

# PLÄTTCHENREICHES PLASMA ALS SICHERER ERSATZ FÜR TIERISCHES SERUM IM KNOCHEN TISSUE ENGINEERING

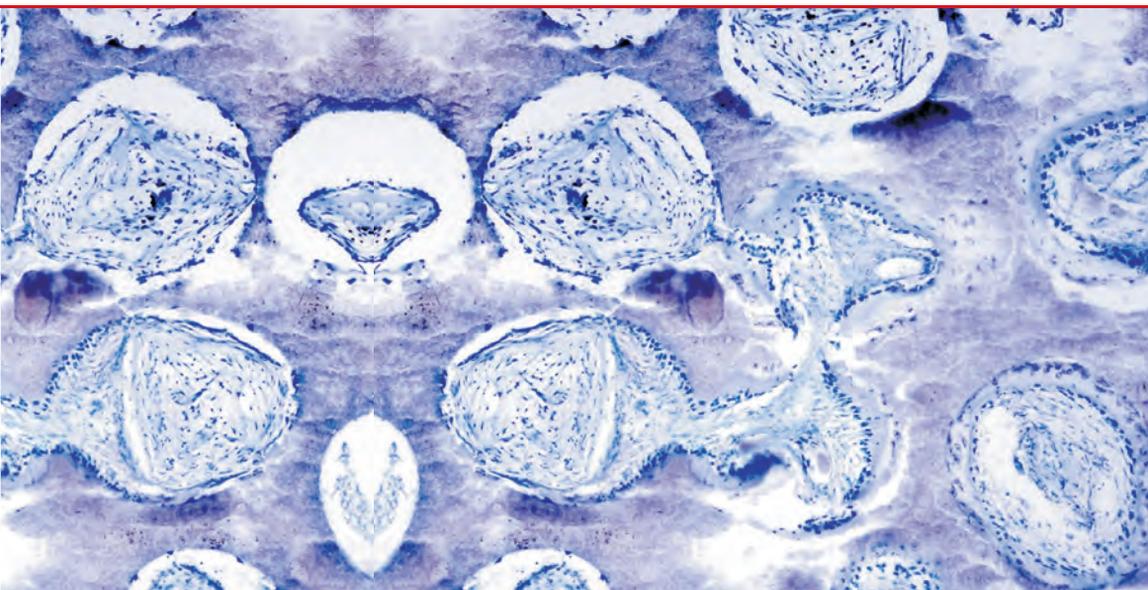
Eine *in vitro* und *in vivo* Studie zur Knochen-  
regeneration mit mesenchymalen Stammzellen  
und Knochenersatzstoffen

**JULIA PASCALE VOGEL**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**



**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2008

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1<sup>st</sup> Edition 2008

© 2008 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus der  
Klinik für Kleintiere, Chirurgie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. M. Kramer

**und**

Sektion Experimentelle Orthopädie  
der Orthopädischen Universitätsklinik Heidelberg  
Betreuerin: Prof. Dr. W. Richter

**Plättchenreiches Plasma als sicherer Ersatz für tierisches Serum  
im Knochen Tissue Engineering**

**Eine *in vitro* und *in vivo* Studie zur Knochenregeneration mit mesenchymalen  
Stammzellen und Knochenersatzstoffen**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Julia Pascale Vogel**

Tierärztin aus Frankfurt a.M.

**Gießen 2008**

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

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter/in: Prof. Dr. M. Kramer  
Prof. Dr. W. Richter

Tag der Disputation: 19.05.2008

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Einleitung.....	1
2. Literaturübersicht.....	4
2.1 Knochenbildung und Knochenaufbau.....	4
2.2 Frakturheilung.....	6
2.3 Störungen der Frakturheilung.....	7
2.4 Knochenersatz: Stand der Forschung.....	8
2.5 Calciumphosphat-Keramiken.....	14
2.5.1 Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten von $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP).....	16
2.5.2 Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten von Calcium-defizientem Hydroxylapatit (CDHA).....	17
2.6 Die Geschichte der Knochenersatzstoffe in chronologischer Reihenfolge.....	18
2.7 Mesenchymale Stammzellen.....	19
2.8 Zellkulturmedien.....	24
2.9 Plättchenreiches Plasma.....	27
2.10 SCID-Maus Modell zur Knochenbildung nach subkutaner Implantation.....	30
2.11 Beschichtungen der Matrix.....	31
3. Material und Methoden.....	32
3.1 Knochenmark.....	33
3.2 Plättchenreiches Plasma.....	34
3.3 Zellexpansionsmedien.....	34
3.4 Isolation von humanen mesenchymalen Stammzellen.....	36
3.4.1 Dichtegradient.....	37
3.4.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen.....	38
3.5 In vitro Versuch zur Expansion humaner mesenchymaler Stammzellen.....	38
3.6 Charakterisierung der Zellen mittels Fluorescence-activated Cell Sorting.....	40
3.7 In vitro Versuch zur Untersuchung des Differenzierungspotentials humaner mesenchymaler Stammzellen.....	41
3.7.1 Osteogene Differenzierung.....	42
3.7.2 Chondrogene Differenzierung.....	42
3.7.3 Adipogene Differenzierung.....	43
3.7.4 Nachweis der osteogenen Differenzierung.....	43

3.7.5 Nachweis der chondrogenen Differenzierung.....	46
3.7.6 Nachweis der adipogenen Differenzierung .....	48
3.8 In vivo Versuch zur Knochenneubildung im SCID-Maus-Modell.....	48
3.8.1 Keramiken .....	49
3.8.2 Beschichtung der Keramiken.....	50
3.8.3 Besiedelung der Keramiken.....	51
3.8.4 Versuchstiere.....	52
3.8.5 Gruppeneinteilung .....	52
3.8.6 Chirurgischer Eingriff .....	54
3.8.7 Standzeiten und Versuchsabschluss .....	54
3.9 Auswertung des in vivo Versuchs.....	54
3.9.1 Histologische Auswertung .....	54
3.9.2 Darstellung humaner MSC mittels in situ Hybridisierung .....	56
3.9.3 Quantifizierung des in vivo neu gebildeten Knochens mittels $\mu$ -Computer Tomographie .....	57
3.10 Statistische Auswertung .....	59
4. Ergebnisse.....	60
4.1 Wachstumsfaktorengehalt im Plättchenreichen Plasma.....	60
4.2 Ergebnisse des in vitro Versuchs zur Zellexpansion .....	60
4.3 Ergebnisse der FACS-Analyse .....	64
4.4 Ergebnisse des in vitro Versuchs zur osteogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierung.....	65
4.4.1 Ergebnisse der osteogenen Differenzierung.....	65
4.4.2 Ergebnisse der chondrogenen Differenzierung .....	68
4.4.3 Ergebnisse der adipogenen Differenzierung.....	70
4.5 Ergebnisse der histologischen Beurteilung des in vivo neu gebildeten Knochens .....	71
4.6 Ergebnisse der in situ Hybridisierung auf humane Alu Sequenzen .....	77
4.7 Ergebnisse der $\mu$ -Computer Tomographischen Messung .....	81
5. Diskussion .....	83
5.1 In vitro Versuch zur Zellexpansion und Zelldifferenzierung .....	83
5.1.1 Diskussion der Methode .....	83
5.1.1.1 Zellexpansion im Monolayer .....	83
5.1.1.2 Zelldifferenzierung .....	84

5.1.2 Diskussion der Ergebnisse .....	84
5.1.2.1 Zellexpansionsmedien .....	84
5.1.2.2 Etablierung der Zellkulturen und Zellexpansion .....	87
5.1.2.3 Zelldifferenzierung .....	90
5.2 In vivo-Versuch zur Knochenneubildung in der SCID-Maus .....	92
5.2.1. Tiermodell und Operationsmodell .....	92
5.2.2 Mesenchymale Stammzellen .....	93
5.2.3 Form und Besiedelung der Keramiken .....	94
5.2.4 Knochenneubildung in vivo .....	95
6. Zusammenfassung .....	101
7. Summary .....	103
Literaturverzeichnis .....	105
Anhang .....	131
A. Reagenzien .....	131
B. Lösungen und Puffer .....	136
C. Kommerziell erhältliche Systeme .....	140
D. Medien zur Kultivierung und Differenzierung von Zellen .....	140
E. Geräte und Verbrauchsmaterialien .....	143
Erklärung .....	147
Danksagungen .....	148

## Abkürzungsverzeichnis

ALP	Alkalische Phosphatase
ANOVA	Multifaktorielle Varianzanalyse
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
AR-S	Alizarinrot- S
BMP	bone morphogenic protein
BMSC	bone marrow stromal cells
BSA	bovines Serum Albumin
BSE	bovine spongiforme Enzephalopathie
°C	Grad Celsius
CD	cluster of differentiation
CDHA	Calcium defizientes Hydroxylapatit
CFU	Colony Forming Units
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
CP	Calciumphosphat
CPe	Calciumphosphate
C/P-Verhältnis	Calcium/Phosphat-Verhältnis
CPZ	Calciumphosphat-Zement
2 D Kultur	Zweidimensionale Kultur
3 D Kultur	Dreidimensionale Kultur
DBM	Demineralized Bone Matrix
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ESC	Embryonale Stammzellen
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor

FN	Fibronektin
g	Gramm
g	Schleuderziffer der Zentrifuge (x-faches der Erdbeschleunigung)
GF	Growth Factor (Wachstumsfaktor)
h	Stunde
HA	Hydroxylapatit
HCL	Salzsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HS	Humanserum
HSC	Hämatopoetische Stammzellen
IBF	Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung
IE	Internationale Einheit
IGF	Insulin-like Growth Factor
ITS	Insulin Transferrin Selenit
°K	Grad Kelvin
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
M	Molar
MACS	Magnetisch aktiviertes Zellsortiersystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minuten
mio	Millionen
MSC	Mesenchymale Stammzellen
MW	Mittelwert
µ-CT	Mikro-CT
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte

OSW	Ordinale Score Werte
P	Passage
pg	Pikogramm
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCL-TCP	Polycaprolacton/Tricalciumphosphat
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-derived Growth Factor
PG	Platelet Gel
PHA	Präzipitiertes Hydroxylapatit
PRP	Plättchenreiches Plasma
PRS	Platelet-released Supernatant
pH	pH-Wert
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SD	Standardabweichung
SFM	serumfreies Medium
SSC-Puffer	Saline Sodium Citrate Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
$\beta$ -TCP	$\beta$ -Tricalciumphosphat
TE	Tissue Engineering
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
U/min	Umdrehungen pro Minute
v-CJD	variant Creutzfeld Jacob Disease
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XEM	Xylolersatzmedium

## 1. Einleitung

Die Behandlung langstreckiger Knochendefekte stellt sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin eine Herausforderung für Orthopäden und Unfallchirurgen dar, da bei solchen Defekten die Knochenheilung fast immer ausbleibt oder ungenügend ist (Non-Union/Mal-Union). Speziell bei Fluchttieren, aber auch bei kleineren Haustieren, bei denen eine Ruhigstellung über längere Zeit häufig nicht möglich ist, ist eine schnelle und sichere Heilung aber von entscheidender Bedeutung.

In der Behandlung dieser Defekte ist die autogene Beckenkammspongiosa-Transplantation seit über 50 Jahren als der „Goldstandard“ anzusehen, an dem sich alle anderen Behandlungsmethoden messen lassen müssen (Fleming et al. 2000; Hauschild et al. 2005). Autogener Knochen stellt einerseits eine Matrix für das Einwachsen von neuem Knochen und das Einwandern osteogener Vorläuferzellen zur Verfügung (Osteokonduktion) und enthält andererseits Wachstumsfaktoren (Osteoinduktion) und Zellen (Osteogenese) für die Knochenneubildung (Fleming et al. 2000). Leider ist die Verfügbarkeit von autogenem Knochen vor allem bei kleineren Tieren limitiert. Die Entnahme bedeutet einen zusätzlichen Eingriff für den Patienten, der die Narkosezeit verlängert, eine erhöhte Infektionsgefahr birgt und eine nicht unerhebliche Entnahmemorbidität mit sich bringt. Zusätzlich entstehen höhere Behandlungskosten.

Als Alternative kommt der Ersatz des fehlenden Knochens durch allogene oder xenogene Knochenmaterialien in Frage. Diese beinhalten aber die Gefahr der Übertragung von Erregern des Knochenspenders sowie von Abstoßungsreaktionen beim Empfänger und haben eine wesentlich geringere osteoinduktive Potenz als autogener Knochen, da sie vor Anwendung sterilisiert werden müssen und dadurch sowohl Zellen als auch Wachstumsfaktoren zerstört werden (Goldberg und Stevenson 1987; Greenwald et al. 2006; Hauschild und Bader 2004).

In letzter Zeit werden große Hoffnungen in ein modernes interdisziplinäres Forschungsfeld der regenerativen Medizin, das so genannte „Tissue Engineering“ (Gewebezüchtung) gesetzt. Es hat zum Ziel, aus vitalen

Komponenten Gewebe außerhalb des Körpers herzustellen, um diese dann als Transplantate verwenden zu können (Lavik und Langer 2004; Sittering 1995).

Es wird zum Beispiel versucht, durch die Kombination eines dreidimensionalen Trägermaterials, autologen Zellen und Wachstumsfaktoren Gewebe zu ersetzen. Im „Knochen-Tissue Engineering“ werden derzeit verschiedene synthetische Keramiken, wie das weit verbreitete  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) und das neu entwickelte Calcium-defiziente Hydroxylapatit (CDHA) auf ihre Eignung als Trägermaterialien bzw. Knochenersatzstoffe überprüft. Durch Beschichtung der Oberfläche einer Keramik kann diese zusätzlich so verändert werden, dass sie die Adhäsion und Proliferation von Zellen begünstigt (Dennis et al. 1992).

Autologe mesenchymale Stammzellen (MSC) werden aufgrund ihrer Multipotenz und hohen Expansionsfähigkeit häufig im Knochen-Tissue Engineering verwendet. Sie können aus Knochenmark von Patienten isoliert und *in vitro* vermehrt werden, um eine ausreichende Anzahl Zellen für die Kombination mit Knochenersatzstoffen zu erhalten. Problematischerweise enthalten die herkömmlichen Zellexpansionsmedien fötales Kälberserum (FCS), welches in Zeiten von boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) ein potentielles Risiko der Infektion mit Prionen birgt (Asher 1999; WHO 1997). Diese wurden beim Menschen als Auslöser der variant-Creutzfeld-Jakob-Krankheit (v-CJD) identifiziert (Lasmezas et al. 2001; Scott et al. 1999). Zudem birgt FCS das Risiko unerwünschter immunologischer Reaktionen (Johnson et al. 1990). Daher ist es für eine sichere klinische Anwendung der MSC wichtig, Zellkulturmedien zu entwickeln, die frei von FCS sind, und die trotzdem eine schnelle Vermehrung und den Erhalt der Differenzierungsfähigkeit der Stammzellen gewährleisten.

Als ein möglicherweise geeigneter Ersatz für FCS bot sich das plättchenreiche Plasma (PRP) an, ein Thrombozytenkonzentrat, welches autolog aus dem Blut des Patienten gewonnen werden kann. PRP enthält verschiedene Wachstumsfaktoren und steigert die Proliferation mesenchymaler Stammzellen (Lucarelli et al. 2003; Weibrich et al. 2002b).

Ziel dieser Arbeit war es, mesenchymale Stammzellen in einem selbst entwickelten xenogenfreien Zellexpansionsmedium, in welchem FCS durch

PRP ersetzt wurde, zu vermehren, ihre Differenzierungsfähigkeit *in vitro* zu überprüfen und anschließend eine Knochenbildung PRP-expandierter Zellen *in vivo* zu erreichen. Ferner wurde in den vorliegenden Untersuchungen ermittelt, ob sich das neue keramische Biomaterial CDHA in Kombination mit MSC im Vergleich mit  $\beta$ -TCP als Knochenersatzstoff bewähren kann. Auch wurden zwei unterschiedliche Beschichtungen für diese Keramiken getestet.

Zur Abklärung dieser Sachverhalte wurden folgende Fragen in dieser Studie bearbeitet:

- 1.) Stammzellen und PRP: Ist es möglich, MSC ohne xenogene Zusätze wie FCS zu expandieren? Welche Auswirkungen hat der Ersatz von FCS durch PRP im Zellexpansionsmedium auf die Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit von MSC *in vitro* und auf ihre Fähigkeit zur Knochenneubildung *in vivo*?
- 2.) Knochenersatzstoffe: Kann sich das neuartige keramische Biomaterial CDHA im Vergleich zu dem klinisch schon verwendeten  $\beta$ -TCP in einem Modell zur ektopen Knochenbildung nach subkutaner Implantation von Biomaterial-Zell-Konstrukten bewähren?
- 3.) Beschichtungen: Stellt Fibronectin oder Humanserum die vorteilhaftere Beschichtung für die keramischen Matrices im Hinblick auf die ektopen Knochenbildung *in vivo* dar?

## 2. Literaturübersicht

### ***2.1 Knochenbildung und Knochenaufbau***

Das Skelett ist ein metabolisch aktives Organ, welches lebenslang kontinuierlichen Umbauprozessen unterliegt. Zusätzlich zu ihrer mechanischen Funktion stellen die Knochen ein Reservoir für die Mineralhomöostase dar (Ng et al. 1997). Die Bildung des Knochengewebes aus dem embryonalen Bindegewebe, dem Mesenchym, wird als Osteogenese bezeichnet.

Es gibt zwei Möglichkeiten der Knochenbildung, die chondrale und die desmale Osteogenese. Die Bildung der Röhrenknochen geschieht auf indirektem Weg durch die Bildung eines Knorpelmodells und dessen Umwandlung in eine mineralisierte Struktur (Buckwalter et al. 1995). Diesen Vorgang nennt man chondrale Osteogenese. Im Embryo reagieren mesenchymale Zellen auf eine Reihe genetischer Faktoren und kondensieren, um ein Knorpelmodell zu formen (Shapiro 1999; Olsen et al. 2000). Um das Knorpelmodell bildet sich eine Schicht osteogener Zellen, das Perichondrium, aus dem Gefäße einsprossen. Aus dem Perichondrium wandern nach der Apoptose (programmierter Zelltod) der Knorpelzellen Osteoblasten in die entstehenden Hohlräume ein und bilden das weiche Osteoid, die noch unverkalkte Knochengrundsubstanz. Sie reichern mit der Zeit Hydroxylapatit an, wodurch aus dem Osteoid harter Knochen wird (Felsenberg 2001). In den Hohlräumen entsteht das embryonale Knochenmark. Manche Knochen, darunter die meisten Schädelknochen und das Becken, bilden sich auch direkt aus dem embryonalen Bindegewebe (desmale Osteogenese). Mesenchymzellen differenzieren sich zu Osteoblasten, die Osteoid bilden, welches nach Abgabe in den Interzellularraum verkalkt (Buckwalter et al. 1995). So gebildete Knochen nennt man Bindegewebs-, Deck- oder Belegknochen (Felsenberg 2001). Sowohl durch desmale als auch durch chondrale Osteogenese entsteht zunächst Geflechtknochen, in welchem die Kollagenfibrillen der Knochengrundsubstanz noch ungeordnet sind. Dieser Knochen wird später nahezu vollständig in den stabileren Lamellenknochen, in welchem die Kollagenfibrillen gerichtet angeordnet sind, umgebaut (Felsenberg 2001; Junqueira et al. 2002).

Knochen setzt sich zu 10% aus Wasser, zu 20% aus organischen Materialien wie Kollagen Typ I, Osteonektin, Osteocalzin und Proteoglykanen und zu 70% aus anorganischen Stoffen, vor allem Hydroxylapatit ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), zusammen (Felsenberg 2001). Die Kristalle im Knochen sind sehr klein (20-40 nm) und enthalten Unreinheiten wie Carbonat, Magnesium, Natrium, Fluorid und Zitrat (Slatter 1993b).

Knochen werden in Röhrenknochen, platte Knochen und kurze Knochen eingeteilt. Sie bestehen aus verschiedenen, funktionell unterschiedlichen Regionen. Der gesamte Knochen wird von einer membranösen Struktur, dem Periost, umgeben. Die eigentliche Knochensubstanz wird in die äußere, dicke Kortikalis und die innere Spongiosa, die eine feine Röhren-, Plättchen- und Bälkchenstruktur besitzt, eingeteilt. Röhrenknochen bestehen aus den beiden von einer dünnen Kortikalis umgebenen Knochenenden, den Epiphysen, in denen sich spongiöser Knochen befindet. Die Diaphyse (Schaft), besitzt eine dicke Kortikalis und ist mit lamellärem Knochen gefüllt, der eine Markhöhle umgibt. Zwischen Diaphyse und Epiphysen befinden sich die Metaphysen. Der Kompakta der Epiphyse liegt der Gelenkknorpel auf (Nickel et al. 1984). Kurze und platte Knochen besitzen eine dünne Kortikalis und sind vollständig mit Spongiosa gefüllt.

Im Knochen dominieren drei Zelltypen: Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Die Osteoblasten entstehen aus pluripotenten mesenchymalen Stammzellen, die zur Selbsterneuerung fähig sind. Osteoblasten findet man aufgereiht an der Oberfläche knochenbildender Regionen, den Haversschen Kanälen, welche Blutgefäße in der Knochenmatrix umgeben (Junqueira et al. 2002). Aus den Stammzellen gehen die so genannten Osteoprogenitor-Zellen (osteogenen Vorläuferzellen) hervor, die nicht mehr zur Selbsterneuerung befähigt sind und deren Differenzierungspotential nur noch die Bildung von Knochen-, Knorpel- und Fettzellen erlaubt. Aus ihnen entstehen über die Zwischenstufe der Präosteoblasten die Osteoblasten (Long 2001).

Durch die Bildung des Osteoid und dessen Mineralisation mauern sich die Osteoblasten langsam ein. Einmal im Knochen eingeschlossen, werden die Osteoblasten zu Osteozyten, die über lange Fortsätze miteinander und zum Teil auch noch mit nicht-ingemauerten Zellen in Verbindung stehen. Die großen,

unregelmäßig geformten, mehrkernigen Zellen, die sich auf der Oberfläche der mineralisierten Matrix befinden, nennt man Osteoklasten. Diese Riesenzellen (20-100 µm Durchmesser) sind die mechanischen Sensoren der Knochenmatrix und direkt verantwortlich für die Knochenresorption (Vaananen et al. 2000; Vaananen et al. 1988). Sie stammen von hämatopoetischen Vorläuferzellen des Knochenmarks ab (Raisz 1999). Im gesunden Knochen ist die Aktivität von Osteoblasten und Osteoklasten gekoppelt; vermehrte Knochenresorption stimuliert somit die Knochenneubildung (Lerner 2000).

Die Fähigkeit des Knochens, seine Architektur als Reaktion auf einwirkende Kräfte durch Resorption und Umformung auf die neue Situation anzupassen, ist eine der einzigartigen Eigenschaften dieses Gewebes (Slatter 1993b).

## ***2.2 Frakturheilung***

Die Knochenheilung kann in eine primäre und eine sekundäre Knochenheilung eingeteilt werden (Jäger und Wirth 1992). Die primäre Knochenheilung findet bei adaptierten Frakturen und Stabilität im Frakturspalt statt. Sie kann weiterhin in Kontaktheilung und Spaltheilung eingeteilt werden (Bonath und Prieur 1998). Eine Kallusbildung bleibt in beiden Fällen aus (Perren 1981; Perren 1993). Kontaktheilung findet in den Zonen statt, wo sich die Kortikalis der Frakturenden berührt oder der Abstand der Knochenenden nicht größer als 0,5 mm ist (Schenk und Willenegger 1977; Schenk 1978). Es folgt die Resorption der Frakturenden durch Osteoklasten und somit eine geringfügige Verbreiterung des Frakturspalts. Dies reduziert die hier herrschenden Kräfte etwas. Im Folgenden wird direkt neuer Lamellenknochen abgelagert (Jäger und Wirth 1992). Spaltheilung findet bei einer Größe des Frakturspalts über 0,5 mm sowie in den kleinen Zonen zwischen den Kontaktzonen statt. Der Spalt erlaubt das Einsprossen von endostalen und periostalen Blutgefäßen. Der Defekt wird zunächst durch Lamellenknochen aufgefüllt, der entsprechend dem Frakturverlauf ausgerichtet ist. Später wird diese Schicht von längsgerichteten Osteonen aufgeschlossen und überquert (Jäger und Wirth 1992). Knochenresorption und Knochenneubildung finden dabei simultan statt. Verhindern aber die Größe des Frakturspalts, stärkere Instabilität zwischen den Frakturenden oder eine unzureichende vaskuläre Versorgung die direkte

Bildung lamellären Knochens, findet eine sekundäre Knochenheilung statt (Jäger und Wirth 1992). Hier wird der Frakturspalt zunächst durch externen Kallus überbrückt und so die notwendige Stabilität hergestellt. Die Stadien der sekundären Frakturheilung sind Entzündung, Bildung eines weichen Kallus, Bildung eines harten Kallus und Remodellierung des Knochens. Eine initiale Entzündung entwickelt sich sofort nach der Fraktur und besteht bis zur Bildung von fibrösem Gewebe. Es bildet sich zunächst Granulationsgewebe (weicher Kallus), welches den durch die anfängliche Instabilität verursachten Kräften standhalten kann (Slatter 1993b) und den Frakturbereich bindegewebig überbrückt. Das Bindegewebe wird fibröser, verbessert so die Stabilität und verringert die Beweglichkeit zwischen den Frakturrenden. Dadurch kann das Gewebe langsam mineralisieren. Es wird zunächst Geflechtknochen gebildet wird, der dann in lamellären Knochen umgewandelt wird.

### ***2.3 Störungen der Frakturheilung***

Eine unzureichende Stabilität der Fraktur, unzureichende Apposition der Knochenenden, Störungen der Blutversorgung (z.B. aufgrund stark beschädigter Weichgewebe) sowie große Knochendefekte sind die Ursachen der Entstehung einer verzögerten oder ausbleibenden Knochenheilung („Delayed Union“ oder „Non Union“).

Unter einer verzögerten Knochenheilung versteht man eine Heilung, die langsamer als normal abläuft. Bei einfachen Delayed Unions reicht es zur Restitutio ad integrum meist aus, die fehlende Stabilität der Fraktur wieder herzustellen. Zum Teil ist auch ein zweiter chirurgischer Eingriff mit verbesserter Platzierung der Implantate nötig.

Bei einer Non Union hat der Heilungsprozess offensichtlich ausgesetzt (Sumner-Smith 1991). Es besteht eine Beweglichkeit im Frakturspalt. Oft ist die Blutversorgung schwer gestört, zum Teil bilden sich Knochensequester. Es existiert ein Knochendefekt kritischer Größe, der Kallus ist nicht fähig, den Frakturspalt zu überbrücken (Slatter 1993b). Eine Heilung ohne chirurgische Intervention ist unwahrscheinlich. Der Einsatz eines autologen Knochentransplantats oder eines Knochenersatzstoffes kann hier wertvolle Hilfe leisten und ist in schwereren Fällen sogar unerlässlich.

Unter einer Malunion (Anson 1991) versteht man eine Fraktur, die in einer anatomisch nicht korrekten Position geheilt ist. Eine frühe Diagnose und chirurgische Reposition (Osteotomie, Stabilisierung) sind dabei von entscheidender Bedeutung. Auch in diesem Fall kommen häufig Knochentransplantate oder Knochenersatzstoffe zum Einsatz.

## ***2.4 Knochenersatz: Stand der Forschung***

Die Rekonstruktion langstreckiger Knochendefekte gehört in der Orthopädie und Unfallchirurgie zu den schwierigsten Aufgaben. Oft sind mehrere chirurgische Eingriffe notwendig, um eine Knochenheilung zu erzielen (Puelo 2003). Trümmerfrakturen, Korrekturosteotomien, Osteitiden oder Tumorsektionen können große Knochendefekte hervorrufen (Mankani et al. 2001; Arinze et al. 2003). Zwar ist in der Veterinärmedizin die Therapie der Wahl bei Knochtumoren die Amputation der betroffenen Gliedmaße, aber immer häufiger wird auf Besitzerwunsch oder aufgrund von Kontraindikationen wie zum Beispiel neurologischer Probleme oder massiver Arthrosen der Erhalt der Extremität angestrebt (Liptak et al. 2006). Weitere Defekte, die der Füllung mit Knochenersatzstoffen bedürfen, können angeborene, der Korrektur bedürftige Deformationen sein (Rueger 1998).

Die Möglichkeiten zur Behandlung solcher Defekte haben sich in den vergangenen Jahrzehnten schnell weiterentwickelt, wodurch sich auch das jetzige Interesse und der erhöhte Bedarf an Knochentransplantaten für die Skelettreakonstruktion beim Menschen erklären lässt (de Boer 1988). Von über 6,2 mio Frakturen, die in den USA jährlich behandelt werden müssen, gibt es bei ca. 10% Komplikationen bei der Heilung. Normalerweise wird in diesen Fällen ein Knochentransplantat oder Knochenersatz verwendet (AAOS 2004). Insgesamt werden in den USA jährlich mehr als 0,5 mio Knochentransplantationen durchgeführt (Greenwald et al. 2006). In Deutschland wird die Defektfüllung mittels autogenem oder allogenen Knochen pro Jahr ungefähr 10.000 Mal angewendet (Rueger 1998).

Seit über 50 Jahren gilt die autogene Beckenkamm-spongiosa-Transplantation als der „Goldstandard“ zur funktionellen und ästhetischen Rekonstruktion von Knochendefekten (Fleming et al. 2000; Hauschild et al. 2005; Finkemeier 2002).

Unter einem autologen Transplantat versteht man ein Stück körpereigenes Gewebe, welches von einer an eine andere Stelle des Körpers desselben Individuums transplantiert wird. Spongiöse Knochentransplantate besitzen viele Knochenbälkchen und lebende Zellen und werden aus der Metaphysenregion des Knochens entnommen. Kortikale Transplantate bestehen aus dem äußeren kortikalen Knochen, welcher strukturelle Festigkeit besitzt. Kortikospongiöse Transplantate bestehen aus beidem (Slatter 1993b). Ein Vorteil der Verwendung von autologen Transplantaten ist die Möglichkeit, lebende, zur Knochenbildung befähigte Zellen zu übertragen (Fähigkeit zur Osteogenese). Zudem stellt der autogene Knochen eine Matrix für das Einwachsen von neuem Knochen und das Einwandern osteogener Vorläuferzellen zur Verfügung (Fähigkeit zur Osteokonduktion) und enthält zudem Wachstumsfaktoren (Fähigkeit zur Osteoinduktion) wie z.B. die bone morphogenetic proteins (BMPs), die die Knochenbildung fördern. Immunreaktionen bleiben aus und eine Übertragung von Krankheitserregern ist ebenfalls ausgeschlossen (Laurencin et al. 2006). Autologes Knochengewebe ist aber nicht in unbegrenzter Menge verfügbar. Zudem entstehen zum Teil erhebliche Schmerzen und Komplikationen bei der Gewinnung (Joshi und Kostakis 2004; Silber et al. 2003). Die Entnahme erfordert einen zweiten Eingriff, der die Narkosezeit verlängert und die Gefahr von Infektionen erhöht. Es entstehen höhere Behandlungskosten. Bei sehr jungen Individuen besteht zusätzlich die Gefahr der Verletzung offener Fugen an den Entnahmestellen.

Alternativ sind allogene oder xenogene Knochentransplantate oder eine Kallusdistraktion möglich (Rueger 1998). Als allogenes Transplantat bezeichnet man Gewebe, das einem anderen Individuum derselben Spezies eingepflanzt wird (Slatter 1993a). Allogenes Knochenmaterial wird schon lange zum Überbrücken und Auffüllen von Defekten eingesetzt. Vorteile der Verwendung allogener Transplantate sind ihre bessere Verfügbarkeit und die Vermeidung der Entnahmemorbidität beim Patienten sowie, zumindest bei der Verwendung kortikaler allogener Transplantate, die gute biomechanische Festigkeit. Zu den Nachteilen zählen ein gewisses Infektionsrisiko (z.B. HIV, Hepatitis B, C) (Li et al. 2001; Laurencin et al. 2006) und immunologische Reaktionen (Haunschild et al. 1996; Friedlaender 1983; Horowitz und Friedlaender 1991). Durch

Sterilisation, Bestrahlung, Gefriertrocknung, Dekalzifizierung oder Deproteinisierung (Goldberg und Stevenson 1987) kann zwar die Gefahr von Immunreaktionen und Krankheitsübertragung vermindert werden, dies bewirkt aber den Verlust der Osteoinduktivität durch Zerstörung der Zellen und Wachstumsfaktoren (Hallfeldt et al. 1995), erhöht die Brüchigkeit der Implantate und verändert deren Resorptionseigenschaften (Laurencin et al. 2006; Knaepler 2000). Zum Teil werden die entsprechenden Behandlungen zur Erregerabtötung auch nicht korrekt durchgeführt und Spender nicht getestet (Knaepler 2000). Zusätzlich wird ein allogenes Transplantat als avitales, solides Material kaum umgebaut (Goldberg und Stevenson 1987; Aho et al. 1994; Garbuz et al. 1998). Dadurch entstehen unterschiedliche Elastizitätseigenschaften an den Übergängen zum autologen Knochen und hierdurch ein potentiell Versagen mit Frakturgefahr (Wiesmann et al. 2004). Mögliche Komplikationen sind somit eine ausbleibende Knochenheilung zwischen Transplantat und Empfängerknochen, Knochenresorption und Frakturen des Transplantats (de Boer 1988). Daher sind allogene Transplantate den autologen Transplantaten unterlegen.

Ein xenogenes Transplantat ist ein Transplantat von einem Individuum einer anderen Spezies (Slatter 1993a). Vor allem Knochenersatzstoffe aus entmineralisiertem Rinderknochen sind auf dem Markt (z.B. Endobon, Merck KGaA; gesinterte, bovine spongiöse Knochenblöcke) (Finkemeier 2002). Im Prinzip bestehen hier die gleichen Probleme wie bei der Verwendung allogenen Knochenmaterials. Allerdings ist hier zusätzlich die Gefahr der Übertragung von Krankheitserregern über Speziesbarrieren hinweg gegeben (Hauschild und Bader 2004; Boneva et al. 2001).

Die Kallusdistraktion ist eine potente Methode zur Überbrückung von Knochendefekten, ist aber technisch anspruchsvoll und erfordert eine Behandlung über eine lange Zeitdauer (Erler et al. 2005; Hankemeier et al. 2004). Sie birgt relativ hohe Komplikationsraten, daher ist die Entwicklung neuer Strategien zur Heilung langstreckiger Knochendefekte erforderlich.

In letzter Zeit werden große Hoffnungen in ein modernes interdisziplinäres Forschungsfeld der regenerativen Medizin, das so genannte „Knochen-Tissue Engineering“, gesetzt. Unter dem Begriff Tissue Engineering

(„Gewebezüchtung“) versteht man die Herstellung/Züchtung eines künstlichen Gewebeersatzes aus vitalen Komponenten außerhalb des Körpers (Lavik und Langer 2004; Sitterling 1995). Es kann auch beschrieben werden als „die Anwendung von Technologien der Biologie, Chemie und der Ingenieurwissenschaft, um eine Heilung, Restauration oder Regeneration lebenden Gewebes unter Verwendung von Biomaterialien, Zellen und Wachstumsfaktoren, alleine oder in Kombination zu erzielen“ (Laurencin et al. 1999a).

Seit seinen Anfängen vor ungefähr 20 Jahren sind auf dem Gebiet des TE sehr große Fortschritte zu verzeichnen. Im Laufe der Forschung mit Biomaterialien vollzog sich eine Entwicklung von rein „passiven“ Materialien hin zu Materialien, die aktiv mit ihrem biologischen Umfeld interagieren können und die fähig sind, sich am Implantationsort zu integrieren (Anderson 2005). Das Konzept des Tissue Engineering ruht auf drei Säulen: Mittels der Kombination geeigneter dreidimensionaler Trägerstoffe, Zellen und Wachstumsfaktoren entsteht ein Zell/Matrix-Konstrukt, welches in Knochendefekte eingebracht wird und dort das fehlende Gewebe ersetzen und eine vollständige Rekonstruktion ermöglichen soll (Laurencin et al. 1999a). Der Arbeitsansatz des Tissue Engineerings imitiert den derzeitigen Goldstandard der autologen Beckenkamm-spongiosa-Transplantation. So sollen optimale Bedingungen für die Knochenheilung in schwierigen Situationen geschaffen werden. Für weniger problematische Fälle ist eventuell auch schon die Anwendung einer oder zweier Säulen des Konzeptes ausreichend.

Als Trägermaterialien werden die so genannten Knochenersatzstoffe verwendet. Der ideale Knochenersatz sollte die Festigkeit und Elastizität von Knochen aufweisen, resorbierbar sein aber sich nicht zu schnell abbauen, chemische Ähnlichkeit zu den Bestandteilen des Knochens aufweisen, keine toxischen Abbauprodukte bilden, durch seinen Abbau den pH-Wert an der Implantationsstelle nicht herabsetzen, das Wachstum von osteogenen Vorläuferzellen nicht nur erlauben sondern möglichst noch begünstigen, eine hohe Biokompatibilität aufweisen, immunologisch inaktiv sein, keine Fremdkörperreaktionen auslösen, unter physiologischen Bedingungen eine relative Unlöslichkeit haben, als Leitstruktur für Zelladhäsion, -migration und -

proliferation dienen, eine Affinität zu Knochen haben, Formbarkeit zur Anpassung an die Defektstelle besitzen und in hohem Maße verfügbar sein (Greenwald et al. 2006; Wiesmann et al. 2004; Linhart et al. 2000). Ein Stoff, der eine solche Menge zum Teil widerstreitender Kriterien in sich vereint, wurde bisher nicht gefunden. Im Augenblick ist eine Vielzahl von Knochenersatzstoffen auf dem Markt, welche aber bisher alle nicht den Goldstandard des autologen Knochens erreichen.

Die Knochenersatzstoffe können in 4 Gruppen eingeteilt werden:

1) synthetisch organische Knochenersatzstoffe (z.B. resorbierbare Polymere wie Polylaktid- oder Polyglycolpolymere (Laurencin et al. 1996) (Immix® von Osteobiologics); sie verursachen unphysiologische pH-Werte durch Abbauprodukte und somit eventuell Osteolysen (von Recum et al. 1995; Kallela et al. 1999))

2) synthetisch anorganische Knochenersatzstoffe (z.B. Calciumphosphat-Komposite (OpteMx® von Exatech), Bioglas (Biogran® von Orthovita), gesintertes/resorbierbares  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) (ChronOs® von Synthes), ungesintertes resorbierbares Calcium-defizientes Hydroxylapatit (CDHA) (Bohner 2000), nicht resorbierbares gesintertes Hydroxylapatit (HA) (Calcitite® von Centerpulse)).

3) biologisch organische Knochenersatzstoffe (z.B. Kollagen, Fibrin, Hyaluronsäure)

4) biologisch anorganische Knochenersatzstoffe (z.B. corallines Hydroxylapatit, welches hydrothermal aus Korallen hergestellt wird (Biocoral® von Inotek), aus bovinem Knochen durch Sinterungs- oder Elutionsprozess gewonnene HA-Keramiken (Endobon® von Merck, Bio-Oss® von Geistlich Biomaterials), allogene demineralisierte Knochenmatrix (DBM) (Grafton® von Osteotech)) (Wiesmann et al. 2004; Laurencin et al. 2006).

Die in dieser Studie untersuchten Keramiken gehören zur Gruppe 2 der synthetisch anorganischen Knochenersatzstoffe.

Probleme, die beim Einsatz der Knochenersatzstoffe auftreten können, sind die zum Teil für einen Einsatz im Defekt mangelnde Festigkeit, speziell bei organischen Produkten, und teilweise bei anorganischen Stoffen der fehlende Umbau und Abbau des Materials nach der Implantation. Das Konzept der

Osteogenese, nach dem die zellulären Elemente in einem Transplantat, welche die Transplantation überleben, an der empfangenden Stelle neuen Knochen synthetisieren, ist nur bei frischen Implantaten und nur mit autologem Knochen möglich, da ansonsten starke Immunreaktionen auftreten können. Die Fähigkeit zur Osteoinduktion konnte ebenfalls noch nicht für einen Knochenersatzstoff nachgewiesen werden. Zur Osteokonduktion, dem dreidimensionalen Prozess des Einsprießens von Kapillaren, perivaskulärem Gewebe und mesenchymalen Zellen mit dem Resultat des Einwachsens von neuem Knochen von der Implantationsstelle in die Poren eines als passive Leitstruktur dienenden Implantats (Greenwald et al. 2006), sind alle Knochenersatzstoffe befähigt.

Neben der Stoffgruppe des Knochenersatzes und der sich daraus ergebenden Resorptionszeit spielt auch die Reinheit des Materials (Lu et al. 2002), die Größe der verwendeten Partikel (Mankani et al. 2001), die Porosität (Gauthier et al. 1998; Kuboki et al. 1995; Kuhne et al. 1994) und die Größe der spezifischen Oberfläche (Kasten et al. 2005) bei der de novo-Osteogenese eine wichtige Rolle. Unreinheiten des Materials können aseptische Entzündungsreaktionen bewirken, die eine unkontrollierte Beschleunigung der Resorption zur Folge haben (van der Meulen und Koerten 1994).

Die Verwendung von Partikeln einer Größe von 100-250  $\mu\text{m}$  kann eine stärkere Knochenneubildung bewirken, hat aber eine fehlende Primärstabilität in Last tragenden Defekten zur Folge (Mankani et al. 2001).

Mit einer Porengröße zwischen 300-500  $\mu\text{m}$  wird eine bessere Knochenneubildung erreicht, als mit geringerer Porengröße (Gauthier et al. 1998; Kuboki et al. 1995; Kuhne et al. 1994).

Knochen besitzt eine spezifische Oberfläche von 80  $\text{m}^2/\text{g}$  (Bohner 2000). Die bisher klinisch eingesetzten Keramiken sind in der Regel gesintert und weisen eine niedrige spezifische Oberfläche von ungefähr 0,5  $\text{m}^2/\text{g}$  auf. Ein Beispiel hierfür ist das  $\beta$ -TCP. Um den physiologischen Gegebenheiten besser zu entsprechen, wurde das CDHA, ein ungesintertes Material mit einer spezifischen Oberfläche von ca. 48  $\text{m}^2/\text{g}$  (Bohner 2000), entwickelt.

Im Augenblick befinden sich vor allem Calciumphosphat-Keramiken im klinischen Einsatz (Cornell et al. 1991; Kocialkowski et al. 1990; McAndrew et al. 1988). Es ist ein deutlicher Trend zu resorbierbaren Keramiken, die als

Leitstruktur dienen, an dem sich eigener Knochen bilden kann, zu erkennen. Die Resorption dieser Stoffe erfolgt mittels des schleichenden Ersatzes der Keramik durch neugebildeten Knochen.

## **2.5 Calciumphosphat-Keramiken**

Die Verwendung von Calciumphosphaten (CP) als Knochenersatzstoffe wird schon seit über 80 Jahren erforscht (Albee und Morrison 1920). 1979 untersuchte Ferraro (Ferraro 1979) Kalziumphosphat-Pulver auf ihre Eignung als Knochenersatz hin. Die am häufigsten verwendeten Calciumphosphat-Keramiken sind Hydroxylapatit (HA) und Tricalciumphosphat (TCP), welche als Defektfüller, aber auch als Beschichtung von Implantaten Verwendung finden. Sie sind in Form von Pulvern, Granulaten oder Blöckchen erhältlich (Finkemeier 2002). Sie sind intraoperativ nicht formbar und haben teilweise keine hohe Belastbarkeit (Parikh 2002). CP-Keramiken lösen keine Fremdkörperreaktionen aus und werden vom Körper gut toleriert (Finkemeier 2002).

Bereits kleine Änderungen in Zusammensetzung und Struktur von CP-Kompositen können einen tiefgreifenden Effekt auf ihr Verhalten nach Implantation *in vivo* haben. Eine der wichtigsten Eigenschaften von CP ist möglicherweise ihre Löslichkeit in Wasser, da ihr Resorptionsverhalten *in vivo* zu einem großen Teil anhand ihrer Löslichkeit vorhergesagt werden kann. Ist diese Löslichkeit geringer als diejenige des mineralischen Teils des Knochens, baut sich das CP *in vivo* nur extrem langsam oder gar nicht ab (Bohner 2000). Weiterhin sind CP-Keramiken osteointegrativ. Dies bezeichnet die Eigenschaft eines Materials, eine direkte, feste Verbindung mit Knochen einzugehen. In der Zone zwischen Keramik und Knochen freigesetzte Calcium- und Phosphationen bewirken die Ablagerung kleiner Hydroxylapatit-Kristalle an die aneinander grenzenden Oberflächen. Dies erlaubt die direkte Verbindung beider Materialien (Laurencin et al. 1999b). Diese feste Verbindung ist essentiell, um die im Allgemeinen bestehende Mobilität des Implantats zu verringern, die Implantationsstelle zu stabilisieren und so eine vollständige Knochenheilung zu ermöglichen.

Bei allen traditionell als Knochenersatzstoff verwendeten CP handelt es sich um Hochtemperatur-CP, meist  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP), Hydroxylapatit (HA)

oder Komposite aus beidem (Bohner 2000). HA ist die Hochtemperatur-Form eines stöchiometrischen präzipitierten Hydroxylapatits (PHA). Die Strukturformel der PHA ist sehr komplex ( $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ), da ihr Calcium/Phosphat-Verhältnis (C/P-Verhältnis) von 1,5 bis 1,67 variieren kann (Bohner 2000).

HA ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ ; z.B. Pro Osteon® von Interpore Cross, USA oder Pyrost® von Stryker Howmedica, USA) ist hochkristallin und ist das CP, welches sich in einer wässrigen Lösung am stabilsten verhält. Es hat eine spezifische Oberfläche von ca.  $1 \text{ m}^2/\text{g}$  (Bohner 2001a) und wird als nicht-resorbierbar angesehen, da sich seine Abbauzeit in Jahrzehnten und nicht in Jahren berechnet. Es ist sehr gut biokompatibel (Bohner 2000).

