6.2 Heparin-modifiziertes Mineralisiertes Kollagen

Das natürliche Polymer Kollagen Typ I weist eine hohe Zugfestigkeit auf und ist für die Scaffold-Entwicklung unbegrenzt verfügbar [21]. Das natürliche Vorkommen im Körper und damit eine gute Biokompatibilität und Abbaubarkeit sind von Vorteil [17]. Die Kollagenfibrillen besitzen polare und geladene Gruppen und ermöglichen damit die Zelladhäsion und unterstützen unter anderem die Differenzierung und Proliferation von Osteoprogenitorzellen [59]. Allerdings weisen poröse Scaffolds aus Kollagen Typ I eine ungenügende Druckfestigkeit auf und eignen sich nicht für den Einsatz im Knochendefekt [21]. Ähnlich der extrazellulären Matrix von Knochengewebe kann Hydroxylapatit eingesetzt werden, um dem Scaffold zusätzliche Kompressionsstabilität zu verleihen [15, 36]. Das entstandene mineralisierte Kollagen fördert die Differenzierung und Proliferation von MSC [92]. Ein derartiges Scaffold wurde bereits *in vivo* getestet und bot ein gutes Verhältnis zwischen der Resorption des Materials und dem Ersetzen mit

neu-gebildetem Knochen einige Wochen nach Implantation [76, 92]. Für das in dieser Arbeit verwendete Scaffold wurde das mineralisierte Kollagen (MK) zusätzlich mit Heparin modifiziert. In Voruntersuchungen an der TU Dresden wurde verdeutlicht, dass Heparin keinen Einfluss auf die Porenstruktur des Scaffolds oder Zellverteilung nach Kultivierung hat. Vielmehr unterstützt es die osteogene Differenzierung und Aktivität der Osteoblasten. Heparin ermöglicht neben einer zusätzlichen Zelladhäsion auch die Bindung und langanhaltende, kontinuierliche Freisetzung von Wachstumsfaktoren. Die biologische Aktivität der Wachstumsfaktoren wurde anhand von VEGF untersucht. Diese blieb durch eine Heparin-Modifizierung der Scaffolds unverändert [44, 46].

1.6.3 Hypoxie-kultivierte Wachstumsfaktoren aus MSC

Ein Material, welches Wachstumsfaktoren längerfristig bindet, kann chemoattraktiv wirksam sein. Besonders MSC bieten eine gute chemotaktische Reaktion auf diverse Lockstoffe, dazu zählen VEGF, IGF-1, IL-8 und BMPs [61]. Die pluripotenten Vorläuferzellen können sich in Osteoblasten und Chondrozyten differenzieren, aber auch sie selbst können chemoattraktive Agenzien sezernieren [9]. Bislang wurden rekombinante Proteine wie VEGF eingesetzt, um Migrationsprozesse in das Scaffold zu beschleunigen. Kooperierende Studien haben darauf hingewiesen, dass die chemoattraktiven Agenzien der MSC eine schnelle und vollständige Migration von Blutgefäßen und Zellen in einen Knochendefekt ermöglichen. Durch eine Knochenmarkspunktion können MSC der gleichen Spezies gewonnen werden. Diese wiederum werden einer Hypoxie ausgesetzt und sezernieren dadurch signifikante Mengen an Wachstumsfaktoren, wie VEGF. Zusätzlich werden weitere Wachstumsfaktoren sezerniert. Hierbei scheinen vor allem die Faktoren HMGB1, IL-11, sVCAM-1 und SDF-1 α für die chemokine Wirkung von Bedeutung zu sein [31, 32]. Das Wachstumsfaktorgemisch wird folgend als Hypoxie-konditioniertes Medium kurz HCM bezeichnet. *In vitro* Versuche deuten auf eine potente chemoattraktive Kapazität des HCMs hin, mit stärkerer Zellmigration gegenüber dem rein rekombinanten VEGF [30].

1.7 Zielstellung der Arbeit

Nach vielversprechenden *in vitro* Ergebnissen soll das HCM hinsichtlich der Chemoattraktivität und Stimulation der Angiogenese *in vivo* untersucht werden. Das

Heparin-modifizierte Mineralisierte Kollagen wird mit HCM funktionalisiert. Das metaphysäre Frakturdefektmodell an der ovariectomierten Ratte soll die Grundlage sein für die Untersuchungen in dieser Studie. Erwartet wird ein insgesamt beschleunigter Knochenheilungsprozess in der Gruppe mit HCM.

Fragestellung

1. Weist die Prüfsubstanz mit HCM eine bessere knöcherne Heilung auf gegenüber der Prüfsubstanz ohne HCM?
2. Welchen Einfluss hat das HCM auf die Vaskularisierung zum Versuchszeitpunkt zwölf Wochen nach Implantation?

Um die osteokonduktive Potenz des Mineralisierten Kollagens zu verifizieren, wurde zusätzlich ein „Leerdekt“ ohne Knochenimplantat als Kontrollgruppe eingesetzt.

2 Material und Methoden

2.1 Prüfsubstanz

2.1.1 Mineralisiertes Kollagen

Das Mineralisierte Kollagen bildet das Grundgerüst der Prüfsubstanz. Bestehend aus Kollagen Typ 1 (ca. 30 Gew.-%) und dem nanokristallinen Hydroxylapatit (ca. 70 Gew.-%) imitiert es eine natürliche Knochenstruktur, welche die Proliferation und Differenzierung von MSC unterstützen soll [5]. Mit dem Glykosaminoglykan Heparin wird das Material zusätzlich modifiziert, je 30 mg pro 1 Gramm Kollagen. Es ermöglicht eine nahezu lineare Freisetzung der im HCM enthaltenen Wachstumsfaktoren, indem es die Wachstumsfaktoren in einem zentralen Depot bindet und sie hinsichtlich ihrer biologischen Wirksamkeit moduliert [45, 67]. Die Sterilisation des biomimetischen Knochenersatzmaterials erfolgt durch Gamma-Bestrahlung. Dieses Grundgerüst stellt als Implantat eine Kontrolle dar und wurde in der Vergleichsgruppe „MK_K“ implantiert.

2.1.2 Hypoxie-konditioniertes Medium

Das Mineralisierte Kollagen wird funktionalisiert mit Zellkulturüberständen aus unter hypoxischen Bedingungen kultivierten allogenen MSC von Sprague-Dawley-Ratten. Die MSC werden der Hypoxie über 48h bei 1% O₂ ausgesetzt. Auf die keilförmigen Scaffolds, siehe *Abbildung 2*, werden anschließend 40 µl des Konzentrats getropft und vor der Implantation gefriergetrocknet. Durch die Lyophilisation wird das HCM zuvor um den Faktor 80 - 100 aufkonzentriert [67]. Die Lagerung bis zur Implantation erfolgt bei 4°C.

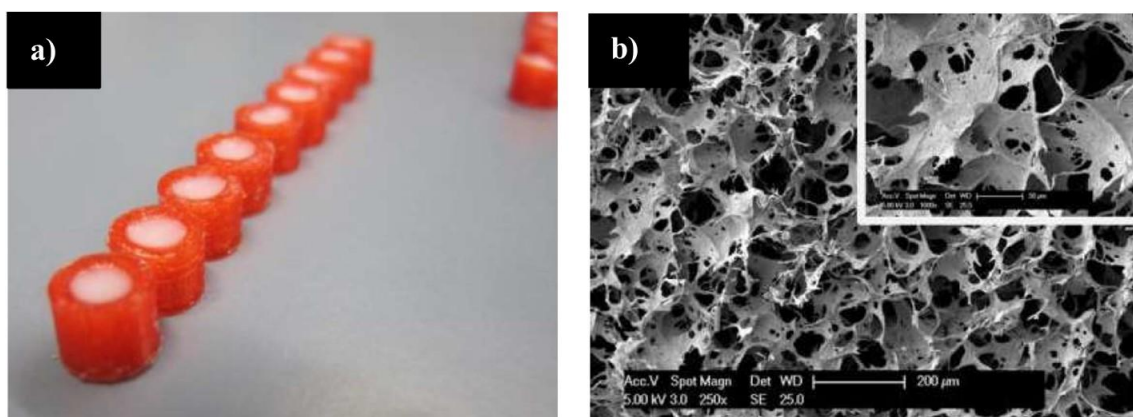


Abbildung 2 a) und b): Scaffold-Herstellung. a) Keilförmige Gussform zur Erzeugung von Scaffolds b) Rasterelektronenmikroskop-Aufnahme der Scaffold Oberfläche (Genehmigung durch Prof. Dr. rer. nat. Michael Gelinsky, TU Dresden)

2.2 Versuchstiere

Die hier aufgeführte Studie wurde an 14 Wochen alten, weiblichen Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Die Tiere wurden randomisiert zugeordnet für Untersuchungen in der Biomechanik, Molekularbiologie oder der für diese Arbeit relevanten Histomorphometrie, Enzym- und Immunhistochemie. Die Berechnung der Gruppengröße erfolgte mit der Software G*Power Version 3.1.

Es handelt sich um eigens für Tierversuche gezüchtete Tiere. Sie stammen aus der Zucht der Charles River Laboratories (Research Models and Services Germany, Sulzfeld). Ort der Tierhaltung und des Versuchsvorhabens war die zentrale Forschungseinrichtung der J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main.

2.2.1 Tierschutzkommissionsvotum

Die Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums in Darmstadt hat gemäß § 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes den Antrag auf Genehmigung des Tierversuchsvorhabens unter der Nummer v54-19 c 20/15-FU/1121 vor Beginn der Studie bewilligt.

2.3 Probenumfang

Die Ratten wurden randomisiert den einzelnen Versuchsgruppen zugeordnet und erhielten während der Osteosynthese die entsprechende Prüfsubstanz. Für die Fragestellung dieser Arbeit erfolgt die Betrachtung der drei Untergruppen MK_HCM (Mineralisiertes Kollagen plus Hypoxie-konditioniertes Medium), MK_K (Mineralisiertes Kollagen ohne Hypoxie-konditioniertes Medium) und „Leerdefekt“. Die Materialgruppen MK_HCM und MK_K sollen die Grundlage bilden für die Untersuchung der formulierten Fragestellung. Zusätzlich erfolgt der Vergleich mit der Kontrollgruppe „Leerdefekt“. Bei den Versuchstieren der Kontrollgruppe wurde keine Prüfsubstanz implantiert und der Knochendefekt offen belassen.

Insgesamt wurden 32 Versuchstiere für die histologische Auswertung randomisiert den drei Untergruppen zugeordnet, 12 Tiere in MK_HCM, 12 Tiere in MK_K, 8 Tiere in „Leerdefekt“.

2.4 Versuchsanordnung

Im Alter von zehn Wochen wurden die Versuchstiere in die definitive Unterbringung in der Forschungseinrichtung über vier Wochen eingewöhnt. Unter üblichen Haltungsbedingungen hatten sie Zugang zu Wasser und Nahrung *ad libitum*, sowie zu Nadelhölzern, welche einem Enrichment dienten. Die Umgebung entsprach einem 12 h Tag/Nacht Rhythmus mit 22°C und einer Raumfeuchte von 40-60%.

Unter kurzfristiger Einschränkung von wenigen postoperativen Tagen waren die Tiere in Gruppen von jeweils drei bis vier Ratten gemeinsam untergebracht, wobei sich die Gruppenkonstellation auch nach den operativen Eingriffen nicht änderte.

Nach der Eingewöhnung folgte die Ovariectomie, die den Versuchszeitpunkt V0 darstellt. Postoperativ wurde die Nahrung auf eine Mangel diät umgestellt, entsprechend dem osteoporotischen Frakturdefektmodell calcium- und phosphorarm, sowie frei von Vitamin D, Soja und Phytoöstrogen, Altromin C-1034 (Altromin Spezialfutter, Lage).

Die nachfolgenden zwölf Wochen dienten der Induktion eines osteoporotischen Knochenstatus.

Die Zuteilung der Tiere in die Versuchsgruppen Leerdefekt, MK_K und MK_HCM erfolgte randomisiert vor der zweiten Operation, der Setzung der Femurdefektfraktur (Versuchszeitpunkt V1). Postoperativ erfolgte keine Immobilisation, weil die Plattenosteosynthese eine Belastungsstabilität verspricht.

132 Tage nach Versuchsbeginn, sechs Wochen nach V1, erfolgte die Euthanasie der Ratten und die Explantation des operierten Femurs (Versuchszeitpunkt V2).

2.5 Ovariectomie V0

Der operative Eingriff zur Ovariectomie wurde unter einer Inhalationsnarkose mit ausreichender Analgesie durchgeführt. Für die Narkoseeinleitung wurde Isofluran (Forene[®], AbbVie, Wiesbaden) mit einer Anfangskonzentration von 4 Vol.-% in einer Narkosekammer angeflutet und die Ratte hineingesetzt. Nachdem eine ausreichende Narkosetiefe erreicht war, wurde sie zunächst im Lendenwirbelbereich rasiert, gewogen und mit Buprenorphin 0,01 mg/ kg KG subkutan analgesiert. Anschließend wurde eine Knochendichtemessung (DEXA-System, Prodigy[®], GE Healthcare, Solingen) in einer posterior-anterior Projektion durchgeführt.

Die intraoperative Lagerung erfolgte auf einer Wärmematte in Bauchlage. Die Augen wurden mit einer Salbe vor dem Austrocknen geschützt (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen). Für die Narkoseaufrechterhaltung wurde 1 Vol.-% Isofluran über eine Atemmaske verabreicht. Das Operationsgebiet wurde mit nicht-alkoholischem Desinfektionsmittel desinfiziert (Braunol®, B. Braun, Melsungen) und steril abgedeckt. Ein 1,5 cm langer Hautschnitt wurde kranial der Schenkelfalte gesetzt und das Ovar stumpf von dorsal freipräpariert. Der Eileiterstrang wurde dicht am Ovar mittels Kauterisierung durchtrennt. Beide Ovarien konnten über die gleiche Schnittführung entfernt werden. Geschlossen wurde die OP-Wunde schichtweise mit resorbierbaren Einzelheftnähten und Wundverschlussklammern.

Nach der Wiedererlangung des Bewusstseins erhielten die Ratten eine orale postoperative Analgesie über das Trinkwasser mit einer Dosierung von 0,66 mg/ml Tramadol (Tramal, Grünenthal, Aachen).

2.6 Implantation der Prüfsubstanzen V1

Die Narkoseeinleitung für die Osteotomie erfolgte in der gleichen Weise, wie auch für die Ovariectomie. Auch die DEXA-Messung, die Kontrolle des Gewichts und perioperative Analgesie wurden zum Zeitpunkt T1 durchgeführt. Zusätzlich erfolgte die Implantierung eines Transponders im Bereich der Nackenfalte mit dem IPTT-300 der Firma Bio Medic Data Systems aus Seaford DE, USA.

Die Osteotomie erfolgte im Bereich der distalen Metaphyse des linken Femurs. Für die Lagerung der Ratte wurde entsprechend eine Rechtsseitenlage auf der Wärmeplatte gewählt.

Das Operationsgebiet wurde rasiert, flächig desinfiziert und mit einem Lochtuch steril abgedeckt. Die Palpation des Femurkopfes und der Kondylen half der Lokalisation der Schnittführung. Die longitudinale Hautinzision wurde lateral gesetzt, beginnend am Kniegelenk mit einer Länge von 3 - 4 cm. Die Fascia lata, sowie der *Musculus biceps femoris* und *Musculus vastus lateralis femoris* wurden im *Septum intermuscularis* getrennt. Um die Stabilität zu gewährleisten, erfolgte eine Plattenosteosynthese mit einer Leibinger-Mini-Platte (Typ XS, Styker, Freiburg) und zugehörigen Schrauben der Größe 1,2 mm. Der Frakturdefekt wurde, wie in der Einleitung erwähnt, keilförmig gesetzt

mithilfe der Ultraschallsäge (Piezosurgery® 3, Sägeblatt OT7S-3, Mectron, Köln) unter ständiger Kühlung mit Ringerlösung, siehe *Abbildung 3 a) und b)*.

Das Probenmaterial wurde mit NaCl (B. Braun, Melsungen) funktionalisiert und in den Defekt eingesetzt. Dabei konnte das Scaffold durch die poröse Beschaffenheit leicht zurechtgeformt werden, überschüssiges Material wurde abgetragen.

Die Tiere aus der Gruppe des Leerdefekts erhielten keine Defektfüllung durch Prüfsubstanzen.

Der Wundverschluss erfolgte schichtweise mit resorbierbarem Faden und Wundverschlussklammern für den Verschluss der Haut. Versiegelt wurde die Wunde mit Nobecutan-Spray (Opsite® Sprühverband, smith&nephew, Hamburg).

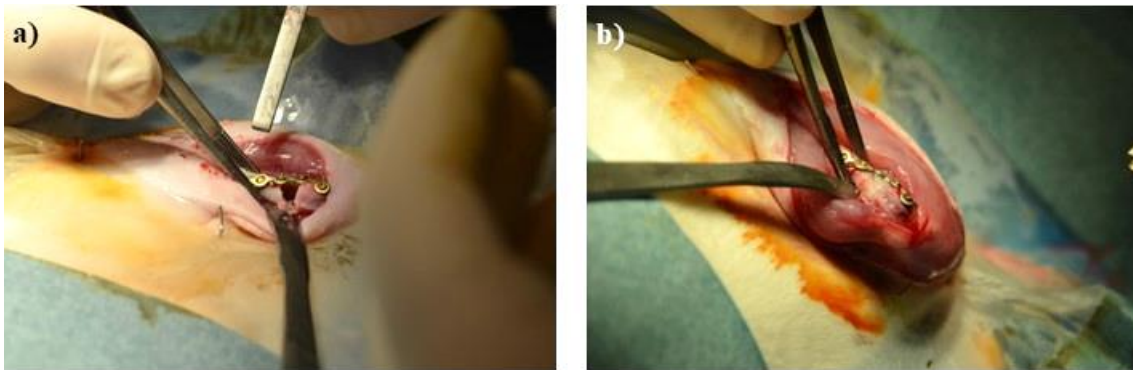


Abbildung 3 a) und b): Implantation und Setzung des Frakturdefekts. a) Osteotomie und Plattenosteosynthese. b) Implantation der Prüfsubstanz.

2.7 Euthanasie und Probenentnahme V2

Für die Euthanasie wurde eine Überdosis CO₂ appliziert, welcher die Ratten in einer speziellen, zu diesem Zweck etablierten Box ausgesetzt waren (Exposure Line - CO₂ Box, Ehret, Emmendingen).

Das Femur wurde anschließend freipräpariert und Weichgewebe entfernt. Für die weiteren Untersuchungen musste die Leibinger-Mini-Platte mitsamt den Schrauben vorsichtig entfernt werden (*Abbildung 4*). Die für die histologische Untersuchung bestimmten Proben wurden in neutral gepuffertem 4% Paraformaldehyd (0335, Carl Roth, Karlsruhe) für 48 Stunden bei 4°C fixiert.

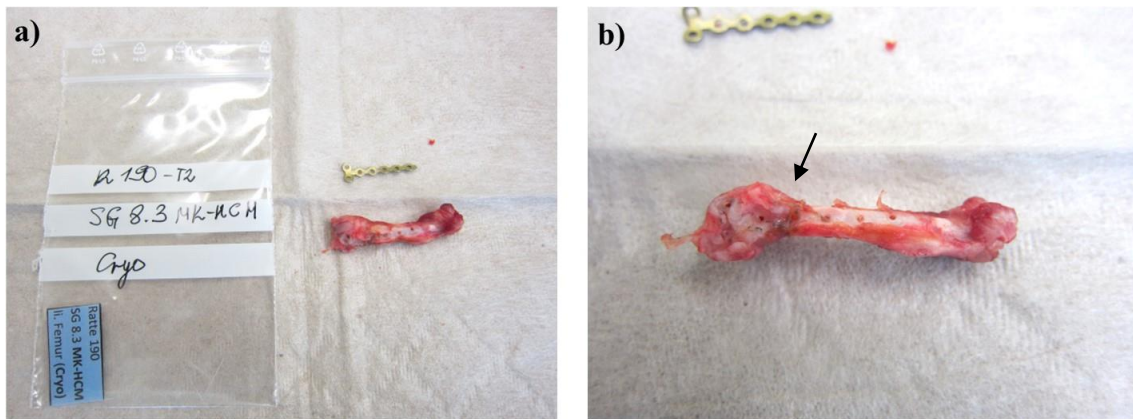


Abbildung 4 a) und b): Femurexplantat zum Versuchszeitpunkt V2 nach Entfernung des Osteosynthesematerials. a) Überprüfung und Beschriftung der Probe und Versuchsgruppe, b) Linkes Femur der Versuchsgruppe MK_HCM mit Inzisionen nach Schraubenentfernung über dem (→) Defektbereich.

