

Aus dem Fachbereich Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

Zentrum der Chirurgie  
Klinik für Unfall-, Hand-und Wiederherstellungschirurgie  
Direktor: Prof. Dr. med. Ingo Marzi

**Charakterisierung und Kultivierung von bone marrow mononuclear cells  
auf verschiedenen Biomaterialien *in vitro***

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main

vorgelegt von

René Danilo Verboket

aus Mönchengladbach

Frankfurt am Main, 2014

Dekan: Prof. Dr. med. J. Pfeilschifter  
Referent: Prof. Dr. phil. nat. D. Henrich  
Korreferent: Prof. Dr. J. Barker  
Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 2014



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>8</b>
<b>1.1</b>	<b>Knochenheilung</b>	<b>8</b>
1.1.1	Primäre Knochenheilung	8
1.1.2	Sekundäre Knochenheilung	9
	Verletzungsphase	9
	Entzündungsphase	9
	Granulationsphase	10
	Phase der Kallushärtung	10
	Phase des Remodelling	11
<b>1.2</b>	<b>Critical size defect</b>	<b>11</b>
1.2.1	Derzeitiger Behandlungsgoldstandard, autologe Transplantate	11
1.2.2	Allogene Transplantate	12
1.2.3	Xenogene Transplantate	13
1.2.4	Synthetische Transplantate	13
1.2.5	Adjuvantien	13
<b>1.3</b>	<b>Tissue Engineering</b>	<b>14</b>
1.3.1	Trägermaterial	14
	Hydroxyapatit	15
	Tricalciumphosphat	16
	Demineralisierter Knochen	17
1.3.2	Zellarten für Tissue Engineering-Anwendungen	17
	EPC	19
	MSC	19
<b>1.4</b>	<b>Problematik</b>	<b>20</b>
<b>1.5</b>	<b>Lösungsansatz bone marrow-derived mononuclear cells (BMC)</b>	<b>21</b>
<b>1.6</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>27</b>
<b>2.1</b>	<b>Apparaturen und Materialien</b>	<b>27</b>
2.1.1	Knochenersatzmaterialien	30
2.1.2	Zellen und Blutplasma	31
2.1.3	Nährmedien	32

2.1.4	Puffer und Lösungen	32
2.1.5	Zellfärbung	34
2.1.6	ELISA	34
2.1.7	RT-PCR	35
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>36</b>
2.2.1	Ansätze	36
2.2.2	Beschichtung des Knochenersatzmaterials	36
2.2.3	Isolierung von BMC	37
2.2.4	Aussaat	38
2.2.5	Bestimmung der Aussaat-effizienz mittels Zellzählung	38
2.2.6	Nachweis von BMC sowie Nachweis einer endothelialen Differenzierung auf Granulat mittels Fluoreszenzmikroskopie (DAPI-/DiL-Färbung)	39
2.2.7	Nachweis der metabolischen Aktivität der BMC auf den Testsubstanzen (MTT-Assay)	40
2.2.8	FACS Analyse	41
2.2.9	ELISA	42
2.2.10	Nachweis zelltypspezifischer Genexpression mittels RT-PCR	43
2.2.11	RNA-Isolierung	43
2.2.12	cDNA-Synthese	44
2.2.13	Realtime PCR	45
2.2.14	Nachweis von BMC mittels Rasterelektronenmikroskopie	45
2.2.15	Nachweis von BMC in DBM mittels Hämatoxylin-EosinG-Färbung	46
2.2.16	Nachweis spezifischer Zelltypen in DBM mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung	47
2.2.17	Nachweis von Zellen auf DBM mittels 4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) Färbung	47
2.2.18	Flüssigkeitsabsorption durch die Testgranulate	47
2.2.19	Statistik	48
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
<b>3.1</b>	<b>Vorversuche</b>	<b>49</b>
3.1.1	Adhäsionstest für BMC	49

3.1.2	Nährmediumtest für BMC	49
3.1.3	Vitalitätstest für BMC	50
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse erster Versuchsteil – Beschichtungsvergleich</b>	<b>50</b>
3.2.1	Aussaateffizienz	50
3.2.2	Anteile adhätierender Zellpopulationen	51
3.2.3	Semiquantitative Bestimmung adhätierender Zellen in Abhängigkeit von Beschichtung und Medium	53
3.2.4	Metabolische Aktivität der BMC in Abhängigkeit von Beschichtung und Medium	58
<b>3.3</b>	<b>Ergebnisse zweiter Versuchsteil – Materialvergleich</b>	<b>60</b>
3.3.1	Nachweis von BMC auf den Knochenersatzstoffen mittels Rasterelektronenmikroskopie	60
3.3.2	Aussaateffizienz	64
3.3.3	Anteile adhätierender Zellpopulationen	65
3.3.4	Semiquantitative Bestimmung adhätierender Zellen in Abhängigkeit des Trägermaterials	67
3.3.5	Metabolische Aktivität der BMC in Abhängigkeit des Trägermaterials	69
3.3.6	Sekretion von VEGF	71
3.3.7	ELISA SDF-1a	73
3.3.8	Genexpressionanalyse mittels RT-PCR	73
	Von-Willebrand-Faktor-Genexpression	73
	Vascular Endothelial Growth Factor-Genexpression	74
	Kollagen 1 alpha-Genexpression	75
	Bone gamma-carboxyglutamate protein-Genexpression	75
	Alkalische Phosphatase-Genexpression	76
	Zusammenfassung RT-PCR	77
3.3.9	Relative Flüssigkeitsaufnahmekapazität der Materialien	78
3.3.10	Rasterelektronenmikroskopischer Nachweis von BMC auf den Knochenersatzmaterialien	80
3.3.11	Histologischer Nachweis von BMC in DBM	82
3.3.12	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von BMC in DBM-Strukturen	84
3.3.13	Zelltypspezifische Charakterisierung von BMC auf DBM	86

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>89</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>102</b>
<b>6</b>	<b>Summary</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>106</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>108</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>110</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>112</b>
<b>11</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>126</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung</b>	<b>128</b>
<b>13</b>	<b>Schriftliche Erklärung</b>	<b>129</b>

# 1 Einleitung

Bei einer Fraktur, also der teilweisen oder kompletten Unterbrechung der Kontinuität des Knochens, hervorgerufen durch überdurchschnittliche Belastung, können neben der normalen Knochenheilung verschiedene Komplikationen auftreten. Eine dieser Komplikationen ist der *critical size defect*, der eine normale Heilung des Knochens verhindert.

## 1.1 Knochenheilung

Damit eine Fraktur gut verheilt, sind verschiedene Faktoren von Wichtigkeit. Die Fragmente müssen einen ausreichenden Kontakt zueinander haben, sie müssen im Verbund eine ausreichende Stabilität zueinander haben und sie müssen gut durchblutet werden. Bei Vorhandensein dieser Faktoren findet eine primäre Knochenheilung statt, hierbei wird kein Kallus gebildet. Wenn einer dieser Faktoren nicht vorhanden ist oder sich nicht herstellen lässt, bildet sich um die Knochenbruchstücke herum und zwischen ihnen Kallusgewebe, das sich im Laufe der Zeit zu Knochengewebe differenziert. Diese Art der Frakturheilung bezeichnet man als sekundär. Es konnte gezeigt werden, dass die primäre Knochenheilung vor allem bei der direkten Osteosynthese auftritt, während bei konservativer Behandlung in Gips und bei vielen Osteosyntheseverfahren, wie dem Fixateur externe oder der Marknagelung, die sekundäre Knochenheilung stattfindet.<sup>1,2</sup>

### 1.1.1 Primäre Knochenheilung

Primäre oder direkte Frakturheilung findet statt, wenn die Havers-Kanäle direkt durch angiogene Knochenneubildung in das benachbarte Frakturende einwachsen. Dies geschieht in erster Linie bei gut zueinander fixierten, gut durchbluteten und eng aneinander liegenden Knochenfragmenten. Man bezeichnet diese Art der Frakturheilung auch Kontaktheilung. Die Substantia Spongiosa wächst von den zugewandten Bruchstücken durch Neubildung von

Osteonen aufeinander zu und fusioniert. Auch bei Fissuren oder stabilen Plattenosteosynthesen, die mit Kompression adaptiert werden, findet diese Form der Frakturheilung statt.

Sollte jedoch ein Spalt zwischen den Fragmenten bestehen bleiben, wird bei der Spalthheilung zunächst Geflechtknochen im Frakturspalt gebildet, der im Laufe der Zeit durch Havers-Umbau ein funktionelles Remodelling erfährt.<sup>1</sup>

### 1.1.2 Sekundäre Knochenheilung

Sekundäre oder indirekte Knochenheilung erfolgt in verschiedenen Schritten über narbige und knorpelige Zwischengewebe. Sie tritt bei weniger guter Fixation und Adaption der Bruchenden oder auch bei größeren Knochendefekten, wie zum Beispiel einer Trümmerfraktur, auf. Die Prozesse bei der sekundären Knochenheilung laufen nach einem festen Muster ab:

1. Verletzungsphase
2. Entzündungsphase
3. Granulationsphase
4. Phase der Kallushärtung
5. Phase des Umbaus (auch: Remodelling des Knochens)

#### *Verletzungsphase*

Die Verletzungsphase zeichnet sich durch eine Gewalteinwirkung und/oder eine erhöhte Belastung auf den Knochen aus. Hierdurch kommt es zu Kontinuitätsunterbrechungen der Kortikalis, Spongiosa und des Periosts. Dabei bilden sich ein Frakturhämatom und unterschiedlich stark ausgeprägte Weichteilverletzungen.

### *Entzündungsphase*

Durch das entstandene Frakturhämatom kommt es zur Einwanderung von Granulozyten, Monozyten und Mastzellen. Letztere sorgen für eine Histaminausschüttung, neben der es zusätzlich noch zur Aktivierung von Cytokinen und Wachstumsfaktoren kommt. Diese Faktoren sorgen für eine Gefäßeinsprossung und die Phagozytose des Frakturhämatoms. Gesteigerte Durchblutung des Periosts aktiviert Fibroblasten und sorgt für die Ausdifferenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten, welche neuen Knochen bilden.

### *Granulationsphase*

Die Granulationsphase wird auch Phase des weichen Kallus genannt, da ein noch nicht verkalktes Kallusgewebe gebildet wird. In dieser Phase entsteht Granulationsgewebe, in dem schon Mineraldepots angelegt werden. Trotzdem ist aber immer noch eine interfragmentäre Bewegung möglich. Die toten Zellen der Fragmentenden werden durch Osteoklasten abgebaut und die Osteoblastenproliferation wird gefördert. Durch das Auftreten der ersten Chondroblasten und die subperiostale Knochenneubildung durch Osteoblasten wird die primäre Kallusreaktion sichtbar. Nach 3 - 4 Wochen sind die Fraktarenden teils durch Knorpel und teils durch Bindegewebe wieder weich miteinander verbunden.

### *Phase der Kallushärtung*

Der vorhandene weiche Kallus wird mineralisiert und dadurch zunehmend fester. Es entsteht Geflechtknochen, dessen Struktur sich nach den physiologischen Belastungszonen des betroffenen Knochens ausrichtet. Dieser Prozess der Kallushärtung dauert ungefähr 3 bis 4 Monate, in denen der Kallus durch die zunehmende Verknöcherung an Festigkeit zunimmt.

## *Phase des Remodelling*

Die Phase des Remodelling zeichnet sich durch die Rückbildung des Kallusgewebes aus. Aus dem vorhandenen Geflechtknochen entsteht durch Auf-, Ab- und Umbau wieder lamellärer Knochen. Versorgt wird dieser nun wieder über das Periost und Endost und die Haversschen und Volkmanschen Kanäle. Bis die ursprüngliche Knochenstruktur komplett wiederhergestellt und das Remodelling abgeschlossen ist, vergehen 6 bis 24 Monate.<sup>2</sup>

### **1.2 Critical size defect**

*Critical size defects* oder Defekte kritischer Größe sind als die kleinste Größe einer intraossären Verletzung im einzelnen Knochen definiert, die nicht spontan verheilt.<sup>3,4</sup> Der Versuch, diesen Defekt kritischer Größe seitens des Organismus zu reparieren, endet in der Formation von fibrösem Bindegewebe.<sup>4</sup> Die Größe, ab der man einen Defekt als einen Defekt kritischer Größe bezeichnet, ist abhängig vom Alter des Patienten und von der Funktionsfähigkeit seines Organismus.<sup>4,5</sup> Generell lässt sich sagen, dass die Mindestgröße für einen Defekt kritischer Größe über den 1,5fachen Durchmesser des Knochens definiert ist.<sup>4</sup> Um einen solchen Defekt zur Heilung zu bringen ist es also nötig, den Knochen zu unterstützen.

#### 1.2.1 Derzeitiger Behandlungsgoldstandard, autologe Transplantate

Der derzeitige Goldstandard bei der Behandlung von *critical size defects* ist die Verwendung von autologem Knochen. Dieser wird in der Regel an der Crista iliaca des vorderen oder hinteren Os ileum entnommen<sup>6</sup> und gilt durch seine Festigkeit und seine engmaschige Bälkchenstruktur als die Spongiosa, die die höchste osteogene Potenz besitzt.<sup>7-9</sup> Augenblicklich ist auch eine neue Technik auf dem Markt, die sich zu etablieren beginnt. Bei der RIA-Technik werden mittels einer Markraumböhrung und Aspiration des Aushubs mittels Flüssigkeit große Mengen an Spongiosa entnommen.<sup>10</sup> Corticospongiöse Späne werden

seit vielen Jahren bei Defekten, die zusätzlich einer mechanischen Stabilisierung bedürfen, verwendet.<sup>11</sup> Bei dieser Technik ist die Größe jedoch auf circa 5 cm Länge begrenzt, da die Späne sonst nicht sicher einheilen; die optimale Größe der Späne beträgt zwischen 7 und 10 mm.<sup>12</sup> Bei größeren und vor allem längeren Defekten an Röhrenknochen eignet sich das aufwendigere Verfahren der Distraktionsosteogenese, bei dem der Knochen über einen bestimmten Zeitraum, während seiner Heilung, auseinandergezogen wird.<sup>2,13</sup> Vorteil dieser zuvor genannten Verfahren ist die Tatsache, dass körpereigenes Material verwendet werden kann, wodurch es nicht zu Abstoßungsreaktionen durch das Immunsystem kommt, und die Tatsache, dass corticospongiöse Späne osteoinduktiv und osteokonduktiv wirken.<sup>2</sup> Problematisch bei der Verwendung von autologem Knochenmaterial aus dem Os ileum oder anderen geeigneten Knochen ist die Möglichkeit von Infektionen, Nekrosen, Schmerzen oder Blutungen an der Entnahmestelle und die Möglichkeit einer Osteonekrose oder Infektion des Knochenspanns.<sup>14-16</sup> Da besonders die Nekrotisierung der Entnahmestelle zu lange anhaltenden, starken Schmerzen führt, die oft stärker sind als die Schmerzen im eigentlichen Operationsgebiet, ist die Forschung bemüht, suffiziente Alternativmethoden zu finden.<sup>17</sup>

### 1.2.2 Allogene Transplantate

Als eine Lösung für das Problem der autologen Knochentransplantate bieten sich allogene Knochen Spenden an. Diese sind mengenmäßig nur durch das Vorhandensein von Spendern limitiert. Gewonnen werden sie häufig im Rahmen einer Femurkopffosteotomie bei endoprothetischer Versorgung eines Hüftgelenks. Da es sich bei den Transplantaten um Spenderknochen handelt, können sie jedoch Abstoßungsreaktionen oder eine mögliche Übertragung von Infektionskrankheiten hervorrufen.<sup>18,19</sup> Die Hersteller der Transplantate begegnen dieser Gefahr mit verschiedener Behandlung der Transplantate. So ist eine Möglichkeit, die Sicherheit dieser zu gewährleisten, die Bestrahlung des Transplantats.<sup>20</sup> Im Vergleich mit autologen Knochen haben allogene Transplantate den Nachteil, dass sie im Organismus nur osteokonduktiv wirken

<sup>2</sup> und dass sie, wenn sie eine bestimmte Größe überschreiten, im Laufe der Zeit nur schlecht einheilen.<sup>21</sup>

### 1.2.3 Xenogene Transplantate

Xenogene Transplantate stellen eine weitere Alternative zu den zuvor genannten Knochenersatzmaterialien dar und sind damit die dritte Gruppe der Knochenersatzstoffe. Sie sind kostengünstig und in ausreichender Menge herzustellen, jedoch gibt es auch in dieser Gruppe der Knochenersatzstoffe Probleme mit Infektionsübertragungen und Abstoßungsreaktionen auf Grund der Verschiedenheit der Spezies von Spender und Empfänger. Dennoch bieten sie eine gewisse osteokonduktive Wirkung und eine gute Bioresorbierbarkeit.<sup>22</sup>

### 1.2.4 Synthetische Transplantate

Synthetisch hergestellte Knochenersatzmaterialien stellen die vierte Gruppe der Knochenersatzstoffe dar. Da sie industriell hergestellt werden können, sind sie mengenmäßig nicht begrenzt, jedoch ist ihre Produktion sehr kostenintensiv. Es sind viele verschiedene Materialien auf dem Markt erhältlich, die sich chemisch und strukturell stark unterscheiden. So sind die Biokompatibilität und die Biofunktionalität der verschiedenen Materialien sowie die Biodegradierbarkeit unterschiedlich und abhängig vom Herstellungsprozess und der Materialchemie. Gerade die Biodegradierbarkeit ist bei den synthetischen Knochenersatzmaterialien ein Problem. Zum Teil lösen sie sich während der Knochenheilung auf und sind nicht mehr nachweisbar, doch werden auch Fälle beschrieben, in denen das Material abgekapselt und nicht integriert in den Knochen vorgefunden wurde.<sup>23</sup>

### 1.2.5 Adjuvantien

Es besteht die Möglichkeit, die Knochenersatzmaterialien durch Adjuvantien zu unterstützen. Hier konnte gezeigt werden, dass die *bone morphogenetic*

*proteins* (BMP-2 und BMP-7) osteoinduktiv wirken, bei großen Defekten alleine aber nicht geeignet sind, was eine Kombination mit Knochenersatzmaterialien sinnvoll macht.<sup>24</sup>

Genau wie die *bone morphogenetic proteins* haben auch thrombozytenreiches Plasma (platelet rich plasma, PRP) und demineralisierter Knochen osteoinduktive Eigenschaften.<sup>23</sup>

### **1.3 Tissue Engineering**

Das Tissue Engineering ist ein Verfahren, dessen Ziel es ist, fehlendes Gewebe des Patienten durch im Labor angefertigte, präformierte und biologisch verträgliche Substitute zu ersetzen. Diese Substitute sollen zur Erneuerung, Bewahrung oder Verbesserung der Gewebefunktion beitragen.<sup>25</sup> So werden lebende Zellen eines Organismus außerhalb kultiviert, um dann in den Organismus verbracht zu werden und so seine Gewebefunktion wiederherzustellen.<sup>24,26,27</sup> Beim Tissue Engineering des Knochens werden nach Wintermantel et al.<sup>28</sup> vier verschiedene Komponenten benötigt: ein strukturelles Gerüst (Trägermaterial), lebende Zellen oder Gewebe, stattfindende Signaltransduktion an den lebenden Bestandteilen und ein geeignetes Medium bzw. der Organismus. Seitdem das Tissue Engineering Konzept zum Anfang der neunziger Jahre erstmals beschrieben wurde,<sup>29</sup> wurden zu jedem der Teilaspekte des Tissue Engineerings ausführliche Studien durchgeführt. So wurde zum Beispiel versucht, die Zellarten zu bestimmen, die am besten für das Tissue Engineering des Knochens geeignet sind<sup>26,30</sup> und auch die Interaktion zwischen Trägermaterial und Zellen wurde genau untersucht.<sup>31</sup> Dennoch lässt ein klinischer Durchbruch in der Orthopädie oder in der Unfallchirurgie auf Grund der Komplexität der Vorgänge und der Handhabung noch auf sich warten.

#### **1.3.1 Trägermaterial**

Die Wahl des Trägermaterials scheint im Tissue Engineering des Knochens eine wichtige Rolle zu spielen. Es muss eine ausreichende mechanische

Stabilität und geeignete Beschaffenheit für die Aussaat von Zellmaterial besitzen, hier spielen Porengröße und Anordnung der Poren im Raum eine wichtige Rolle. Zudem spielt auch die biologische Interaktivität zwischen Gerüst und ausgesäten Zellen eine große Rolle.<sup>31</sup>

Van Heest beschreibt das ideale Trägermaterial in seiner Arbeit mit folgenden Punkten:<sup>31</sup>

- Das Material sollte eine ausreichende Porosität bei einem großen Oberflächen/Volumen-Verhältnis besitzen. Dadurch kann eine gleichmäßige Zellbesiedlung und Zellmigration gewährleistet werden.
- Das Material sollte optimale mechanische Stabilität und Plastizität besitzen, um den Defekt optimal aufzufüllen.
- Das Material sollte eine hohe Biokompatibilität besitzen, um immunologische Reaktionen zu vermeiden.
- Das Material sollte gut resorbierbar sein und keine toxischen Abbauprodukte aufweisen, um ein physiologisches Remodelling des Gewebes zu erreichen.
- Das Material sollte eine gute Zelladhäsion in der Defektzone mit Proliferation und gewebsspezifischer Differenzierung ermöglichen.

Hauptsächlich werden Materialien aus Tricalciumphosphat und Hydroxyapatit verwendet, da diese Werkstoffe viele der von van Heest proklamierten Fähigkeiten aufweisen. Doch auch demineralisierter Knochen ist als Trägermaterial geeignet.

### *Hydroxyapatit*

Da Hydroxyapatit mit ungefähr 40% der mineralische Hauptbestandteil des Knochens ist, bildet es eine geeignete Grundlage für Knochenersatzmaterialien. Hydroxyapatite können zum Beispiel aus boviner Spongiosa oder Korallen

mittels Pyrolyse und anschließenden Sinterungsprozessen gewonnen werden.<sup>32</sup> Es entsteht ein hexagonales Kristallgitter mit einem Calcium-Phosphor Verhältnis von 5:3. Durch die Sinterungsprozesse wird die Porosität des Materials verringert, was eine Steigerung der Dichte und der Festigkeit zur Folge hat.<sup>33</sup> Hydroxyapatit kann vom umliegenden Knochen durchbaut werden<sup>34</sup> und wird dadurch gut in den vitalen Knochen integriert. Für eine gute Osteoinduktion spielt die Größe der Poren und ihr Volumen eine entscheidende Rolle. Bei Herstellung der Hydroxyapatit-Keramik aus biologischem Material ist eine optimale Porengröße bereits vorhanden. Bei rein synthetisch hergestellten Hydroxyapatit-Keramiken müssen diese durch besondere Herstellungsverfahren erst erzeugt werden.<sup>35</sup> Ein Nachteil der Hydroxyapatit-Keramiken ist ihre schlechte Resorbierbarkeit. Es können sogar nach Jahren noch Keramikpartikel innerhalb des Knochens gefunden werden, die unter Umständen die Stabilität des Knochens negativ beeinflussen und chronische Entzündungen hervorrufen können.<sup>33</sup>

### *Tricalciumphosphat*

Calciumphosphat ist genau wie Hydroxyapatit ein Bestandteil des Knochens. Tricalciumphosphat(TCP)-Keramiken werden auf ähnliche Weise hergestellt wie synthetische Hydroxyapatit-Keramiken. Sinterungsprozesse führen zu TCP-Keramiken, die im nächsten Schritt chemischen Lösungsprozessen unterzogen werden. Diese Lösungsprozesse bilden die Grundlage für die Unterscheidung von  $\alpha$ -TCP und  $\beta$ -TCP.<sup>35</sup> Tricalciumphosphat ist sehr biokompatibel,<sup>36</sup> fördert die Einsprossung von Zellen und Gefäßen und geht eine direkte Verbindung mit der knöchernen Struktur ein.<sup>37</sup> Die verschiedenen TCP-Keramiken unterscheiden sich hauptsächlich in der Beschaffenheit der Poren und Kanäle sowie in ihrer geometrischen Struktur, doch auch ihre biomechanische Beschaffenheit<sup>38</sup> und ihr Abbau im Organismus sind verschieden.<sup>39,40</sup>

## *Demineralisierter Knochen*

Demineralisierter Knochen wird schon seit 1889 zur Auffüllung von Knochendefekten verwendet.<sup>41</sup> Das Material kann hierbei tierischen oder humanen Ursprungs sein. In verschiedenen Studien wurde belegt, dass demineralisierte Knochenmatrix sowohl osteoinduktive als auch osteokonduktive Eigenschaften besitzt und dass das Material vom Organismus komplett abgebaut werden kann.<sup>42-44</sup> Die Bedenken beim Einsatz demineralisierten Knochens fokussieren sich hauptsächlich auf den Bereich der mit dem Material übertragbaren Krankheiten. Jedoch konnte gezeigt werden, dass der Prozess der Demineralisierung zu einer ähnlichen Sicherheit bezüglich des Infektionsschutzes führt wie der, der bei Bluttransfusionen als sicher erachtet wird.<sup>45</sup> Zusätzlich werden außerdem Chemikalien wie Peressigsäure angewendet, um das Material zu sterilisieren.

### 1.3.2 Zellarten für Tissue Engineering-Anwendungen

Aktuell werden im Tissue Engineering zwei Konzepte bezüglich der Herkunft der Zellen verfolgt. Es werden Zellen eingesetzt, die aus dem Pool der Stammzellen stammen, und Zellen, die nicht aus diesem Pool stammen. Die Anwendungsgebiete sind in nachfolgenden Tabellen genauer ausgeführt.