Calciumphosphat-Zemente (CPZ) wurden 1980 durch Brown und Chow entdeckt (Bohner 2001b). Sie bestehen aus einem oder mehreren CP-Pulvern und einer wässrigen Lösung. Werden diese Komponenten gemischt, so entsteht eine injizierbare Paste, die in Knochendefekte eingebracht werden kann und innerhalb einiger Minuten aushärtet (Bohner 2001a). Der hauptsächliche Nachteil der CPZ ist ihr Mangel an Makroporen, wodurch ihr Abbau Schicht für Schicht stattfinden muss (Bohner 2000). Zudem konnten CP-Pulver bisher nur mittels eines Sinterprozesses in CP-Blocks umgewandelt werden.

Durch die Entwicklung eines neuartigen Prozesses ist es der Dr. h. c. Robert Mathys Foundation gelungen, CP-Blocks bei Raumtemperatur herzustellen und diese Blocks mit definierter Porosität, Porengröße und Interkonnektivität der Poren auszustatten. So entstehen Niedrigtemperatur-Calciumphosphate. Bei dem neuen Herstellungsprozess wird eine hydrophobe Flüssigkeit (Paraffinöl) mit CP-Zementpaste und einem Emulgator gemischt. Nach dem Aushärten der Mischung werden die im Zement verteilten Öltröpfchen herausgewaschen, so dass der übrig gebliebene CP-Block eine poröse Struktur erhält. Je nach eingesetztem Verhältnis an Zementpaste, Öl und Emulgator können Porosität und Porengröße der Blöckchen variiert werden (Bohner 2001b).

Calciumphosphate, die unter großer Hitzeeinwirkung (so genannter Sinterprozess, meist über  $1000^\circ\text{C}$ ) hergestellt werden, nennt man Hochtemperatur-CP (Bohner 2001a). Sie unterscheiden sich in ihrer Struktur,

ihrer Löslichkeit und teilweise auch in ihrer chemischen Zusammensetzung von den Niedrigtemperatur-CP. Somit können auch Unterschiede hinsichtlich der Resorbierbarkeit *in vivo* erwartet werden (Bohner 2001a).

### **2.5.1 Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten von $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP)**

$\beta$ -TCP zählt zu den Hochtemperatur-CP (Bohner 2000). Es ist ein gesinterter Knochenersatzstoff.  $\beta$ -Trikalziumphosphat ist resorbierbar und biokompatibel, hat aber eine unzulängliche Porosität und eine kleine spezifische Oberfläche von ungefähr 1 m<sup>2</sup>/g. Es wird *in vivo* innerhalb von ein bis zwei Jahren resorbiert (Bohner 2001a). Damit löst es sich nicht so langsam auf wie HA, obwohl beide Materialien durch Osteoklasten und Makrophagen abgebaut werden (Bohner und Baumgart 2004).  $\beta$ -TCP wird oft in Form von Granulaten oder Blöckchen verwendet. Ein häufig verwendetes  $\beta$ -TCP-Produkt ist ChronOs® von Synthes, Schweiz. Weitere Produkte sind Vitoss® von Orthovita, USA und Biosorb® von SBM, Frankreich (Bohner 2001a).  $\beta$ -TCP ( $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) kann mittels einer thermalen Behandlung von mindestens 700°C aus CDHA gewonnen werden. Es hat ein C/P-Verhältnis von 1,5 (Bohner 2000). In der klinischen Praxis wurde es bereits erfolgreich im Rahmen von Wirbelkörperfusionen, Skoliosen, Keilosteotomien und bei Frakturen eingesetzt (Bohner 2001a; Bucholz 2002; McAndrew et al. 1988).

Auch in der Veterinärmedizin findet  $\beta$ -TCP bereits vereinzelt Anwendung: Hauschild et al. (2005) führten eine aufgrund einer traumatischen Luxation des rechten Tarsalgelenks notwendige Arthrodesis bei einem Beagle unter Einsatz von  $\beta$ -TCP und einem Zusatz von plättchenreichem Plasma (PRP) durch. Schon zwei Tage nach der Operation belastete der Patient die betroffene Gliedmaße voll. Eine vier Monate später erfolgte radiologische Kontrolle zeigte eine im Vergleich zum umgebenden Knochen erhöhte Dichte. Die granuläre Struktur des  $\beta$ -TCP war nicht mehr zu erkennen, was auf eine nahezu vollständige Biodegradation des Grafts und eine starke Knochenneubildung hinwies (Hauschild et al. 2005). Das Tier war lahmheitsfrei. Izumisawa et al. (2005) führten eine axiale Korrektur der Tibia zweier Dackel durch, die an lateraler Patellaluxation, verursacht durch pes varus, litten. Nach einer

aufklappenden Keilosteotomie wurde der entstandene Defekt mit  $\beta$ -TCP in Keilform gedeckt. Bereits einige Tage nach dem Eingriff belasteten die Tiere die operierte Gliedmaße. Die laterale Dislokation der Patella verschwand innerhalb eines Monats fast vollständig. Eine radiologische Kontrolle nach zwei Monaten zeigte, dass das Implantat mit dem umgebenden Knochen verschmolzen war (Izumisawa et al. 2005).

### **2.5.2 Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten von Calcium-defizientem Hydroxylapatit (CDHA)**

Präzipitiertes Hydroxylapatit (PHA) mit einem C/P-Verhältnis von 1,5 wird oft CDHA genannt ( $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5(\text{OH})$ ). Es hat fast die gleiche chemische Zusammensetzung wie  $\beta$ -TCP, verfügt aber über eine völlig andere kristalline Struktur. CDHA ist ein ungesinterter Knochenersatzstoff. Wie alle Niedrigtemperatur-CP hat es eine sehr große spezifische Oberfläche von 25-100  $\text{m}^2/\text{g}$ , was es biologisch wesentlich reaktiver macht als traditionelle CPe (Bohner 2001a). Hinsichtlich seiner großen spezifischen Oberfläche ist es dem Apatit des Knochens ähnlich. Der größte Unterschied liegt in der Abwesenheit von Unreinheiten wie Carbonat- oder Mg-Ionen. Die Löslichkeit von PHA steigt mit fallendem C/P Verhältnis und ist auch von der Größe der Poren sowie von der Größe der Kristalle abhängig. Die Größe der Kristallpartikel beträgt ungefähr 10-20 nm und bestimmt somit die Löslichkeit entscheidend mit (Bohner 2001a). Die Löslichkeit von CDHA entspricht ungefähr jener von  $\beta$ -TCP. Es ist gut bioresorbierbar. Seine große spezifische Oberfläche lässt vermuten, dass es fähig ist, größere Mengen an Wachstumsfaktoren oder auch Zellen aufzunehmen und diese so z.B. in Knochendefekte einzubringen. Es ist in Form von Granulaten und Blöckchen erhältlich (Bohner 2001a) und entsteht durch das unter 2.5 beschriebene Emulsionsverfahren aus CP-Zementpaste. Erhitzt man CDHA auf über 700°C, entsteht entweder  $\beta$ -TCP,  $\beta$ -TCP und HA oder nur HA (C/P-Verhältnis=1,67) (Bohner 2000). Das in dieser Arbeit verwendete CDHA wurde bislang noch nicht *in vivo* im Rahmen experimenteller oder klinischer Studien getestet. Allerdings zeigten sich in Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe ermutigende Ergebnisse hinsichtlich der Zelladhäsion

und osteogenen Differenzierung von MSC auf CDHA *in vitro* (Kasten et al. 2003).

## **2.6 Die Geschichte der Knochenersatzstoffe in chronologischer Reihenfolge**

Die Transplantation von Knochen ist seit langem das Thema vieler experimenteller und klinischer Studien. Im Jahre 1668 beschrieb der holländische Chirurg Job van Meekeren die erste Knochentransplantation (de Boer 1988). Mittels des aus einem Hundeschädel stammenden Transplantats konnte ein traumatischer Defekt im Schädel eines Soldaten rekonstruiert werden. 1820 wurde in Deutschland durch den Chirurgen Philips von Walter die erste Transplantation von autologem Knochen durchgeführt. Er ersetzte die nach einer Trepanation am Schädel fehlenden Knochenteile. Das erste allogene Transplantat wurde 1880 von William Macewen aus Schottland verwendet. Aber erst nachdem der US-Amerikaner F.H. Albee 1915 seine Arbeit über Knochentransplantation publiziert hatte, begann sich diese Therapiemethode allgemeiner durchzusetzen (Soost 1996). Die große Zahl von Verletzten im 1. Weltkrieg machte viele osteoplastische Transplantationen erforderlich. Vor allem Lindemann und Klapp taten sich 1916 als Kriegschirurgen hervor. Dies kann als die Geburtsstunde der systematischen Anwendung chirurgischer Maßnahmen zur Defektdeckung mit anschließender Rehabilitation durch eine defektprothetische oder epithetische Versorgung angesehen werden (Soost 1996). Nach dem 2. Weltkrieg folgte einer Zeit der vermehrten Anwendung boviner xenogener Transplantate aufgrund der hohen Rate an Misserfolgen eine Phase, in der die Transplantation tierischen Knochens auf das menschliche Skelett abgelehnt wurde. Nachdem die immunologische Abwehr des Empfängers gegen Fremdknochen erkannt wurde, konnten Maßnahmen zur Reduktion dieser Reaktionen, wie Bestrahlungen und Gefriertrocknungen, ergriffen werden (Soost 1996).

Schon seit sehr langer Zeit wird zudem versucht, Knochendefekte mittels Ersatzmaterialien zu decken. Knochenersatzmittel sind Biomaterialien. Diese werden definiert als „nicht körpereigene Substanzen, die nach der Implantation in den menschlichen Organismus dort vorhandene strukturelle Elemente, ganze

Gewebe und deren (Teil-) Funktionen ersetzen“ (Rueger 1998). Älteste Funde aus der neolithischen Zeit bestätigen die Rekonstruktion eines frontalen Kalottendefektes mittels einer gehämmerten Goldplatte bei einem Häuptling der Inkas (Soost 1996). Sporadische Berichte ähnlicher Art ziehen sich weit über die Jahrhunderte. Erst nach dem Mittelalter lässt sich die Geschichte des Knochenersatzes eingehender verfolgen. Um 1860, als sich aseptische chirurgische Techniken zu entwickeln begannen, beginnen die Berichte über die Verwendung von Implantatmaterialien, meist Metalle und Legierungen (Slatter 1993a). Im späten 19. Jahrhundert wurden Keramiken, wie zum Beispiel das „Plaster of Paris“ (Gips; hydratisiertes Calciumsulfat,  $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ ), verwendet, um knöcherne Defekte zu decken (Slatter 1993a). Über den ersten Einsatz von Calciumsulfat als Füllmaterial von Knochendefekten wurde 1892 von Dressman berichtet (Dressmann 1892). Graves (1972) und Hench (1980) entwickelten Keramiken aus Calcium-Verbindungen (Soost 1996). Osborn befasste sich seit 1978 mit Hydroxylapatitkeramiken (Soost 1996).

Bisher besitzt keine der auf dem Markt befindlichen Materialkombinationen eine osteoinduktive Wirkung, so dass sie dem autologen Transplantat im Hinblick auf biologische Aktivität und Sicherheit nicht annähernd ebenbürtig sind. Es ist daher eine ‚Biologisierung‘ der Implantate durch Besiedelung mit vitalen Zellen oder eine Mischung mit autologem Knochen erforderlich (Rueger 1998).

Der wachsende Bedarf an Knochenersatzstoff wird auch zukünftig die Untersuchung bereits bekannter sowie die Entwicklung neuer Knochenersatzmaterialien notwendig machen. Je nach Indikation können diese auch als Träger von Wachstumsfaktoren, Stammzellen oder Medikamenten oder auch Kombinationen dieser Faktoren eingesetzt werden.

### ***2.7 Mesenchymale Stammzellen***

Die Voraussetzung jeglicher Geweberegeneration ist das Vorhandensein von Zellen, die dieses Gewebe bilden können. Daher sind Stammzellen für das Knochen-Tissue Engineering von erheblicher Bedeutung.

Unter Stammzellen versteht man undifferenzierte Zellen, die zur Selbsterneuerung während der Replikation fähig sind und die in verschiedene Gewebearten differenzieren können (Fortier 2005). Man unterscheidet

embryonale Stammzellen (ESC), die aus der Blastocyste gewonnen werden und adulte Stammzellen, die aus Gewebe des postnatalen Organismus isoliert werden können (Fortier 2005). Obwohl ESC durch ihre Totipotenz und Immortalität (Heng et al. 2004) ein hohes Potential besitzen, sind mit ihrer Verwendung, abgesehen von der Existenz ethischer Probleme, weitere erhebliche Nachteile verbunden:

Ihre Gewinnung und Kultivierung ist schwierig, sie differenzieren in Kultur oft früh und spontan, die gerichtete Differenzierung zu einem bestimmten Zelltyp ist extrem kompliziert (Heng et al. 2004). Adulte Stammzellen hingegen können verhältnismäßig leicht isoliert werden, besitzen ein hohes Expansionspotential und einen stabilen Phänotyp, lassen sich problemlos einfrieren (Bruder et al. 1997) und transportieren und sind klinisch vielfältig einsetzbar (Le Blanc und Pittenger 2005). Stammzellen unterscheiden sich von Vorläuferzellen durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung (Weissmann 2000) im Sinne einer asymmetrischen Zellteilung. Vorläuferzellen gehen aus Stammzellen hervor, besitzen Differenzierungspotential und hohe Proliferationskapazität aber haben die Fähigkeit zur Selbsterneuerung verloren.

Adulte Stammzellen wurden anfangs aus Geweben mit hoher Zellteilungsrate isoliert (Cancedda et al. 2003). Die sehr gut erforschten hämatopoetischen Stammzellen (HSC) sind im Knochenmark in enger Nachbarschaft zu den so genannten stromalen Knochenmarkszellen (bone marrow stromal cells - BMSC) angesiedelt, die einen Teil des die HSC funktionell und strukturell unterstützenden Knochenmarksstromas bilden (Lichtman 1981; Allen et al. 1990; Mimeault und Batra 2006). In zwei 1966 und 1968 veröffentlichten Arbeiten beschrieb Friedenstein erstmals die Isolation von BMSC aus einer Knochenmarkssuspension (Friedenstein et al. 1968; Friedenstein et al. 1966). Es waren adhärente, fibroblastenähnliche Zellen, die *in vivo* zu Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten differenzieren konnten. Diese Beobachtung bestärkte die Annahme, dass es sich bei diesen Zellen um Stammzellen handelte, beziehungsweise dass diese Zellpopulation Stammzellen enthalten könnte. Unter dem Einfluss der jeweiligen Umgebung können sie fast alle Typen mesenchymalen Gewebes bilden.

MSC konnten bisher aus dem Knochenmark zahlreicher Tierarten, wie Maus (Kuznetsov et al. 1989), Ratte (Goshima et al. 1991c), Kaninchen (Friedenstein et al. 1974), Hund (Volk et al. 2005), Katze (Martin et al. 2002), Schwein (Nakamura et al. 2007), Ziege (Kruyt et al. 2007), Schaf (Petite et al. 2000) und Pferd (Koerner et al. 2006) sowie vom Menschen (Krebsbach et al. 1997; Haynesworth et al. 1992) isoliert werden.

Beim Menschen erfolgt die Isolation von MSC üblicherweise aus dem Knochenmark (Reyes et al. 2001; Pittenger et al. 1999). Nur wenige Milliliter Knochenmark, die nach Punktion des Beckenkamms mittels Aspiration gewonnen werden können, reichen zur Etablierung einer Primärkultur aus (Petite und Hannouche 2002).

Um mesenchymale Stammzellen zu isolieren, erfolgt zunächst eine Selektion der mononukleären Knochenmarkszellen anhand eines Dichtegradienten. Durch ihre Eigenschaft, sich an Zellkulturplastik anzuheften, können die MSC anschließend in Kultur unter Verwendung spezifischer Zellkulturmedien selektiert werden (Krebsbach et al. 1997). Heute wird fast ausschließlich diese Methode der auf dem Selektionsfaktor der Plastikadhärenz beruhenden MSC-Isolation angewendet (Reyes et al. 2001; Pittenger et al. 1999). Später kann die so isolierte Zellpopulation auf ihr charakteristisches Oberflächenantigen-Expressionsmuster und ihr Differenzierungspotential untersucht werden. Die zur Verfügung stehenden Protokolle zur Isolation und Kultivierung mesenchymaler Stammzellen weisen wesentliche Unterschiede auf und es ist anzunehmen, dass sie zu unterschiedlichen Stammzellpopulationen führen.

Nur eine von 100.000 bis 1.000.000 mononukleären Knochenmarkszellen ist eine echte Stammzelle (Pittenger et al. 1999; Jaiswal et al. 1997). Während bei Neugeborenen noch eine von zehntausend stromalen Knochenmarkszellen eine MSC ist, beträgt ihre Frequenz bei 80-jährigen nur noch 1 von 1.000.000 (Puelo 2003).

Es gibt Studien, die zeigen konnten, dass die aus einer einzelnen MSC nach entsprechender Expansion hervorgegangenen, klonalen Zellen zu einer Differenzierung in die osteogene, chondrogene und adipogene Richtung des mesenchymalen Gewebes fähig sind (Pittenger et al. 1999; Mareddy et al. 2007). Auch die Differenzierung zu Muskel- und Sehnenzellen wurde

beschrieben (Awad et al. 1999; Wakitani et al. 1995). Ergebnisse anderer Studien geben sogar Hinweise auf die Möglichkeit, MSC unter spezifischen Bedingungen *in vitro* und *in vivo* zu teils funktionsfähigen Endothelzellen (Aranguren et al. 2007), neuronenartigen Zellen, Hepatozyten und Zellen des hämatopoetischen Systems zu differenzieren (Jiang et al. 2002).

Es ist nachgewiesen, dass MSC ihre Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit über viele Passagen beibehalten und dass, obwohl ihre Zahl mit zunehmendem Alter des Patienten abnimmt, trotzdem noch für eine Zelltherapie ausreichende Zahlen an MSC gewonnen werden können (Goldberg et al. 1997). MSC können *in vitro* über 30 Populationsverdopplungen ohne merklichen Verlust ihres osteogenen Differenzierungspotentials vermehrt werden (Banfi et al. 2000; Haynesworth et al. 1992; Jaiswal et al. 1997).

Spezifische Marker für MSC fehlen bisher, auch wenn einige Marker fast immer vorhanden sind (Reyes et al. 2001; Boiret et al. 2005; Lakshmiopathy und Verfaillie 2005; Jiang et al. 2002; Deschaseaux et al. 2003; Jones et al. 2002; Kassem 2005; Schneider et al. 2005; Jones et al. 2005).

Zu diesen zählen beispielsweise CD 34-, CD 38-, CD 44+, CD 45-, anti-HLA-DR-, anti-HLA-A-, B-, C-, CD 80-, CD 66-, CD 13+, CD 29+, CD 73+, CD 90+, CD 105+/-, CD 106-, CD 166+. Vor einigen Jahren wurde STRO-1 als Oberflächenantigen zur Identifikation der MSC diskutiert, inzwischen jedoch wurde seine Bedeutung wieder relativiert (Dennis et al. 2002).

Mesenchymale Stammzellen werden heute bereits im Rahmen zellbasierter Therapieanwendungen in Human- und Veterinärmedizin eingesetzt.

In der Humanmedizin werden sie im Rahmen verschiedener Therapieansätze verwendet. Kitoh et al. (2004) schildern den Einsatz von MSC in der Distraktionsosteogenese. Sie konnten zeigen, dass das minimalinvasiv per Injektion durchgeführte Einbringen von MSC in den Osteotomiespalt die Heilungsperiode durch Beschleunigung der Knochenregeneration signifikant verkürzte (Kitoh et al. 2004). Vielversprechende Ergebnisse wurden auch in klinischen Studien zur Therapie der Osteogenesis imperfecta von Horwitz et al. erzielt (Horwitz et al. 2002; Horwitz et al. 1999). Mangi et al. setzten MSC in einem Herzinfarktmodell bei der Ratte ein (Mangi et al. 2003).

In der Veterinärmedizin beschränkt sich ihre Anwendung bisher vorwiegend auf experimentelle Projekte, in deren Rahmen die neuen Therapiemöglichkeiten bei einzelnen Patienten erprobt werden. Durch verschiedene Untersuchungen wurde bewiesen, dass mesenchymale Stammzellen in Kombination mit Knochenersatzstoffen zu einer beschleunigten Heilung von Frakturen und segmentalen Knochendefekten führen. Kraus et al. brachten MSC auf eine poröse HA/ $\beta$ -TCP-Matrix auf und überbrückten mittels dieses Konstrukts 21 mm große segmentale Defekte im Femur von Hunden. Bei den nicht überbrückten Defekten war eine atrophische Non-Union die Folge. Defekte, die mit autologem Knochen oder mit HA/ $\beta$ -TCP in Kombination mit MSC überbrückt wurden, heilten komplikationslos. Während sich in den Poren des Implantats, welches mit MSC besiedelt worden war, reichlich neuer Knochen gebildet hatte, entstand in den Poren der leeren Implantate nur wenig neuer Knochen. Meist bildete sich nur fibröses Gewebe aus (Kraus und Kirker-Head 2006). Arinzeh et al. kommen in einer sehr ähnlich angelegten Studie zu den gleichen Ergebnissen (Arinzeh et al. 2003). Petite et al. überbrückten 25 mm lange segmentale Defekte am Metatarsus von Schafen unter Verwendung von Implantaten aus dem Exoskelett der Koralle, welche entweder ohne den Zusatz von Zellen, unter Zusatz von frischem Knochenmark oder nach Besiedelung mit MSC in den Defekt eingebracht wurden. Einige Defekte wurden nicht gedeckt. Nach 16 Wochen erfolgte die Untersuchung der Implantate. Eine vollständige Knochenheilung konnte nur mit den mit MSC besiedelten Implantaten in drei von sieben Schafen erreicht werden. Allerdings wiesen sechs der Schafe mindestens einen geheilten Kortex auf. Bei den leeren Defekten erfolgte keine Knochenbildung. Die Verwendung der leeren Keramik führte nur zu geringer Knochenneubildung und nie zu einer Knochenheilung. Die Defekte, die die mit Knochenmark kombinierten Implantate erhalten hatten, waren lediglich mit dichtem, fast avaskulärem fibrösem Gewebe gefüllt (Petite et al. 2000). R. K. W. Smith brachte bei 37 Rennpferden mesenchymale Stammzellen in hoher Zahl in Kernläsionen der oberflächlichen Beugesehne ein. Ziel war es, eine bessere Regeneration und Funktionalität der Sehne nach einer durch Verletzung der Sehne entstandenen mittel- bis hochgradigen Entzündung zu erreichen. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil der Pferde, die wieder zum Renneinsatz

kamen, im Vergleich mit Literaturdaten signifikant höher war (Smith 2006). Brehm untersuchte in einer Studie mit 120 Pferden die Auswirkungen einer intraläsionalen Injektion autologer Stammzellen auf Erkrankungen der oberflächlichen Beugesehne oder des Fesselträgers und erzielte eine Erfolgsrate von 80-85% (Brehm 2007). Oyama et al. injizierten aus Sklettmuskel-Biopsien gesunder Hunde isolierte und expandierte Myoblasten mittels eines in die Arteria femoralis eingeschobenen Katheters in die linke Koronararterie des jeweiligen Spenderhundes. Das Anwachsen und Überleben der transplantierten Zellen im ventrikulären Myokard konnte nachgewiesen werden. Diese Technik könnte zukünftig in der Therapie von Hunden mit dilatativer Kardiomyopathie verwendet werden, indem die transplantierten Zellen im Myokard zu funktionsfähigen Herzmuskelzellen differenzieren und so zur Regeneration des Herzens beitragen (Oyama et al. 2005). Auch transduzierte MSC wurden bereits erfolgreich von Lim et al. in einem Myokardinfarkt-Modell des Schweins zur Regeneration geschädigten Myokards eingesetzt (Lim et al. 2006).

### **2.8 Zellkulturmedien**

Die Standard-Zellkulturmedien für MSC enthalten bis zu 20% fötales Kälberserum (FCS) (Haynesworth et al. 1992; Kuznetsov et al. 2000; D'Ippolito et al. 1999; Jaiswal et al. 1997; Mauney et al. 2004; Petite und Hannouche 2002; Müller et al. 2000).

FCS enthält essentielle Faktoren für die Zelladhäsion, Proliferation und Differenzierung (Petite und Hannouche 2002). Dennoch ist der Gebrauch von FCS im Hinblick auf eine klinische Applikation der gewonnenen Zellen sehr problematisch, da sich bovines Protein an die Zelloberfläche anheftet und auch von den Zellen aufgenommen wird. Selbst unter niedrigen Serumkonzentrationen (2% FCS) erfolgt noch eine Kontamination der Zellen (Gregory et al. 2006). Ob diese Verunreinigung durch einen Wechsel auf FCS-freies Medium am Ende der Kultivierung beseitigt werden kann, wird kontrovers diskutiert. Johnson et al. zeigten, dass Keratinozyten, die in einem Medium mit 5% FCS-Zusatz kultiviert worden waren, nach einer dreitägigen Inkubation in FCS-freiem Medium noch immer 31% des anfänglich gemessenen bovines

Proteins enthielten. Dieser Wert veränderte sich auch nach insgesamt 8 Tagen Inkubation in FCS-freiem Medium nicht. Auch eine Kultivierung der Zellen in Medien mit reduziertem FCS-Gehalt bewirkte keine signifikante Verringerung bezüglich der Proteinaufnahme der Zellen (Johnson et al. 1990). Dagegen berichteten Gregory et al. eine Reduktion der Kontamination von MSC mit bovinem Protein nach kurzer Kultur in mit Humanserum supplementiertem Medium um 99% (Gregory et al. 2006).

FCS wirkt sowohl im Menschen als auch im Nagetier schon in winzigen Dosen stark immunogen (Gregory et al. 2006; Johnson et al. 1991; Meyer et al. 1988; Sanderson 1977; WHO 1997). Kievits et al. kultivierten syngenetische Maus-Lymphoblasten in Gegenwart von FCS und injizierten sie diesen Mäusen intraperitoneal (i.p.). Sie konnten eine gegen bovines  $\beta_2$ -Mikroglobulin gerichtete Bildung lymphozytotoxischer Antikörper nachweisen, obwohl die Zellen vor Verwendung drei Mal mit PBS gewaschen worden waren (Kievits et al. 1988). Solche Antikörper könnten eine akute oder chronische Transplantatabstoßung oder eine anaphylaktische Reaktion verursachen (Meyer et al. 1988; Boneva et al. 2001; Johnson et al. 1991). In Zeiten boviner spongiformer Enzephalopathie (BSE) birgt die Verwendung von FCS zudem die potentielle Gefahr der Übertragung von Prionen (Scott et al. 1999; Asher 1999; Brown 2005; Ironside und Head 2004; WHO 1997). Diese wurden beim Menschen als Auslöser der variant-Creutzfeld-Jakob-Krankheit (v-CJD) identifiziert (Lasmézas et al. 2001; Scott et al. 1999; WHO 1997). Obwohl die hauptsächlichliche Infektiosität auf die zellulären Bestandteile des Blutes zurückzuführen ist, ist die Übertragung durch z.B. Plasmaderivate nicht auszuschließen (Ironside und Head 2004). Auch existiert ein geringes aber vorhandenes Risiko der Übertragung weiterer Erreger auf den Menschen, zumal die implantierten MSC bei der Verwendung im Knochen-Tissue Engineering in ein gut durchblutetes Wundbett eingebracht werden. Erreger, die unter normalen Umständen nicht oder nur schwer in der Lage wären, eine Infektion hervorzurufen, könnten durch eine Transplantation die normalen Abwehrmechanismen umgehen (Boneva et al. 2001). Ein weiterer Nachteil der Verwendung von FCS ist die zwischen den verschiedenen Chargen auftretende Variation, die Einfluss auf die Zellvermehrung hat und welche ein aufwendiges

Chargen-Screening mittels *in vitro*-Versuchen auf die Eignung des jeweiligen FCS unabdingbar macht (Lennon et al. 1996). Mehrere Arbeitsgruppen haben bereits versucht, FCS bei der Expansion von MSC durch Verwendung von serumfreiem Medium (SFM), allogenen und autogenem Serum sowie synthetischem Serumersatz zu ersetzen. Die Verwendung serumfreien Mediums zur Zellexpansion ist aufgrund der ausbleibenden Bildung von MSC-Kolonien nach der Isolation nicht möglich (Kuznetsov et al. 2000). Müller et al. verwendeten syngenetisches Mausserum, wodurch sich die Proliferationsrate der Zellen verringerte (Müller et al. 2000). Das von Lennon et al. verwendete Expansionsmedium enthielt trotz des fehlenden FCS eine xenogene Komponente in Form von bovinem Serum Albumin (BSA). Die von ihnen beobachteten Proliferationsraten glichen denen im FCS-haltigen Medium (Lennon et al. 1995). Auch das von Gronthos und Simmons verwendete serumfreie Medium enthielt BSA sowie bovines Pankreas-Insulin. Zur erfolgreichen Zellexpansion mussten die Zellkulturflaschen mit Fibronectin vorbeschichtet und dem Medium EGF (Epidermal Growth Factor) und PDGF (Platelet-derived Growth Factor) zugesetzt werden (Gronthos und Simmons 1995). Obwohl die Verwendung autogenen Serums für die Isolation und Expansion von MSC im Vergleich zu der Verwendung von FCS mindestens gleichwertige Ergebnisse liefert (Stute et al. 2004), ist dies aufgrund der großen Menge (ca. 10%), die für die Expansion höherer Zellzahlen notwendig ist, nicht praktikabel. Auch allogenes, gepooltes Serum stellt keine Alternative dar, weil es zu Wachstums-Stop und Tod der MSC führt (Sotiropoulou et al. 2006b) und weiterhin ein Risiko der Übertragung von Infektionen besteht. Zudem berichteten Kuznetsov et al. von einer durch den Einsatz von humanem Serum verursachten geringeren Zellproliferation und verminderten osteogenen Differenzierung der von ihnen untersuchten MSC *in vitro* und *in vivo* (Kuznetsov et al. 2000). Synthetischer Serumersatz (z.B. Nuserum®) erzielte eine dem Gebrauch von FCS vergleichbare Expansion (Wong und Tuan 1993), ist aber im Allgemeinen sehr kostenintensiv. Zudem ist die genaue Rezeptur der kommerziell erhältlichen, FCS-freien Zellkulturmedien nicht bekannt, so dass nicht ausgeschlossen ist, dass noch immer gewisse xenogene Komponenten

enthalten sind. Da keine der vorgenannten Substanzen FCS vollwertig ersetzen kann, muss nach einer anderen Lösung gesucht werden.

## **2.9 Plättchenreiches Plasma**

Plättchenreiches Plasma (PRP) ist ein Thrombozytenkonzentrat, welches in zwei Zentrifugationsschritten autolog aus dem Blut eines Patienten gewonnen werden kann (Yamada et al. 2004; Marx et al. 1998; Weibrich et al. 2003). Dadurch ist in PRP ungefähr die sechsfache Menge an Thrombozyten enthalten (ca. 1.500.000/ $\mu$ l) wie im Vollblut (260.000/ $\mu$ l) (Weibrich et al. 2003; Weibrich et al. 2004; Wagner und Foitzik 2000).

PRP enthält eine Reihe von Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel PDGF (Platelet-derived Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), IGF (Insulin-like Growth Factor), TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ), EGF (Epidermal Growth Factor) und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Weibrich et al. 2003; Weibrich et al. 2004). Diese Wachstumsfaktoren findet man auch im Rahmen der frühen Frakturheilung (Lieberman et al. 2002). PDGF hat viele positive Effekte auf die Wundheilung, einschließlich Proliferation, Angiogenese und die Hochregulation anderer GFs (Yu et al. 2003). Man findet es schon während der frühesten Phase der Frakturheilung. PDGF fördert die Knochenheilung, indem es auf MSC und Osteoblasten chemotaktisch und proliferationssteigernd wirkt (Gruber et al. 2004; Puelo 2003). Zur TGF- $\beta$ -Gruppe gehören generelle Wachstums- und Differenzierungsfaktoren, die im Rahmen der Knochenregeneration die Osteoklastenbildung und Knochenresorption verhindern (Gosain et al. 2000). Zusätzlich stimuliert TGF- $\beta$  die Proliferation mesenchymaler Stammzellen (Lieberman et al. 2002). Der Effekt von TGF- $\beta$  scheint von der Reife der jeweiligen Zellen abzuhängen; in einer Studie mit humanen Osteoblasten hemmte es bei frühzeitiger Verwendung in Kultur die Bildung einer mineralisierten Matrix (Puelo 2003). Von IGF-I ist bekannt dass es die Zahl der Osteoblasten steigert und so die Knochenheilung anregt (Birnbaum et al. 1995). Es ist in heilenden Frakturen von Ratten und Menschen zu finden. Die genaue Wirkung von IGF-1 auf MSC ist noch unbekannt (Jadlowiec et al. 2003). EGF bewirkt die Proliferation und Migration von MSC. VEGF nimmt Einfluss auf Endothelzellen und induziert so

die Neovaskularisation (Dugrillon und Klüter 2002). FGF-2 spielt eine wichtige Rolle beim Knochenwachstum und -umbau, möglicherweise, indem es ein Gleichgewicht zwischen Osteoblasten und Osteoklasten erhält (Jadlowiec et al. 2003). Es ist auch als potenter angiogener Faktor bekannt (Puelo 2003). Auf MSC wirkt FGF-2 mitogen (Lieberman et al. 2002).

Thrombozyten wirken teilweise mikrobizid (Dugrillon und Klüter 2002). Durch Degranulation der Thrombozyten werden die in ihnen enthaltenen Wachstumsfaktoren freigesetzt (Landesberg et al. 2000). Die Degranulation kann durch Zusatz von Calcium und Thrombin ausgelöst werden, aber auch durch Tiefgefrieren des PRP und anschließendes Auftauen (Sekido et al. 1987; Pesonen et al. 1989; Zimmermann et al. 2003).

Weibrich et al. und Gruber et al. konnten zeigen, dass PRP die Proliferation osteoblastenähnlicher Zellen bzw. Knochenzellen fördert (Gruber et al. 2003; Weibrich et al. 2002a). Auch die Proliferation mesenchymaler Stammzellen wird durch PRP gesteigert (Lucarelli et al. 2003; Weibrich et al. 2002a; Gruber et al. 2004). Marx et al. waren die ersten, die PRP klinisch einsetzten. Sie konnten in einer klinischen Studie an 44 Patienten mit mandibulären Knochendefekten eine signifikant höhere Knochendichte und eine schnellere Knochenreifung beim Vergleich zwischen dem Einsatz autogener Spongiosa mit einem Zusatz von PRP und autogener Spongiosa ohne PRP nachweisen (Marx et al. 1998). Vor allem in der Oralchirurgie wurden daraufhin zahlreiche Studien durchgeführt, die sich mit der Wirkung von PRP beschäftigten. Hier wird PRP heute überwiegend beim plastischen ossären Aufbau, beispielsweise zur Implantatverankerung, klinisch eingesetzt (Thorn et al. 2004; Tözüm und Demiralp 2003; Pacifici et al. 2003).

Viele experimentelle und auch klinische Studien postulieren eine positive Wirkung des PRP auf Knochenheilung und Implantatverankerung. Zechner et al. konnten in einer Studie zur Knochenheilung von oralen/dentalen Implantaten am Minischwein mit dem Einsatz von PRP eine im Vergleich zur Kontrollgruppe doppelt so hohe Knochenbildung nach 3 und 6 Wochen beobachten (Zechner et al. 2003). Nach Implantation eines laminaren Titanimplantates mit PRP in die Tibia von 15 Ratten fanden Fontana et al. nach 30 Tagen Implantation ein signifikant erhöhtes Knochenvolumen in dem an das Implantat angrenzenden

Bereich im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne PRP (Fontana et al. 2004). In einer Studie zur Knochenheilung am langstreckigen Knochendefekt des Rattenfemurs stellten Rai et al. fest, dass der Zusatz von PRP zu dem zur Defektdeckung verwendeten Knochenersatzstoff Polycaprolacton/20% Tricalciumphosphat (PCL-TCP) nach drei Wochen zu einem 70.3% höheren Gefäßvolumen sowie nach 12 Wochen zu einer signifikant höheren Rate vollständig geheilter Femura (83% bei PCL-TCP+PRP verglichen mit 33% bei PCL-TCP alleine) führte (Rai et al. 2007). Im Bereich der Veterinärmedizin existiert unseres Wissens bisher nur die bereits unter Punkt 2.5.1 („Eigenschaften und Einsatzmöglichkeiten von  $\beta$ -TCP“) zitierte Studie von Hauschild et al., die den klinischen Einsatz von PRP bei einer aufgrund einer traumatischen Luxation des rechten Tarsalgelenks notwendigen Arthrodesese bei einem Beagle unter Einsatz von  $\beta$ -TCP und einem Zusatz von PRP beschreibt (Hauschild et al. 2005).

Daneben gibt es aber auch Arbeitsgruppen, die keine positive Wirkung des PRP auf Knochenheilung, Knochendichte oder Implantatresorption feststellen konnten (Li et al. 2004; Choi et al. 2004; Jensen et al. 2005). Es wurde sogar über einen möglichen negativen Effekt von PRP auf die ektopische Knochenbildung im Modell der intramuskulären Implantation von DBM und PRP in die Nacktmaus sowie auf die Knochenheilung in einem Defektmodell der Mandibula beim Hund, bei welchem autologer Knochen mit Zusatz von PRP zur Defektdeckung verwendet wurde, berichtet (Choi et al. 2004; Ranly et al. 2007). Zudem gibt es Hinweise, dass sowohl die Art der Herstellung des PRP als auch die enthaltene Thrombozytenkonzentration Einfluss auf die Art der Wirkung des PRP hat. So wurde beispielsweise eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Thrombozyten pro  $\mu$ l PRP als vorteilhaft für die Knochenbildung angesehen, während niedrigere Konzentrationen gar keine und höhere Konzentrationen eine inhibitorische Wirkung zeigten (Weibrich et al. 2004). Mögliche Erklärungen hierfür könnten ungewollte inhibitorische oder zytotoxische Wirkungen durch unphysiologisch hohe Konzentrationen der GFs sein. Von einem konzentrationsabhängigen, anti-mitogenen Effekt von TGF- $\beta$ , einem vorherrschenden GF in Thrombozyten, wurde bereits berichtet (Floege et al. 1991; Pollard 2001). Generell zeigen Thrombozytenkonzentrate einen

konzentrationsabhängigen Effekt. Erhöht man ihre Konzentration im Zellexpansionsmedium, erhöht sich auch die Proliferationsrate der Zellen, bis ein Plateau erreicht wird. Eine weitere Steigerung der Konzentration wirkt sich eher hemmend aus (Weibrich et al. 2002a). Die GF-Konzentrationen im PRP sind sowohl mit der Thrombozytenzahl des Ausgangs-Vollblutes als auch mit der Plättchenzahl des daraus resultierenden PRP schlecht korreliert (Weibrich et al. 2002b). PRP kann mit Hilfe spezieller Methoden auch in kleinen Mengen gewonnen werden (z.B. PRP-Kit, Fa. Curasan, Kleinostheim) (Weibrich et al. 2003).

Gruber et al. zeigten, dass der Überstand Thrombin-aktivierter Plättchen die Migration und Proliferation von MSC steigern konnte, während deren *in vitro* osteogene Differenzierung gehemmt wurde. Das PDGF war für die Proliferationssteigerung verantwortlich, da gegen PDGF gerichtete, neutralisierende AK die Zellproliferation hemmten (Gruber et al. 2004).

Die Datenlage bezüglich PRP ist somit uneinheitlich und kann noch nicht abschließend beurteilt werden. Im Hinblick auf die bisher vorliegenden Ergebnisse zur Wirkung auf die Proliferation mesenchymaler Stammzellen stellte sich PRP aber als vielversprechender Ersatz für FCS dar.

### ***2.10 SCID-Maus Modell zur Knochenbildung nach subkutaner Implantation***

Die ektope Implantation von Knochenersatzmaterialien wurde zunächst in einem Modell einer Diffusionskammer, die mit dem entsprechenden Material bestückt und in die Bauchhöhle eines Versuchstieres eingebracht wurde, untersucht (Friedenstein et al. 1966). Kusnetsov et al. entwickelten dann die erste Methode, Knochenbildung außerhalb einer „diffusion chamber“ zu erreichen. Sie implantierten MSC unter die Nierenkapsel von Mäusen und beobachteten Knochenbildung in den Transplantaten (Kuznetsov et al. 1989). Zwei Jahre später entwickelten Goshima et al. ein Modell zur ektopen subkutanen (s.c.) Transplantation (Goshima et al. 1991a; Goshima et al. 1991b; Goshima et al. 1991c). Hierbei wurden Ratten- oder Wachtel-MSK auf poröse HA/TCP-Blocks aufgebracht und subkutan bei Ratten implantiert. Dazu wurden die Materialien in stumpf präparierte subkutane Taschen verbracht. Schon nach

2 Wochen wurde Knochenneubildung in den Poren der Implantate festgestellt. Haynesworth et al. konnten zeigen, dass das Modell der s.c. Implantation der Knochenersatzstoff-MSK-Konstrukte dem Modell der Diffusionskammer überlegen war und somit den sensitiveren *in vivo* Ansatz für eine ektope Knochenbildung darstellt (Haynesworth et al. 1992). Krebsbach et al. führten einen solchen Versuch an Mäusen durch und untersuchten dabei gleichzeitig verschiedene Arten von Trägermaterialien auf ihre Eigenschaften zur Knochenneubildung (Krebsbach et al. 1997). Die subkutan implantierten Zell-Biomaterial-Komposite zeigen osteogene Differenzierung und Knochenneubildung und erlauben die quantitative und qualitative Evaluierung verschiedener Materialien in Bezug auf ihre osteogenen Fähigkeiten (Dennis et al. 1998). Die ektope subkutane Implantation der Materialien bietet somit eine einfache, schnelle und teilweise auch leichter auszuwertende Alternative zu den anderen genannten Assays.

### ***2.11 Beschichtungen der Matrix***

Eine vor dem Besiedeln mit MSC vorgenommene Beschichtung der Knochenersatzmaterialien mit Fibronectin oder Laminin erhöht die Adhäsion und osteogene Differenzierung der Zellen (Dennis et al. 1992; Dennis und Caplan 1993; Seitz et al. 1982). Die Oberfläche eines Knochenersatzstoffes kann durch eine Beschichtung dahingehend verändert werden, dass sie ein Überleben von MSC begünstigt. Da die oben genannten Stoffe relativ teuer sind, haben wir nach einer günstigeren Möglichkeit der Beschichtung gesucht. Humanes Serum bot sich aufgrund seiner einfachen Verfügbarkeit als Alternative an. Wird autologes Serum verwendet, so besteht auch hier kein Risiko von Infektionen oder Immunreaktionen.

### 3. Material und Methoden

Für die erfolgreiche Anwendung eines Knochen-Tissue-Engineering-Verfahrens wird eine große Anzahl mesenchymaler Stammzellen (MSC) und ein für diese möglichst optimales Trägermaterial in Form eines Knochenersatzstoffes benötigt. Eine erfolgreiche Expansion der aus Knochenmark isolierten MSC *in vitro* ist die Vorbedingung für eine klinische Applikation *in vivo*. Die üblicherweise für die Zellexpansion verwendeten Kulturmedien enthalten fötales Kälberserum (FCS), welches Risiken unerwünschter immunologischer Reaktionen birgt und einen potentiellen Vektor der Übertragung von Prionen darstellt. Daher ist es für eine sichere klinische Anwendung der Stammzellen wichtig, Zellkulturmedien zu entwickeln, die frei von FCS sind, und die trotzdem eine schnelle Vermehrung und den Erhalt der Differenzierungsfähigkeit der MSC gewährleisten.

In dieser Studie wurde das in einem Expansionsmedium für Stammzellen enthaltene fetale Kälberserum (FCS) durch plättchenreiches Plasma (PRP) ersetzt. Die Auswirkungen auf Expansion und mesenchymale Differenzierung der MSC wurden in zwei *in vitro* Versuchen untersucht. Weiterhin wurden MSC, die in FCS-supplementiertem Medium expandiert wurden, sowie MSC, die in PRP-supplementiertem Medium expandiert wurden *in vivo* auf ihre Fähigkeit zur ektopen Knochenneubildung auf dem neuartigen keramischen Knochenersatzstoff CDHA im Vergleich mit dem klinisch schon eingesetzten  $\beta$ -TCP getestet. Zusätzlich sollte der Einfluss einer vorherigen Beschichtung dieser Trägerstoffe mit Fibronectin oder Humanserum evaluiert werden. Zu diesem Zweck wurde ein *in vivo* Versuch mit ektooper subkutaner Implantation von Biomaterial-Zell-Kompositen im Rahmen eines etablierten SCID-Maus Modells durchgeführt.

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle Versuche in den Räumen der Sektion experimentelle Orthopädie der Orthopädischen Universitätsklinik Heidelberg durchgeführt.

Die exakten Methoden zur Herstellung von Puffern und Zellexpansions- und Differenzierungsmedien sowie zum Ansetzen von Lösungen und Wachstumsfaktoren finden sich im Anhang.

### 3.1 Knochenmark

Das Knochenmark stellt eine Quelle adulter humaner mesenchymaler Stammzellen dar. Die für die *in vitro* Versuche benötigten MSC wurden aus Knochenmarksaspiraten von sechs hämatologisch gesunden Patienten der Orthopädischen Universitätsklinik Heidelberg isoliert, die sich einer Hüft-Endoprothese-Operation oder Operationen an der Wirbelsäule unterziehen mussten. Es handelte sich um gesunde Menschen im Alter von 12 bis 75 Jahren. Für den *in vivo* Versuch wurden MSC aus Knochenmarksaspiraten von 3 Spendern im Alter von 10 bis 77 Jahren isoliert und gepoolt verwendet. Alter und Geschlecht der Spender sind aus Tabelle 1 ersichtlich.