2.8 Aufbereitung der Explantate

Eine histologische Untersuchung kann durch dünne Schnittpräparate der Proben ermöglicht werden. Dazu müssen die Knochen eingebettet werden, anschließend die Dünnschnitte erstellt und die Präparate schließlich deplastifiziert werden. Für eine erweiterte Untersuchungstechnik in der Lichtmikroskopie und speziell für die Einbettung von unentkalktem, mineralisiertem Gewebe wurde das Kunststoffeinbettssystem Technovit® 9100 (Kulzer, Hanau) gewählt, welches auf Methylmethacrylat basiert.

2.8.1 Einbettung in Technovit 9100

Nach der Fixierung in 4% Paraformaldehyd wurden die Proben sechs Mal gespült mit 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer pH 7,2 – 7,4. Anschließend folgte die Entwässerung mit vergälltem Ethanol (1001043227002, Stockmeier Chemie, Bielefeld) in aufsteigender Alkoholreihe. Über je 24 h wurden die Proben in 70-, 80- und 96%ig und weitere 96 h in 100%ig vergälltem Ethanol belassen, sowie 24h in 100%igem Ethanol p.A. (108543, Merck, Darmstadt). Xylol (9713, Carl Roth, Karlsruhe) wurde als Intermedium zweimal über je 12 h eingesetzt.

Die Immersion erfolgte in drei Stufen der Präinfiltration (je 24h) und Infiltration (6 Tage). Für die Präinfiltration 3 wurde die Basislösung durch Aluminiumoxid (Carl Roth, Karlsruhe) entstabilisiert. Die Herstellung der Gebrauchslösungen ist *Tabelle 1* zu entnehmen.

Das Polymerisationsgemisch wurde unmittelbar vor Gebrauch durch das Mischen von Stammlösung A und B hergestellt und in eine vorgekühlte Einbettform gegossen. Die Knochen mussten darin vorsichtig orientiert und die Form anschließend luftdicht mit Parafilm (Cole-Parmer, Wertheim) verschlossen werden. Bei -4°C polymerisierten die Proben über 2 Tage. Zur anschließenden Temperierung verblieben die Einbettformen für einige Stunden bei 4°C bevor sie unter dem Abzug aufgeblickt werden konnten.

Tabelle 1: Herstellung der Gebrauchslösungen

Gebrauchslösung	Komponenten	Anmerkung
Präinfiltration 1	Basislösung (66006735, Kulzer, Hanau), Xylol 1:1	lagerfähig, -20°C
Präinfiltration 2	250 ml Basislösung, 1,25 g Härter 1 ((64709022, Kulzer)	lagerfähig, -20°C
Präinfiltration 3	250 ml Basislösung (entstabilisiert), 1,25 g Härter 1	lagerfähig, -20°C
Infiltration	250 ml Basislösung (entstabilisiert), 20g PMMA-Pulver (66010251, Kulzer), 1 g Härter 1	lagerfähig, -20°C
Stammlösung A	500 ml Basislösung (entstabilisiert), 80g PMMA-Pulver, 3 g Härter 1	lagerfähig, -20°C
Stammlösung B	44 ml Basislösung (entstabilisiert), 17,6 ml Härter 2 (66039185, Kulzer), 2 ml Regler (66039184, Kulzer)	lagerfähig, -20°C
Polymerisationslösung	Stammlösung A, Stammlösung B 9:1	sofort verwenden

2.8.2 *Dünnschnitt-Technik*

Die Kunststoffblöcke wurden daraufhin mittels der Exakt Diamant Bandsäge 310 (Exakt Advanced Technologie, Norderstedt) quaderförmig modelliert.

Mit dem Rotationsmikrotom Leica RM2155 (Leica Mikrosystems, Wetzlar) wurden 5 µm dicke Längsschnitte, wie auf *Abbildung 5* ersichtlich, angefertigt. Damit das Gewebe dabei intakt bleibt, wurde Kawamoto's Film Method (Section-Lab, Hiroshima, Japan) verwendet. Die Trägerfolie wurde dann mit Hilfe von doppelseitig klebenden Haftaufklebern (G304, Plano, Wetzlar) auf Objektträgern fixiert.

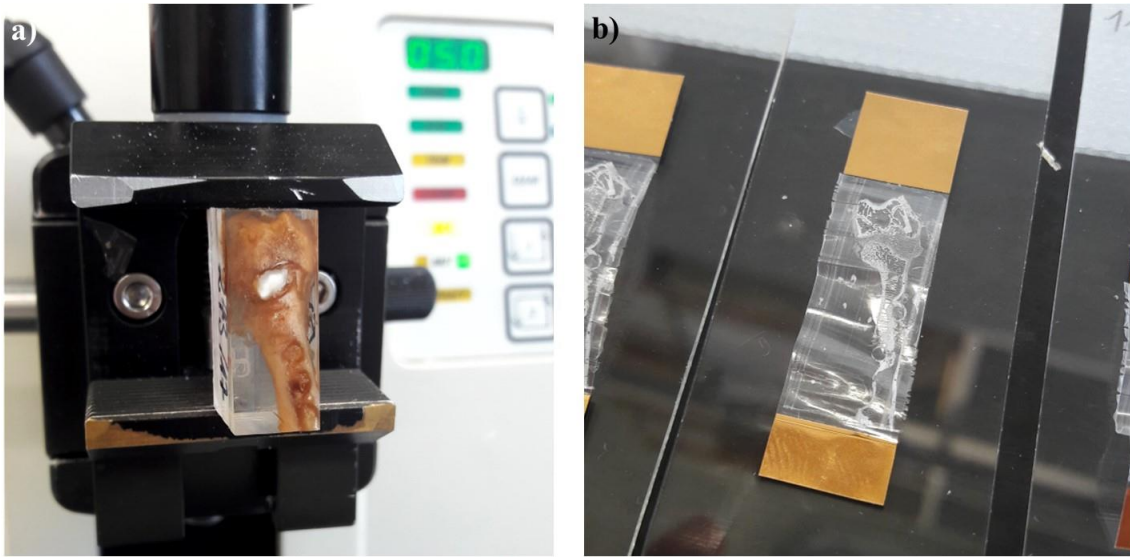


Abbildung 5 a) und b): Dünnschnitt-Technik. a) Eingespannter Kunststoffblock am Rotationsmikrotom Leica RM2155, b) Dünnschnitt, haftend an Kawamoto's Film. Abbildung exemplarisch, Versuchsgruppe entspricht nicht der in dieser Arbeit aufgeführten Gruppe. Das Implantat ist abweichend.

2.9 Histologische Färbungen

2.9.1 Movat-Pentachromfärbung

Die Movat-Pentachromfärbung bietet eine farbenreiche Kontrastierung von Knochengewebe und nicht-mineralisiertem Knorpelgewebe. Die polychrome Färbung mit Alcianblau, Eisenhämatoxylin nach Weigert, Brilliant-Crocein in Verbindung mit Säurefuchsin und Safran färben die Zellkerne blauschwarz, Mineralisierten Knochen und kollagene Fasern gelb, Osteoid dunkelrot, sowie mineralisiertes Knorpelgewebe blaugrün.

Die Färbung ermöglicht histomorphometrische Messungen des Status der allgemeinen Knochenheilung im Defektbereich. Tabelle 2 beschreibt die Durchführung.

Tabelle 2: Färbeprotokoll Movat-Pentachromfärbung

	Methode, Durchführung	Einwirkzeit
1.	Deplastifizieren in 2-Methoxyethylacetat (8.06061, Merck, Darmstadt)	3 x 10 Minuten
2.	Rehydrieren in 100%, 96%, 70% Ethanol	je 5 Minuten
3.	Rehydrieren in Aqua dest.	5 Minuten
4.	Färben mit Alcianblau Lösung (2C-005, Waldeck, Münster)	10 Minuten
5.	Spülen in Leitungswasser	5 Minuten
6.	Stabilisieren in alkalischem Ethanol (20 ml 25% Ammoniak (P093.1, Roth, Karlsruhe) + 180 ml 96% Ethanol, pH > 8)	60 Minuten
7.	Spülen in Leitungswasser	10 Minuten
8.	Eintauchen in Aqua dest.	kurz
9.	Kernfärbung mit Weigerts Eisenhämatoxylin (1+1: Lösung A, X906, Lösung B, X907, Roth, Karlsruhe)	10 Minuten
10.	Eintauchen in Aqua dest.	kurz
11.	Spülen in Leitungswasser	15 Minuten
12.	Färben mit Brillant-Crocein-Säurefuchsin (Brilliant Crocein R, 1B-109; Säurefuchsin, 1B-525, Waldeck, Münster)	12 Minuten
13.	Differenzieren in 0,5% iger Essigsäure (1.00063, Merck, Darmstadt)	2 Minuten
14.	Differenzieren in 5% Phosphorwolframsäure (1.00583, Merck, Darmstadt) in Aqua dest.	20 Minuten
15.	Spülen in 0,5% Essigsäure	2 Minuten
16.	Eintauchen in 100% Ethanol	3 x 10 Minuten
17.	Färben mit 6% Safran du Gâtinais (5A-394, Waldeck, Münster) in 100% Ethanol	60 Minuten
18.	Entwässern in 70%, 96%, 100% Ethanol	je 2 Minuten
19.	Klären in Xylol	2 x 5 Minuten
20.	Eindecken mit DePex (18243, Serva, Heidelberg)	

2.9.2 Versilberung nach von Kossa / van Gieson

Die von Kossa/van Gieson Färbung ist eine Doppelfärbung zur Darstellung mineralisierten Gewebes. Die Methode nach von Kossa weist kalzifiziertes Gewebe nach, indem es an Phosphat gebundene Calciumionen durch Silberionen ersetzt. Sie ist kein spezifischer Calciumnachweis. Durch die van Gieson-Gegen-Färbung kann zusätzlich differenziert Bindegewebe dargestellt werden.

Die Färbung ermöglicht eine histomorphometrische Abgrenzung von Osteoid. Tabelle 3 beschreibt die Durchführung.

Tabelle 3: Färbeprotokoll Versilberung nach von Kossa/van Gieson

	Methode, Durchführung	Einwirkzeit
1.	Deplastifizieren in 2-Methoxyethylacetat	3 x 10 Minuten
2.	Rehydrieren in 100%, 96%, 70% Ethanol	je 5 Minuten
3.	Spülen in Aqua dest.	kurz
4.	Färben mit 3% Silbernitrat (1.01510, Merck, Darmstadt) in Aqua dest.	10 Minuten
5.	Eintauchen in Aqua bidest.	3 x 2 Minuten
6.	Reduzieren in 10g Natriumkarbonat (A135, Roth, Karlsruhe) + 25ml 37% Formaldehyd (1.04002, Merck, Darmstadt) auf 100ml mit Aqua dest.	2 Minuten
7.	Spülen in Leitungswasser	8 Minuten
8.	Fixieren in 5% Natriumthiosulfat (1.06509, Merck, Darmstadt) in Aqua dest.	5 Minuten
9.	Eintauchen in Aqua dest.	2 x 2 Minuten
10.	Färben mit 0,8% Methylgrün (5159, Roth, Karlsruhe) in 20% Ethanol	8 Minuten
11.	Eintauchen in Aqua dest.	3 x 2 Minuten
12.	Färben mit Eisenhämatoxylin nach Weigert	12 Minuten
13.	Spülen in Leitungswasser	8 Minuten
14.	Färben mit van Gieson (2E-050, Waldeck, Münster)	5 Minuten
15.	Entwässern in 100%, 96%, 70% Ethanol	je 2 Minuten
16.	Klären in Xylol	2 x 5 Minuten
17.	Eindecken mit DePex	

2.10 Enzymhistochemische Färbungen

2.10.1 Nachweis der alkalischen Phosphatase

Die von Osteoblasten gebildete alkalische Phosphatase (ALP) ist in mehreren Isoformen im Körper zu finden. Im Knochen spielt das Enzym eine wichtige Rolle bei der Mineralisation der Knochengrundsubstanz während der Defektheilung. Der Nachweis ist ein geläufiger Marker für ausdifferenzierte Osteoblasten.

Eine Histomorphometrie ermöglicht hier eine Quantifizierung des Differenzierungsgeschehens. *Tabelle 4* beschreibt die Durchführung.

Tabelle 4: Färbeprotokoll ALP

	Methode, Durchführung	Einwirkzeit
1.	Deplastifizieren in 2-Methoxyethylacetat	2 x 10 Minuten
2.	Rehydrieren in 100%, 96%, 70% Ethanol	je 5 Minuten
3.	Spülen in Aqua dest.	3 x 5 Minuten
4.	Eintauchen in 0,1M Tris-Puffer pH 9,4 (4855, Roth, Karlsruhe)	10 Minuten
5.	Inkubieren der Präparate mit Phosphatase-Substrat BCIP/NBT (50-81.08, KPL, New Delhi, USA)	30 Minuten bei 37°C in Feuchtkammer
6.	Spülen in Aqua dest.	kurz
7.	Eintauchen in Aqua dest.	3 x 5 Minuten
8.	Färben mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat (N069, Roth, Karlsruhe)	5 Minuten
9.	Spülen in Aqua dest.	3 x 5 Minuten
10.	Entwässern in 70%, 96%, 100% Ethanol	3 x 5 Minuten
11.	Klären in Xylol	2 x 5 Minuten
12.	Eindecken auf neuem Objektträger mit Eukitt (03989, Sigma-Aldrich, Steinheim)	

2.10.2 Nachweis der tartrat-resistenten sauren Phosphatase

Die tartrat-resistente saure Phosphatase (TRAP) wird von aktiven Osteoklasten sezerniert. Deren Quantifizierung korreliert mit dem RANKL-verbundenen Abbau der Knochensubstanz. Zusätzlich kann das Enzym in aktiven Makrophagen nachgewiesen werden [60]. *Tabelle 5* beschreibt die Durchführung.

Tabelle 5: Färbeprotokoll TRAP

	Methode, Durchführung	Einwirkzeit
1.	Deplastifizieren in 2-Methoxyethylacetat	2 x 10 Minuten
2.	Rehydrieren in 100%, 96%, 70% Ethanol	je 5 Minuten
3.	Spülen in Aqua dest.	3 x 5 Minuten
4.	Inkubieren in 0,1 M Na-Acetatpuffer ¹ pH 5,2 (1.062680, Merck, Darmstadt)	10 Minuten
5.	Inkubieren in Färbelösung, bestehend aus 35 mg Naphthol-AS-TR-Phosphat (N6125, Sigma-Aldrich, Steinheim), gelöst in 125µl N-N-Dimethylformamid und auf je 1 ml Na-Acetatpuffer gelöst 57,5 mg di-Natriumtartrat-Dihydrat (1.06663, Merck, Darmstadt) und 35 mg Echtrotsalz (368881, Sigma-Aldrich)	30 Minuten bei 37°C in Feuchtkammer
6.	Spülen in Aqua dest.	3 x 5 Minuten
7.	Gegenfärben mit Shandon Instant Hämatoxylin (6765015, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)	30 Sekunden
8.	Spülen in Aqua dest.	5 Minuten
9.	Bläuen in fließendem Leitungswasser	10 Minuten
10.	Spülen in Aqua dest.	5 Minuten
11.	Eindecken auf neuem Objektträger mit Kaisers Glyceringelatine (6474, Roth, Karlsruhe)	

2.11 Immunhistochemische Färbungen

Eine immunhistochemische Färbung erlaubt den Nachweis von spezifischen molekularen Gewebemerkmale, den Epitopen. Der Nachweis beruht auf der Demaskierung und Bindung der Antigene durch Antikörper mit anschließender Färbung.

2.11.1 Nachweis des Bone Morphogenetic Protein-2

Der Nachweis des BMP-2 beruht auf der indirekten Avidin-Biotin-Peroxidase (ABC)-Methode. Dabei bildet ein biotinylierter sekundärer Antikörper eine Brücke zwischen dem primären Antikörper (gebunden an das nachzuweisende Epitop) und einem Komplex aus Streptavidin, Biotin und Peroxidase. Die Peroxidase oxidiert anschließend ein zugegebenes Chromogen, welches dadurch an der Stelle des detektierten Epitopes als farbiger Niederschlag ausfällt. *Tabelle 6* beschreibt die Durchführung.

Tabelle 6: Färbeprotokoll BMP-2

	Methode, Durchführung	Einwirkzeit
1.	Deplastifizieren in 2-Methoxyethylacetat	4 x 5 Minuten
2.	Rehydrieren in 100%, 96%, 80%, 70% Ethanol	je 5 Minuten
3.	Spülen in Waschpuffer (WP), bestehend aus 0,25ml Triton-x-100 (3051, Roth), 100ml TBS-x-10 pH 7,4 und 900ml Aqua dest.	2 x 5 Minuten
4.	Demaskieren in Citratpuffer pH 6,0 bei 60°C	30 Minuten
5.	Spülen in WP	2 x 5 Minuten
6.	Blockieren der endogenen Peroxidase in 7ml 30% Wasserstoffperoxid (822287, Sigma-Aldrich) und 63ml WP	5 Minuten
7.	Eintauchen in WP	2 x 5 Minuten
8.	Inkubieren der Schnitte mit primärem Antikörper (Bone Morphogenetic Protein 2, AP20597PU-N, ACRIS, Herford) 1:50 in Antikörper Diluent (S302283, Dako, Glostrup, Dänemark)	24 Stunden bei 4°C in feuchter Kammer
9.	Objektträger einzeln spülen mit WP	10 x

Fortsetzung Tabelle 6: Färbeprotokoll BMP-2

	Methode, Durchführung	Einwirkzeit
10.	Eintauchen in WP	3 x 5 Minuten
11.	Inkubieren mit sekundärer Antikörperlösung, bestehend aus 655 µl 1% BSA (A3912, Sigma) in TBS, 94 µl Rattenserum (R9759, Sigma) und 1,5 µl Ziege-anti-Kaninchen-Immunglobulin-Serum (BA-1000, Vector, Burlingame, USA)	30 Minuten bei 24°C in Feuchtkammer
12.	Objektträger einzeln spülen mit WP	10 x
13.	Eintauchen in WP	2 x 5 Minuten
14.	Beschichten mit Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (PK-6100, Vector, Burlingame, USA) in TBS	30 Minuten bei 24°C in Feuchtkammer
15.	Eintauchen in WP	2 x 5 Minuten
16.	Spülen in Aqua dest.	1 x 5 Minuten
17.	Färben in NovaRED (SK-4800, Vector, Burlingame, USA)	30 Minuten
18.	Objektträger einzeln abspülen mit Aqua bidest.	je 10 Sekunden
19.	Eintauchen in Aqua dest.	3 x 5 Minuten
20.	Gegenfärben mit Shandon Instant Hämatoxylin verdünnt in Aqua bidest. 1:2	20 Sekunden
21.	Eintauchen in Aqua dest.	20 Sekunden
22.	Eintauchen in Leitungswasser	10 Minuten
23.	Eintauchen in Aqua dest.	5 Minuten
24.	Entwässern in Ethanol 70 %, 80 %, 96 %	je 1x
25.	Eintauchen in Ethanol 100 % und Xylol	je 2 Minuten
26.	Eindecken mit DePex	

2.11.2 Nachweis des Vascular Endothelial Growth Factor

Der Nachweis des VEGF erfolgt mit der Envision Polymer-Konjugat-Methode. Anders als bei der ABC-Methode wird hier kein Biotin-Streptavidin-Komplex gebildet. Der sekundäre Antikörper ist stattdessen an ein Polymer gebunden, welches eine Vielzahl von Enzymen (hier Peroxidase) aufweist. Die Peroxidase katalysiert die Farbreaktion des Chromogens (hier DAB). *Tabelle 7* beschreibt die Durchführung.