Tabelle 1-1: Anwendungsgebiete des nicht stammzellbasierten Tissue Engineering

#### Anwendungsgebiete des nicht stammzellbasierten Tissue Engineering <sup>46</sup>

Blasenepithel	Menisken
Knorpel (Ohr, Nase und Gelenke)	Mundschleimhaut
Herzklappen	Speicheldrüsen
Trachea	Ureter
Urethra	Niere

Tabelle 1-2: Anwendungsgebiete des stammzellbasierten Tissue Engineering

Anwendungsgebiete des stammzellbasierten Tissue Engineering

Blutgefäße <sup>47,48</sup>	Leber <sup>49</sup>
Pancreas <sup>50</sup>	Knorpel <sup>51</sup>
Nervengewebe <sup>52</sup>	Kornea <sup>53,54</sup>
Skelettmuskulatur <sup>55,56</sup>	Dentin <sup>57</sup>
Haut <sup>58,59</sup>	Herzmuskulatur <sup>48,60</sup>
Knochen <sup>61-63</sup>	

Für das Tissue Engineering des Knochens werden zurzeit Stammzellen und Osteoblasten verwendet. Als Stammzellen bezeichnet man besondere Zelltypen, die die Fähigkeit zur fortgesetzten Selbsterneuerung besitzen und die sich unter bestimmten Voraussetzungen zu Zellen unterschiedlicher Spezialisierung differenzieren können. Man unterscheidet die Stammzellen nach ihrer Herkunft. So sind pluripotente embryonale Stammzellen bekannt, die sich in vivo und in vitro in alle drei Keimblätter ausdifferenzieren können und aus der Zellmasse der Blastozyste stammen.<sup>64</sup> Zudem kennt man adulte multipotente Stammzellen, die man als Vorläuferzellen in sehr vielen Geweben des Organismus findet und die dort zu Zellerneuerung beitragen. Adulte multipotente Stammzellen besitzen im Vergleich zu embryonalen pluripotenten Stammzellen ein eingeschränkteres Differenzierungsvermögen und eine verminderte Proliferationsfähigkeit.<sup>65</sup> Gerade die einfacher zu gewinnenden multipotenten Stammzellen haben sich als nützlich in der Knochenheilung erwiesen.<sup>66,67</sup> So wurde in den letzten Jahren der Fokus vor allem auf endotheliale Progenitorzellen (EPC), aber auch auf multipotente mesenchymale Stammzellen (MSC) gelegt, die zuvor in Kultur expandiert wurden.

## *EPC*

Progenitorzellen oder Vorläuferzellen sind Zellen, die, was die Regenerationsfähigkeit angeht, Stammzeleigenschaften aufweisen. Ihr künftiger Funktionsbereich ist jedoch auf Grund ihrer Abstammung von einer pluripotenten adulten Stammzelle festgelegt.<sup>68</sup> Endotheliale Vorläuferzellen (EPC) sind im Blutstrom zirkulierende Zellen, die zu Endothelzellen differenzieren können. Sie stammen aus dem Knochenmark und spielen bei der Vaskulogenese, also dem Wachstum neuer Gefäße aus endothelialen Vorläuferzellen, eine Rolle.<sup>69</sup> EPC lassen sich aus peripherem Blut oder Knochenmark direkt isolieren und zeichnen sich durch das Vorhandensein der Oberflächenmarker CD34, CD133 und VEGFR-2 (KDR oder FIK-1) aus.<sup>68</sup> Die aus dem Knochenmark isolierten EPC besitzen zu einem großen Teil CD133<sup>+</sup> Antigene,<sup>70</sup> die aus dem peripheren Blut isolierten EPC haben dieses Antigen verloren.<sup>71</sup> Auf Grund dieser Unterschiede in den Oberflächenmarkern lassen sich verschiedene Subpopulationen der EPC beschreiben. So sind sogenannte „late EPC“ bekannt, die CD34<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup> und VEGFR-2 positiv sind ebenso wie „early EPC“, die CD34<sup>+</sup>, CD133<sup>-</sup> und VEGFR-2 positiv sind.<sup>72,73</sup> Neben diesen beiden Arten ist eine dritte, primitivere Art der endothelialen Progenitorzellen festgestellt worden, die keine CD34<sup>+</sup> Antigene besitzen, aber dennoch CD133-positiv sind.<sup>74</sup> In Studien wurde gezeigt, dass nach dem Auftreten von Gewebischämien oder endothelialen Defekten EPC aus dem Knochenmark mobilisiert werden, um gezielt im Bereich der Defekte die Neovaskularisation anzuregen und dadurch den Blutfluss zu erhöhen.<sup>72,75,76</sup>

## *MSC*

Mesenchymale Stammzellen sind Vorläuferzellen des Bindegewebes. Beschrieben wurden sie das erste Mal im Jahre 1968 von Friedenstein et al.<sup>77</sup> als adhärente, morphologisch den Fibroblasten ähnliche Zellen, die aus dem adulten Knochenmark isoliert und unter geeigneten Bedingungen kulturexpandiert werden können.<sup>78</sup> Im erwachsenen Organismus sind MSC fast überall verteilt. Sie sind für strukturelle und auch funktionelle Unterstützung der

Organe sowie für die Geweberegeneration zuständig. Doch es entwickeln sich nicht nur typische mesenchymale Organe und Gewebe aus MSC, sondern auch das die Organe umgebende Bindegewebe. MSC sind in der Lage, sich durch Teilung selber zu erhalten und sich in verschiedenen differenzierte Tochterzellen weiter zu entwickeln. So können sie in Osteozyten, Chondrozyten, Myozyten, Fibrozyten und Adipozyten differenzieren.<sup>79</sup> Als charakteristisch für MSC wird die Kombination von CD73, CD106, CD166 und Stro-1 beschrieben. Typische Marker, wie sie bei hämatopoetischen Zellen gefunden werden, wie CD14, CD35 und CD45 und Marker endothelialer Zellen wie der von-Willebrandt-Faktor oder P-Selektin fehlen jedoch bei MSC.<sup>80,81</sup> Durch die Fähigkeit der MSC, neues Gewebe zu bilden, und durch die immunmodulatorischen Eigenschaften bilden sie einen interessanten Ansatz in der regenerativen Medizin.<sup>82-84</sup> Aktuell richtet die Forschung den Blick darauf, MSC bei möglichst vielen verschiedenen Krankheitsbildern einsetzen zu können. So steht aktuell die Wirkung von MSC bei systemischer Sklerose<sup>85</sup> und bei Herzerkrankungen im Fokus.<sup>86</sup> Doch auch ihre Wirkung kombiniert mit einem osteokonduktiven Gerüst in der Knochenheilung wurde erfolgreich gezeigt.<sup>63,66,79</sup> Der Anteil der MSC beträgt im Knochenmark, an der Gruppe der mononukleären Knochenmarkszellen, ungefähr 0,001% bis 0,01%.<sup>87</sup>

#### **1.4 Problematik**

Im klinischen Gebrauch stellt sich die Verwendung von MSC und EPC als problematisch dar. Beide Zellarten müssen in einem aufwändigen Verfahren isoliert und anschließend über mindestens eine Woche (EPC) bzw. mehrere Wochen (MSC) kultiviert werden, um eine ausreichende Zellzahl und Zellreinheit zu erreichen. Diese lange Prozessphase, die zusätzlich noch mit hohen Kosten verbunden ist, birgt das Risiko maligner Zellentartung auf genetischer Ebene.<sup>88</sup>

## 1.5 Lösungsansatz bone marrow-derived mononuclear cells (BMC)

Ein möglicher Lösungsansatz für das zuvor beschriebene Problem der MSC und EPC ist die Verwendung von *bone marrow-derived mononuclear cells* (BMC). Als BMC wird eine heterogene Population mononukleärer Knochenmarkzellen beschrieben, die verschiedene Eigenschaften besitzen.

Tabelle 1-3: Drei wichtige Gruppen der aus dem Knochenmark stammenden Vorläuferzellen und ihre Funktion.

Hämatopoetische Stammzellen (HSC)	ständige Regeneration der Zellen des Blut- und Immunsystems
Mesenchymale Stammzellen (MSC)	Mögliche Differenzierung in Osteoblasten, Chondrozyten, Monozyten und verschiedene andere Zelltypen
Endotheliale Progenitorzellen (EPC)	Differenzierung in Endothelzellen

Von diesen drei relevanten Gruppen der aus dem Knochenmark stammenden Stammzellen wurden die hämatopoetischen Stammzellen (HSC) noch nicht erwähnt. Das Vorhandensein von HSC wurde erstmalig im Jahre 1906 beschrieben.<sup>89</sup> HSC sind adulte, multipotente Stammzellen, die für die ständige Regeneration aller Zellen des Blut- und Immunsystems zuständig sind.<sup>90</sup> Pro Kilogramm Körpergewicht werden am Tag im adulten Menschen ungefähr eine Milliarde Granulozyten, zweieinhalb Milliarden Thrombozyten und zweieinhalb Milliarden Erythrozyten durch die HSC gebildet oder freigesetzt.<sup>91</sup> Nur ca. 0,01-0,05% der im Knochenmark befindlichen Zellen lassen sich als HSC bezeichnen.<sup>92</sup> Klinisch finden sie Anwendung bei autologen und allogenen Knochenmarkstransplantationen.<sup>93</sup> Ihr Anteil an den BMC variiert mit dem Alter

des Knochenmarksspenders. Der Anteil nimmt mit dem Alter zu und liegt zwischen 4,5% und 11%.<sup>94</sup>

Neben den drei großen Zellpopulationen, den HSC, MSC und EPC, sind in der Population der BMC auch noch andere, kleinere Gruppen von Stamm- bzw. Vorläuferzellen enthalten:

- *Side Population-Cells* werden als eine Subpopulation der HSC betrachtet. Sie sind CD34<sup>-</sup>, c-Kit<sup>+</sup> und Sca-1<sup>+</sup> und konnten nicht nur aus dem Knochenmark, sondern auch aus Muskulatur und anderen Geweben isoliert werden.<sup>95,96</sup>
- *Multipotent Adult Progenitor Cells (MAPC)* werden als eine Subpopulation der MSC betrachtet. Dennoch konnte gezeigt werden, dass MAPC sich nicht nur zu mesenchymalen Zellen differenzieren lassen, sondern auch zu endothelialen, neuroectodermalen und endodermalen Zelltypen. Sie sind CD13<sup>+</sup>, Flk1dim, c-Kit<sup>-</sup>, CD44<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, MHC class I<sup>-</sup> und MHC class II<sup>-</sup>.<sup>97,98</sup>
- *Marrow-Isolated Adult Multilineage Inducible Cells (MIAMI)* werden als eine Subpopulation der MSC betrachtet. In vitro ist diese Zellpopulation in der Lage, in Zellen aller drei Keimblätter zu differenzieren. Sie exprimiert die Stammzell-Marker Oct-4, Rex-1.<sup>99</sup>
- *Tissue Committed Stem Cells (TCSC)* ist eine Population adulter, sehr kleiner (5-7µm) Stammzellen, die CXCR4<sup>+</sup> sind. TCSC können durch SDF-1 aktiviert werden, das durch Osteoblasten, Knochenmarksfibroblasten und endotheliale Zellen sezerniert werden kann.<sup>100,101</sup>
- *Very Small Embryonic-Like Stem Cells (VSEL)* besitzen *in vitro* das Potential, sich in alle drei Keimblätter zu differenzieren. Sie sind Sca-1<sup>+</sup>, lin<sup>-</sup> und CD45<sup>-</sup> und bilden eine sehr kleine Fraktion pluripotenter Stammzellen, deren Anzahl zudem mit zunehmendem Alter abnimmt. Ihr Anteil an den BMC beträgt ungefähr 0,02%. VSEL exprimieren die Stammzell-Marker SSEA-1, Oct-4, Rex-1 und Nanog.<sup>102</sup>

Somit enthält die Fraktion der BMC alle Vorstufen der für die Knochenbildung benötigten Zellen. Der Vorteil der Anwendung von BMC ist, dass sie bereits klinisch verwendet werden dürfen. So wurde gezeigt, dass die Anwendung von BMC bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit dazu führt, dass ischämische Extremitäten wieder besser durchblutet werden und die Verlustrate einer Extremität herabgesetzt wird.<sup>103</sup> Im Bereich der Kardiologie werden BMC Patienten mit akuten Myokardinfarkten, bei denen sich im Elektrokardiogramm eine Hebung der ST-Strecke zeigt, verabreicht und führen bei diesen zu einer im weiteren Verlauf signifikant höheren Auswurfleistung des Herzens.<sup>104</sup> Auch im Bereich der Knochenheilung konnte von Jäger et al. gezeigt werden, dass die Anwendung von erythrozythenhaltigem, aufkonzentriertem Knochenmark einen positiven Effekt auf die Knochenheilung zu haben scheint.<sup>105</sup> Die Geschwindigkeit, mit der es möglich ist, BMC-Präparate herzustellen und anzuwenden, ist ein weiterer großer Vorteil gegenüber in Kultur expandierten Zellen. In einem vom Paul-Ehrlich-Institut (PEI) genehmigten Verfahren<sup>106</sup> werden die BMC durch Knochenmarksaspiration entnommen, mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert, gewaschen, aufgereinigt und können so dem Patienten innerhalb von wenigen Stunden zurückgegeben werden.

## **1.6 Fragestellung**

Derzeit werden *critical size defects* in Knochen durch Entnahme von autologem Knochen aus dem Beckenkamm therapiert, dies ist jedoch mit Nachteilen wie Entnahmemorbidität und Limitierung der entnehmbaren Menge vergesellschaftet. In der Zukunft soll das Tissue Engineering eine wichtige Rolle in der Therapie dieser Defekte spielen. Bis jetzt wurden im experimentellen Tissue Engineering hauptsächlich MSC und EPC, also zuvor in Kultur expandierte Zellen, verwendet.

Um die Möglichkeit einer Entartung dieser Zellen in Kultur auszuschließen und um eine klinisch schneller anzuwendende und günstigere Möglichkeit zu finden, Zellen auf biodegradierbaren Scaffolds auszubringen, soll in dieser Arbeit der

Einsatz von BMC, die diese Vorteile mitbringen würden, im Tissue Engineering untersucht werden.

Hierzu soll im ersten Teil der Arbeit geklärt werden, ob eine vorherige Beschichtung des Scaffolds nötig ist, um eine gute Adhäsion der BMC zu erreichen, und wie sich das weitere Verhalten der BMC im zeitlichen Verlauf auf den verschiedenen vorbehandelten Scaffolds entwickelt. Als Testscaffold für diesen ersten Versuchsteil wurde das  $\beta$ -Tricalziumphosphat *ChronOs*<sup>®</sup> der Firma Synthes verwendet, das auch klinisch häufig Anwendung findet. Nach der Klärung der Fragestellung, ob die Adhärenz durch Beschichtung verbessert werden kann, soll mit den dann vorliegenden Ergebnissen die Frage beantwortet werden, ob BMC auf einem bestimmten Scaffold besser adhären oder sich scaffoldspezifisch im zeitlichen Verlauf anders verhalten. Hierzu wurde aus den verschiedenen Materialgruppen der Scaffolds jeweils eines ausgewählt:

- Synthetisch:  $\beta$ -Tricalziumphosphat *ChronOs*<sup>®</sup> der Firma Synthes
- Xenogen: Bovine HA Keramik *Cerabone*<sup>®</sup> der Firma Aap Biomaterials
- Allogen: Demineralisierte Humane Knochenmatrix DBM des Deutschen Instituts für Zell- und Gewebeersatz gemeinnützige GmbH

Die BMC für alle Versuchsteile stammen von Knochenmarksspenden, die freundlicherweise vom Deutschen Roten Kreuz Hessen zur Verfügung gestellt wurden.

Konkret ergeben sich also für den ersten Versuchsteil folgende Fragestellungen:

- Wie entwickelt sich die Anzahl adhärerender BMC in Abhängigkeit von der Beschichtung des  $\beta$ -Tricalziumphosphat-Scaffolds im Zeitverlauf (Tage 2, 7, 14 und 21 nach Aussaat)?

- Findet bei der Aussaat eine Anreicherung der Stammzellen auf dem Scaffold statt?
- Wie ist die zelluläre Aktivität der ausgesäten Zellen an den Tagen 2, 7, 14 und 21?
- Daraus abgeleitet: Ist eine Beschichtung der Scaffolds vor Aussaat der Zellen sinnvoll?

Für den zweiten Versuchsteil, der unter Berücksichtigung der Ergebnisse des ersten Versuchsteils stattfindet, also der Fragestellung, ob eine Beschichtung der Scaffolds vor der Zellaussaat einen positiven Effekt hat, ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Wie entwickelt sich die Anzahl adhätierender BMC in Abhängigkeit von der Art des Scaffolds im Zeitverlauf (Tage 2, 7, 14 und 21 nach Aussaat)?
- Findet bei der Aussaat eine Anreicherung der Stammzellen auf einem der Scaffolds statt?
- Wie ist die zelluläre Aktivität der ausgesäten Zellen an den Tagen 2, 7, 14 und 21?
- Welche Eigenschaften des Materials tragen zu einer besseren Adhäsion bei?
- Kann man ein Einwandern der Zellen in das Material feststellen?

Folgende Methoden finden Verwendung, um oben genannte Fragestellungen zu bearbeiten:

- Semiquantitative Bestimmung der Zellzahl: Mikroskopische Auszählung fluoreszenzgefärbter, adhätierender BMC (siehe Material und Methoden: 2.2.5 und 2.2.6). Nachweis adhätierender Zellen mittels Rasterelektronenmikroskopie (siehe Material und Methoden: 2.2.14).

- Bestimmung der Zellaktivität erfolgt mithilfe des MTT-Test (siehe Material und Methoden: 2.2.7). Analyse der Genexpression erfolgte mittels RT-PCR (siehe Material und Methoden: 2.2.11, 2.2.12 und 2.2.13).
- Materialeigenschaften, die zur Verbesserung der Zelladhäsion beitragen: Bestimmung der Flüssigkeitsaufnahme in die Scaffolds (siehe Material und Methoden: 2.2.18).
- Nachweis von Zellen in den Scaffolds erfolgte mittels (immun)histologischer Verfahren (siehe Material und Methoden: 2.2.15, 2.2.16 und 2.2.17).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Apparaturen und Materialien

Tabelle 2-1: Apparaturen und Materialien

6 Wellplatte	Sarstedt Inc., Newton, USA
12 Wellplatte	BD Falcon Inc., Franklin Lakes, USA
96 Wellplatte	Sarstedt Inc., Newton, USA
Biofuge fresco	Agar Scientific Ltd., Essex, UK
Computer (real time PCR)	Fijitsu Siemens B.V., Maarsen, Niederlande
Digital image processing System 2.6	Point Electronic GmbH, Halle, Deutschland
Einbettkassetten	Sanowa GmbH, Leimen, Deutschland
Eppendorf Cups 1,5 mL	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf-Pipetten 0,1-10 µL, 0,5-10 µL, 2- 20 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf, Deutschland; Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland

Falcontubes 15 mL, 50 mL	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland
Gefrierschrank -80 °C	Heraeus AG, Hanau, Deutschland
Inkubator, CO <sub>2</sub>	Jouan Inc., Winchester, USA
Insulinspritzen	Tyco Healthcare Deutschland GmbH, Neustadt, Deutschland
kleiner Löffel, Volumen ca. 50 µL	Omnilab GmbH, Bremen, Deutschland
Kühlschrank +4 °C bis -20 °C	Bosch AG, Stuttgart, Deutschland
Mikrotom, Leica EG 1120	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland
Leica RM 2235	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland
Photometer, ELISA-Reader Magellan	Tecan AG, Männedorf, Schweiz
Inverses Zellkulturmikroskop	Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland
Mikroskop, Axio Observer Z1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland

Mirastainer II, Färbeautomat	EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, USA
Neubauer-Zählkammer	NanoEnTek Inc., Seoul, Korea
Pasteurpipette 3,5 mL	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
PCR Thermocycler Tpersonal	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Pipettenspitzen 0,1-10 µL, 1-20 µL, 1-100 µL, 1-200 µL, 101-1000 µL	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettierhilfe (elektrisch)	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop Hitachi FE-SEM S4500	Hitachi AG, Düsseldorf, Deutschland
Serologische Pipetten 1 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL	Sigma-Aldrich Inc., New York und BD Falcon Inc., Franklin Lakes, USA
Sicherheitswerkbank	Antares GmbH, Hartmannsdorf, Deutschland
Spritzen 50 mL	Antares GmbH, Hartmannsdorf, Deutschland
Vortex MSI Minishaker	IKA Instruments Inc., Wilmington, USA

Wärmebad	GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland
Zentrifuge	Hereaus AG, Hanau, Deutschland

### 2.1.1 Knochenersatzmaterialien

Tabelle 2-2: Hersteller und Größe der untersuchten Knochenersatzstoffe

ChronOs <sup>®</sup> , Größe: 1,4 - 2,8 mm	Synthes AG, Oberdorf, Schweiz
Cerabone <sup>®</sup> , Größe: 1,6 - 3,15 mm	Aap Biomaterials AG, Dieburg, Deutschland
DBM, Größe: 1 - 3 mm	Deutsches Institut für Zell- und Gewebeersatz gemeinnützige GmbH

Tabelle 2-3: Eigenschaften der Knochenersatzmaterialien

	ChronOs®	Cerabone®	DBM
Porosität (%)	60	50	natürlich
Porengröße (µm)	100 - 500	100 - 1000	natürlich
Stoffklasse	β-TCP	Rinder HA Keramik	humaner, demineralisierter Knochen
Hersteller	Synthes AG	Aap Biomaterials AG	Deutsches Institut für Zell- und Gewebeersatz gemeinnützige GmbH

### 2.1.2 Zellen und Blutplasma

Tabelle 2-4: Zellen und Blutplasma

Knochenmarksaspirate	DRK-Blutspendedienst, Frankfurt am Main, Deutschland
Humanes Plasma (FFP)	DRK-Blutspendedienst, Frankfurt am Main, Deutschland

### 2.1.3 Nährmedien

Tabelle 2-5: Nährmedien

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
MesenCult + Supplements	Stemcell Technologies Inc., Vancouver, Canada

### 2.1.4 Puffer und Lösungen

Tabelle 2-6: Puffer und Lösungen

1,1,1,3,3,3-Hexamethyldisilazan	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Aceton 100%	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Aqua dest.	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Biocoll Separating Solution (Ficoll)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Dulbecco's phosphate buffered saline with calcium chloride and magnesium chloride (PBS +/+)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

Dulbecco's phosphate buffered saline without calcium chloride and magnesium chloride (PBS w/o)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Eisessig 100%	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Erythrozyten Lysing Solution	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Ethanol, 100%, 96% (EtOH)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Fibronektin	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Glutardialdehyd	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland
Methanol 100%	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
MTT Proliferation Kit	Roche GmbH, Mannheim, Deutschland
Natriumthiosulfatlösung 5%	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Silbernitratlösung 5%	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Xylol 98%	Merck AG, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.5 Zellfärbung

Tabelle 2-7: Materialien zur Zellfärbung

4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
DiL-Acetylated LDL	CellSystems GmbH, St. Katharinen, Deutschland
Türks-Lösung	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
Meyer's Hämatoxin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Anti-CD14-FITC Antikörper Anti-CD34-Rhodamin	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
EosinG 0,5%	Merck AG, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.6 ELISA

Tabelle 2-8: Materialien ELISA

Quantikine Immunoassay Human VEGF	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA
Quantikine Immunoassay Human SDF-1 $\alpha$	R&D Systems, Inc., Minneapolis, USA

## 2.1.7 RT-PCR

Tabelle 2-9: Materialien RT-PCR

RNeasy Mini Kit	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNase-Free DNase Set	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit	Stratagene Corp., La Jolla, USA
RT2 qPCR Primer Assay for Human ALPL (NM 000478) BGLAP (NM 199173) Col1A1 (NM 000088) GAPDH (NM 002046) VEGFA (NM 003376) VWF (NM 000552)	SA Biosciences Qiagen, Hilden, Deutschland
Photometer NanoDrop	NanoDrop Products Inc., Wilmington, USA
Realtime Thermocycler Mx3005p	Stratagene Corp., La Jolla, USA

## 2.2 Methoden

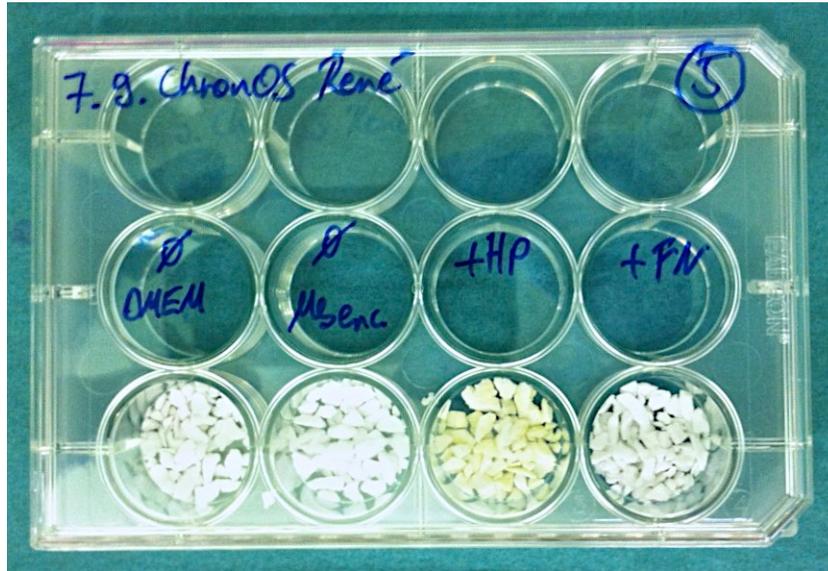
### 2.2.1 Ansätze

Um das Verhalten der BMC zu testen, wurden diese im ersten Versuchsteil auf verschieden behandeltem Knochenersatzmaterial ausgesät. Eine unbehandelte Probe des  $\beta$ -Tricalciumphosphat *ChronOs*<sup>®</sup> diente als Kontrollgruppe.

Im zweiten Versuchsteil fand ein Materialvergleich statt; hierbei wurden BMC auf drei verschiedene Knochenersatzmaterialien ausgesät.