Alle Eingriffe wurden durch die institutseigene Ethikkommission der Universität Heidelberg genehmigt (Antragsnummern: L-295/2001, 025/2001, 041/2001 und 42/2001). Vor dem Eingriff erfolgte eine ausführliche Aufklärung und schriftliche Einwilligung aller Spender. Die Operation erfolgte unter Allgemeinanästhesie. Nach Präparation des Beckenkamms wurde dieser osteotomiert. Zwischen 7 und 25 ml Knochenmark wurden mittels heparinisierten Spritzen (ca. 5000 IE Heparin pro Spritze) aspiriert, durch Inversion gemischt und sofort zur Isolation der Stammzellen in das Zellkulturlabor verbracht.

	<i>In Vitro</i> Versuche		<i>In Vivo</i> Versuch
	Differenzierung	Expansion	
<b>Spenderzahl</b>	6	6	3
<b>Spenderalter (MW+/-SD)</b>	32,5 +/- 23,9 Jahre	40,7 +/- 25,5 Jahre	33 +/- 38,1 Jahre
<b>Geschlecht</b>	5 weibl. / 1 männl.	5 weibl. / 1 männl.	2 weibl. / 1 männl.
	<i>Alter/Geschlecht</i>	<i>Alter/Geschlecht</i>	<i>Alter/Geschlecht</i>
<b>Spender 1</b>	23, weibl.	23, weibl.	12, weibl.
<b>Spender 2</b>	46, weibl.	46, weibl.	77, männl.
<b>Spender 3</b>	23, weibl.	23, weibl.	10, weibl.
<b>Spender 4</b>	75, weibl.	75, weibl.	
<b>Spender 5</b>	16, weibl.	65, weibl.	
<b>Spender 6</b>	12, männl.	12, männl.	

**Tabelle 1:** Alter und Geschlecht der Knochenmarkspender

### **3.2 Plättchenreiches Plasma**

Das neu entwickelte Expansionsmedium für mesenchymale Stammzellen (MSC) enthielt an Stelle des normalerweise verwendeten fetalen Kälberserums (FCS) plättchenreiches Plasma (PRP). Allogenes PRP erhielten wir von der Blutbank der Universität Heidelberg (Blutbank im Institut für Immunologie; Heidelberg). Das PRP wurde mittels Zentrifugation (10 min, 1000 rpm / 209 x g) aus einem Pool von 5 buffy coats hergestellt, welche aus Vollblutspenden gewonnen und mit Citrat-Phosphat-Dextrose antikoaguliert wurden. Aus dem plättchenreichen Überstand wurden mittels Filtration die Leukozyten depletiert. Die Plättchenzahl im Leukozyten-depletierten PRP betrug  $1.56 \times 10^6/\mu\text{l}$ . Um repräsentative Werte der Wachstumsfaktoren zu erreichen, wurde das PRP von 5 Spendern gemischt. Das sterile PRP wurde unter einer Sterilarbeitsbank in Aliquots aufgeteilt und dann bis zur Verwendung bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren.

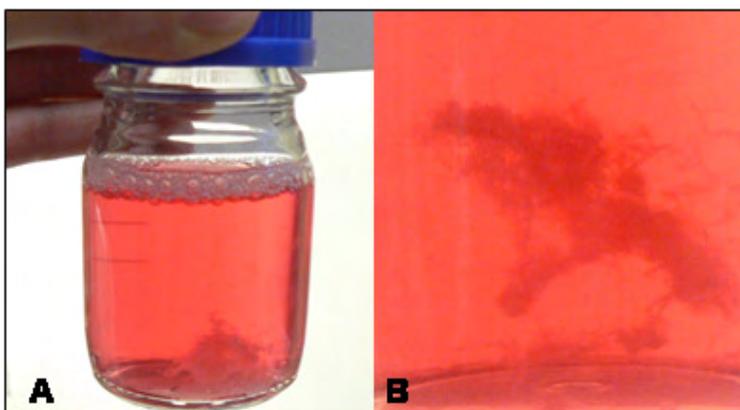
Für die quantitative Ermittlung des Gehalts an humanem Platelet-derived Growth Factor-AB (PDGF-AB) und humanem Transforming Growth Factor beta 1 (TGF- $\beta$ 1) in unserem gepoolten PRP verwendeten wir zwei ELISA-Kits (PDGF: DHD00B; TGF- $\beta$ 1: DB100; Fa. R&D, Wiesbaden). Die Assays wurden bis auf eine kleine Modifikation bei der Verdünnung der Proben (die Verdünnung erfolgte 1:100 mit Calibrator Diluent RD6-11 bei der PDGF-AB-Bestimmung und 1:50 mit Calibrator Diluent RD6M bei der TGF- $\beta$ 1-Bestimmung) nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

### **3.3 Zellexpansionsmedien**

Um die aus Knochenmark isolierten mesenchymalen Stammzellen (MSC) zu vermehren (expandieren), wurde ein modifiziertes Expansionsmedium nach Verfaillie mit dem Zusatz von 2% FCS oder 3% PRP verwendet (Reyes et al. 2001). Es war notwendig 3% PRP zu verwenden, da sich sonst kein ausreichender Thrombozyten-Clot im Medium bilden ließ. Im Gegensatz zu dem ursprünglichen Medium nach Verfaillie befand sich in unserem Medium kein bovines Serumalbumin. Zusätzlich enthielt es Dexamethason in 20-fach höherer Konzentration. Jaiswal et al. stellten fest, dass eine erhöhte Dexamethason-Konzentration des Kulturmediums die Proliferation und osteogene Differenzierung von MSC signifikant steigerte (Jaiswal et al. 1997).

Auch Peter et al. beobachteten diesen Effekt bei stromalen Knochenmarkszellen der Ratte (Peter et al. 1998). Coelho et al. wiesen ebenfalls eine Stimulation der osteogenen Differenzierung durch Dexamethason nach (Coelho und Fernandes 2000).

Das Expansionsmedium setzte sich aus Dulbecco's modified Eagle's medium high Glucose (DMEM mit 4,5 g/l Glucose; 547,5 ml auf 1 Liter Medium), MCDB (400 ml auf 1 Liter Medium), 10 µg/ml Insulin, 10 µg/ml Transferrin, 10 ng/ml Selenit (ITS-Supplement), 100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,02 µM Dexamethason und 0,1 mM Ascorbinsäure- 2- phosphat zusammen. Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen an einer Sterilarbeitsbank angesetzt und mittels eines Filters mit 0,22 µm Porendurchmesser steril filtriert. Dann wurde es in Aliquots aufgeteilt und bei -20°C gelagert. Vor der Verwendung wurde die benötigte Menge bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut und jeweils 10 ng/ml Epidermal Growth Factor (EGF) und Platelet-derived Growth Factor BB (PDGF-BB) sowie 2% FCS oder 3% PRP frisch hinzugegeben. Wachstumsfaktoren und FCS wurden ebenfalls bis zur Verwendung bei -20°C und das PRP bei -80°C gelagert. In dem Medium, welches PRP enthielt (*Abbildung 1A*), wurde durch Pipettieren ein Thrombozyten- Clot (*Abbildung 1B*) erzeugt, der über die gesamte Gebrauchsperiode des Mediums darin schwimmend verblieb.



**Abbildung 1:** A) PRP-supplementiertes Medium; B) Thrombozyten-Clot

### **3.4 Isolation von humanen mesenchymalen Stammzellen**

Alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter sterilen Bedingungen an einer Sterilarbeitsbank mit Laminar Flow durchgeführt, soweit es nicht anders vermerkt wurde.

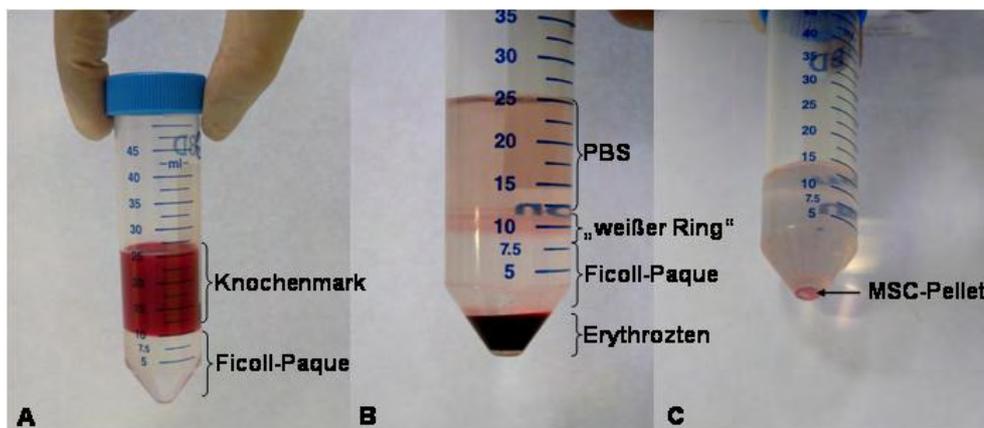
Nach der Entnahme im Operationssaal wurde jedes Knochenmarksaspirat zur Isolation der MSC in das Zellkulturlabor verbracht. Das Knochenmark wurde in ein steriles 50 ml-Falcon-Röhrchen umgefüllt. Dann wurde es in einem Verhältnis von 1:2 mit auf 37°C angewärmter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gemischt und für 10 min bei 1800 rpm (677 x g) und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert („gewaschen“). Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Bestandteile des Knochenmarks, welche die Stammzellisolation behindern, wie zum Beispiel Fett oder Knochenstückchen, konnten so entfernt oder reduziert werden. Nach Verwerfen des Überstandes, der hauptsächlich aus PBS, Fett, und lysierten Blutzellen bestand, wurde das entstandene Zellpellet erneut im Ausgangsvolumen der Probe in PBS aufgenommen und resuspendiert.

Dieses Gemisch wurde nun vorsichtig in einer Relation von 1:1 bis 1:2 in einem neuen 50 ml-Falcon-Röhrchen über einen Ficoll-Paque<sup>TM</sup>Plus-Dichtegradienten geschichtet (*Abbildung 2A*). Es folgte eine Zentrifugation bei 2700 rpm (1524 x g) für 30 min ohne Bremse. Als Resultat dieser Zentrifugation wurde die mit Stammzellen angereicherte Fraktion niedrigerer Dichte als ein weißer Ring an der Phasengrenze zwischen Ficoll-Paque<sup>TM</sup>Plus-Dichtegradienten und PBS sichtbar (*Abbildung 2B*). Dieser weiße Ring wurde nun mittels einer sterilen 5 ml-Pipette isoliert. Zur Bestimmung der enthaltenen Zellzahl und der Vitalität der Zellen wurden 10 µl dieser Suspension in einem Eppendorf-Röhrchen mit 10 µl Trypanblau (0,4%) angefärbt. Die Zellen wurden mittels einer Zählkammer nach Neubauer gezählt (Formel: Gezählte Zellen / 4 x 2 x 10.000 = Anzahl der Zellen pro ml Zellsuspension). Die Zellsuspension wurde nun im doppelten Volumen PBS gewaschen (10 min bei 1800 rpm/677 x g), um weitere Erythrozyten zu entfernen.

Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das entstandene kleine Zellpellet (*Abbildung 2C*) mit serumfreiem Kulturmedium resuspendiert. Diese Suspension wurde anschließend in zwei gleiche Teile geteilt und zur Primärkultur in Zellkulturflaschen (je 25 cm<sup>2</sup>) ausgesät. Eine dieser Flaschen

erhielt Medium, welchem FCS zugesetzt worden war, die andere erhielt Medium, welchem PRP zugesetzt worden war. Es wurden Standardbedingungen zur Zellkultur verwendet (37°C, 6% CO<sub>2</sub>).

Nach 24h wurden nicht-adhärenente Zellen, meist verbliebene Erythrozyten und Leukozyten, durch Waschen der Kulturflaschen mit PBS entfernt und das Kulturmedium komplett ausgewechselt. Ein Mediumwechsel erfolgte zwei Mal wöchentlich.



**Abbildung 2:** Verschiedene Stadien der Stammzellisolation

### 3.4.1 Dichtegradient

Die Isolation von Stammzellen mittels eines Ficoll-Paque<sup>TM</sup>Plus Dichtegradienten beruht auf folgendem Prinzip:

Mononukleäre Zellen (Lymphozyten und Monozyten) haben eine etwas geringere Dichte als Granulozyten und Erythrozyten und können mit Hilfe einer isopyknischen Zentrifugation mit einem diskontinuierlichen Dichtegradienten isoliert werden (Krause 2004).

Die Zellseparation mit Ficoll-Metrizoat beruht darauf, dass das Polysaccharid Ficoll die Erythrozyten zu rasch-sedimentierenden großen Klumpen agglutiniert, während Metrizoat (Na-Diatrizoat, Röntgen-Kontrastmittel; Hypaque®) die Dichte des Mediums auf 1,077 g/l erhöht. Infolge dessen finden sich nach der Zentrifugation die Erythrozyten als Pellet am Boden des Röhrchens, darüber folgt die Schicht, die das Ficoll-Paque<sup>TM</sup>Plus enthält, dann ein weißlicher Ring, der aus den mononukleären Zellen besteht und die oberste Schicht bildet der Puffer, in welchem das Knochenmarksaspirat resuspendiert wurde.

### **3.4.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen**

In der frühen Expansionsphase (Passage 1-3) wurden Zellen, die nicht unmittelbar zur Wiederaussaat benötigt wurden, zur späteren Verwendung (beispielsweise zur Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS)-Analyse) eingefroren. Jeweils 1-5 mio Zellen wurden pro Cryoröhrchen in 1,5 ml Einfriermedium konserviert. Das Einfriermedium bestand aus Expansionsmedium mit Zusatz von 10% DMSO und 20% FCS. Die beschrifteten Cryoröhrchen wurden in ein Einfriergerät gestellt, welches eine schonende Temperaturabsenkung um 1° K/min gewährleistet, und über Nacht bei -80° C zwischengelagert. Die endgültige Lagerung erfolgte bei -196° C in flüssigem Stickstoff.

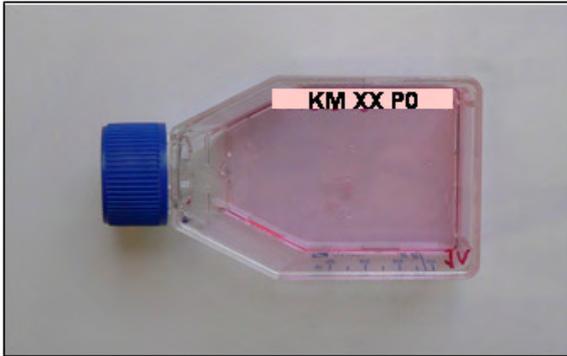
Zum Auftauen wurden die Cryoröhrchen für 3 min in ein Wasserbad mit 37°C verbracht. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml-Falkon-Röhrchen überführt und 5 ml Expansionsmedium zugegeben. Die Suspension wurde gemischt und bei 1500 rpm (470 x g) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Nach dem Zählen der lebenden Zellen mittels Trypanblau-Färbung folgte die Aussaat in neue Kulturflaschen, Mediumzugabe und Lagerung im Brutschrank. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen verwendet.

### **3.5 *In vitro* Versuch zur Expansion humaner mesenchymaler Stammzellen**

Um die Expansion und die Proliferation der mesenchymalen Stammzellen (MSC) in den beiden unterschiedlichen Kulturmedien zu untersuchen, erfolgte eine nach Medium getrennte Kultivierung der MSC bis Passage 5. Neben der Aufzeichnung während der Expansion auftretender morphologischer Veränderungen der Zellen sollte die Proliferationsfähigkeit der in den zwei unterschiedlichen Zellkulturmedien expandierten MSC verglichen werden. Anschließend wurden diese Zellen für die *in vitro*-Differenzierungs-Versuche verwendet. Die Expansion der Zellen, die im *in vivo*- Versuch eingesetzt wurden, erfolgte unabhängig von den *in vitro*-Versuchen.

Für den Vergleich der Zellproliferation wurden die Stammzellen von 6 Knochenmarkspendern (siehe Abschnitt 3.1, „Knochenmark“), auf die in

Abschnitt 3.4, „Isolation von MSC“, beschriebene Art und Weise isoliert. Die in zwei gleiche Teile geteilte Zellsuspension wurde zur Primärkultur in zwei 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit Kulturmedium, welches entweder FCS oder PRP enthielt, gegeben (*Abbildung 3*).



**Abbildung 3:** Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>) für die Primärkultur mesenchymaler Stammzellen

Die Zellen wurden anschließend in den beiden Kulturmedien vermehrt, bis sich ein annähernd konfluenter Zellrasen gebildet hatte.

Wenn der Zellrasen eine Konfluenz von 80-90% erreichte, wurden die Zellen mittels 1x-Trypsin/EDTA (0,25%/1 mM) abgelöst und in einer Relation von 1:3 bis 1:5, welches einer Dichte von ungefähr 5700 Zellen pro cm<sup>2</sup> entsprach, wieder ausgesät („Split“). Die folgende Zellexpansion wurde unter strikter Trennung der in den beiden Medien vermehrten Zellen durchgeführt.

Zum Splitten wurde das Kulturmedium abgesaugt, der Zellrasen einmal mit PBS gewaschen und die Zellen anschließend für 4 min bei 37°C (im Brutschrank) mit 1x-Trypsin/EDTA abgelöst. Danach wurde das Trypsin durch Zugabe des alten Mediums inaktiviert. Die Zellsuspension wurde in ein Falcon-Röhrchen überführt und 10 µl der Suspension wurden zur Zellzahlbestimmung entnommen. Anschließend wurde das Falcon-Röhrchen bei 1000 rpm (209 x g) für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene Zellpellet in frischem Expansionsmedium aufgenommen und die Zellen auf neue Kulturflaschen verteilt.

Die erste Passage (eine Passage beinhaltet das Ablösen und Wiederansiedeln von Zellen, beginnend bei Passage 0, direkt nach der Stammzell-Isolation) diente der Vereinzelung der nach der Zellisolation meist entstehenden

Zellinseln. Zellen der ersten Passage wurden meist in eine neue Flasche derselben Größe umgesetzt, um ihr Wachstum nicht durch eine zu frühe, zu starke Vereinzelnung zu hemmen.

Die Zellen wurden nach jeder Passage gezählt und in der oben angegebenen Dichte in neue Zellkulturflaschen ausgesät. Nach dem Erreichen von über einer Million Zellen in einer Passage, welche ungefähr für das Besiedeln einer Zellkulturflasche von 175 cm<sup>2</sup> notwendig sind, wurden diese zur Aussaat der nächsten Passage verwendet und alle überzähligen Zellen eingefroren. Eine Neuaussaat aller in einer Passage expandierten Zellen war aus Kostengründen nicht möglich. Daher wurden die in der jeweiligen Passage theoretisch erreichbaren Zellzahlen aus den tatsächlich erreichten Zellzahlen zweier konfluenter Zellkulturflaschen berechnet. Wir gingen hierbei von der Annahme aus, dass auch die restlichen, eingefrorenen Zellen nach einer Aussaat die gleiche Dichte erreicht hätten, wie die tatsächlich ausgesäten Zellen dieses Spenders.

Die Zellexpansion erfolgte bis einschließlich Passage 5.

Um zu untersuchen, ob die mit PRP expandierten Zellen nach Entzug des PRP wieder zu einer normalen Proliferationsrate zurückkehren, wurde in Passage 4 zusätzlich zur normalen Aussaat jeweils eine Million der bisher mit PRP expandierten MSC jedes Spenders in separate Kulturschalen gesät und mit einem PRP-freien (serumfreies Medium, SFM) Medium kultiviert. Der Effekt auf die Proliferationsrate der MSC wurde durch Zählen der Zellen in Passage 5 festgestellt.

Der Vergleich der während der Expansion auftretenden morphologischen Zellveränderungen erfolgte mittels Beurteilung bei 100-facher Vergrößerung unter einem Zeiss-Mikroskop (Typ Axiovert 25). Die Zellmorphologie wurde ab Passage 0 fotografisch dokumentiert.

### ***3.6 Charakterisierung der Zellen mittels Fluorescence-activated Cell Sorting***

Die Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS)-Messungen und -auswertungen erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Ulf Krause, FACS Core Facility, Medizinische Universitätsklinik V, Heidelberg.

Um zu verifizieren, dass es sich bei den von uns verwendeten Zellen um echte mesenchymale Stammzellen (MSC) handelte, wurden anhand einer Literaturrecherche (Reyes et al. 2001; Boiret et al. 2005; Lakshmiathy und Verfaillie 2005; Jiang et al. 2002; Deschaseaux et al. 2003; Jones et al. 2002; Kassem 2005; Schneider et al. 2005; Jones et al. 2005) verschiedene für MSC charakteristische Oberflächenmarker ermittelt. Eine Liste von 17 Antigenen, welche der phänotypischen Definition mesenchymaler Stammzellen dienen, wurde aufgestellt und ein entsprechendes Antikörperpanel entworfen. Bei MSC zweier Knochenmarksspender wurde der Expressionsstatus folgender Oberflächenmarker geprüft: CD34, CD38, CD44, CD45, anti-HLA-DR, anti-HLA-A, B, C, CD80, CD66, CD13, CD29, CD73, CD90, CD105, CD106, CD166.

Konfluente MSC-Kulturen der Passage 4 und 9 wurden wie oben beschrieben mittels Abtrypsinieren geerntet, einmal mit PBS gewaschen und anschließend gezählt. Jeweils 40.000-200.000 Zellen wurden in 5 ml FACS- Röhren (Falcon) gegeben und nach Zugabe von 2-5 µl Antikörpersuspension für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 2 ml MACS-Puffer wurden die Zellen in 150-400 µl MACS-Puffer resuspendiert und mit dem FACS Vantage SE oder FACScan (Beckton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA) gemessen.

Zur Messung der Autofluoreszenz der Zellen und unspezifischer Kreuzreaktivität der Antikörper wurden entsprechende Leer- und Isotyp-Kontrollen verwendet. Die Auswertung erfolgte mit der CellQuest Software von Becton Dickinson. Zur Bestätigung der FACS-Daten wurden MSC auf fibronectinbeschichteten Lab-Tek II Chamber Slides (Fa. Nunc) ausplattiert und über Nacht kultiviert. Dann wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert und analog zur Durchflußzytometrie gefärbt. Ausgewertet wurde mit einem Nikon Eclipse TE300 Fluoreszenz-Mikroskop.

### ***3.7 In vitro Versuch zur Untersuchung des Differenzierungspotentials humaner mesenchymaler Stammzellen***

Durch verschiedene *in vitro*-Ansätze sollte die Fähigkeit der unter Zusatz von plättchenreichem Plasma expandierten mesenchymalen Stammzellen (MSC),

osteogen, chondrogen und adipogen zu differenzieren, untersucht werden. Es erfolgte ein Vergleich mit den unter FCS-Zusatz expandierten Zellen. Bei den verwendeten Zellen handelte es sich bis auf eine Ausnahme (siehe Abschnitt 3.1) um die MSC in Passage 5 aus dem in Abschnitt 3.5 beschriebenen Expansionsversuch.

### **3.7.1 Osteogene Differenzierung**

Die osteogene Differenzierung erfolgte über 14 Tage in Monolayer-Kultur. Ausgewertet wurde an Tag 1, 7 und 14. Die MSC wurden durch Trypsinieren abgelöst, gezählt und in 24-well Platten ausgesät. Jedes besiedelte Well erhielt  $3,5 \times 10^4$  MSC und 500  $\mu$ l osteogenes Induktionsmedium. Dieses setzte sich aus DMEM high Glucose (261 ml auf 1 Liter Medium), 10% FCS, 100 IE/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin, 0,1  $\mu$ M Dexamethason, 10 mM  $\beta$ -Glycerolphosphat und 0,17 mM Ascorbinsäure-2-phosphat zusammen. Ein Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage. An den jeweiligen Auswertungstagen wurden die betreffenden Monolayer mittels verschiedener Nachweisverfahren der osteogenen Differenzierung untersucht.

### **3.7.2 Chondrogene Differenzierung**

Die chondrogene Differenzierung wurde für 4 Wochen in Pellet-Kultur durchgeführt. Hierfür wurden die MSC durch Trypsinieren abgelöst und gezählt. Anschließend wurde durch Resuspendieren in einem chondrogenen Induktionsmedium eine Zellsuspension mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  MSC/ml hergestellt. Das chondrogene Differenzierungsmedium enthielt DMEM high Glucose (286 ml auf 1 Liter Medium), 5  $\mu$ g/ml Insulin, 5  $\mu$ g/ml Transferrin, 5 ng/ml Selenit, 0,1  $\mu$ M Dexamethason, 0,17 mM Ascorbinsäure-2-phosphat, 1 mM Natrium-pyruvat, 0,35 mM Prolin, 1,25 mg/ml bovines Serum Albumin (BSA) und 10 ng/ml Transforming Growth Factor  $\beta_3$  (TGF $\beta$ -3).

500  $\mu$ l der Zellsuspension wurden in ein 1,5 ml- Eppendorf-Röhrchen überführt und für 10 min bei 1000 U/min (209 x g) zentrifugiert, so dass sich die Zellen am Boden absetzten. Die rundlichen Zellpellets, die sich spontan innerhalb weniger Tage bildeten, wurden nach 7 Tagen in eine sterile 96-well Rundbodenplatte überführt, um Medium zu sparen. Ein Mediumwechsel erfolgte

drei Mal wöchentlich. Nach 28 Tagen chondrogener Induktion wurden die Pellets fixiert, in Paraffin eingebettet und histologisch sowie immunhistologisch untersucht.

### **3.7.3 Adipogene Differenzierung**

Die adipogene Differenzierung erfolgte in Monolayer-Kultur. Ausgewertet wurde an Tag 1, 14 und 28. Die Besiedelungsprozedur war die Gleiche, wie für die osteogene Differenzierung beschrieben. Das adipogene Induktionsmedium setzte sich aus DMEM high Glucose (260 ml auf 1 Liter Medium), 10% FCS, 100 IE/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin, 1 µM Dexamethason, 0,01 mg/ml Insulin, 0,2 mM Indomethacin und 0,5 mM 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthine zusammen. An den Auswertungstagen wurden die Monolayer fixiert, gefärbt und histologisch untersucht.

### **3.7.4 Nachweis der osteogenen Differenzierung**

Der Nachweis der osteogenen Differenzierung erfolgte mittels Alizarinrot-Färbung der Monolayer mit anschließender Quantifizierung des gebundenen Farbstoffs. Zusätzlich erfolgte der Nachweis der im Laufe einer osteogenen Differenzierung von den Zellen gebildeten Alkalischen Phosphatase (ALP). Beides wurde auf den Gehalt der Zellen an Desoxyribonukleinsäure (DNA) normiert.

Eine im Verlauf der osteogenen Differenzierung von den Zellen gebildete extrazelluläre Matrix aus Calcium-haltigen Ablagerungen auf dem Boden der Kulturschalen kann durch die Alizarinrot-S Färbung nachgewiesen werden. Hierfür wurde an den Auswertungstagen 1, 7 und 14 der konfluente Zellrasen der Monolayer mit PBS gespült, die Zellen für 60 min mit 0,5 ml/Well eiskaltem Ethanol (70%) bei Raumtemperatur fixiert und dann vorsichtig mit destilliertem Wasser gewaschen. Anschließend wurden sie für 10 min mit 200 µl/Well 0,5%-Alizarinrot-S (AR-S) gefärbt. Die Menge des vom Monolayer gebundenen AR-S wurde mittels einer Inkubation mit Cetylpyridiniumchlorid-Lösung (CPC) bestimmt. Hierfür wurde ein bereits veröffentlichtes, für diesen Zweck leicht modifiziertes Standardprotokoll befolgt (Stanford et al. 1995).

Die Monolayer wurden vier Mal mit destilliertem Wasser gespült, um das

überschüssige, nicht gebundene AR-S zu entfernen. Dann wurden sie mit PBS bedeckt. Nun wurde ihre Färbung fotografisch dokumentiert. Nach dem Entfernen der PBS wurden 200 µl 10%ige (w/v) CPC-Lösung in 10 mM Natrium-Phosphat, (pH 7), in jedes Well pipettiert und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Inkubation mit CPC wurde das gebundene AR-S gelöst und es kam zu einem Farbumschlag von rot nach violett. Die farbige Lösung jedes Wells wurde in einem Verhältnis von 1:10 mit CPC-Lösung verdünnt, indem je 180 µl CPC-Lösung und 20 µl der Probe in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert wurden. Anschließend wurde die optische Dichte der Proben bei 570 nm in einem ELISA-Reader ermittelt.

Eine Standardkurve wurde durch Verdünnen einer 0.5%igen AR-S Lösung in einem Verhältnis von 1:10 mit CPC-Lösung hergestellt. Dies ergab den höchsten Standard (500 µg/ml). Von diesem ausgehend, wurde durch wiederholte Verdünnung im Verhältnis von 1:2 eine Verdünnungsreihe von 10 Standards angefertigt. Diese wurden wie oben angegeben im ELISA-Reader gemessen und eine Standardkurve ermittelt. Die anhand dieser Standardkurve und unter Berücksichtigung der vorherigen Verdünnung berechneten Ergebnisse, (angegeben in µg Alizarinrot-S pro ml Probenlösung), wurden auf den Gehalt der Zellen an DNA bezogen, welcher aus zwei zusätzlich kultivierten Wells bestimmt wurde.

Für die ALP- und die DNA-Analyse wurden Zelllysate hergestellt, indem die kultivierten Monolayer mit je 200 µl Triton-X 100 (0,01%) lysiert und anschließend noch mittels eines Polytron (dispersing and mixing technology, Modell PT 2100, Kinematica Inc., Cincinnati, Ohio, USA) homogenisiert wurden. Für die Bestimmung des Gehalts an Alkalischer Phosphatase wurden je 100 mg p-Nitrophenylphosphat (Sigma 104® Phosphatase Substrate) mit jeweils 12,67 ml eines alkalischen Puffers, bestehend aus 150 mM NaHCO<sub>3</sub> und 1 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 10,3) gelöst, so dass eine 30 mM p-Nitrophenylphosphat-Lösung entstand. In eine 96-Well-Mikrotiterplatte wurden je 50 µl destilliertes Wasser pipettiert, gefolgt von je 50 µl Probenlysat und 200 µl p-Nitrophenylphosphat-Lösung. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde die durch die ALP bewirkte Umwandlung des farblosen p-Nitrophenylphosphat zum gelben Produkt p-Nitrophenol bei 405/490 nm in einem Photometer gemessen. Mittels einer p-

Nitrophenol-Standard-Lösung (10  $\mu\text{mol/ml}$ ) wurde eine Verdünnungsreihe (Verdünnung immer im Verhältnis 1:2, 25  $\mu\text{g/ml}$  bis 0,195  $\mu\text{g/ml}$ ) in 0,01% Triton-X 100 hergestellt und wie oben beschrieben gemessen. Aus dieser wurde eine Standardkurve erstellt, und die Konzentration an p-Nitrophenol (angegeben in  $\mu\text{g/ml}$ ) errechnet.

Neben der Zellzahl sind die Bestimmung von DNA- und Proteingehalt die gebräuchlichsten Messwerte bei der Quantifizierung von zellulärem Material. Die DNA kann durch ihre Absorption bei 260 nm bestimmt werden, wobei aber viele Zellbestandteile, z.B. Proteine, stören. Deshalb ist diese Methode nur für gereinigte DNA geeignet. Bisbenzimid (Hoechst 33258, Formel:  $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{N}_6\text{O}_3\text{ClH}$ ) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der sich selektiv in Adenin/Thymin-reichen Regionen der DNA anlagert. Es findet dabei jedoch keine Interkalation in die DNA-Doppelhelix statt. Die Quantifizierung des DNA-Gehalts von Zellen mit bisBenzimid beruht auf der Zunahme der Fluoreszenzemission von bisBenzimid bei 458 nm infolge der Wechselwirkung des Farbstoffs mit der DNA. Vorher ist ein Zellaufschluss notwendig, welcher in diesem Fall durch das Polytronieren der Proben gewährleistet wurde. Diese Methode gestattet einen Nachweis von 0,01  $\mu\text{g/ml}$  und erfordert eine doppelsträngige DNA (Labarca und Paigen 1980; Application Notes 2001).

Für die Bestimmung des Gehalts der Zellen an DNA wurden 25  $\mu\text{l}$  Probenlysat und 150  $\mu\text{l}$  10 mM EDTA (pH 12,3; 4°C) in die Wells einer schwarzen 96-well Mikrotiterplatte pipettiert und für 20 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde die Platte für 2 min zum Abkühlen auf Eis gestellt. Nun wurden 10  $\mu\text{l}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -Lösung und 50  $\mu\text{l}$  Bisbenzimid-Arbeitslösung in jedes Well pipettiert. Die Fluoreszenz der jeweiligen Wells wurde bei 355/460 nm im Photometer bestimmt. Aus einer 1 mg/ml Lachs-Sperma-DNA-Lösung, die in einem Verhältnis von 1:2 mit Triton-X 100 (0,01%) verdünnt wurde, wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, die von 10  $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$  bis 0,078  $\mu\text{g}/25 \mu\text{l}$  reichte. Die Messung erfolgte wie zuvor beschrieben. Aus den erhaltenen Werten wurde eine Standardkurve generiert und mit deren Hilfe der Gehalt an DNA in den Zellen ermittelt.

### 3.7.5 Nachweis der chondrogenen Differenzierung

Nach 28 Tagen chondrogener Differenzierung wurden die Pellets für 2 Stunden in 4% Paraformaldehyd fixiert. Dann wurden sie drei Mal mit Leitungswasser gewaschen und anschließend für jeweils 2 Stunden in einer ansteigenden Reihe von 70%, 96% und 100% Isopropanol, sowie in 100% Azeton inkubiert. Nach 2 Stunden Inkubation in flüssigem Paraffinwachs wurden sie in Paraffin eingebettet. In verschiedenen Ebenen der Pellets (Anschnitt, Mitte, Endstück) wurden Schnitte von je 5 µm Dicke angefertigt und nach einem Standardprotokoll mit Toluidinblau gefärbt. Hierfür wurden die Schnitte für 4 x 10 min in XEM (Xylolersatz) entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe (100% / 96% / 70% / 50% Isopropanol) rehydriert, zweimal für je 5 min in destilliertem Wasser gespült und anschließend für 6 min in Toluidinblau Lösung (0,03%) gefärbt. Dann wurden sie erneut dreimal kurz in destilliertem Wasser gespült, um überschüssige Farblösung zu entfernen. Es folgte eine Inkubation für jeweils einige Sekunden in einer weiteren Alkoholreihe (96% / 100%-I / 100%-II Isopropanol), eine viermalige Entwässerung der Schnitte für je 5 min in XEM und schließlich das Eindecken der Schnitte mittels Deckgläschen und Eukitt®.

Für den immunhistologischen Nachweis einer erfolgten chondrogenen Differenzierung der Zellen wurde ein gegen Kollagen Typ I gerichteter Antikörper (Anti-Human Collagen Type I; Mouse monoclonal Antibody; Purified IgG) und ein gegen knorpelspezifisches Kollagen Typ II gerichteter Antikörper (Anti-Human Collagen Type II; Mouse; Klon II-4CII; Purified IgG) sowie ein biotinylierter Anti-IgG-Sekundärantikörper (Biotin-SP-conjugated Affini Pure Goat Anti-Mouse IgG (H+L)) verwendet. Die zu untersuchenden Schnitte wurden auf die bei der Toluidinblau-Färbung beschriebene Art entparaffiniert, in Alkohol rehydriert und mit destilliertem Wasser gespült. Dann wurden sie für 2 min in 1 x PBS gewaschen. Alle weiteren Schritte fanden, sofern nicht anders beschrieben, bei Raumtemperatur (RT) und durch Auftropfen der Reagenzien auf die in einer feuchten Kammer befindlichen Schnitte statt. Alle Waschschrte wurden bei RT in einer mit dem jeweiligen Puffer gefüllten Küvette auf einem Schüttler durchgeführt.

Zunächst wurde das Enzym Hyaluronidase auf die Schnitte aufgetropft. Nach

15 min Inkubation bei 37°C wurde es mittels dreimaligen Waschens mit 1 x PBS entfernt. Es folgte eine zweite Inkubation für 30 min bei 37°C mit dem Enzym Pronase. Anschließend wurde erneut mit 1 x PBS für drei Mal 5 min gewaschen. Nun wurde 5% BSA in PBS (No. A-9647, Sigma) auf die Schnitte gegeben. Nach Ablauf von 30 min wurde das BSA durch Abtropfen auf Papier entfernt und der jeweilige Primärantikörper für Kollagen Typ I beziehungsweise Typ II wurde, 1:1000 verdünnt mit 1% BSA in PBS-Puffer, auf die Schnitte aufgetragen. Für die Negativ-Kontrollen wurde nur 1% BSA in PBS-Puffer aufgetragen. Es folgte nun eine Inkubation der Schnitte über Nacht bei 4°C.

Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper durch Abtropfen auf Papier entfernt und anschließend drei Mal für je 5 min mit TBS- Puffer abgewaschen. Nun wurde der Sekundärantikörper (Verdünnung 1:500 in 1 x TBS) auf die Schnitte gegeben und für 30 min inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift von drei Mal 5 min in TBS wurde ein Streptavidin-Biotin-Complex 45:5000 in 50 mM Tris-Puffer (pH 7,6) verdünnt, auf die Schnitte aufgetropft und diese für 30 min inkubiert.

Nach dem Entfernen des Streptavidin-Biotin-Complexes mittels eines Waschschriftes von drei Mal 5 min mit TBS wurden die Schnitte für ca. 15 min mit Fast Red-Lösung inkubiert. Anschließend wurden sie zwei Mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Dann wurde eine Kernfärbung mit Haemalaun nach Mayer durchgeführt. Schließlich wurden die Schnitte mittels Aquatex® und Deckgläschen eingedeckt. Durch die Inkubation mit dem Streptavidin-Komplex und der Fast Red-Lösung färbten sich die Kollagen Typ I- oder Typ II-Fasern rötlich an. Bei den Kontrollen wurde keine rötliche Färbung sichtbar.

Die mit Toluidinblau gefärbten Schnitte wurden von zwei unabhängigen Untersuchern bei 100-facher Vergrößerung verblindet nach folgendem semi-quantitativen histologischen Score von 0 bis 4 untersucht:

0	1+	2+	3+	4+
keine knorpelige Zellmorphologie	schwache knorpelige Zellmorph.	mäßige knorpelige Zellmorph.	starke knorpelige Zellmorph.	sehr starke knorpelige Zellmorph.

**Tabelle 2:** Semiquantitativer histologischer Score zur Bewertung der chondrogenen Differenzierung

Die Färbeintensität der Schnitte, bei denen eine Kollagen-Typ I und -Typ II Immunhistologie durchgeführt worden war, wurde mittels des gleichen Scores bewertet.

### 3.7.6 Nachweis der adipogenen Differenzierung

Die Wells mit den adipogen differenzierten Monolayern wurden kurz mit PBS-Puffer gespült, mit 0,4% Paraformaldehyd für 20 min bei RT fixiert und kurz mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden sie für 5 min mit 60% Isopropanol inkubiert und anschließend mit 0,3% Öl-Rot O-Lösung in 60% Isopropanol für 15 min bei RT gefärbt. Schließlich wurden sie für einige Sekunden mit 60% Isopropanol differenziert, mit destilliertem Wasser gewaschen und es wurde eine Kernfärbung mit Hämalaun durchgeführt. Nach dem Abspülen der überschüssigen Farbe mit destilliertem Wasser wurden die Wells 10 min lang unter fließendes Leitungswasser gestellt und dann in Glycerin eingeschlossen. Sie wurden von zwei unabhängigen Untersuchern verblindet nach folgendem semiquantitativen, histologischen Score bei 100-facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop bewertet:

0	1+	2+	3+	4+
keine Öl-Rot-O-positiven Zellen (0%)	einige Zellen positiv (1-20%)	viele Zellen positiv (21-50%)	sehr viele Zellen positiv (51-80%)	fast alle Zellen positiv (81-100%)

**Tabelle 3:** Semiquantitativer histologischer Score zur Bewertung der adipogenen Differenzierung

### 3.8 *In vivo* Versuch zur Knochenneubildung im SCID-Maus-Modell

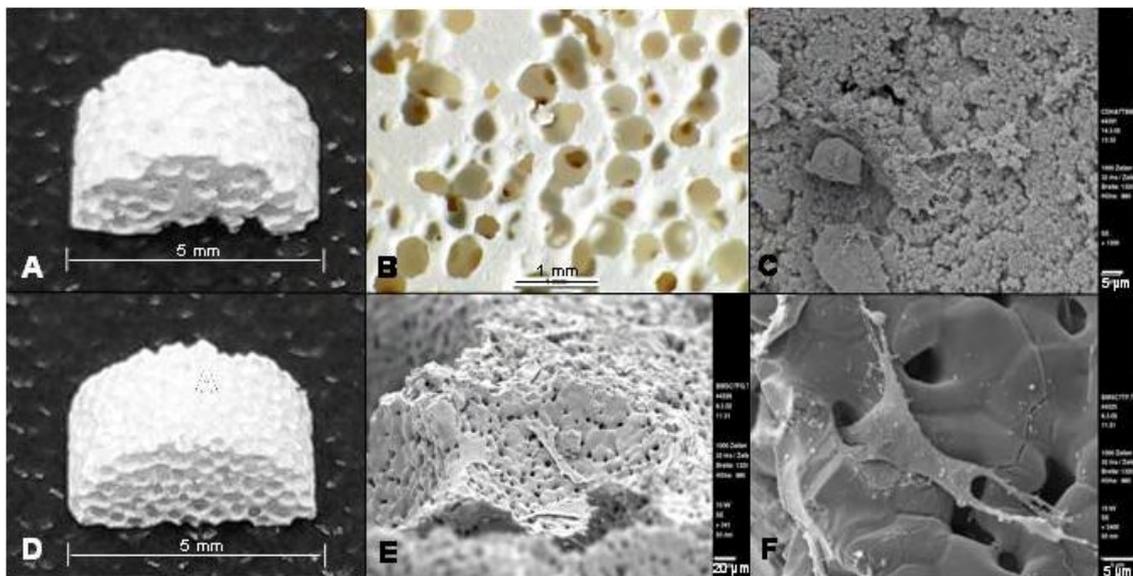
Die Fähigkeit von Stammzellen, *in vivo* Knochen zu bilden, ist essentiell für ihre klinische Anwendung im Tissue Engineering von Knochen. Daher wurde die Fähigkeit der unter PRP-Zusatz expandierten Stammzellen, *in vivo* Knochen neu zu bilden, untersucht. Wir verglichen sie hierbei mit den unter FCS-Zusatz expandierten Zellen. Als Trägerstoffe dienten zwei verschiedene Biomaterialien, das neue CDHA (Calcium-defizientes Hydroxylapatit) und ein klinisch erprobtes

$\beta$ -TCP ( $\beta$ -Tricalciumphosphat). Zusätzlich wurde der Einfluss zweier Beschichtungen der Keramiken auf die Knochenneubildung evaluiert.

Es wurde ein SCID-Maus-Modell mit ektooper subkutaner Implantation der Biomaterial-Zell-Komposite eingesetzt. Vorbereitung und Auswertung des *in vivo* Versuchs fanden in der Forschungsabteilung der Orthopädischen Universitätsklinik Heidelberg statt. Die Operationen und die Unterbringung der Tiere erfolgten in der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF, Im Neuenheimer Feld 347, 69120 Heidelberg).

### 3.8.1 Keramiken

Für den *in vivo* Versuch wurden keramische Blöckchen (*Abbildung 4*) aus  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP, ChronOs<sup>®</sup>,  $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) und Calcium defizientem Hydroxylapatit (CDHA, Ca<sub>9</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>5</sub>(HPO<sub>4</sub>)OH), beides von Dr. h.c. Robert Mathys Stiftung, Bettlach, Schweiz, mittels eines schon früher publizierten Emulsionsprozesses hergestellt (Bohner 2001b).



**Abbildung 4:** Morphologie der Knochenersatzstoffe:

Bild A: CDHA-Keramik; Bild B: CDHA-Keramik; Bild C: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer CDHA-Keramik (1300x); Bild D:  $\beta$ -TCP-Keramik; Bild E: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer  $\beta$ -TCP-Keramik (341x); Bild F: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer  $\beta$ -TCP-Keramik (2400x)

Makroporosität (=Poren  $\varnothing$  50-600  $\mu\text{m}$ , teilweise interkonnektierend), Mikroporosität (=Poren  $<50$   $\mu\text{m}$ , voll interkonnektierend) und die spezifische Oberfläche der Keramiken sind in Tabelle 4 dargestellt. Die Keramiken wurden durch computergestützte Herstellung in vier verschiedene Formen mit einer Dicke von 3 mm und einem Volumen von 30  $\text{mm}^3$  gebracht: einen Halbkreis, ein Dreieck, ein Rechteck und einen Kreis. Jede Form stand für eine experimentelle Gruppe, um die Keramiken nach der Explantation wieder zuzuordnen zu können:

Halbkreis= CDHA, beschichtet mit Fibronectin (FN) und besiedelt mit MSC;

Dreieck= CDHA, beschichtet mit Humanserum (HS) und besiedelt mit MSC;

Rechteck=  $\beta$ -TCP, beschichtet mit FN und besiedelt mit MSC;

Kreis=  $\beta$ -TCP, beschichtet mit HS und besiedelt mit MSC.

Leere Keramiken beider Beschichtungsarten dienten als Kontrolle. Eine Übersicht der experimentellen Gruppen ist in Tabelle 5 dargestellt.