Tabelle 7: Färbeprotokoll VEGF

	Methode, Durchführung	Einwirkzeit
1. - 3.	Siehe Tabelle 6: Schritte 1 – 3	
4./5.	Kein Vorverdau	
6./7.	Siehe Tabelle 6: Schritte 6 + 7	
8.	Inkubieren der Schnitte mit primärem Antikörper gegen VEGF (AF564, R&D Systems, Minneapolis, USA) 1:7 in Antikörper Diluent	24 Stunden bei 4°C
9.	Objekträger separat 10x spülen mit WP und Eintauchen in WP	3 x 5 Minuten
10.	Blockieren mit 12,5 % Rattenserum in TBS/ BSA	10 Minuten
11.	Beschichten mit speziellem Polymer (aus K4003, Dako)	45 Minuten bei 24°C in Feuchtkammer
12./13.	Siehe Tabelle 6: Schritte 12 + 13	
14.	Färben mit DAB (aus K4003, Dako)	45 Minuten bei 24°C in Feuchtkammer
15.	Objekträger einzeln abspülen mit Aqua bidest.	10 x
16.	Eintauchen in Aqua dest.	4 x 5 Minuten
17.	Gegenfärben mit Shandon Instant Hämatoxylin (Thermo Scientific, Waltham, USA), verdünnt in Aqua bidest. 1:2	20 Sekunden
18. - 23.	Siehe Tabelle 6: Schritte 21 - 26	

2.11.3 Nachweis des Receptor-activator-of-NF- κ B-Liganden

Der Nachweis des RANKL erfolgt mit der Envision Polymer-Konjugat-Methode. *Tabelle 8* beschreibt die Durchführung.

Tabelle 8: Färbeprotokoll RANKL

	Methode, Durchführung	Einwirkzeit
1. - 3.	Siehe Tabelle 6: Schritte 1 - 3	
4.	Demaskieren in Citratpuffer pH 6,0 bei 60°C	60 Minuten
5.	Spülen in WP	2 x 5 Minuten
6./7.	Siehe Tabelle 6: Schritte 6 + 7	
8.	Inkubieren der Schnitte mit primärem Antikörper gegen RANKL (AP30826PU-N, Acris, Herford), Konzentration 0,6 μ g/ml in Antikörper Diluent	24 Stunden bei 4°C
9./10.	Siehe Tabelle 7: Schritte 9 + 10	
11.	Inkubieren mit speziellem Polymer (aus K4003, Dako, Jena)	45 Minuten bei 24°C in Feuchtkammer
12./13.	Siehe Tabelle 6: Schritte 12 + 13	
14. - 17.	Siehe Tabelle 7: Schritte 14 - 17	
18. - 23.	Siehe Tabelle 6: Schritte 21 - 26	

2.11.4 Nachweis des Alpha-Smooth Muscle Actin

Der Nachweis des Alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA) erfolgt mit der Envision Polymer-Konjugat-Methode. *Tabelle 9* beschreibt die Durchführung.

Tabelle 9: Färbeprotokoll α -SMA

	Methode, Durchführung	Einwirkzeit
1. - 3.	Siehe Tabelle 6: Schritte 1 - 3	
4./ 5.	Kein Vorverdau	
6./7.	Siehe Tabelle 6: Schritte 6 + 7	
8.	Inkubieren der Schnitte mit primärem Antikörper gegen (M0851, α -SMA, Dako) 1:100 in Antikörper Diluent	24 Stunden bei 4°C
9./10.	Siehe Tabelle 7: Schritte 9 + 10	
11.	Inkubieren mit speziellem Polymer (aus K4006, Dako)	45 Minuten bei 24°C in Feuchtkammer
12./13.	Siehe Tabelle 6: Schritte 12 + 13	
14. - 17.	Siehe Tabelle 7: Schritte 14 - 17	
18. - 23.	Siehe Tabelle 6: Schritte 21 - 26	

2.11.5 Nachweis des Osteoprotegerin

Der Nachweis des Osteoprotegerin (OPG) erfolgt mit der Envision Polymer-Konjugat-Methode. *Tabelle 10* beschreibt die Durchführung.

Tabelle 10: Färbeprotokoll OPG

	Methode, Durchführung	Einwirkzeit
1. - 3.	Siehe Tabelle 6: Schritte 1 - 3	
4./ 5.	Kein Vorverdau	
6./7.	Siehe Tabelle 6: Schritte 6 + 7	
8.	Inkubieren der Schnitte mit primärem Antikörper gegen Osteoprotegerin (250800, Abbiotec, Escondido, USA) 1:200 in Antikörper Diluent	24 Stunden bei 4°C
9./10.	Siehe Tabelle 7: Schritte 9 + 10	
11.	Inkubieren im Labelled Polymer (aus K4003 Dako)	45 Minuten bei 24°C in Feuchtkammer
12./13.	Siehe Tabelle 6: Schritte 12 + 13	
14. - 17.	Siehe Tabelle 7: Schritte 14 - 17	
18. - 23.	Siehe Tabelle 6: Schritte 21 - 26	

2.11.6 Nachweis des ED1 Antikörpers

Der Nachweis des Anti-CD68 Antikörper (ED1) erfolgt mit der Envision Polymer-Konjugat-Methode. *Tabelle 11* beschreibt die Durchführung.

Tabelle 11: Färbeprotokoll ED-1

	Methode, Durchführung	Einwirkzeit
1. - 3.	Siehe Tabelle 6: Schritte 1 – 3	
4./ 5.	Kein Vorverdau	
6./7.	Siehe Tabelle 6: Schritte 6 + 7	
8.	Inkubieren der Schnitte mit primärem Antikörper gegen ED1 (MAB1435, Chemicon, Merck, Darmstadt) 1:3000 in Antikörper Diluent	24 Stunden bei 4°C
9./10.	Siehe Tabelle 7: Schritte 9 + 10	
11.	Inkubieren mit speziellem Polymer (aus K4006, Dako)	45 Minuten bei 24°C in Feuchtkammer
12./13.	Siehe Tabelle 6: Schritte 12 + 13	
14. - 17.	Siehe Tabelle 7: Schritte 14 – 17	
18. - 23.	Siehe Tabelle 6: Schritte 21 – 26	

2.12 Histomorphometrische Untersuchung

Die histomorphometrische Untersuchung ermöglicht eine standardisierte Analyse der Knochenheilung auf Zellebene im Defektbereich. Für die Aufnahmen der histologischen Dünnschnitte wurde das Leica DM5500B Lichtmikroskop mit der Kamera DFC 7000 T und der Anwendung LASX genutzt (Leica Mikrosystems, Wetzlar). Die Auswertung erfolgte mithilfe von Adobe Photoshop CS6 (Adobe, San Jose, USA). Festgelegt wurde eine „region of interest“ (ROI), entsprechend der Defektregion. Für die Vergleichbarkeit unter verschiedenen histologischen Färbungen wurde die festgelegte ROI einer Probe beibehalten. Innerhalb der ROI wurden Areale, wie die Materialreste oder Stücke alten Knochens, als VOID festgelegt und für die weiteren Messungen nicht berücksichtigt. Ein Beispiel ist in *Abbildung 6* zu sehen.

In dieser Arbeit bezeichnet die Grenzfläche den distal und proximal gelegenen Übergangsbereich von intaktem Knochen zur Defektregion.



Abbildung 6: Histomorphometrische Untersuchung. Festlegung der (→) ROI. Übersichtsaufnahme der Movat-Pentachromfärbung. Innerhalb der ROI violett markiert: Mineralisierte Areale. Hellgrün markiert: Lagerknochen (VOID).

Für die Messung einzelner Areale wurde eine Farbcodierung genutzt. Gefäßanschnitte und Zellen mit positivem Signal der ED1, RANKL und TRAP-Färbung wurden ausgezählt.

Die histomorphometrische Untersuchung der Proben fand verblindet statt.

2.13 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung der drei unabhängigen Versuchsgruppen Leerdefekt, MK_HCM und MK_K wurde eine einfaktorische ANOVA durchgeführt. Überprüft wurde, ob sich die histomorphometrischen Ergebnisse der drei Versuchsgruppen statistisch signifikant voneinander unterscheiden. Für eine genauere Differenzierung erfolgte anschließend der paarweise Vergleich der Gruppen mit einem Post-hoc Test bei offener Hypothesenstellung. Für die Berechnungen wurde das Programm SPSS Statistics 24 (IBM, Armonk, USA) verwendet. Als Voraussetzung erfolgte die Überprüfung auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk-Test. Eine Normalverteilung wurde angenommen bei $p > .05$. Die explorative Datenanalyse ermöglicht die Bestimmung der Ausreißer. Ausreißer wurden auf Messfehler und Fehler bei der Dateneingabe überprüft. Bei einer fehlerhaften Färbung oder Beschädigung des Präparates erfolgte der Ausschluss der Analyse bereits vor der Histomorphometrie. Die Überprüfung der Varianzhomogenität erfolgte über den Levene-Test, bei einem $p \geq .05$ wurde die Varianzhomogenität angenommen. In diesem Fall erfolgte die Interpretation der einfaktorischen ANOVA und des Tukey post-hoc Test, beziehungsweise des Tukey-Kramer post-hoc Tests bei unterschiedlicher Gruppengröße. Bei Verletzung der Varianzhomogenität wurde der robustere Welch-Test und Games-Howell post-hoc Test gewählt. Das festgelegte Signifikanzniveau dieser Arbeit beträgt $\alpha = 0.05$. Die statistische Signifikanz wird angenommen, wenn der p-Wert $< .05$ beträgt.

3 Ergebnisse

3.1 Klinische Beobachtung

Über den gesamten Versuchszeitraum V1 bis V2 wurden die Ratten engmaschig tierärztlich betreut. Nach der Osteosynthese des Knochendefekts und der Implantation der Prüfsubstanz war bei allen Tieren eine unkomplizierte Genesung zu beobachten. Eine Frühmobilisierung und Belastung der Fraktur bei normalem Gangbild war sofort möglich. Unter den 32 Versuchstieren für die histologische Untersuchung wurden keine Todesfälle beobachtet. Bei der Explantation der Prüfsubstanz wurden vermehrt Plattenbrüche beobachtet, die auf ein Versagen des Osteosynthesematerials zurückzuführen sind, siehe *Tabelle 12*. Unter den Gruppen traten die Plattenbrüche unspezifisch auf und führten zum Ausschluss der Proben für die weitere Untersuchung.

Tabelle 12: Explantate mit Plattenbrüchen

Gesamtanzahl Σ	Gruppe	Anzahl pro Gruppe	davon Plattenbrüche	untersucht
32 Tiere für die histologische Untersuchung	MK_HCM	12 Tiere	2	10
	MK_K	12 Tiere	2	10
	Leerdefekt	8 Tiere	1	7

3.2 Histologische Färbungen

Zum Versuchszeitpunkt V2, sechs Wochen nach Implantation der Prüfsubstanzen, wurde der Knochendefekt am Dünnschnittpräparat histologisch untersucht. Entsprechend der Ergebnisse zurückliegender Studien zur Entwicklung des Knochendefektmodells ebenjenes Rattenstammes, konnte der Zeitpunkt der Explantation gezielt festgelegt werden [4].

Erwartet wird ein frühes Stadium der Heilung, geprägt durch einen Bindegewebskallus. Es erlaubt die Untersuchung des Granulationsgewebes und somit die Migration und Aktivität von Chondro- und Osteoprogenitorzellen nach der Theorie der Osteoinduktion und Osteokonduktion, ausgehend von dem Implantat.

3.2.1 Movat-Pentachromfärbung

In den Übersichtsaufnahmen auf der *Abbildung 7* lässt sich der Defektbereich gut abgrenzen. Er ist gefüllt mit einem Bindegewebskallus, hauptsächlich bestehend aus abgerundeten Fibroblasten. Im Leerdefekt scheint das Bindegewebe eher locker angeordnet zu sein. Es finden sich wenig Areale mit Knorpelzellaggregaten. In den beiden Materialgruppen MK_K und MK_HCM ist das Bindegewebe dicht gerichtet und enthält hoch differenzierte hypertrophe Chondrozyten. Diese sind umgeben von Faserknorpel mit mineralisierten Bereichen, welche sich narbig durch den Defektbereich ziehen.

Materialreste sind in einigen Anschnitten vereinzelt zu finden, unabhängig der ausgehenden Versuchsgruppe. Insgesamt kann man hierbei von einer nahezu abgeschlossenen Materialresorption ausgehen.

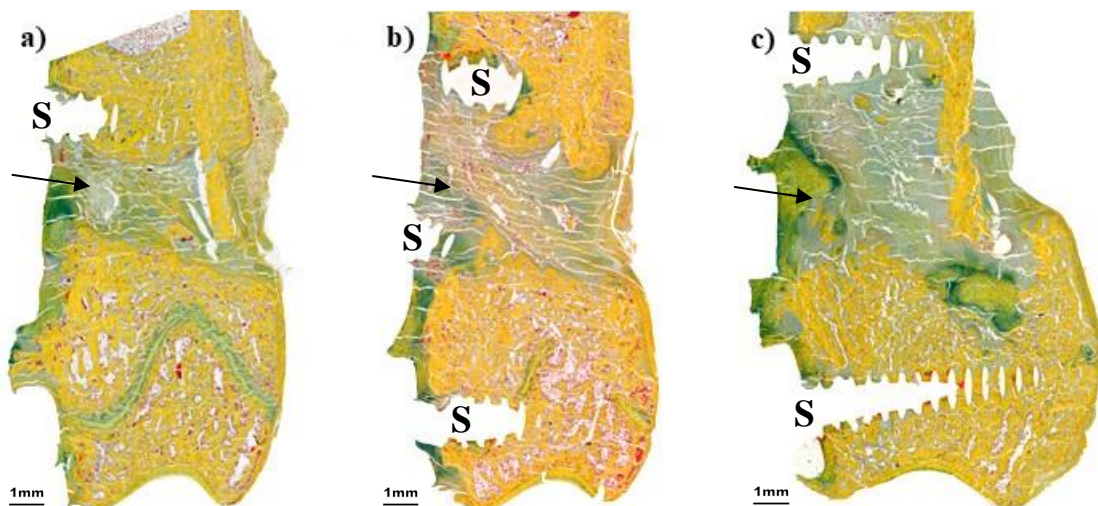
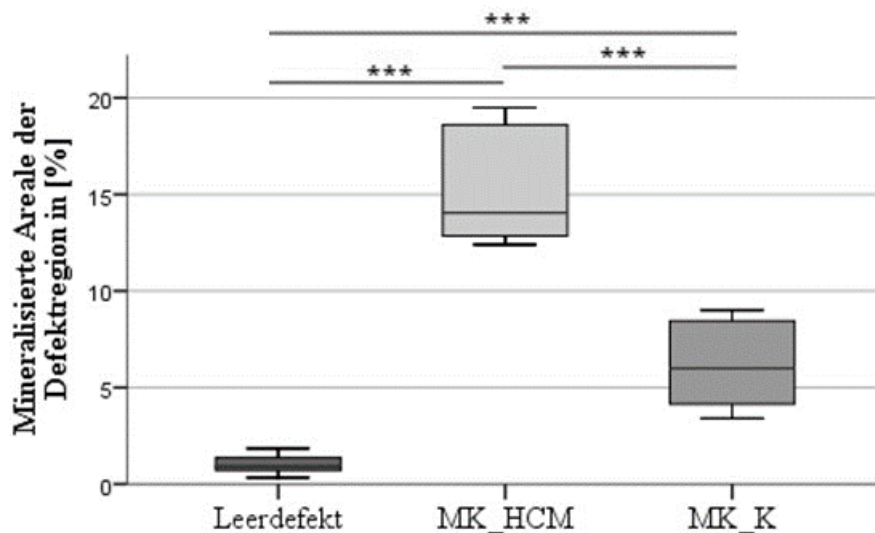


Abbildung 7 a) - c): Histologische Übersichtsaufnahmen. Movat-Pentachromfärbung. a) Leerdefekt b) MK_HCM und b) MK_K. Abgebildet ist das distale Femur mit (→) metaphysärem Frakturdefekt, sowie (S) Schraubeninzisionen um den Defektbereich.

Die histomorphometrische Bestimmung der gelb gefärbten, mineralisierten Areale im Defektbereich gibt einen hoch signifikanten Unterschied unter allen Gruppen an. Gemessen wurden Mineralisierte Areale in Relation zu der Defektfläche in %, $(\text{mineralisierter Areale} / [\text{mm}^2] \text{ Defektfläche}) * 100 \%$. Die Größe der Mineralisierten Areale nahm zu, von Leerdefekt (M = 1.0, SD = .5), zu MK_K (M = 6.2, SD = 2.3), zu MK_HCM (M = 15.3, SD = 3.0). Bei Varianzinhomogenität ergab sich eine statistische Signifikanz zwischen den Gruppen, Welch-Test $F(2, 10.175) = 95,443, p < .001$. Der Games-Howell post-hoc Test ergab einen hoch signifikanten Unterschied ($p < .001$)

zwischen den Gruppen Leerdefekt, MK_K und MK_HCM. Zwischen den Materialgruppen MK_HCM und MK_K liegt die Mittlere Differenz bei 9,1 und das 95%-Konfidenzintervall bei [5.6, 12.7], siehe *Abbildung 8*.



*Abbildung 8: Histomorphometrische Auswertung der Movat-Pentachromfärbung. Flächenbestimmung (mineralisierte Areale/ [mm²] Defektfläche) * 100 %. Leerdefekt n = 7, MK_HCM n = 8, MK_K n = 8. Die Sterne zeigen (*) p < 0,05; (**) p < 0,01, (***) p < 0,001.*

Die gemessenen Areale entsprechen mikroskopisch überwiegend verkalkter Knorpelmatrix. Eine beginnende Synthese der knöchernen Narbe, dem Geflechtknochen, ist in der *Abbildung 9* entlang der Grenzfläche erkennbar. Hypertrophierte Knorpelzellen bilden das Zentrum der Narbe. Umgeben wird sie von Bindegewebsstraßen, gefüllt mit Fibroblasten und Gefäßanschnitten.

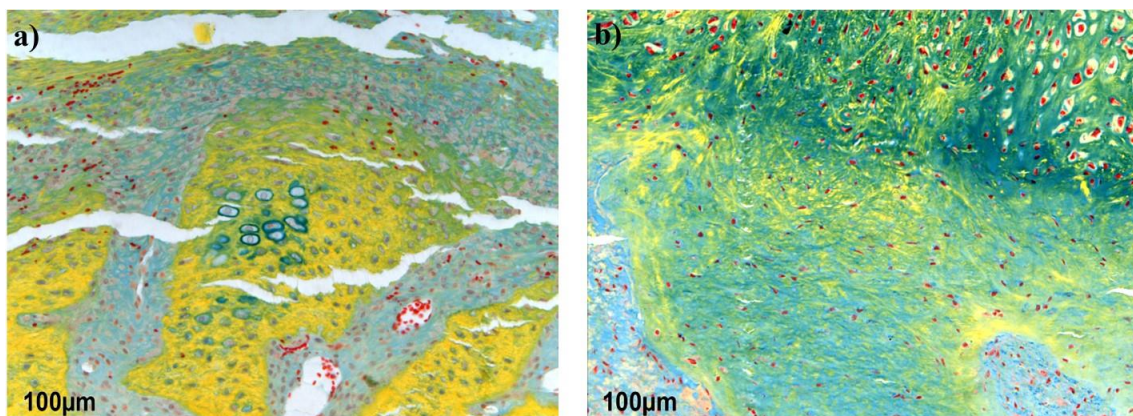


Abbildung 9 a) und b): Histologische Aufnahmen. Movat-Pentachromfärbung. a) MK_HCM und b) MK_K. Darstellung der knöchernen Narbe an der Grenzfläche.