### 2.2.2 Beschichtung des Knochenersatzmaterials

Zwei Tage vor Aussaat der Zellen auf dem Knochenersatzmaterial wurde das Material unterschiedlich beschichtet. Hierzu wurde unter sterilen Bedingungen das Knochenersatzmaterial entnommen und derart auf 3 Wells einer 6er Wellplatte verteilt, dass sich in jedem Well eine ausreichende Anzahl an Granulat befand. Für jeden Messtag wurden ca. 18 Körner benötigt. Die Abmessung der Materialmenge geschah mit einem kleinen Löffel. Ein Ansatz blieb unbehandelt und wurde nicht beschichtet, er diente der Kontrolle und dem Vergleich unterschiedlicher Nährmedien. Der zweite Ansatz wurde mit 4 mL Humanplasma für 30 min inkubiert. Während dieser Zeit wurde das Plasma mehrfach über die Granula pipettiert, um für eine gleichmäßige Benetzung zu sorgen. Für den dritten Ansatz wurde eine Fibronectinlösung angesetzt, mit der gleichermaßen verfahren wurde. Die angesetzte Fibronectinlösung enthielt 1 mg Fibronectin pro 1 mL PBS w/o. Nach der Inkubationszeit wurde in beiden Ansätzen die Flüssigkeit abgesaugt und verworfen. Die Wellplatte wurde nun halb abgedeckt, um das Trocken des Granulates zu erleichtern, und 48 h bei Raumtemperatur steril unter der Werkbank verwahrt. Hierbei ist darauf zu achten, dass das Granulat vor dem UV-Licht der Werkbank abgedeckt ist. Nach 48 h ist das Granulat getrocknet und bereit für die Aussaat der extrahierten BMC.



**Abbildung 2-1: Das verschieden beschichtete  $\beta$ -Tricalciumphosphat vor Aussaat der BMC. Von links nach rechts: ohne Beschichtung für DMEM Medium, ohne Beschichtung für Mesencult Medium, Humanplasmabeschichtung, Fibronektinbeschichtung. Zu erkennen ist vor allem die starke Gelbfärbung des mit Humanplasma beschichteten Materialansatzes.**

### 2.2.3 Isolierung von BMC

Anonymisierte Knochenmarkspiratrestproben wurden freundlicherweise vom DRK-Blutspendedienst Frankfurt zur Verfügung gestellt. Die Verwendung der anonymisierten Restproben für Forschungszwecke ist durch das Ethik-Votum 329/10 des Fachbereichs Medizin der Goethe-Universität gedeckt.

Das Knochenmarkspirat wurde im Verhältnis 1:1 mit PBS w/o verdünnt und auf ein äquivalentes Volumen Ficoll ( $d: 1.077 \text{ g/cm}^3$ ) überschichtet, so dass zwei vollständig voneinander getrennte Schichten entstehen. Diese Mischung wurde nun für 30 min bei 800 g und  $22 \text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Interphase mittels Pasteurpipette abgesaugt. In dieser Phase befinden sich die BMC. Um überschüssiges Ficoll auszuwaschen, wurde die abgesaugte Phase zweimal mit PBS w/o auf 15 mL verdünnt und anschließend zehn Minuten bei 1800 rpm zentrifugiert.

Für die Zellzählung wurde das Zellpellet in 500 µL PBS w/o resuspendiert. Zur Zellzählung wurden 10 µL der Zellsuspension mit 80 µL zuvor im Wasserbad erwärmter Erythrozyten-Lyse-Lösung über 5 min inkubiert. Danach wurden 10 µL Türks-Lösung hinzugegeben. 10 µL dieser Zellsuspension wurden nun in die Neubauerzählkammer eingebracht und ausgezählt. Die absolute Zellzahl berechnete sich nach folgender Gleichung:

$$\text{Zellzahl absolut} = \text{Mittelwert gezählte Zellen} * 100.000 * 0.5$$

#### 2.2.4 Aussaat

Die Aussaat der Zellen auf den Granulaten erfolgte, indem jeweils 1 Million Zellen in 1 mL des entsprechenden Nährmediums über entsprechende Granulatmonolayer pipettiert wurden, die sich in einer 12er Wellplatte befanden (4 cm<sup>2</sup>/Well). Die Granulate wurden durch Zuhilfenahme eines kleinen Löffels abgemessen, um das Granulatvolumen konstant zu halten. Die Zellen wurden mehrfach über die Granula pipettiert und danach 10 min zur Inkubation in den Inkubator gestellt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Anschließend wurden die Granula in eine neue 12er Wellplatte überführt und mit 2 mL des entsprechenden Nährmediums versorgt.

#### 2.2.5 Bestimmung der Aussaat-effizienz mittels Zellzählung

Um die Aussaat-effizienz zu bestimmen, wurden die Zellen in der Zellsuspension nach Aussaat auf die verschieden behandelten Granula und die Zellen, die nach Entfernen der Granula aus dem Well am Wellboden adhären, mit der ursprünglich ausgesäten Zellzahl ins Verhältnis gesetzt. Hierzu wurden die Granula in eine neue Wellplatte transferiert. Die auf dem Wellboden adhärenen Zellen wurden mit 2 mL Accutase vom alten Wellboden abgelöst, zehn Minuten bei 1800 rpm zu einem Pellet zentrifugiert und nach dem Verwerfen des Überstandes in 250 µL PBS w/o resuspendiert. Zur Auszählung der Zellen wurden 50 µL der Zellsuspension mit 50 µL Türks-Lösung über 5 min im Wasserbad inkubiert. 10 µL der Zellsuspension wurden nun in der Neubauerzählkammer ausgezählt.

Aus den gezählten, nicht ausgesäten Zellen ließ sich mittels der Formel  $\{100 - [0,0001 * (\text{gezählte Zellzahl} \times 2 / 40000)]\}$  die Aussaat-effizienz berechnen.

## 2.2.6 Nachweis von BMC sowie Nachweis einer endothelialen Differenzierung auf Granulat mittels Fluoreszenzmikroskopie (DAPI-/DiL-Färbung)

Um die Zellen im Fluoreszenzmikroskop darstellen zu können, wurden diese mit DiL (1,1'-Dioctadecyl-1-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanin-perchlorat) und DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-Dihydrochlorid) gefärbt. Endothelial differenzierte Zellen nehmen in der Färbung DiL und DAPI auf, wohingegen nicht endothelial differenzierte Zellen nur mit DAPI angefärbt werden können. Um die Zellen einzufärben, wurden von den zuvor mit Zellen besäten und inkubierten Granula je Ansatz drei Granulat-körner mit einem sterilen Löffel in ein 96er Well transferiert und hier mit 100 µL des entsprechenden Mediums und 1 µL DiL für eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das mit DAPI versehene Medium entfernt und das Granulat wurde vorsichtig mit jeweils 200 µL PBS+/- gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 5% Formaldehyd im Kühlschrank bei 4 °C fixiert. Nach 30 min Inkubation wurde die Formaldehydlösung abgesaugt und die Granula wurden zweimal mit jeweils 200 µL PBS+/- gewaschen. Zur Färbung mit DAPI wurde in die mit den Granula gefüllten Wells jeweils 100 µL DAPI-Lösung gegeben und 15 min bei 4 °C inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit jeweils 200 µL PBS+/- wurden die Wells mit jeweils 100 µL PBS+/- aufgefüllt. Die eingefärbten Zellen wurden nun mit dem Fluoreszenzmikroskop bei 100facher Vergrößerung betrachtet und es wurden pro Well fünf zufällig ausgewählte Ausschnitte pro Färbung aufgenommen.

Auf den Fotos wurden dann die Zellen ausgezählt; man erhält die Zellzahl pro mikroskopischem Feld (cell number/field of view [fov]). Es wurde darauf geachtet, dass das Gesichtsfeld komplett von dem Granulat eingenommen wurde und kein granulatfreier Hintergrund aufgenommen wurde. Somit entfällt

eine entsprechende Korrektur der Zellzahlen. Die Färbungen erfolgten jeweils an den Tagen 2, 7, 14 und 21 nach Aussaat.

### 2.2.7 Nachweis der metabolischen Aktivität der BMC auf den Testsubstanzen (MTT-Assay)

Der MTT-Assay wurde benutzt, um die metabolische Aktivität von Zellen zu testen. Der Mechanismus des Nachweises der metabolischen Aktivität beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid in blau-violettes, wasserunlösliches Formazan. Reduziert wird hier in erster Linie durch die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH, wobei die Menge des umgesetzten Farbstoffs der Glykolyserate der Zellen entspricht. Das MTT wird abhängig von den Enzymen des endoplasmatischen Retikulums reduziert.

Die Zellen auf den Granulaten wurden *in vitro* mit Tetrazoliumsalz inkubiert, um so den Anteil lebender Zellen gegen eine Vergleichsprobe zu messen. Als Vergleichsprobe wurde eine Eichreihe erstellt. Für diese wurden auf einer 96er Wellplatte in 100 µL Medium 32.000, 16.000, 8.000, 4.000, 2.000 und 1.000 Zellen ausgesät.

Zur Messung wurden von jeder Probe, d.h. jeder Beschichtungs- und Mediumkonstellation, drei Granula entnommen und mit einem sterilen Löffel in eine 96er Wellplatte transferiert. Es wurden nun 90 µL des entsprechenden Mediums und 10 µL MTT-Labeling Reagenz zugegeben und für vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurden je Well 100 µL *Solubilisation Solution* hinzugegeben und die Wellplatte über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nach mindestens 12 Stunden wurden 100 µL je Well in eine neue 96er Wellplatte transferiert, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die Granulate zu vermeiden. Im Photometer *Magellan* erfolgte die Messung der Absorption bei 570-590 nm. Die Blaufärbung korrelierte hier mit der metabolischen Aktivität der Zellen und der Zellzahl. Die MTT-Messungen erfolgten jeweils an den Tagen 2, 7, 14 und 21. Durch den Vergleich mit einer Eichreihe aus vordefinierten Zellzahlen konnte ein Rückschluss auf die aktuelle Zellzahl der Probe geschlossen werden.

### 2.2.8 FACS Analyse

Zur Analyse der in der KM-Probe enthaltenen Zellen und um zu bestimmen, welche Zellen in welchem Ausmaß am Granulat adhären, wurden durchflusszytometrische Messungen durchgeführt. Zur Vorbereitung der Proben wurden 200 µL der ursprünglichen Probe mit jeweils 10 µL der Antikörper und 200 µL PBS w/o in einem FACS-Röhrchen inkubiert (siehe Tabelle 2-10).

Zusätzlich wurden die nicht an den Granulaten adhärenenden BMC mit den gleichen Antikörperkombinationen inkubiert.

Nach 20 min Inkubationszeit bei 8 °C und in Dunkelheit wurden jeweils 2 mL PBS w/o zugegeben und 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellpellets in jeweils 200 µL PBS w/o resuspendiert und zur Messung in das FACS-Calibur Gerät verbracht.

Es wurden mindestens 30.000 mononukleäre Zellen gemessen. Mononukleäre Zellen wurden anhand ihrer *Forward/Sidescatter*-Eigenschaften identifiziert. Zur Auswertung wurden die Daten in zweidimensionalen Dotblots, die jeweils definierte Fluoreszenzkombinationen abdeckten, dargestellt und die prozentualen Anteile der Zellpopulationen mittels Quadrantenanalyse errechnet. Um zu ermitteln, ob sich bestimmte Vorläuferzellsorten auf den Testgranulaten angereichert hatten, wurde der Anteil der Vorläuferzellen in den nicht am Granulat adhärenenden Zellen von dem entsprechenden Wert der BMC-Suspension vor Aussaat subtrahiert. Negative Werte zeigen eine Abreicherung der Vorläuferzellen, positive Werte eine Anreicherung der Vorläuferzellen auf den Testgranulaten an.

Tabelle 2-10: In der FACS Analyse verwendete Antikörperkombinationen

CD 34 <sup>+</sup>	Marker für reife Stammzellen <sup>107-109</sup>
CD 34 <sup>+</sup> /CD 133 <sup>+</sup>	Marker für unreife Stammzellen <sup>108</sup>
CD 271 <sup>+</sup>	Marker für mesenchymale Stammzellen <sup>110</sup>
CD 45 <sup>+</sup>	Marker für hämatopoietische Zellen <sup>111</sup>

### 2.2.9 ELISA

Zur Messung der VEGF-Sekretion durch BMC auf den Testgranulaten wurde das *Quantikine Immunoassay Human VEGF Kit* verwendet. Zu dessen Verwendung wurde zunächst der Wasch-Puffer vorbereitet; 20 mL Waschpuffer-Konzentrat aus dem Kit wurden hierzu mit 480 mL destilliertem Wasser gut durchmischt. Die Substrat-Lösung wurde hergestellt, indem die Reagenzien A und B aus dem Kit gemischt wurden. Dies sollte maximal 15 min vor dem Gebrauch geschehen. Die Substrat-Lösung ist vor Licht zu schützen.

Um eine VEGF-Standard Reihe herzustellen, wurde die VEGF-Standard Lösung mit 1 mL des *Verdünners für Zell-Überstände* aufgelöst [cVEGF: 2000 pg/mL] und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte der Ansatz der Verdünnungsstufen 1000 pg/mL, 500 pg/mL, 250 pg/mL, 125 pg/mL, 62,5 pg/mL, 31,2 pg/mL und 15,6 pg/mL unter Verwendung des Puffers *RDK*. Die *RDK* Lösung selbst wurde für die Verdünnungsstufe 0 pg/mL verwendet.

Im ersten Schritt wurden 50 µL des im Kit enthaltenen Verdünnungspuffers *RD1W* in jedes Well der vorbeschichteten im Kit enthaltenen Wellplatte pipettiert. Nun wurden in jedes Well entweder 200 µL der Standard-Lösung, der Kontroll-Lösung oder der langsam, auf Eis aufgetauten Probe hinzugegeben und 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein dreimaliges Waschen mit 400 µL Wasch-Puffer und die anschließende Zugabe von 200 µL

VEGF-Konjugat pro Well. Erneut erfolgte eine Inkubation über 2 h bei Raumtemperatur und ein dreimaliges Waschen mit jeweils 400 µL Wasch-Puffer. Im nächsten Schritt wurden 200 µL Substrat-Lösung pro Well hinzugegeben und 20 min bei Raumtemperatur unter Lichtabschluss inkubiert. Im letzten Schritt wurden je Well 50 µL Stopp-Puffer hinzugegeben, abschließend erfolgte die Messung der Proben und die Erstellung einer Standardkurve bei 450 nm im Plattenphotometer *Magellan*.

Die Messung der SDF-1α Werte erfolgte mit dem *Quantikine Immunoassay Human SDF-1α Kit*. Die Messung und der Versuchsablauf erfolgten mit den Kit-spezifischen Substanzen wie für die VEGF-Bestimmung beschrieben.

#### 2.2.10 Nachweis zelltypspezifischer Genexpression mittels RT-PCR

Zur Analyse des Differenzierungszustandes der BMC wurde die Genexpression endothelzelltypischer sowie prototypischer osteogener Gene untersucht. Hierzu wurden die zellbeladenen Granulate mit einem sterilen Löffel aus den Wellplatten entnommen und in jeweils ein Eppendorfgefäß (1,5 mL) überführt. Hierzu wurden je 350 µL *RLT-Lyse-Puffer* + 10% β-Mercaptoethanol zugegeben; das Gemisch wurde etwa 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend 1-2 min bei geringer Geschwindigkeit auf dem Vortex gemischt. Der Puffer wurde nun abpipettiert und in ein Cryoröhrchen überführt. Das Eppendorfgefäß mit den Granulaten wurde mit 10.000 rpm zentrifugiert, um hiernach die Reste des RNA-Lysates, welches sich in den Granulaten befand, abpipettieren und überführen zu können. Mit einer Insulinspritze wurde die DNA der lysierten Zellen im Cryoröhrchen durch dreimaliges Aspirieren geschert. Nun konnte das Zelllysate direkt zur RNA-Isolierung genutzt werden oder bei -80 °C zur späteren Verarbeitung eingefroren werden.

#### 2.2.11 RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurde das *RNeasy Mini Kit* der Firma Qiagen verwendet. Die zuvor hergestellten 350 µL RNA-Lysate wurden im ersten Schritt mit 350 µL

EtOH (70%) gemischt und auf eine *RNeasy*-Säule pipettiert. Dieses Gemisch wurde für 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert und hiernach das Eluat verworfen. Im zweiten Schritt wurden auf die Säule, bei beibehaltenem Sammelgefäß, 700 µL *RW1* Puffer gegeben und das Gemisch erneut 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert und das Eluat verworfen. Für den dritten Schritt, den DNase Verdau auf der Membran des *RNeasy mini spin*, musste zunächst die DNase-Stock- Lösung hergestellt werden. Diese besteht aus dem im Kit enthaltenen DNase Lyophilisat in 550 µL RNase-freiem Wasser. Hiervon können an diesem Punkt Aliquots hergestellt werden und diese bei -20 °C eingefroren werden. Pro Probe wurden nun 10 µL DNase-Stock-Lösung aufgetaut und mit 70 µL Puffer *RDD* vermischt. Die Lösung wurde direkt in die Mitte der *RNeasy silica-gel* Membran pipettiert und das Gemisch für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der nächsten Zentrifugation über 15 sec bei 10.000 rpm wurden 350 µL *RW1* Puffer hinzugegeben. Nach der Zentrifugation wurde das *RNeasy mini spin* in ein neues Sammelröhrchen gestellt und das zuvor abzentrifugierte Eluat verworfen. Es wurden 500 µL RPE Puffer zugegeben und über 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Erneut wurde das Eluat verworfen und das Sammelgefäß beibehalten. Noch einmal wurden 500 µL RPE Puffer zugegeben, das Gemisch über 2 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und das Eluat verworfen. Die Säule wurde auf ein neues Sammelgefäß gestellt und es wurden 25 µL DEPC-Wasser (DEPC = Diethyl- Pyrocarbonat = RNase-Inhibitor) direkt auf die Säulenmembran aufpipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 min erfolgte eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 1 min. Das dabei gewonnene RNA-Eluat wurde in ein steriles Gefäß überführt und konnte nun, auf Eis gelagert, direkt zur cDNA-Synthese genutzt werden. Sollte die cDNA-Synthese nicht direkt stattfinden, können die Proben auch bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert werden.

### 2.2.12 cDNA-Synthese

Zur Herstellung der cDNA wurde das *Affinity Script QPCR cDNA Synthesis Kit* verwendet. 6 µL der zuvor hergestellten RNA wurden mit 10 µL MasterMix, 3 µL Oligo DT Primer und 1 µL Affinity Script RT in ein 0,2 mL-Reaktionsgefäß

pipettiert und gut durchmischt. Der Master Mix beinhaltet für eine Probe 37 µL destilliertes Wasser, 4,5 µL 10xPCR Buffer und 1 µL dNTPs. Dieses Gemisch wurde im Thermocycler inkubiert. Das Inkubationsprogramm beinhaltet eine Inkubation von 5 min bei 25 °C, dann über 15 min bei 42 °C und zum Abschluss 5 min bei 95 °C. Die cDNA konnte nun direkt für eine Realtime PCR verwendet werden. Sollte die Realtime PCR nicht direkt stattfinden, können die Proben auch bei -80 °C bis zur Verwendung gelagert werden.

### 2.2.13 Realtime PCR

Um die Genexpression zu messen, wurden verschiedene Primer aus der Serie RT2qPCR Primer Assays von SABiosciences verwendet. Pro Probe wurden 2 µL der hergestellten cDNA mit 12,5 µL *RT2MasterMix*, 9,5 µL aqua dest. und 1 µL *upstream* Primer up und 1 µL *downstream* Primer des entsprechenden RTPrimer in einem 0,2 mL-Reaktionsgefäß vermengt. Für die Amplifikation wurde der Thermocycler MX 3005p verwendet. Die PCR-Bedingungen waren einmalig 10 min bei 95 °C, gefolgt von 45 Zyklen über 15 sec bei 95 °C und 60 sec bei 60 °C. Die Software errechnet die sogenannten cT-Werte, dies ist der PCR-Zyklus, bei dem die PCR in die exponentielle Phase übergeht. Die Spezifität der PCR wurde mittels Schmelzkurvenanalyse überprüft.

Zur Berechnung der Genexpression wurde die delta-cT-Methode angewendet. Hierzu wurde die Genexpression des sogenannten *gene of interest* (GOI) in Beziehung zur Genexpression des sogenannten *housekeeping* Gens GAPDH gesetzt: Genexpressionslevel GOI =  $2^{-(cT\ GOI - cT\ GAPDH)}$ .

### 2.2.14 Nachweis von BMC mittels Rasterelektronenmikroskopie

Zur Fixierung der Proben für das Rasterelektronenmikroskop wurde das Granulat in der Wellplatte für 1 h in 2% Glutardialdehydlösung inkubiert. Zur Entwässerung der Zellen diente eine aufsteigende Alkoholreihe (25%, 50%, 75%, 96% und 100%). Hierzu wurden die Proben jeweils 5 min in der entsprechenden Alkoholstufe inkubiert. Nach dem Absaugen der 100%igen

Ethanollösung wurde Silan in das Well pipettiert. Dies hatte geschützt unter einem Abzug zu geschehen, da Silan gesundheitsschädlich ist. Die Probe wurde dann über Nacht zum Trocknen unter dem Abzug belassen. Nach dem Trocknen wurden die Proben bis zur Messung staubfrei, erschütterungsfrei, trocken und dunkel gelagert.

Für die rasterelektronenmikroskopische Analyse wurden die Granulate mit einem Kohlekleber auf einem Aluminiumträger befestigt. Hiernach folgte, um die Proben für die Darstellung elektrisch leitfähig zu machen, eine Beschichtung mit Gold. Dieser Bedampfungsprozess geschah unter Vakuumbedingungen 3 - 5 mal für jeweils 1 min im *Agar Sputter Coater*.

Danach wurde die zu messende Probe in die Messkammer des REM verbracht und ein Hochvakuum angelegt. Die Proben wurden bei einer Spannung von 10 kV untersucht und Digitalbilder wurden mittels des *Digital image processing System 2.6* in unterschiedlichen Vergrößerungen aufgenommen.

#### 2.2.15 Nachweis von BMC in DBM mittels Hämatoxylin-EosinG-Färbung

Für die Hämatoxylin-EosinG-Färbung der BMC auf DBM wurden Paraffinschnitte nach folgendem Protokoll angefertigt.

Die Schnitte (3 µm Dicke) wurden im ersten Schritt entparaffiniert. Dies geschah durch eine dreimalige, jeweils 5 min andauernde Inkubation in Xylol und einer daran angeschlossenen absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70%). Danach wurden die Schnitte 10 min in Meyer's Hämatoxylin Lösung inkubiert, anschließend erfolgte ein kurzes Eintauchen in destilliertes Wasser. Es folgten 10 min Wässerung in H<sub>2</sub>O. Für die Strukturfärbung wurden die Schnitte 3 min in 0,5% EosinG mit einem Tropfen Eisessig je 100 mL Färbelösung inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte 1 min in H<sub>2</sub>O gewässert und danach in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 100%) jeweils 2 min je Station entwässert. Abschließend erfolgte eine dreimal 7 min andauernde Inkubation in Xylol und das Eindecken der Schnitte in Eukitt.

### 2.2.16 Nachweis spezifischer Zelltypen in DBM mittels Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Der Nachweis von CD14 positiven monozytären Zellen und CD34 positiven Vorläuferzellen innerhalb der BMC auf DBM erfolgte immunhistochemisch. Für diese Doppelfärbung wurden die, wie in 2.2.15 beschrieben, hergestellten Paraffinschnitte genutzt. Die nun folgende Färbung mit den Primärantikörpern muss im Dunkeln stattfinden. Es werden 20 µL Anti-CD14 + 20 µL Anti-CD34 + 60 µL DAKO AK-Verdünnungspuffer auf die Schnitte gegeben und bei +4 °C und Dunkelheit über Nacht inkubiert. Die Konzentration der Antikörper betrug 5 µg/ml. Am nächsten Tag erfolgt ein dreimaliges Waschen mit PBS w/o, wonach die Schnitte schnellstmöglich mit *Mounting Medium with DAPI* eingedeckt wurden.

### 2.2.17 Nachweis von Zellen auf DBM mittels 4,6-Diamidino-2- phenylindoldihydrochlorid (DAPI) Färbung

Die 4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) Färbung der Schnitte erfolgt durch 10 min Inkubation in 1 mg DAPI gelöst in 1 mL 70% Ethanol bei +4 °C. Die Schnitte wurden ohne Alkoholreihe eingedeckelt und konnten direkt am Fluoreszenzmikroskop bei 100facher Vergrößerung analysiert werden.

### 2.2.18 Flüssigkeitsabsorption durch die Testgranulate

Zur Bestimmung der absorbierten Flüssigkeit im Verhältnis zur Materialmenge wurde eine 48er Wellplatte auf der Laborwaage platziert und diese tariert. Nun wurde mit einem kleinen Löffel Material in ein Well eingebracht und das Trockengewicht des Materials in g protokolliert. In das materialgefüllte Well wurden anschließend 200 µL PBS w/o pipettiert und 1 min inkubiert. Hiernach wurde die überstehende Flüssigkeit mit der Pipette abgezogen und das Feuchtgewicht in g abgelesen. Aus der Differenz der beiden Werte ergab sich die Menge des absorbierten PBS in g. Aus dem Quotienten dieses Wertes und

dem Trockengewicht in g berechnete sich die absorbierte Flüssigkeit im Verhältnis zur Materialmenge.

#### 2.2.19 Statistik

Für die Statistik wurde das Programm SPSS Statistics 21 eingesetzt. Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte inklusive Standardabweichung präsentiert. Um statistische Signifikanzen zwischen den verschiedenen Gruppen zu identifizieren, wurde der Kruskal-Wallis-Test als Rangsummentest eingesetzt. Bei signifikanten Gruppenunterschieden wurde im Anschluss der multiple Dunn-Test (Bonferroni-Holm korrigiert) auf diese Gruppen angewendet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Vorversuche

#### 3.1.1 Adhäsionstest für BMC

Die Fragestellung, ob BMC in der Lage sind, auf Knochenersatzmaterial zu adhären, wurde in mehreren Vorversuchsreihen getestet. Hierzu wurden eine Million zuvor aus Spenderknochenmark gewonnene BMC auf *ChronOs*<sup>®</sup> ( $\beta$ -TCP) ausgesät, die Zellen wurden mehrfach über die Granula pipettiert und danach 7 min zur Inkubation in den Inkubator gestellt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt, danach wurden die Granula in ein neues Well überführt. Die am Wellboden des ersten Wells anhaftenden Zellen wurden mittels Accutase abgelöst und mittels Mikroskop gezählt. Aus der Differenz der beiden Werte errechnet sich der prozentuale Anteil der adhärenenden BMC, der bei der Vorversuchsreihe bei ca. 86% lag und damit für eine gute Anhaftung der BMC auf  $\beta$ -TCP sprach.