Material	Gesamtporosität	Makroporen	Mikroporen	Spezifische Oberfläche
$\beta$ -TCP	84%	55%	29%	0,5 $\text{m}^2/\text{g}$
CDHA	85%	54%	31%	48 $\text{m}^2/\text{g}$
Knochen				80 $\text{m}^2/\text{g}$

**Tabelle 4:** Eigenschaften der verwendeten Keramiken

### 3.8.2 Beschichtung der Keramiken

Die mit humanem Serum zu beschichtenden Matrices wurden für 1 Stunde in 5 ml humanes Serum eingelegt. Hierbei fiel auf, dass sich vor allem die  $\beta$ -TCP-Keramiken schlecht mit Serum benetzen ließen. Danach wurden die Matrices über Nacht auf einer sterilen Kompresse getrocknet. Die genaue Menge an Serum, die jede Keramik aufnahm, wurde nicht gemessen. Nach dem Trocknen wurde jedoch eine durch das Serum verursachte Gewichtszunahme der Keramiken von 1,05 mg (SD 0,07) im Falle von CDHA und von 0,85 mg (SD 0,07) im Falle von TCP gemessen. Das humane Serum wurde aus 20 Vollblutspenden hämatologisch gesunder Europäer gewonnen. Das Blut wurde in Serum-Monovetten entnommen, über Nacht bei 4°C koaguliert und am

nächsten Tag bei 1881 x g zentrifugiert. Das Serum wurde abgenommen, gepoolt, in Aliquots geteilt und bei -20 °C eingefroren.

Die Matrizes, die Fibronectin als Beschichtung erhielten, wurden über Nacht bei 4 °C in einer Lösung von 40 µg/ml humanem Fibronectin inkubiert. Beide Keramiken ließen sich gut mit Fibronectin benetzen. Am folgenden Tag wurden sie für eine Minute auf einer sterilen Kompresse getrocknet.

### **3.8.3 Besiedelung der Keramiken**

Direkt vor der subkutanen Implantation in SCID-Mäuse wurden die Matrizes statisch mit je  $2 \times 10^5$  PRP- oder FCS- expandierten Zellen besiedelt. Es handelte sich hierbei um einen Pool aus den MSC von drei Spendern (siehe Abschnitt 3.1 „Knochenmark“). Die Zellen wurden gepoolt, um die Anzahl der im Versuch benötigten Tiere zu reduzieren und um interindividuelle Schwankungen der MSC-Spender auszugleichen.

Nachdem die MSC wie oben bereits beschrieben von der Zellkulturplatte abgelöst und gezählt worden waren, wurden sie so mit Kulturmedium wieder aufgenommen, dass eine Zellsuspension von 20.000 Zellen/µl entstand. Zum Transport in die IBF wurden die Zellen in ein steriles 2 ml-Eppendorf-Röhrchen umgefüllt. Unter einer Sterilbank wurden dann jeweils 10 µl der Zellsuspension ( $2 \times 10^5$  Zellen) mittels einer Gilson-Pipette auf die Oberseite jeder Keramik aufgetropft und diese innerhalb von 15 min subkutan in immundefiziente Mäuse implantiert. Unbesiedelte Keramiken jeder Gruppe dienten als Kontrollen.

Bei der Besiedelung der Keramiken fiel auf, dass CDHA fähig war, die aufgetropfte Menge der Zellsuspension sofort aufzunehmen, während diese im Fall von  $\beta$ -TCP erst nach ungefähr 5 min begann, in die Matrix einzuziehen, was den Vorgang der Besiedelung erschwerte.

### **3.8.4 Versuchstiere**

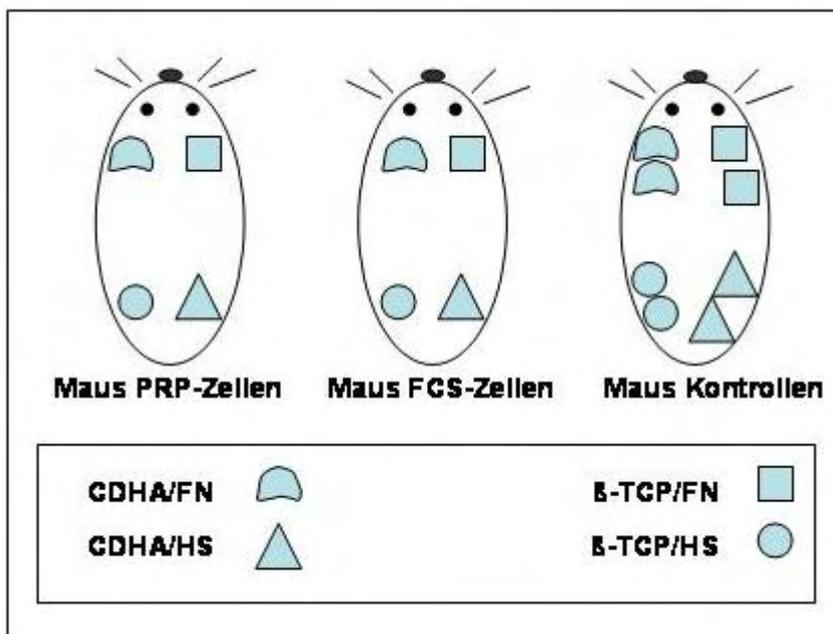
Es wurden 15 männliche SCID-Mäuse, Stamm C.B. 17-scid/leRCrI (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) im Alter von 7-8 Wochen verwendet. Die Tiere wogen durchschnittlich 25 g. Die Tiere wurden gemäß der Europäischen Richtlinie zum Schutz der für Versuche und andere wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere (RL des Rates 86/609/EWG) sowie gemäß der Empfehlungen der GV-Solas (Gesellschaft für Versuchstierkunde) gehalten. Die Unterbringung erfolgte in der IBF in Macrolon-Käfigen der Größe M-II (Fa. Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg). Sie wurden mit einem speziellen Mäusefutter gefüttert (V1185-300 ssniff M-Z, Fa. ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) und hatten freien Zugang zu Wasser. In jedem Käfig befand sich ein Kunststoff-Häuschen. Alle Tiere überlebten die Standzeit von 8 Wochen. Sie wurden tierschutzgerecht mittels CO<sub>2</sub>-Gas getötet. Der Tierversuch wurde zuvor von der Tierschutzkommission des Regierungspräsidiums Karlsruhe genehmigt.

### **3.8.5 Gruppeneinteilung**

Es gab insgesamt 12 Implantatgruppen (siehe Tabelle 5). Besiedelt waren die Implantatgruppen bei 6 Mäusen mit PRP-expandierten Zellen (Gruppen 1-4) und bei 6 Mäusen mit FCS-expandierten Zellen (Gruppen 5-8). Jede Maus erhielt insgesamt 4 Implantate, die sich durch ihre Form unterschieden, eines aus jeder Implantatgruppe (1-4 oder 5-8) (*Abbildung 5*). Drei Mäuse erhielten jeweils ein Paar identischer unbesiedelter Implantate als Kontrollen (Gruppen 9-12, insgesamt 8 Implantate pro Tier). Dies hatte zum Ziel, die Zahl der benötigten Mäuse möglichst gering zu halten. In vorherigen Versuchen konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass ohne eine Besiedelung mit Stammzellen keine Knochenbildung auf den Keramiken erfolgt, während aber auch bei paarweiser Implantation besiedelter Keramiken eine Knochenbildung möglich ist. Die Ergebnisse wurden folglich durch diese Änderung des Versuchsaufbaus nicht beeinflusst.

Art der expandierten MSC	Keramik	Beschichtung	Zahl der Implantate	Nummer der Implantatgruppe
<b>PRP</b>	<i>CDHA</i>	<i>Fibronectin</i>	n=6	1
		<i>Humanserum</i>	n=6	2
	<i>β-TCP</i>	<i>Fibronectin</i>	n=6	3
		<i>Humanserum</i>	n=6	4
<b>FCS</b>	<i>CDHA</i>	<i>Fibronectin</i>	n=6	5
		<i>Humanserum</i>	n=6	6
	<i>β-TCP</i>	<i>Fibronectin</i>	n=6	7
		<i>Humanserum</i>	n=6	8
<b>Kontrollen (ohne MSC)</b>	<i>CDHA</i>	<i>Fibronectin</i>	n=6	9
		<i>Humanserum</i>	n=6	10
	<i>β-TCP</i>	<i>Fibronectin</i>	n=6	11
		<i>Humanserum</i>	n=6	12

**Tabelle 5:** Darstellung der Implantatgruppen



**Abbildung 5:** Implantationsschema

### **3.8.6 Chirurgischer Eingriff**

Unter intraperitoneal applizierter Vollnarkose (12 mg/kg Xylazinhydrochlorid [Rompun<sup>R</sup> 2%] und 120 mg/kg Ketaminhydrochlorid [Hostaket<sup>R</sup>]) und nach Desinfektion des betreffenden Bereiches wurden auf dem Rücken der Mäuse durch zwei 0,5 cm große Schnitte vier subkutane Taschen stumpf präpariert.

In jede Tasche wurde im Fall der Verumgruppen ein Implantat, im Fall der Kontrollgruppen zwei Implantate einer Implantatgruppe gegeben und die Wunde dann mit Einzelheften verschlossen. Die Gesamtdauer der Operation betrug pro Maus ungefähr 10 min. Während der Aufwachphase war eine Person bei den Tieren.

### **3.8.7 Standzeiten und Versuchsabschluss**

Nach Ablauf der 8. postoperativen Woche wurden die Tiere mittels CO<sub>2</sub> - Applikation schmerzlos getötet. Nach der Euthanasie wurden die Implantate explantiert und zur Fixierung für die Histologie in 2 ml-Eppendorff-Röhrchen mit jeweils 1 ml 4%igem gepufferten Formalin verbracht.

## **3.9 Auswertung des *in vivo* Versuchs**

Die Auswertung der Implantate erfolgte in der Forschungsabteilung der Orthopädischen Universitätsklinik Heidelberg. Sie wurden sowohl histologisch unter dem Lichtmikroskop als auch mittels eines  $\mu$ -Computer Tomographen auf die Qualität und Quantität einer eventuellen Knochenbildung hin untersucht. Zusätzlich wurde mit ausgewählten Schnitten eine *in situ* Hybridisierung auf humane Alu-Sequenzen durchgeführt, um zu ermitteln, ob murine oder humane Zellen den im Implantat entstandenen Knochen gebildet hatten.

### **3.9.1 Histologische Auswertung**

Für die Lichtmikroskopie wurden die Implantate für vier Stunden in 4% gepuffertem Formaldehyd fixiert. Dann wurden sie drei Mal für jeweils 10 min in Leitungswasser eingelegt, über Nacht in 70% Isopropanol gelagert und am folgenden Tag für jeweils vier Stunden in einer ansteigenden Reihe von 96% und 100% Isopropanol, sowie in 100% Azeton inkubiert. Schließlich wurden sie über Nacht in flüssiges Paraffinwachs eingelegt. Am dritten Tag wurden die

Implantate in Paraffinwachs eingebettet. Anschnitt eins, zwei, drei und vier (Serienschnitte von jeweils 5  $\mu\text{m}$  Schnittdicke) wurden jeweils mit unterschiedlichen histologischen Färbemethoden behandelt und zur Beurteilung der Knochenneubildung herangezogen. Mit ausgewählten Schnitten jeder Implantatgruppe wurde auch eine *in situ* Hybridisierung durchgeführt, um das Vorhandensein humaner Zellen speziell in verknöcherten Arealen der Implantate zu beweisen.

Der erste und vierte Anschnitt wurden, wie schon beim Nachweis der chondrogenen Differenzierung beschrieben, mit Toluidinblau gefärbt. Anschließend wurden sie verblindet bei 100-facher Vergrößerung durch zwei unabhängige Untersucher in Bezug auf die Quantität und Qualität der Knochenneubildung im Randbereich und in der Mitte der Schnitte beurteilt.

Verwendet wurde hierbei ein schon zuvor veröffentlichter, semiquantitativer histologischer Score (Kuznetsov et al. 2000) von 0 bis 4:

0	1+	2+	3+	4+
keine Zeichen der Knochenneubildung	schlechte Knochenneubildung, nur ein kleines Knochenbälkchen ist in wenigen Sektionen der Probe zu sehen	schwache Knochenneubildung, nur in einem kleinen Teil jeder oder einiger Sektionen sind Knochenbälkchen zu sehen	mittelmäßige Knochenneubildung, der neugebildete Knochen nimmt einen signifikanten Teil der Probe ein, aber <50% der Sektionen	gute Knochenneubildung, der neugebildete Knochen ist in mehr als 50% der Sektionen zu finden

**Tabelle 6:** Semiquantitativer histologischer Score zur Beurteilung der Knochenneubildung

Zur Bestätigung der Kalzifizierung aller als Knochengewebe bewerteten Areale wurden alle zweiten Anschnitte mit Alizarinrot-S, mit welchem sich Kalziumablagerungen rot darstellen lassen, gefärbt. Hierfür wurden die Schnitte vier Mal 10 min in XEM entparaffiniert, in einer absteigenden Alkoholreihe (100% / 96% / 70% / 50% Isopropanol) rehydriert, zwei Mal 5 min in Aqua bidest. gewaschen, für 5 min mit einer 0,5% Alizarinrot-S-Lösung gefärbt, drei

Mal kurz mit destilliertem Wasser gespült, um die überschüssige Farbe zu entfernen, rasch in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (96% / 100%-I / 100%-II Isopropanol), 10 min in XEM aufgehellt und zuletzt mit Eukitt® und Deckgläschen eingedeckt. Die Beurteilung der Färbung erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Schnitte mit sichtbarer Rotfärbung einer oder mehrerer Sektionen wurden als „positiv“, ungefärbte hingegen als „negativ“ bewertet.

### **3.9.2 Darstellung humaner MSC mittels *in situ* Hybridisierung**

Um zu zeigen, dass der *in vivo* geformte Knochen durch humane und nicht durch murine Zellen gebildet worden war, wurde eine *in situ* Hybridisierung ausgewählter Schnitte (dritter Anschnitt) aller Implantatgruppen durchgeführt. Durch diese Methode lassen sich humane Zellen in den verschiedenen Arealen der Implantate darstellen und von murinen Zellen differenzieren.

Hierfür wurde mittels PCR (Polymerase-Kettenreaktion) eine Digoxigenin-markierte Sonde für human-spezifische, repetitive Alu-Sequenzen hergestellt, die 1 x PCR Puffer, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM dATP, 0,1 mM dCTP, 0,1 mM dGTP, 0,065 mM dTTP, 0,035 mM Digoxigenin-11-dUTP (Roche, Mannheim), 10 pmol Alu-spezifische Primer, 5U Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Karlsruhe) und 50 ng humane, genomische DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl enthielt. Die folgenden Primer wurden verwendet: forward 5`-cgaggcgggtggatcatgaggt-3`, reverse 5`-tttttgagacggagtctcgc-3`. Die Schnitte wurden 2 x 8 min in XEM-200 entparaffiniert, je 1 min in einer absteigenden Reihe Ethanol (100%, noch einmal 100%, 90% und 70%) rehydriert, für 3 min in PBS-Puffer gewaschen und dann für 10 min bei Raumtemperatur in 0,2 N HCl inkubiert. Anschließend wurde die Oberfläche der Schnitte für 15 min bei 37°C mit 0,5 mg/ml Pepsin in 0,01 N HCl enzymatisch behandelt. Nach einem dreiminütigen Waschen der Schnitte in PBS-Puffer wurden sie für 10 min bei RT mit 0,1 M Triethanolaminchlorid (pH 8,0) in 0,25% Essigsäure inkubiert, nochmals für 3 min mit PBS gewaschen und dann für 30 min bei 42°C in Hybridisierungspuffer, der 4 x SSC, 50% deionisiertes Formamid, 1 x Denhardt's Lösung, 5% Dextransulfat und 100 µg/ml Herings-DNA enthielt, prähybridisiert. Danach wurde der Hybridisierungspuffer durch frischen Puffer ersetzt, welcher zusätzlich 0,5 ng/µl Digoxigenin-markierte Sonde enthielt.

Daraufhin wurden die Ziel-DNA der Schnitte und die Sonde für 5 min bei 95°C denaturiert. Dann wurden die Schnitte sofort für 3 min auf einen 4°C-kalten Kühlblock gelegt. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C für 16 h in einer feuchten Kammer.

Nach der Hybridisierung wurden die Schnitte zwei Mal für je 5 min bei RT in 2 x SSC, und dann zwei Mal für jeweils 10 min bei 42°C in 0,1 x SSC gewaschen. Die Detektion positiver Signale erfolgte mittels Immunhistochemie.

Hierfür wurden die Schnitte für 1 min in DIG-1 Puffer äquilibriert, für 15 min bei RT mit Blockierungslösung geblockt und anschließend für 1 h bei RT mit DIG-AP Konjugat (anti-Digoxigenin Alkalische Phosphatase-konjugierte Fab-Fragmente [Roche]) inkubiert. Nach dem Waschen für 2 x 10 min bei RT in DIG-1 Waschpuffer wurden die Schnitte für 3 min bei RT in DIG-3 Puffer äquilibriert. Nun wurde das 1:50 in DIG-3 Puffer verdünnte Substrat NBT/BCIP auf die Schnitte gegeben und ca. 30 min bis zum Sichtbarwerden positiver Signale inkubiert. Um die Beurteilbarkeit der Schnitte zu erhöhen, wurde nach der *in situ* Hybridisierung noch eine Gegenfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat durchgeführt. Dieses färbte das nicht-humane Gewebe (murine Zellen) rot an, während sich humane Zellen als dunkelbraune Punkte darstellten. Zur Konservierung wurden die Schnitte mit Eukitt® und Deckgläschen eingedeckt. Die Beurteilung erfolgte unter dem Lichtmikroskop.

### **3.9.3 Quantifizierung des *in vivo* neu gebildeten Knochens mittels $\mu$ -Computer Tomographie**

Der  $\mu$ -CT Scan wurde am Institut für Unfallchirurgische Forschung und Biomechanik, Ulm, durchgeführt.

Um den neu gebildeten Knochen objektiv quantifizieren zu können, wurde eine  $\mu$ -Computer Tomographie ( $\mu$ -CT) aller Implantate, sowie je einer nicht-implantierten CDHA- und  $\beta$ -TCP Keramik durchgeführt. Alle Präparate waren beim Scannen in Paraffin eingebettet. Das  $\mu$ -CT wurde mit einer Auflösung von 30  $\mu$ m durchgeführt. Da durch die Explantation der Proben sowie durch die vorhergegangene Histologie unterschiedliche Anteile jedes Implantats verloren gegangen waren, wurde zur Auswertung in der Mitte jedes Präparates ein zylinderförmiger Körper immer gleichen Volumens (12 mm<sup>3</sup>) definiert. Nur der in

diesem Areal der Probe ermittelte Knochen wurde zu einem statistischen Vergleich der Knochenmenge herangezogen.

Jedes Präparat wurde mittels eines  $\mu$ CT Gerätes (XCT FAN Beam  $\mu$ -Scope, speziell für zerstörungsfreie Histomorphometrie kleiner Knochenproben entwickelt) untersucht. Der Mikrofokus der Röntgenröhre des  $\mu$ -CT hatte eine Spot Size von 7  $\mu$ m und eine maximale Spannung von 36 kV. Die Bildmatrix hatte 512 x 512 Pixel. Die Proben wurden jeweils in ein mit Wasser gefülltes 2 ml Eppendorf-Röhrchen gelegt und in einen Probenhalter gestellt. Sie wurden so angeordnet, dass die Längsachse des Blocks parallel zur Achse des Probenhalters war. Ein hochauflösendes Protokoll (Scheibendicke 30  $\mu$ m; feed 30  $\mu$ m; Pixelgröße 30  $\mu$ m) wurde verwendet. Je nach Länge der Proben wurden bis zu 30 Scheiben gescannt.

Um den Anteil an neu geformtem Knochengewebe zu ermitteln, wurde die optimale Schwelle für die Keramik CDHA alleine visuell gewählt. Anschließend wurde die optimale Schwelle für die CDHA-Keramik und den neu gebildeten Knochen zusammen festgestellt. Zusätzlich wurden die Spannweiten und die Mittelwerte der Graustufen, welche für CDHA und den neu gebildeten Knochen charakteristisch sind, ermittelt. Das CDHA zeigte ein mittleres Graustufenlevel von 160 +/- 15, während das mittlere Graustufenlevel des neu gebildeten Knochens bei 60 +/- 15 lag. Die visuell ermittelte Schwelle, die der Unterscheidung von CDHA und neu gebildetem Knochen diene, wurde bei 100 gesetzt, und erlaubte somit eine verlässliche Unterscheidung zwischen den zwei Materialien. Mit den  $\beta$ -TCP-Implantaten wurde ebenso verfahren, es wurden die gleichen Schwellen wie für das CDHA ermittelt. Zuletzt wurden die  $\mu$ -CT Scheiben mit den korrespondierenden histologischen Befunden verglichen sowie statistisch korreliert, um die Verlässlichkeit der Methode zu verifizieren. Die Daten wurden mittels VGStudio Max 1.2.1 (Volume Graphics, Heidelberg) ausgewertet und die neu geformten Knochen-Voxels pro gesamten Gewebe-Voxels wurden errechnet.

### **3.10 Statistische Auswertung**

Die Analysen des *in vitro*-Zellexpansionsversuchs, der *in vitro* chondrogenen Differenzierung und der *in vitro* adipogenen Differenzierung erfolgte aufgrund der nicht-normalen Verteilung der Daten nichtparametrisch. Dazu wurden jeweils Median und Range errechnet und als Tests Rangvarianzanalysen (Kruskal-Wallis-Tests), Mann-Whitney- sowie Wilcoxon-Tests herangezogen, um besagte nicht-normalverteilte Werte zu vergleichen.

Die Analyse der *in vitro* osteogenen Differenzierung konnte wegen normalverteilter Daten parametrisch erfolgen. Dazu wurden zunächst Mittelwert und Standardabweichung (MW +/- SD) berechnet. Anschließend wurde der Einfluss der unabhängigen Variablen „Medium“, „Zeitpunkt“ und „Spender“ mittels einer multifaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Abschließend wurden Unterschiede zwischen den Gruppen in Post-hoc-Tests (Scheffé-Tests) überprüft.

Die Analyse des *in vivo*-Differenzierungsversuchs konnte wegen normalverteilter Daten ebenfalls parametrisch erfolgen. Neben Mittelwert und Standardabweichung (MW +/- SD) wurden ebenfalls Varianzanalysen (ANOVA), sowie gepaarte t-Tests berechnet.

Zur Berechnung von Zusammenhängen respektive Assoziationen verwendeten wir zudem den Kendall-Tau-B-Koeffizienten. Alle Tests waren zweiseitig und ein p-Wert  $\leq 0,05$  wurde als signifikant angesehen. Die Datenanalyse wurde mittels SPSS für Windows 14.0 (SPSS Inc., USA) durchgeführt.

## **4. Ergebnisse**

Die Versuche zur *in vitro*-Expansion, zur *in vitro*-Differenzierung und zur *in vivo*-Knochenbildung von unter PRP- oder FCS-Zusatz expandierten humanen mesenchymalen Stammzellen wurden mittels histologischer, immunhistologischer, biochemischer und statistischer Methoden untersucht und anschließend ausgewertet.

### ***4.1 Wachstumsfaktorengleichgewicht im Plättchenreichen Plasma***

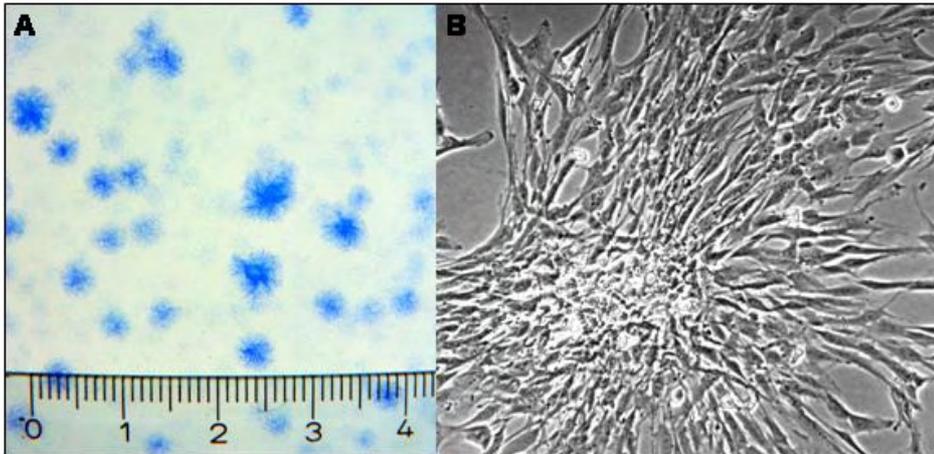
Der Gehalt des in dem neu entwickelten Zellexpansionsmedium verwendeten PRP an Plättchen und in ihnen enthaltenen aktiven Wachstumsfaktoren hat erheblichen Einfluss auf dessen biologische Wirkung. Um die im gepoolten PRP enthaltene Menge an humanem PDGF-AB und humanem TGF- $\beta$ 1 festzustellen, wurden zwei ELISA Tests durchgeführt. Das PRP enthielt 239,8 ng/ml TGF $\beta$ -1 und 120,9 ng/ml PDGF-AB. Die Plättchenzahl im Leukozyten-depletierten PRP betrug  $1,56 \times 10^6/\mu\text{l}$ , was einer Anreicherung der Thrombozyten um das 6-fache im Vergleich zum Vollblut ( $0,15 - 0,35 \times 10^6/\mu\text{l}$ ) entspricht. Um 1 ml PRP herzustellen, werden ungefähr 6 ml Vollblut benötigt. Die Aktivierung der Thrombozyten, die für die Ausschüttung der in ihren Granula enthaltenen Wachstumsfaktoren notwendig ist, wurde durch Einfrieren und Auftauen des PRP gewährleistet.

### ***4.2 Ergebnisse des in vitro Versuchs zur Zellexpansion***

Ziel dieses Versuches war es, den Einfluss der Zugabe von PRP zum Zellexpansionsmedium auf die Proliferation und Morphologie mesenchymaler Stammzellen (MSC) zu untersuchen.

Die MSC aller Spender ließen sich gut expandieren und bildeten nach durchschnittlich 7 Tagen makroskopisch sichtbare Zellkolonien aus (*Abbildung 6*).

Nach Passage 1 wuchsen die MSC in Form eines Monolayers, der nach einiger Zeit konfluent wurde.



**Abbildung 6:** MSC-Kolonien in Passage 0 nach der Primärisolation:  
A) Originalgröße; B) Einzelkolonie in 100-facher Vergrößerung

MSC, die in PRP-supplementiertem Medium expandiert wurden (Median: 56,3 mio; Range: 18,5-1849 mio), erreichten nach Passage 4 signifikant höhere Zellzahlen als MSC, die in FCS-supplementiertem Medium expandiert wurden (Median: 27,1 mio; Range: 4,8-48 mio) ( $p=0,046$ , siehe *Abbildung 7* und *Tabelle 7*). Die Entwicklung der Zellproliferation über 5 Passagen ist in *Abbildung 8* dargestellt.

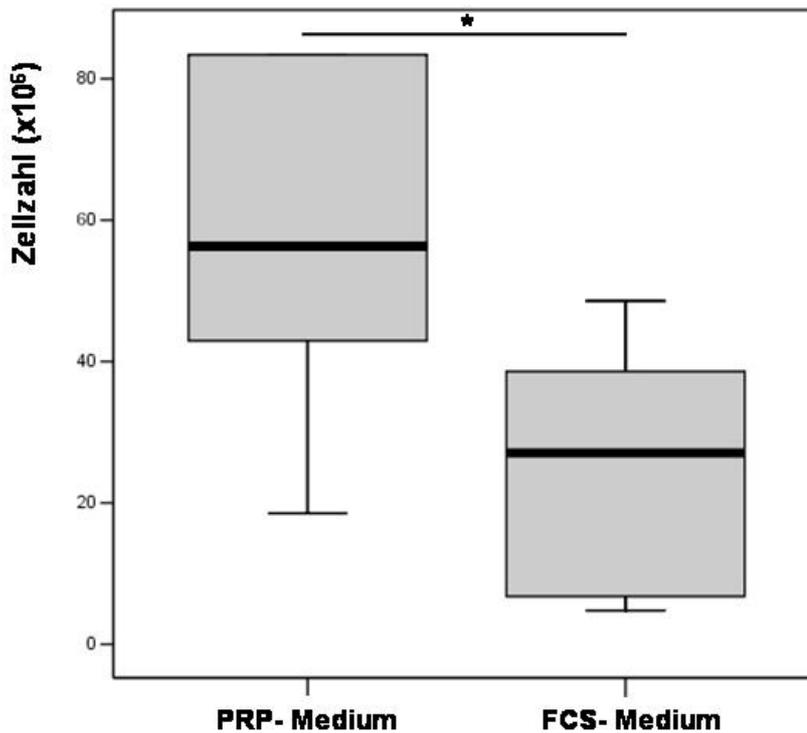
Zu Beginn der Zellexpansion (in Passage 1) zeigte sich bei den unter PRP-Zusatz kultivierten Zellen sogar eine etwas schwächere Proliferation.

Ab Passage 2 aber setzte mit dem PRP-Medium rasches Wachstum ein, in Passage 3 waren die erzielten Zellzahlen deutlich höher als im Vergleichsmedium mit FCS und ab Passage 4 wurde dieser Unterschied statistisch signifikant (siehe *Tabelle 7*).

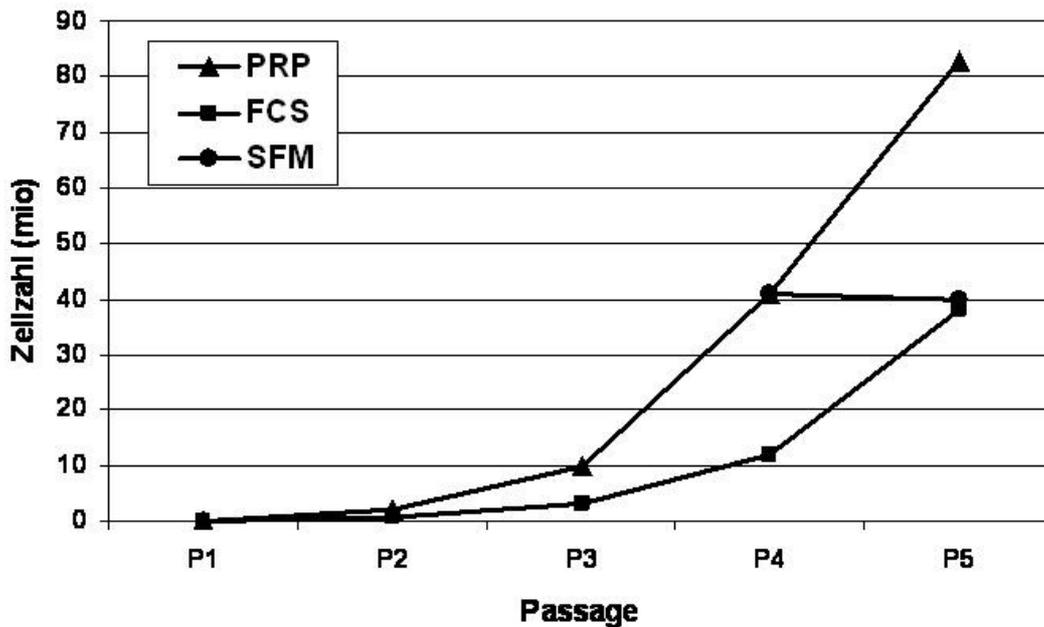
Die Zellexpansion bis einschließlich Passage 4 nahm im PRP-Medium durchschnittlich 21, im FCS-Medium 20 Tage in Anspruch. Passage 5 wurde in beiden Medien nach durchschnittlich 26 Tagen beendet. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die Verwendung von PRP-supplementiertem Kulturmedium in der gleichen Zeitspanne eine signifikant höhere Anzahl mesenchymaler Stammzellen gewonnen werden kann, als durch die Verwendung von FCS-supplementiertem Medium.

Wurden die mit PRP expandierten Zellen ab Passage 4 in einem PRP-freien Medium (SFM) kultiviert, so sank die Zahl der sichtbaren Mitosen und somit ihre Proliferationsrate rapide und in Passage 5 (Median: 41,5 mio; Range: 11,8-

277,5 mio) zeigte sich kein signifikanter Unterschied mehr zu den mit FCS expandierten Zellen.



**Abbildung 7:** Boxplot zum Vergleich der Zellzahlen im PRP- bzw. FCS-supplementierten Medium nach Passage 4



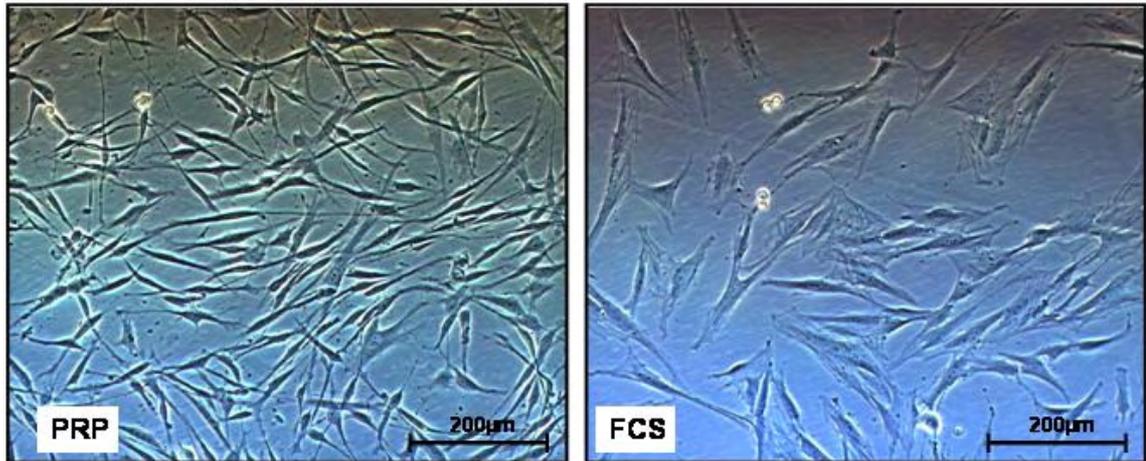
**Abbildung 8:** Entwicklung der Zellproliferation über 5 Passagen im PRP-, FCS- und serumfreien Medium. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen MSC-Spenders von insgesamt 6 Spendern.

<b>Medium</b>	<b>Passage</b>	<b>Median</b>	<b>Range</b>	<b>MW</b>	<b>SD</b>	<b>p-Wert</b>
PRP	1	0,09	0,04-0,7	0,2	0,3	0,046*
FCS	1	0,4	0,07-0,7	0,4	0,3	
PRP	2	1,2	0,6-8,2	2,3	2,9	0,753
FCS	2	2,9	0,5-5,0	2,6	1,9	
PRP	3	6,1	3,4-52	13,6	19	0,753
FCS	3	6,5	2,5-11,9	6,9	4,4	
PRP	4	34	15,7-411,1	92,1	156,7	0,046*
FCS	4	13,2	4,5-50,6	17,3	17	
PRP	5	56,4	18,5-1849	351,1	734,2	0,046*
FCS	5	27,1	4,8-48,6	25,5	17,3	
SFM	5	41,5	11,8-277,5	80,7	98,5	0,138
PRP	5	56,4	18,5-1849	351,1	734,2	
SFM	5	41,5	11,8-277,5	80,7	98,5	0,116
FCS	5	27,1	4,8-48,6	25,5	17,3	

**Tabelle 7:** Darstellung der Zellzahlen des Zellexpansionsversuches.

Median, Range, MW und SD sind in mio Zellen angegeben. Der p-Wert bezieht sich auf die Vergleiche der in der jeweiligen Passage erreichten Zellzahlen im PRP- und FCS-Medium bzw. im PRP- und SFM-Medium und FCS- und SFM-Medium. Die mit \* gekennzeichneten Werte sind signifikant.

Im Verlauf der Expansion nahmen die FCS-expandierten Zellen eine im Vergleich zu den PRP-expandierten Zellen abgeflachtere, polygonale Form an und wiesen viele Zellfortsätze/Cytoplasma-Ausläufer auf, während die PRP-expandierten Zellen über alle Passagen hinweg eine spindelförmige, Fibroblasten-ähnliche Morphologie beibehielten (*Abbildung 9*).



**Abbildung 9:** Morphologie der mit PRP- bzw. FCS-supplementiertem Medium expandierten Zellen

### **4.3 Ergebnisse der FACS-Analyse**

Die FACS-Analyse (fluorescence activated cell sorting-analysis) in Passage 4 und 9 von in beiden Expansionsmedien gezüchteten Zellen zeigte ein gleiches cluster of differentiation (CD)-Muster wie diejenigen MSC, die von Reyes et al. beschrieben wurden (Reyes et al. 2001): CD 34-, CD 38-, CD 44+, CD 45-, anti-HLA-DR-, anti-HLA-A-, B-, C-, CD 80-, CD 66-, CD 13+, CD 29+, CD 73+, CD 90+, CD 105+/-, CD 106-, CD 166+.

Wie die Abwesenheit von CD 34 und CD 45 belegt, waren keine Zellen der hämatopoietischen Linie mehr vorhanden, während die für MSC charakteristischen Marker CD 29, CD 73, CD 90 sowie zum Großteil auch CD 105 vorhanden waren.

#### **4.4 Ergebnisse des *in vitro* Versuchs zur osteogenen, chondrogenen und adipogenen Differenzierung**

In diesem Teil des Versuchs wurden die mit PRP expandierten MSC auf ihre Differenzierungsfähigkeit hin getestet. Dabei erfolgte ein Vergleich mit den mit FCS expandierten MSC.

##### **4.4.1 Ergebnisse der osteogenen Differenzierung**

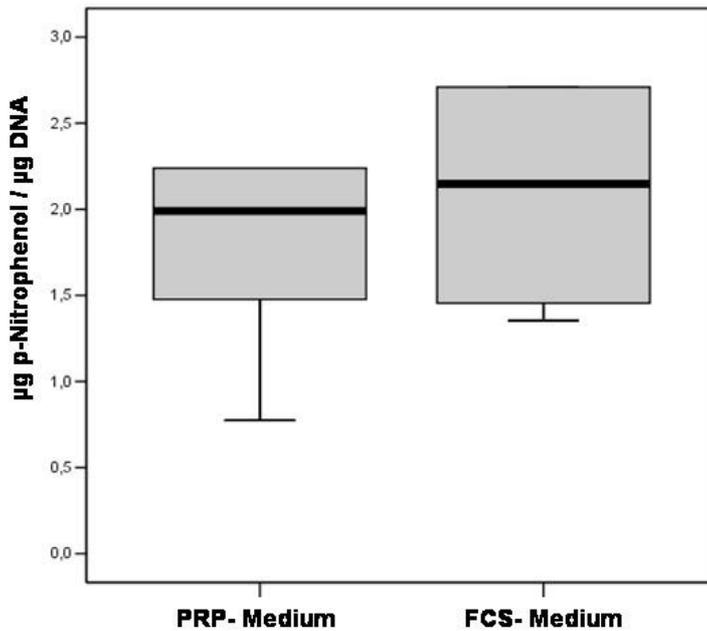
Die aus dem Expansionsversuch hervorgegangenen Zellen wurden in einem *in vitro* Versuch über 14 Tage hinweg auf ihre Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung untersucht.

FCS- und PRP-expandierte Zellen wiesen zu allen kontrollierten Zeitpunkten (Tag 1, 7, 14) gleiche ALP-Aktivität auf. Dies zeigt, dass das verwendete Kulturmedium keinen Einfluss auf diesen Marker der osteogenen Differenzierung hatte (siehe *Abbildung 10*).

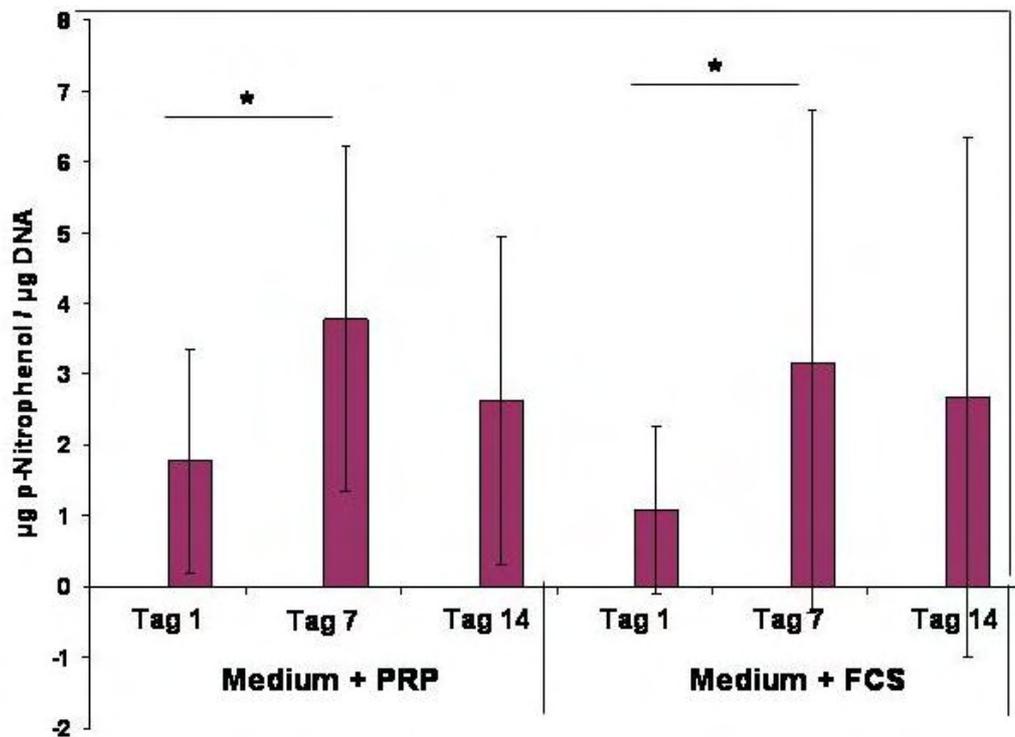
Es wurde ein signifikanter Anstieg der ALP-Aktivität von Tag 1 ( $1,5 \pm 1,1$ ) zu Tag 7 ( $3,6 \pm 2,5$ ) der osteogenen Differenzierung sichtbar ( $p=0,025$ ; *Abbildung 11*). Weder Tag 1 noch Tag 7 unterschieden sich signifikant vom 14. Tag ( $3,0 \pm 2,6$ ) der osteogenen Induktion (siehe *Abbildung 11*).

Zwischen Tag 7 und 14 stieg die ALP-Aktivität nicht weiter an und fiel sogar leicht ab (siehe *Abbildung 11*), was sich durch einen Verlust an vitalen Zellen (Zelltod durch fortschreitende Kalzifizierung) erklären lässt.

Die MSC der sechs Spender wiesen signifikante Unterschiede in ihrer ALP-Aktivität auf ( $p=0,001$ ).



**Abbildung 10:** Boxplot zum Vergleich der ALP-Aktivität der in PRP- bzw. FCS-Medium expandierten MSC

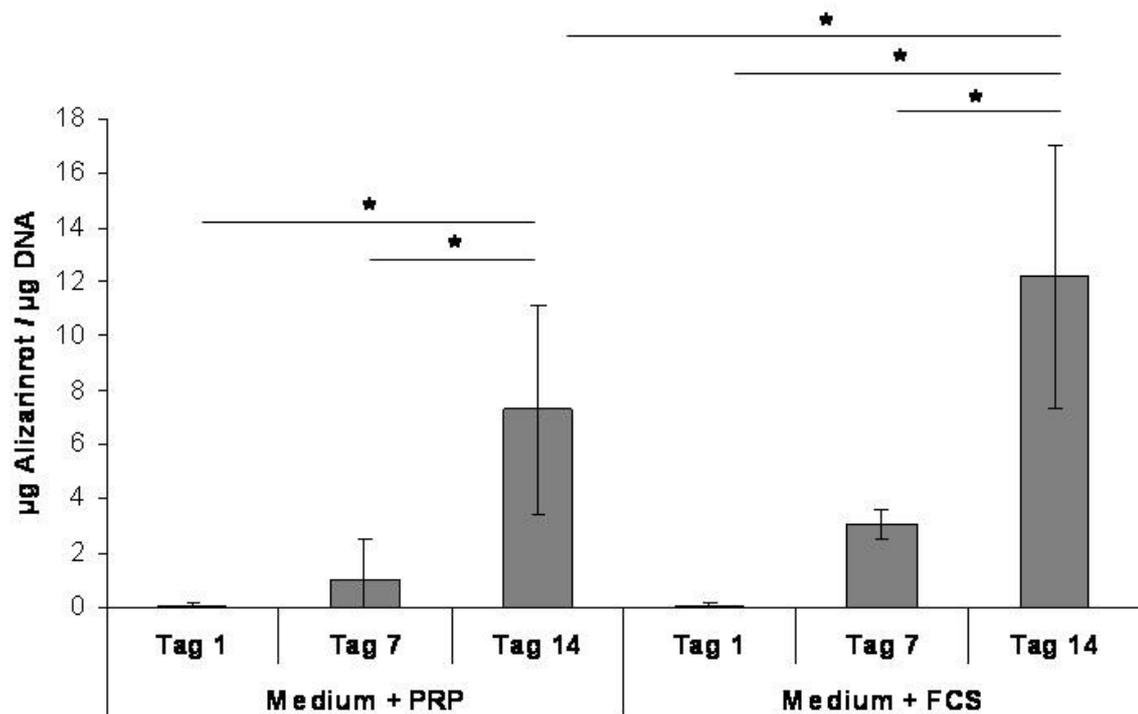


**Abbildung 11:** ALP-Aktivität der mit PRP- bzw. FCS-Medium expandierten MSC zu verschiedenen Zeitpunkten der osteogenen Differenzierung. Die Balken repräsentieren die MW  $\pm$  SD; \* =  $p \leq 0,05$

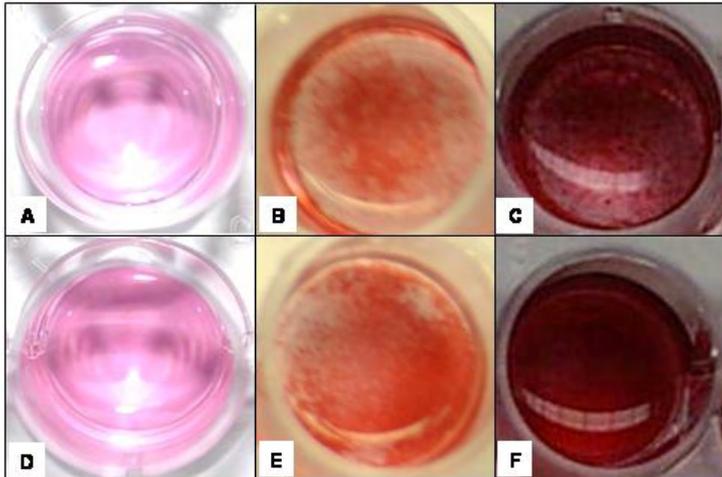
Die Alizarinrot-S Quantifizierung zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen in PRP-Medium expandierten und in FCS-Medium expandierten Zellen, betrachtete man alle kontrollierten Zeitpunkte zusammen.