An der Grenzfläche ist die knöcherne Heilung weiter fortgeschritten als zentral im Defektbereich. Die mineralisierten Bereiche sind in der Movat-Pentachromfärbung durch die Gelbfärbung gut abgrenzbar. Auf der *Abbildung 9* zeigt sich an der Grenzfläche bei MK_HCM eine stärkere Mineralisierung im Vergleich zu MK_K. In der Materialgruppe ohne HCM sind vermehrt große nicht mineralisierte Knorpelareale zentral im Defektbereich, sowie an der Grenzfläche erkennbar. Insbesondere in der Differenzierung der Knorpelzellen lassen sich Unterschiede erkennen. In den umschriebenen Knorpelarealen bei MK_K finden sich neben der Mineralisierungszone mit hyperplastischen, blasigen Knorpelzellen auch Bereiche mit flachen Knorpelzellen. Im Unterschied dazu hat MK_HCM bereits eine fortgeschrittene enchondrale Ossifikation mit überwiegend grobblasigen Knorpelzellen. Der Unterschied ist auf der *Abbildung 10* sichtbar.

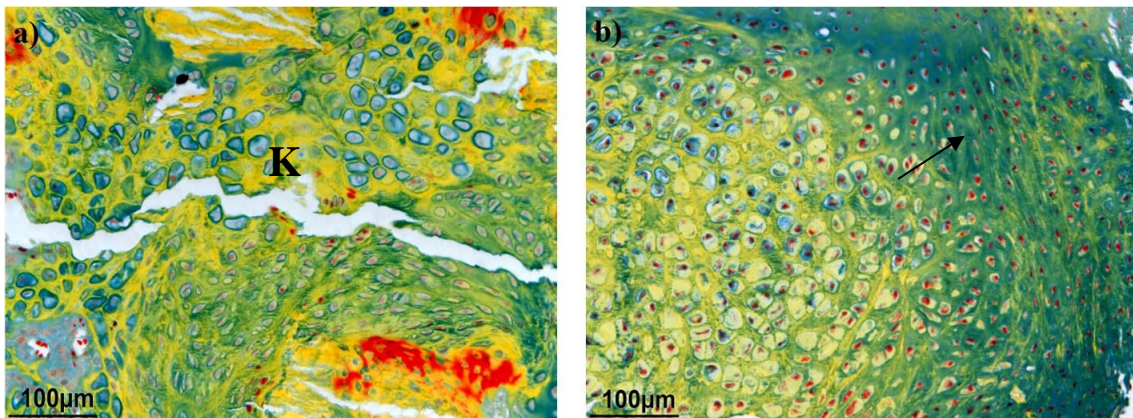


Abbildung 10 a) und b): Histologische Aufnahmen. Movat-Pentachromfärbung. Darstellung der Mineralisierungszone im Defektbereich. a) MK_HCM mit überwiegend grobblasigen Knorpelzellen (K) und b) MK_K mit undifferenzierten Knorpelzellen (→).

Unter den Materialgruppen lässt sich histomorphometrisch kein Unterschied in der Materialresorption feststellen. Zentral betont lassen sich in einigen Schnitten letzte Fragmente des MK darstellen. Die poröse Oberfläche des Scaffolds ist gut erkennbar. Auffallend war die gute bindegewebige Umbauung und Vaskularisation, in *Abbildung 11* wird dies deutlich. Es konnten keine Nekroseareale beschrieben werden.

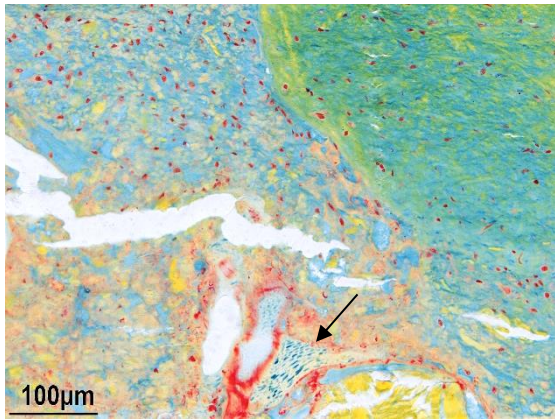


Abbildung 11: Histologische Aufnahme. Movat-Pentachromfärbung. Exemplarische Darstellung der (→) Materialreste in MK_K mit bindegewebiger Umbauung.

3.2.2 Versilberung nach von Kossa/van Gieson

An der Grenzfläche zur intakten Spongiosa ist geringfügig gerichtete Osteogenese sichtbar. Neu gebildeter Geflechtknochen wird umgeben von einem breiten Osteoidsaum. Wie aufgrund der kritischen Defektgröße zu erwarten war, reicht die Osteogenese nicht aus, den Defekt sechs Wochen nach der Osteotomie mit einem knöchernen Kallus zu füllen, siehe *Abbildung 12*. Eingewanderte und differenzierte Osteoblasten bilden das Osteoid im Implantatbereich, in der Färbung dunkelviolettschwarz erkennbar.

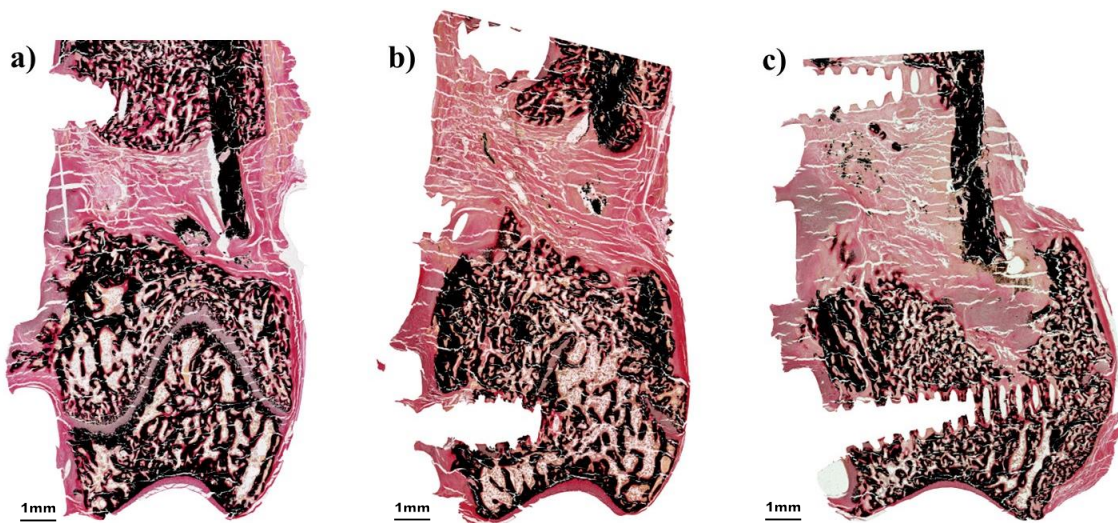


Abbildung 12 a) - c): Histologische Übersichtsaufnahmen. Versilberung nach von Kossa/van Gieson. a) Leerdefekt b) MK_HCM und c) MK_K.

In der Materialgruppe MK_HCM ist der dunkelviolettschwarze Osteoid-Saum an der Grenzfläche breiter ausgebildet und deutlicher gefärbt als in Materialgruppe MK_K, siehe *Abbildung 13*. Zudem finden sich entlang der Bindegewebsstränge zentral im Defektbereich vermehrt Areale mit Osteoid, bei noch beginnender Mineralisierung.

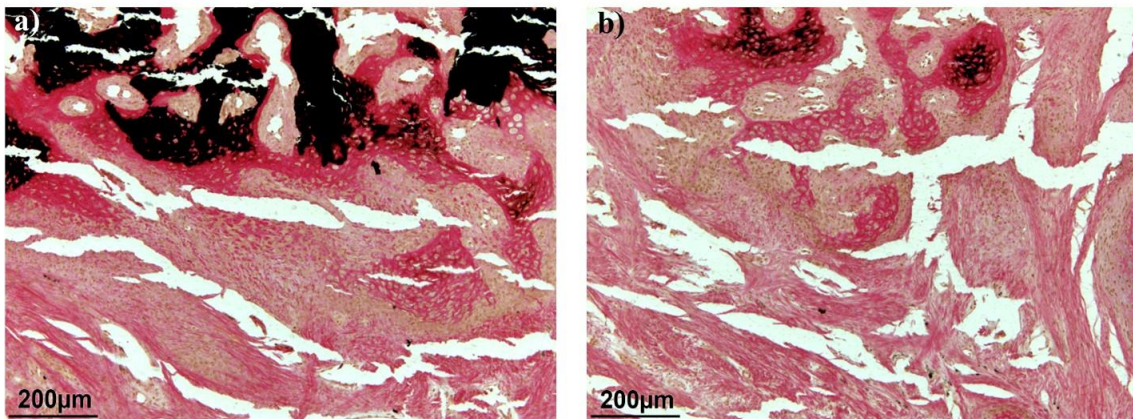


Abbildung 13 a) und b): Histologische Aufnahmen. Versilberung nach von Kossa/ van Gieson. Abgebildet in a) MK_HCM und b) MK_K mit der Osteoidbildung (dunkelviolett) an der Grenzfläche.

Mit der Versilberung nach von Kossa/ van Gieson werden die Materialreste demaskiert und grenzen sich mit fehlendem Osteoidsaum von körpereigenem, vitalem Knochen ab. Auf der *Abbildung 14* sind exemplarisch Materialreste im Defektbereich, ohne einen anliegenden violetten Saum, zu erkennen. Das histomorphometrische Ausmessen der Materialreste bei MK_HCM und MK_K ergab keinen Unterschied in der Degradation der Prüfsubstanzen.

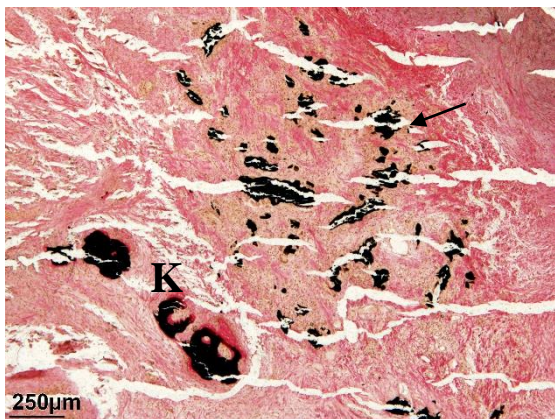


Abbildung 14: Histologische Aufnahmen. Versilberung nach von Kossa/ van Gieson. Gruppe MK_HCM. Darstellung der (→) Materialreste ohne Osteoidsaum im Vergleich zu (K) körpereigenem, vitalem Knochen.

Die Bestimmung der Osteoidareale, zur Abschätzung der Syntheseleistung der Osteoblasten ist in *Abbildung 15* dargestellt. Gemessen wurde die Osteoidfläche in Relation zu der Defektfläche in %, $(\text{Osteoidareale} / [\text{mm}^2] \text{ Defektfläche}) * 100 \%$. Die gemessene Fläche nahm zu, von Leerdefekt (M = 5.1, SD = 1.3) zu MK_K (M = 8, SD = 2), von Leerdefekt zu MK_HCM (M 12.3, SD = 2,8) und von MK_K zu MK_HCM. Gemäß der Levene-Statistik kann von einer Gleichheit der Varianzen ausgegangen

werden ($p = .278$). Der Tukey post-hoc Test zeigte einen hoch signifikanten Unterschied der Osteoidareale in MK_HCM zu dem Leerdefekt ($p = .0001$), sowie einen sehr signifikanten Unterschied zu MK_K ($p = .008$). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen MK_K und dem Leerdefekt ($p = .117$). Das Ergebnis deckt sich mit der Bestimmung aller mineralisierten Areale in der Movat-Pentachromfärbung und bestätigt den anschließenden Umbau des verkalkten Knorpelgewebes in eine Knochenmatrix.

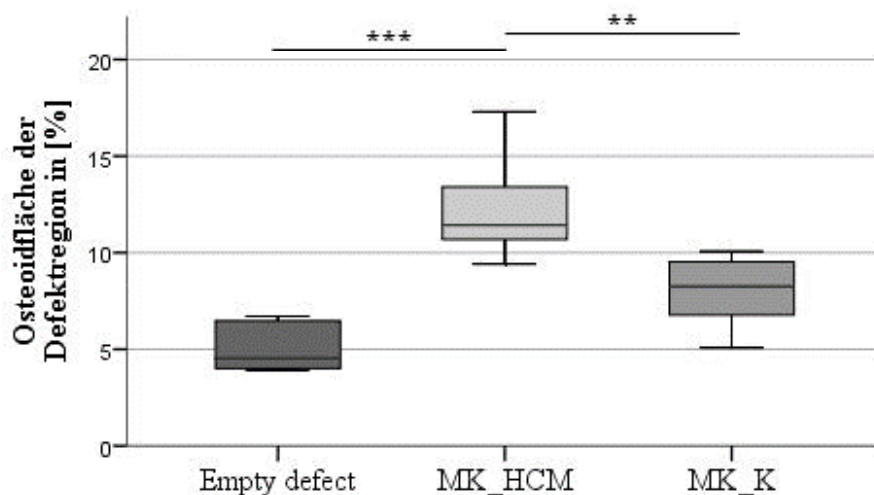


Abbildung 15: Histomorphometrische Auswertung der Versilberung nach von Kossa/ von Gieson. Flächenbestimmung (Osteoidareale/ $[mm^2]$ Defektfläche) $\cdot 100$ %. Leerdefekt $n = 5$, MK_HCM $n = 7$, MK_K $n = 6$. Die Sterne zeigen (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

3.3 Enzymhistochemische Färbungen

3.3.1 Nachweis der alkalischen Phosphatase

Die ALP wird synthetisiert von differenzierten und aktiven Osteoblasten, welche die Proteine der Knochenmatrix synthetisieren. In der Enzymhistochemie färbt sich die ALP bläulich als Saum um die Osteoblasten.

Mikroskopisch lassen sich Unterschiede zwischen den Materialgruppen feststellen. Die Färbung der ALP fällt in MK_HCM deutlich intensiver und flächiger aus im Vergleich zu MK_K. In *Abbildung 16* wird dieser Unterschied an der Grenzfläche deutlich. Im Leerdefekt finden sich ALP-positive Areale vereinzelt schwach entlang der Grenzfläche, jedoch nicht in der Defektregion ohne Bezug zur intakten Spongiosa.

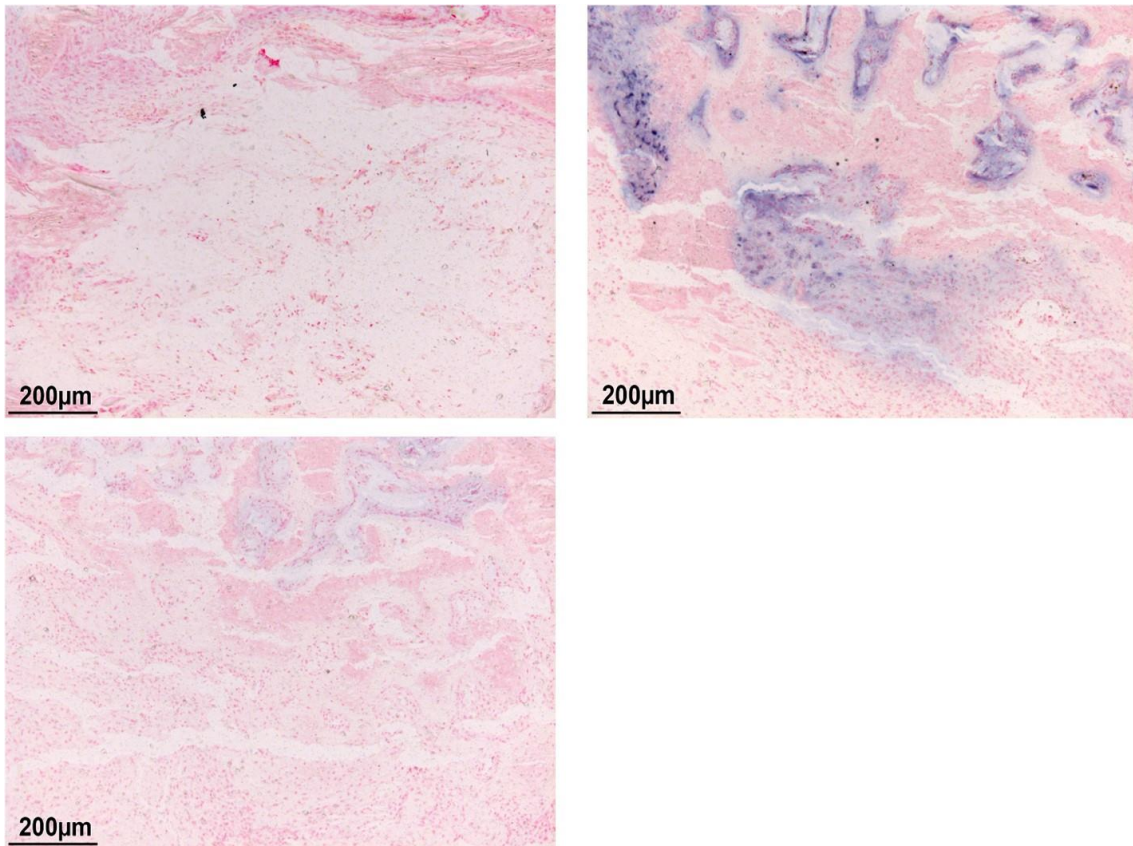


Abbildung 16 a) – c): Histologische Aufnahmen. Nachweis der ALP. a) Leerdekt b) MK_HCM und c) MK_K. Bläuliche Darstellung der Osteoblastenaktivität an der Grenzfläche.

Die Quantifizierung der ALP ermöglicht indirekt Rückschlüsse auf die Aktivität und Menge eingewanderter Osteoblasten, siehe *Abbildung 17*. Der bläuliche Saum wurde in der Histomorphometrie mittels Farbcodierung flächig bestimmt und ebenfalls in Relation zur Defektfläche gesetzt, $(\text{ALP-positive Areale} / [\text{mm}^2] \text{ Defektfläche}) * 100 \%$. Im Mittel wurde bei MK_HCM ($M = 7.9$, $SD = 4.6$) die größte Aktivität der Osteoblasten gemessen. In den Gruppen MK_K ($M = 2.1$, $SD = 1.6$) und dem Leerdekt ($M = .2$, $SD = .2$) waren die gemessenen ALP-positiven Areale im Durchschnitt kleiner. In der Levene-Statistik kann keine Homogenität der Varianzen angenommen werden ($p = .005$). Die Osteoblastenaktivität unterschied sich sehr signifikant in den drei Versuchsgruppen, Welch-Test $F(2,8.783) = 13.762$, $p = .002$. Der Games-Howell post-hoc Test ergab einen signifikanten Unterschied ($p < .05$) in der Osteoblastenaktivität zwischen allen Versuchsgruppen. Die Osteoblastenaktivität nahm ab von MK_HCM zu MK_K (5.8, 95%-CI[.4, 11.1]), von MK_K zum Leerdekt (1.8, 95%-CI[.2,3.4]) und von MK_HCM zum Leerdekt (7.6, 95%-CI[2.2,13]).

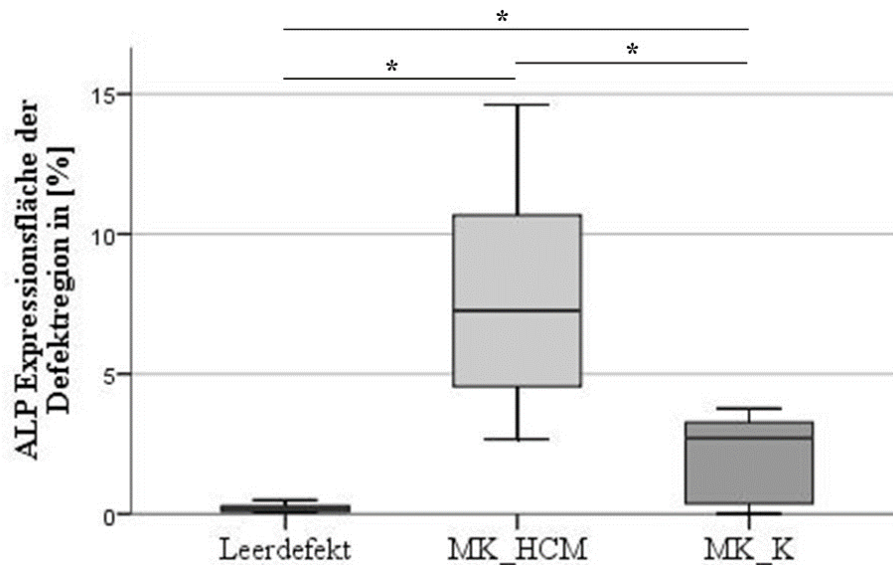


Abbildung 17: Histomorphometrische Auswertung des Nachweises der ALP. Flächenbestimmung (ALP-positive Areale/ [mm²] Defektfläche) *100 %. Leerdefekt n = 5, MK_HCM n = 7, MK_K n = 8. Die Sterne zeigen (*) p < 0,05; (**) p < 0,01, (***) p < 0,001.