#### 3.1.2 Nährmediumtest für BMC

Um festzustellen unter welchen Bedingungen BMC auf Knochenersatzmaterialien die besten Voraussetzungen zu Wachstum und Proliferation haben, wurden vor Versuchsbeginn verschiedene Nährmedien getestet. Hierzu wurden zuvor extrahierte BMC auf  $\beta$ -TCP ausgesät und über 5 Tage in EBM1, EBM2, DMEM und Mesencult + Supplements in Kultur gehalten. Nach 5 Tagen wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt und unter dem Mikroskop die Anzahl anhaftender Zellen semiquantitativ bestimmt. Es zeigte sich anhand der Zellzahlen in mehreren Versuchsreihen ein gutes Überleben der ausgesäten BMC nach Inkubation mit DMEM und Mesencult + Supplements, so dass diese Medien für die Untersuchungen im ersten Versuchsteil verwendet wurden.

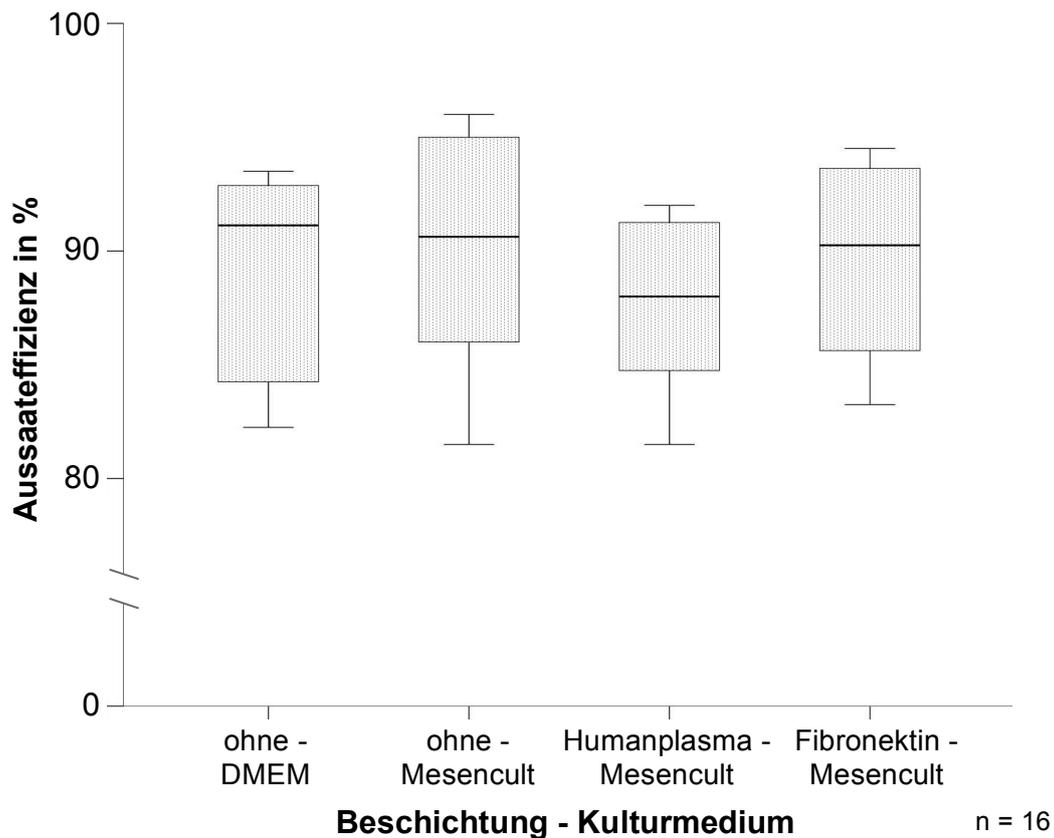
### 3.1.3 Vitalitätstest für BMC

Die Testung der Vitalität der BMC im Verlauf über die für den Versuch geplanten 21 Tage wurde mittels MTT-Test durchgeführt. Aufgereinigte BMC wurden auf  $\beta$ -TCP ausgesät und in Mesencult + Supplements über 21 Tage in Kultur gehalten. An den Tagen 2, 7, 14 und 21 erfolgte eine Probenentnahme, die mittels MTT ausgewertet wurde. Es zeigte sich hier, dass sich BMC über 21 Tage vital in Kultur halten lassen.

## **3.2 Ergebnisse erster Versuchsteil – Beschichtungsvergleich**

### 3.2.1 Aussaat-effizienz

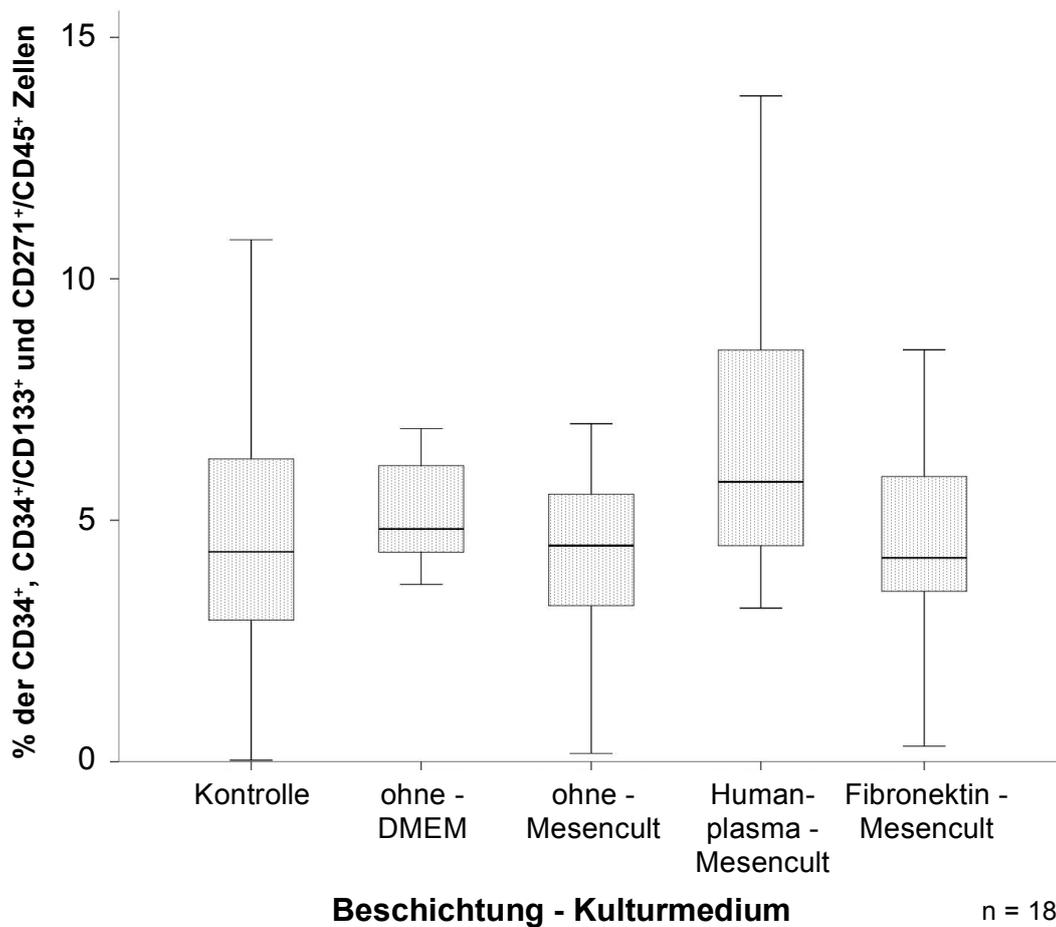
Die Aussaat-effizienz der BMC bei verschiedenen Beschichtungs-Kulturmediums-Konstellationen wurde durch Zellzählung nachgewiesen. In jeder Kombination wurden nach Aussaat die im Well und nicht auf dem Material adhärierenden Zellen gezählt und so die Aussaat-effizienz bestimmt. Bei den so bestimmten Aussaat-effizienzen sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Testansätzen nachweisbar (siehe Abbildung 3-1).



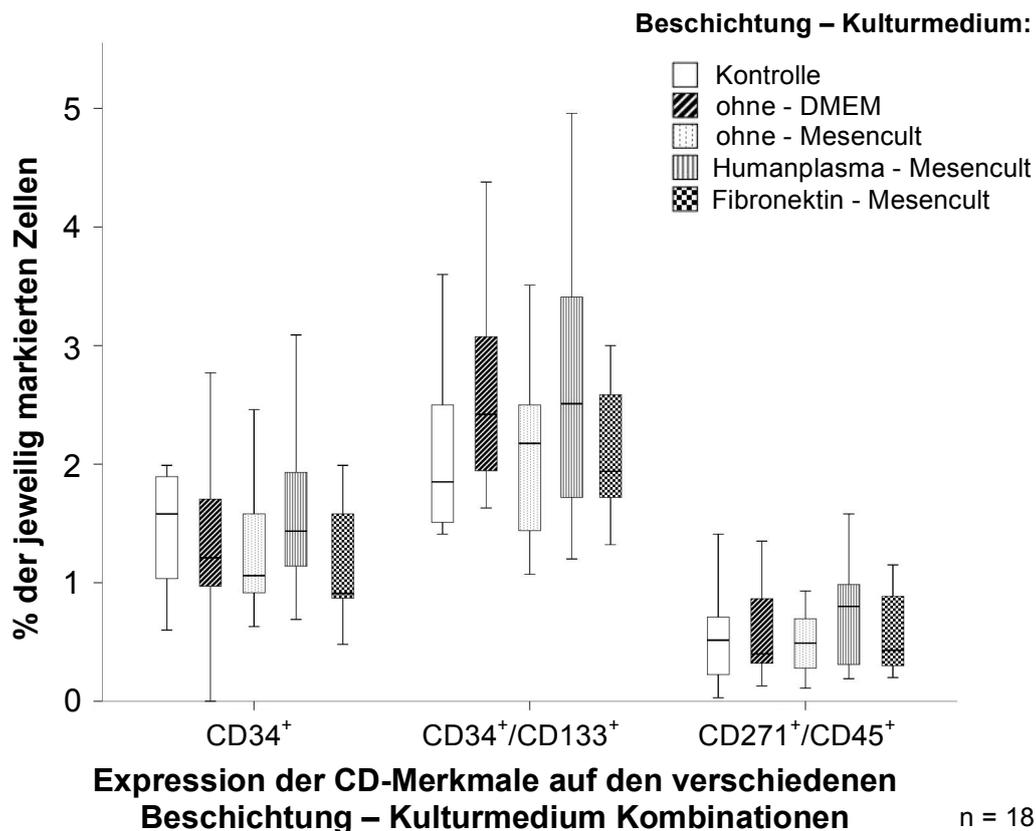
**Abbildung 3-1: Aussaateffizienz der BMC ist unabhängig von Beschichtung und Kulturmedium. Boxplots des Medians sind gezeigt (n = 16). Auf der y-Achse ist die Aussaateffizienz in %, auf der x-Achse die Beschichtung bzw. das verwendete Kulturmedium aufgetragen. Die Messung der Aussaateffizienz erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.5) beschrieben wurde.**

### 3.2.2 Anteile adhätierender Zellpopulationen

Bei diesem Versuch wurden die prozentualen Anteile verschiedener Zellpopulationen vor der Aussaat sowie in den nicht adhätierenden BMC mittels FACS-Analyse bestimmt. Es wurden  $CD34^+$ ,  $CD34^+/CD133^+$  und  $CD271^+/CD45^+$  Zellen untersucht. Bei den durchgeföhrteten FACS Messungen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Adhäsion der untersuchten Zellpopulationen in Abhängigkeit von der Beschichtung und dem Kulturmedium beobachtet werden (siehe Abbildung 3-2 und Abbildung 3-3).



**Abbildung 3-2: Keine An- oder Abreicherung der BMC in Abhängigkeit von Beschichtung und Kulturmedium. Boxplots des Medians sind gezeigt (n = 18). Auf der y-Achse ist der aufsummierte Gesamtanteil der nicht adhärenen Vorläuferzellpopulationen (CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>, CD271<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup>)-Zellen in %, auf der x-Achse die Beschichtung bzw. das verwendete Kulturmedium aufgetragen. Die Messung mittels FACS erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.8) beschrieben wurde.**



**Abbildung 3-3: Keine An- oder Abreicherung bestimmter Vorläuferzellsorten in Abhängigkeit von Beschichtung und Kulturmedium. Boxplots des Medians sind gezeigt (n = 18). Auf der y-Achse ist der prozentuale Anteil der nicht adhärenen, jeweilig markierten Zellen in %, auf der x-Achse die verwendete Markierung CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> und CD271<sup>+</sup>/CD45<sup>+</sup> aufgetragen. Die Messung mittels FACS erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.8) beschrieben wurde.**

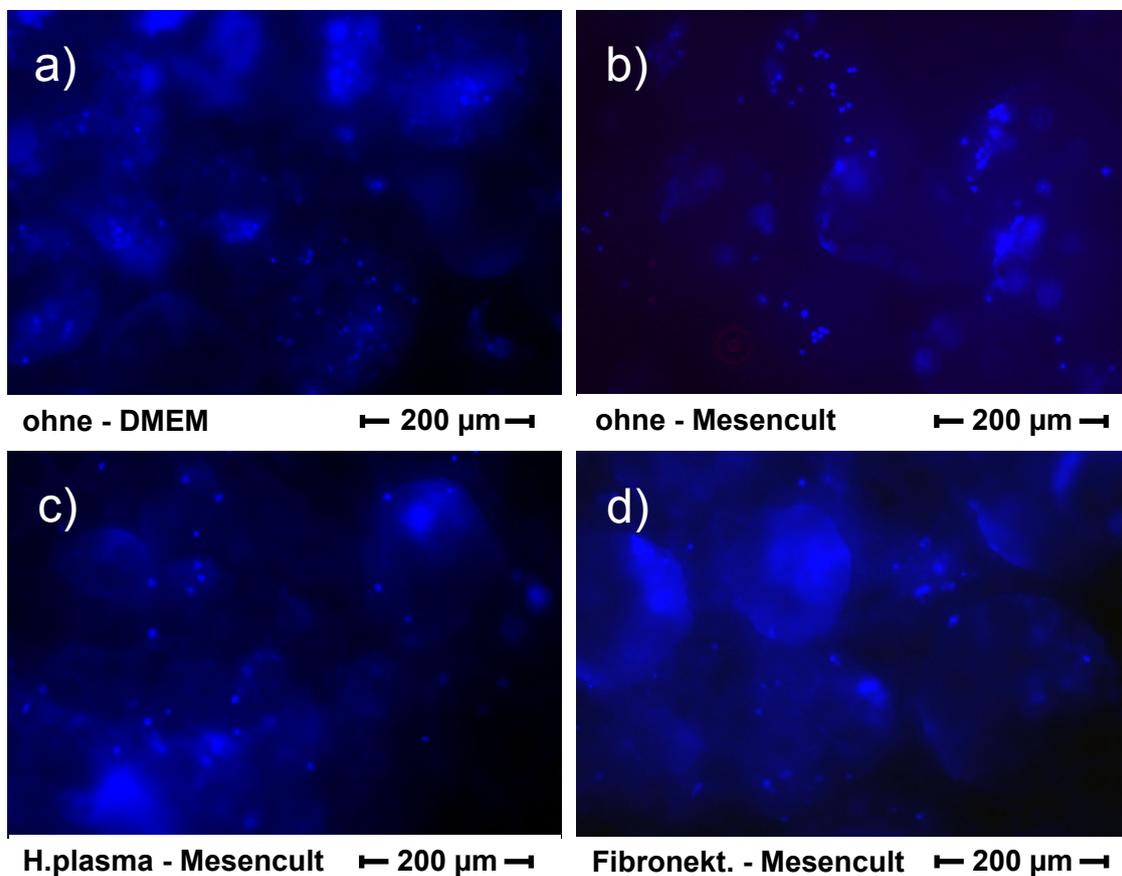
### 3.2.3 Semiquantitative Bestimmung adhärerender Zellen in Abhängigkeit von Beschichtung und Medium

Durch die DAPI-Färbung war es möglich, Zellkerne der BMC anzufärben und diese unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Diese wurden fotografiert, das Sichtfeld gerastert und die Zellen ausgezählt. So ließ sich die Anzahl adhärerender Zellen über einen bestimmten Zeitraum, in diesem Fall 21 Tage, vergleichen.

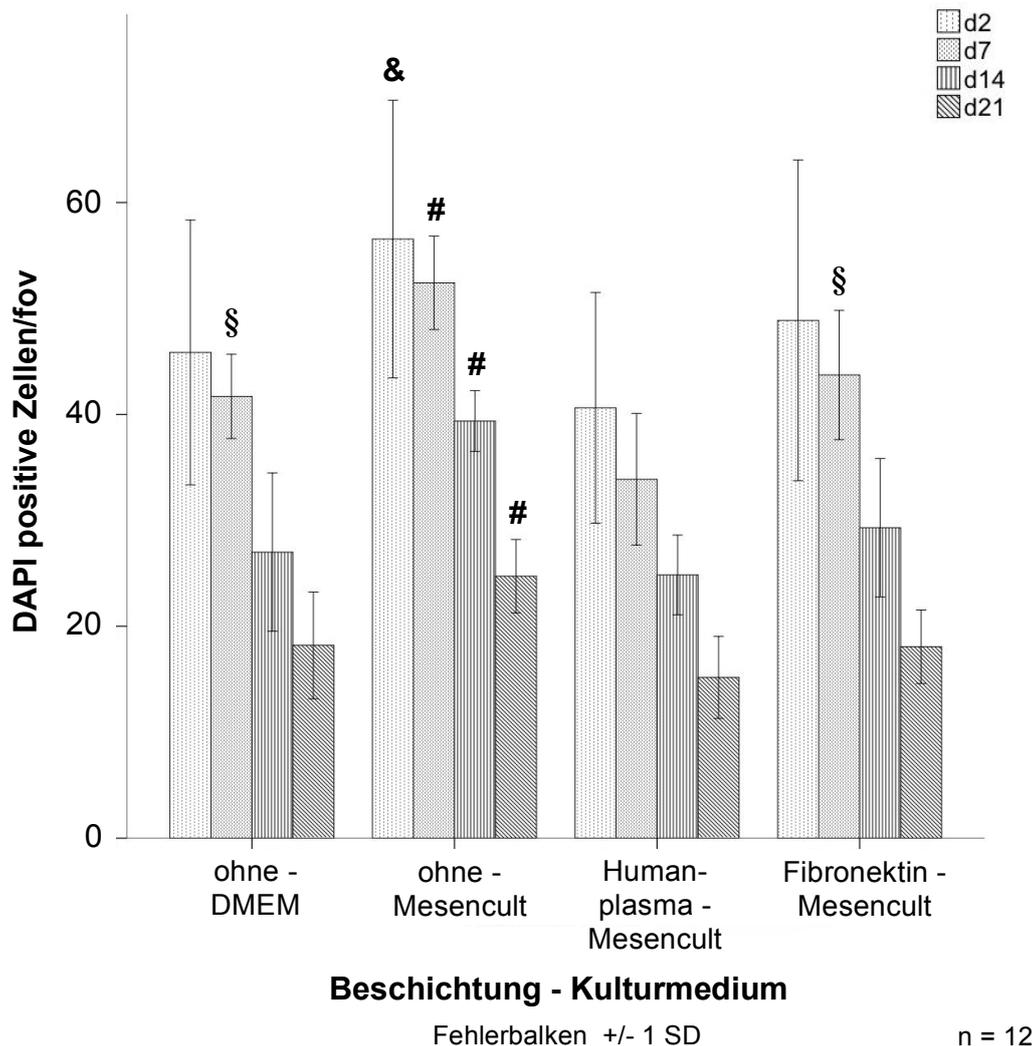
Die Anzahl der Zellen auf der Beschichtungs-Kulturmedium Kombination ohne - DMEM und +Fibronectin - Mesencult zeigte sich an Tag 7 signifikant erhöht

gegenüber der Kombination +Humanplasma - Mesencult. Die Zellzahl der Kombination ohne - Mesencult zeigte sich an Tag 2 signifikant erhöht gegenüber der Kombination +Humanplasma - Mesencult. Auf der Kombination ohne - Mesencult hafteten an den Tagen 7, 14 und 21 gegenüber allen anderen Beschichtungs-Kulturmedium Kombinationen signifikant mehr Zellen an. Die höchsten Zellzahlen wurden auf der Kombination ohne - Mesencult an den Tagen 2 und 7 erreicht ( $p < 0,05$ ; siehe auch Abbildung 3-5).

Im Folgenden ist exemplarisch von jeder Beschichtung-Kulturmedium Kombination an Tag 2 ein Bild in 100facher Vergrößerung aufgeführt:

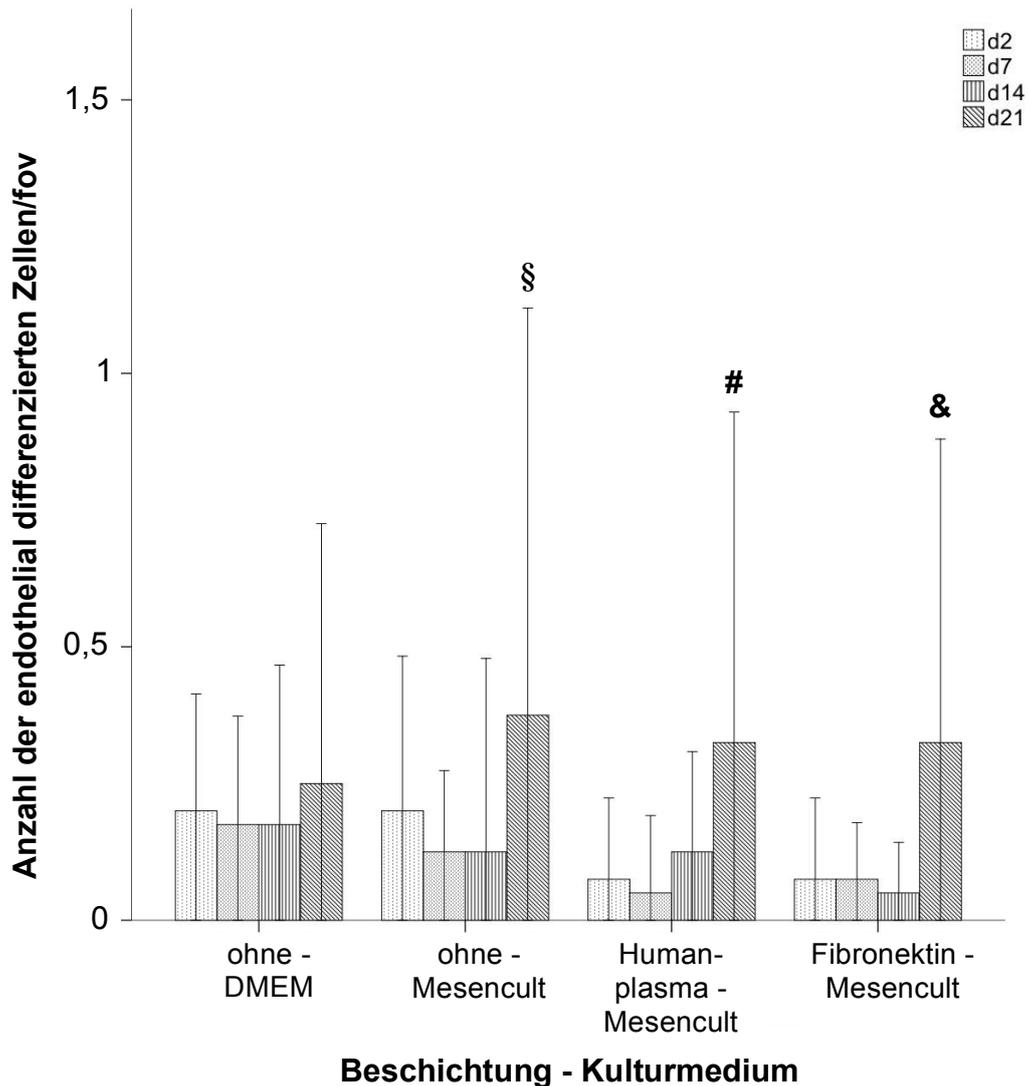


**Abbildung 3-4: Repräsentative Darstellung DAPI-gefärbter BMC an Tag 2 nach Aussaat auf  $\beta$ -TCP ohne Beschichtung in DMEM (a), ohne Beschichtung in Mesencult (b), mit Humanplasmabeschichtung in Mesencult in (c) und mit Fibronektinbeschichtung in Mesencult (d). Originale Vergrößerung: 100x, Maßstabsbalken repräsentiert 200 µm.**



**Abbildung 3-5: Signifikanter Abfall der Anzahl adhätierender BMC im Zeitverlauf (Tage 2, 7, 14 und 21 nach Aussaat). Mittelwert und Standardabweichung werden gezeigt (n = 12). Generell zeigte sich eine tendenziell höhere Anzahl adhätierender Zellen auf unbeschichtetem  $\beta$ -TCP. Auf der y-Achse ist die Anzahl der DAPI positiven Zellen pro Gesichtsfeld (fov), auf der x-Achse die Beschichtung - Kulturmedium Kombination aufgetragen. Die Messung der DAPI positiven Zellen pro Gesichtsfeld erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.6) beschrieben wurde. § =  $p < 0,05$  ohne - DMEM und Fibronectin -Mesencult d7 vs. Humanplasma - Mesencult; & =  $p < 0,05$  ohne - Mesencult d2 vs. Humanplasma - Mesencult; # =  $p < 0,05$  ohne - Mesencult d7, d14, d21 vs. alle anderen Gruppen.**

Auch der Nachweis von endothelial differenzierten Zellen über den endothelzellspezifischen Farbstoff DiL gelang bei allen Beschichtung - Kulturmedium Kombinationen auf die gleiche Weise. Jedoch zeigten sich hier keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Zahl der endothelial differenzierten Zellen unter den BMC war weitaus geringer als die Zahl der DAPI-positiven Zellen, so dass sich die Quantifizierung der Zellen als schwierig erwies. Dennoch ließ sich innerhalb der Gruppen ohne - Mesencult, +Humanplasma - Mesencult und +Fibronectin - Mesencult eine signifikant erhöhte Zellzahl an Tag 21 gegenüber den vorherigen Tagen nachweisen.