Es fiel auf, dass die Kalziumablagerung in beiden Kulturmedien an Tag 14 signifikant höher war als an Tag 1 und Tag 7 (*Abbildung 12* und *13*,  $p=0,001$ ), was eine zunehmende osteogene Differenzierung der Zellen anzeigt.

Mit FCS expandierte Zellen hatten aber an Tag 14 signifikant mehr Kalzium abgelagert, als mit PRP expandierte Zellen an Tag 14 (*Abbildung 12*,  $p\leq 0,05$ ). Dies weist auf eine etwas bessere *in vitro*-osteogene Differenzierung der mit FCS expandierten Zellen hin. Die MSC der sechs Spender zeigten eine gleich gute Kalzifizierung.



**Abbildung 12:** Kalzifizierung der mit PRP- bzw. FCS-Medium expandierten MSC zu verschiedenen Zeitpunkten der osteogenen Differenzierung; \*=  $p\leq 0,05$ ; Die Balken repräsentieren die MW $\pm$ SD.



**Abbildung 13:** Nachweis der Kalzifizierung osteogen differenzierter MSC mittels Alizarinrot-Färbung an Tag 1 (A+D), Tag 7 (B+E) und Tag 14 (C+F) der osteogenen Induktion. Bild A,B,C: In PRP-Medium expandierte MSC; Bild D,E,F: In FCS-Medium expandierte MSC

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl bei PRP- als auch bei FCS-expandierten Zellen die Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung erhalten blieb. Die Zellen beider Kultivierungsmethoden unterschieden sich im Hinblick auf die ALP-Aktivität nicht, während sich die FCS-expandierten Zellen im Hinblick auf die Kalziumablagerung leicht überlegen zeigten.

#### 4.4.2 Ergebnisse der chondrogenen Differenzierung

Die im Expansionsversuch gewonnenen Zellen wurden *in vitro* über 28 Tage hinweg chondrogen differenziert. Beurteilt wurde die Metachromasie nach Färbung mit Toluidinblau sowie der Gehalt an im Knorpel stark exprimiertem Kollagen Typ I und -Typ II, welcher durch Immunhistologie festgestellt wurde.

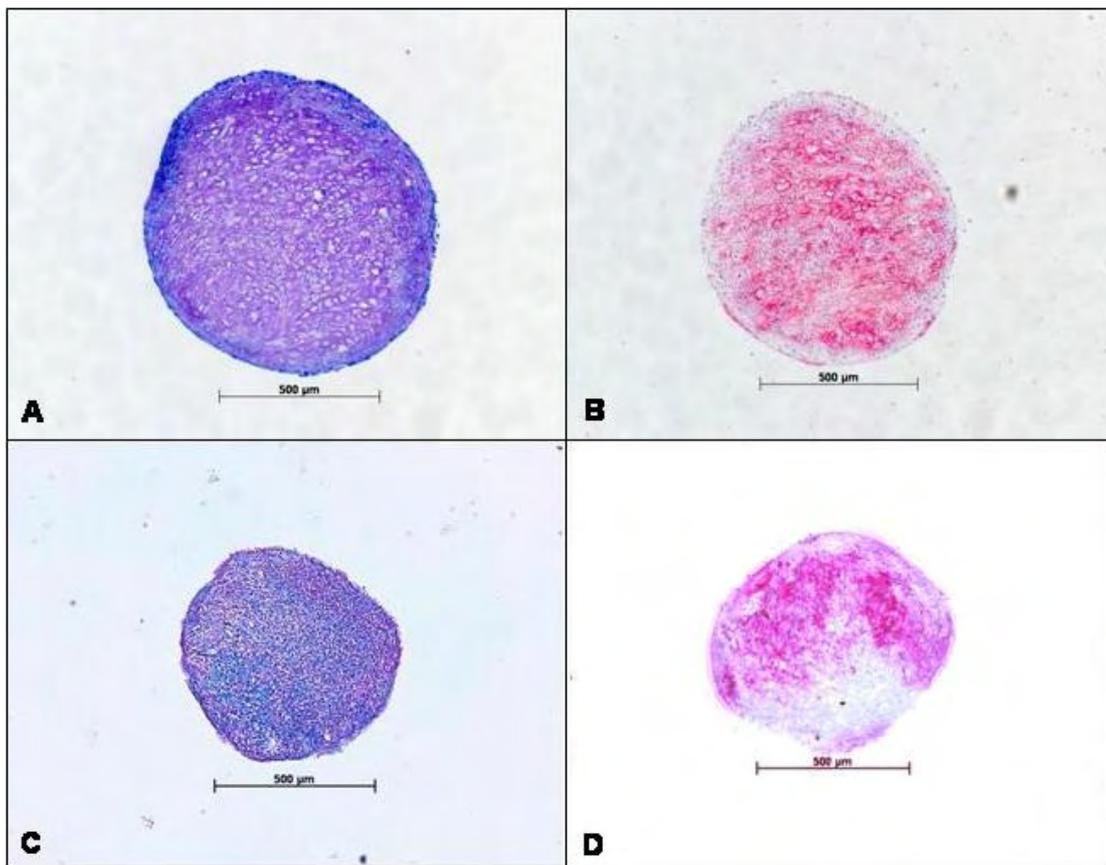
Die semiquantitative Evaluierung der mit Toluidinblau gefärbten, über 28 Tage chondrogen induzierten Pellets zeigte für PRP- und FCS-expandierte MSC ein gleiches Potential zur chondrogenen Differenzierung.

Die Zellen beider Kultivierungsmethoden zeigten eine deutliche chondrogene Morphologie und Metachromasie (*Abbildung 14*). Die ordinalen Score Werte (OSW) der in den beiden Medien kultivierten MSC können Tabelle 8 entnommen werden. Die MSC einzelner Spender zeigten ein höheres Potential zur chondrogenen Differenzierung ( $p=0,017$ ), aber diese Unterschiede waren unabhängig davon, welches Medium verwendet wurde. Auch hinsichtlich des

Vorhandenseins an Kollagen Typ I und II unterschieden sich die Zellen beider Kultivierungsmethoden nicht. Aus technischen Gründen (Ablösung des Schnitts vom Objektträger bei der Immunhistologie) konnte bei den MSC eines Spenders keine Auswertung des Kollagen Typ II-Gehalts erfolgen.

Variable	MSC	OSW+/-SD	n	p-Wert
<b>Metachromasie</b>	PRP	1,50 +/- 1,64	6	0,753
	FCS	1,17 +/- 1,47	6	
<b>Kollagen Typ I</b>	PRP	2,61 +/- 1,27	6	0,636
	FCS	2,92 +/- 0,80	6	
<b>Kollagen Typ II</b>	PRP	1,40 +/- 1,53	5	0,741
	FCS	1,17 +/- 1,14	5	

**Tabelle 8:** Ordinale Score Werte (OSW) der mit PRP oder FCS kultivierten Zellen



**Abbildung 14:** Chondrogene Differenzierung an Tag 28: Bilder A+B zeigen Pellets PRP-expandierter MSC, Bilder C+D zeigen Pellets FCS-expandierter MSC. A+C: Toluidinblau-Färbung; B+D: Kollagen Typ II Immunhistologie.

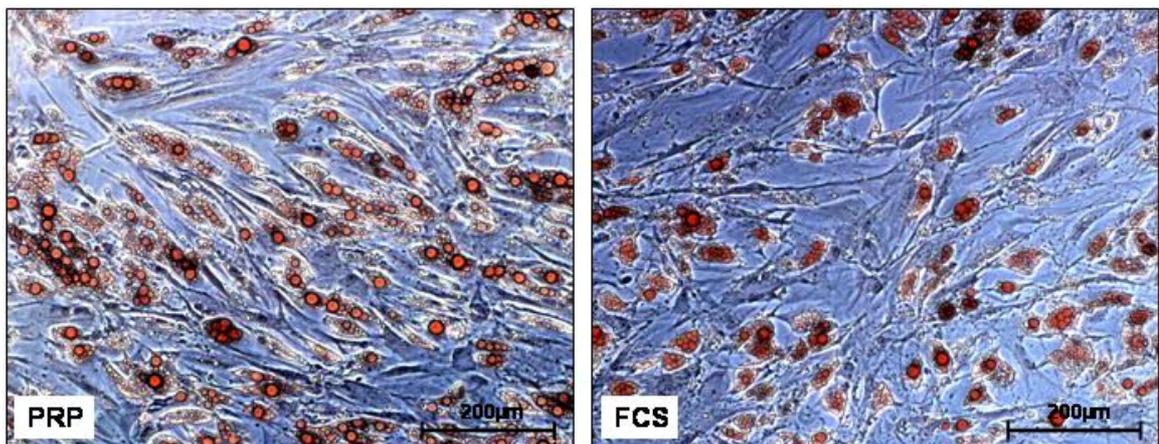
### 4.4.3 Ergebnisse der adipogenen Differenzierung

Die aus dem Expansionsversuch hervorgegangenen Zellen wurden über 28 Tage adipogen differenziert. An Tag 1, 14 und 28 wurden die MSC-Kulturen mit Ölrot-O gefärbt und anschließend unter dem Lichtmikroskop hinsichtlich ihrer Morphologie und Anfärbung beurteilt.

Hinsichtlich der adipogenen Differenzierung konnten zwischen den in den beiden Zellkulturmedien expandierten MSC keine Unterschiede festgestellt werden ( $p=0,430$ ) (*Abbildung 15*).

Folglich differenzieren in PRP- und in FCS-supplementiertem Medium kultivierte Zellen gleich gut adipogen. FCS-expandierte Zellen hatten einen OSW von  $1,41 \pm 1,28$  (MW/SD), PRP-expandierte Zellen hatten einen OSW von  $1,06 \pm 0,99$  (MW/SD).

An Tag 14 und Tag 28 der adipogenen Induktion zeigten sich signifikant mehr Zellen, die mit Ölrot-O orangerot angefärbte Lipidvesikel enthielten, als an Tag 1, an welchem keinerlei positive Färbung der Zellen zu sehen war ( $p=0,001$ ). Zwischen dem 14. und dem 28. Tag der Differenzierung war kein signifikanter Anstieg in der Zahl positiv gefärbter Zellen mehr festzustellen ( $p=0,760$ ).



**Abbildung 15:** Adipogen differenzierte, in PRP- bzw. FCS-Medium expandierte MSC an Tag 28 (Ölrot-O-Färbung)

#### **4.5 Ergebnisse der histologischen Beurteilung des *in vivo* neu gebildeten Knochens**

Die Fähigkeit der mittels Zellexpansion gewonnenen MSC zur ektopen Knochenbildung wurde in einem *in vivo* Versuch getestet. PRP- oder FCS-expandierte Zellen wurden dafür auf zwei unterschiedliche Knochenersatzstoffe (CDHA bzw.  $\beta$ -TCP) aufgebracht, die vor der Besiedelung mit MSC mit Fibronectin oder Humanserum beschichtet worden waren. Nach 8-wöchiger s.c. Implantation in der SCID-Maus wurden die Konstrukte explantiert und es erfolgte ein Vergleich dieser drei Faktoren (MSC, Matrix und Beschichtung der Matrix), bei dem ihr jeweiliger Einfluss auf die ektipe Knochenbildung evaluiert werden sollte.

Die Untersuchung Toluidinblau-gefärbter Schnitte der Implantate unter dem Lichtmikroskop ergab, dass sich in 42 von 48 mit MSC besiedelten Implantaten Knochen neu gebildet hatte. Nur in 6 Implantaten war keine Knochenneubildung nachweisbar. Drei dieser Implantate waren mit PRP-expandierten MSC, drei mit FCS-expandierten MSC besiedelt worden, bei dem verwendeten Knochenersatzstoff handelte es sich in allen 6 Fällen um  $\beta$ -TCP.

Der neu gebildete Knochen wurde hauptsächlich an den Wänden der Poren abgelagert. Osteoblasten säumten seine innere Oberfläche und Osteozyten waren in seiner Cortikalis-ähnlichen Matrix eingebettet (*Abbildung 17-21* und *23-25*). Das als Knochen klassifizierte Gewebe zeigte deutlich die Morphologie von echtem Knochen und färbte sich in allen Fällen mit Alizarinrot-S positiv an. Einzelne Poren waren auch vollständig mit Knochen ausgefüllt. Zum Teil war sogar ein Ansatz zur Bildung einer Markhöhle zu erkennen, in welcher Gefäße in lockeres Bindegewebe eingebettet waren. Die Kontroll-Keramiken, die nicht mit MSC besiedelt wurden, zeigten in keinem Fall eine Knochenneubildung. Hier war stets nur wenig, in die Poren der Keramik eingewachsenes lockeres Bindegewebe der Maus zu erkennen (*Abbildung 16*).

Die Knochenneubildung in den Randbereichen der Schnitte war derjenigen in der Mitte nicht überlegen ( $p=0,111$ ), was darauf schließen lässt, dass die MSC beim Besiedeln nicht nur auf der Oberfläche der Keramiken verbleiben, sondern auch in tiefere Schichten der Matrix eindringen bzw. später dorthin migrieren

können. Allerdings zeigte sich in manchen Implantaten die Tendenz zu einer besseren Knochenbildung auf einer bestimmten Seite der Keramik. Vermutlich handelte es sich dann um diejenige Seite, auf welche die MSC aufgebracht worden waren.

Die Verumgruppen (Keramik + MSC) waren den Kontrollgruppen (unbesiedelte Keramik) hinsichtlich der Knochenneubildung im Allgemeinen signifikant überlegen ( $p < 0,001$ ). Nur in zwei Fällen (PRP-Zellen auf Fibronectin-beschichtetem  $\beta$ -TCP und FCS-Zellen auf Fibronectin-beschichtetem  $\beta$ -TCP) war kein signifikanter Unterschied zwischen Verumgruppe und Kontrolle zu erkennen, da in diesen beiden Verumgruppen in jeweils zwei Implantaten kein Knochen gebildet wurde (siehe *Tabelle 9*).

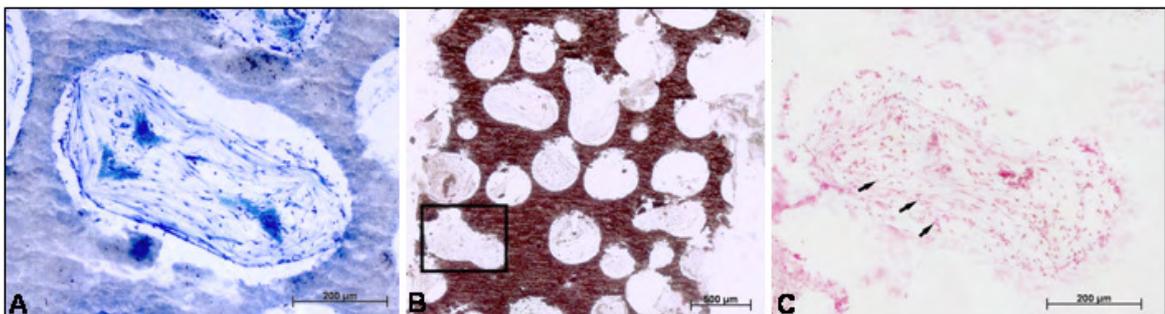
Mit PRP expandierte Zellen unterschieden sich hinsichtlich der Knochenneubildung *in vivo* nicht von mit FCS expandierten Zellen ( $p = 0,790$ ). Dieses Ergebnis war unabhängig davon, auf welche Keramik die Zellen aufgebracht wurden und auch von der Beschichtung der Keramiken. Unabhängig von der Beschichtung zeigten Zellen beider Kultivierungsmethoden auf dem neuartigen Knochenersatzstoff CDHA (*Abbildung 17, 18, 19, 23, 24, 25*) eine signifikant bessere Knochenneubildung als auf  $\beta$ -TCP ( $p < 0,001$ ) (*Abbildung 20, 21*).

Die Beschichtung der Keramiken mit Fibronectin war im Gegensatz zu unseren Ergebnissen in der Pilotstudie (Vogel et al. 2006) in diesem Versuch der Beschichtung mit Humanserum nicht überlegen ( $p = 0,467$ ).

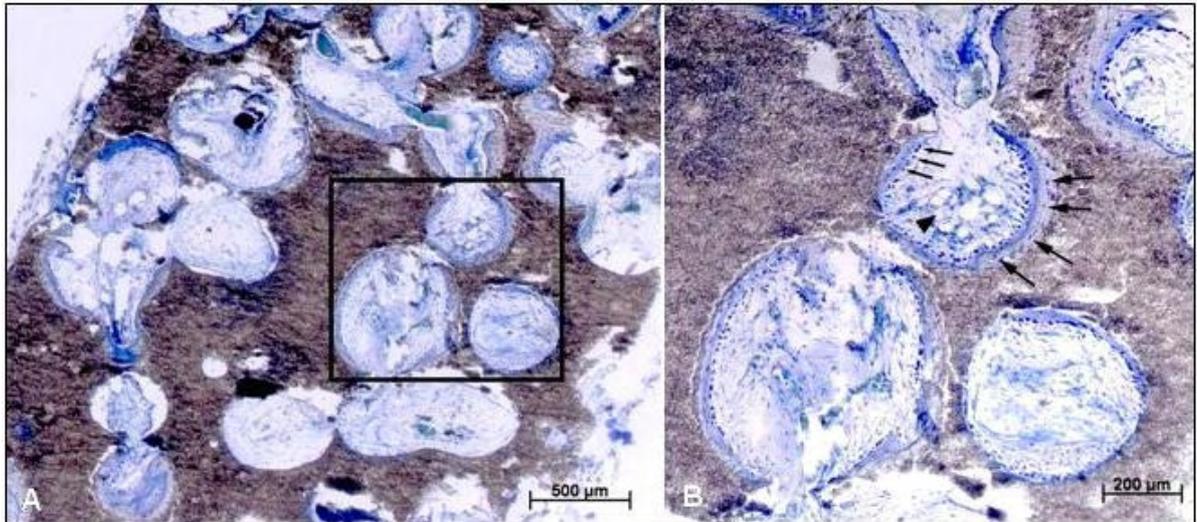
Die Knochenneubildung war mit beiden Beschichtungsarten gleich gut. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl PRP-expandierte als auch FCS-expandierte MSC gleichermaßen in der Lage sind, *in vivo* ektopen Knochen zu bilden, dass der neuartige Knochenersatzstoff CDHA sich in diesem Versuch als dem  $\beta$ -TCP weit überlegen gezeigt hat und dass eine Beschichtung des CDHA mit Fibronectin aus technischen Gründen am sinnvollsten erscheint.

Implantat- gruppe	Art des Implantats (Zellart/Matrix/Beschichtung)	Knochenbildung (x von 6)
1	PRP/CDHA/FN	6/6
2	PRP/CDHA/HS	6/6
3	PRP/ $\beta$ -TCP/FN	4/6
4	PRP/ $\beta$ -TCP/HS	5/6
5	FCS/CDHA/FN	6/6
6	FCS/CDHA/HS	6/6
7	FCS/ $\beta$ -TCP/FN	4/6
8	FCS/ $\beta$ -TCP/HS	5/6
9	Control/CDHA/FN	0/6
10	Control/CDHA/HS	0/6
11	Control/ $\beta$ -TCP/FN	0/6
12	Control/ $\beta$ -TCP/HS	0/6

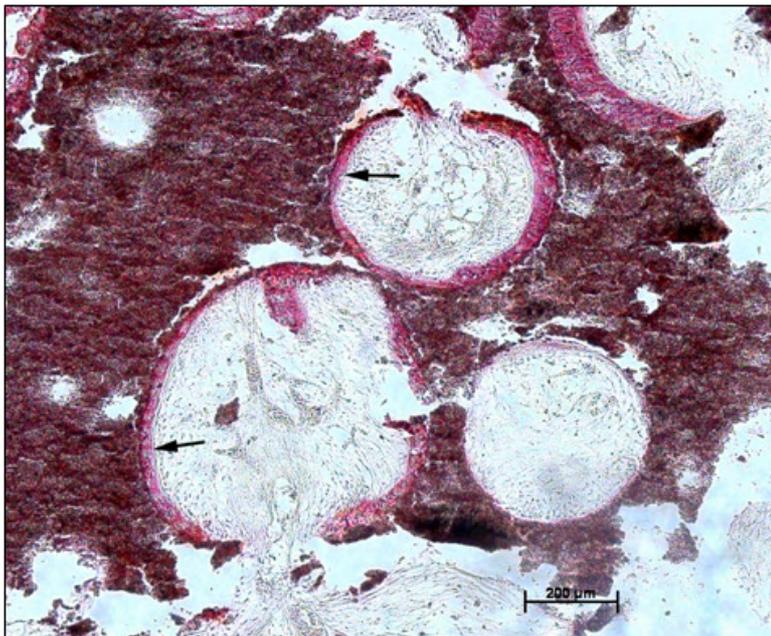
**Tabelle 9:** Knochenbildung *in vivo* von mit PRP bzw. FCS-expandierten Zellen



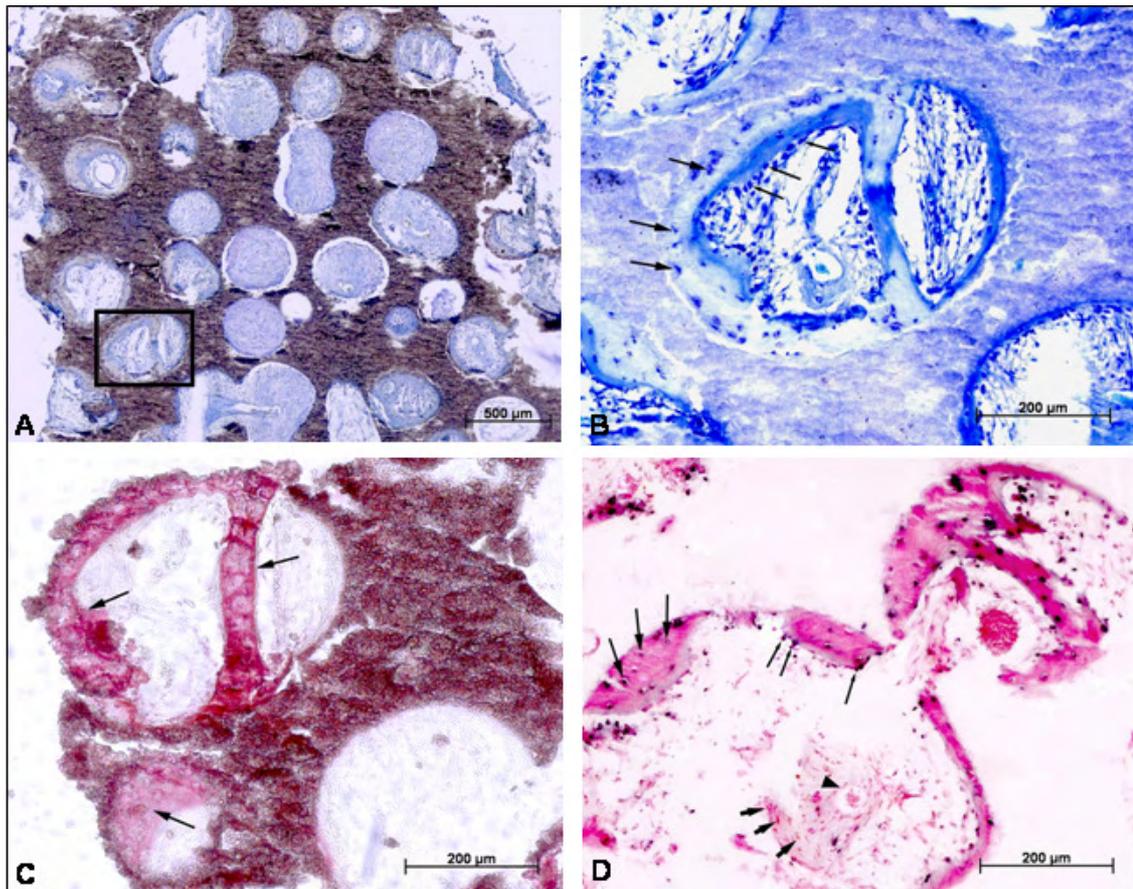
**Abbildung 16:** HS-beschichtetes, unbesiedeltes CDHA-Implantat (Kontrolle): Bild A: Toluidinblau Färbung, es ist keine Knochenneubildung zu erkennen; Bild B: Alizarinrot-Färbung, es ist keine Kalzifizierung nachweisbar; Bild C: In Situ Hybridisierung, die Pfeile weisen auf lockeres Bindegewebe der Maus.



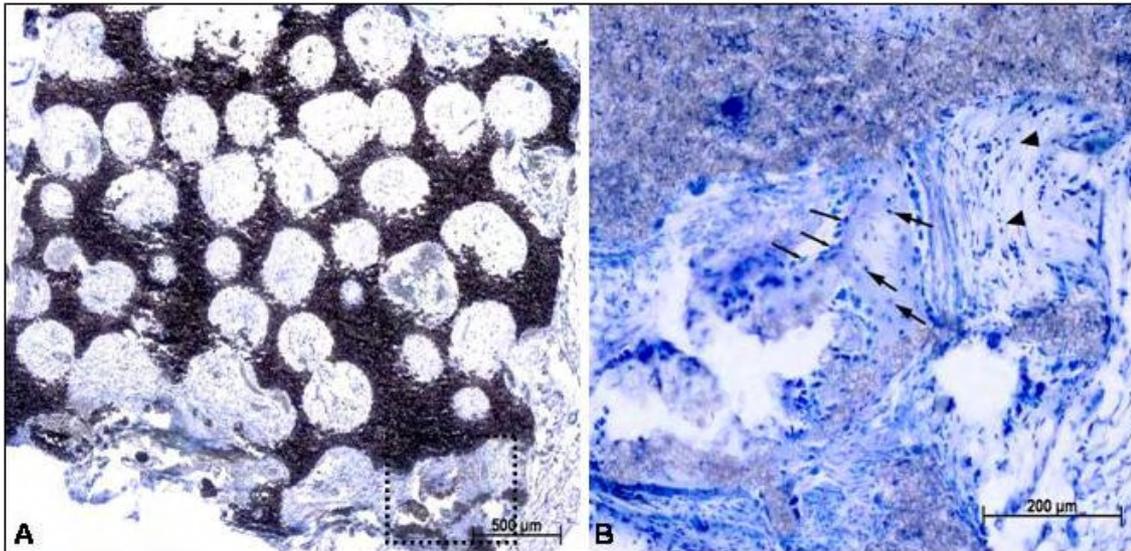
**Abbildung 17:** FN-beschichtete, mit FCS-explandierten MSC besiedelte CDHA-Keramik (Toluidinblau-Färbung): Bild A: Übersicht; Bild B: Vergrößerung; große Pfeile weisen auf Osteocyten, kleine Pfeile auf Osteoblasten, Pfeilspitzen auf Gefäße, eingebettet in lockeres Bindegewebe



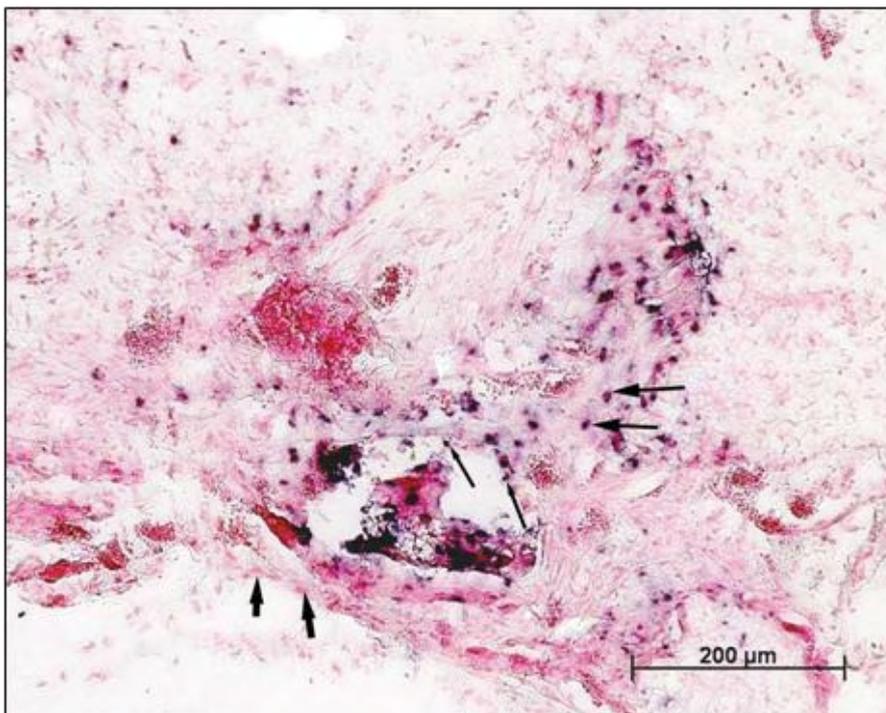
**Abbildung 18:** Alizarinrot-Färbung der in Abb. 17 gezeigten FN-beschichteten, mit FCS-explandierten MSC besiedelten CDHA-Keramik zum Nachweis des neu gebildeten Knochens; die Pfeile markieren den am Rand der Poren abgelagerten Knochen



**Abbildung 19:** HS-beschichtete, mit FCS-expandierten MSC besiedelte CDHA-Keramik: Bild A: Übersicht, Toluidinblau-Färbung; Bild B: Vergrößerung; große Pfeile weisen auf Osteocyten, kleine Pfeile auf Osteoblasten; Bild C: Alizarinrot-Färbung zum Nachweis des neu gebildeten Knochens; die Pfeile markieren den meist am Rand der Poren abgelagerten Knochen; Bild D: Nachweis von Zellen humanen Ursprungs (schwärzlich) mittels in situ Hybridisierung; große Pfeile weisen auf Osteocyten, kleine dünne Pfeile auf Osteoblasten, kleine dicke Pfeile markieren Mauselemente (rot), die Pfeilspitze weist auf ein in lockeres Bindegewebe eingebettetes Gefäß.



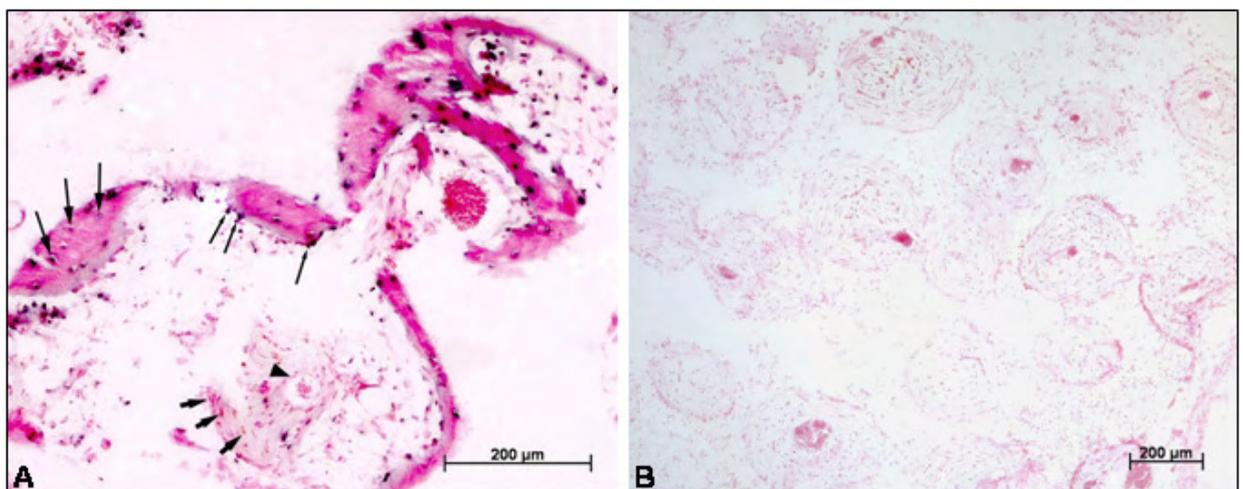
**Abbildung 20:** FN-beschichtete, mit PRP-expandierten MSC besiedelte  $\beta$ -TCP-Keramik (Toluidinblau-Färbung): Bild A: Übersicht; Bild B: Vergrößerung; große Pfeile weisen auf Osteocyten, kleine Pfeile auf Osteoblasten, Pfeilspitzen auf lockeres Bindegewebe.



**Abbildung 21:** In situ Hybridisierung der in Abb. 20 gezeigten FN-beschichteten, mit PRP-expandierten MSC besiedelten  $\beta$ -TCP-Keramik zum Nachweis von Zellen humanen Ursprungs (schwärzlich); große Pfeile weisen auf Osteocyten, kleine dünne Pfeile auf Osteoblasten, kleine dicke Pfeile markieren Mauszellen (rot).

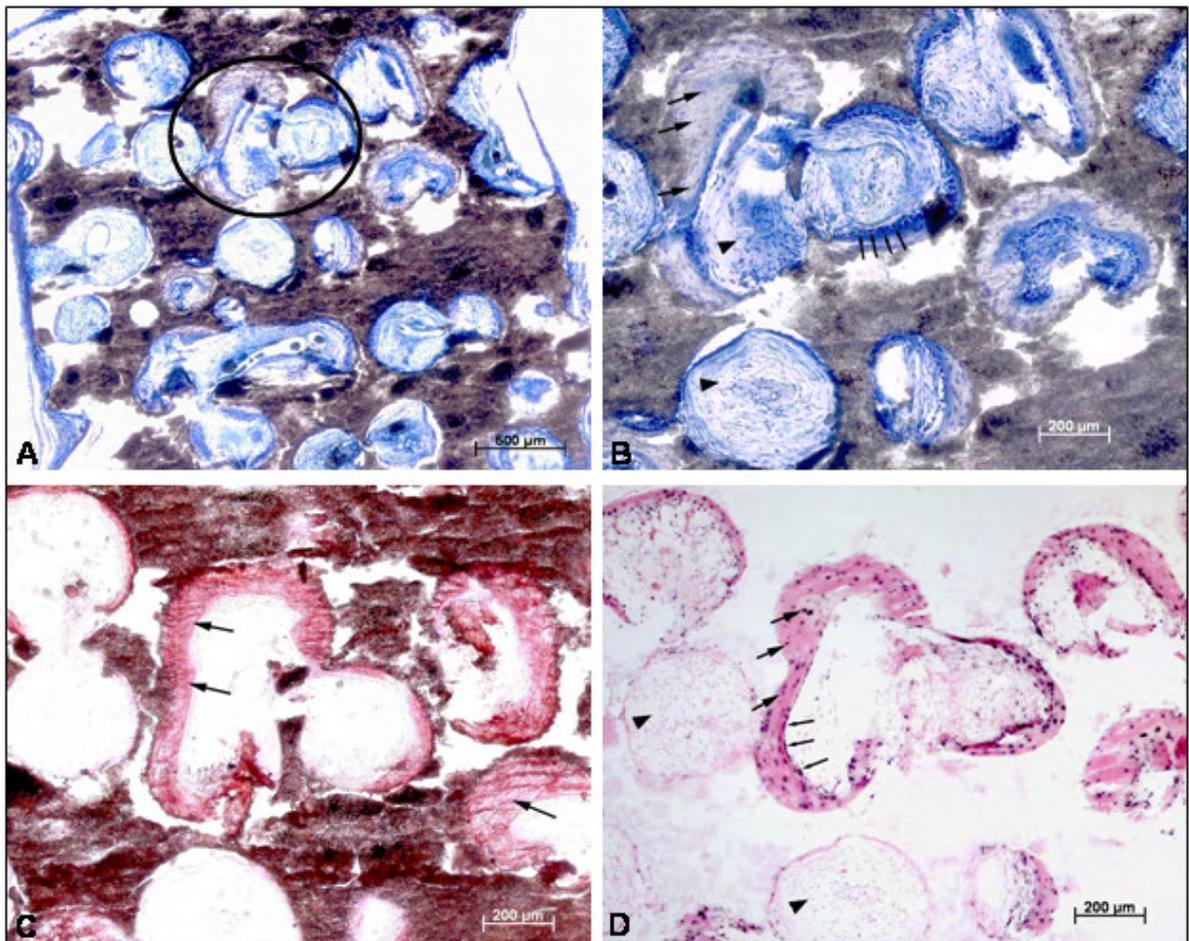
#### **4.6 Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung auf humane Alu Sequenzen**

Durch die *in situ* Hybridisierung lassen sich humane Zellen in den verschiedenen Arealen der Implantate darstellen und von murinen Zellen differenzieren. Auf diese Weise kann festgestellt werden, ob der *in vivo* geformte Knochen durch humane oder durch murine Zellen gebildet wurde und auch, wie weit die MSC nach der Besiedelung in die Keramik eindringen konnten. Es konnte nachgewiesen werden, dass nach 8 Wochen subkutaner Implantation in der SCID-Maus noch sehr viele humane Zellen in der Matrix vorhanden waren. Humane Zellen fanden sich in allen Arealen der einzelnen Schnitte. Sowohl Osteoblasten als auch Osteozyten waren humanen Ursprungs. Das in die Keramiken eingewachsene und bei den Kontrollen allein vorherrschende lockere Bindegewebe war murinen Ursprungs, ebenso wie die gebildeten Gefäße (*Abbildung 16C, 22B*). In den Verumgruppen fand sich humaner Knochen, der zum Teil eine Art Markhöhle umgab, welche wiederum von murinen Zellen gebildet wurde (*Abbildung 21, 22A*).

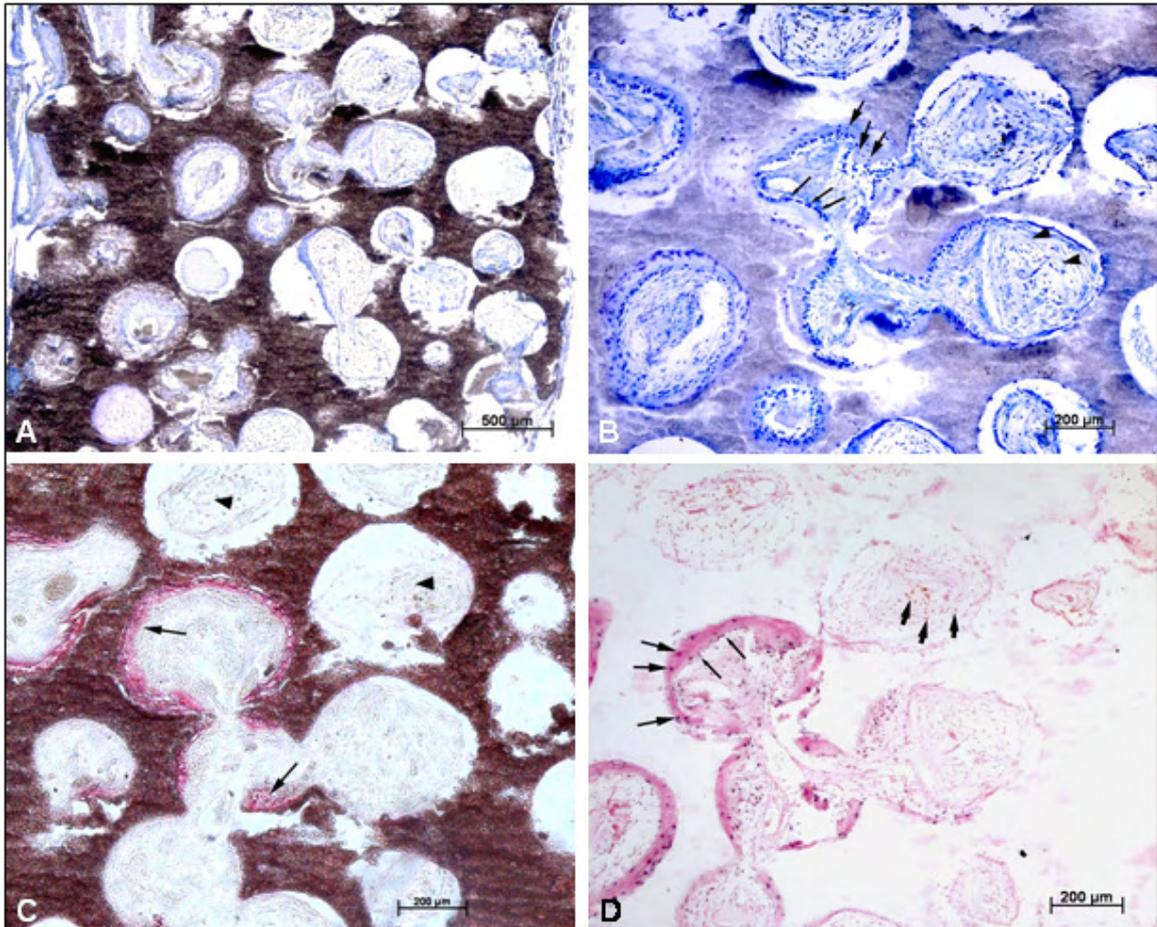


**Abbildung 22:** In situ Hybridisierung zum Nachweis von Zellen humanen Ursprungs (schwärzlich): Bild A: Verumgruppe; HS-beschichtete, mit FCS-expandierten MSC besiedelte CDHA-Keramik; große Pfeile weisen auf Osteocyten, kleine dünne Pfeile auf Osteoblasten, kleine dicke Pfeile markieren Mauszellen (rot), die Pfeilspitze weist auf ein in lockeres Bindegewebe eingebettetes Gefäß. Bild B: unbesiedelte Kontrolle; HS-beschichtete, unbesiedelte CDHA-Keramik; es ist nur lockeres Bindegewebe der Maus zu erkennen.

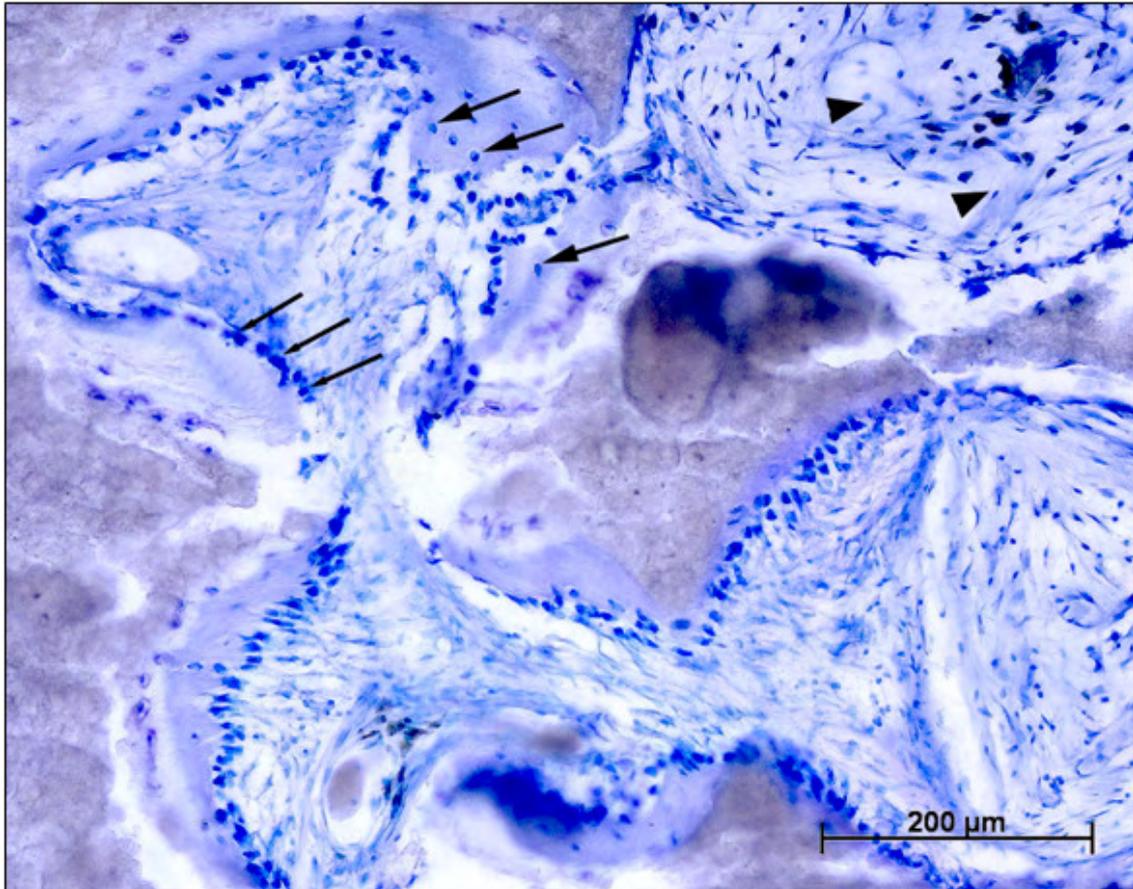
In den Abbildungen 23, 24 und 25 sieht man jeweils Serienschritte, in welchen immer die gleiche Porenformation einer Keramik in Toluidinblau-Färbung (Übersicht und Vergrößerung), Alizarinrot-S-Färbung und einer *in situ*-Hybridisierung dargestellt ist. Diese Darstellung ermöglicht es, gleichzeitig die Morphologie, die Kalzifizierung und die Verteilung der humanen Zellen in diesen bestimmten Arealen der Schnitte zu beurteilen.