3.3.2 Nachweis der tartrat-resistenten sauren Phosphatase

Die TRAP konnte in mehrkernigen Zellen nachgewiesen werden, die in ihrer Morphologie und Lage unter anderem den Osteoklasten entsprechen können. Die Auswertung zeigt ein gehäuftes Vorkommen der phagozytierenden Zellen an den Grenzflächen, den alten Knochenbruchstücken, den Materialresten und entlang der Osteoidflächen. In *Abbildung 18* sind entlang der Grenzfläche verstärkt TRAP-positive Zellen bei MK_HCM erkennbar. Diese Tendenz konnte aufgrund der stark variierenden Färberegebnisse nicht in allen Präparaten bestätigt werden.

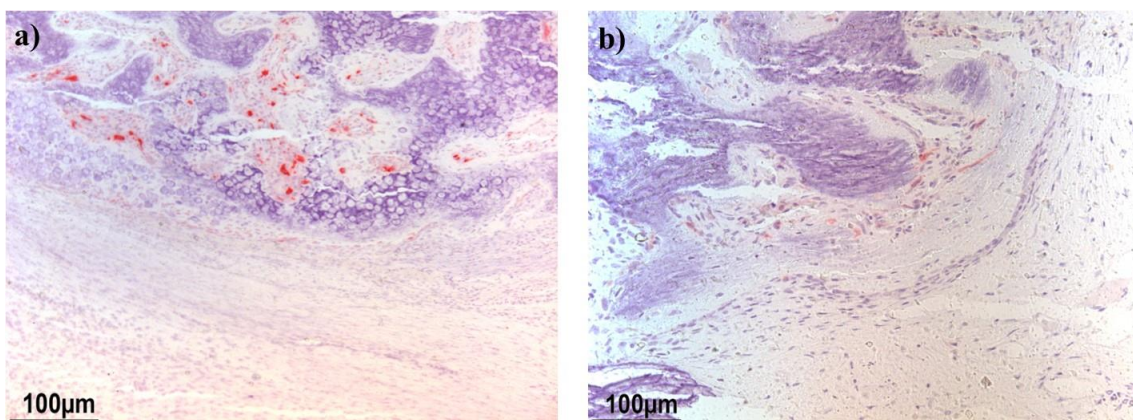


Abbildung 18 a) und b): Histologische Aufnahmen. Nachweis der TRAP. a) MK_HCM, b) MK_K. Abgebildet ist die Grenzfläche mit der rötlichen Färbung von TRAP-positiven, phagozytierenden Zellen.

Die *Abbildung 19* deutet auf das Auftreten der TRAP-positiven Zellen an Materialresten hin.

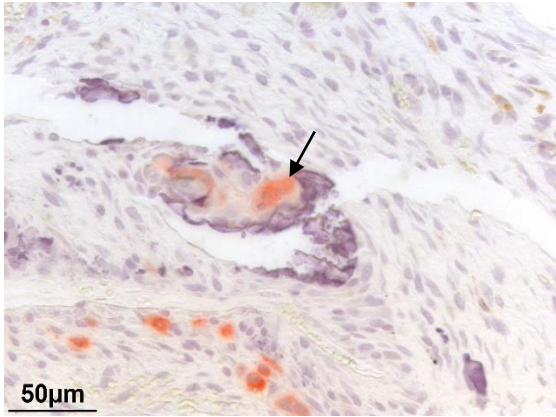


Abbildung 19: Histologische Aufnahme. Nachweis der TRAP der Materialgruppe MK_HCM. Exemplarisch abgebildet ist (→) ein Materialrest mit angrenzend TRAP-positiven Zellen.

Histomorphometrisch gezählt wurden die TRAP-positiven, mehrkernigen Zellen in der Defektregion, siehe *Abbildung 20*. Im Mittel hat der Leerdefekt ($M = 27.9$, $SD = 8.1$) die höchste Anzahl an TRAP-positiven Zellen, gefolgt von MK_HCM ($M = 6.5$, $SD = 5.7$) und MK_K ($M = 3.2$, $SD = 2.5$). Die Varianzen sind nach dem Levene-Test inhomogen ($p = .045$). Der Welch-Test, mit $F(2,9,666) = 28.116$, $p = .0001$, ergab einen hoch signifikanten Unterschied zwischen allen Gruppen. Der Games-Howell post-hoc Test zeigte einen hoch signifikanten Unterschied zwischen MK_K und dem Leerdefekt ($p = .0003$), sowie zwischen MK_HCM und dem Leerdefekt ($p = .0004$). Zwischen MK_K und MK_HCM konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden ($p = .39$). Die Streuung der Werte ist in allen Gruppen recht groß und kann dem eher unspezifischen Auftreten geschuldet sein.

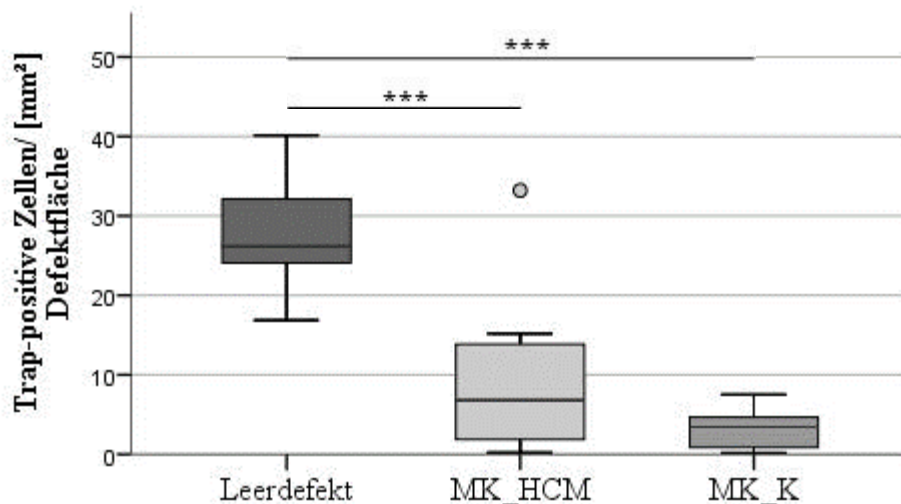


Abbildung 20: Histomorphometrische Auswertung des Nachweises der TRAP. Quotientenbestimmung: Anzahl der TRAP-positiven Zellen/ [mm²] Defektfläche. Leerdefekt n = 7, MK_HCM n = 7, MK_K n = 8. Die Sterne zeigen (*) p < 0,05; (**) p < 0,01, (***) p < 0,001.

3.4 Immunhistochemische Färbungen

3.4.1 Nachweis des Vascular Endothelial Growth Factor

Der VEGF spielt eine entscheidende Rolle bei der Angiogenese und Lymphangiogenese. Er wirkt chemoattraktiv auf die Migration von, unter anderem, Makrophagen. Enthalten im HCM kann sich VEGF entsprechend positiv auf die Zellmigration und Angiogenese im Defektbereich auswirken. Verglichen wurden insbesondere die Signalstärke des VEGF im Bereich der Materialreste der Gruppen MK_HCM und MK_K.

Auch zum Zeitpunkt sechs Wochen nach Implantation konnte in der Materialgruppe MK_HCM der Wachstumsfaktor VEGF in der Prüfsubstanz nachgewiesen werden. Die *Abbildung 21* verdeutlicht den Unterschied zu MK_K.

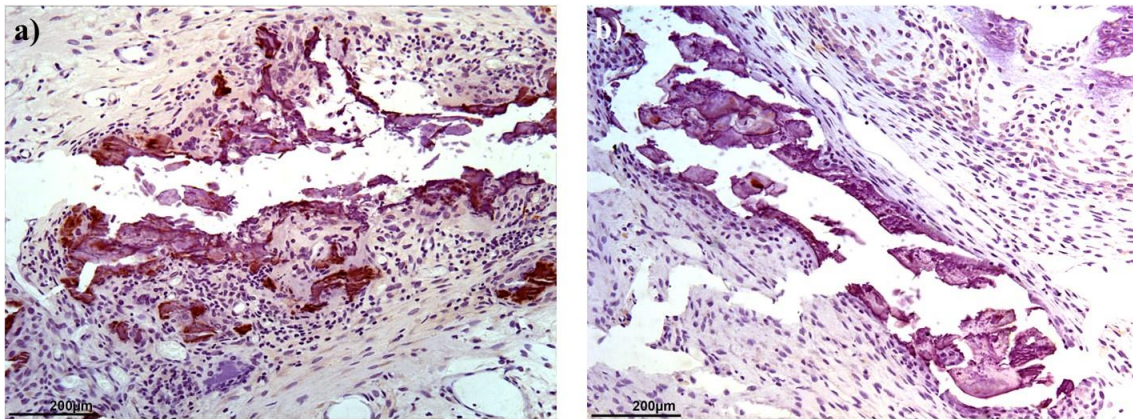


Abbildung 21 a) und b): Histologische Aufnahmen. Nachweis des VEGF. a) MK_HCM, b) MK_K. Zentral abgebildet finden sich Materialreste der Prüfsubstanz im Defektbereich. VEGF braunrot gefärbt.

Die Detailaufnahmen in *Abbildung 22* offenbaren die kräftige Färbung ubiquitär im Materialrest bei MK_HCM. Die Umgebung präsentiert sich reichlich vaskularisiert mit großen Gefäßanschnitten.

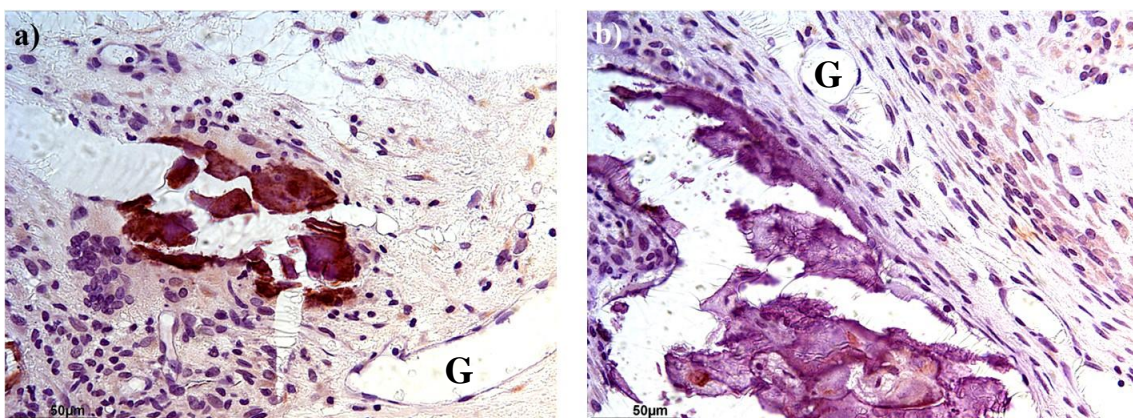


Abbildung 22 a) und b): Histologische Aufnahmen. Nachweis des VEGF braunrötlich. a) MK_HCM, b) MK_K. Exemplarisch abgebildet sind (→) Materialreste und G Gefäßanschnitte.

3.4.2 Nachweis des α -smooth-muscle Aktins

Der Antigennachweis des α -SMA markiert die Muskulatur in glatten Gefäßwänden. Etwas kräftiger ist die Färbung bei Myofibroblasten. Sie besitzen jedoch kein Lumen und können demnach gut von Gefäßanschnitten unterschieden werden.

Das sehr lockere Granulationsgewebe im Leerdefekt enthält kaum α -SMA-positive Gefäße. Interessant hinsichtlich der Fragestellung ist die Migration der Gefäße in den Defektbereich und in das Knochenersatzmaterial. Die bereits *in vitro* belegte positive

Chemotaxis [29] des HCM auf die Angiogenese konnte hier *in vivo* bestätigt werden. Mikroskopisch stellen sich in MK_HCM zahlreiche, groß- und kleinlumige Gefäße dar, siehe *Abbildung 23* und *Abbildung 24*.

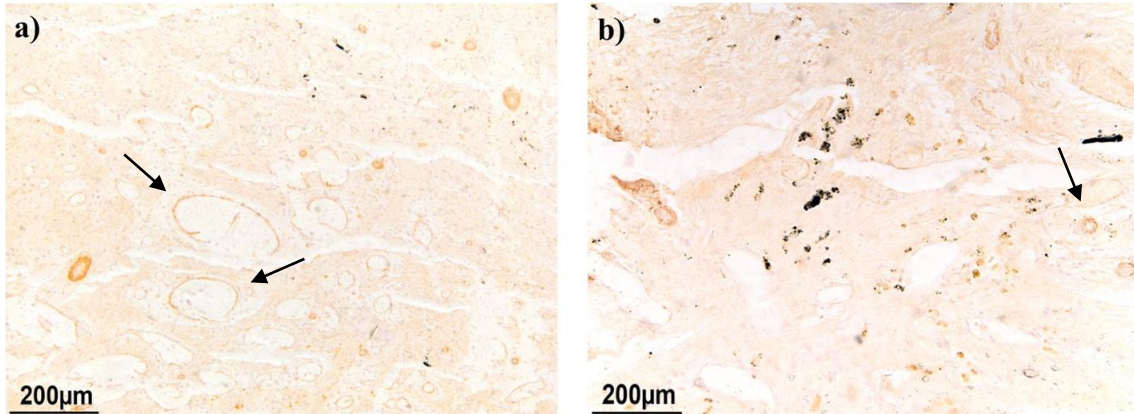


Abbildung 23: Histologische Aufnahmen. Nachweis des α -SMA. a) MK_HCM und b) MK_K. Vergleichende Darstellung der (\rightarrow) Gefäßanschnitte unter den Materialgruppen.

In der histomorphometrischen Auswertung wurden die Gefäßanschnitte mit erkennbarem Lumen mit der Defektfläche in Relation gestellt, siehe *Abbildung 24* und *Abbildung 25*.

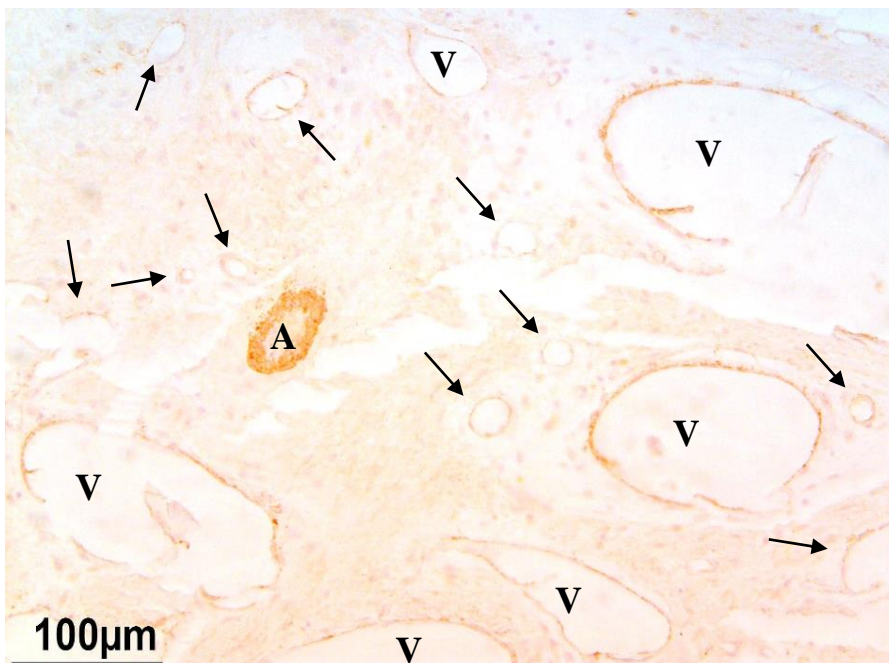


Abbildung 24: Histologische Aufnahmen. Nachweis des α -SMA in MK_HCM. Histomorphometrisch bestimmt wurden V Venöse Gefäße, A Arterielle Gefäße und (\rightarrow) weitere kleinere Gefäßanschnitte, welche noch eindeutig als Gefäß zu erkennen sind.

Wie in *Abbildung 25* erkennbar, treten in MK_HCM ($M = 43.5$, $SD = 21.5$) mehr Gefäßanschnitte pro mm^2 Defektfläche auf als in MK_K ($M = 16.7$, $SD = 78$). Bei Varianzinhomogenität, der Levene-Statistik zufolge, ergibt der robuste Welch-Test einen signifikanten Unterschied zwischen allen Gruppen ($F(1, 7.377) = 9.742$, $p = .016$). Der Games-Howell post-hoc Test deutet auf einen signifikanten Unterschied ($p=.037$) in der Anzahl der Gefäßanschnitte zwischen MK_HCM und MK_K (Mittlere Differenz = 26.8, 95%-CI[1.8, 51.7]) hin. Ein sehr signifikanter Unterschied der beiden Materialgruppen zum Leerdefekt (Signifikanzwert jeweils $p=.007$) zeichnete sich ab. Vermutlich gründet die hohe Standardabweichung in der unterschiedlichen Lage und Orientierung der Knochenanschnitte. Überdies wurde der Gefäßdurchmesser nicht mitberücksichtigt. In Materialgruppe MK_HCM ergaben sich deskriptiv vermehrt großlumige Gefäße.

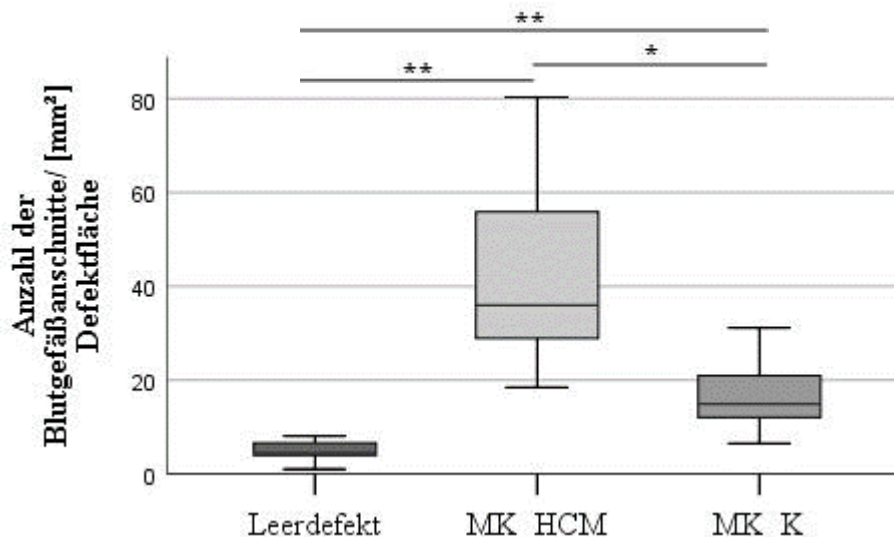


Abbildung 25: Histomorphometrische Auswertung des Nachweises von α -SMA. Quotientenbestimmung: Anzahl der Gefäßanschnitte/ $[\text{mm}^2]$ Defektfläche. Leerdefekt $n = 6$, MK_HCM $n = 7$, MK_K $n = 8$. Die Sterne zeigen () $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.*

3.4.3 Nachweis des Bone Morphogenetic Protein-2

BMP-2 kann von allen Zelltypen exprimiert werden, die an der Osteogenese beteiligt sind. Es wird mit einer osteoinduktiven Wirkung in Zusammenhang gebracht. Ein positives BMP-2 Signal konnte überwiegend intrazellulär nachgewiesen werden. Insbesondere aktive chondrogene Zellen präsentierten ein positives Signal. Histologisch offenbarte sich ein klares BMP-2 Signal an der Grenzfläche in den Materialgruppen. In

der *Abbildung 26* ist die Grenzfläche dargestellt. Am Übergang vom Knochendefekt zum intakten Knochen zeigt sich in MK_HCM ein stärkeres intrazelluläres BMP-2 Signal.