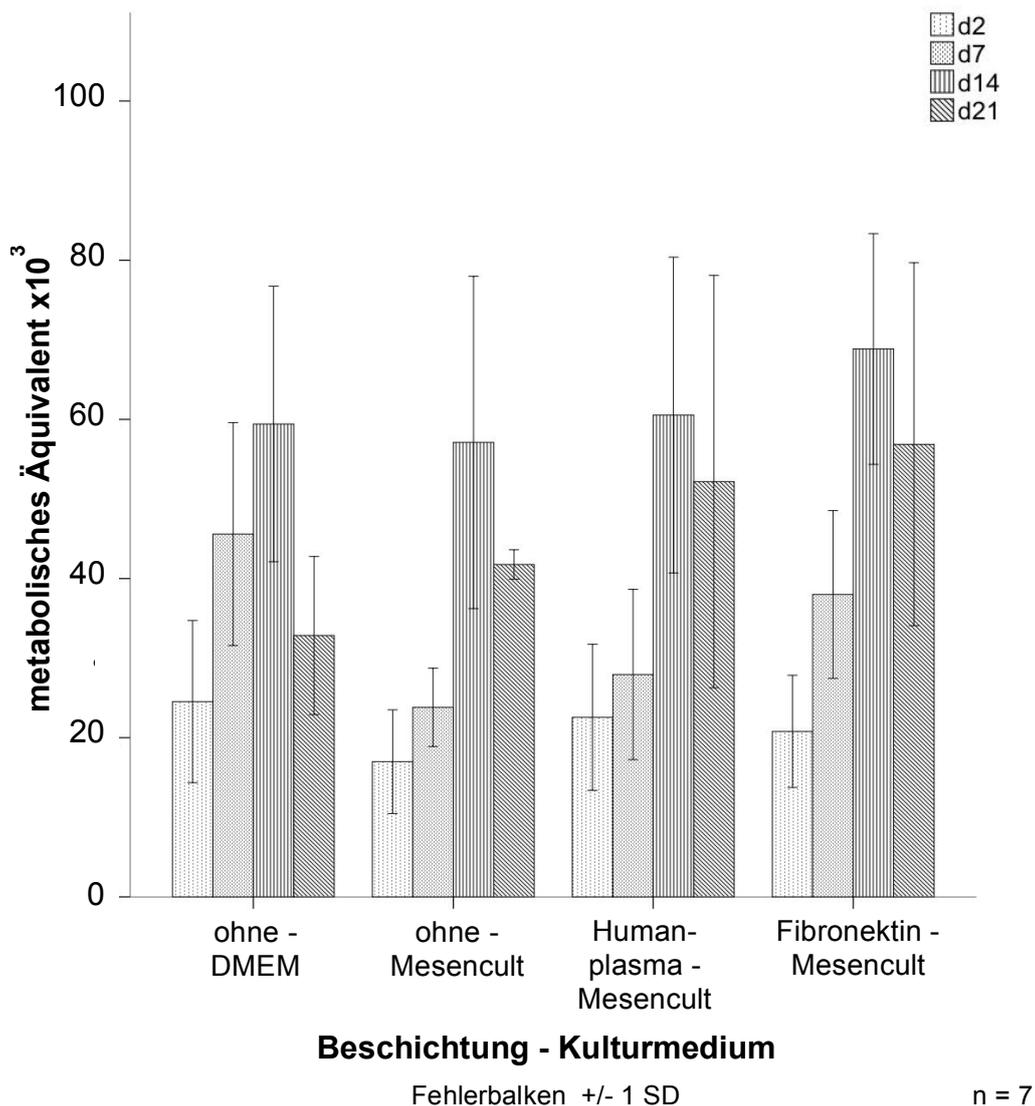
Fehlerbalken +/- 1 SD

n = 12

**Abbildung 3-6: Signifikanter Anstieg der Anzahl adhärerender endothelial differenzierter Zellen im Zeitverlauf (Tag 21 nach Aussaat) bei in Mesencult kultivierten BMC. Mittelwert und Standardabweichung werden gezeigt (n = 12). Auf der y-Achse ist die Anzahl der endothelial differenzierten Zellen pro Gesichtsfeld (fov), auf der x-Achse die Beschichtung - Kulturmedium Kombination aufgetragen. Die Messung der endothelial differenzierten Zellen pro Gesichtsfeld erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.6) beschrieben wurde. § = p < 0,05 ohne -Mesencult vs. ohne - Mesencult d2, d7 und d14; # = p < 0,05 Humanplasma - Mesencult vs. Humanplasma - Mesencult d2, d7 und d14; & = p < 0,05 Fibronectin - Mesencult vs. Fibronectin - Mesencult d2, d7 und d14.**

### 3.2.4 Metabolische Aktivität der BMC in Abhängigkeit von Beschichtung und Medium

Über den MTT-Test wurde die metabolische Aktivität der Zellen nachgewiesen, dies gelang hier über 21 Tage. Die höchsten Werte zeigten sich in allen Gruppen an Tag 14, ebenfalls gemeinsam war ein Abfall der Werte zu Tag 21. Das höchste Aktivitätsniveau im Gruppenvergleich ließ sich bei der Beschichtungs-Kulturmedium Kombination +Fibronectin - Mesencult an den Tagen 14 und 21 messen, jedoch waren die beobachteten Unterschiede ohne statistische Signifikanz (siehe Abbildung 3-7).



**Abbildung 3-7: Metabolische Aktivität von BMC im Beschichtung - Kulturmedium Vergleich im zeitlichen Verlauf über 21 Tage. Mittelwert und Standardabweichung werden gezeigt (n = 7). Auf der y-Achse ist das metabolische Äquivalent von BMC, auf der x-Achse die Beschichtung - Kulturmedium Kombination aufgetragen. Die Messung des Zelläquivalentes erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.7) beschrieben wurde. Die metabolische Aktivität wurde mittels MTT-Test gemessen und wird als metabolisches Äquivalent von BMC kultiviert unter Standardbedingungen angegeben. Die Aktivität war an Tag 14 unabhängig von den Versuchsbedingungen am höchsten.**

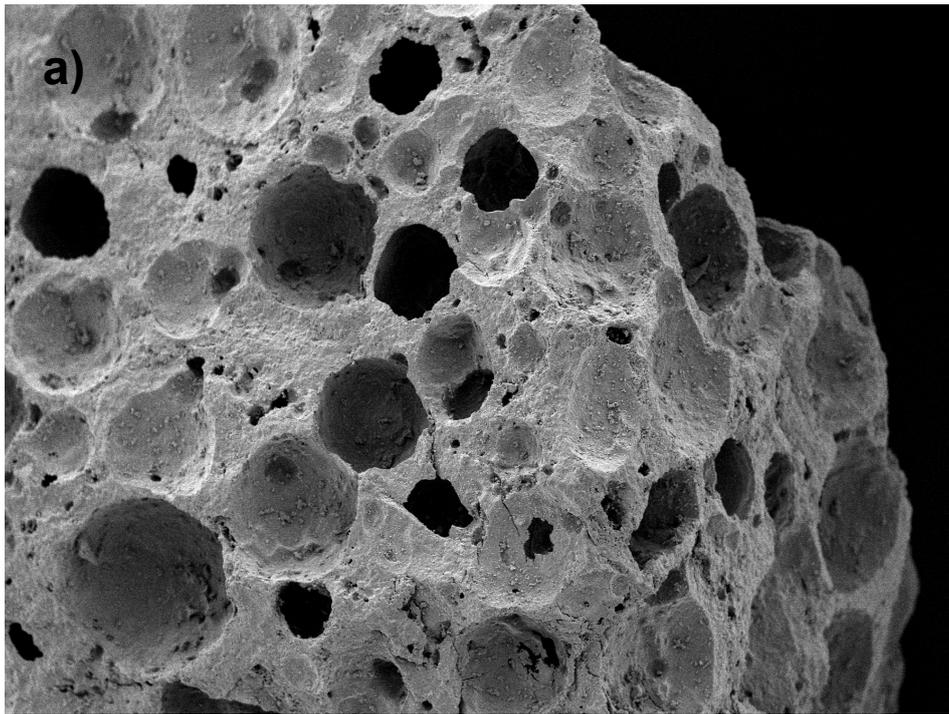
### 3.3 Ergebnisse zweiter Versuchsteil – Materialvergleich

#### 3.3.1 Nachweis von BMC auf den Knochenersatzstoffen mittels Rasterelektronenmikroskopie

Durch rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen ließ sich die Oberflächenstruktur der verschiedenen Knochenersatzmaterialien genau darstellen.

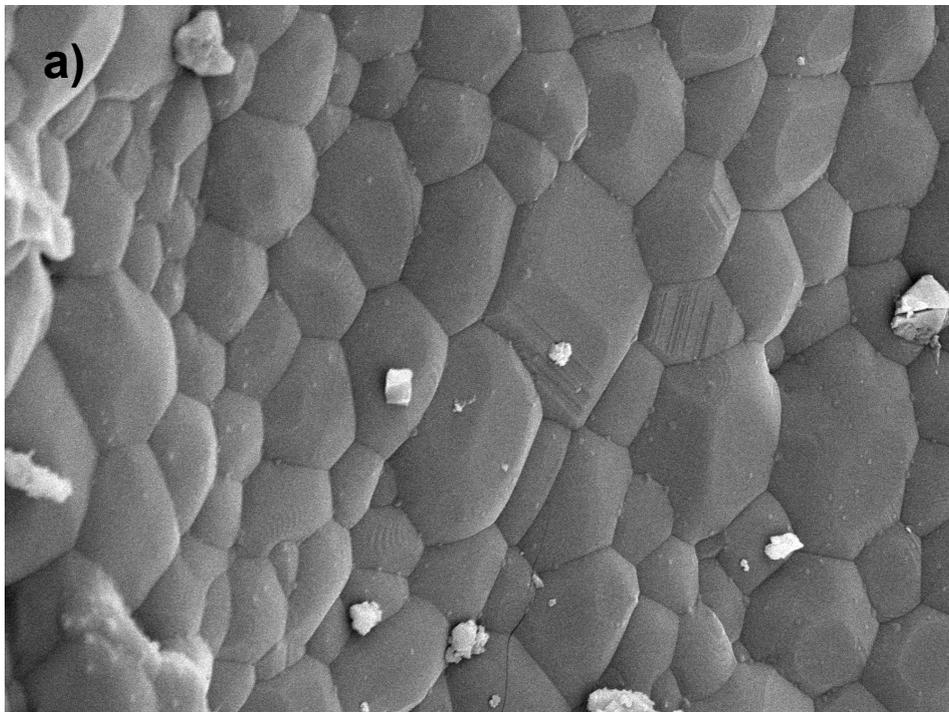
Der Knochenersatzstoff *ChronOs*<sup>®</sup> ( $\beta$ -TCP) zeigte in hoher Vergrößerung eine wabenartige, mit Furchen zwischen den Waben versehene Oberfläche. Bei niedrigerer Vergrößerung zeigten sich große interkonnektierende Poren, die einen Blick tief ins Innere des Materials zuließen. Im Gegensatz hierzu stellte sich *Cerabone*<sup>®</sup> (BS) in großer Vergrößerung als sehr raues Material dar. Die Oberfläche war stark zerklüftet und besaß winzige Erhabenheiten. In hoher Vergrößerung erkannte man die ungleichmäßige Porenverteilung auf dem Material, so waren Gebiete mit sehr kleinen und Gebiete mit größeren Poren zu erkennen. Die demineralisierte humane Knochenmatrix (DBM) zeigte anders als die beiden anderen Materialien in hoher Vergrößerung eine relativ glatte Oberfläche mit sehr kleinen Porenöffnungen. In größerer Vergrößerung zeigte sich ein faseriger Aufbau des Materials mit vielen über das gesamte Material verteilten großen und kleinen Poren und Kanälchen.

Die Aufnahme von zellfreien Granula wurde vorgenommen, um die mit BMC versehenen Materialien besser beurteilen zu können (siehe Abbildung 3-8). So war es hierdurch leichter, an mit Zellen versehenem Material zu erkennen, wo genau die Zellen anhaften und ob und wie tief sie in das Material eingedrungen waren.



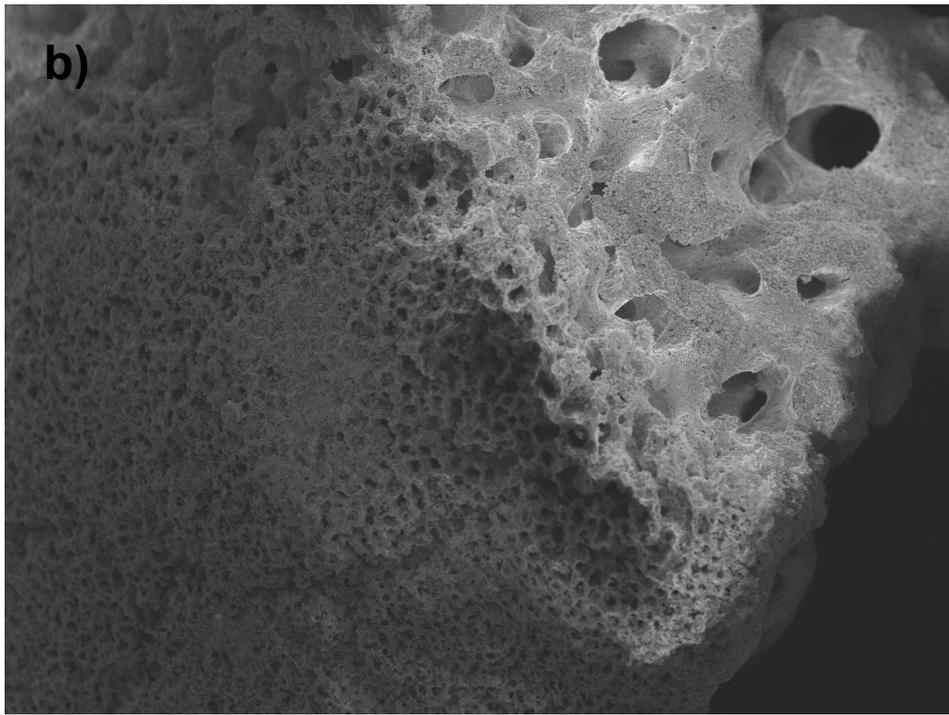
$\beta$ -TCP zellfrei

400  $\mu$ m



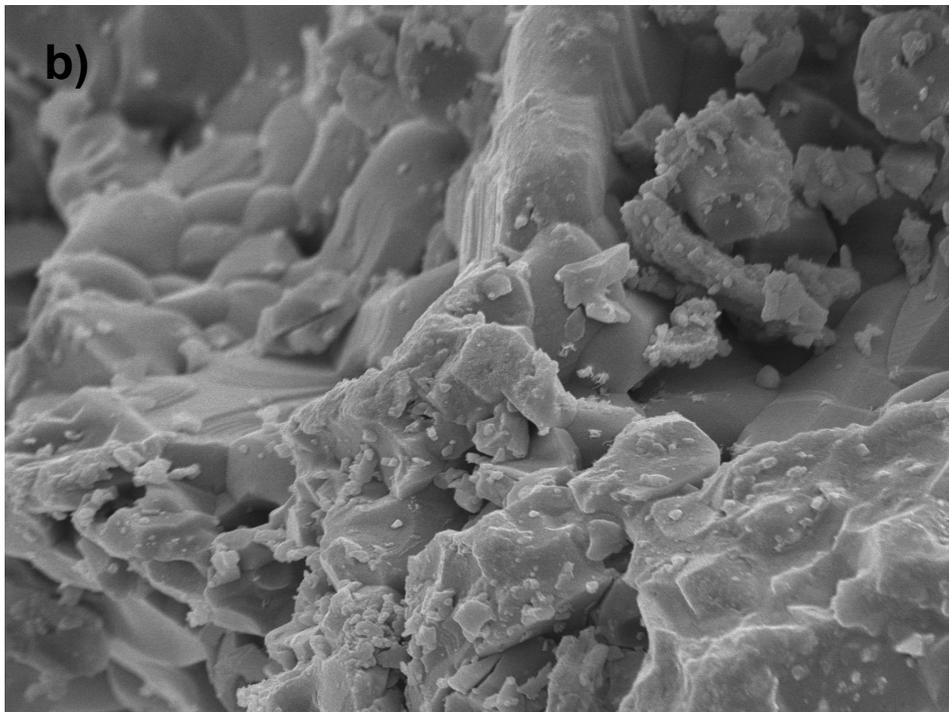
$\beta$ -TCP zellfrei

6  $\mu$ m



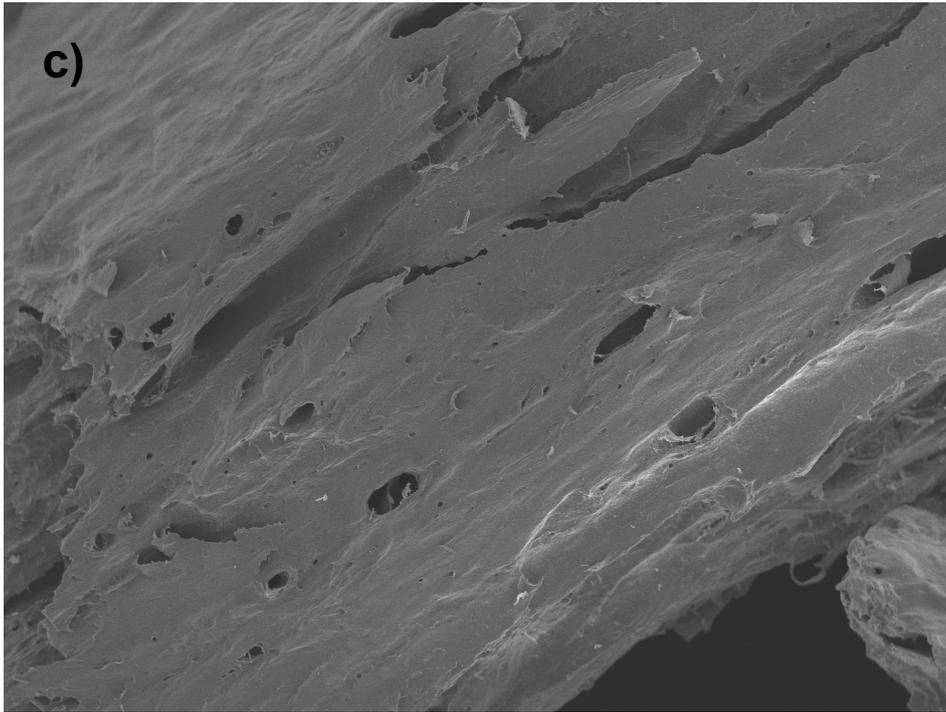
BS zellfrei

400  $\mu\text{m}$



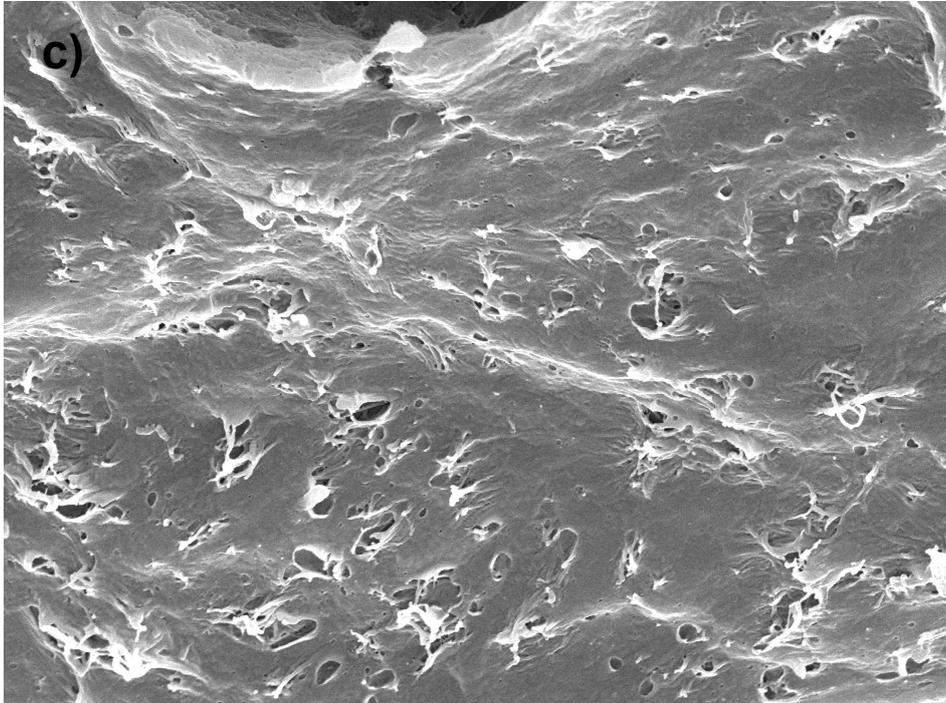
BS zellfrei

6  $\mu\text{m}$



**DBM zellfrei**

**400 μm**



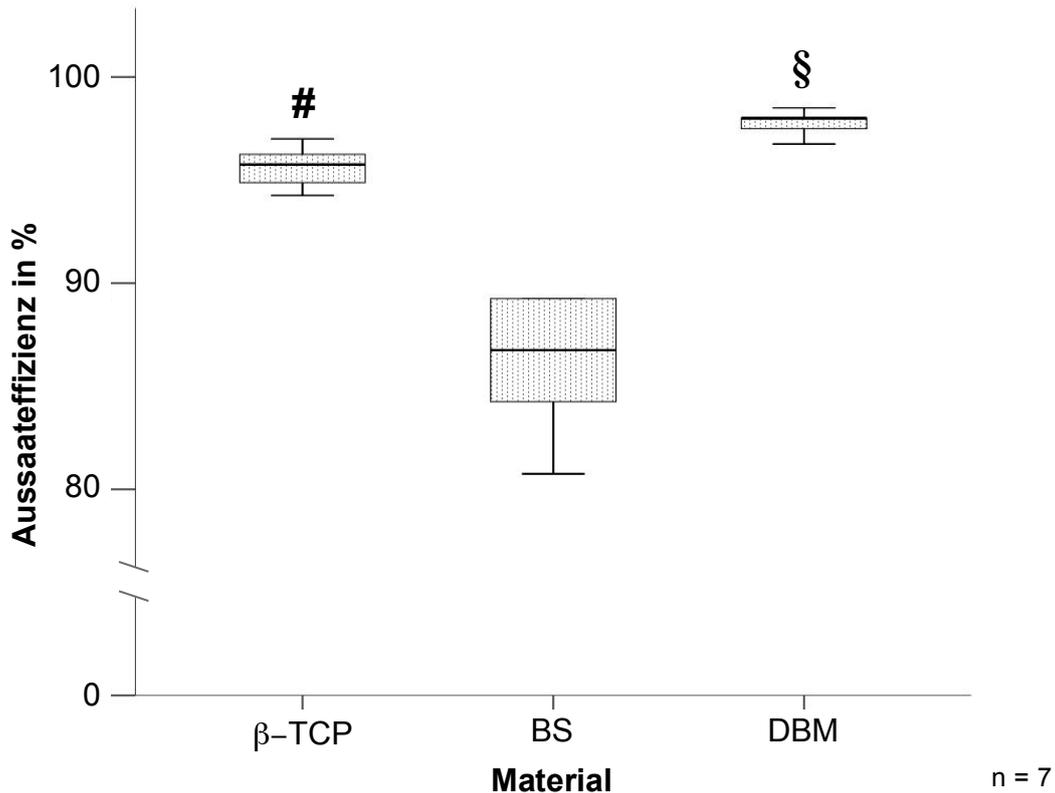
**DBM zellfrei**

**6 μm**

**Abbildung 3-8: Repräsentative Darstellung von REM-Aufnahmen der verschiedenen zellfreien Knochenersatzmaterialien in verschiedenen Vergrößerungen.  $\beta$ -TCP (a), Bovine Spongiosa (b) und DBM (c). Die Aufnahme der Bilder erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.14) beschrieben wurde.** Deutlich sichtbar sind die interkonnektierenden Poren des  $\beta$ -TCP (a), die ungleiche Porenverteilung auf Boviner Spongiosa (b) und der faserige Aufbau des DBM mit vielen verschieden großen interkonnektierenden Poren und Kanälchen (c).