**Abbildung 23:** FN-beschichtete, mit FCS-expandierten MSC besiedelte CDHA-Keramik: Bild A: Übersicht, Toluidinblau-Färbung; Bild B: Vergrößerung; große Pfeile weisen auf Osteocyten, kleine Pfeile auf Osteoblasten, Pfeilspitzen auf Gefäße, eingelagert in lockerem Bindegewebe; Bild C: Alizarinrot-Färbung zum Nachweis des neu gebildeten Knochens; die Pfeile markieren den am Rand der Poren abgelagerten Knochen; Bild D: Nachweis von Zellen humanen Ursprungs mittels *in situ* Hybridisierung; große Pfeile weisen auf Osteocyten, kleine dünne Pfeile auf Osteoblasten, Pfeilspitzen markieren lockeres Bindegewebe der Maus (rötlich).



**Abbildung 24:** HS-beschichtete, mit PRP-expandierten MSC besiedelte CDHA-Keramik: Bild A: Übersicht, Toluidinblau-Färbung; Bild B: Vergrößerung; große Pfeile weisen auf Osteocyten, kleine Pfeile auf Osteoblasten, Pfeilspitzen auf Gefäße, eingelagert in lockerem Bindegewebe; Bild C: Alizarinrot-Färbung zum Nachweis des neu gebildeten Knochens; die Pfeile markieren den am Rand der Poren abgelagerten Knochen; Bild D: Nachweis von Zellen humanen Ursprungs (schwärzlich) mittels in situ Hybridisierung; große Pfeile weisen auf Osteocyten, dünne Pfeile auf Osteoblasten, kleine dicke Pfeile markieren lockeres Bindegewebe der Maus (rötlich).



**Abbildung 25:** Vergrößerung von Abbildung 24, Bild B: HS-beschichtete, mit PRP-expandierten MSC besiedelte CDHA-Keramik (Toluidinblau-Färbung): Große Pfeile weisen auf Osteocyten, kleine Pfeile auf Osteoblasten, Pfeilspitzen auf lockeres Bindegewebe

#### **4.7 Ergebnisse der $\mu$ -Computer Tomographischen Messung**

Als eine objektive Methode zur Quantifizierung des *in vivo* neu gebildeten Knochens wurde zusätzlich zur histologischen Untersuchung der Implantate eine  $\mu$ -Computer Tomographische Messung ( $\mu$ -CT-Messung) durchgeführt.

Um die Übereinstimmung der in der Histologie ermittelten mit den im  $\mu$ -CT ermittelten Ergebnissen festzustellen, wurden diese miteinander korreliert. Es wurde eine mittlere Korrelation (Korrelationskoeffizient=0,409) der Ergebnisse festgestellt, die Korrelation war auf dem 0,01-Niveau signifikant.

Die histologischen Beobachtungen konnten im  $\mu$ -CT in soweit bestätigt werden, als dass sich die PRP-expandierten Zellen hinsichtlich ihrer Knochenneubildung nicht von den FCS-expandierten Zellen unterschieden ( $p=0,978$ ).

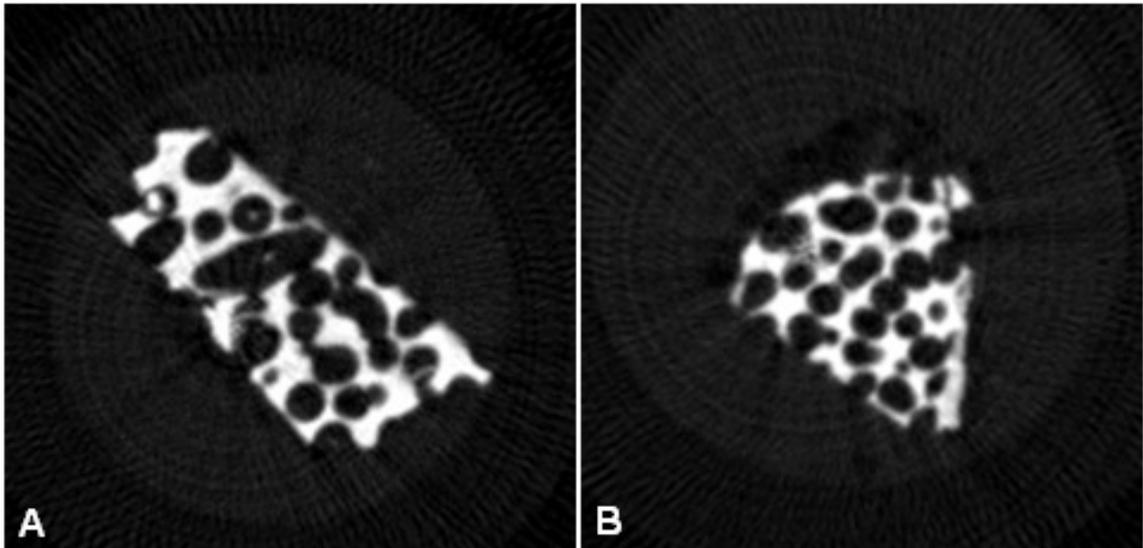
Ebenso sind alle Verumgruppen den Kontrollgruppen signifikant überlegen, und zwar auch diejenigen Verumgruppen (PRP/FN/ $\beta$ -TCP und FCS/FN/ $\beta$ -TCP), die in der Histologie als nicht signifikant überlegen ermittelt worden waren.

Die Überlegenheit der CDHA-Keramik, die in der Histologie deutlich zu Tage tritt, lässt sich im  $\mu$ -CT nicht nachvollziehen ( $p=0,303$ ). Dies liegt sowohl daran, dass die Proben zum Zeitpunkt der  $\mu$ -CT-Messung schon für die Histologie verwendet worden waren, wodurch große Teile der Probe verloren gegangen waren, als auch an dem Problem, Knochen im  $\mu$ -CT von der Keramik selbst zu differenzieren.

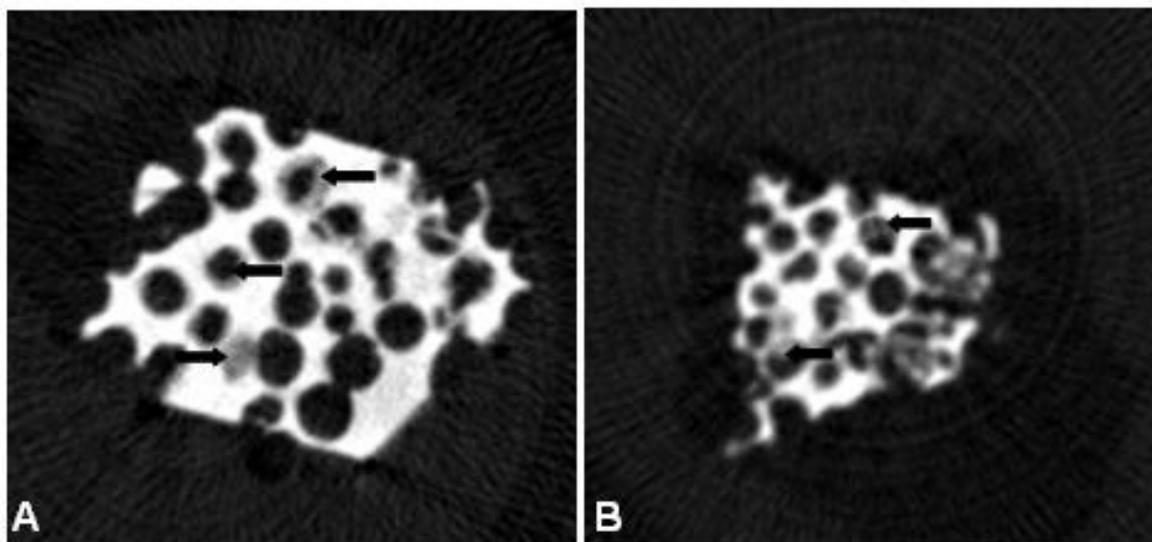
Die Messung erlaubte einen guten Einblick in die dreidimensionale Porenstruktur der beiden Keramiken. Zum Zweck der genauen Probenauswertung und der Klärung spezifischer Fragestellungen ist jedoch die zuerst erfolgte histologische Untersuchung der Implantate die bessere Methode.

Die Abbildungen 26 A und B zeigen die  $\mu$ -CT-Messungen je einer unbesiedelten CDHA- und  $\beta$ -TCP-Keramik (Kontrolle).

Die Abbildungen 27 A und B zeigen die  $\mu$ -CT-Messungen je einer CDHA- und  $\beta$ -TCP-Keramik mit Knochenbildung (Verumgruppe).



**Abbildung 26:**  $\mu$ -CT-Messungen unbesiedelter Keramiken (Kontrollen):  
Bild A: FN-beschichtetes CDHA; Bild B: FN-beschichtetes  $\beta$ -TCP



**Abbildung 27:**  $\mu$ -CT-Messungen besiedelter Keramiken (Verumgruppen):  
Bild A: FN-beschichtetes, mit PRP-explandierten MSC besiedeltes CDHA; Bild B: FN-beschichtetes, mit PRP-explandierten MSC besiedeltes  $\beta$ -TCP; die Pfeile weisen auf in den Poren neu gebildeten Knochen.

## 5. Diskussion

Diese Studie wurde durchgeführt, um die in einem neuartigen, mit plättchenreichem Plasma (PRP) supplementierten Zellkulturmedium expandierten mesenchymalen Stammzellen (MSC) im Hinblick auf ihre Proliferationsfähigkeit, ihre mesenchymale Plastizität *in vitro* und ihre Fähigkeit zur Knochenneubildung auf zwei keramischen Knochenersatzstoffen *in vivo* zu untersuchen. Es erfolgte hierbei ein Vergleich mit Zellen, die in herkömmlichem, fötales Kälberserum (FCS) enthaltendem Medium expandiert wurden. Zusätzlich sollte die Frage geklärt werden, ob sich die neuartige Keramik CDHA ebenso gut oder sogar besser als das schon klinisch eingesetzte  $\beta$ -TCP für die Verwendung als Knochenersatzstoff in Kombination mit MSC eignet. Schließlich wurden noch zwei verschiedene Beschichtungsarten für diese Knochenersatzstoffe miteinander verglichen.

### **5.1 *In vitro* Versuch zur Zellexpansion und Zelldifferenzierung**

#### **5.1.1 Diskussion der Methode**

##### **5.1.1.1 Zellexpansion im Monolayer**

Die Methode der Gewinnung mononukleärer Zellen aus Knochenmark unter Verwendung eines Dichtegradienten und anschließender Isolation der enthaltenen mesenchymalen Stammzellen unter Ausnutzung ihrer Fähigkeit zur Plastikadhärenz ist heute gut etabliert (Reyes et al. 2001; Pittenger et al. 1999). Die zweidimensionale *in vitro*-Kultur im Monolayer erlaubt eine rasche Vermehrung der MSC in einem standardisierten Umfeld. Sie verbleiben hierbei in einem undifferenzierten Zustand und ihre Gewinnung nach Abschluss der Expansionsphase ist einfach. Bei der in-Kulturnahme der Zellen wurde darauf geachtet, dass die aus dem jeweiligen Spender-Knochenmark isolierten mononukleären Zellen stets genau hälftig auf die Zellkulturflaschen, die entweder PRP- oder FCS-supplementiertes Medium enthielten, aufgeteilt wurden. Zudem erfolgte ihre Kultur unter identischen Bedingungen (37°C, 6% CO<sub>2</sub>, Verwendung des gleichen Brutschrankes und des gleichen Zellkulturplastiks). Auf diese Weise sollte die Vergleichbarkeit der Ansätze gewährleistet werden.

### **5.1.1.2 Zelldifferenzierung**

Als Marker der osteogenen Differenzierung dienten die Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase und die Anfärbung der osteogen induzierten MSC mit Alizarinrot-S. Die ALP ist ein Enzym, welches in hoher Konzentration im Knochen zu finden ist und die Analyse ihrer Aktivität ist ein häufig angewandtes Verfahren zum Nachweis einer osteogenen Zelldifferenzierung (Nishida et al. 1999). Stanford et al. beschrieben 1995 den Nachweis der Ablagerung von Kalziumkristallen in der extrazellulären Matrix durch Färbung der differenzierten Zellen mit Alizarinrot-S und einer anschließenden Quantifizierung des gebundenen Farbstoffs (Stanford et al. 1995). Um eine chondrogene Differenzierung der in Pelletkultur induzierten Zellen nachzuweisen, wurden histologische Schnitte mit Toluidinblau gefärbt, wodurch die typische chondrogene Morphologie der differenzierten Zellen gut erkennbar war. Eine Kollagen Typ-I (Regenerationsfaserknorpel) und Typ-II (hyaliner Knorpel) Immunhistologie sollte das Vorhandensein spezifischer Marker der chondrogenen Differenzierung bestätigen (Cohen et al. 1998). Die Immunhistochemie stellt nach Frazer et al. ein geeignetes Analyseinstrument zur Detektion chondrozytenspezifischer Marker dar (Frazer et al. 1994). Die für die adipogene Differenzierung typische Ansammlung von Lipidvesikeln in den MSC wurde mittels einer Ölrot-O-Färbung der histologischen Schnitte nachgewiesen. Auch diese Methode ist in der Literatur beschrieben (Winter et al. 2003).

## **5.1.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.1.2.1 Zellexpansionsmedien**

Um mesenchymale Stammzellen im Rahmen verschiedener Therapieansätze verwenden zu können, müssen aus einer sehr kleinen Menge Knochenmarksaspirat während der *ex vivo*-Expansion mehrere Millionen undifferenzierter Zellen gewonnen werden. Die herkömmlichen Medien zur Zellexpansion enthalten fötales Kälberserum (FCS). Für eine klinische Anwendung aber sollte der Kontakt der MSC mit FCS vermieden werden, da FCS immunologische Reaktionen auslösen kann (MacDermott und Bragdon 1983; Kievits et al. 1988) und zudem als ein potentieller Vektor der Prionen-

Übertragung diskutiert wurde (WHO 1997). Ein weiterer Nachteil der Verwendung von FCS ist die zwischen den verschiedenen Chargen auftretende Variation, die Einfluss auf die Zellvermehrung hat und ein aufwändiges Chargen-Screening mittels *in vitro*-Versuchen auf die Eignung des jeweiligen FCS unabdingbar macht (Lennon et al. 1996).

Ein Ziel dieser Studie war es, MSC ohne den Zusatz von FCS zu expandieren. Daher entwickelte unsere Arbeitsgruppe ein Zellexpansionsmedium, in welchem FCS durch plättchenreiches Plasma (PRP) ersetzt wurde.

Der proliferationssteigernde Effekt von plättchenreichem Plasma (PRP) oder der Überstände aktivierter Plättchen (Platelet-released supernatants, PRS) auf verschiedene Zellarten wurde in der Literatur bereits beschrieben (Lucarelli et al. 2003; Weibrich et al. 2002a). Allogenes PRP kann kurz vor Beginn der Zellexpansion bei einer Blutbank bezogen werden. Es lässt sich aber auch in kleineren Mengen mittels tragbarer PRP-Separationssysteme autolog aus dem Blut von Patienten gewinnen (Weibrich et al. 2003). Diese Alternative ist der Verwendung von allogenem PRP vorzuziehen, da das Risiko des Auftretens von Immunreaktionen oder der Übertragung von Krankheiten ausgeschlossen wird.

PRP enthält verschiedene Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel PDGF, FGF, IGF, TGF- $\beta$ , EGF und VEGF (Weibrich et al. 2003; Weibrich et al. 2004). Doucet et al. untersuchten die in ihrer Studie eingesetzten MSC auf das Vorhandensein von PDGF $\alpha$ - und - $\beta$ , bFGF-, TGF-  $\beta$ II- sowie IGF-Rezeptoren (Doucet et al. 2005). Sie konnten zeigen, dass MSC über diese Rezeptoren verfügen, und somit fähig sind, auch auf die im PRP enthaltenen GF zu reagieren.

Kuznetsov et al. konnten zeigen, dass der Gebrauch neutralisierender Antikörper gegen PDGF, EGF, TGF- $\beta$  und bFGF die Koloniebildung mesenchymaler Stammzellen inhibierte, wobei der größte inhibitorische Effekt mit der Verwendung von anti-PDGF und anti-TGF-Antikörpern erzielt wurde (Kuznetsov et al. 1997). Dies zeigt, dass diese im PRP in großen Mengen vorhandenen Faktoren essentiell für eine erfolgreiche Stammzellisolation und -expansion sind.

Aus diesen Gründen bot sich PRP als Ersatz für das normalerweise dem Zellkulturmedium zugegebene FCS an. Da die Studien von Gruber et al. und Arpornmaeklong et al. einen negativen Einfluss von PRP oder PRS auf die osteogene Differenzierung von MSC *in vitro* postulieren (Arpornmaeklong et al. 2004; Gruber et al. 2004), zielten unsere Untersuchungen unter anderem darauf ab, festzustellen, ob die MSC nach ihrer Vermehrung *in vitro* ihre mesenchymale Plastizität bewahrt hatten, oder ob der Einsatz des PRP ihre Differenzierungsfähigkeit vermindert hatte.

Die in den Thrombozyten enthaltenen Wachstumsfaktoren werden bei deren Aktivierung freigesetzt. Das von uns praktizierte Einfrieren und Auftauen des PRP ist ein anerkanntes Verfahren, um Wachstumsfaktoren aus den Thrombozyten freizusetzen (Weibrich et al. 2003; Pesonen et al. 1989). Wir untersuchten das von uns verwendete PRP auf die Anzahl der enthaltenen Thrombozyten, den Grad ihrer Anreicherung im Vergleich zum Vollblut und seinen Gehalt an PDGF und TGF- $\beta$ . Die ermittelten Werte bewegten sich im Rahmen der in der Literatur von Weibrich et al. und Thorwarth et al. angegebenen Daten (Thorwarth et al. 2006; Weibrich et al. 2003). Unser PRP lag im Hinblick auf seine Thrombozytenzahl etwas über dem Bereich von  $1,0 \times 10^6/\mu\text{l}$ , der für die Induktion einer osteogenen Differenzierung *in vivo* als vorteilhaft angesehen wird (Weibrich et al. 2004). Ein für eine erfolgreiche Steigerung der Zellproliferation optimaler Thrombozytengehalt ist aber bisher noch nicht ermittelt worden.

Bei den von uns in nicht veröffentlichten Vorarbeiten und im Rahmen dieser Studie verwendeten PRP-Pools war in keinem Fall eine Verschlechterung des Zellwachstums erkennbar, was darauf hindeutet, dass hier im Gegensatz zur Verwendung von FCS ein aufwendiges Screening der Chargen im Vorfeld unterbleiben kann. Dies ist auch insofern von Bedeutung, als bei einer klinischen Anwendung das PRP autolog aus dem Blut des Patienten gewonnen werden sollte, um den Einsatz allogenen PRPs zu vermeiden. Eine schlechte Funktionalität des autologen PRPs wäre vor diesem Hintergrund ungünstig.

### **5.1.2.2 Etablierung der Zellkulturen und Zellexpansion**

In unserer Studie wurden MSC-Kulturen von insgesamt neun Patienten in drei unterschiedlichen Ansätzen untersucht, um der Spendervariabilität Rechnung zu tragen. Dennoch zeigten die Zellen der verschiedenen Spender über alle Passagen hinweg große interkulturelle Schwankungen hinsichtlich ihrer Proliferationskapazität. Auch Phinney et al. beobachteten in ihrer Studie zur Zellexpansion und osteogenen Differenzierung der MSC von 17 gesunden Spendern im Alter von 19-45 Jahren eine bis zu 12-fache spenderabhängige Variation der Proliferationsrate in Passage 1. Dabei bestand keine Korrelation zwischen Proliferationsrate und dem Alter oder Geschlecht der Spender (Phinney et al. 1999). Da aber die in unserem Ansatz vorhandene Spenderabhängigkeit der Zellproliferation unabhängig vom verwendeten Kulturmedium war, konnte trotzdem eine verlässliche Analyse der gewonnenen Daten erfolgen.

Auf der Grundlage ihrer Fähigkeit zur Plastikadhärenz konnten aus den Knochenmarkspunktaten aller Spender mesenchymale Stammzellen (MSC) isoliert werden. Die nach der Primärisolation anhaftenden einzelnen Fibroblasten-ähnlichen Zellen bildeten nach einigen Tagen in Kultur makroskopisch sichtbare, dichte Zellkolonien aus. Nach der ersten Passage wuchsen die MSC im Monolayer, der nach einiger Zeit konfluent wurde.

Der Vergleich früher und später Passagen zeigte, dass die FCS-expandierten Zellen im Verlauf der Expansion eine abgeflachte, polygonale Morphologie annahmen und viele Zellfortsätze/Cytoplasma-Ausläufer aufwiesen, während die PRP-expandierten Zellen über alle Passagen hinweg ihre spindelförmige, Fibroblasten-ähnliche Morphologie beibehielten.

Dieser Wandel der Morphologie FCS-expandierter Zellen wird auch durch die Studie von Mareschi et al. bestätigt (Mareschi et al. 2006). Hier wird noch zusätzlich ein mit der veränderten Morphologie einhergehender Rückgang der Zellproliferation festgestellt, den auch wir in späteren Passagen beobachten konnten.

Nach einer Anfangsphase, in der die Proliferation der PRP-expandierten Zellen derjenigen der FCS-expandierten Zellen etwas unterlegen war, setzte ab Passage zwei bei den PRP-expandierten Zellen rasches Wachstum ein, so

dass ihre Proliferationsrate ab Passage vier den FCS-expandierten Zellen signifikant überlegen war. Kuznetsov et al. beobachteten eine beim Einsatz von Humanserum oder Kaninchenserum im Vergleich zum Gebrauch von FCS signifikant verringerte Koloniebildung (Colony forming efficiency, CFE) bei der Isolation der MSC (Kuznetsov et al. 2000). Die Verwendung von PRP könnte einen ähnlichen Effekt hervorgerufen haben, was die anfänglich etwas niedrigeren Zellzahlen erklären würde. Die Arbeitsgruppen von Lucarelli und Gruber, die sich ebenfalls mit der Wirkung von PRP bzw. durch Plättchen freigesetzte Überstände (PRS) auf MSC beschäftigten, verwendeten beide zur Isolation ihrer MSC ein Medium, welches mit 20% FCS supplementiert war, wodurch das oben genannte Problem der verringerten Koloniebildung umgangen wurde (Gruber et al. 2004; Lucarelli et al. 2003). Doucet et al. gaben in ihren Ergebnissen an, dass die CFE der mit Plättchen-Lysaten (Platelet Lysates, PL) expandierten Zellen derjenigen von mit FCS expandierten Zellen nicht unterlegen war. Die genaue Methode der Zellisolation wurde allerdings nicht beschrieben und die Arbeitsgruppe verwendete 5% PL in ihrem Medium, 2% mehr, als von uns eingesetzt wurde (Doucet et al. 2005). Alle drei Arbeitsgruppen berichteten aber ebenfalls über den auch von uns beobachteten proliferationssteigernden Einfluss von PRP bzw. PRS.

Das Erreichen von Passage fünf der Zellexpansion nahm in unserer Studie in beiden Kulturmedien durchschnittlich 26 Tage in Anspruch, wobei in dieser Zeitspanne durch Verwendung des PRP-supplementierten Mediums eine signifikant höhere Zellzahl erreicht werden konnte als bei Verwendung des FCS-supplementierten Mediums. Doucet et al. berichteten in ihrer Studie, dass PRP expandierte Zellen 40 Tage früher in P4 eintraten (Tag 60), als FCS-expandierte Zellen (Tag 100) (Doucet et al. 2005). Dieser Unterschied zu unseren Ergebnissen lässt sich dadurch erklären, dass die Zeitdauer, die zum Erreichen der P4 notwendig war, in unserem Fall ungefähr 20 Tage betrug, und somit 40 bzw. 80 Tage kürzer als die von Doucet et al. (2005) berichtete Zeitspanne war. Zudem beobachteten wir, dass die in PRP-supplementiertem Medium expandierten Zellen ab einer gewissen Passagezahl kleiner waren als die stark abgeflachten FCS-Zellen. Dadurch erreichten sie die Konfluenz fast zeitgleich mit den FCS-Zellen, obwohl zu diesem Zeitpunkt schon wesentlich

mehr Zellen in der Kulturschale der PRP-Zellen enthalten waren. Wodurch dieser große Unterschied hinsichtlich der Dauer der Zellexpansion zustande kommt, ist unklar; er könnte durch die Verwendung eines anderen Zellkulturplastiks oder Basalmediums zu erklären sein, da diese Faktoren laut Sotiropoulou et al. großen Einfluss auf die Isolation und die Wachstumseigenschaften von MSC haben (Sotiropoulou et al. 2006a).

Eine Voraussetzung für eine sichere klinische Anwendung der mit PRP expandierten Zellen ist die Reversibilität der PRP-induzierten Proliferationssteigerung. Wurden die mit PRP-expandierten Zellen in serumfreies Medium verbracht, so ließ sich eine rapide Abnahme der Zellproliferation beobachten. Nach Ablauf einer Passage war bezüglich der Zellzahl kein signifikanter Unterschied mehr zu den mit FCS-Medium expandierten Zellen zu erkennen. Dies beweist, dass die PRP-induzierte Steigerung der Proliferationsrate reversibel ist. Die Studie von Lucarelli et al. bestätigt diese Beobachtung (Lucarelli et al. 2003).

Rubio et al. zeigten in ihrer Studie, dass sich MSC nach einer Langzeit-*in vitro*-Kultur von 4-5 Monaten spontan transformierten, die Seneszenz-Phase überwandten und in einen im Vergleich mit den vor-seneszenten Zellen beschleunigten Zellzyklus eintraten (Rubio et al. 2005). Immortalität und unkontrolliertes Wachstum sind Charakteristika, die auch von Tumorzellen bekannt sind. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass adulte Stammzellen sehr widerstandsfähig gegen eine Transformation sind (Feroni et al. 2007; Bernardo et al. 2007). Die Ergebnisse von Rubio et al. (2005) betonen dennoch die Bedeutung einer möglichst kurzen Zeitdauer der *in vitro*-Kultur. Das von uns verwendete Protokoll zur Zellexpansion trägt folglich durch die Verkürzung der Expansionsdauer zusätzlich zur Sicherheit Stammzell-basierter Therapien bei. Dem Wissen unserer Arbeitsgruppe nach sind wir die ersten, die MSC unter Verwendung eines PRP-supplementierten Mediums in einem strikt humanen Setting isoliert, expandiert und auf ihre Differenzierungsfähigkeit hin untersucht haben. Lucarelli und seine Arbeitsgruppe (2003) konnten durch den Zusatz von 10% Platelet-Gel (PG) zu einem  $\alpha$ -MEM und 20% FCS enthaltenden Medium eine dosisabhängige Proliferation von MSC induzieren. Mit 1% Platelet-Gel konnte hingegen kein signifikanter Anstieg der Zellproliferation erzielt werden.

Sie zeigten auch, dass der Zusatz von FCS für die Induktion der Zellproliferation nicht notwendig ist. Sie verwendeten jedoch in jedem Fall während der Zellisolation FCS-supplementiertes Medium (Lucarelli et al. 2003). Die Arbeitsgruppe von Gruber et al. verwendete PRS (durch Plättchen freigesetzte Überstände) in verschiedenen Konzentrationen in ihrem Zellexpansionsmedium, das Medium enthielt aber während der Dauer der Zellexpansion bis kurz vor Beginn der Versuche 20% FCS (Gruber et al. 2004). Doucet et al. (2005) verwendeten 5% PL.

Unsere Arbeitsgruppe war in der Lage, die für die Induktion der Zellproliferation notwendige Menge an PRP auf 3% zu senken. Wir modifizierten hierzu ein von Reyes et al. beschriebenes MSC Expansionsmedium (Reyes et al. 2001).

Der reduzierte Gehalt an PRP im Expansionsmedium ist von Vorteil für den betroffenen Patienten, da für die Gewinnung von 1 ml PRP ca. 6 ml Vollblut notwendig sind. Um beispielsweise  $30 \times 10^6$  MSC zu produzieren, sind ungefähr 800 ml Zellexpansionsmedium, die 3% PRP enthalten, notwendig. Dies entspricht einer Vollblutmenge des Patienten von 144 ml.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die Verwendung des neuen, PRP enthaltenden Zellkulturmediums in der gleichen Zeitspanne eine signifikant höhere Anzahl mesenchymaler Stammzellen gewonnen werden konnte, als durch die Verwendung von FCS-supplementiertem Medium.

### **5.1.2.3 Zelldifferenzierung**

Für eine erfolgreiche Verwendung der MSC im Knochen-Tissue Engineering ist es von herausragender Bedeutung, dass sie ihre Differenzierungskapazität, speziell in die osteogene Richtung des mesenchymalen Gewebes, beibehalten. Die Ergebnisse der osteogenen Differenzierung zeigten, dass das verwendete Kulturmedium keinen Einfluss auf die ALP-Aktivität der MSC hatte. Die ALP-Aktivität stieg zu Beginn der osteogenen Differenzierung signifikant an und zeigte zum Schluss einen leichten Rückgang, was sich durch einen Verlust an vitalen Zellen (Zelltod durch fortschreitende Kalzifizierung) erklären lässt. Die bei der Alizarinrot-S Quantifizierung beobachtete, geringere Kalzifizierung der mit PRP expandierten Zellen an Tag 14 der osteogenen Induktion lässt auf eine etwas stärkere osteogene Differenzierung der mit FCS expandierten Zellen schließen. Insgesamt aber blieb die Fähigkeit zur osteogenen Differenzierung in

beiden Fällen erhalten. Auch Doucet et al. differenzierten in PRP- oder FCS-supplementiertem Medium expandierte MSC in die osteogene Richtung des mesenchymalen Gewebes, ohne einen signifikanten Unterschied festzustellen (Doucet et al. 2005).

Lucarelli et al. konnten in ihrer Studie gleichfalls eine osteogene Differenzierung der mit Platelet-Gel expandierten Zellen zeigen. Sie verwendeten aber ausschließlich solche Zellen für ihren Differenzierungsversuch, die zuvor in einem Medium mit 20% FCS und 10% PG kultiviert worden waren (Lucarelli et al. 2003). Eine Aussage über den genauen Effekt des PGs wird damit maskiert. Andere *in vitro* Studien (Arpornmaeklong et al. 2004; Gruber et al. 2004) haben gezeigt, dass sich PRP auf die osteogene Differenzierung hemmend auswirkt. Arpornmaeklong et al. stellten fest, dass sowohl die ALP-Aktivität als auch die Kalziumablagerung in ihrem Modell zur 3D-Kultur von MSC durch den Einsatz von PRP vermindert wurden (Arpornmaeklong et al. 2004). Gruber et al. berichteten von einer durch die höchste verwendete Konzentration des PRS ( $2 \times 10^8$  Thrombozyten/ml) hervorgerufenen Depression der osteogenen Differenzierung der MSC (ALP-Aktivität). Der Zusatz eines gegen PDGF gerichteten Antikörpers neutralisierte diesen Effekt partiell, so dass die Arbeitsgruppe vermutete, dass PDGF zwar eine Proliferationssteigerung der MSC bewirkte, diese aber gleichzeitig in einem undifferenzierten Stadium hielt (Gruber et al. 2004). Die während der Expansionsphase konstante, für undifferenzierte Zellen charakteristische Fibroblasten-ähnliche Morphologie unserer mit PRP expandierten Zellen untermauert diese Theorie. Nach unseren Daten bleibt der Effekt von PRP auf die osteogene Differenzierung von MSC aber widersprüchlich; denn während sich die ALP-Aktivität PRP-expandierter Zellen nicht von jener der FCS-expandierten Zellen unterschied, erwies sich ihre Kalzifizierung *in vitro* am Tag 14 der osteogenen Induktion als unterlegen. Andererseits erhielten wir in unserem nachfolgend dargestellten *in vivo* Versuch eine den im FCS-Medium expandierten Zellen ebenbürtige Knochenneubildung. PRP- und FCS-expandierte Zellen besaßen die Fähigkeit zur chondrogenen Differenzierung und zeigten in dieser Hinsicht keine Unterschiede. Die über vier Wochen chondrogen induzierten Zellpellets wiesen in der histologischen Untersuchung eine deutliche chondrogene Morphologie und Metachromasie auf

und waren in der Immunhistologie deutlich positiv für Kollagen Typ-II. Auch hinsichtlich der adipogenen Differenzierung wiesen die Zellen keine Unterschiede auf. Doucet et al. kommen in ihrer Studie zum gleichen Ergebnis (Doucet et al. 2005). Ansonsten wurden unseres Wissens bislang noch durch keine Arbeitsgruppe Ergebnisse einer erfolgreichen adipogenen oder chondrogenen Differenzierung PRP-expandierter Zellen veröffentlicht.

Unsere Ergebnisse sind von großer Wichtigkeit, da sie die Möglichkeit einer weitverbreiteten Anwendung zellbasierter Therapien eröffnen. Unser neuartiges Medium erlaubt eine sichere und rasche Expansion der Zellen unter Beibehaltung ihrer Differenzierungsfähigkeit, während es die Exposition des Patienten mit allogenen oder xenogenem Serum sowie das Risiko immunologischer Reaktionen verhindert. Dadurch kann eine erhöhte Sicherheit zelltherapeutischer Anwendungen gewährleistet werden. Zudem wird durch die kürzere Dauer der Zellexpansion die Zeitspanne bis zur Implantation reduziert und eine Kostenersparnis erreicht. Das von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Zellexpansionsmedium enthält den geringsten Anteil an PRP von allen bisher veröffentlichten Medien, was den klinischen Einsatz erleichtert und die Akzeptanz des Verfahrens erhöht, da dem Patienten weniger Blut zur Herstellung des PRP entnommen werden muss.

## ***5.2 In vivo-Versuch zur Knochenneubildung in der SCID-Maus***

### **5.2.1. Tiermodell und Operationsmodell**

Um die Eigenschaften eines Materials hinsichtlich seiner Fähigkeit zur Unterstützung der Knochenbildung zu evaluieren, können zwei verschiedene Wege eingeschlagen werden:

Zum Ersten besteht die Möglichkeit der Transplantation des Materials an eine orthotope Stelle, meist in einen osteotomierten Röhrenknochen, zum Zweiten kann das Material an eine ektote Stelle eingebracht werden. Speziell bei kleinen Tieren ist die orthotope Transplantation technisch anspruchsvoll. Um statistisch relevante Ergebnisse zu erhalten, müssen viele Tiere operiert werden. Zudem erschwert das Vorhandensein des tierischen Knochens an der Implantationsstelle zum Teil die spätere Analyse des Materials.

Wir verwendeten ein 1991 durch Goshima et al. entwickeltes Modell zur subkutanen Implantation von Biomaterial-Zell-Konstrukten (Goshima 1991; Goshima et al. 1991a; Goshima et al. 1991b; Goshima et al. 1991c). Dieses Modell kam in anderen Studien mit ähnlichen Fragestellungen bereits zum Einsatz (Krebsbach et al. 1997; Haynesworth et al. 1992; Dennis et al. 1998). Es stellt einen sensitiven *in vivo* Assay für eine ektopische Knochenbildung dar (Haynesworth et al. 1992) und ermöglicht gleichzeitig die quantitative und qualitative Untersuchung verschiedener Arten von Trägermaterialien auf ihre Eigenschaften zur Knochenneubildung (Krebsbach et al. 1997).

Je nach Tierart können auch mehrere Implantate pro Tier eingesetzt werden. Die Gesamtzahl der für einen Versuch benötigten Tiere lässt sich hierdurch stark vermindern. Für unsere Studie wurden adulte, männliche SCID Mäuse ausgewählt. Geschlechtsspezifische Unterschiede im Stoffwechsel sowie eine generell erhöhte Stoffwechselrate bei Jungtieren waren als mögliche Fehlerquelle somit ausgeschlossen. Die von uns verwendeten humanen mesenchymalen Stammzellen ließen sich in diesem Modell aufgrund der schweren kombinierten Immundefizienz der Tiere ohne die Gefahr von Abstoßungsreaktionen untersuchen. Durch die am Implantationsort bestehenden, nicht-lasttragenden Bedingungen war die Untersuchung der Knochenersatzstoffe ohne den Einfluß einwirkender Kräfte möglich. Ein Nachteil dieses Modells ist es, dass mit der subkutanen Lokalisation der Implantate eine Stelle gewählt wird, an der physiologischerweise keine Knochenbildung stattfindet. Ist allerdings ein Implantat unter diesen erschwerten Bedingungen bereits zur Knochenneubildung fähig, so kann davon ausgegangen werden, dass dies auch an einer orthotopen Stelle möglich ist.

### **5.2.2 Mesenchymale Stammzellen**

Wir haben uns aus zwei Gründen für die Verwendung humaner Zellen entschieden: Die Anwendung von Knochenersatzstoffen im Knochen Tissue Engineering erfolgt zur Zeit hauptsächlich am Menschen, so dass es nahe liegend war, die beiden ausgewählten Keramiken CDHA und  $\beta$ -TCP zunächst mit humanen MSC zu testen. Zweitens konnte im Anschluss an die subkutane Implantation durch die Anwendung einer *in situ* Hybridisierung genau zwischen

dem von den implantierten Zellen gebildeten Gewebe und dem Empfängergewebe differenziert werden. Dies ist wichtig, um die Eigenschaften der verwendeten Zellen genau untersuchen und beurteilen zu können.

Bei der *in situ* Hybridisierung handelt es sich um ein Verfahren, welches den Nachweis spezifischer Nukleinsäuren am Gewebeschnitt erlaubt. Die Bereiche mit einer positiven Reaktion können in Bezug zur Gewebemorphologie gesetzt werden. Die Unterscheidung von durch humane Zellen gebildetem Gewebe und Mausgewebe wird hierdurch möglich.

### **5.2.3 Form und Besiedelung der Keramiken**

Der neuartige Knochenersatzstoff CDHA wurde von uns aufgrund seiner vielversprechenden Eigenschaften ausgewählt: Er verfügt über eine sehr große spezifische Oberfläche, eine günstige Porenstruktur, ist biokompatibel und gut resorbierbar. Ein vorangegangener *in vitro*-Versuch unserer Arbeitsgruppe zeigte, dass sich CDHA im Gegensatz zu  $\beta$ -TCP sehr gut mit MSC besiedeln lässt (Kasten et al. 2003). Diese Feststellung wurde in dieser Studie bestätigt und erklärt sich möglicherweise durch die hydrophilen Eigenschaften des CDHA, die ein Durchdringen der Matrix mit dem Kulturmedium, in welchem die Zellen resuspendiert worden waren, stark erleichterten. CDHA und  $\beta$ -TCP ermöglichten zudem beide die Adhäsion und Proliferation von MSC (Kasten et al. 2003). Der Nachteil von CDHA ist seine Brüchigkeit.

$\beta$ -TCP wurde ausgewählt, da es schon früher alleine oder in Kombination mit HA erfolgreich in ähnlich angelegten Studien zur ektopen Knochenbildung eingesetzt wurde (Dennis et al. 1992; Ohgushi et al. 1990). Es diente uns somit als eine Positiv-Kontrolle. Es wird bereits klinisch eingesetzt und eignet sich somit gut als funktionelles Referenzmaterial. Auch  $\beta$ -TCP ist gut biokompatibel, resorbierbar und hat eine ähnliche Porenstruktur wie CDHA. Ein Nachteil des  $\beta$ -TCP ist seine geringe spezifische Oberfläche. Zudem ist es hydrophob und lässt sich somit schlechter mit Zellen besiedeln als CDHA, da die Zellsuspension nicht leicht in die Matrix eindringen kann.

Bei der Resorption keramischer Knochenersatzstoffe entstehen keine toxischen Abbauprodukte. Im Gegensatz zu demineralisierter Knochenmatrix (DBM) sind sie nicht allogenen oder xenogenen Ursprungs.

Beide Materialien erfüllen viele Kriterien eines „idealen Knochenersatzstoffes“ (Caplan 1990): Das Material soll den Defekt vollständig ausfüllen können, um auszuschließen, dass umgebendes Weichgewebe vorfällt und die Reparatur stört, das Material soll den Zelltransport zulassen, muss also Poren gewisser Größe aufweisen, es muss die Bildung von Blutgefäßen ermöglichen, da eine mangelnde Vaskularisierung zur Knorpel- und nicht zur Knochenbildung führt, es soll biokompatibel sein und nicht immunogen wirken, es soll eine Verbindung mit dem Wirtsgewebe und neuen Zellen eingehen können und es soll osteokonduktiv, osteoinduktiv und resorbierbar sein.

#### **5.2.4 Knochenneubildung in vivo**

Sowohl eine ausreichende Menge funktioneller Stammzellen als auch ein möglichst ideales Trägermaterial in Form eines Knochenersatzstoffes sind für den Erfolg des Knochen-Tissue-Engineering unabdingbar.

In dieser Studie wurden das neuartige CDHA und das klinisch schon verwendete  $\beta$ -TCP mit den PRP- bzw. FCS-expandierten MSC kombiniert und in einem ektopen Implantationsmodell in der SCID Maus untersucht. Unbesiedelte Keramiken dienten als Negativkontrolle. Nach acht Wochen wurden die Konstrukte explantiert und histologisch untersucht.

42 von 48 MSC-besiedelten Implantaten wiesen eine unterschiedlich stark ausgeprägte Knochenneubildung auf. Wie auch durch Goshima et al. und Krebsbach et al. beobachtet, erfolgte die Knochenneubildung hauptsächlich an den Wänden der Poren (Goshima et al. 1991b; Krebsbach et al. 1997). Die innere Oberfläche des neugebildeten Knochens wurde durch Osteoblasten gesäumt und in seiner Cortikalis-ähnlichen Matrix waren Osteozyten eingebettet. Das als Knochen klassifizierte Gewebe zeigte deutlich die Morphologie von echtem Knochen und färbte sich in allen Fällen mit Alizarinrot-S positiv an. Zum Teil war sogar ein Ansatz zur Bildung einer Markhöhle zu erkennen, in welcher Gefäße in lockeres Bindegewebe eingebettet waren.

Die Auswertung der Ergebnisse der Quantifizierung des neugebildeten Knochens in der Histologie ergab eine signifikante Überlegenheit des neu entwickelten Knochenersatzstoffs CDHA gegenüber  $\beta$ -TCP. Die MSC beider Kultivierungsmethoden zeigten auf CDHA eine signifikant bessere

Knochenneubildung als auf  $\beta$ -TCP. Eine Erklärung hierfür könnte die deutlich größere spezifische Oberfläche des CDHA in Verbindung mit seinen guten Besiedelungseigenschaften sein, durch welche die Zelladhäsion gefördert wird. Die Brüchigkeit des CDHA und (in etwas geringerem Maße) des  $\beta$ -TCP stellt, da bei langstreckigen Knochendefekten ohnehin eine stabile Fixation notwendig ist, kein großes Problem dar. Zudem ist zu bedenken, dass auch der als Goldstandard verwendete, autogene spongiöse Knochen keine lasttragenden Eigenschaften besitzt.

Die Kontroll-Keramiken, die nicht mit MSC besiedelt wurden, zeigten in keinem Fall eine Knochenneubildung, was den Beobachtungen von Ohgushi et al. und Krebsbach et al. in ihren Studien zur ektopen Knochenbildung nach subkutaner Implantation von Biomaterial-Zell-Konstrukten in die Ratte bzw. in die Maus entspricht (Krebsbach et al. 1997; Ohgushi et al. 1990). Hier war stets nur wenig, in die Poren der Keramik eingewachsenenes lockeres Bindegewebe zu erkennen. Der neu gebildete Knochen fand sich auch in der Mitte der Implantate, was darauf schließen lässt, dass die MSC beim oder nach dem Besiedelungsprozess auch in tiefere Schichten der Keramik gelangen konnten. Mittels einer *in situ* Hybridisierung konnte nachgewiesen werden, dass auch nach acht Wochen subkutaner Implantation noch sehr viele humane MSC in der Matrix vorhanden waren. Osteoblasten und Osteozyten waren humanen Ursprungs, während das lockere Bindegewebe und die gebildeten Gefäße murinen Ursprungs waren. Goshima et al. beschäftigten sich in einer Studie mit der Herkunft des ektop gebildeten Knochens und kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass Spenderzellen für die Knochenneubildung verantwortlich sind. Nach acht bis zwölf Wochen, in der Spätphase der Implantation, konnten sie allerdings auch eine Beteiligung von Empfängerzellen an der Knochenneubildung nachweisen (Goshima et al. 1991b). Dieses Ergebnis stellt aber keinen Widerspruch zu unseren Beobachtungen dar, da in unserem Fall die Explantation und Untersuchung der Konstrukte schon nach acht Wochen erfolgte.

Die mit PRP expandierten Zellen wiesen hinsichtlich der Knochenneubildung *in vivo* keinen Unterschied zu den mit FCS expandierten Zellen auf. Obwohl also die PRP-expandierten MSC im *in vitro*-Versuch zur osteogenen Differenzierung

an Tag 14 eine etwas schwächere Kalzifizierung gezeigt hatten, als die mit FCS expandierten Zellen, waren sie zu einer ebenso guten Knochenneubildung *in vivo* fähig. Dies weist darauf hin, dass die Fähigkeit der Zellen zur osteogenen Differenzierung *in vitro* keinen prädiktiven Wert als Marker für eine Knochenneubildung *in vivo* besitzt. Dies wird auch durch die Feststellungen von Cassiede et al. untermauert, die den Einfluss von PDGF-BB und TGF- $\beta$ 1 auf MSC *in vitro* und *in vivo* untersuchten. Sie stellten unter anderem fest, dass die Ermittlung der ALP-Aktivität präkonfluenter MSC keine Schlussfolgerung auf die Knochenneubildung der Zellen *in vivo* zulässt, da die ALP-Aktivität der MSC zwar durch beide Wachstumsfaktoren vermindert wurde, aber diese Zellen in der Folge trotzdem in der Lage waren, *in vivo* Knochen zu bilden (Cassiede et al. 1996). Eine Erklärung hierfür könnte die Tatsache darstellen, dass die Biomaterial-Zell-Konstrukte durch die Implantation in ein vaskularisiertes Umfeld verbracht werden, an dem eine Reihe von Wachstumsfaktoren vorkommen, die *in vitro* nicht verfügbar sind. Umgekehrt berichteten Mendes et al. in ihrer Studie davon, dass trotz des *in vitro* bestätigten osteogenen Potentials ihrer MSC einige der Zelllinien nicht in der Lage waren, *in vivo* Knochen zu bilden (Mendes et al. 2004).