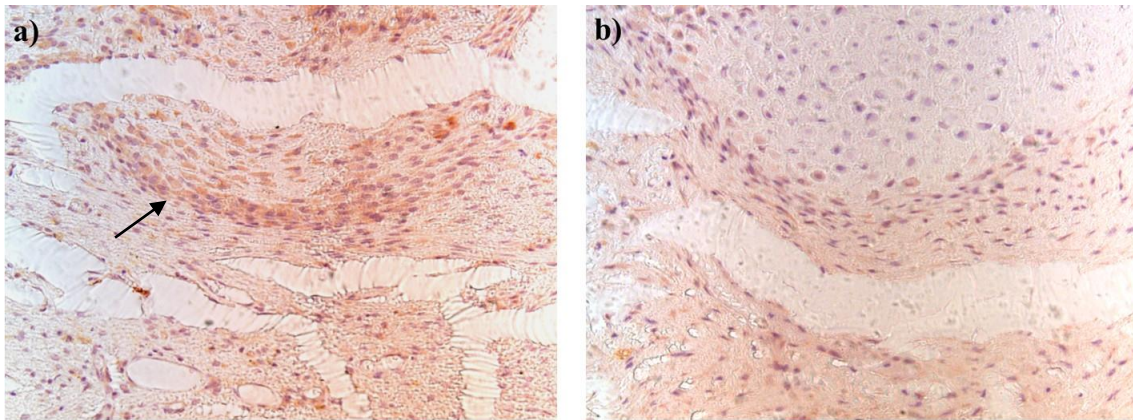


Abbildung 26: Histologische Aufnahmen. Nachweis des BMP-2. a) MK_HCM, b) MK_K. (→) Deutlicheres BMP-2 Signal an der Grenzfläche in MK_HCM.

Im Frakturdefekt der Materialgruppen konnte BMP-2 auch vermehrt unabhängig der Randstrukturen histologisch nachgewiesen werden. Auch im Frakturdefekt von MK_HCM zeigen sich Inseln mit einem stärkeren BMP-2 Signal, umgeben von Gefäßanschnitten, siehe *Abbildung 27*.

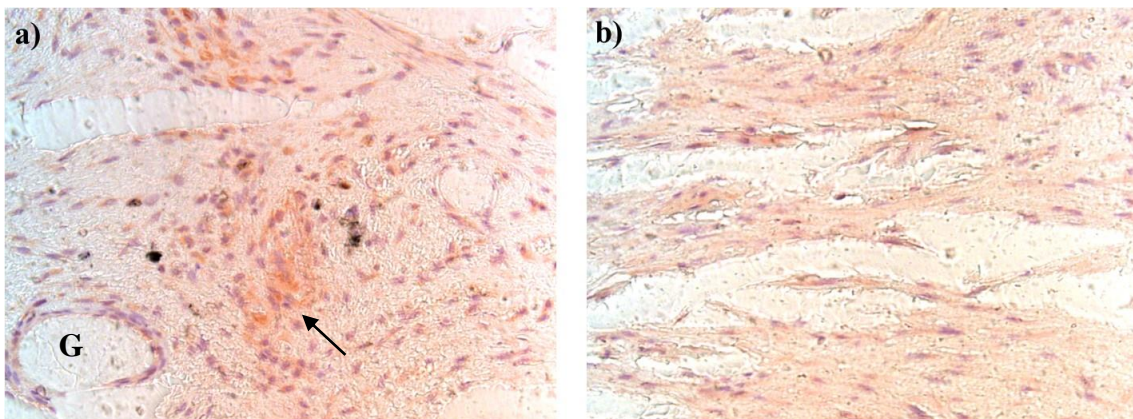


Abbildung 27: Histologische Aufnahmen. Nachweis des BMP-2. a) MK_HCM, b) MK_K. (→) Bereiche mit stärkerem intrazellulärem BMP-2 Signal und G Gefäßanschnitte.

Eine Flächenbestimmung mittels Farbcodierung ermöglicht eine Quantifizierung der Expression von BMP-2 im Defektbereich. Bestimmt wurde die BMP-2 Expressionsfläche im Verhältnis zu der Größe der Defektregion, $(\text{BMP-2 Expressionsfläche [mm}^2] / \text{Defektfläche [mm}^2]) * 100 \%$, siehe *Abbildung 28*. Bei der Überprüfung der Gleichheit

der Varianzen ergab sich eine Varianzheterogenität unter den Gruppen. Die robustere Welch-ANOVA zeigte einen signifikanten Unterschied unter den Gruppen ($F(2, 8.297) = 6.12, p = .023$). Sechs Wochen nach Implantation der Prüfsubstanz war ein signifikanter Unterschied in der BMP-2 Expression bei den Materialgruppen MK_HCM ($p = .035$) und MK_K ($p = .05$) gegenüber dem Leerdefekt deutlich, getestet wurde mit dem Games-Howell post-hoc Test.

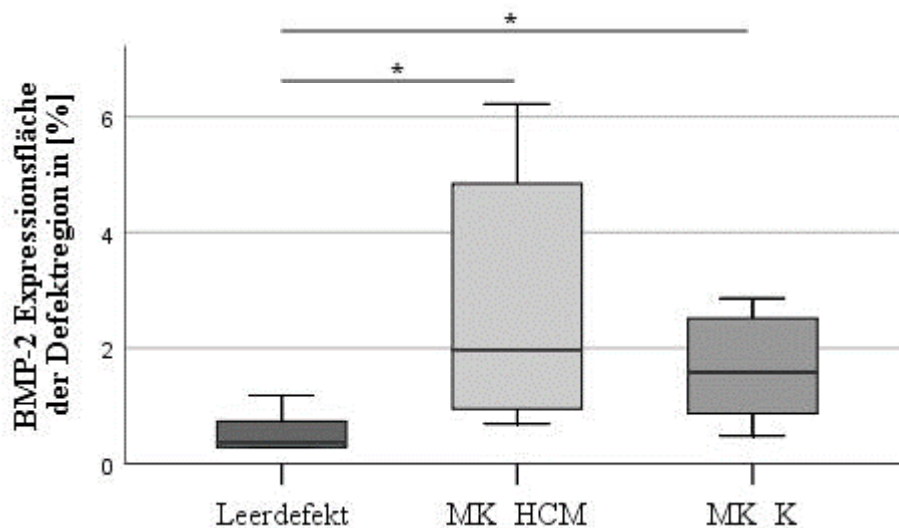


Abbildung 28: Histomorphometrische Auswertung des Nachweises des BMP-2. Quotientenbestimmung: $(\text{BMP-2 Expressionsfläche [mm}^2] / \text{Defektfläche [mm}^2]) * 100 \%$. Leerdefekt $n = 6$, MK_HCM $n = 6$, MK_K $n = 7$. Die Sterne zeigen (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

3.4.4 ED1 Antigennachweis

Die Verteilung der ED1-positiven Zellen ist im mittleren Bereich des Defekts unabhängig der vorliegenden Gruppe recht inhomogen. Gefärbt werden Osteoklasten, Monozyten, Makrophagen und neutrophile Granulozyten. Am intakten Knochen finden sich mehrkernige Osteoklasten, die sich in ihrer Form deutlich von den restlichen resorbierenden Zellen unterscheiden. An vereinzelt Materialüberständen sind noch große mehrkernige ED1-positive Zellen zu finden. Histomorphometrisch bestimmt wurden ED1-positive Zellen in Relation zur Defektfläche, $(\text{Anzahl der ED1-positiven Zellen} / \text{Defektfläche [mm}^2]) * 100 \%$. Nach der Levene-Statistik ist von einer Varianzhomogenität auszugehen mit $p = .53$. Insgesamt unterscheiden sich die Gruppen untereinander nicht signifikant in der einfaktoriellen ANOVA. Die graphische Darstellung der Anzahl an ED1-positiven Zellen unter den Gruppen ist in *Abbildung 29*

zu sehen. Die hohe Standardabweichung könnte durch das unspezifische Auftreten und die geringe Anzahl der ED-positiven Zellen begründet sein.

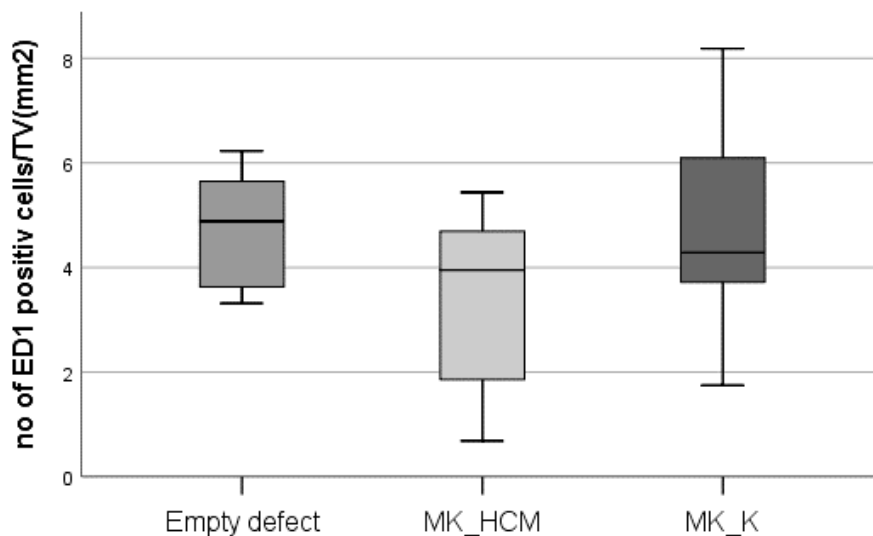


Abbildung 29: Histomorphometrische Auswertung der ED1-positiven Zellen. Quotientenbestimmung: (Anzahl der ED1-positiven Zellen / Defektfläche [mm²]) * 100 %. Leerdefekt n = 7, MK_HCM n = 8, MK_K n = 8. Die Sterne zeigen (*) p < 0,05; (**) p < 0,01, (***) p < 0,001.

Eine größere Anzahl Monozyten, Makrophagen und neutrophiler Granulozyten als Zeichen für ein verstärktes Entzündungsgeschehen trat in keiner der untersuchten Proben auf.

3.4.5 RANKL-OPG Relation

Die Osteoklastendifferenzierung ist abhängig von der Expressierung des RANKL. OPG kann dieses Protein binden und damit antagonisieren. Der Index kann somit hinweisend sein für die Osteoklastogenese.

Histomorphometrisch bestimmt wurden RANKL-positive Zellen je OPG-Expressionsfläche in Relation zur ROI, ((Anzahl der RANKL-positiven Zellen/ OPG-Expressionsfläche [mm²]) / Defektfläche [mm²]). Bei Varianzinhomogenität ergab sich eine statistische Signifikanz zwischen den Gruppen im Welch-Test, mit $F(2,8,832) = 4.473$, $p = .046$. Der Games-Howell post-hoc Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen MK_K und dem Leerdefekt ($p = .05$), sowie zwischen MK_HCM und dem Leerdefekt ($p = .05$). Zwischen MK_K und MK_HCM konnte kein signifikanter Unterschied gemessen werden ($p = .829$). (Abbildung 30)

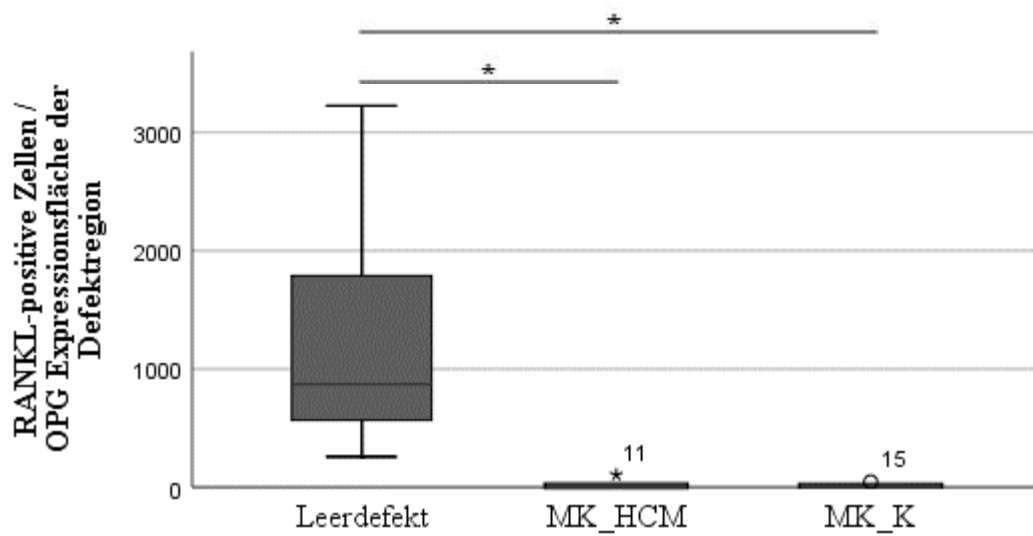


Abbildung 30: Histomorphometrische Auswertung der RANKL/OPG Relation. Quotientenbestimmung: ((Anzahl der RANKL-positiven Zellen/ OPG Expressionsfläche [mm²]) / Defektfläche [mm²]). Leerdefekt n = 7, MK_HCM n = 8, MK_K n = 8. Die Sterne zeigen (*) p < 0,05; (**) p < 0,01, (***) p < 0,001.

4 Diskussion

Die Versorgung großer Knochendefekte wird häufig zusätzlich erschwert durch die reduzierte Regenerationskapazität osteoporotischen Knochens. Das In-situ-Tissue-Engineering bietet ein großes Potential in der Entwicklung geeigneter Scaffolds, welche eine Knochendefektheilung ermöglichen und diese beschleunigen sollen. Bislang war der Einsatz oft limitiert durch die fehlende Nährstoffversorgung im Inneren der Scaffolds durch fehlende Vaskularisierung. Ein neues Konzept soll die Stimulation der Angiogenese und damit eine beschleunigte Knochendefektheilung ermöglichen. Auf der Grundlage mineralisierter Kollagene werden die Scaffolds mit einem Wachstumsfaktorgemisch funktionalisiert. Mesenchymale Stammzellen wurden hypoxischen Bedingungen ausgesetzt und sezernierten darunter parakrin wirkende Wachstumsfaktoren. Die chemotaktische und angiogene Wirkung auf die Knochenheilung soll in dieser Studie *in vivo* untersucht werden.

4.1 Das In situ-Tissue-Engineering-Konzept

In dem in situ-Tissue Engineering Konzept des SFB/ Transregio 79 soll die Zellmigration und die Vitalisierung des Knochendefekts durch die Anpassung der Trägermaterialien und den Einsatz von Chemokinen verbessert werden. Knochenersatzmaterialien können die extrazelluläre Matrix von gesundem Knochen imitieren. In den letzten Jahren haben die Bedeutung und der Einsatz von MSC immer weiter zugenommen. Die Proliferation der MSC bildet die Grundlage der Knochenbildung [55, 93]. Es konnte gezeigt werden, dass die Regeneration im Knochendefekt mittels MSC in Verbindung mit einer Leitstruktur ebenso effektiv sein kann wie durch den Einsatz einer allogenen Spongiosaplastik [48]. Die Migration der MSC ist induzierbar durch Chemokine. Wichtige Vertreter sind unter anderem VEGF, PDGF, BMP-4, BMP-7, Il-8 und IGF-1 [61]. Die gute osteokonduktive Wirkung allogener Knochentransplantate wird ebenfalls auf die Präsenz dieser Chemokine zurückgeführt [75]. Die Leitstruktur für die Prüfsubstanz ist ein mit Heparin modifiziertes Mineralisiertes Kollagen, weiter als Scaffold bezeichnet. In vorangegangenen Studien konnten die positiven Effekte des speziellen Scaffolds auf die Proliferation und Differenzierung von MSC, sowie die

Fähigkeit der kontinuierlichen Freisetzung von Chemokinen nachgewiesen werden [6, 44, 67].

Auch für sich genommen können MSC-Zytokine und Wachstumsfaktoren mit chemokinen Eigenschaften sezernieren. Im sogenannten konditionierten Medium sollen MSC unter hypoxischen Bedingungen diese Faktoren sezernieren. Positive Resultate dieses HCM zeigten sich *in vitro* in einer starken chemoattraktiven Kapazität und einem positiven Einfluss auf die Angiogenese im Scaffold. Gegenüber dem rein rekombinanten VEGF besitzt HCM eine höhere chemoattraktive Kapazität [29].

4.2 Das Knochendefektmodell

Das Tiermodell der Ratte hat sich in der Vergangenheit für Studien bezüglich der Knochenheilung etabliert. Eine besondere klinische Relevanz stellen Frakturen im Bereich der Metaphyse am osteoporotisch erkrankten Röhrenknochen dar. Die Entwicklung des Knochendefekts orientiert sich an der Problemstellung der Osteosynthese osteoporotischen Knochens und der fehlenden Knochensubstanz. Adressierend wurde ein keilförmiger Knochendefekt kritischer Größe gewählt. Eine Knochenheilung kann bei einem Defekt kritischer Größe ohne Osteosynthesematerial nicht suffizient erfolgen. Die Angaben verschiedener Studien bezüglich der kritischen Defektgröße am metaphysären Rattenfemur weichen zwischen 4 und 5 mm ab [4, 65]. Diese Studie nimmt einen Spalt von 4 mm als kritische Defektgröße an. Relativierend wurde in dieser Studie der Vergleich zur Gruppe Leerdefekt gestellt. Die Ovariectomie zwölf Wochen vor Implantation und anschließende Mangeldiät diente der signifikanten Reduktion der Knochendichte [23, 37, 83]. Zudem wurde eine erhöhte Aktivität von RANKL, sowie eine erniedrigte Expression von ALP festgestellt [27]. Die Größenordnung der Reduktion der Knochendichte ähnelt derer osteoporotischen Knochens am Menschen [74].

4.3 Hypoxie-konditioniertes Medium

In den letzten Jahren hat die Bedeutung der Aktivität der MSC unter hypoxischen Bedingungen zugenommen. Das HCM ist Gegenstand zahlreicher Studien. Definiert werden die hypoxischen Bedingungen in der Regel mit einem Sauerstoffgehalt von 1% -

10% [51]. Bekannt ist, dass die MSC darunter in der Lage sind diverse Wachstumsfaktoren, sowie anti-entzündlich und anti-apoptotisch wirkende Faktoren zu sezernieren. Die Charakterisierung der maßgebenden Chemokinen ist hier wegweisend. Eine entscheidende Rolle bei der Migration von MSC spielen unter anderem HMGB1, IL-11, sVCAM-1, SDF-1 α [31, 32]. VEGF und PDGF könnten entscheidend sein für die beschriebene angiogene Wirkung des HCM. Gegenüber rein rekombinanten Faktoren ist die Kultivierung des HCM potentiell kostengünstiger und zeitsparender [29].

4.4 Vaskularisierung, die Grundlage der Knochenbildung

Die Proliferation der MSC bildet die Grundlage der Knochenbildung. Die Voraussetzungen hierfür sind die Vitalisierung des Knochendefektes. Die kritische Defektgröße bei darüber hinaus osteoporotischem Knochen bildet hier die Limitation. Bei fehlender Vaskularisierung im Knochendefekt weisen diverse Studien auf eine signifikant geringere Osteoblastogenese und knöchernen Durchbau hin [50, 77]. Im Hinblick auf die zweite Fragestellung stellte sich die Hypothese der besseren Vaskularisierung durch die osteokonduktive Wirkung des Scaffolds und vermutete angiogene Wirkung des HCM. Zum Zeitpunkt sechs Wochen nach Implantation ist von einer nahezu vollständigen Resorption des Scaffolds auszugehen. An verbliebenen Materialresten der Gruppe MK_HCM konnte der VEGF immunhistochemisch nachgewiesen werden. In der Kontrollgruppe MK_K blieb ein positives Signal am Materialrest aus.