### 3.3.2 Aussaat-effizienz

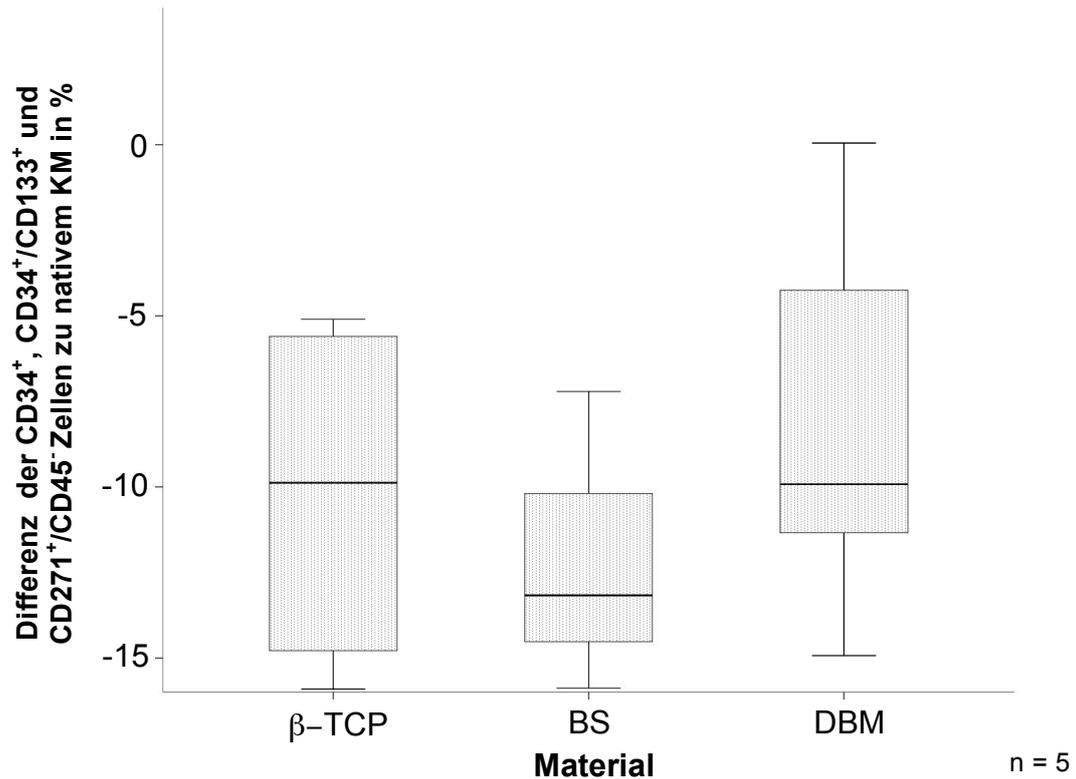
Auch im zweiten Versuchsteil wurde die Aussaat-effizienz der BMC bei den verschiedenen Knochenersatzmaterialien durch Zellzählung nachgewiesen. Analog zum ersten Versuchsteil wurden bei jedem Knochenersatzmaterial nach Aussaat die im Well und nicht auf dem Material adhärierenden Zellen gezählt und so die Aussaat-effizienz bestimmt. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte Aussaat-effizienz auf DBM gegenüber den beiden anderen Materialien.  $\beta$ -TCP als Trägermaterial zeigte eine signifikant erhöhte Aussaat-effizienz gegenüber BS (siehe Abbildung 3-9).



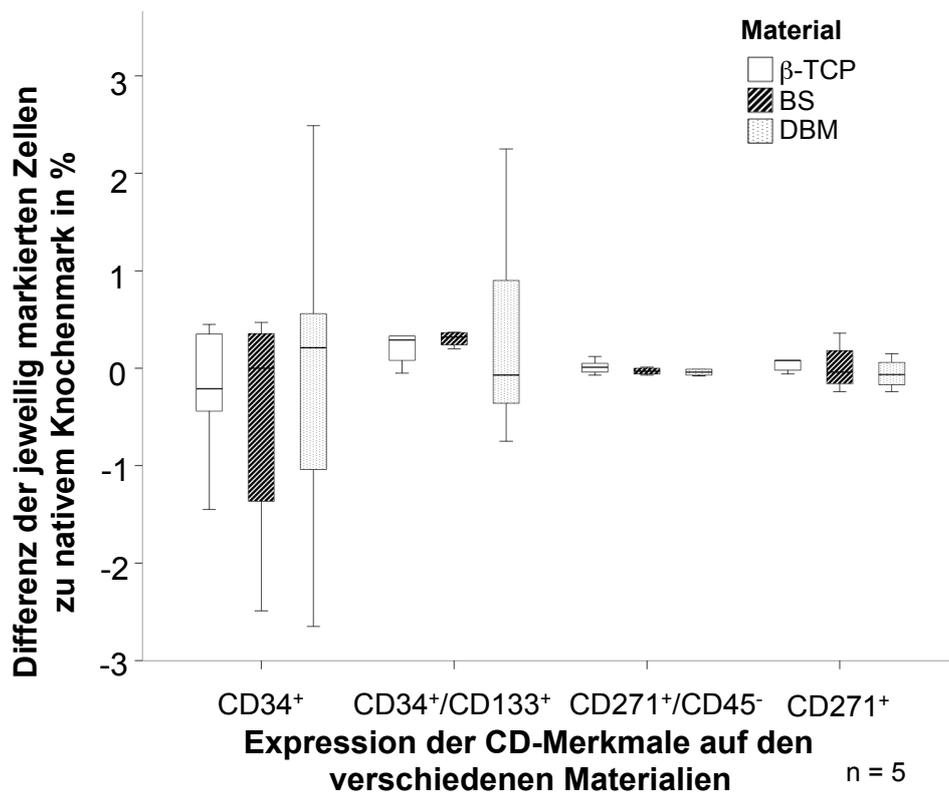
**Abbildung 3-9: Aussaateffizienz der BMC abhängig vom Trägermaterial. Boxplots des Medians sind gezeigt (n = 7). Auf der y-Achse ist die Aussaateffizienz in %, auf der x-Achse das Trägermaterial aufgetragen. Die Messung der Aussaateffizienz erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.5) beschrieben wurde. § = p < 0,05 DBM vs. alle anderen Materialien; # = p < 0,05  $\beta$ -TCP vs. BS.**

### 3.3.3 Anteile adhätierender Zellpopulationen

In diesem Versuchsteil wurden in einem subtraktiven Verfahren die prozentualen Anteile verschiedener Zellpopulationen vor der Aussaat sowie in den nicht adhätierenden BMC mittels FACS-Analyse bestimmt. Es wurden CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>, CD271<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> und CD271<sup>+</sup> Zellen untersucht. Bei den durchgeführten FACS Messungen konnten keine signifikanten Unterschiede in der Adhäsion der untersuchten Zellpopulationen in Abhängigkeit vom verwendeten Trägermaterial beobachtet werden (siehe Abbildung 3-10 und Abbildung 3-11).



**Abbildung 3-10: Keine An- oder Abreicherung der BMC in Abhängigkeit vom Trägermaterial. Boxplots des Medians sind gezeigt (n = 5). Auf der y-Achse ist die Differenz der nicht adhärenen CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup> und CD271<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> Zellen in %, auf der x-Achse das Trägermaterial aufgetragen. Die Messung mittels FACS erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.8) beschrieben wurde.**

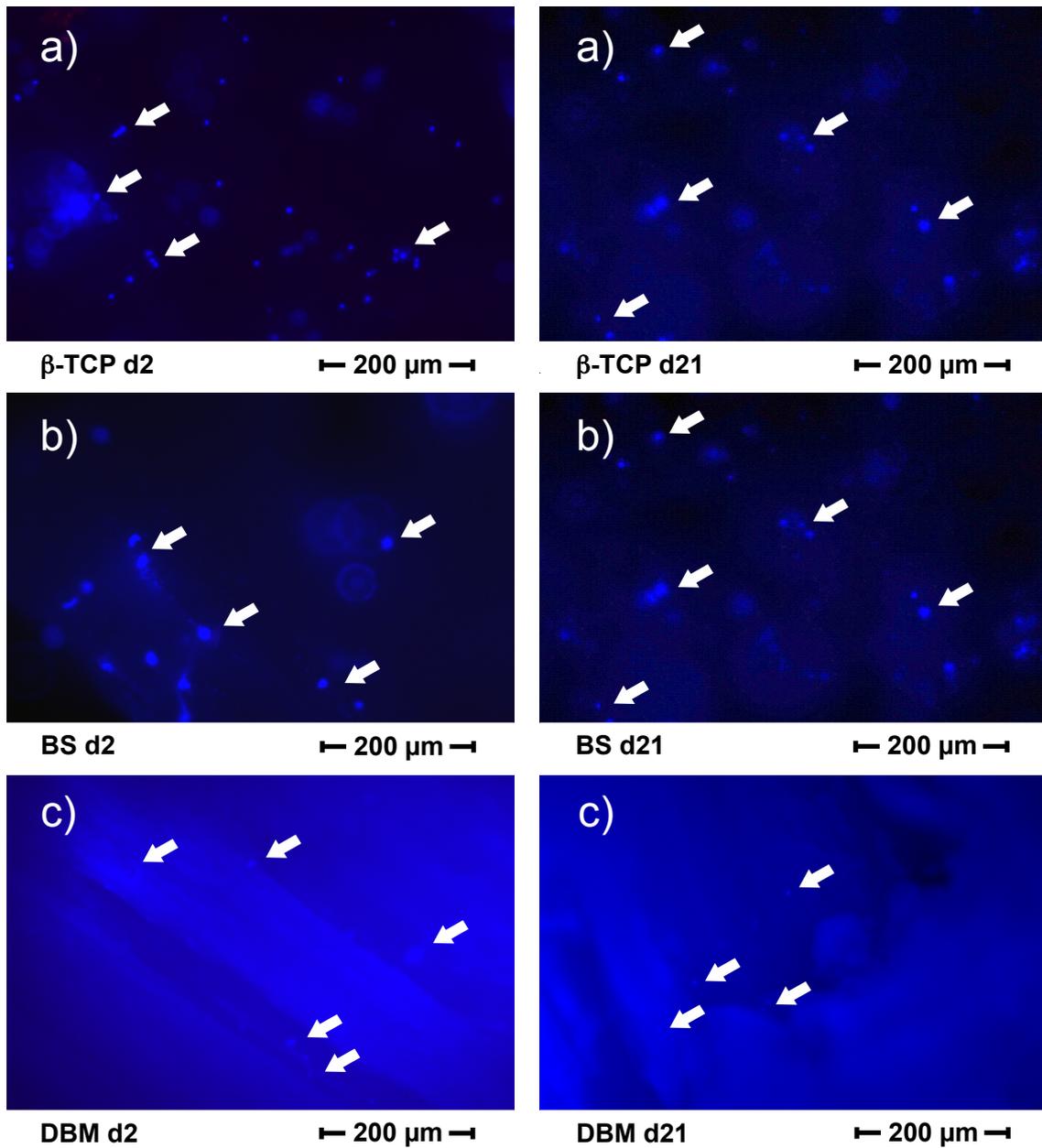


**Abbildung 3-11: Keine An- oder Abreicherung bestimmter Vorläuferzellen in Abhängigkeit vom Trägermaterial. Boxplots des Medians sind gezeigt (n = 5). Auf der y-Achse ist die Differenz der anhaftenden, jeweilig markierten Zellen in % zu nativem Knochenmark, auf der x-Achse die verwendete Markierung CD34<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>, CD271<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup> und CD271<sup>+</sup> aufgetragen. Die Messung mittels FACS erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.8) beschrieben wurde.**

### 3.3.4 Semiquantitative Bestimmung adhärerender Zellen in Abhängigkeit des Trägermaterials

Auch im Versuchsteil des Materialvergleichs wurden die Zellkerne der BMC mittels DAPI angefärbt, um eine Zellzählung auf den Materialien durchzuführen. Hier wies das Material DBM an seiner Oberfläche eine starke Eigenfluoreszenz auf (siehe Abbildung 3-12) und die im Material befindlichen Kanäle und Poren waren wesentlich kleiner als die der Vergleichsmaterialien. Eine Auswertung mittels Zellzählung brachte auf Grund der schlechten Sichtbarkeit der Zellen für

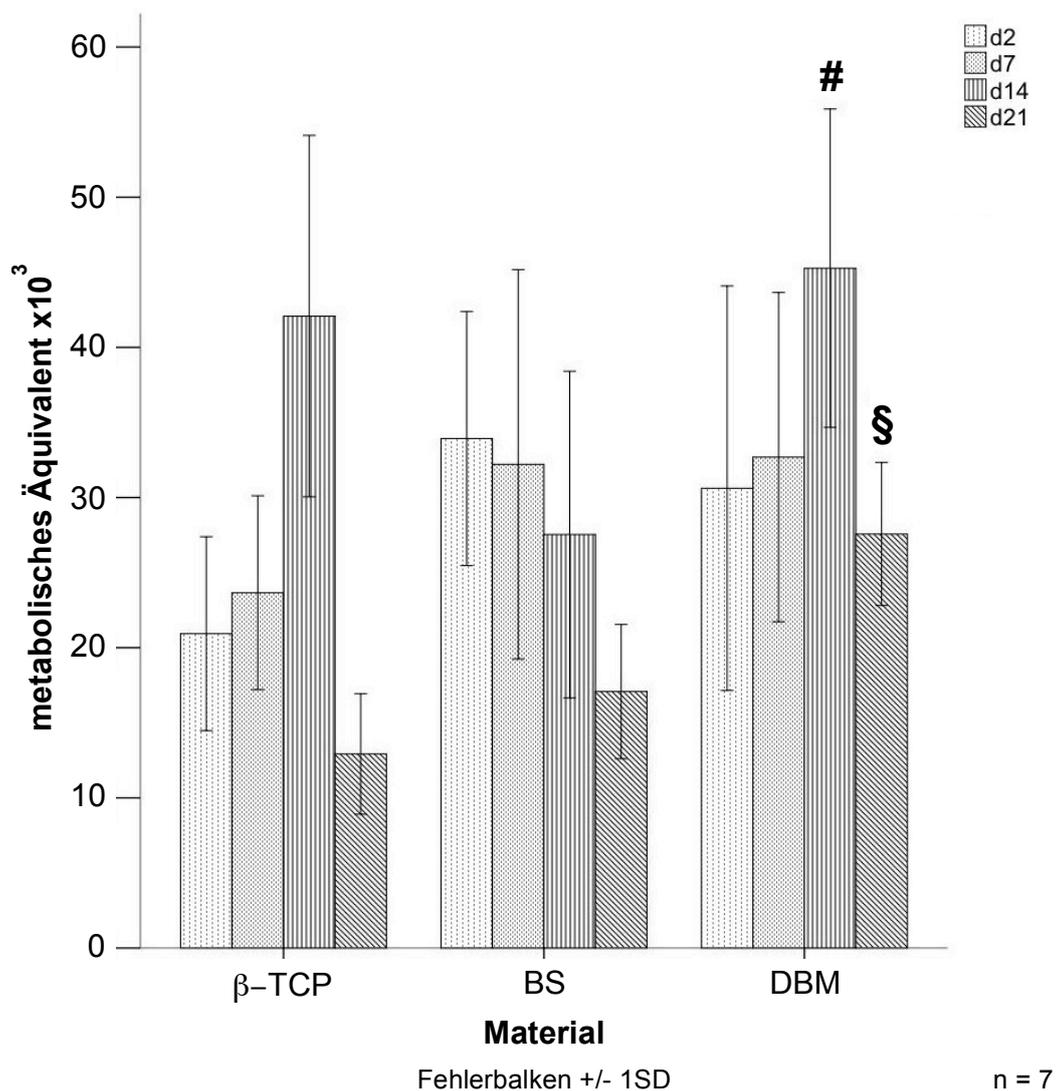
DBM keine Werte ein. Dennoch konnten an allen Tagen auf allen Materialien Zellen nachgewiesen werden.



**Abbildung 3-12: Repräsentative Darstellung DAPI-gefärbter BMC an Tag 2 und Tag 21 nach Aussaat auf  $\beta$ -TCP (a), boviner Spongiosa (b) und demineralisierter humaner Knochenmatrix (c). Die Pfeile weisen exemplarisch auf einige Zellen. Originale Vergrößerung: 100x, Maßstabsbalken repräsentiert 200  $\mu$ m.**

### 3.3.5 Metabolische Aktivität der BMC in Abhängigkeit des Trägermaterials

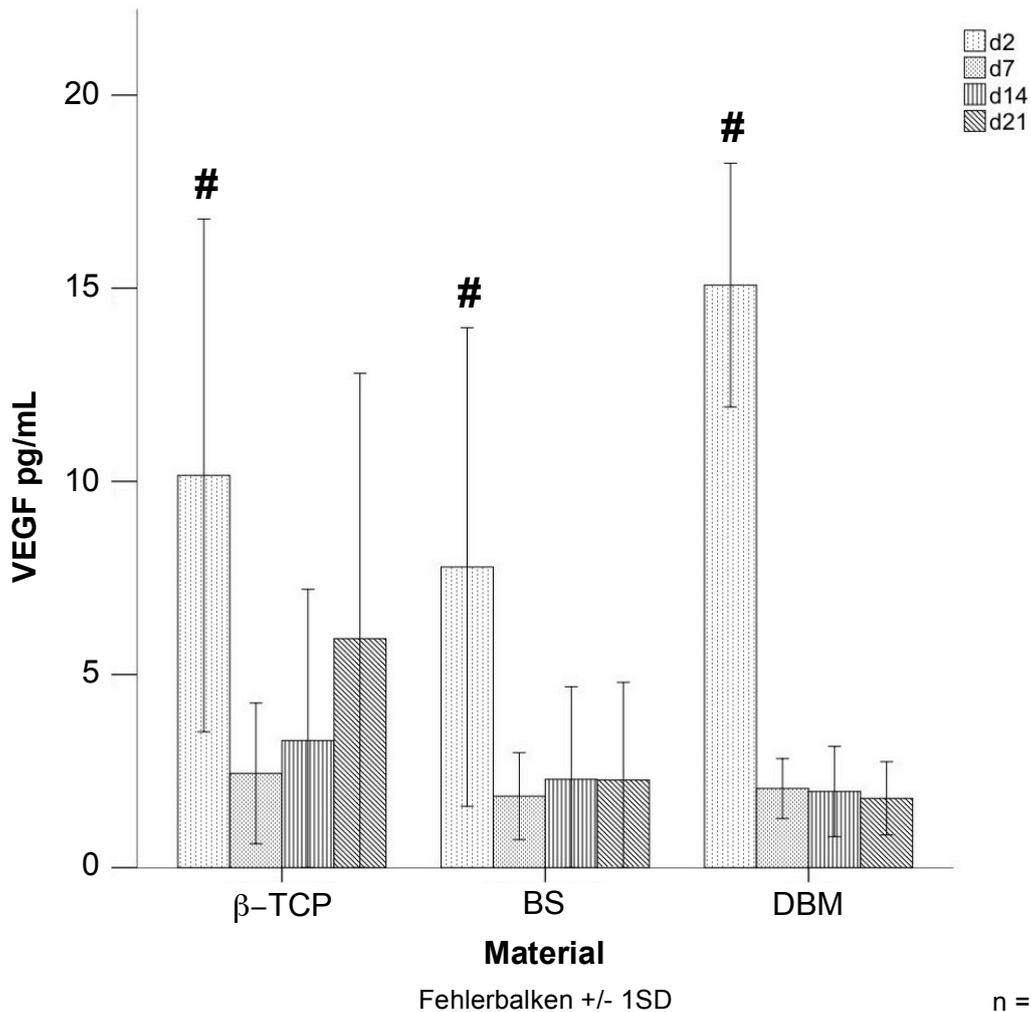
Es gelang im zweiten Versuchsteil, die metabolische Aktivität der Zellen auf allen drei Knochenersatzmaterialien mittels MTT-Test zu messen.  $\beta$ -TCP und DBM zeigten ein ähnliches Bild wie im Vergleich der Beschichtungen-Kulturmedien (siehe Abbildung 3-13) mit einem Maximum der Aktivität an Tag 14. Auf BS war die Aktivität an Tag 2 höher, fiel jedoch im weiteren Verlauf der Versuchsreihe kontinuierlich ab. Die metabolische Aktivität der Zellen auf DBM zeigte sich an Tag 14 als signifikant höher als auf BS. An Tag 21 war die Aktivität auf DBM signifikant höher als auf den beiden anderen Trägermaterialien. Auf  $\beta$ -TCP ließ sich nach Tag 14 ein starker Abfall der metabolischen Aktivität nachweisen.



**Abbildung 3-13: Metabolische Aktivität von BMC im Materialvergleich im zeitlichen Verlauf über 21 Tage. Mittelwert und Standardabweichung werden gezeigt (n = 7). Auf der y-Achse ist das metabolische Äquivalent von BMC, auf der x-Achse das Material aufgetragen. Die Messung des Zelläquivalents erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.7) beschrieben wurde. Die metabolische Aktivität wurde mittels MTT-Test gemessen und wird als metabolisches Äquivalent von BMC kultiviert unter Standardbedingungen angegeben. # =  $p < 0,05$  DBM d14 vs. Cerabone®; § =  $p < 0,05$  DBM d21 vs. alle anderen Materialien.**

### 3.3.6 Sekretion von VEGF

Die VEGF-Freisetzung durch BMC wurde mittels ELISA gemessen. In den gemessenen Überständen zeigte sich eine signifikant erhöhte Konzentration von VEGF auf allen Knochenersatzstoffen an Tag 2 gegenüber allen Folgetagen in der jeweiligen Gruppe (siehe Abbildung 3-14). Auch zeigte sich an Tag 2 auf DBM eine tendenziell erhöhte VEGF-Synthese gegenüber BS ( $p = 0,09$ ).



**Abbildung 3-14: Maximum der VEGF-Sekretion durch BMC an Tag 2 nach Aussaat. VEGF-Sekretion von BMC kultiviert auf  $\beta$ -TCP, boviner Spongiosa und DBM gemessen mittels ELISA ist gezeigt. Mittelwert und Standardabweichung werden gezeigt (n = 7). Auf der y-Achse ist die VEGF Konzentration in pg/mL, auf der x-Achse das Material aufgetragen. Die Messung der VEGF-Konzentration erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.9) beschrieben wurde. Ein Trend zu höheren Werten in der DBM-Gruppe im Vergleich zu boviner Spongiosa konnte an Tag 2 beobachtet werden. # =  $p < 0,05$  d2 vs. alle anderen Materialien; DBM d2 tendenziell erhöht gegenüber BS d2 ( $p = 0,09$ ).**

### 3.3.7 ELISA SDF-1 $\alpha$

SDF-1 $\alpha$  ist ein Chemokin und ein Adhäsionsprotein, das die Adhäsion von Stammzellen in der Knochenmarksnische triggert und den Verbleib in dieser steuert. Die Messung der SDF-1 $\alpha$  Werte mittels ELISA zeigte keine SDF-1 $\alpha$  Ausschüttung der Zellen auf den verschiedenen Materialien. Einzig an d21 auf  $\beta$ -TCP ließ sich ein Mittelwert von 6,28 pg/mL SDF-1 $\alpha$  messen. Des Weiteren spielt SDF1-a eine wichtige Rolle für die Rekrutierung regenerativer Zellen in ischämische Gewebe.

### 3.3.8 Genexpressionanalyse mittels RT-PCR

Um den Differenzierungsgrad der BMC auf den verschiedenen Knochenersatzmaterialien zu bestimmen, wurde eine Real-Time-PCR mit verschiedenen Oberflächenmarkern durchgeführt. Um die gemessenen Werte vergleichen zu können, wurde die Genexpression in Relation zur Expression von GAPDH gemessen. Da die Mengen gewonnener cDNA sehr gering waren, wurde ein absoluter Nachweis der Genexpression durchgeführt.

#### *Von-Willebrand-Faktor (vWF)-Genexpression*

Der von-Willebrand-Faktor wird vor allen Dingen von Endothelzellen der Intima der Blutgefäße gebildet. Mit dem Vorhandensein vom vWF lässt sich also auf eine endotheliale Differenzierung schließen. Die Genexpression vom von-Willebrand-Faktor war über den gesamten Versuchszeitraum auf jedem der Materialien nachzuweisen.

Tabelle 3-1: Nachweis vom vWF auf den drei Knochenersatzmaterialien über 21 Tage

<b>vWF</b>	d2	d7	d14	d21
$\beta$ -TCP	+	+	+	+
BS	+	+	+	+
DBM	+	+	+	+

### *Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-Genexpression*

Als Signalmolekül kommt dem Vascular Endothelial Growth Factor sowohl in der Vaskulogenese als auch in der Angiogenese eine wichtige Rolle zu. Er sorgt für die Stimulierung des vaskulären Endothels und die Stimulation der Migration von Monozyten und Makrophagen. Es konnte gezeigt werden, dass VEGF in vitro die Teilung und Migration von Endothelzellen und die Migration glatter Gefäßmuskelzellen fördert.

VEGF-Genexpression ließ sich auf  $\beta$ -TCP und BS an den Tagen 2, 7 und 14 nachweisen. Auf DBM fand sich VEGF-Genexpression über die kompletten 21 Versuchstage.

Tabelle 3-2: Nachweis von VEGF-Genexpression auf den drei Knochenersatzmaterialien über 21 Tage

<b>VEGF</b>	d2	d7	d14	d21
$\beta$ -TCP	+	+	+	-
BS	+	+	+	-
DBM	+	+	+	+

### *Kollagen 1 alpha (Col-1 $\alpha$ )-Genexpression*

Kollagen 1 alpha (Col-1 $\alpha$ ) ist ein Protein der extrazellulären Matrix. Es wird zum Beispiel von Osteoblasten in den interstitiellen Raum ausgeschieden und bildet die Grundlage für neue Knochensubstanz. Col-1 $\alpha$  ist zudem ein wichtiger Bestandteil der Arterienwand und findet sich in vielen anderen konnektiven Geweben. Col-1 $\alpha$ -Genexpression ließ sich auf BS an den Tagen 2 bis 14 und auf DBM an Tag 14 nachweisen.

Tabelle 3-3: Nachweis von Col-1 $\alpha$ -Genexpression auf den drei Knochenersatzmaterialien über 21 Tage

<b>Col-1<math>\alpha</math></b>	d2	d7	d14	d21
$\beta$ -TCP	-	-	-	-
BS	+	+	+	-
DBM	-	-	+	-

### *Bone gamma-carboxyglutamate protein (BGLAP)-Genexpression*

Bone gamma-carboxyglutamate protein (BGLAP) wird auch Osteocalcin (OC) genannt und im Knochen von Osteoblasten gebildet. In der extrazellulären Matrix, deren Bestandteil es ist, bindet es an Hydroxyapatit und Calcium und inhibiert die Mineralisierung des Knochens. Durch diese Eigenschaften ist es ein guter Marker für die Knochenneubildung. Die Genexpression von BGLAP ließ sich auf  $\beta$ -TCP an den Tagen 2 und 14 und auf BS an den Tagen 2 bis 14 nachweisen.

Tabelle 3-4: Nachweis von BGLAP-Genexpression auf den drei Knochenersatzmaterialien über 21 Tage

<b>BGLAP</b>	d2	d7	d14	d21
$\beta$ -TCP	+	-	+	-
BS	+	+	+	-
DBM	-	-	-	-

#### *Alkalische Phosphatase (ALP)-Genexpression*

Eine erhöhte Expression der alkalischen Phosphatase (ALP) kann auf eine Osteoinduktivität des Materials hindeuten. ALP wurde hier als osteogener Indikator gemessen. Expression von ALP ließ sich auf  $\beta$ -TCP am Tag 14, auf BS an Tag 2 und auf DBM an den Tagen 2 und 14 nachweisen.