Es ist nachgewiesen, dass durch die Beschichtung von Keramiken mit Fibronectin deren Fähigkeiten zur Knochenneubildung gesteigert wird. Dennis et al. konnten in einer Studie zeigen, dass durch eine Beschichtung der Keramiken mit Fibronectin ungefähr die doppelte Menge an Stammzellen auf den Keramiken verblieb, als wenn diese unbehandelt blieben (Dennis et al. 1992). Zusätzlich verkürzte sich die Zeit, zu der *in vivo* erstmals eine Knochenneubildung stattfand, signifikant durch eine solche Vorbehandlung der Keramik. Da die Verwendung von Fibronectin zusätzliche Kosten verursacht, sollte Humanserum als eine mögliche Alternative untersucht werden. In unserer Pilotstudie (Vogel et al. 2006) zeigte sich die Fibronectin-Beschichtung der Humanserum-Beschichtung im Hinblick auf die ektopische Knochenbildung signifikant überlegen. Dies konnte in der vorliegenden Studie nicht nachvollzogen werden. Der Grund hierfür könnte die große Variabilität der eingesetzten Humanserum-Chargen sein, die in dieser Studie eine im Vergleich zur Pilotstudie bessere Performance der HS-Beschichtung ermöglichte.

Dennoch hat sich in diesem Versuch erneut gezeigt, dass Fibronectin große Vorteile hinsichtlich der Vorbereitung und Handhabung besitzt. Es hat eine einheitliche Qualität und enthält keine Wachstumsfaktoren, die chargenweise variieren könnten. In humanem Serum sind zudem möglicherweise Inhibitoren der Osteogenese vorhanden (Kuznetsov et al. 2000). Daher ist das Fibronectin dem Humanserum als Beschichtungsmaterial der Keramiken im Knochen Tissue Engineering vorzuziehen.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass die mit PRP expandierten Zellen nach ektopter Implantation der Biokomposite *in vivo* Knochen neu bilden konnten und in dieser Hinsicht den mit FCS expandierten Zellen nicht unterlegen waren. Der neu gebildete Knochen stammte von den humanen Zellen. Die neuartige Keramik CDHA zeigte in dieser Studie eine signifikant bessere Knochenbildung als die Keramik  $\beta$ -TCP und scheint somit die bessere Wahl als Knochenersatzstoff zu sein. Dies wird durch die Beobachtungen in unseren früheren Studien untermauert. Eine Beschichtung des CDHA mit Fibronectin erscheint aus praktischen Gründen am sinnvollsten.

Bisher hat noch keine Arbeitsgruppe die in PRP-supplementiertem Medium expandierten MSC *in vivo* auf ihre Fähigkeit zur Knochenbildung getestet. Auch der neuartige Knochenersatzstoff CDHA wurde bislang noch nicht *in vivo* in einem Modell zur Knochenbildung nach subkutaner Implantation in die SCID-Maus untersucht.

Durch unsere Ergebnisse wird die Möglichkeit einer weitverbreiteten Anwendung zellbasierter Therapien ein Stück realistischer. Da unser Medium eine rasche Expansion der Zellen unter Beibehaltung ihrer Differenzierungsfähigkeit *in vitro* und *in vivo* erlaubt, während es andererseits die Exposition des Patienten mit allogenen oder xenogenem Serum sowie das Risiko immunologischer Reaktionen verhindert, kann eine erhöhte Sicherheit zelltherapeutischer Anwendungen gewährleistet werden. Zudem wird durch die kürzere Dauer der Zellexpansion eine Kostenersparnis erreicht.

Da das von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Zellexpansionsmedium nur 3% PRP enthält, wird der klinische Einsatz erleichtert und die Akzeptanz des Verfahrens erhöht, weil dem Patienten weniger Blut zur Herstellung des PRP entnommen werden muss. PRP konnte bereits aus dem Blut einiger Tierarten

hergestellt werden, und die bisherigen Erfahrungen lassen vermuten, dass auch MSC aus dem Knochenmark der meisten Tierarten isolierbar sind. Die Vorteile des neu entwickelten Zellexpansionsmediums lassen sich also auch in der Veterinärmedizin nutzen.

Der ideale Knochenersatzstoff wurde bisher noch nicht gefunden. CDHA zeigte sich in dieser Studie dem etablierten Knochenersatzstoff  $\beta$ -TCP signifikant überlegen und kann somit als vielversprechende Alternative zu den bisherigen Materialien angesehen werden. Neue Studien unserer Arbeitsgruppe, die den Einsatz von CDHA in einem orthotopen Defektmodell am Radius des Kaninchens untersuchen, sind ein weiterer Schritt auf dem Weg zur klinischen Anwendung des CDHA.

Mit fortschreitenden Kenntnissen wird immer deutlicher, dass ein Faktor alleine, sei es ein bestimmter Knochenersatzstoff, Zellen oder ein Wachstumsfaktor, die Knochenheilung nicht suffizient stimulieren kann. Erst das Zusammenwirken vieler Faktoren führt zum gewünschten Erfolg. Es ist hierbei wichtig, die natürlichen Bedingungen zu berücksichtigen, unter denen Zellen in das jeweilige Zielgewebe differenzieren.

Das Knochen Tissue Engineering ist von seinem Ansatz her eine Kombination verschiedener, die Knochenheilung fördernder Faktoren. Für den Erfolg des Tissue Engineering sind die Ergebnisse vieler Forschungsgebiete relevant. Bezüglich des Verständnisses der Zellproliferation- und -differenzierung ist das Gebiet der Zellbiologie von Bedeutung. Das Gebiet der Biomaterialforschung soll die alleine oder in Kombination mit Zellen oder Wachstumsfaktoren verwendbaren Trägermaterialien liefern. Den gefahrlosen Einsatz genveränderter oder transfizierter Zellen soll das Feld der Molekulargenetik ermöglichen. Die im Moment angewendeten Methoden der Transplantation und Geweberegeneration gehören zu den teuersten Therapien überhaupt. Das Tissue Engineering bietet die Möglichkeit großer zukünftiger Kostenersparnisse, indem es Transplantate zur Verfügung stellt, die billiger sind als Spenderorgane. Die durch TE gewonnenen Gewebe und Organe stehen in unbegrenzter Menge zur Verfügung, dadurch besteht die Möglichkeit, den Patienten zu helfen, bevor die Krankheit ein kritisches Stadium erreicht hat. Auch eventuelle Abstoßungsreaktionen können durch die Verwendung

autologer MSC vermieden werden (Langer und Vacanti 1993). Auch wenn die Anwendung der neuen Techniken zunächst kostenintensiv erscheint, wird doch die Vermeidung von Zweiteingriffen durch eine bessere Heilung zu einer Senkung der Kosten für das Gesundheitswesen insgesamt beitragen (Puelo 2003). In der Veterinärmedizin werden das Tissue Engineering und die Stammzelltherapie aus Kostengründen noch sehr selten angewendet. Gerade beim Tier ist es wichtig, nach erfolgter Fraktur die Mobilität schnell wieder herzustellen, da die Möglichkeit zur Bewegungseinschränkung nur sehr begrenzt gegeben ist.

Schon jetzt lassen verschiedene Studien erkennen, dass eine erfolgreiche Anwendung der neuen Techniken auch am Tier möglich ist (Hauschild et al. 2005; Brehm 2007). Auch vielfältige experimentelle Tierstudien machen dies deutlich. Es ist anzunehmen, dass sich mit zunehmender Verbreitung der neuen Techniken in der Humanmedizin die Möglichkeiten noch erweitern und die Kosten sinken werden, so dass in der Folge auch in der Veterinärmedizin ein breiteres Anwendungsfeld erschlossen werden könnte.

## 6. Zusammenfassung

Die Rekonstruktion langstreckiger Knochendefekte gehört in der Orthopädie und Unfallchirurgie zu den schwierigsten Aufgaben. Nach wie vor ist die Verwendung von autologem Knochen als der Goldstandard in der Therapie solcher Defekte anzusehen. In letzter Zeit haben auch Techniken des so genannten Knochen Tissue Engineering an Bedeutung gewonnen, bei denen Knochenersatzmaterialien, Zellen und Wachstumsfaktoren kombiniert werden, um eine Heilung zu erzielen. Für eine sichere und erfolgreiche Anwendung stammzellbasierter Techniken ist es essentiell, dass die notwendigen Zellzahlen in möglichst kurzer Zeit zur Verfügung stehen, dass ihre Funktionalität für den gewünschten Zweck erhalten bleibt und dass bei ihrer Vermehrung auf den Einsatz tierischen Serums (FCS) verzichtet wird, da mit seinem Gebrauch verschiedene Risiken wie Immunreaktionen oder die Übertragung von Prionen verbunden sind.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Gebrauch von plättchenreichem Plasma (PRP) als ein Ersatz für FCS in einem Expansionsmedium für mesenchymale Stammzellen (MSC) untersucht.

Unsere Hypothese war, dass eine entsprechende PRP-Konzentration FCS vollwertig ersetzen kann und spenderunabhängig eine gleiche oder sogar größere Menge undifferenzierter MSC hervorbringen kann. Wir untersuchten, ob PRP-expandierte MSC ihre Fähigkeit, osteogen, chondrogen und adipogen zu differenzieren, behalten würden und ob sie unter definierten Bedingungen *in vivo* zur Knochenneubildung fähig wären.

Durch den Einsatz von PRP an Stelle von FCS wurde die Expansion der MSC *in vitro* verbessert, während ihre Fähigkeit zur Differenzierung in die drei untersuchten Richtungen des mesenchymalen Gewebes *in vitro* und zur Knochenbildung *in vivo* erhalten blieben. Die Risiken, die mit dem Gebrauch xenogener Zusätze verbunden sind, können so vermieden werden. Diese Technik ist an einen rein autologen Gebrauch adaptierbar.

Somit ist mit unserem neuen Expansionsmedium der Einsatz von MSC in der Zelltherapie von Gewebedefekten auch beim Menschen ein Stück realistischer geworden.

Unseres Wissens ist dies auch die erste Studie, die die Knochenneubildung von humanen MSC auf der neuartigen Keramik CDHA, die eine große spezifische Oberfläche besitzt, untersucht. Es zeigten sich gleichwertige oder sogar bessere Eigenschaften als bei der im Vergleich untersuchten Keramik  $\beta$ -TCP. Somit scheint CDHA ein vielversprechender Trägerstoff für die stammzellbasierte Knochenregeneration zu sein.

Eine Beschichtung von Keramiken mit dem Ziel, die Stammzellanheftung zu erhöhen, sollte aufgrund der einfacheren Handhabung und Standardisierung von Prozessen mit Fibronectin durchgeführt werden.

## 7. Summary

The reconstruction of long defects in bones is one of the most challenging tasks in orthopaedic medicine. The gold standard in the treatment of those defects is still the use of autologous bone. Recently, the so called bone tissue engineering has offered an alternative. Here, bone substitution materials, cells and growth factors are combined to achieve bone healing. For the safe and effectual use of stem cell based therapies it is crucial that the needed cell numbers can be obtained in a relatively short time, that the cells remain functional for the desired purpose and that the application of FCS during their expansion is avoided due to the risks (e.g. immunological reactions or prion transmission) that are connected with it.

In this study, we investigated the use of platelet-rich plasma (PRP) as a substitute for FCS in an expansion medium for mesenchymal stem cells (MSC). Our hypothesis was, that a suitable concentration of PRP could fully replace FCS and would provide a similar or even superior yield of undifferentiated cells in a donor independent manner. We examined whether PRP-expanded MSC would keep their ability to differentiate into the osteogenic, chondrogenic and adipogenic lineages *in vitro* and whether they would retain their ability to form bone under defined conditions *in vivo*.

By replacing FCS with PRP, better cell expansion could be attained while the cells could still differentiate into the three tested lineages of the mesenchymal tissues and kept their ability to form bone *in vivo*. The risks inherent in the use of xenogenic media supplements can thereby be eliminated. The setting is adaptable to autologous use.

Our new medium for cell expansion has thus succeeded to make cell therapy of tissue injuries in humans a bit more realistic.

Additionally, this is to our knowledge the first study in which human MSC were evaluated on the new ceramic high surface ceramic CDHA for their ability to form bone *in vivo*. The properties shown by CDHA were better than those seen with  $\beta$ -TCP which was used for comparison. Consequently, CDHA seems to be a promising bone substitution material for MSC-based bone regeneration therapy.

Coating of ceramics with the objective to enhance the adhesion of MSC should be conducted with fibronectin, because of its easier handling and in favour of obtaining a more standardized process.

## Literaturverzeichnis

AAOS. Reaping nature's own solutions to heal broken bones. *News Release by the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2004; **3.10.2004**.

Aho, A. J., Ekfors, T., Dean, P. B., Aro, H. T., Ahonen, A., und Nikkanen, V. Incorporation and clinical results of large allografts of the extremities and pelvis. *Clin Orthop.* 1994; **307**: 200- 213.

Albee, F. H. und Morrison, H. F. Studies in bone growth. *Ann Surg.* 1920; **71**: 32- 38.

Allen, T. D., Dexter, T. M., und Simmons, P. J. Marrow biology and stem cells. *Immunol.Ser.* 1990; **49**: 1- 38.

Anderson, J. M. The future of biomedical materials. *Hench Symposium* 2005.

Anson, L. W. Malunions. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1991; **21**: 761- 780.

Application Notes. Quantitation of DNA using Hoechst 33258. 21-2-2001.

Aranguren, X. L., Luttun, A., Clavel, C., Moreno, C., Abizanda, G., Barajas, M. A., Pelacho, B., Uriz, M., Arana, M., Echavarri, A., Soriano, M., Andreu, E. J., Merino, J., Garcia-Verdugo, J. M., Verfaillie, C. M., und Prosper, F. In vitro and in vivo arterial differentiation of human multipotent adult progenitor cells. *Blood* 15-3-2007; **109**: 2634- 2642.

Arinzech, T. L., Peter, S. J., Archambault, M. P., van den Bos, C., Gordon, S., Kraus, K., Smith, A., und Kadiyala, S. Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am.* 1-1-2003; **85**: 1927- 1935.

Arpornmaeklong, P., Kochel, M., Depprich, R., Kubler, N. R., und Wurzler, K. K. Influence of platelet-rich plasma (PRP) on osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells. An in vitro study. *Int.J Oral Maxillofac.Surg* 2004; **33**: 60-70.

Asher, D. M. Bovine sera used in the manufacture of biologicals: current concerns and policies of the U.S. Food and Drug Administration regarding the transmissible spongiform encephalopathies. *Dev Biol Stand.* 1999; **99**: 41- 44.

Awad, H. A., Butler, D. L., Boivin, G. P., Smith, F. N., Malaviya, P., Huibregtse, B., und Caplan, A. I. Autologous mesenchymal stem cell-mediated repair of tendon. *Tissue Eng* 1999; **5**: 267- 277.

Banfi, A., Muraglia, A., Dozin, B., Mastrogiacomo, M., Cancedda, R., und Quarto, R. Proliferation kinetics and differentiation potential of ex vivo expanded human bone marrow stromal cells: Implications for their use in cell therapy. *Exp Hematol.* 2000; **28**: 707- 715.

Bernardo, M. E., Avanzini, M. A., Perotti, C., Cometa, A. M., Moretta, A., Lenta, E., Del Fante, C., Novara, F., de Silvestri, A., Amendola, G., Zuffardi, O., Maccario, R., und Locatelli, F. Optimization of in vitro expansion of human multipotent mesenchymal stromal cells for cell-therapy approaches: further insights in the search for a fetal calf serum substitute. *J Cell Physiol.* 2007; **211**: 121- 130.

Birnbaum, R. S., Bowsher, R. R., und Wiren, K. M. Changes in IGF-I and -II expression and secretion during the proliferation and differentiation of normal rat osteoblasts. *J Endocrinol.* 1995; **144**: 251- 259.

Bohner, M. Physical and chemical aspects of calcium phosphates used in spinal surgery. *Eur Spine J* 2001a; **10**: 114- 121.

Bohner, M und Baumgart, F. Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes. *Biomaterials* 2004; **25**: 3569- 3582.

Bohner, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury* 2000; **31 Suppl 4**: 37- 47.

Bohner, M. Calcium phosphate emulsions: Possible applications. *Key Eng Mater* 2001b; **192-195**: 765- 768.

Boiret, N., Rapatel, C., Veyrat-Masson R., Guillouard, L., Guerin, J. J., Pigeon P., Descamps, S., Boisgard, S., und Berger, M. G. Characterization of nonexpanded mesenchymal progenitor cells from normal adult human bone marrow. *Exp Hematol.* 2005; **33**: 219- 225.

Bonath, K. H. und Prieur, W. D. Kleintierkrankheiten. Band 3, Orthopädische Chirurgie und Traumatologie. UTB, Ulmer, Stuttgart, 34-36. 1998.

Boneva, R. S., Folks, T. M., und Chapman, L. E. Infectious disease issues in xenotransplantation. *Clin Microbiology Reviews* 2001; **14**: 1- 14.

Brehm, W. Stammzelltherapie von Sehnenläsionen beim Pferd. *Congress Proceedings, XVII. Tagung über Pferdekrankeheiten im Rahmen der Equitana, Essen, 16.-17.03. 2007* 87- 88.

Brown, P. Blood infectivity, processing and screening tests in transmissible spongiform encephalopathy. *Vox Sanguinis* 2005; **89**: 63- 70.

Bruder, S. P., Jaiswal, N., und Haynesworth, S. E. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem.* 1997; **64**: 278- 294.

Bucholz, R. W. Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes. *Clin Orthop Rel Res.* 2002; **395**: 44- 52.

Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R., und Recker, R. Bone Biology. *J Bone Joint Surg Am.* 1995; **77-A**: 1276- 1289.

Cancedda, R., Bianchi, G., Derubeis, A., und Quarto, R. Cell Therapy for Bone Disease: A Review of Current Status. *Stem Cells* 2003; **21**: 610- 619.

Caplan, A. I. Cell delivery and tissue regeneration. *J Controlled Release* 1990; **11**: 157- 165.

Cassiede, P., Dennis, J. E., Ma, F., und Caplan, A. I. Osteochondrogenic potential of marrow mesenchymal progenitor cells exposed to TGF- $\beta$ 1 or PDGF-BB as assayed in vivo and in vitro. *J Bone Miner Res.* 1996; **11**: 1264- 1273.

Choi, B. H., Im, C. J., Huh, J. Y., Suh, J. J., und Lee, S. H. Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int.J Oral Maxillofac.Surg* 2004; **33**: 56- 59.

Coelho, M. J. und Fernandes, M. H. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part II: effect of ascorbic acid, beta-glycerophosphate and dexamethasone on osteoblastic differentiation. *Biomaterials* 2000; **21**: 1095- 1102.

Cohen, N. P., Foster, R. J., und Mow, V. C. Composition and dynamics of articular cartilage: structure, function, and maintaining healthy state. *J Orthop Sports Phys Ther.* 1998; **28**: 203- 215.

Cornell, C. N., Lane, J., Chapman, M., Merkow, R., Seligson, D., Henry, S., Gustilo, R., und Vincent, K. Multicenter trial of collagraft as bone graft substitute. *J Orthop Trauma.* 1991; **5**: 1- 8.

D'Ippolito, G., Schiller, P. C., Ricordi, C., Roos, B. A., und Howard, G. A. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res.* 1999; **14**: 1115- 1122.

de Boer, H. H. The history of bone grafts. *Clin Orthop Rel Res.* 1988; **226**: 292-298.

Dennis, J. E. und Caplan, A. I. Porous ceramic vehicles for rat-marrow-derived (*Rattus norvegicus*) osteogenic cell delivery, effects of pre-treatment with fibronectin or laminin. *J Oral Implant.* 1993; **19**: 106- 115.

Dennis, J. E., Carbillet, J. P., Caplan, A. I., und Charbord, P. The STRO-1+ marrow cell population is multipotential. *Cells Tissues Organs* 2002; **170**: 73-82.

Dennis, J. E., Haynesworth, S. E., Young, R. G., und Caplan, A. I. Osteogenesis in marrow-derived mesenchymal cell porous ceramic composites transplanted subcutaneously: Effect of fibronectin and laminin on cell retention and rate of osteogenic expression. *Cell Transplant.* 1-1-1992; **1**: 23- 32.

Dennis, J. E., Konstantakos, E. K., Arm, D., und Caplan, A. I. In vivo osteogenesis assay: a rapid method for quantitative analysis. *Biomaterials* 1998; **19**: 1323- 1328.

Deschaseaux, F., Gindraux, F., Saadi, R., Obert, L., Chalmers, D., und Herve, P. Direct selection of human bone marrow mesenchymal stem cells using an anti-CD49a antibody reveals their CD45<sup>med,low</sup> phenotype. *Br J Haematol.* 2003; **122**: 506- 517.

Doucet, C., Ernou, I., Zhang, Y., Llense, J.-R., Begot, L., Holy, X., und Lataillade, J.-J. Platelet lysates promote mesenchymal stem cell expansion: A safety substitute for animal serum in cell-based therapy applications. *J Cell Physiol.* 2005; **205**: 228- 236.

Dressmann, H. Ueber Knochenplombierung bei hohlförmigen Defekten des Knochens. *Beitr Klin Chir.* 1892; **9**: 804- 810.

Dugrillon, A. und Klüter, H. Topical application of platelets for improved wound healing. *Blood Therapies in Medicine* 2002; **3**: 21- 26.

Erlor, K., Yildiz, C., Baykal, B, Atesalp, A. S., Ozdemir, M. T., und Basbozkurt, M. Reconstruction of defects following bone tumor resections by distraction osteogenesis. *Arch.Orthop.Trauma Surgery* 2005; **125**: 177- 183.

Felsenberg, D. Struktur und Funktion des Knochens: Stützwerk aus Kollagen und Hydroxylapatit. *Pharmazie in unserer Zeit* 2001; **30**: 488- 494.

Ferraro, J. W. Experimental evaluation of ceramic calcium phosphate as a substitute for bone grafts. *Plast Reconstr Surg.* 1979; **63**: 634- 640.

Finkemeier, C.G. Bone-grafting and bone-graft substitutes. Current concepts review. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; **84-A**: 454-464

Fleming, J. E., Cornell, C. N., und Muschler, G. F. Bone cells and matrices in orthopedic tissue engineering. *Orthop Clin North Am.* 1-7-2000; **31**: 357- 374.

Floege, J., Topley, N., und Resch, K. Regulation of mesangial cell proliferation. *Am J Kidney Dis.* 1991; **17**: 673- 676.

Fontana, S., Olmedo, D. G., Linares, J. A., Guglielmotti, M. B., und Crosa, M. E. Effect of platelet-rich plasma on the peri-implant bone response: an experimental study. *Implant Dent.* 2004; **13**: 73- 78.

Foroni, C., Galli, R., Cipelletti, B., Caumo, A., Alberti, S., Fiocco, R., und Vescovi, A. Resilience to transformation and inherent genetic and functional stability of adult neural stem cells ex vivo. *Cancer Res.* 2007; **67**: 3725- 3733.

Fortier, L. A. Stem Cells: Classifications, Controversies, and Clinical Applications. *Vet Surg* 2005; **34**: 415- 426.

Frazer, A., Bunning, R. A., Thavarajah, M., Seid, J. M., und Russel, R. G. Studies on type II collagen and aggrecan production in human articular chondrocytes in vitro and effects of transforming growth factor-beta and interleukin-1 beta. *Osteoarthritis Cartilage* 1994; **2**: 235- 245.

Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., Latsinik, N. V., Panasyuk, A. F., und Keiliss-Borok, I. V. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hematopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation* 1974; **17**: 331- 340.

Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., und Kurolesova, A. I. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; **6**: 230- 247.

Friedenstein, A. J., Piatetzky-Shapiro, I. I., und Petrakova, K. V. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Exp.Morphol.* 1966; **16**: 381- 390.

Friedlaender, G. E. Immune responses to osteochondral allografts. Current knowledge and future directions. *Clin.Orthop.* 1983; **April**: 58- 68.

Garbuz, D. S., Masri, B. A., und Czitrom, A. A. Biology of allografting. *Orthop Clin North Am.* 1998; **29**: 199- 204.

Gauthier, O., Bouler, J. M., Aguado, E., Pilet, P., und Daculsi, G. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: Influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials* 1998; **19**: 133- 139.

Goldberg, V. M., Buckwalter, J. A., Hayes, W. C., und Koval, K. J. Orthopaedic challenges in an aging population. *Instr Course Lect.* 1997; **46**: 417- 422.

Goldberg, V. M. und Stevenson, S. Natural history of autografts and allografts. *Clin Orthop* 1987; **225**: 7- 16.

Gosain, A. K., Song, L. S., Santoro, T., Weihrauch, D., Bosi, B. O., und Corrao, M. A. Effects of transforming growth factor-beta and mechanical strain on osteoblast cell counts: an in vitro model for distraction osteogenesis. *Plast Reconstr Surg*. 2000; **105**: 130- 136.

Goshima, J. Ectopic bone formation by composite graft of culture-expanded human marrow cells and porous calcium phosphate ceramic. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*. 1991; **65**: 34- 43.

Goshima, J., Goldberg, V. M., und Caplan, A. I. Osteogenic potential of culture-expanded rat marrow cells as assayed in vivo with porous calcium phosphate ceramic. *Biomaterials* 1991a; **12**: 253- 258.

Goshima, J., Goldberg, V. M., und Caplan, A. I. The origin of bone formed in composite grafts of porous calcium phosphate ceramic loaded with marrow cells. *Clin Orthop Rel Res*. 1991b; **269**: 274- 283.

Goshima, J., Goldberg, V. M., und Caplan, A. I. The osteogenic potential of culture-expanded rat marrow mesenchymal cells assayed in vivo in calcium phosphate ceramic blocks. *Clin Orthop Rel Res*. 1991c; **January**: 298- 311.

Greenwald, A. S., Boden, S. D., Goldberg, V. M., Yaszemski, M., und Heim, C. S. Bone-Graft Substitutes: Facts, Fictions & Applications. *American Academy of Orthopaedic Surgeons, 73rd Annual Meeting, Chicago, Illinois, March 22-26 22-3-2006*.

Gregory, C. A., Reyes, E., Whitney, M. J., und Spees, J. L. Enhanced engraftment of mesenchymal stem cells in a cutaneous wound model by culture in allogenic species-specific serum and administration in fibrin constructs. *Stem Cells* 2006; **24**: 2232- 2243.

- Gronthos, S. und Simmons, P. J. The growth factor requirements of STRO-1-positive human bone marrow stromal precursors under serum-deprived conditions in vitro. *Blood* 1995; **85**: 929- 940.
- Gruber, R., Karreth, F., Kandler, B., Fuerst, G., Rot, A., Fischer, M. B., und Watzek, G. Platelet-released supernatants increase migration and proliferation, and decrease osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells under in vitro conditions. *Platelets*. 2004; **15**: 29- 35.
- Gruber, R., Varga, F., Fischer, M., und Watzek, G. Platelets stimulate proliferation of bone cells: involvement of platelet-derived growth factor, microparticles and membranes. *Clin Oral Impl Res*. 2003; **13**: 529- 535.
- Hallfeldt, K. K., Stütze, H., Puhmann, M., Kessler, S., und Schweiberer, L. Sterilization of partially demineralized bone matrix: the effects of different sterilization techniques on osteogenic properties. *J Surg Res*. 1995; **59**: 614- 620.
- Hankemeier, S., Bastian, L., Gosling, T., und Krettek, C. Principles of callus distraction. *Unfallchirurg* 2004; **107**: 945- 958.
- Haunschild, M., Machulla, H. K. G., Reichel, H., Schaaf, A., und Hein, W. Immunologische Reaktionen nach allogener Knochentransplantation. *Osteologie* 1996; **3**.
- Hauschild, G. und Bader, A. Vor- und Nachteile synthetischer versus xenogener Knochenersatzmaterialien. *Tierärztliche Praxis* 2004; **32(K)**: 67- 70.
- Hauschild, G., Merten, H.-A., Bader, A., Uhr, G., Deivick, A., Meyer-Lindenberg, A., und Fehr, M. Bioartificial bone grafting: Tarsal joint fusion in a dog using a bioartificial composite bone graft consisting of  $\beta$ -tricalciumphosphate and platelet rich plasma - a case report. *Vet Comp Orthop Traumatol*. 2005; **18**: 1- 3.

- Haynesworth, S. E., Goshima, J., Goldberg, V. M., und Caplan, A. I. Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 1992; **13**: 81- 88.
- Heng, B. C., Cao, T., Stanton, L. W., Robson, P., und Olsen, B. Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *J Bone Miner.Res.* 2004; **19**: 1379- 1394.
- Horowitz, M. C. und Friedlaender, G. E. Induction of specific T-cell responsiveness to allogeneic bone. *J.Bone Joint Surg.Am.* 1991; **73**: 1157- 1168.
- Horwitz, E. M., Gordon, P. L., Koo, W. K., Marx, J. C., Neel, M. D., McNall, R. Y., Muul, L., und Hofmann, T. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stem cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 8932- 8937.
- Horwitz, E. M., Prockop, D. J., Fitzpatrick, L. A., Koo, W. W., Gordon, P. L., Neel, M., Sussman, M., Orchard, P., Marx, J. C., Pyeritz, R. E., und Brenner, M. K. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in children with osteogenesis imperfecta. *Nat Med.* 1999; **5**: 309- 313.
- Ironside, J. W. und Head, M. W. Variant Creutzfeld-Jakob disease: risk of transmission by blood and blood products. *Haemophilia* 2004; **10**: 64- 69.
- Izumisawa, Y., Seno, T., Abe, R., Miyoshi, K., Maehara, S., Wakaiki, S., Kushiro, T., Umar, M. A., Tsuzuki, K., Yamashita, K., und Hayashi, S. Axial correction of pes varus by transverse-opening wedge osteotomy and T-plate fixation with beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) transplantation in dachshunds. *J Vet Med Sci.* 2005; **67**: 437- 440.

Jadlowiec, J. A., Celil, A. B., und Hollinger, J. O. Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents. *Expert Opin.Biol.Ther.* 2003; **3**: 409- 423.

Jäger, M. und Wirth, C. J. Praxis der Orthopädie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 1992; **Ed. 2**.

Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I., und Bruder, S. P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J Cell Biochem.* 1997; **64**: 295- 312.

Jensen, S. S., Brogгинi, N., Weibrich, G., Hjorting-Hansen, E., Schenk, R., und Buser, D. Bone regeneration in standardized bone defects with autografts or bone substitutes in combination with platelet concentrate: a histologic and histomorphometric study in the mandible of minipigs. *Int J Maxillofac Implants* 2005; **20**: 703- 712.

Jiang, Y., Balkrishna, N. J., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A., und Verfaillie, C. M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 4-7-2002; **Jul 4**: 41- 49.

Johnson, L. F., de Serres, S., Herzog, S. R., Peterson, H. D., und Meyer, A. A. Antigenic cross-reactivity between media supplements for cultured keratinocyte grafts. *J Burn Care Rehabil.* 1991; **12**: 306- 312.

Johnson, M. C., Meyer, A. A., deSerres, S., Herzog, S., und Peterson, H. D. Persistence of fetal bovine serum proteins in human keratinocytes. *J Burn Care Rehabil.* 1990; **11**: 504- 509.

Jones, E., English, A., Godthardt, K., Donath, S., Schmitz, J., Kinsey, S., und McGonagle, D. Towards a consensus protocol for isolation and phenotyping of mesenchymal stem cells (MSCs) from human bone marrow (BM). *Stem Cell*

*Workshop - Human mesenchymal stem cells, Empa St.Gallen, Switzerland 7-11-2005.*

Jones, E. A., Kinsey, S. E., English, A., Jones, R. A., Straszynski, L., Meredith, D. M., Markham, A. F., Jack, A., Emery, P., und McGonagle, D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum.* 1-12-2002; **46**: 3349- 3360.

Joshi, A. und Kostakis, G. C. An investigation of post-operative morbidity following iliac crest graft harvesting. *Br Dent J* 2004; **196**: 167- 171.

Junqueira, L. C., Carneiro, J., und Kelley, R. O. Histologie. Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen. Springer Verlag, Berlin. 2002; **Ed. 5**.

Kallela, I., Laine, P., Suuronen, R., Ranta, P., Iizuka, T., und Lindqvist, C. Osteotomy site healing following mandibular sagittal split osteotomy and rigid fixation with polylactide biodegradable screws. *Int.J.Oral Maxillofac.Surg.* 1999; **28**: 166- 170.

Kassem, M. Human mesenchymal stem cells: Isolation from bone marrow based on specific selection criteria. *Stem Cell Workshop - Human mesenchymal stem cells, Empa St.Gallen, Switzerland 7-11-2005.*

Kasten, P., Luginbühl, R., van Griensven, M., Barkhausen, T., Krettek, C., Bohner, M., und Bosch, U. Comparison of human bone marrow stromal cells seeded on calcium-deficient hydroxyapatite,  $\beta$ -tricalcium phosphate and demineralized bone matrix. *Biomaterials* 2003; **24**: 2593- 2603.

Kasten, P., Vogel, J., Luginbühl, R., Niemeyer, P., Tonak, M., Lorenz, H., Weiss, S., Fellenberg, J., Leo, A., Simank, H. G., und Richter, W. Ectopic bone formation associated with mesenchymal stem cells in a resorbable calcium deficient hydroxyapatite carrier. *Biomaterials* 2005; **26**: 5879- 5889.

Kievits, F., Boerenkamp, W. J., und Ivanyi, P. H-2-dependent binding of xenogeneic beta 2-microglobulin from culture media. *J.Immunol.* 15-6-1988; **140**: 4253- 4255.

Kitoh, H., Kitakoji, T., Tsuchiya, H., Mitsuyama, H., Nakamura, H., Katoh, M., und Ishiguro, N. Transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma during distraction osteogenesis - a preliminary result of three cases. *Bone* 2004; **35**: 892- 898.

Knaepler, H. Stand(ard) der allogenen Knochentransplantation. Ergebnisse einer Umfrage an Deutschen AO-Kliniken. *OP-Journal* 2000; **16**: 290- 292.

Kocialkowski, A., Wallace, W. A., und Prince, H. G. Clinical experience with a new artificial bone graft: preliminary results of a prospective study. *Injury* 1990; **21**: 142- 144.

Koerner, J., Nestic, D., Diaz Romero, J., Brehm, W., Mainil-Varlet, P., und Grogan, S. P. Equine peripheral blood-derived progenitors in comparison to bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006; **24**: 1613- 1619.

Kraus, K. H. und Kirker-Head, C. Mesenchymal Stem Cells and Bone Regeneration. *Vet Surg* 2006; **35**: 232- 242.

Krause, U. C. Charakterisierung und Vergleich mesenchymaler Progenitorzellen aus humanem Knochenmark und Nabelschnurblut. *Med.Dissertation, Med Fakultät Heidelberg* 2004.

Krebsbach, P. H., Kuznetsov, S. A., Satomura, K., Emmons, R. V., Rowe, D. W., und Robey, P. G. Bone formation in vivo: comparison of osteogenesis by transplanted mouse and human marrow stromal fibroblasts. *Transplantation* 27-4-1997; **63**: 1059- 1069.

Kruyt, M. C., Dhert, W. J., Oner, W. J., van Blitterswijk, C. A., Verbout, A. J., und de Bruijn, J. D. Analysis of ectopic and orthotopic bone formation in cell based tissue-engineered constructs in goats. *Biomaterials* 2007; **28**: 1798-1805.

Kuboki, Y., Saito, T., Murata, M., Takita, H., Mizuno, M., Inoue, M., Nagai, N., und Poole, A. R. Two distinctive BMP-carriers induce zonal chondrogenesis and membranous ossification, respectively; geometrical factors of matrices for cell-differentiation. *Connect. Tissue Res.* 1995; **32**: 219- 226.

Kuhne, J. H., Bartl, R., Frisch, B., Hammer, C., Jansson, V., und Zimmer, M. Bone formation in coralline hydroxyapatite. Effects of pore size studies in rabbits. *Acta Orthop.Scand.* 1994; **65**: 246- 252.

Kuznetsov, S. A., Friedenstein, A. J., und Robey, P. G. Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro. *British J of Haematol.* 1997; **97**: 561- 570.

Kuznetsov, S. A., Grosheva, A. G., und Friedenstein, A. J. Osteogenic properties of adhesive cells from mouse bone marrow Dexter cultures. *Bull Exp Biol Med.* 1989; **108**: 236- 238.

Kuznetsov, S. A., Mankani, M. H., und Robey, P. G. Effect of serum on human bone marrow stromal cells: ex vivo expansion and in vivo bone formation. *Transplantation* 27-12-2000; **70**: 1780- 1787.

Labarca, C. und Paigen, K. A simple, rapid, and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem.* 1-3-1980; **102**: 344- 352.

Lakshmiathy, U. und Verfaillie, C. Stem cell plasticity. *Blood Reviews* 2005; **19**: 29- 38.

- Landesberg, R., Roy, M., und Glickman, R. Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich plasma gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; **58**: 297- 300.
- Langer, R. und Vacanti, J. P. Tissue engineering. *Science* 1993; **260**: 920- 926.
- Lasmezas, C. I., Fournier, J-G., Nouvel, V., Boe, H., Marce, D., Lamoury, F., Kopp, N., Hauw, J-J., Ironside, J., Bruce, M., Dormont, D., und Deslys, J-P. Adaption of the bovine spongiform encephalopathy agent to primates and comparison with Creutzfeld-Jakob disease: Implications for human health. *PNAS* 27-3-2001; **98**: 4142- 4147.
- Laurencin, C., Khan, Y., und El-Amin, S. F. Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices* 2006; **3**: 49- 57.
- Laurencin, C. T., Ambrosio, A. M., Borden, M. D., und Cooper, J. A., Jr. Tissue engineering: orthopedic applications. *Annu.Rev.Biomed.Eng* 1999a; **1**: 19- 46.
- Laurencin, C. T., Attawia, M., und Borden, M. D. Advancements in tissue engineered bone substitutes. *Current Opinion in Orthopedics* 1999b; **10**: 445- 451.
- Laurencin, C. T., Attawia, M. A., Elgendy, H. E., und Herbert, K. M. Tissue engineered bone-regeneration using degradable polymers: the formation of mineralized matrices. *Bone* 1996; **19**: 93S- 99S.
- Lavik, E. und Langer, R. Tissue Engineering: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004; **65**: 1- 8.
- Le Blanc, K. und Pittenger, M. Mesenchymal stem cells: progress toward promise. *Cytotherapy* 2005; **7**: 36- 45.
- Lennon, D. P., Haynesworth, S. E., Bruder, S. P., Jaiswal, N., und Caplan, A. I. Human and animal mesenchymal progenitor cells from bone marrow:

Identification of serum for optimal selection and proliferation. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1996; **32**: 602- 611.

Lennon, D. P., Haynesworth, S. E., Young, R. G., Dennis, J. E., und Caplan, A. I. A chemically defined medium supports in vitro proliferation and maintains the osteochondral potential of rat marrow-derived mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res.* 1995; **219**: 211- 222.

Lerner, U. H. Osteoclast formation and resorption. *Matrix Biol.* 2000; **19**: 107- 120.

Li, C. M., Ho, Y. R., und Liu, Y. C. Transmission of human immunodeficiency virus through bone transplantation: A case report. *J Formos Med Assoc.* 2001; **100**: 350- 351.

Li, H., Zou, X., Xue, Q., Egund, N., Lind, M., und Büniger, C. Anterior lumbar interbody fusion with carbon fiber cage loaded with bioceramics and platelet-rich plasma. An experimental study on pigs. *Eur Spine J.* 17-1-2004; **13**: 354- 358.

Lichtman, M. A. The ultrastructure of the hematopoietic environment of the marrow: a review. *Exp Hematol.* 1981; **9**: 391- 410.

Lieberman, J. R., Daluiski, A., und Einhorn, T. A. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J.Bone Joint Surg.Am* 2002; **84-A**: 1032- 1044.

Lim, S. Y., Kim, Y. S., Ahn, Y., Jeong, M. H., Hong, M. H., Joo, S. Y., Nam, K. I., Cho, J. G., Kang, P. M., und Park, J. C. The effects of mesenchymal stem cells transduced with Akt in a porcine myocardial infarction model. *Cardiovasc Res.* 2006; **70**: 530- 542.

Linhart, W., Meenen, N. M., und Rueger, J. M. Knochenersatzmaterialien: Neue Möglichkeiten und Techniken. *OP-Journal* 2000; **16**: 294- 298.

Liptak, J. M., Ehrhart, N., Santoni, B. G., und Wheeler, D. L. Cortical bone graft and endoprosthesis in the distal radius of dogs: A biomechanical comparison of two different limb-sparing techniques. *Vet Surg* 1-2-2006; **35**: 150- 160.

Long, M. W. Ostoegenesis and bone-marrow-derived cells. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2001; **27**: 677- 690.

Lu, J., Descamps, M., Dejou, J., Koubi, G., Hardouin, P., Lemaitre, J., und Proust, J. P. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. *J.Biomed.Mater.Res.* 2002; **63**: 408- 412.

Lucarelli, E., Beccheroni, A., Donati, D., Sangiorgi, L., Cenacchi, A., Del Vento, A. M., Meotti, C., Bertoja, A. Z., Giardino, R., Fornasari, P. M., Mercuri, M., und Picci, P. Platelet-derived growth factors enhance proliferation of human stromal stem cells. *Biomaterials* 2003; **24**: 3095- 3100.

MacDermott, R. P. und Bragdon, M. J. Fetal calf serum augmentation during cell separation procedures accounts for the majority of human autologous mixed leukocyte reactivity. *Behring Inst.Mitt.* 1983 122- 128.

Mangi, A. A., Noiseux, N., Kong, D., He, H., Rezvani, M., Ingwall, J. S., und Dzau, V. J. Mesenchymal stem cells modified with Act prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med.* 2003; **9**: 1195- 1201.

Mankani, M. H., Kuznetsov, S. A., Fowler, B., Kingman, A., und Robey, P. G. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: effect of carrier particle size and shape. *Biotechnol.Bioeng.* 5-1-2001; **72**: 96- 107.

Mareddy, S., Crawford, R., Brooke, G., und Xiao, Y. Clonal isolation and characterization of bone marrow stromal cells from patients with osteoarthritis. *Tissue Eng.* 2007; **13**: 819- 829.

Mareschi, K., Ferrero, I., Rustichelli, D., Aschero, S., Gammaitoni, L., Aglietta, M., Madon, E., und Fagioli, F. Expansion of mesenchymal stem cells isolated

from pediatric and adult donor bone marrow. *J Cell Biochem.* 2006; **97**: 744-754.

Martin, D. R., Cox, N. R., Hathcock, T. L., Niemeyer, G. P., und Baker, H. J. Isolation and characterization of multipotential mesenchymal stem cells from feline bone marrow. *Exp Hematol.* 2002; **30**: 879- 886.

Marx, R. E., Carlson, E. R., Eichstaedt, R. M., Schimmele, S. R., Strauss, J. E., und Georgeff, K. R. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod.* 1998; **85**: 638- 646.

Mauney, J. R., Kaplan, D. L., und Volloch, V. Matrix-mediated retention of osteogenic differentiation potential by human adult bone marrow stromal cells during ex vivo expansion. *Biomaterials* 2004; **25**: 3233- 3243.

McAndrew, M. P., Gorman, P. W., und Lange, T. A. Tricalcium phosphate as a bone graft substitute in trauma: preliminary report. *J Orthop Trauma.* 1988; **2**: 333- 339.

Mendes, S. C., Tibbe, J. M., Veenhof, M., Both, S., Oner, F. C., van Blitterswijk, C. A., und de Bruijn, J. D. Relation between *in vitro* and *in vivo* osteogenic potential of cultured human bone marrow stromal cells. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1-10-2004; **15**: 1123- 1128.

Meyer, A. A., Manktelow, A., Johnson, M., de Serres, S., Herzog, S., und Peterson, H. D. Antibody response to xenogeneic proteins in burned patients receiving cultured keratinocyte grafts. *J Trauma.* 1988; **28**: 1054- 1059.

Mimeault, M. und Batra, S. K. Concise Review: Recent advances on the significance of stem cells in tissue regeneration and cancer therapies. *Stem Cells* 2006; **24**: 2319- 2345.

Müller, G, Müller, A., Jonuleit, H., Steinbrink, K., Szalma, C., Paragnik, L., Lingnau, K., Schmidt, E., Knop, J., und Enk, A. H. Fetal calf serum-free

generation of functionally active murine dendritic cells suitable for in vivo therapeutic approaches. *J Invest Dermatol.* 2000; **114**: 142- 149.

Nakamura, Y., Wang, X., Xu, C., Asakura, A., Yoshiyama, M., From, A. H. L., und Zhang, J. Xenotransplantation of long-term-cultured swine bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2007; **25**: 612- 620.

Ng, K. W., Romas, E., Donnan, L., und Findlay, D. M. Bone biology. *Baillieres Clin Endocrinol Metab.* 1997; **11**: 1- 22.

Nickel, R., Schummer, A., und Seiferle, E. Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Bd. 1, Bewegungsapparat. Verlag Paul Parey, Hamburg. 1984.

Nishida, S., Endo, N., Yamagiwa, H., Tanizawa, T., und Takahashi, H. E. Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. *J Bone Miner Metab.* 1999; **17**: 171- 177.

Ohgushi, H., Okumura, M. M., Tamai, S., Shors, E. C., und Caplan, A. I. Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate: a comparative histomorphometric study of ectopic bone formation. *J Biomed Mater Res.* 1990; **24**: 1563- 1570.

Olsen, B., Reginato, A. M., und Wang, W. Bone Development. *Ann Rev Cell Dev Biol.* 2000; **16**: 191- 220.

Oyama, M. A., Merola, V., und Eurell, T. E. Cardiac cellular transplantation: transarterial myoblast transplantation in dogs. *Intern J Appl Res Vet Med.* 2005; **3**: 102- 115.