Der VEGF und weitere Wachstumsfaktoren des HCM haben einen guten Einfluss auf die Angiogenese und Lymphangiogenese [52]. Dies bestätigte sich in den Ergebnissen der Studie. Im Defektbereich von MK_HCM gegenüber MK_K konnten signifikant mehr Gefäßanschnitte mittels Darstellung von α -SMA nachgewiesen werden. Gegenüber der Gruppe des Leerdefekts bestätigte sich die gute osteokonduktive Wirkung des Scaffolds. Im Leerdefekt war die Vaskularisierung signifikant geringer als in den Materialgruppen. Das hochporöse Heparin-modifizierte MK stellt somit ein geeignetes Knochenersatzmaterial im Knochendefekt dar. Die Porosität des Scaffolds erlaubt die Einwanderung der Blutgefäße, der Heparin Gehalt ermöglicht gleichzeitig die Elution der Wachstumsfaktoren [13, 13, 67, 92].

Ohne die osteokonduktive Wirkung des Scaffolds bei einem Knochendefekt kritischer Größe sind ein Zellularuntergang im Defektbereich und ein vermehrter Knochenabbau an der

Grenzfläche zu erwarten. Entsprechend konnten vermehrt TRAP-positive Zellen, phagozytierende Zellen wie Osteoklasten, an der Grenzfläche im Leerdefekt nachgewiesen werden. Insgesamt waren auch im Defektbereich in den Materialgruppen hoch signifikant weniger phagozytierende Zellen nachweisbar. Der überwiegende Knochenabbau bestätigt die insuffiziente Knochenheilung im Knochendefekt kritischer Größe. Die Aussagekraft des Nachweises der TRAP unter den Materialgruppen scheint nur eingeschränkt möglich, bei geringem Auftreten von phagozytierenden Zellen im Defektbereich und großer Streubreite.

4.5 Die Knochenneubildung

Die Explantation der Rattenfemura zur histologischen Untersuchung erfolgte sechs Wochen nach Setzung des Knochendefektes. Der gewählte Zeitpunkt entsprach demselben in Voruntersuchungen am gleichen Knochendefektmodell [4, 49, 68, 69, 84, 85]. Eine Vergleichbarkeit ist hier möglich. Die Knochenheilung verläuft über viele Etappen und kann in entsprechender Versuchsanordnung nicht in der Gesamtheit betrachtet werden. Insbesondere die abgeschlossene Knochenheilung und Belastbarkeit sollten klinisch weiter untersucht werden. Sechs Wochen nach Implantation der Prüfsubstanz wurde bei dem Defekt kritischer Größe ein vergleichsweise frühes Stadium der knöchernen Heilung gesehen. Der Versuchszeitpunkt erlaubt Rückschlüsse auf die enchondrale Ossifikation, sowie die Migration und Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten im Defektbereich. Grund hierfür ist auch die fortgeschrittene Resorption der Prüfsubstanz. Der gewählte Zeitpunkt kann als geeignet betrachtet werden für die Beurteilung der beginnenden knöchernen Heilung unter den Versuchsgruppen. Ein früherer Versuchszeitpunkt würde hingegen Rückschlüsse auf das Verhalten des Implantatmaterials erlauben.

Das BMP-2 fördert die Proliferation von MSC in Chondrozyten und Osteoblasten [11]. An der Grenzfläche und in der ROI konnte in MK_HCM ein stärkeres Signal des BMP-2 nachgewiesen werden. Die gemessenen Areale entsprechen der intrazellulären Expression des BMP-2. Eine Quantifizierung der Stärke des Signals war somit nur deskriptiv möglich.

Die gemessene BMP-2 Expressionsfläche unterscheidet sich in den Materialgruppen nicht signifikant. Dies unterstreicht die Funktion des Mineralisierten Kollagens die MSC

in ihrer Proliferation und Differenzierung zu unterstützen. Durch den porösen Aufbau des Mineralisierten Kollagens wird eine beschleunigte Migration und Stabilisierung des Granulationsgewebes erwartet. Das Mineralisierte Kollagen unterstützt in beiden Materialgruppen die BMP-2 Expression.

Bei suffizienter Gefäßbildung in den Materialgruppen gelang der Nachweis von Osteoprogenitorzellen und Osteoblasten in der ROI. Die Osteoblastenaktivität ist signifikant höher in MK_HCM gegenüber den beiden Kontrollgruppen. Die Differenzierung der Osteoblasten ist entscheidend für die Bildung der Knochenmatrix, dem Osteoid. Die Osteoidareale entsprechen durch die Mineralisierung jungem Knochen. Das Implantat mit HCM präsentierte hier deutlich mehr Osteoidfläche verglichen mit der Kontrollgruppe. Die Mineralisierung der Knorpel und Osteoidareale ist eine Voraussetzung für die Stabilität des Knochens. Sichtbar wurde eine deutlich stärkere Mineralisierung in MK_HCM.

Zusammenfassend war die knöcherne Durchbauung in MK_HCM zum Versuchszeitpunkt sechs Wochen nach Implantation am weitesten fortgeschritten.

4.6 Knochen – Aufbau und Abbau, das Gleichgewicht

Der gesunde Knochen befindet sich in ständigem Umbau. Knochenauf- und -abbau halten sich die Waage. Der osteoporotische Knochen hingegen bietet eine hohe Osteoklastenaktivität bei zu geringer Osteoblastenaktivierung. Der Knochenabbau überwiegt. Für die Osteoklastogenese ist RANKL entscheidend. Das OPG verhindert die übermäßige Knochenresorption, indem es RANKL bindet und inaktiviert. Differenzierte Osteoblasten produzieren das OPG [12]. Insbesondere bei der Knochendefektheilung ist somit die Osteoblastenaktivierung entscheidend. Im Leerdefekt spiegelt sich das fehlende Leitgerüst im Hinblick auf die signifikant erhöhte RANKL/OPG Ratio wider. Die deutlich erhöhte Osteoklastenaktivierung fördert den Knochenabbau im Leerdefekt. Das Ergebnis bestätigt die erwartete osteokonduktive Wirkung des Scaffolds.

An den Grenzflächen treten im Leerdefekt viele differenzierte Osteoklasten auf. Das Verhältnis der Osteoblasten- und Osteoklastenhäufigkeit ist ohne Implantat vermehrt aufseiten des Knochenabbaus. Die Tendenz gleicht osteoporotischen Knochenverhältnissen. Ein Schaubild in *Abbildung 31* soll das verdeutlichen. Die Anzahl der Zellen beeinflusst das Gleichgewicht der Waage, genauso wie die Aktivität der

Zellen. Im Bild soll dies durch das Gewicht der Blöcke verdeutlicht werden. MK_HCM weist im Mittel am meisten Osteoblasten auf und mehr Osteoklasten als MK_K. Knochenabbau und Knochenaufbau korrelieren in dem Fall.

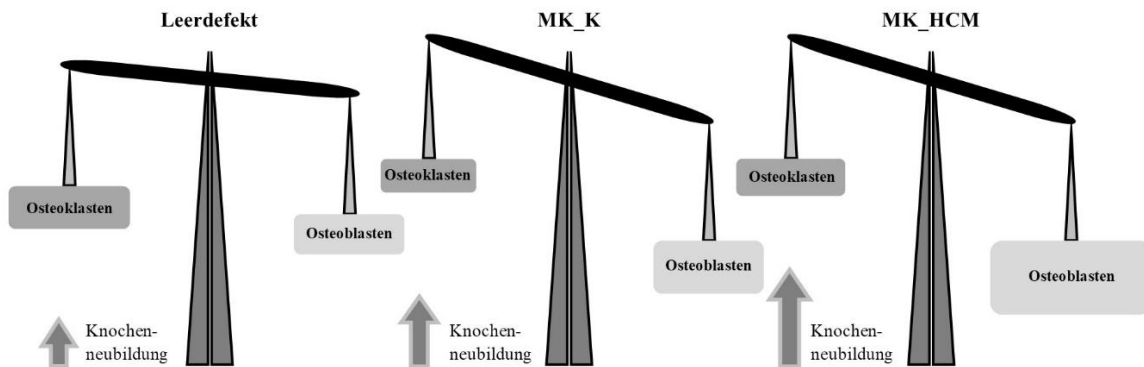


Abbildung 31: Schaubild Waage des Knochenauf- und -abbaus während der Defektheilung. Die Größe der Blöcke entspricht der Anzahl der aktiven Zellen. Das Gewicht soll die Aktivität und den Grad der Differenzierung verdeutlichen.

4.7 Anwendbarkeit

Für die klinische Relevanz erheblich sind die einfache Anwendbarkeit in der Praxis, die Kostenfrage und die Verfügbarkeit. Die autologe Spongiosaplastik ist weiterhin der Goldstandard in der Behandlung knöcherner Defekte. Wie eingangs erwähnt ist dieses Verfahren jedoch limitiert in der Anwendung, insbesondere bei degenerativen Knochenerkrankungen. Auch das allogene Knochentransplantat ist durch viele Aspekte keine vergleichbare Alternative. Die gute osteoinduktive und -konduktive Wirkung kann durch das Sterilisationsverfahren gemindert sein [39, 91]. Ein großer Kostenpunkt dabei ist die Unterhaltung der Knochenbank. Potenziell infektiöse Krankheiten könnten in seltenen Fällen übertragen werden [14]. Zudem gilt es mögliche immunologische Reaktionen zu beachten [64]. Für eine Aussage zu der Verträglichkeit der Prüfsubstanz mit HCM bedarf es Langzeitstudien in größerem Stichprobenumfang in klinischer Anwendung. Bei den Versuchstieren dieser Untersuchung gab es keinen Hinweis auf eine Abstoßungsreaktion oder ein verstärktes Entzündungsverhalten. Die Verfügbarkeit des untersuchten Scaffolds ist durch die synthetische Herstellung unbegrenzt. Gegenüber der notwendigen Prüfregister und der aufwendigen Aufarbeitung autologer Plastiken kann sich hier ein Kostenvorteil ergeben [29]. Der Transport und die Lagerung der Scaffolds sind gekühlt bei 4°C möglich. Durch die poröse Struktur ist die Einpassung des Scaffolds

in den Knochendefekt problemlos möglich. Eine (Platten-)Osteosynthese für die Stabilisierung der Knochenfragmente ist weiterhin erforderlich.

4.8 Ausblick

Für die Anwendung des HCM im großen Maßstab wäre es notwendig, ein standardisiertes Verfahren für die Gewinnung und Vermehrung der MSC zu etablieren.

Im Hinblick auf das Materialverhalten kann eine Untersuchung zu einem früheren Versuchszeit nach Implantation der Prüfsubstanz hilfreich sein. Weiterhin sollten sich biomechanische Untersuchungen nach knöcherner Durchbauung anschließen. Die aktuellen Ergebnisse lassen vermuten, dass eine langsamere Degradation des Knochenmaterials von Vorteil sein könnte. Die Hypothese wäre, dass die gute osteokonduktive und -induktive Wirkung des MK_HCM durch eine verzögerte Degradation länger anhält und die induzierte knöcherne Heilung auch nach dem in dieser Studie dargestellten Versuchszeitpunkt ermöglicht wird.

5 Zusammenfassung

Die Frakturversorgung des osteoporotisch erkrankten Knochens ist nach wie vor eine große Herausforderung und ist oft limitiert durch die reduzierte Regenerationskapazität. Das In-situ-Tissue-Engineering-Konzept soll die Zellmigration und die Vitalisierung des Knochendefekts durch spezielle Knochenersatzmaterialien verbessern.

Auf der Grundlage des biomimetischen Scaffolds aus Mineralisiertem Kollagen findet das Hypoxie-konditionierte Medium Anwendung. Gewonnen wird letzteres mittels einer hypoxischen Konditionierung Mesenchymaler Stammzellen. Der Einfluss des Hypoxie-konditionierten Mediums auf die knöcherne Heilung wurde bei osteoporotisch-metaphysären Frakturdefekten an Rattenfemura getestet und immunhistologisch und histomorphometrisch untersucht.

Der positive Effekt der Prüfsubstanz auf die Zellmigration und Osteoblastenaktivität konnte bestätigt werden. Die Osteoidbildung und Mineralisierung des Gewebes waren signifikant erhöht.

Die *in vitro* untersuchte angiogene Wirkung konnte in dieser Studie bestätigt werden. Der unter anderem im Hypoxie-konditionierten Medium enthaltene vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF konnte auch zum Versuchszeitpunkt sechs Wochen nach Implantation an Materialresten nachgewiesen werden. Die Vaskularisierung zeigte sich signifikant erhöht.

Der Einsatz des Hypoxie-konditionierten Mediums in Knochenersatzmaterialien verspricht eine verbesserte Knochendefektheilung bei Osteoporose. Ziel in kommenden Studien ist es den klinischen Einsatz zu ebneten.

6 Summary

Fracture treatment of osteoporotic bone remains a major challenge and is often limited by reduced regenerative capacity. The in-situ tissue engineering concept aims to improve cell migration and vitalization of the bone defect using specialized bone graft substitutes. Based on the biomimetic scaffold of mineralized collagen, the hypoxia-conditioned media is applied. The latter is obtained by hypoxic conditioning of the mesenchymal stem cells. The influence of the hypoxia-conditioned media on bone healing was tested in osteoporotic-metaphyseal fracture defects in rat femurs and investigated immunohistologically and histomorphometrically.

The positive effect of the bone graft on cell migration and osteoblast activity was confirmed. Osteoid formation and mineralization of the tissue were significantly increased.

The angiogenic effect investigated *in vitro* was confirmed in this study. The vascular endothelial growth factor VEGF, which is contained in the hypoxia-conditioned media, could also be detected on material remnants at the time point six weeks after implantation. Vascularization was shown to be significantly increased.

The use of the hypoxia-conditioned media in bone graft substitutes promises improved healing of bone defects which occur in osteoporosis. The goal in upcoming studies is to pave the way for clinical use.

7 Abkürzungs-, Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

ALP Alkalische Phosphatase

BMP Bone-morphogenetic protein

DEXA Dual Energy X-Ray Absorptiometry

ED1 Anti-CD68 Antikörper

Grenzfläche Übergangsbereich von intaktem Knochen zur Defektregion

HCM Hypoxie-konditioniertes Medium

HMGB1 High mobility group box 1

IGF-1 Insulin-like growth factor

IL-8 Interleukin-8

IL-11 Interleukin-11

MK Mineralisiertes Kollagen

MSC Mesenchymalen Stammzellen

OPG Osteoprotegerin

PDGF Platelet-derive growth factor

RANK Receptor Activator of NF- κ B

RANKL Receptor Activator of NF- κ B Ligand

ROI Region of interest

SDF-1 α Stromal cell-derived factor 1

sVCAM-1 Soluble vascular cell adhesion molecule 1

TRAP Tartrat-resistente saure Phosphatase

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

V1 Versuchszeitpunkt Setzung der Femurdefektfraktur

V2 Versuchszeitpunkt Explantation des operierten Femurs

α -SMA Alpha-Smooth Muscle Actin

Abbildung 1: Knochendefektmodell. Metaphysär, keilförmiger Frakturdefekt am distalen Femur. Versorgung mittels Plattenosteosynthese.	4
Abbildung 2 a) und b): Scaffold-Herstellung	10
Abbildung 3 a) und b): Setzung des Frakturdefekts, Implantation der Prüfsubstanz, Plattenosteosynthese.....	14
Abbildung 4 a) und b): Femurexplantat zum Versuchszeitpunkt V2 nach Entfernung des Osteosynthesematerials	15
Abbildung 5 a) und b): Dünnschnitt-Technik.....	17
Abbildung 6: Histomorphometrische Untersuchung. Festlegung der (→) ROI. Übersichtsaufnahme der Movat-Pentachromfärbung.....	30
Abbildung 7 a) - c): Histologische Übersichtsaufnahmen. Movat-Pentachromfärbung.	33
Abbildung 8: Histomorphometrische Auswertung der Movat-Pentachromfärbung.....	34
Abbildung 9 a) und b): Histologische Aufnahmen. Movat-Pentachromfärbung.....	34
Abbildung 10 a) und b): Histologische Aufnahmen. Movat-Pentachromfärbung. Darstellung der Mineralisierungszone im Defektbereich.....	35
Abbildung 11: Histologische Aufnahme. Movat-Pentachromfärbung	36
Abbildung 12 a) - c): Histologische Übersichtsaufnahmen. Versilberung nach von Kossa/van Gieson.....	36
Abbildung 13 a) und b): Histologische Aufnahmen. Versilberung nach von Kossa/ van Gieson.....	37
Abbildung 14: Histologische Aufnahmen. Versilberung nach von Kossa/ van Gieson. Gruppe MK_HCM	37
Abbildung 15: Histomorphometrische Auswertung der Versilberung nach von Kossa/ von Gieson.....	38
Abbildung 16 a) – c): Histologische Aufnahmen. Nachweis der ALP.....	39
Abbildung 17: Histomorphometrische Auswertung des Nachweises der ALP	40
Abbildung 18 a) und b): Histologische Aufnahmen. Nachweis der TRAP.....	40
Abbildung 19: Histologische Aufnahme. Nachweis der TRAP der Materialgruppe MK_HCM	41
Abbildung 20: Histomorphometrische Auswertung des Nachweises der TRAP	42
Abbildung 21 a) und b): Histologische Aufnahmen. Nachweis des VEGF	43

Abbildung 22 a) und b): Histologische Aufnahmen. Nachweis des VEGF braunrötlich.	43
Abbildung 23: Histologische Aufnahmen. Nachweis des α -SMA	44
Abbildung 24: Histologische Aufnahmen. Nachweis des α -SMA in MK_HCM.....	44
Abbildung 25: Histomorphometrische Auswertung des Nachweises von α -SMA.....	45
Abbildung 26: Histologische Aufnahmen. Nachweis des BMP-2.....	46
Abbildung 28: Histomorphometrische Auswertung des Nachweises des BMP-2.....	47
Abbildung 29: Histomorphometrische Auswertung der ED1-positiven Zellen	48
Abbildung 30: Histomorphometrische Auswertung der RANKL/OPG Relation.....	49
Abbildung 31: Schaubild Waage des Knochenauf- und -abbaus während der Defektheilung	55

Tabelle 1: Herstellung der Gebrauchslösungen.....	16
Tabelle 2: Färbeprotokoll Movat-Pentachromfärbung.....	18
Tabelle 3: Färbeprotokoll Versilberung nach von Kossa/van Gieson.....	20
Tabelle 4: Färbeprotokoll ALP.....	21
Tabelle 5: Färbeprotokoll TRAP	22
Tabelle 6: Färbeprotokoll BMP-2	23
Tabelle 7: Färbeprotokoll VEGF.....	25
Tabelle 8: Färbeprotokoll RANKL	26
Tabelle 9: Färbeprotokoll α -SMA	27
Tabelle 10: Färbeprotokoll OPG	28
Tabelle 11: Färbeprotokoll ED-1	29
Tabelle 12: Explantate mit Plattenbrüchen	32

8 Literaturverzeichnis

1. Abrahamsen, B., Osmond, C., & Cooper, C. (2015). Life Expectancy in Patients Treated for Osteoporosis: Observational Cohort Study Using National Danish Prescription Data. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 30(9), 1553–1559.
2. Ai-Aql, Z. S., Alagl, A. S., Graves, D. T., Gerstenfeld, L. C., & Einhorn, T. A. (2008). Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *Journal of dental research*, 87(2), 107–118.
3. Albrektsson, T. (1980). The healing of autologous bone grafts after varying degrees of surgical trauma. A microscopic and histochemical study in the rabbit. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 62(3), 403–410.
4. Alt, V., Thormann, U., Ray, S., Zahner, D., Durselen, L., Lips, K., et al. (2013). A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures. *Acta biomaterialia*, 9(6), 7035–7042.
5. Bernhardt, A., Lode, A., Mietrach, C., Hempel, U., Hanke, T., & Gelinsky, M. (2009). In vitro osteogenic potential of human bone marrow stromal cells cultivated in porous scaffolds from mineralized collagen. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 90(3), 852–862.
6. Bernhardt, A., Lode, A., Mietrach, C., Hempel, U., Hanke, T., & Gelinsky, M. (2009). In vitro osteogenic potential of human bone marrow stromal cells cultivated in porous scaffolds from mineralized collagen. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 90(3), 852–862.
7. Biberthaler, P., & van Griensven, M. (2017). *Knochendefekte und Pseudarthrosen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
8. Blümel, G. (1970). Fibrinolytische Aktivitäten und deren Hemmung im Frakturhämatom mit Beeinflussung der Knochenbruchheilung. *European Surgery*, 2(4), 122–133.