Tabelle 3-5: Nachweis von ALP-Genexpression auf den drei Knochenersatzmaterialien über 21 Tage

<b>ALP</b>	d2	d7	d14	d21
$\beta$ -TCP	-	-	+	-
BS	+	-	-	-
DBM	+	-	+	-

## Zusammenfassung RT-PCR

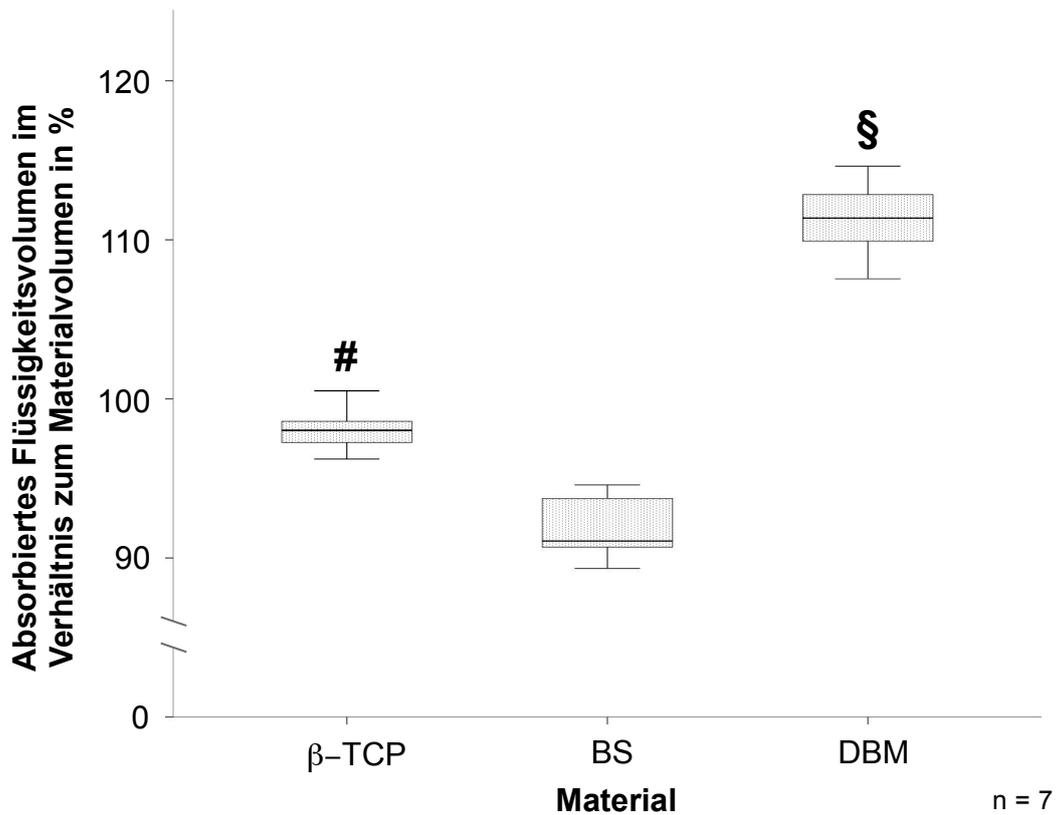
Nachfolgend ist eine tabellarische Übersicht über die gesamten Genexpressionsanalysen dargestellt.

Tabelle 3-6: Genexpression von endothelialen und osteogenen Markergenen in BMC kultiviert auf  $\beta$ -TCP, boviner Spongiosa und DBM im Zeitverlauf über 21 Tage, Übersichtstabelle.

	<b>d2</b>	<b>d7</b>	<b>d14</b>	<b>d12</b>
<b>vWF</b>	$\beta$ -TCP, BS, DBM	$\beta$ -TCP, BS, DBM	$\beta$ -TCP, BS, DBM	$\beta$ -TCP, BS, DBM
<b>VEGF</b>	$\beta$ -TCP, BS, DBM	$\beta$ -TCP, BS, DBM	$\beta$ -TCP, BS, DBM	DBM
<b>Col-1<math>\alpha</math></b>	BS	BS	BS, DBM	
<b>BGLAP</b>	$\beta$ -TCP, BS	BS	$\beta$ -TCP, BS	
<b>ALP</b>	BS, DBM		$\beta$ -TCP, DBM	

### 3.3.9 Relative Flüssigkeitsaufnahmekapazität der Materialien

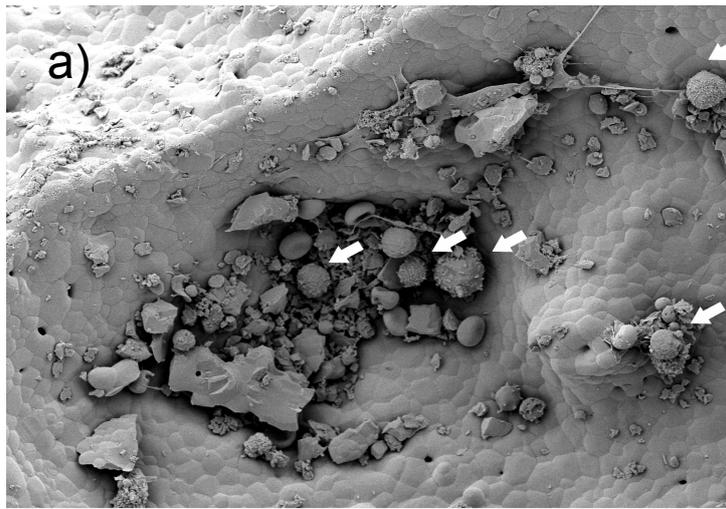
Da die BMC zur Aussaat auf den Materialien in PBS suspendiert sind, ist es möglich, dass die Flüssigkeitsaufnahmefähigkeit der Materialien eine Rolle im Bezug auf die anhaftenden Zellen spielt. Um dies zu evaluieren, wurde für jedes Material die maximal absorbierte Flüssigkeit im Verhältnis zur Materialmenge gemessen. Hier zeigte sich bei DBM ein signifikant erhöhter Wert gegenüber den beiden anderen Materialien. Das absorbierte Flüssigkeitsvolumen pro Volumeneinheit  $\beta$ -TCP war signifikant gegenüber BS erhöht (siehe Abbildung 3-15).



**Abbildung 3-15: Absorbiertes Flüssigkeitsvolumen im Verhältnis zum Materialvolumen bei  $\beta$ -TCP, BS und DBM. DBM wies die höchste Flüssigkeitsabsorbtion auf. Boxplots des Medians sind gezeigt (n = 7). Auf der y-Achse ist das absorbierte Flüssigkeitsvolumen im Verhältnis zum Materialvolumen in %, auf der x-Achse das Trägermaterial aufgetragen. Die Messung des absorbierten Flüssigkeitsvolumens im Verhältnis zum Materialvolumen erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.18) beschrieben wurde. § = p < 0,05 DBM vs.  $\beta$ -TCP und BS; # = p < 0,05  $\beta$ -TCP vs. BS.**

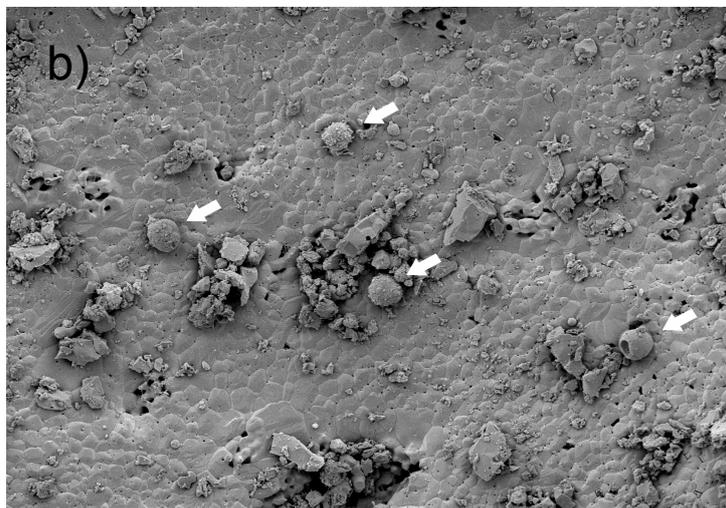
### 3.3.10 Rasterelektronenmikroskopischer Nachweis von BMC auf den Knochenersatzmaterialien

Rasterelektronenmikroskopisch konnte auf allen Materialien die Anlagerung von BMC nachgewiesen werden. Auf dem DBM-Material fanden sich die Zellen, wie in Abbildung 3-16 ersichtlich, vor allem in der Nähe der in das Material führenden Knochenkanälchen. Um eine höchstmögliche klinische Relevanz der Aufnahmen zu gewährleisten, wurden die REM-Bilder zwei Tage nach Aussaat der BMC aufgenommen.



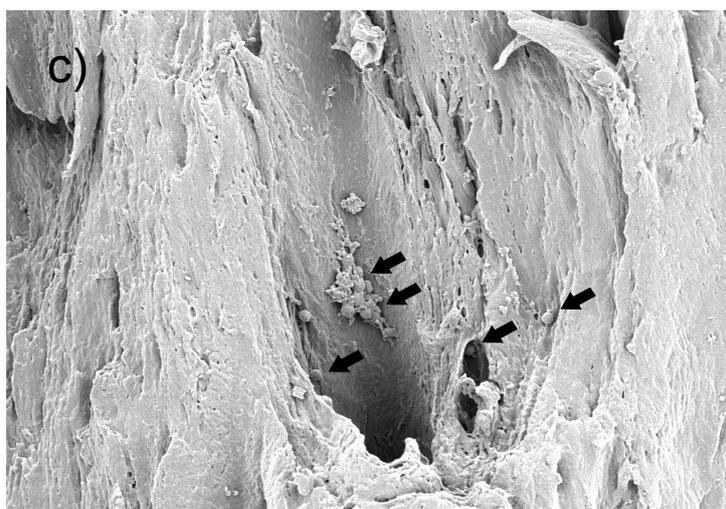
BMC auf  $\beta$ -TCP d2

30  $\mu$ m



BMC auf BS d2

30  $\mu$ m



BMC auf DBM d2

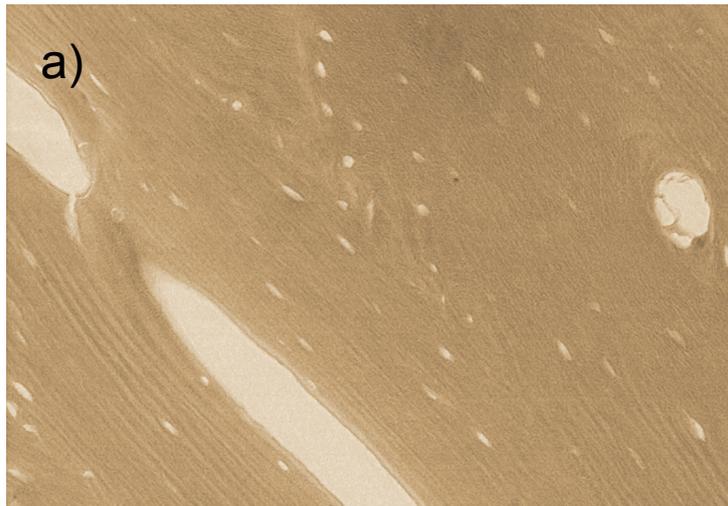
40  $\mu$ m

**Abbildung 3-16: Rasterelektronenmikroskopischer Nachweis von BMC auf den Knochenersatzmaterialien an Tag 2 nach Aussaat. Die Aufnahme der Bilder erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.14) beschrieben wurde.**

Repräsentative Aufnahmen von BMC auf  $\beta$ -TCP (a), BS (b) und DBM (c) sind gezeigt. Anhaftende BMC sind durch Pfeile markiert.

### 3.3.11 Histologischer Nachweis von BMC in DBM

Um einen Nachweis auf vorhandene Zellen im Inneren des DBM-Materials führen zu können, wurden histologische Schnitte angefertigt. Hier ließen sich in HE-Färbung Zellen nachweisen, die durch die engen Kanäle des Materials tief in dieses eingedrungen waren (siehe Abbildung 3-17). Auch gelang der Nachweis der Zellen über 21 Tage.



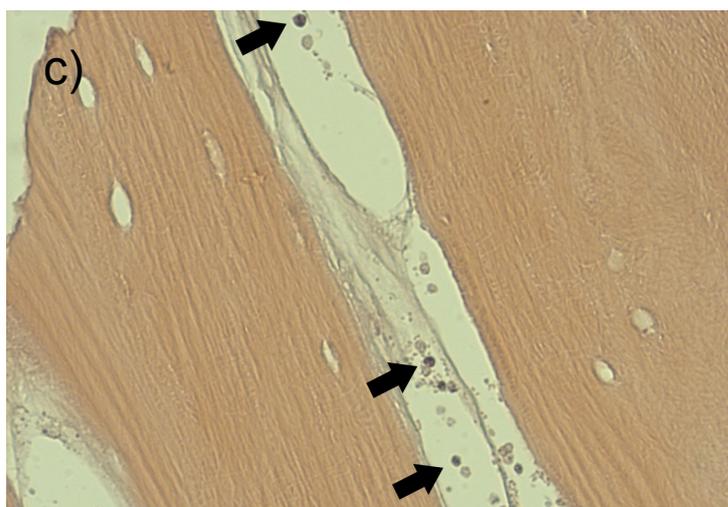
HE DBM Kontrolle

200 µm



HE BMC auf DBM d2

200 µm



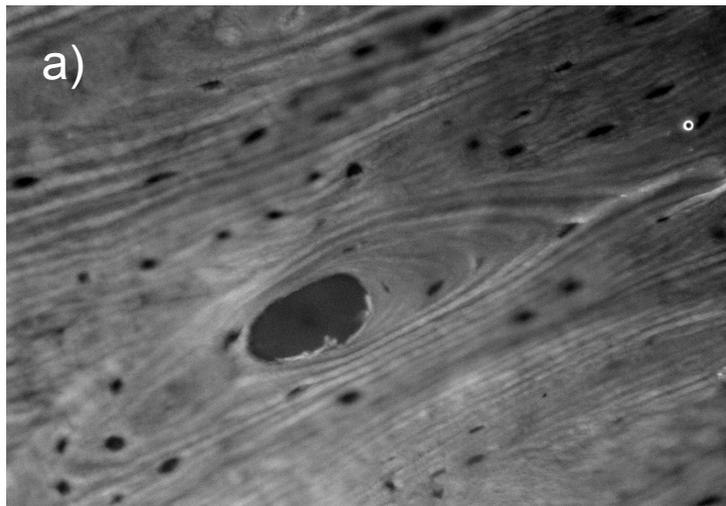
HE BMC auf DBM d21

200 µm

**Abbildung 3-17: Nachweis von BMC im Inneren der DBM-Partikel. HE-Färbung, zellfreier Kontrollansatz (a), BMC an Tag 2 (b) und Tag 21 (c) nach Aussaat. Die Pfeile weisen exemplarisch auf einige Zellen. Originale Vergrößerung: 100x, Maßstabsbalken repräsentiert 200 µm. Die Färbung der Schnitte und die Aufnahme der Bilder erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.15) beschrieben wurde.**

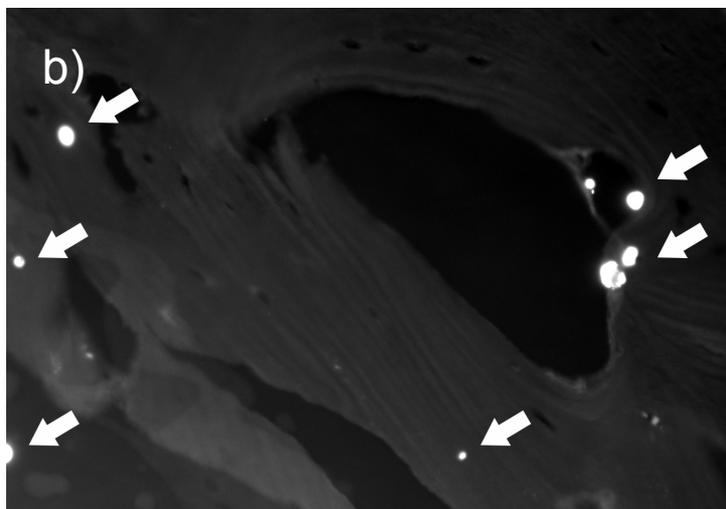
### 3.3.12 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von BMC in DBM-Strukturen

Eine weitere Möglichkeit BMC auf und in DBM nachzuweisen, war die Färbung von Materialschnitten mittels DAPI. Hier ließen sich eindeutig Zellkerne auch tief im Material anfärben. Eine Eigenfluoreszenz des Materials an den Schnittflächen konnte nicht festgestellt werden (siehe Abbildung 3-18). Die Färbung fand direkt nach der Aussaat statt, um feststellen zu können, ob sich auch nach kurzer Zeit schon BMC tief im Inneren des Materials finden lassen.



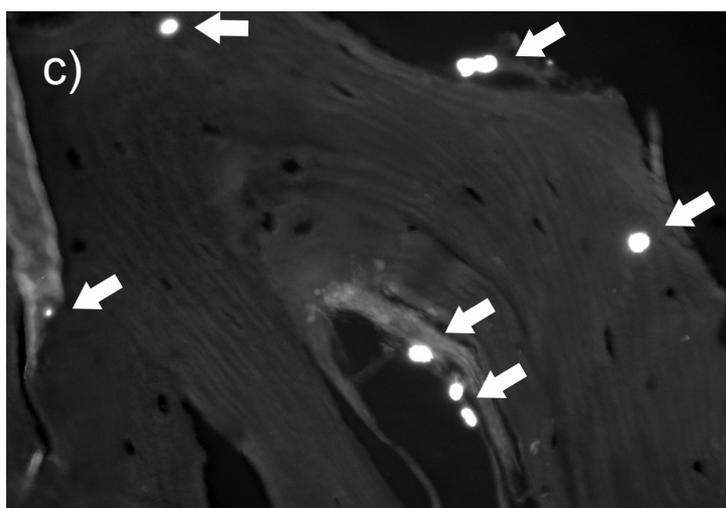
DAPI DBM Kontrolle

200  $\mu$ m



DAPI BMC auf DBM d0

200  $\mu$ m



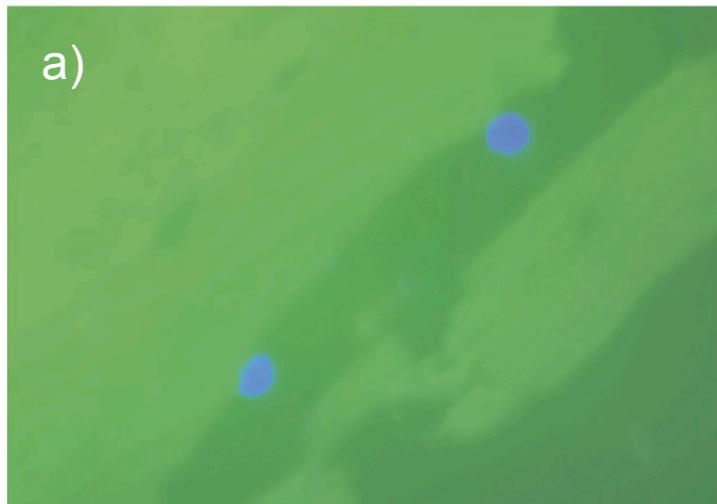
DAPI BMC auf DBM d0

200  $\mu$ m

**Abbildung 3-18: Nachweis von BMC im Inneren der DBM-Partikel. DAPI- Färbung, zellfreier Kontrollansatz (a), BMC an Tag 0 (b und c) nach Aussaat. Die Pfeile weisen exemplarisch auf einige Zellen. Originale Vergrößerung: 100x, Maßstabsbalken repräsentiert 200 µm. Die Färbung der Schnitte und die Aufnahme der Bilder erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.17) beschrieben wurde.**

### 3.3.13 Zelltypspezifische Charakterisierung von BMC auf DBM

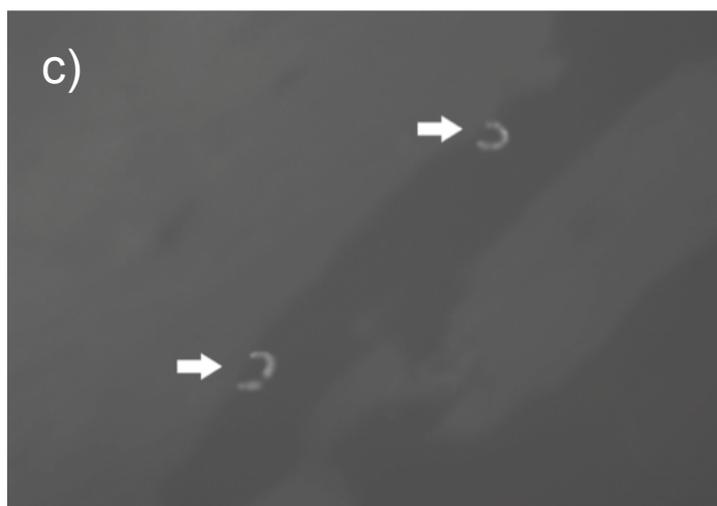
Zum Nachweis von Monozyten (CD14-positiv) und Vorläuferzellen (CD34-positiv) auf DBM wurde eine CD14/CD34/DAPI Kombinationsfärbung der DBM-Schnittpräparate durchgeführt. CD14-positive Zellen konnten in geringer Häufigkeit (siehe Abbildung 3-19), CD34-positive Zellen jedoch nicht nachgewiesen werden.



DAPI/CD14 BMC auf DBM d2  $\longleftarrow$  200  $\mu$ m  $\longrightarrow$



DAPI BMC auf DBM d2  $\longleftarrow$  200  $\mu$ m  $\longrightarrow$



CD14 FITC BMC auf DBM d2  $\longleftarrow$  200  $\mu$ m  $\longrightarrow$

**Abbildung 3-19: Nachweis von CD14 positiven Zellen im Inneren der DBM-Partikel 2 Tage nach Aussaat der Zellen. Kompositbild aus FITC und DAPI-Kanal (a), DAPI- Färbung (b) und CD14-FITC-Färbung (c). Pfeile weisen exemplarisch auf die CD14-positiven BMC. Originale Vergrößerung: 100x, Maßstabsbalken repräsentiert 200 µm. Die Färbung der Schnitte und die Aufnahme der Bilder erfolgte wie in Material und Methoden (2.2.16) beschrieben wurde.**

## 4 Diskussion

Diese Arbeit stellt den ersten Versuch dar, BMC für die Knochenregeneration auf Knochenersatzmaterialien *in vitro* zu kultivieren. Daher war eines der Hauptziele dieser Arbeit, den Nachweis für die Möglichkeit der Kultivierung zu erbringen und in den folgenden Schritten die am besten mögliche Kombination von eventueller Beschichtung des Materials über ein geeignetes Kulturmedium bis hin zum am besten geeigneten Scaffold für ein Überleben und die Differenzierung der Zellen zu finden. Wir konnten in unseren Versuchen den Nachweis erbringen, dass eine Beschichtung des Trägermaterials zu keiner signifikanten Verbesserung der Zelladhäsion, des Überlebens und der Entwicklung der BMC im Verlauf von 21 Tagen führt. Ferner zeigte der zweite Teil unserer Versuchsreihe, dass signifikante materialspezifische Unterschiede für die Adhäsion sowie die weitere Entwicklung der BMC bestehen. Die Auswahl eines Trägermaterials humanen Ursprungs zeigte sich bezüglich Adhäsion, metabolischer Aktivität und VEGF-Freisetzung den anderen verwendeten Materialien überlegen.

Der Prozess der physiologischen Knochenheilung ist sehr komplex und beinhaltet verschiedene Schritte. So müssen osteogene Zellen bereitgestellt werden, es muss sich ein osteokonduktives Biomaterial als Trägersubstanz finden, Wachstumsfaktoren werden benötigt und es müssen optimale mechanische Verhältnisse herrschen.<sup>24</sup> Gleiches gilt im *bone tissue engineering*, jedoch müssen einige der Faktoren künstlich zugeführt werden. Die wichtigsten und am einfachsten zu beeinflussenden Faktoren sind hier die Wahl der zu transplantierenden Zellen und die Wahl und Vorbereitung des Trägermaterials. Um einen biologisch intakten Knochenersatz zu schaffen, werden metabolisch aktive mesenchymale Stammzellen oder Progenitorzellen verwendet; diese haben die Fähigkeit körpereigene Mechanismen und Signalwege, die die knöcherne Differenzierung betreffen, zu induzieren oder zu verstärken.<sup>26</sup>

In bisherigen Studien wurden für die Knochenheilung verschiedene *in vitro* kultivierte Vorläuferzellen genutzt. Haisch et al. nutzten mit Methylprednisolon stimulierte Chondrozyten und konnten dadurch trabekulären Knochen induzieren.<sup>112</sup> Stangenberg et al. testeten *in vitro* den Nutzen von Osteoblasten zur Knochenheilung.<sup>113</sup> Hierzu wurden Osteoblasten von Ratten auf boviner Spongiosa ausgesät und es wurde nach 14 Tagen durch histologische Untersuchungen und RT-PCR gezeigt, dass die Zellen in der Lage sind, osteogen zu differenzieren.