Pacifici, L., Casella, F., und Ripari, M. [Lifting of the maxillary sinus: complementary use of platelet rich plasma, autologous bone deproteinised bovine bone. Case report]. *Minerva Stomatol.* 2003; **52**: 471- 478.

Parikh, S. N. Bone graft substitutes: past, present and future. *J Postgrad Med.* 2002; **48**: 142- 148.

Perren, S. M. Primary bone healing. In: Bojrab M. (ed) Pathophysiology in small animal surgery. Lea & Febiger, Philadelphia. 1981 519- 527.

Perren, S. M. Primary bone healing. In: Bojrab und Mitarbeiter (eds) Disease mechanisms in small animal surgery. Lea & Febiger, Philadelphia. 1993 663- 670.

Pesonen, K., Viinikka, L., Myllyla, G., Kiuru, J., und Perheentupa, J. Characterization of material with epidermal growth factor immunoreactivity in human serum and platelets. *J Clin Endocrinol and Metabolism* 1989; **68**: 486- 491.

Peter, S. J., Liang, C. R., Kim, D. J., Widmer, M. S., und Mikos, A. G. Osteoblastic phenotype of rat marrow stromal cells cultured in the presence of dexamethasone, beta-glycerolphosphate and L-ascorbic acid. *J Cell Biochem.* 1998; **71**: 55- 62.

Petite, H. und Hannouche, D. Marrow stromal stem cells for repairing the skeleton. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 2002; **19**: 83- 101.

Petite, H., Viateau, V., Bensaid, W., Meunier, A., de Pollak, C., Bourguignon, M., Oudina, K., Sedel, L., und Guillemain, G. Tissue-engineered bone regeneration. *Nature Biotechnol.* 2000; **18**: 959- 963.

Phinney, D. G., Kopen, G., Righter, W., Webster, S., Tremain, N., und Prockop, D. J. Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem.* 1-12-1999; **75**: 424- 436.

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., und Marshak, D. R.

Multilineage potential of adult mesenchymal stem cells. *Science* 1999; **284**: 143- 147.

Pollard, J. W. Tumour-stromal interactions. Transforming growth factor-beta isoforms and hepatocyte growth factor/scatter factor in mammary gland ductal morphogenesis. *Breast Cancer Res.* 2001; **3**: 230- 237.

Puelo, D. A. Biotherapeutics in orthopaedic medicine - accelerating the healing process? *Biodrugs* 2003; **17**: 301- 314.

Rai, B., Oest, M. E., Dupont, K. M., Ho, K. H., Teoh, S. H., und Guldberg, R. E. Combination of platelet-rich plasma with polycaprolactone-tricalcium phosphate scaffolds for segmental bone defect repair. *J Biomed Mater Res A.* 2007; **81**: 888- 899.

Raisz, L. G. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clin Chem.* 1999; **45**: 1353- 1358.

Ranly, D. M., Lohmann, C. H., Andreacchio, D., Boyan, B. D., und Schwartz, Z. Platelet-rich plasma inhibits demineralized bone matrix-induced bone formation in nude mice. *J Bone Joint Surg Am.* 2007; **89**: 139- 147.

Reyes, M., Lund, T., Lenvik, T., Aguiar, D., Koodie, L., und Verfaillie, C. M. Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood* 1-11-2001; **98**: 2615- 2625.

Rubio, D., Garcia-Castro, J., Martin, M. C., de la Fuente, R., Cigudosa, J. C., Lloyd, A. C., und Bernad, A. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res.* 2005; **65**: 3035- 3039.

Rueger, J. M. Knochenersatzmittel - Heutiger Stand und Ausblick. *Orthopäde* 1998; **2**: 72- 79.

- Sanderson, A. R. HLA "help" for human  $\beta$ 2-microglobulin across species barriers. *Nature* 1977; **269**: 414- 417.
- Schenk, R. K. Die Histologie der primären Knochenheilung im Lichte neuer Konzeptionen über den Knochenbau. *Unfallheilkunde* 1978; **81**: 219- 219.
- Schenk, R. K. und Willenegger, H. R. Zur Histologie der primären Knochenheilung. Modifikationen und Grenzen der Spalthheilung in Abhängigkeit der Defektgrösse. *Unfallheilkunde* 1977; **80**: 155- 160.
- Schneider, B., Dada, A., Barlage, S., Marx-Müller, U., Weiß-Penzel, M., und Schmitz, G. High-grade depletion of CD45/glycophorin-A positive cells decreases the yield of mesenchymal stem cells from human umbilical cord blood. *Stem Cell Workshop - Human mesenchymal stem cells, Empa St.Gallen, Switzerland* 7-11-2005.
- Scott, M. R., Will, R., Ironside, J., Hoang-Oanh, B. N., Tremblay, P., DeArmond, S. J., und Prusiner, B. Compelling transgenetic evidence for transmission of bovine spongiform encephalopathy prions to humans. *PNAS* 21-12-1999; **96**: 15137- 15142.
- Seitz, T. L., Noonan, K. D., Hench, L. L., und Noonan, N. E. Effect of fibronectin on the adhesion of an established cell line to a surface reactive biomaterial. *J Biomed Mater Res.* 1982; **16**: 195- 207.
- Sekido, Y., Morishima, Y., und Ohya, K. Activity of platelet-derived growth factor (PDGF) in platelet concentrates and cryopreserved platelets determined by PDGF bioassay. *Vox Sanguinis* 1987; **52**: 27- 30.
- Shapiro, I. M. Discovery: Osf2/Cbfa1, a master gene of bone formation. *Clin Orthod Res.* 1999; **2**: 42- 46.
- Silber, J. S., Anderson, D. G., Daffner, S. D., Brislin, B. T., Leland, J. M., Hilibrand, A. S., Vaccaro, A. R., und Albert, T. J. Donor site morbidity after

anterior iliac crest bone harvest for single-level anterior cervical discectomy and fusion. *Spine* 2003; **28**: 134- 139.

Sittinger, M. Tissue Engineering: Künstlicher Gewebeersatz aus vitalen Komponenten. *Laryngo Rhino Otol.* 1995; **74**: 695- 699.

Slatter, D. Textbook of small animal surgery. Volume 1. W. B. Saunders Company, Philadelphia. 15-1-1993a; **Ed. 2**.

Slatter, D. Textbook of small animal surgery. Volume 2. W. B. Saunders Company, Philadelphia. 15-1-1993b; **Ed. 2**.

Smith, R. K. W. Mesenchymal stem cells - Theory and application. *Proceedings of the 15th annual scientific meeting of the ECVS, Sevilla* 2006 207- 210.

Soost, F. Historischer Überblick der Knochenersatz- und Implantatmaterialien in der craniofacialen Chirurgie. *Osteologie* 1996; **5**: 135- 143.

Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Salagianni, M., Baxevanis, C. N., und Papamichail, M. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2006a; **24**.

Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Salagianni, M., Baxevanis, C. N., und Papamichail, M. Letter to the editor: Cell culture medium composition and translational adult bone marrow-derived stem cell research. *Stem Cells* 2006b; **24**: 1409- 1410.

Stanford, C. M., Jacobson, P. A., Eanes, E. D., Lembke, L. A., und Midura, R. J. Rapidly Forming Apatitic Mineral in an Osteoblastic Cell Line (UMR 106\_01 BSP). *J Biol Chem* 21-4-1995; **270**: 9420- 9428.

Stute, N., Holtz, K., Bubenheim, M., Lange, C., Blake, F., und Zander, A. R. Autologous serum for isolation and expansion of human mesenchymal stem cells for clinical use. *Exp Hematol.* 2004; **32**: 1212- 1225.

Sumner-Smith, G. Delayed unions and nonunions. Diagnosis, pathophysiology and treatment. *Vet Clin North Am.: Small Anim Pract.* 1991; **21**: 745- 760.

Thorn, J. J., Sorensen, H., Weis-Fogh, U., und Andersen, M. Autologous fibrin glue with growth factors in reconstructive maxillofacial surgery. *Int.J Oral Maxillofac.Surg* 2004; **33**: 95- 100.

Thorwarth, M., Wehrhan, F., Schultze-Mosgau, S., Wiltfang, J., und Schlegel, K. A. PRP modulates expression of bone matrix proteins in vivo without long-term effects on bone formation. *Bone* 2006; **38**: 30- 40.

Tözüm, T. F. und Demiralp, B. Platelet-rich plasma: a promising innovation in dentistry. *J Can Dent Assoc.* 2003; **69**: 664- 664.

Vaananen, H. K., Hentunen, T., Lakkakorpi, P., Parvinen, E. K., Sundqvist, K., und Tuukkanen, J. Mechanism of osteoclast mediated bone resorption. *Ann Chir Gyneacol.* 1988; **77**: 193- 196.

Vaananen, H. K., Zhao, H., Mulari, M., und Halleen, J. M. The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci.* 2000; **113**: 377- 381.

van der Meulen, J. und Koerten, H. K. Inflammatory response and degradation of three types of calcium phosphate ceramic in a non-osseous environment. *J.Biomed.Mater.Res.* 1994; **28**: 1455- 1463.

Vogel, J. P., Szalay, K., Geiger, F., Kramer, M., Richter, W., und Kasten, P. Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and in vivo bone formation in calcium phosphate ceramics. *Platelets* 2006; **17**: 462- 469.

Volk, S. W., Diefenderfer, D. L., Christopher, S. A., Haskins, M. E., und Leboy, P. S. Effects of osteogenic inducers on cultures of canine mesenchymal stem cells. *Am J Vet Res.* 2005; **66**: 1729- 1737.

von Recum, H. A., Cleek, R. L., Eskin, S. G., und Mikos, A. G. Degradation of polydispersed poly(L-lactic acid) to modulate lactic acid release. *Biomaterials* 1995; **16**: 441- 447.

Wagner, B. und Foitzik, C. Praxistaugliches Verfahren zur Gewinnung von Platelet rich Plasma. *Z Zahnärztl Implantologie* 2000; **16**: 146- .

Wakitani, S., Saito, T., und Caplan, A. I. Myogenic cells derived from rat bone marrow mesenchymal stem cells exposed to 5-azacytidine. *Muscle Nerve* 1995; **18**: 1417- 1726.

Weibrich, G., Gnoth, S. H., Otto, M., Reichert, T. E., und Wagner, W. Wachstumsstimulation von humanen osteoblastenähnlichen Zellen durch Thrombozytenkonzentrate in vitro. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2002a; **6**: 168- 174.

Weibrich, G., Hansen, T., Kleis, T., Buch, R., und Hitzler, W. E. Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 2004; **34**: 665- 671.

Weibrich, G., Kleis, W. K., Hafner, G., und Hitzler, W. E. Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg* 2002b; **30**: 97- 102.

Weibrich, G., Kleis, W. K., Hafner, G., Hitzler, W. E., und Wagner, W. Comparison of platelet, leukocyte, and growth factor levels in point-of-care platelet-enriched plasma, prepared using a modified Curasan kit, with preparations received from a local blood bank. *Clin Oral Implants Res* 2003; **14**: 357- 362.

Weissmann, I. L. Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: Barriers and opportunities. *Science* 2000; **287**: 1442- 1446.

WHO. Medicinal and other products and human and animal transmissible spongiform encephalopathies: memorandum from a WHO meeting. *Bull. World Health Organ* 1997; **75**: 505- 513.

Wiesmann, H. P., Joos, U., und Meyer, U. Biological and biophysical principles in extracorporal bone tissue engineering. Part II. *Int.J.Oral Maxillofac.Surg.* 2004; **33**: 523- 530.

Winter, A., Breit, S., Parsch, D., Benz, K., Steck, E., Hauner, H., Weber, R. M., Ewerbeck, V., und Richter, W. Cartilage-like gene expression in differentiated human stem cell spheroids: a comparison of bone marrow-derived and adipose tissue-derived stromal cells. *Arthritis Rheum.* 2003; **48**: 418- 429.

Wong, M. und Tuan, R. S. Nuserum, a synthetic serum replacement, supports chondrogenesis of embryonic chick limb bud mesenchymal cells in micromass culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1993; **29A**: 917- 922.

Yamada, Y., Ueda, M., Naiki, T., Takahashi, M., Hata, K., und Nagasaka, T. Autogenous injectable bone for regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma: tissue-engineered bone regeneration. *Tissue Eng* 2004; **10**: 955- 964.

Yu, J., Ustach, C., und Kim, H. R. Platelet-derived growth factor signaling and human cancer. *J Biochem Mol Biol.* 2003; **36**: 49- 59.

Zechner, W., Tangl, S., Tepper, G., Furst, G., Bernhart, T., und Haas, R. Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implants: a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2003; **18**: 15- 22.

Zimmermann, R., Arnold, D., Strasser, E., Ringwald, J., Schlegel, A., Wiltfang, J., und Eckstein, R. Sample preparation technique and white cell content influence the detectable levels of growth factors in platelet concentrates. *Vox Sanguinis* 2003; **85**: 283- 289.

## Anhang

Die verwendeten Lösungen wurden, sofern erforderlich, vor Gebrauch 20 Minuten bei 121° C und 1 bar Überdruck autoklaviert oder, sofern sie Inhaltsstoffe enthielten, die durch Hitze einwirkung zerstört werden konnten, mittels Spritzen-Filtern bzw. Bottle Top-Filtern sterilfiltriert (Porengröße: 0,22 µm, Millipore Corporation).

### A. Reagenzien

Name	Abk.	Information	Katalognr.	Firma/Ort
Alizarinrot-S	AR-S		No. 1F583	Fa. Waldeck GmbH & Co. KG, Division Chroma, Münster
Aquatex®		wässriges Eindeckmittel für die Mikroskopie, 50 ml	No. OC567542	Merck, Darmstadt
Ascorbinsäure-2-phosphat		1,5 mg	No. A-8960	Sigma, Taufkirchen
β-Glycerol-phosphat		FW 216,04	No. G-9891	Sigma, Taufkirchen
Bisbenzimid Hoechst, 33258		25 mg	No. B-2883	Sigma
Blocking Reagent			No. 11096176001	Fa. Roche, Mannheim
bovines Serum Albumin	BSA	Albumin bovine serum Fraction V, ≥ 96%	No. A-9647	Sigma, Taufkirchen
Cetyl-pyridinium-chlorid	CPC	FW 340,0	No. C-9002	Sigma, Taufkirchen
Citrat-Phosphat-Dextrose	CPD	Compoflex®		Fresenius HemoCare, Bad Homburg
Collagenase B			No. 1088815	Roche, Mannheim
Dexamethason		Dexamethason water soluble (100 mg)	No. D-2919	Sigma, Taufkirchen

ANHANG

DMEM high Glucose			No. 41966	Gibco Life Technologies, Grand Island, NY 14072, USA bzw. Gibco/Invitrogen
DMEM low Glucose			No. 31885023	Gibco Life Technologies, Grand Island, NY 14072
Dimethylsulf-oxide	DMSO	99,9%, A.C.S. spectrophotometric grade, 100 ml	No. 154938	Sigma, Taufkirchen
Desoxyribonucleid Acid	DNA	Sodium Salt, from Salmon Testes, 250 mg	No. 1626	Sigma, Taufkirchen
EDTA	EDTA	FW 372,2	No. E-5134	Sigma, Taufkirchen
Epidermal Growth Factor	EGF	1 x 500 µg	No. EGF-500	Fa. Strathmann Biotech AG, Hamburg
Fast Red		Fast Red tablets	No. 11496549001	Fa. Roche, Mannheim
Fetal Bovine Serum	FBS	aus Lot 272 FF	No. S-0115	Biochrom, Berlin
Fibronektin	FN	human Plasma, 1 mg Lyophilisat	No. 341635	Fa. Calbiochem, über Merck, Darmstadt
Ficoll-Paque™ plus			No. 17-1440-02	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Glycerin		FW 92,09	No. G-5516	Sigma, Taufkirchen
Haemalaun nach Mayer		Haemalaun, sauer, nach Mayer	No. 2E038	Fa. Waldeck GmbH & Co. KG, Division Chroma, Münster
Heparin		Heparin-Natrium, 25.000 IE / 5 ml		Fa. Braun, Melsungen
Hyaluronidase		Hyaluronidase from	No. 10106500001	Roche, Mannheim

ANHANG

		bovine testes, 100 mg		
Indomethacin			No. I-7378	Sigma, Taufkirchen
Insulin		Insulin human, 100 mg/Vial, FW 5,808	No. I-2767	Sigma, Taufkirchen
3-Isobutyl-1-Methylxanthine		FW 222,25	No. I-5879	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol				Merck, Darmstadt
Insulin Transferrin Selenit Supplement	ITS-Supplement		No. I-1884	Sigma, Taufkirchen
Kernechtrot-Aluminiumsulfat			No. 2E012	Fa. Waldeck GmbH & Co. KG, Division Chroma, Münster
Ketaminhydrochlorid		Hostaket®		Fa. Intervet Deutschland GmbH, Unterschleißheim
MCDB		MCDB 201	No. M-6770	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	NaCl	FW 58,44		Fluka Biochemika/Sigma
Natriumphosphat		FW 138,0	No. S-9638	Sigma, Taufkirchen
Natriumpyruvat		100 ml, 100 mM, sterile, cell culture tested	No. S-8636	Sigma, Taufkirchen
NBT-BCIP Stock Solution			No.1681451	Roche, Mannheim
Ölrot O			No. 1E242	Fa. Waldeck GmbH & Co. KG, Division Chroma, Münster
PCR-Puffer		1x		Invitrogen, Karlsruhe
Phosphate Buffered Saline	PBS	PBS 10 x, pH 7,4, ohne CaCl <sub>2</sub> und ohne	No. 140800-48	Gibco/Invitrogen, Grand Island, NY 14072, USA

ANHANG

		MgCl <sub>2</sub>		
Platelet derived growth factor	PDGF	Th PDGF-BBy-50		Strathmann Biotech AG, Hamburg
Penicillin/Streptomycin			No. A-2213	Fa. Biochrom, Berlin
Phosphatase Substrat		Phosphatase Substrate 100 mg Capsules, 25 Stck	No. P-5869	Sigma, Taufkirchen
p-Nitrophenol Standard Solution			No. N-7660	Sigma, Taufkirchen
Primärantikörper Kollagen Typ I		Anti-Human Collagen Type I; Mouse Monoclonal Antibody, Purified IgG	No. 63170	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA
Primärantikörper Kollagen Typ II		Anti-Human Collagen Type II; Mouse; Klon II-4CII; Purified IgG	No. 63171	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA
Prolin			No. P-4655	Sigma, Taufkirchen
Pronase		1 g, from Streptomyces griseus	No. 165921	Roche, Mannheim
Salmon Sperm DNA solution		10 mg/ml	No. 15632-001	Fa. Gibco
Salzsäure	HCl	1 M/l (1 N)		Merck, Darmstadt
Sekundärantikörper, biotinyliert, Anti-IgG		Biotin-SP-conjugated Affini Pure Goat Anti-Mouse IgG (H+L), minimal cross reaction to human, bovine, horse, rabbit and swine	No. 115-065-146	Dianova, Hamburg

## ANHANG

		proteins		
Streptavidin-Biotin Complex	Strept AB Complex /AP	Streptavidin, Biotinylated Alkaline Phosphatase, StreptAB Complex/AP Mixing Bottle	No. K0391	Dako Cytomation, Glostrup, Dänemark
Transforming growth factor- $\beta$ -3	TGF- $\beta$ -3	2 $\mu$ g	No. T-5425	Sigma, Taufkirchen
Toluidinblau			No. 1B481	Fa. Waldeck GmbH & Co. KG, Division Chroma, Münster
Triton-X 100			No. T-8787	Sigma, Taufkirchen
Tris		Tris (basisch), FW 121,14 g		Merck, Darmstadt
Trizma <sup>®</sup> hydrochloride	Tris/HCl	reagent grade, minimum 99% redox titration, FW 157,6	No. T-3253	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau		Trypan blue solution, 0,4%	No. T-8154	Sigma, Taufkirchen
Trypsin	0,25%/1 mM	Trypsin-EDTA, 0,5% / 0,2% (w/v) in 10 x PBS w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	No. L2153	Fa. Biochrom, Berlin
WST-1 Reagent		Cell Proliferation Reagent WST-1	No. 11644807001	Roche, Mannheim
XEM		XEM-200, Xylolersatz	No. ND-H5-200	Vogel GmbH&Co. KG, Gießen
Xylazinhydrochlorid		Rompun <sup>®</sup> 2%		BayerVital GmbH, Leverkusen

## **B. Lösungen und Puffer**

### **Alizarinrot-S-Lösung (0,5%)**

0,5 g Alizarinrot-S Pulver werden in 100 ml destilliertem Wasser gelöst.

### **Ascorbinsäure-2-phosphat**

2,5 g A-2-P in 50 ml Milli-Q-Wasser lösen. Dies ergibt eine 0,173 M (50 mg/ml) Stocklösung. In 1 ml Aliquots teilen und bei -20 °C bis zur Verwendung lagern. Für 1 Liter Zellkultur-Medium werden 580 µl benötigt. Für 300 ml chondrogenes bzw. osteogenes Differenzierungs-Medium werden 300 µl benötigt.

### **Bisbenzimid-Stock-Lösung**

Für die Stock-Lösung wurden 200 µg/ml Bisbenzimide mit Aqua dest. gelöst.

### **Bisbenzimid-Arbeitslösung**

Die Arbeitslösung wird hergestellt, indem man die Stock-Lösung in einem Verhältnis von 1:100 in 100 mM NaCl/10 mM Tris, pH 7.0, verdünnt.

### **BSA 5% in PBS**

0,5 g BSA werden in 10 ml 1 x PBS gelöst.

### **BSA (100 mg/ml)**

100 mg/ml in Milli-Q-Wasser lösen. Auf 300 ml chondrogenes Differenzierungs-Medium werden 3,75 ml benötigt.

### **Cetylpyridiniumchlorid-Lösung (10% (w/v) in 10 mM Natriumphosphat)**

Für die Herstellung der Gebrauchslösung werden 1,38 g/l Natriumphosphat in destilliertem Wasser gelöst (ergibt eine Lösung von 10 mM). Für 50 ml CPC-Lösung gibt man 5 g CPC in 50 ml Natriumphosphat-Lösung. Der pH Wert wird auf 7,0 eingestellt.

### **10<sup>-2</sup> M Dexamethason-Lösung (3,92 mg/ml)**

100 mg (gesamtes Vial) Dexamethason in 25,5 ml Milli-Q-Wasser lösen. In 250 µl Aliquots bei -20 °C lagern.

### **10<sup>-5</sup> M Dexamethason-Lösung (3,92 µg/ml)**

50 µl 10<sup>-2</sup> M Dexamethason-Lösung und 49,95 ml Milli-Q-Wasser mischen. 2 ml Aliquots herstellen.

2 ml werden auf 1 Liter Zellkultur-Medium benötigt.  
3 ml werden für 300 ml chondrogenes bzw. osteogenes Differenzierungs-Medium benötigt.

#### **10<sup>-4</sup> M Dexamethason-Lösung**

1 ml 10<sup>-2</sup> M Dexamethason-Lösung mit 99 ml Milli-Q-Wasser mischen. Aliquots zu je 3 ml herstellen und bei -20°C bis zur Verwendung lagern.  
3 ml werden für 300 ml adipogenes Differenzierungs-Medium benötigt.

#### **DNA Lösung aus Salmon Testes**

Gesamtes Vial (250 mg) in 250 ml Milli-Q-Wasser/Triton-X 100/Tris-EDTA-Puffer lösen. In 2 ml Aliquots bei -20°C bis zur Verwendung lagern.

#### **EDTA (10 mM, pH 12,3)**

3,722 g EDTA werden in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst. Anschließend wird der pH Wert auf 12,3 eingestellt.

#### **Fast Red Lösung**

1 Tablette Fast Red wird in 2 ml Tris/HCl-Puffer mit pH 8,2 durch Schwenken gelöst. Die fertige Lösung muß bis zur Verwendung im Dunklen aufbewahrt werden. Fast Red zählt zum Sondermüll.

#### **Fibronektin (40 µg/ml)**

Das ganze Vial (1 mg) in 10 ml Milli-Q-Wasser lösen. Dies ergibt die Stock-Lösung von 100 µg/ml, welche in Aliquots von 1 ml aufgeteilt und bei -20°C gelagert wird. Zur Herstellung der Arbeitslösung von 40 µg/ml wird ein Aliquot der Stock-Lösung mit 1,5 ml 1 x PBS vermischt.

#### **β-Glycerolphosphat (FW 216,04)**

216,04 g/l (=1 M) in Milli-Q-Wasser lösen.  
Auf 300 ml osteogenes Differenzierungs-Medium werden 3 ml benötigt.

#### **Hyaluronidase (2 mg/ml)**

4 mg Hyaluronidase in 2 ml PBS mit pH 5,5 auflösen.

#### **Indomethacin (FW 357,8)**

7,156 mg/ml (=20 mM) in Ethanol unter Erwärmung lösen.  
Auf 300 ml adipogenes Differenzierungs-Medium werden 3 ml benötigt.

**Insulin (1 mg/ml)**

1 mg in 20 µl 1 M HCl lösen, dann 980 µl Milli-Q-Wasser zugeben.  
Auf 300 ml adipogenes Differenzierungs-Medium werden 3 ml benötigt.

**3-Isobutyl-1-Methylxanthin (FW 222,25)**

0,11 g/ml (=500 mM) in DMSO lösen. Auf 300 ml adipogenes Differenzierungs-Medium werden 300 µl benötigt.

**ITS-Supplement**

Pulver mit 5 ml 5 mM HCl lösen, dann mit 45 ml Milli-Q-Wasser auf 50 ml auffüllen. In 20 ml Aliquots bei -20 °C bis zur Verwendung lagern.  
20 ml werden auf 1 Liter Zellkultur-Medium benötigt.  
Auf 300 ml chondrogenes Differenzierungs-Medium werden 3 ml benötigt.

**MCDB 201**

Pulver unter Rühren (Magnetrührgerät) in ca. 900 ml Milli-Q-Wasser auflösen. Dann pH-Wert auf 7,1 einstellen. Anschließend Lösung auf 1 Liter auffüllen, sterilfiltrieren und in 400-ml-Aliquots bis zur Verwendung bei -20 °C lagern.  
400 ml werden für einen Liter fertiges Zellkultur-Medium benötigt.

**Natrium-Pyruvat (100 mM, 100 ml)**

Auf 300 ml chondrogenes Differenzierungs-Medium werden 3 ml benötigt.

**Ölrot O-Lösung**

Für die Stocklösung werden 0,5 g Ölrot O in 100 ml 99% Isopropanol gelöst.  
Für die Gebrauchslösung werden 6 Teile Stocklösung mit 4 Teilen destilliertem Wasser vermischt, 24 Stunden stehen gelassen und anschließend filtriert.

**PBS-Puffer 10 x**

Für einen 1 x PBS-Puffer werden 9 Teile destilliertes Wasser mit 1 Teil 10 x PBS-Puffer vermischt.

**Primärantikörper gegen Kollagen Typ I und Typ II**

Beide Primärantikörper müssen 1:1000 mit 1% BSA in PBS verdünnt werden. Hierfür löst man 0,1 g BSA in 10 ml 1 x PBS. Anschließend mischt man je 1 µl Primärantikörper mit je 999 µl 1% BSA/PBS. Die fertigen Lösungen werden vor Verwendung kurz gevortext.

**Prolin (FW 115,1)**

40,28 mg/ml (=0,35 M) in Milli-Q-Wasser lösen.

Auf 300 ml chondrogenes Differenzierungs-Medium werden 300 µl benötigt.
<b>Pronase (1 mg/ml)</b> 11 mg Pronase werden mit 11 ml 1 x PBS-Puffer mit pH 7,4 gelöst.
<b>Sekundärantikörper (goat anti mouse IgG)</b> Der Sekundärantikörper wird vor der Verwendung 1:500 in 1 x TBS-Puffer verdünnt.
<b>Streptavidin-Biotin Complex</b> Streptavidin und biotinylierte ALP müssen vor Verwendung je 45:5000 verdünnt werden. Das bedeutet, dass für 5000 µl Arbeitslösung 45 µl Streptavidin und 45 µl biotinylierte ALP mit 4910 µl Tris-Puffer (50 mM, pH 7,6) durch Schwenken vermischt werden. Die fertige Lösung muß bis zur Verwendung im Dunkeln aufbewahrt werden und darf max. ½ Stunde vor der Anwendung hergestellt werden.
<b>TBS-Puffer 10 x</b> Für 1 Liter TBS-Puffer 10 x werden 60,7 g Tris (basisch) und 87,65 g NaCl mit 41,5 ml HCl (32%) gemischt. Anschließend wird der pH Wert auf 7,6 eingestellt und die Lösung mit destilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Um einen 1 x TBS-Puffer zu erhalten, verdünnt man 1 Teil des 10 x TBS Puffers mit 9 Teilen destilliertem Wasser.
<b>TGF-β-3</b> Das gesamte Vial in 2 ml 4 mM HCl + 1 mg/ml BSA lösen. Dies ergibt eine Stocklösung von 1 µg/ml. Auf 10 ml chondrogenes Differenzierungs-Medium werden 100 µl benötigt. Dies ergibt eine Endkonzentration des Wachstumsfaktors von 10 ng/ml.
<b>Toluidinblau-Lösung (0,03%)</b> 3 g Toluidinblau-Pulver werden in 1000 ml destilliertem Wasser gelöst. Dies ergibt eine Stock-Lösung von 0,3 %. Vor der Verwendung wird 1 Teil dieser Lösung mit 9 Teilen destilliertem Wasser verdünnt.
<b>Tris-Puffer (50 mM)</b> Für 1 Liter Tris-Puffer wurden 7,88 g Tris mit 1000 ml destilliertem Wasser vermischt und der pH Wert anschließend auf 7,6 eingestellt.
<b>Triton-X 100 (0,01%)</b> Für 1 Liter Triton-X 100 (0,01%) wurden 100 µl Triton-X 100 mit 999,9 ml

destilliertem Wasser vermischt.

### Trypsin

Das aufgetaute Vial steril in Aliquots zu je 10 ml aufteilen. Die Aliquots werden dann bei -20 °C gelagert. Vor Verwendung für die Zellkultur werden 10 ml 10 x - Trypsin mit 90 ml sterilem, destilliertem Wasser vermischt. Die Gebrauchslösung wird bei 4 °C aufbewahrt.

## C. Kommerziell erhältliche Systeme

Name	Katalognummer	Firma
PDGF-AB ELISA Kit	DHD00B	Fa. R&D, Wiesbaden
TGF-β1 ELISA Kit	DB100	Fa. R&D, Wiesbaden

## D. Medien zur Kultivierung und Differenzierung von Zellen

Zellexpansionsmedium mit FCS	Firma	Stocklösung	für 1 Liter Medium	Endkonzentration
Dulbecco's modified Eagle's medium high Glucose (DMEM mit 4,5 g/l Glucose)	Gibco Life Techn. 41966		547,5 ml	
MCDB	Sigma M-6770		400 ml	
FCS	Biochrom KG S-0115		20 ml	2%
ITS Supplement	Sigma I-1884	50 x	20 ml	
Insulin				10 µg/ml
Transferrin				10 µg/ml
Selenit				10 ng/ml
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, A-2213		10 ml	100 IE/ml (Pen.) 100µg/ml (Strep.)
Dexamethason	Sigma D-2915	10 <sup>-5</sup> M	2 ml	0,02 µM
Ascorbinsäure- 2-phosphat	Sigma A-8960	0,173 M	580 µl	0,1 mM
Epidermal Growth Factor (EGF)	Strathmann Biotech	10 µg/ml	200 µl/200 ml frisch zugeben	10 ng/ml

ANHANG

Platelet-derived Growth Factor BB (PDGF-BB)	Strathmann Biotech	10 µg/ml	200 µl/200 ml frisch zugeben	10 ng/ml
---	--------------------	----------	------------------------------	----------

<b>Zellexpansionsmedium mit PRP</b>	<i>Firma</i>	<i>Stocklösung</i>	<i>für 1 Liter Medium</i>	<i>Endkonzentration</i>
Dulbecco's modified Eagle's medium high Glucose (DMEM mit 4,5 g/l Glucose)	Gibco Life Techn. 41966		547,5 ml	
MCDB	Sigma M-6770		400 ml	
PRP	Biochrom KG S-0115		6 ml pro 200 ml Medium frisch zugeben	3%
ITS Supplement	Sigma I-1884	50 x	20 ml	
Insulin				10 µg/ml
Transferrin				10 µg/ml
Selenit				10 ng/ml
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, A-2213		10 ml	100 IE/ml (Pen.) 100µg/ml (Strep.)
Dexamethason	Sigma D-2915	10 <sup>-5</sup> M	2 ml	0,02 µM
Ascorbinsäure- 2-phosphat	Sigma A-8960	0,173 M	580 µl	0,1 mM
Epidermal Growth Factor (EGF)	Strathmann Biotech	10 µg/ml	200 µl/200 ml frisch zugeben	10 ng/ml
Platelet-derived Growth Factor BB (PDGF-BB)	Strathmann Biotech	10 µg/ml	200 µl/200 ml frisch zugeben	10 ng/ml

ANHANG

<b>Osteogenes Differenzierungsmedium</b>	<i>Firma</i>	<i>Stocklösung</i>	<i>für 300 ml Medium</i>	<i>Endkonzentration</i>
DMEM high Glucose	Gibco Life Techn. 41966		261 ml	
FCS	Biochrom KG S-0115		30 ml	10%
Dexamethason	Sigma D-2915	$10^{-5}$ M	3 ml	0,0001 $\mu$ M (= $10^{-7}$ M)
Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma A-8960	0,173 M	300 $\mu$ l	0,17 mM
$\beta$ -Glycerolphosphat	Sigma G-9891	1 M	3 ml	10 mM
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, A-2213		3 ml	100 IE/ml (Pen.) 100 $\mu$ g/ml (Strep.)

<b>Chondrogenes Differenzierungsmedium</b>	<i>Firma</i>	<i>Stocklösung</i>	<i>für 300 ml Medium</i>	<i>Endkonzentration</i>
DMEM high Glucose	Gibco Life Techn. 41966		286 ml	
ITS Supplement	Sigma I-1884	100 x	3 ml	
Dexamethason	Sigma D-2915	$10^{-5}$ M	3 ml	0,1 $\mu$ M
Ascorbinsäure-2-phosphat	Sigma A-8960	0,173 M	300 $\mu$ l	0,17 mM
Natrium-Pyruvat	Sigma S-8636	100 mM	3 ml	1 mM
Prolin	Sigma P-4655	0,35 M	300 $\mu$ l	0,35 mM
BSA	Sigma A-9647	100 mg/ml	3,75 ml	1,25 mg/ml
TGF $\beta$ -3	Sigma T-5425	1 $\mu$ g/ml	100 $\mu$ l	10 ng/ml

<b>Adipogenes Differenzierungsmedium</b>	<i>Firma</i>	<i>Stocklösung</i>	<i>für 300 ml Medium</i>	<i>Endkonzentration</i>
DMEM high Glucose	Gibco Life Techn. 41966		260 ml	
FCS	Biochrom KG S-0115		30 ml	10%
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, A-2213		3 ml	100 IE/ml (Pen.) 100µg/ml (Strep.)
Dexamethason	Sigma D-2915	10 <sup>-4</sup> M	3 ml	0,001 µM
Insulin	Sigma I-2767	1 mg/ml	3 ml	0,01 mg/ml
Indomethacin	Sigma I-7378	20 mM	3 ml	0,2 mM
Isobutyl-methyl-xanthine	Sigma I-5879	500 mM	300 µl	0,5 mM

### ***E. Geräte und Verbrauchsmaterialien***

<b>Name</b>	<b>Information</b>	<b>Katalognummer</b>	<b>Firma/Ort</b>
Bottle Top Filter	Steritop™, 150 ml, 0,22 µm	No. SCGPT 01 RE	Millipore Corporation, Bedford, Massachusetts 01730, USA
Cryo-Einfriergerät		No. 479-3200	Fa. Nalgene, Roskilde/Dänemark bzw. Wiesbaden, über VWR, Darmstadt
Cryoviales	Cryoröhrchen mit Außengewinde	No. E 315.1	Fa. Roth, Karlsruhe
Eppendorf Röhrchen	Safe-Lock Tubes 1,5 ml, 2,0 ml	No. 9409341	Eppendorf AG, Hamburg über Fisher Scientific, Schwerte
Falcon Tubes	15 ml	No. 352096	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NY, USA bzw. Becton Dickinson, Heidelberg

	50 ml	No. 352070	
Fresenius Bio P Plus	Filter zur Leukocyten-Depletion		Fresenius HemoCare, Bad Homburg
Eppendorf-Pipetten	2µl, 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl; 8er-Multikanalpipetten 50µl, 100µl		Fa. Eppendorf, Hamburg
Gilson-Pipetten	2µl, 10µl, 100µl, 200µl, 1000µl		Fa. Gilson, Middleton, WI 53562-0027, USA
Magnetrührer	Typ RH basic		IKA Labortechnik, Köln
Mikroskopier-Einschlußmittel	HICO-MIC, 500 ml		Fa. Hirtz+Co, Köln
Mikroskop Zellkultur	Axiovert 25, 10x Objektiv		Carl Zeiss AG, Oberkochen
Mikrotiterplatten	96-well Mikrotiterplatte ELISA Flachboden	No. 655101	Fa. Greiner bio one, Frickenhausen
Mikrotiterplatten, schwarz	96-well Mikrotiterplatte	No. 137101	Fa. Nunc
Petrischalen		No. 294763310 oder 35 1029	Becton Dickinson über Fisher Scientific, Schwerte
pH-Meter	Typ 761 Calimatic		Fa. Knick, Berlin
Pipet-Boy			Fa. Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten	2, 5, 10, 20 ml		Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NY, USA
Pipettenspitzen	10, 100, 1000µl		Fa. Greiner bio one, Frickenhausen
Polytron	PT 2100 Dispergier-Aggregat PT-DA 2107/2EC, Durchmesser 7 mm		Fa. Kinematica Inc., Cincinnati, Ohio, USA
PP-Röhrchen	2 ml	No. 1156261	Fa. Greiner bio one, Frickenhausen
Schüttler	Typ Mini Rocker		Fa. Kisker, Steinfurt

S-Monovetten	Serum, 9 ml, 92 x 16 mm, Standarddruck, einzeln steril verpackt, No.	No. 02.1063.020	Fa. Sarstedt, Nümbrecht
Sterilbank	Hera Safe, Typ H 518		Heraeus Instruments, Hanau
Victor <sup>2</sup> <sup>TM</sup>	Victor <sup>2</sup> 1420 Multilabel Counter		Wallac Distribution GmbH, Freiburg
Vortex	Typ REAX 2000		Fa. Heidolph, Nürnberg
Waage	Typ BP 1200, max. 1200 g		Sartorius AG, Göttingen
Waage, (Präzisions-)	Typ BP 221-S, max. 220 g, min. 10 mg		Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad	Typ 1005		Fa. EFL, Burgwedel
Zellkulturflaschen	Easy Flask Zellkulturflaschen, T 175 (175 cm <sup>2</sup> , No. 3058093), T 75 (75 cm <sup>2</sup> , No. 9477255 oder 156499), T 25 (25 cm <sup>2</sup> );		Nunc, Roskilde/Dänemark bzw. Wiesbaden, über Fisher Scientific, Schwerte, Germany
Zellkulturplatten	96-well Rundboden (No. 9407471), 12-well, (No. 150628), 24-well-Zellkulturplatte, 1,9 cm <sup>2</sup> /well (No. 662160 oder 142485), 6-well Zellkulturplatte, 9,6 cm <sup>2</sup> /well, No. 140685)		Nunc, Roskilde/Dänemark bzw. Wiesbaden, über Fa. Greiner bio one, Frickenhausen; (Fa. Nalge Nunc International, Rochester, NY 14625, USA)
Zentrifuge	Megafuge 1.0 R		Heraeus Instruments, Hanau
Zentrifugendaten (g ⇔ rpm)	1000 rpm = 209 x g		
	1400 rpm = 409 x g		
	1500 rpm = 470 x g		
	1800 rpm = 677 x g		
	2700 rpm =		

ANHANG

---

	1524 x g		
	4000 rpm = 3345 x g		

## **Erklärung**

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

## Danksagungen

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. W. Richter für die jederzeit gewährte fachliche Unterstützung, die unzähligen guten Ratschläge, den zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz und die technischen Mittel bedanken.

Für die gute Betreuung bin ich auch Dr. P. Kasten sehr dankbar.

Prof. Dr. M. Kramer danke ich für die Korrektur meiner Arbeit und die Beratung bei der Anfertigung dieser Dissertation.

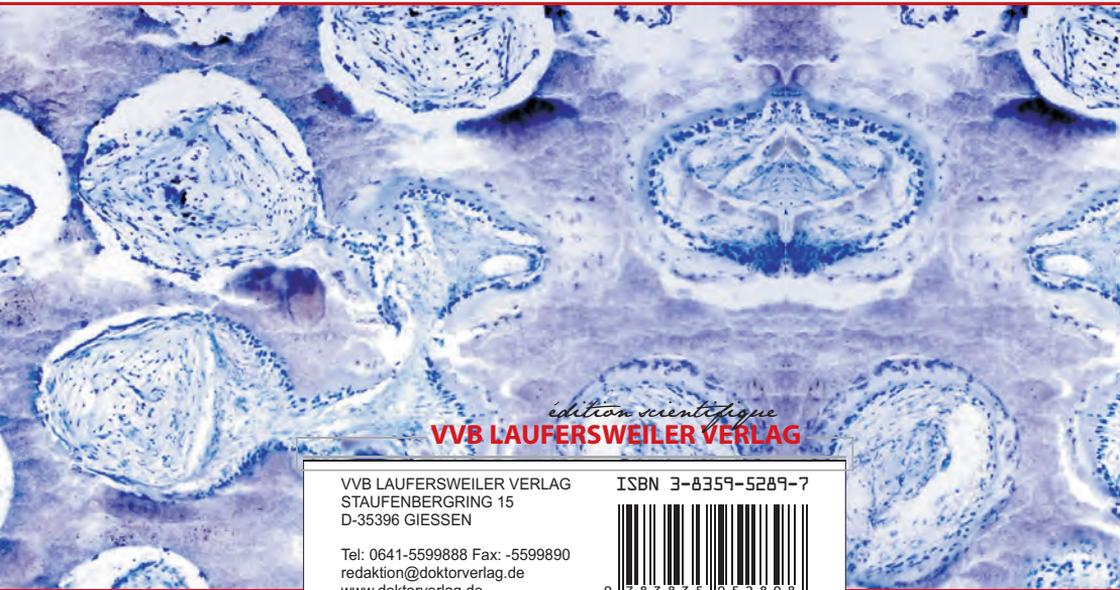
Ich danke Alexandra Krauthoff für die technische Hilfe bei der Laborarbeit und der Histologie sowie Dr. S. Schneider und Dr. M. Zimmermann-Stenzel für die Beratung bei der statistischen Datenanalyse.

Zudem bedanke ich mich bei Dr. H. Lorenz für die Hilfe bei den in vivo Experimenten, bei Dr. A. Leo für das zur Verfügung gestellte Plättchenreiche Plasma, bei Dr. F. Geiger für die Entnahme von Knochenmarksproben und bei Dr. U. Krause für die Hilfe bei der Durchführung des FACS-Scans. K. Szalay danke ich für die Unterstützung bei der Anfertigung und Auswertung der  $\mu$  CT-Bilder.

Die Dr. h.c. Robert Mathys Stiftung stellte dieser Studie die Biomaterialien zur Verfügung.

Finanzielle Unterstützung erhielt ich von der Stiftung Orthopädische Universitätsklinik Heidelberg sowie der Stiftung „Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen“ (AO) (03-K71), Davos, Schweiz.

Das neue Zellexpansionsmedium mit PRP wurde zum Patent angemeldet.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

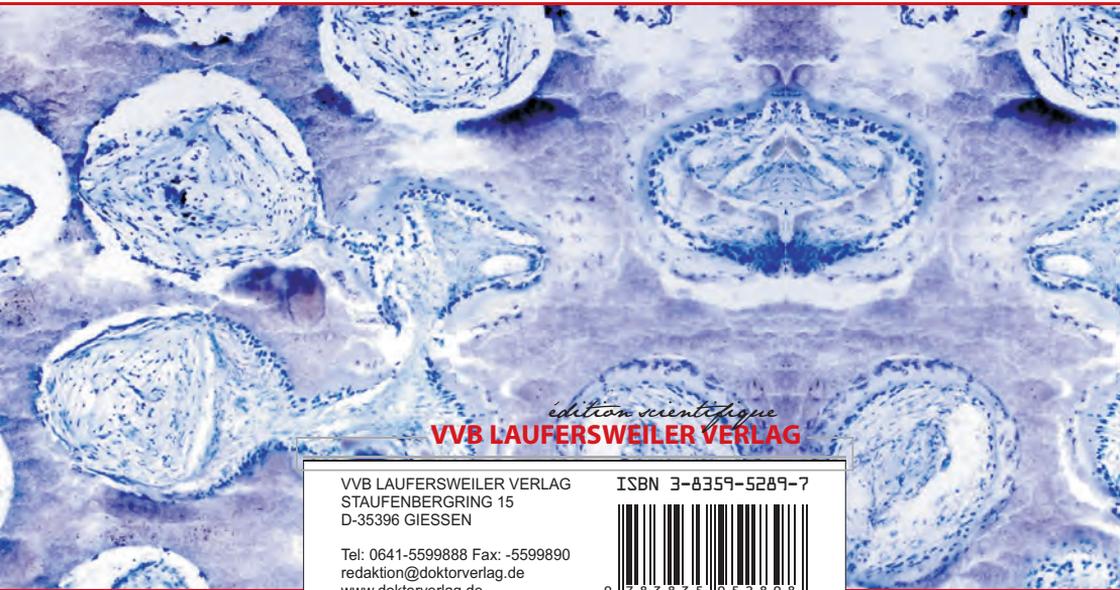
VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5289-7



9 1783835 1952898



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5289-7



9 1783835 1952898