9. 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.
10. Borgström, F., Zethraeus, N., Johnell, O., Lidgren, L., Ponzer, S., Svensson, O., et al. (2006). Costs and quality of life associated with osteoporosis-related fractures in Sweden. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 17(5), 637–650.
11. Bostrom, M. P., Lane, J. M., Berberian, W. S., Missri, A. A., Tomin, E., Weiland, A., et al. (1995). Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 13(3), 357–367.
12. Boyce, B. F. (2007). *Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin* .
13. Bradt J-H et al. Biomimetic Mineralization of Collagen by Combined Fibril Assembly and Calcium Phosphate Formation. *Chem Mater*, 1999(11), 2694–2701.
14. Buck et al. (1989). Bone transplantation and human immunodeficiency virus. An estimate of risk of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Clinical orthopaedics and related research*, (240), 129–136.
15. Cen, L., Liu, W., Cui, L., Zhang, W., & Cao, Y. (2008). Collagen tissue engineering: Development of novel biomaterials and applications. *Pediatric research*, 63(5), 492–496.
16. Chai, B., Tang, X., & Li, H. (1997). Ultrastructural investigation of calcification and ossification in experimental fracture healing with special reference to osteogenic role of fibroblasts. *Chinese medical journal*, 110(4), 274–278.
17. Chevallay, B., & Herbage, D. (2000). Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: Applications for tissue engineering and gene therapy. *Medical & biological engineering & computing*, 38(2), 211–218.
18. Cockerill, W., Lunt, M., Silman, A. J., Cooper, C., Lips, P., Bhalla, A. K., et al. (2004). Health-related quality of life and radiographic vertebral fracture. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between*

the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA, 15(2), 113–119.

19. Compton, J. T., & Lee, F. Y. (2014). A review of osteocyte function and the emerging importance of sclerostin. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 96(19), 1659–1668.
20. (1993). Consensus development conference: Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis. *The American journal of medicine*, 94(6), 646–650.
21. Currey, J. D. (2002). *Bones: Structure and mechanics* (2nd edn). Princeton, NJ: Princeton University Press.
22. Dachverband Osteologie (2017). Prophylaxe, Diagnostik und Therapie der Osteoporose: Leitlinie des Dachverbands der Deutschsprachigen Wissenschaftlichen Osteologischen Gesellschaften e.V.
23. Danielsen, C. C., Mosekilde, L., & Svenstrup, B. (1993). Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. *Calcified tissue international*, 52(1), 26–33.
24. Einhorn, T. A. (2005). The science of fracture healing. *Journal of orthopaedic trauma*, 19(10 Suppl), S4-6.
25. Einhorn, T. A., & Gerstenfeld, L. C. (2015). Fracture healing: Mechanisms and interventions. *Nature reviews. Rheumatology*, 11(1), 45–54.
26. Einhorn, T. A., & Lee, C. A. (2001). Bone regeneration: New findings and potential clinical applications. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 9(3), 157–165.
27. El Khassawna, T., Böcker, W., Govindarajan, P., Schliefer, N., Hürter, B., Kampschulte, M., et al. (2013). Effects of multi-deficiencies-diet on bone parameters of peripheral bone in ovariectomized mature rat. *PloS one*, 8(8), e71665.
28. Fuchs J, Scheidt-Nave C, Kuhnert R (2017). 12-Monats-Prävalenz von Osteoporose in Deutschland. *Journal of Health Monitoring*, (2(3)), 61–65.

29. Gabrielyan, A., Knaak, S., Gelinsky, M., Arnhold, S., & Rösen-Wolff, A. (2014). Hypoxia-conditioned media allows species-specific attraction of bone marrow stromal cells without need for recombinant proteins. *BMC veterinary research*, 10, 56.
30. Gabrielyan, A., Neumann, E., Gelinsky, M., & Rösen-Wolff, A. (2017). Metabolically conditioned media derived from bone marrow stromal cells or human skin fibroblasts act as effective chemoattractants for mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy*, 8(1), 212.
31. Gabrielyan, A., Neumann, E., Gelinsky, M., & Rösen-Wolff, A. (2017). Metabolically conditioned media derived from bone marrow stromal cells or human skin fibroblasts act as effective chemoattractants for mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy*, 8(1), 212.
32. Gabrielyan, A., Quade, M., Gelinsky, M., & Rösen-Wolff, A. (2020). IL-11 and soluble VCAM-1 are important components of Hypoxia Conditioned Media and crucial for Mesenchymal Stromal Cells attraction. *Stem cell research*, 45, 101814.
33. Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T., & Einhorn, T. A. (2003). Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of cellular biochemistry*, 88(5), 873–884.
34. Giannoudis, P. V., Einhorn, T. A., & Marsh, D. (2007). Fracture healing: The diamond concept. *Injury*, 38 Suppl 4, S3-6.
35. Goldhahn, J., Suhm, N., Goldhahn, S., Blauth, M., & Hanson, B. (2008). Influence of osteoporosis on fracture fixation--a systematic literature review. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 19(6), 761–772.
36. Harley, B. A., Lynn, A. K., Wissner-Gross, Z., Bonfield, W., Yannas, I. V., & Gibson, L. J. (2010). Design of a multiphase osteochondral scaffold. II. Fabrication of a mineralized collagen-glycosaminoglycan scaffold. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 92(3), 1066–1077.

37. Heiss, C., Govindarajan, P., Schlewitz, G., Hemdan, N. Y. A., Schliepke, N., Alt, V., et al. (2012). Induction of osteoporosis with its influence on osteoporotic determinants and their interrelationships in rats by DEXA. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 18(6), BR199-207.
38. Hoang-Kim, A., Gelsomini, L., Luciani, D., Moroni, A., & Giannini, S. (2009). Fracture healing and drug therapies in osteoporosis. *Clinical cases in mineral and bone metabolism : the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*, 6(2), 136–143.
39. Hofmann, A. (2004). *Einfluß verschiedener Desinfektions- und Sterilisationsverfahren für allogene Knochentransplantate auf die Osteoblastenfunktion in-vitro*. @Marburg, Univ., Diss, 2004 .
40. Jakob, F., Genest, F., Baron, G., Stumpf, U., Rudert, M., & Seefried, L. (2015). Regulation des Knochenstoffwechsels bei Osteoporose: Neuartige Osteoporosemedikamente in der Entwicklung. *Der Unfallchirurg*, 118(11), 925–932.
41. Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., et al. (2002). Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*, 418(6893), 41–49.
42. Johnell, O., & Kanis, J. A. (2006). An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 17(12), 1726–1733.
43. Kanis, J. A., Johnell, O., Oden, A., Sembo, I., Redlund-Johnell, I., Dawson, A., et al. (2000). Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmö. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 11(8), 669–674.

44. Knaack, S., Lode, A., Hoyer, B., Rösen-Wolff, A., Gabrielyan, A., Roeder, I., et al. (2014). Heparin modification of a biomimetic bone matrix for controlled release of VEGF. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 102(10), 3500–3511.
45. Knaack, S., Lode, A., Hoyer, B., Rösen-Wolff, A., Gabrielyan, A., Roeder, I., et al. (2014). Heparin modification of a biomimetic bone matrix for controlled release of VEGF. *Journal of biomedical materials research. Part A*, 102(10), 3500–3511.
46. König, U., Lode, A., Welzel, P. B., Ueda, Y., Knaack, S., Henß, A., et al. (2014). Heparinization of a biomimetic bone matrix: Integration of heparin during matrix synthesis versus adsorptive post surface modification. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 25(3), 607–621.
47. Krakauer, T. (2008). Nuclear factor-kappaB: Fine-tuning a central integrator of diverse biologic stimuli. *International reviews of immunology*, 27(5), 286–292.
48. Kraus, K. H., & Kirker-Head, C. (2006). Mesenchymal stem cells and bone regeneration. *Veterinary surgery : VS*, 35(3), 232–242.
49. Kruppke, B., Ray, S., Alt, V., Rohnke, M., Kern, C., Kampschulte, M., et al. (2020). Gelatin-Modified Calcium/Strontium Hydrogen Phosphates Stimulate Bone Regeneration in Osteoblast/Osteoclast Co-Culture and in Osteoporotic Rat Femur Defects-In Vitro to In Vivo Translation. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(21).
50. Kumar, S., Wan, C., Ramaswamy, G., Clemens, T. L., & Ponnazhagan, S. (2010). Mesenchymal stem cells expressing osteogenic and angiogenic factors synergistically enhance bone formation in a mouse model of segmental bone defect. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 18(5), 1026–1034.
51. Lavrentieva, A., Majore, I., Kasper, C., & Hass, R. (2010). *Effects of hypoxic culture conditions on umbilical cord-derived human mesenchymal stem cells* . Hannover, Hannover: Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover; Technische Informationsbibliothek (TIB).
52. Lee, C. Y., Kang, J. Y., Lim, S., Ham, O., Chang, W., & Jang, D.-H. (2016). Hypoxic conditioned medium from mesenchymal stem cells promotes

- lymphangiogenesis by regulation of mitochondrial-related proteins. *Stem cell research & therapy*, 7, 38.
53. Lementowski, P. W., Lucas, P., & Taddonio, R. F. (2010). Acute and chronic complications of intracortical iliac crest bone grafting versus the traditional corticocancellous technique for spinal fusion surgery. *Orthopedics*, 33(4).
 54. Lieberman, J. R., Daluiski, A., & Einhorn, T. A. (2002). The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 84-A(6), 1032–1044.
 55. Lienau, J., Schmidt-Bleek, K., Peters, A., Haschke, F., Duda, G. N., Perka, C., et al. (2009). Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 27(9), 1133–1140.
 56. Marsell, R., & Einhorn, T. A. (2011). The biology of fracture healing. *Injury*, 42(6), 283–309.
 57. Melton, L. J., Atkinson, E. J., O'Connor, M. K., O'Fallon, W. M., & Riggs, B. L. (1998). Bone density and fracture risk in men. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 13(12), 1915–1923.
 58. Melton, L. J., Chrischilles, E. A., Cooper, C., Lane, A. W., & Riggs, B. L. (1992). Perspective. How many women have osteoporosis? *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 7(9), 1005–1010.
 59. Meyer, U., Handschel, J., Meyer, T., & Wiesmann, H. P. (Eds.) (2009). *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
 60. Minkin, C. (1982). Bone acid phosphatase: Tartrate-resistant acid phosphatase as a marker of osteoclast function. *Calcified tissue international*, 34(3), 285–290.
 61. Mishima et al. (2008). Chemotaxis of human articular chondrocytes and mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, 26(10), 1407–1412.

62. Palmer, R. H., Hulse, D. A., Hyman, W. A., & Palmer, D. R. (1992). Principles of bone healing and biomechanics of external skeletal fixation. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 22(1), 45–68.
63. Pape, H. C., Evans, A., & Kobbe, P. (2010). Autologous bone graft: Properties and techniques. *Journal of orthopaedic trauma*, 24 Suppl 1, S36-40.
64. Patka et al. (1998). Bottransplantaten en botvervangende materialen. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde*, 142(16), 893–896.
65. Poser, L., Matthys, R., Schawalder, P., Pearce, S., Alini, M., & Zeiter, S. (2014). A standardized critical size defect model in normal and osteoporotic rats to evaluate bone tissue engineered constructs. *BioMed research international*, 2014, 348635.
66. Precheur, H. V. (2007). Bone graft materials. *Dental clinics of North America*, 51(3), 729-46, viii.
67. Quade, M., Knaack, S., Weber, D., König, U., Paul, B., Simon, P., et al. (2017). Heparin modification of a biomimetic bone matrix modulates osteogenic and angiogenic cell response in vitro. *European cells & materials*, 33, 105–120.
68. Ray, S., Thormann, U., Eichelroth, M., Budak, M., Biehl, C., Rupp, M., et al. (2018). Strontium and bisphosphonate coated iron foam scaffolds for osteoporotic fracture defect healing. *Biomaterials*, 157, 1–16.
69. Ray, S., Thormann, U., Sommer, U., Khassawna, T. E., Hundgeburth, M., Henß, A., et al. (2016). Effects of macroporous, strontium loaded xerogel-scaffolds on new bone formation in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. *Injury*, 47 Suppl 1, S52-61.
70. Reginster, J.-Y., & Burlet, N. (2006). Osteoporosis: A still increasing prevalence. *Bone*, 38(2 Suppl 1), S4-9.
71. Remedios, A. (1999). Bone and bone healing. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 29(5), 1029-44, v.
72. Ringe, J. D. (2014). Die Osteoporose des Mannes. Auch männliche Knochen können schwinden. *MMW Fortschritte der Medizin*, 156 Spec No 1(1), 44-7; quiz 48.

73. Ross, P. D., Davis, J. W., Epstein, R. S., & Wasnich, R. D. (1991). Pre-existing fractures and bone mass predict vertebral fracture incidence in women. *Annals of internal medicine*, 114(11), 919–923.
74. Schlewitz, G., Govindarajan, P., Schlieffe, N., Alt, V., Böcker, W., Elkhassawna, T., et al. (2013). Ovariectomie und Kalzium-/Vitamin D2/D3-arme Diät als Osteoporosemodell an der Wirbelsäule von Sprague-Dawley-Ratten. *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*, 151(1), 14–19.
75. Schmidmaier, G., Herrmann, S., Green, J., Weber, T., Scharfenberger, A., Haas, N. P., et al. (2006). Quantitative assessment of growth factors in reaming aspirate, iliac crest, and platelet preparation. *Bone*, 39(5), 1156–1163.
76. Scholz, M., Schleicher, P., Eindorf, T., Friedersdorff, F., Gelinsky, M., König, U., et al. (2010). Cages augmented with mineralized collagen and platelet-rich plasma as an osteoconductive/inductive combination for interbody fusion. *Spine*, 35(7), 740–746.
77. Seebach, C., Henrich, D., Kähling, C., Wilhelm, K., & Marzi, I. (2009). *Beschleunigte Knochenheilung durch frühe Vaskularisierung mittels Implantation von EPC und MSC auf beta-TCP im Knochendefektmodell der Ratte*. Frankfurt am Main: Universitätsbibliothek Johann Christian Senckenberg.
78. Shackelford, J. F. (2005). *Werkstofftechnologie für Ingenieure: Grundlagen, Prozesse, Anwendungen* (6th edn, Maschinenbau : Werkstofftechnologie). München, Boston u.a.: Pearson Studium.
79. Sims, N. A., & Martin, T. J. (2015). Coupling Signals between the Osteoclast and Osteoblast: How are Messages Transmitted between These Temporary Visitors to the Bone Surface? *Frontiers in endocrinology*, 6, 41.
80. Street, J., Winter, D., Wang, J. H., Wakai, A., McGuinness, A., & Redmond, H. P. (2000). Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clinical orthopaedics and related research*, (378), 224–237.
81. Stuermer, E. K., Sehmisch, S., Rack, T., Wenda, E., Seidlova-Wuttke, D., Tezval, M., et al. (2010). Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in

- the early phase of osteoporosis. A new fracture-healing model at the tibia in rat. *Langenbeck's archives of surgery*, 395(2), 163–172.
82. Teti, A. (2013). Mechanisms of osteoclast-dependent bone formation. *BoneKEY reports*, 2, 449.
 83. Thompson, D. D., Simmons, H. A., Pirie, C. M., & Ke, H. Z. (1995). FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*, 17(4 Suppl), 125S-133S.
 84. Thormann, U., El Khawassna, T., Ray, S., Duerselen, L., Kampschulte, M., Lips, K., et al. (2014). Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats. *Injury*, 45(3), 487–493.
 85. Thormann, U., Ray, S., Sommer, U., Elkhassawna, T., Rehling, T., Hundgeburth, M., et al. (2013). Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. *Biomaterials*, 34(34), 8589–8598.
 86. Trippel, S. B. (1997). Growth factors as therapeutic agents. *Instructional course lectures*, 46, 473–476.
 87. Vladimirov, B. S., & Dimitrov, S. A. (2004). Growth factors--importance and possibilities for enhancement of the healing process in bone fractures. *Folia medica*, 46(2), 11–17.
 88. Vortkamp, A., Pathi, S., Peretti, G. M., Caruso, E. M., Zaleske, D. J., & Tabin, C. J. (1998). Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mechanisms of development*, 71(1-2), 65–76.
 89. Weltgesundheitsorganisation (1994). *Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: Report of a WHO study group* (Technical report series / World Health Organization, Vol. 843). Geneva.
 90. Wilson-Hench J (1984). *Osteoinduction: In Progress in biomedical engineering* . Amsterdam: Elsevier.

91. Wimmer, C., Krismer, M., Gluch, H., Ogon, M., & Stöckl, B. (1999). Autogenic versus allogenic bone grafts in anterior lumbar interbody fusion. *Clinical orthopaedics and related research*, (360), 122–126.
92. Yokoyama, A., Gelinsky, M., Kawasaki, T., Kohgo, T., König, U., Pompe, W., et al. (2005). Biomimetic porous scaffolds with high elasticity made from mineralized collagen--an animal study. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*, 75(2), 464–472.
93. Zhang, Z.-Y., Teoh, S.-H., Chong, M. S. K., Lee, E. S. M., Tan, L.-G., Mattar, C. N., et al. (2010). Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. *Biomaterials*, 31(4), 608–620.

9 Publikationsverzeichnis

Publikation in Vorbereitung

10 Ehrenwörtliche Erklärung

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

Ort, Datum

Unterschrift

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen Dankbarkeit ausdrücken, die mich in dieser Arbeit fachlich und gleichermaßen moralisch unterstützt haben.

Meinem Doktorvater PD Dr. Ulrich Thormann danke ich für die langjährige Unterstützung und die unschätzbare Expertise auf dem spannenden Gebiet der Unfallchirurgie. Ebenso möchte ich Professor Dr. med. Dr. biol. hom. Volker Alt danken für die Überlassung des interessanten Themas und die konstruktiven Gespräche während der experimentellen Phase.

Die Umsetzung meiner Arbeit wäre ohne meine Betreuerin Dr. Seemun Ray undenkbar gewesen. Vielen Dank Seemun für die umfassende Einführung in die Grundsätze der histologischen Untersuchung und die unermüdliche Unterstützung in der täglichen Laborarbeit. Frau Professor Dr. Katrin Lips und Frau Dr. Ursula Sommer möchte ich für Ihr Engagement und Ihre Geduld danken um in das Thema wissenschaftliches Arbeiten einzuführen und immer mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Großen Dank gilt auch Herrn Professor Dr. Christian Heiß, Dr. Matthäus Budak und den zahlreichen Mitarbeitern des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie.

Die in vivo Untersuchung des Knochenersatzmaterials wäre ohne die Vorarbeit von Professor Dr. rer. nat. Michael Gelinsky und Frau Dr. rer. medic. Mandy Quade vom Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung der TU Dresden nicht möglich gewesen. Vielen Dank für den leidenschaftlichen Einblick in die Werkstoffwissenschaft und die gute Zusammenarbeit in dem SFB Transregio 79.

Den (ehemaligen) Doktoranden Dr. Lucretia Franz-Forsthoffer und Dr. Nils Döhner möchte ich danken für die vielen Hilfestellungen und die gute Zusammenarbeit. Von ganzem Herzen möchte ich dabei dir Inga Kramer danken für deinen unerschütterlichen Zuspruch und die Freundschaft, die während der Zeit weitergewachsen ist.

Mein Dank in besonderer Weise gilt meiner Familie und meinen engen Freunden für die unermüdliche und liebevolle Unterstützung in jeder Hinsicht.

12 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde in der Druckversion aus Datenschutzgründen entfernt.