Die aus dem Knochenmark stammenden MSC<sup>114</sup> werden durch ihre Differenzierungsfähigkeit in die verschiedenen mesenchymalen Gewebe<sup>82</sup> häufig im *bone tissue engineering* eingesetzt. *In vitro* konnte unter Verwendung von MSC und einem Trägermaterial aus Korallen eine verbesserte Knochenbildung festgestellt werden.<sup>26,63</sup> Auch im Tiermodell zeigte sich die Verwendung von kulturexpandierten MSC auf einem Keramik-Trägermaterial in Defekten kritischer Größe als überlegen gegenüber der Verwendung von Keramik-Trägermaterial ohne Zellen.<sup>61</sup>

Um die Knochenheilung großer Defekte zu beschleunigen wurde in *in vitro* Experimenten nachgewiesen, dass MSC und endotheliale Vorläuferzellen (EPC), die der Neovaskularisierung dienen,<sup>68</sup> in gemeinsamer Kultur gehalten werden können<sup>67</sup> und hierbei ihre gefäßneubildende Fähigkeit erhalten bleibt.<sup>115</sup>

Mit dieser Kombination von Zellen konnte im Tierversuch gezeigt werden, dass eine gemeinsame Verwendung von EPC und MSC eine verbesserte frühe Vaskularisierung und verbesserte Knochenheilung nach sich ziehen.<sup>66</sup> EPC verbessern durch ihre gefäßbildenden Eigenschaften die frühe Vaskularisation und unterstützen damit die MSC in der Knochenheilung.<sup>116</sup>

Problematisch bei der *in vivo* Anwendung von Zellen, die über einen längeren Zeitraum kultiviert wurden, ist eine mögliche Entartung der Zellen in der Kultivationsphase. Genetische Schäden können in den kulturexpandierten Zellen akkumulieren, was ein erhöhtes Tumorrisiko für den Empfänger zur Folge haben könnte. Tolar et al. konnten in ihren Versuchen den Nachweis

erbringen, dass sich aus kultivierten MSC Sarkome entwickeln können.<sup>88</sup> Auf Grund dieser möglichen Gefahr stuft auch das Paul-Ehrlich-Institut die Anwendung von vorkultivierten Zellen am Menschen als risikobehaftet ein,<sup>106</sup> wodurch eine Zulassung als Zelltherapeutikum schwierig ist.

Eine mögliche Alternative zu vorkultivierten Zellen, also MSC und EPC, stellen *bone marrow derived mononuclear cells* (BMC) dar. BMC können innerhalb weniger Stunden isoliert und dem Patienten zurückgegeben werden. Sie werden bisher in wenigen Bereichen therapeutisch eingesetzt. Dill et al. setzten BMC bei Patienten mit im Elektrokardiogramm sichtbaren ST-Strecken-Hebungsinfarkten ein. Bei intrakoronarer Gabe der BMC konnten sie eine zusätzlich verbesserte links ventrikuläre Funktion nachweisen.<sup>104</sup> Zusätzlich wurde durch andere Gruppen eine Wiederherstellung der mikrovaskulären Funktion in der vom Infarkt betroffenen Arterie festgestellt.<sup>117</sup> Auch ein und zwei Jahre nach Gabe der BMC zeigten sich bei den Patienten weniger große kardiovaskuläre Ereignisse und verbesserte Kontraktilität des Myokards als in der Kontrollgruppe.<sup>118,119</sup> Bei direkter Implantation von BMC in das ischämische Myokard konnte eine verbesserte kollaterale Perfusion und regionale Funktion des Myokard nachgewiesen werden.<sup>120</sup> Eine Meta-Analyse von Clifford et al. zeigte für die Anwendung von BMC bei akuten Myokard-Infarkten eine signifikante Verbesserung des links ventrikulären Auswurfvolumens.<sup>121</sup> Auch bei Patienten mit peripherer Arteriosklerose fanden BMC Anwendung. Die Anwendung dieser führte bei den Patienten zu einer Verbesserung des Arm-Bein-Indexes, Reduktion der Schmerzen und verbesserten Sauerstoffpartialdrücken im Gewebe.<sup>122</sup> In der Muskelregeneration zeigte sich im Tiermodell bei Anwendung von BMC, dass diese in die Muskulatur migrieren und hier die Regeneration von beschädigten Muskelfasern unterstützen.<sup>55</sup> Hierzu wurden genetisch markierte BMC in Muskel degenerierte Gebiete bei Mäusen infundiert und beobachtet, dass die Zellen myogen differenzieren und an der Regeneration der geschädigten Muskelfaser teilhaben.

Die Fähigkeit von aufkonzentriertem Knochenmark, in dem sich auch die Fraktion der BMC befindet, Knochendefekte schneller zur Heilung zu bringen,

wurde von verschiedenen Forschungsgruppen gezeigt. Defekte im Schädel durch Kraniotomie und Knochendefekte wie Pseudoarthrosen konnten durch Auffüllen mit aufkonzentriertem Knochenmark schneller zur Heilung gebracht werden.<sup>62,105</sup> Jedoch finden sich in aufkonzentriertem Knochenmark in hoher Anzahl Erythrozyten, die nach Assmus et al. die Effektivität der Therapie herabsetzen.<sup>123</sup>

Um eine höchst mögliche Effektivität der Zellen zu erreichen, wurden in dieser Arbeit erythrozytenfreie BMC-Präparationen verwendet.

Im ersten Teil der Versuche haben wir uns der Frage gestellt, ob es möglich ist BMC, ähnlich wie MSC und EPC,<sup>67,115,124</sup> auf einem Scaffold auszusäen und ob eine Beschichtung des Scaffolds eine positive Auswirkung auf die BMC-Adhäsion und Aktivität hat.

Ein ideales Scaffold samt Beschichtung wäre in der Lage, selektiv die für den Knochenaufbau benötigten Zellen anzureichern, gleichzeitig eine höchstmöglich mechanische Stabilität zu bieten und wäre zusätzlich nicht schadhaft für das Überleben und die weitere Differenzierung der Stammzellen.<sup>24</sup> Zudem wäre es bei einem idealen Knochenersatzstoff dem Körper möglich, diesen komplett zu resorbieren und durch intakten Knochen zu ersetzen.<sup>23</sup>

Hierzu musste eine Auswahl für die zu untersuchenden Trägermaterialien getroffen werden. Der Markt bietet aktuell sehr viele Trägermaterialien, jedoch gibt es nur wenige vergleichende Analysen zur Biokompatibilität der Materialien *in vitro*. In einer Arbeit von Seebach et al. wurden sechs Knochenersatzmaterialien *in vitro* auf Aussateffizienz, Genexpression, metabolische Aktivität und Wachstumsverhalten von MSC untersucht.<sup>124</sup> Gleiche Untersuchungen wurden von Schultheiß et al. für EPC vorgenommen.<sup>125</sup> Beide Arbeiten konnten nachweisen, dass sowohl die Aussateffizienz als auch die metabolische Aktivität und das Wachstumsverhalten der Zellen abhängig von dem jeweilig gewählten Trägermaterial sind.

Für unsere Versuche wurden auf Grund der Ergebnisse von Seebach und Schultheiß<sup>124,125</sup> und um einen möglichst breiten Überblick über die

verschiedenen am Markt befindlichen Grundgerüststoffe zu bieten, *ChronOs*<sup>®</sup> als Vertreter der  $\beta$ -TCP, *Cerabone*<sup>®</sup>, eine verarbeitete bovine Knochenmatrix, und *Demineralized Bone Matrix* (DBM) als Trägermaterialien gewählt.

Nicht nur die Art des Materials vermag die Eigenschaften von aufgebracht regenerativen Zellen zu beeinflussen; durch geeignete Beschichtungen können Parameter wie Adhäsion und Differenzierung modifiziert werden.

In der Literatur sind verschiedene Beschichtungen beschrieben, die unterschiedliche Einflüsse auf die ausgesäten Zellen ausüben. Zoledronat wird als Substanz beschrieben, die stimulierende Eigenschaften auf Osteoblasten und inhibierende Wirkung auf Osteoklasten besitzt.<sup>126</sup> Thrombozyten-Lysat, das sich aus zahlreichen Wachstumsfaktoren zusammensetzt, fördert als Beschichtung von Scaffolds die Zellmigration und die Bildung von Blutgefäßen.<sup>127</sup>

Oberflächenbeschichtung mit Fibronectin wird bei verschiedenen Implantaten verwendet. Dieses führt bei zellfreien Implantaten zu einer beschleunigten Ansiedlung von Zellen,<sup>128</sup> was explizit auch für Endothelzellen beschrieben worden ist.<sup>129</sup> Ferner wurde ein verbessertes Überleben von Stammzellen auf fibronectinbeschichteten Scaffolds beschrieben.<sup>130</sup> Die hohe Anzahl der vorliegenden Studien und die positiven bisher beschriebenen Ergebnisse machen eine Beschichtung mit Fibronectin zu einer Option, um die Aussaat von BMC zu verbessern.

Humanes Plasma (FFP) enthält Gerinnungsfaktoren, Faktoren der Fibrinolyse, Faktoren des Komplementsystems, Fibronectin, Albumin und andere Proteine und Immunglobuline.<sup>131</sup> Von den Gerinnungsfaktoren spielt vor allem der Protransglutaminase Faktor XIII (FXIII) eine wichtige Rolle in der Wundheilung.<sup>132</sup> Durch den fibrinolytischen Faktor Plasmin kann speziell die Endothelzellmigration verbessert werden.<sup>133</sup> Zudem können durch Plasmin Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) aktiviert werden, welche durch Auflockerung von Faserstrukturen den Eintritt von hämatopoietischen Stammzellen aus dem

Knochenmark in ischämische Gebiete erleichtert.<sup>134</sup>

Eine Beschichtung mit Albumin führt zu verbesserter Anhaftung und Proliferation von Zellen auf dem Trägermaterial.<sup>135,136</sup> Horváthy et al. haben *in vitro* gezeigt, dass BMC aus Ratten im Vergleich zu poly-L-Lysin und unbehandelten Kontrollen besser auf mit Albumin beschichtetem polyfilem Nahtmaterial haften.

Verschiedene Immunglobulinsubtypen, hier sind vor allem die IgCAMs zu nennen, haben regulierende Wirkung auf Zelladhäsion und können somit auch zu einer vermehrten Anhaftung führen.<sup>137</sup> Da humanes FFP all diese beschriebenen Faktoren enthält und die positive Wirkung auf mesenchymale Stammzellen *in vivo* schon beschrieben wurde,<sup>138</sup> wurde die Beschichtung mit FFP zu einer weiteren Option, um die Aussaat von BMC zu verbessern.

Da in unserem Labor die Aussaat von EPC und MSC auf *ChronOs*<sup>®</sup> erfolgreich getestet wurde,<sup>66,67,116</sup> wurde dieses  $\beta$ -TCP Material auch im Vergleich der Beschichtungen verwendet.

Die aufgezeigten Ergebnisse im Beschichtungsvergleich zeigen, dass BMC an einem  $\beta$ -TCP Scaffold adhären und dass eine Beschichtung des Scaffolds mit Fibronectin oder mit FFP zu keiner weiteren Verbesserung der initialen BMC-Adhäsion führt. Die Aussateffizienz der BMC unterscheidet sich in den verschiedenen Gruppen nicht signifikant voneinander (siehe Abbildung 3-1). Betrachtet man die Prozentsätze der Gruppen ohne Beschichtung, lässt sich eine leichte Tendenz zu verbesserter Aussateffizienz im Vergleich zu den beschichteten Materialien zeigen. Die durchgeführten FACS-Messungen zeigen, dass der Prozentsatz der auf dem Material adhärenenden BMC dem Prozentsatz der in der Kontrolle enthaltenen BMC entspricht (siehe Abbildung 3-2). Bei genauer Betrachtung der verschiedenen CD-Merkmale der Zellen zeigt sich, dass  $CD34^+$  Zellen, die auch als reife Stammzellen bezeichnet werden,<sup>107-109</sup> im Bezug auf ihren prozentualen Anteil besser adhären als  $CD34^+/CD133^+$  positive Zellen, die in der Literatur als noch unreife Stammzellen beschrieben werden.<sup>108</sup> Die durchgeführten Messungen zeigen, dass eine

Beschichtung des Scaffolds durch die von uns getesteten Stoffe zu keiner selektiven An- oder Abreicherung von Stammzellen führt (siehe Abbildung 3-3). Dieses Verhalten der BMC könnte in einer Oberflächenladung der Calciumphosphate begründet liegen. Für Calciumphosphate ist bekannt, dass sie eine Oberflächenladung besitzen, die möglicherweise die Zelladhäsion verbessern.<sup>139</sup> Der Effekt der Oberflächenladung könnte stark genug sein, um die Zellen auch auf unbeschichtetem Material anhaften zu lassen. Möglicherweise wird durch die Beschichtung mit Plasmaproteinen die Oberflächenladung neutralisiert, was in einer verschlechterten Adhäsion resultieren kann.

Eine endotheliale Differenzierung der Zellen, die nach Seebach et al. durch Unterstützung der MSC zu einer verbesserten Knochenheilung beiträgt,<sup>116</sup> fand auch bei den von uns ausgesäten BMC statt. Abbildung 3-6 zeigt einen signifikanten Anstieg der endothelial differenzierten Zellen an Tag 21 auf den Kombinationen ohne Beschichtung in Mesencult, Beschichtung mit Humanplasma in Mesencult und Beschichtung mit Fibronectin in Mesencult. Die Kultivierung in Mesencult scheint hier also einen positiven Einfluss auf die endotheliale Differenzierung zu haben. Es ist zu vermuten, dass Inhaltsstoffe aus den nicht näher definierten Mediumzusätzen zu dieser Beobachtung führen.

Die Zellzahl der DAPI positiven Zellen, als Maßzahl für kernhaltige Zellen, ist auf allen Beschichtung-Kulturmedium Kombinationen an Tag 2 am höchsten. Die Zahl der auf unbeschichtetem Material ausgesäten und in Mesencult kultivierten BMC zeigt sich an Tag 2 signifikant erhöht gegenüber den auf mit Humanplasma beschichtetem Material und in Mesencult gehaltenen Zellen. Im weiteren Verlauf, also an den Tagen 7, 14 und 21 ist diese Zellzahl sogar signifikant erhöht gegenüber der aller anderen Beschichtung-Kulturmedium Kombinationen (siehe Abbildung 3-5). Eine Beschichtung des Materials vor der Aussaat verbessert also nicht die Aussaat-effizienz der BMC, sondern ist im weiteren Verlauf der Anzahl adhätierender BMC abträglich. Im durchgeführten MTT-Test konnte für alle Beschichtung-Kulturmedium Kombinationen über 21 Tage Zellaktivität nachgewiesen werden. Das Maximum der Aktivität erreichen

die Zellen auf allen Kombinationen an Tag 14. Hiernach findet bei allen Kombinationen ein Abfall des Aktivitätsniveaus statt (siehe Abbildung 3-7). Die Zunahme der Zellzahl über die Zeit ist also, wie mittels MTT-Test und DAPI-Färbung gezeigt, nicht abhängig von einer Beschichtung des Materials.

Basierend auf der Erkenntnis, dass eine Vorbeschichtung der Trägersubstanz nicht zu einer Verbesserung der BMC-Adhäsion auf dem Gerüststoff führt, wurden im zweiten Versuchsteil unbeschichtete Gerüststoffe miteinander verglichen.

Neben den ausgewählten Zellen ist die Auswahl des Scaffolds für das Tissue Engineering von großer Bedeutung.<sup>23,140</sup> Dieses soll initial eine große Stabilität aufweisen, um die Fraktur zu stützen. Zudem sollte die Oberfläche des Scaffolds der Invasion und Adhäsion knochen- und gefäßbildender Zellen die bestmögliche Grundlage bieten. Nach Auffüllung des Defektes durch neu gebildeten Knochen soll das Material vollständig resorbiert werden. All diese Faktoren, die die biologische Wertigkeit eines Scaffolds beschreiben, sind von der chemischen Grundzusammensetzung des Materials und von dessen Aufbau abhängig.

Bisher gibt es keine Arbeiten, die kumulativ die Adhärenz von BMC an verschiedenen Knochenersatzmaterialien vergleichend untersucht haben. Daher ist ein Literaturvergleich nicht möglich, jedoch wurden sämtliche Informationen zu den Materialien und der Adhärenz anderer Zellen an diesen herangezogen.<sup>23,26,38,67,141,142</sup>

Für diese Arbeit wurden drei aus verschiedenen Klassen der Knochenersatzmaterialien stammende Scaffolds gewählt. *ChronOs*<sup>®</sup> als Vertreter der  $\beta$ -TCP, *Cerabone*<sup>®</sup>, eine verarbeitete bovine Knochenmatrix, und *Demineralized Bone Matrix* (DBM), ein sterilisiertes humanes Knochentransplantat.

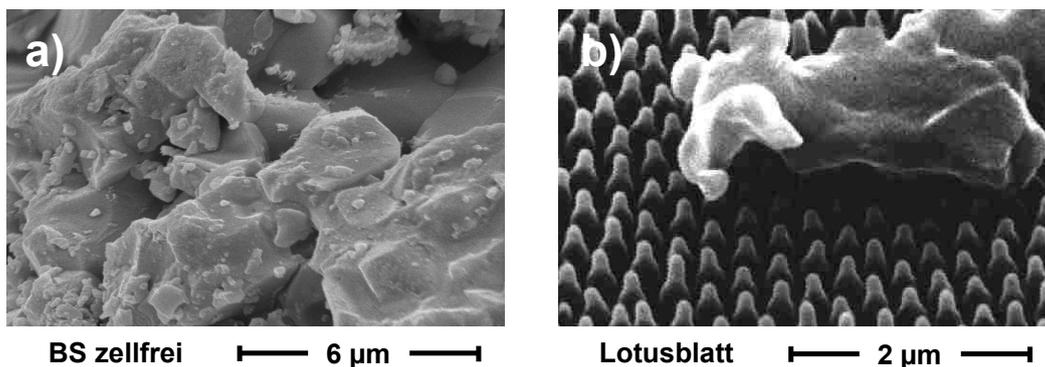
Die dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit zeigen signifikante Unterschiede in der Aussaat-effizienz der Zellen auf den Materialien und der Zellaktivität im Verlauf über 21 Tage. Die Aussaat-effizienz von BMC ist auf den verschiedenen Materialien generell hoch, jedoch zeigen sich materialspezifische Unterschiede (siehe Abbildung 3-9). DBM zeigt hier im Materialvergleich die besten Ergebnisse.

Betrachtet man die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der Oberflächen der drei Materialien, hebt sich die Struktur des DBM-Materials eindeutig von den anderen ab. DBM zeigt sich morphologisch als humaner Knochen, der jedoch auf Grund der Verarbeitung keine Zellen oder Proteine mehr enthält. Man erkennt die knochentypischen Canaliculi und eine Oberfläche aus Kollagenfibrillen (siehe Abbildung 3-8). In diesen oberflächlichen Unterschieden muss die unterschiedliche Aussaat-effizienz begründet sein.

Bereits in vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass Porosität, Porengröße, Porenverteilung, Poreninterkonnektivität und die Rauigkeit der Oberfläche, welche eine erleichterte Anlagerung von Proteinen und bessere Anlagerung der Pseudopodien der Zellen zulässt, einen sehr großen Anteil an der Integration der Zellen in das Material haben.<sup>143-146</sup> Eine möglichst physiologische Oberflächenstruktur sorgt also für eine gute, physiologische Zellanlagerung. *Cerabone*<sup>®</sup> als Vertreter der verarbeiteten bovinen Knochenmatrices schnitt in unserem Vergleich am schlechtesten ab. Dieses ist erstaunlich, da *Cerabone*<sup>®</sup> ebenfalls nicht künstlich hergestellt wurde. Eine vergleichbare Beobachtung wurde auch schon in vorausgegangenen Versuchen gezeigt.<sup>124</sup> Hier wurde das schlechtere Abschneiden von *Cerabone*<sup>®</sup> unter anderem auf den vom Hersteller angewandten Verarbeitungsprozess zurückgeführt, der die vormals raue Oberfläche glättet.

Stärker vergrößerte für diese Studie angefertigte rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen über die gesamte Oberfläche des Materials hinweg nicht nur eine Glättung der Oberfläche, sondern zusätzlich an der Oberfläche anhaftende Partikel im Nanometerbereich (siehe Abbildung 4-1). Diese Partikel könnten dafür sorgen, dass aufgebrachte Flüssigkeit nicht ausreichend mit der Oberfläche des Scaffolds in Kontakt steht,

was eine geringere Benetzbarkeit zur Folge hat. Das Scaffold bietet dem Flüssigkeitstropfen samt der enthaltenen Zellen nur eine geringe Adhäsion, so dass Flüssigkeit und Zellen vom Scaffold abperlen. Dieser Effekt ist in der Literatur bei ähnlich großen, auf Material befindlichen Partikeln bekannt als Lotuseffekt.<sup>147,148</sup> Auch diese Partikel können durch den Verarbeitungsprozess des bovinen Materials entstanden sein.



**Abbildung 4-1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von BS zellfrei (a) und der Oberfläche eines Lotusblattes<sup>149</sup> (b) in verschiedenen Vergrößerungen.** Der Vergleich der Aufnahmen zeigt, dass die Oberfläche der BS ähnlich große Partikel aufweist wie ein Lotusblatt, durch die geringere und unregelmäßigere Anordnung auf BS ist eine generelle Benetzung der BS möglich, aber eingeschränkt.

Zudem weichen Porosität und Porengröße von *Cerabone*<sup>®</sup> von den anderen Materialien ab. *Cerabone*<sup>®</sup> hat im Vergleich die geringste Porosität und die größte Bandbreite der Porengröße (siehe Tabelle 2-3). Die optimale Porosität für TCP Keramiken wurde durch Kasten et al. bei 65% erreicht,<sup>145</sup> im Vergleich hierzu erreicht *Cerabone*<sup>®</sup> 50%. Klenke et al. definierten die optimale Porengröße bei 140-210 µm,<sup>146</sup> die Porengröße bei *Cerabone*<sup>®</sup> schwankt zwischen 100 µm und 1000 µm. Auch diese Faktoren wurden von Seebach et al. schon in Betracht gezogen.<sup>66</sup>

Die Anhaftung mononukleärer Zellen ist auf den Materialien ähnlich, wobei auch hier eine leichte Tendenz zu insgesamt besserer Anhaftung auf DBM und schlechterer Anhaftung auf *Cerabone*<sup>®</sup> besteht. Auch dies lässt sich durch die

vorgenannten Faktoren erklären. Zudem könnte auch das Vorhandensein von Collagen auf der Oberfläche des DBM Scaffolds zu einer verbesserten Adhäsion der BMC auf diesem führen. Ähnliches wurde von Niemeyer et al. bereits für MSC gezeigt<sup>150</sup> und konnte auch in unserem Labor durch vorangegangene Arbeiten gezeigt werden.<sup>124</sup> Zusätzlich könnte auch die Menge an Flüssigkeit, die ein Material initial in der Lage ist aufzunehmen, zu einer verbesserten Aussaat-effizienz führen. Je mehr Flüssigkeit mit Zellen in das Innere des Materials aufgenommen wird, desto größer ist die Möglichkeit, dass eine größere Anzahl Zellen am Material adhärert. Für verschiedene Knochenersatzmaterialien wurde ein solcher Versuch vergleichend noch nicht durchgeführt. In unserem Versuch zeigte sich die Menge der absorbierten Flüssigkeit im Verhältnis zur Materialmenge bei DBM signifikant erhöht gegenüber den beiden anderen Materialien. *ChronOs*<sup>®</sup> zeigte eine signifikant erhöhte absorbierte Flüssigkeitsmenge gegenüber *Cerabone*<sup>®</sup> (siehe Abbildung 3-15). Durch die Vielzahl von Canaliculi im DBM ist es dem Material möglich, mehr Flüssigkeit in sich zu binden und somit auch die Zahl der direkt anhaftenden Zellen zu vergrößern. Um das Verhalten der ausgesäten BMC und das Anhaften der Zellen auf den Materialien sichtbar zu machen, wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen gemacht, die den Nachweis von adhärierenden BMC auf allen Materialien erbrachten (siehe Abbildung 3-16). Um Unterschiede der Zellzahlen im Verlauf beurteilen zu können, wurden mittels DAPI-Färbung die Zellkerne markiert und die Zellzahlen mikroskopisch pro Gesichtsfeld ermittelt. Dabei stellte sich heraus, dass DBM eine starke Eigenfluoreszenz besitzt, was eine Auszählung der anhaftenden Zellen stark erschwerte. Die Eigenfluoreszenz des Materials kann im Verarbeitungsprozess, der dem humanen Knochen zuteil wird, begründet liegen. Möglich ist eine Bindung von DAPI an freie DNA auf dem Material.

Um dennoch einen Nachweis für im und auf dem DBM-Material adhärierende Zellen liefern zu können, wurden zunächst rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Materials nach Aussaat der BMC gemacht. Hierbei konnten auf allen Materialien adhärierende Zellen gefunden werden. Durch die Möglichkeit, humanen Knochen aufzubereiten und histologische Schnitte von ihm anzufertigen, konnten histologische Schnittpräparate von DBM angefertigt

werden, die einen tiefen Blick in das Innere des Materials zulassen. Ein Blick in die anderen Materialien war durch deren Porengröße schon mit dem Fluoreszenzmikroskop möglich. So konnte mittels HE- und DAPI-Färbung der Nachweis erbracht werden, dass sich Zellen tief im Inneren des Materials anlagern. Bei der DAPI-Färbung zeigte sich keine Eigenfluoreszenz des DBM an den Schnittflächen. Hier können etwaige Reste von zur Verarbeitung genutzten Persäuren durch den Prozess des Fixierens neutralisiert worden sein, sodass die Zellen im Bild gut sichtbar angefärbt sind (siehe Abbildung 3-18). Durch eine Antikörper-Kombinationsfärbung CD14/CD34/DAPI konnten vereinzelt CD14-positive, jedoch keine CD34-positiven Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3-19). Dies liegt wahrscheinlich darin begründet, dass der Anteil an CD14-positiven Zellen in einer BMC-Präparation um den Faktor 3,5 höher ist im Vergleich zu CD34-positiven Zellen [Daten aus dem Unfallchirurgischen Forschungslabor, n = 10].

Um die metabolische Aktivität der ausgesäten BMC im Verlauf über 21 Tage festzustellen, wurden MTT-Tests durchgeführt. Hier zeigt sich bei *ChronOs*<sup>®</sup> und DBM ein Anstieg der Aktivität bis zum Tag 14 und zum Tag 21 ein Abfall. Die Zellen auf DBM zeigen an Tag 14 eine signifikant erhöhte Aktivität gegenüber *Cerabone*<sup>®</sup> und an Tag 21 eine signifikant erhöhte Aktivität gegenüber beiden Vergleichsmatrizes. Die Aktivität der Zellen auf *Cerabone*<sup>®</sup> fällt vom ersten bis zum letzten Versuchstag stetig ab, dies deckt sich mit Ergebnissen aus der Studie von Seebach et al., die Co-Kulturen von MSC und EPC auf verschiedenen Materialien im Verlauf über 10 Tage untersuchten.<sup>66</sup> Auch hier fand keine Steigerung der Zellaktivität auf *Cerabone*<sup>®</sup> innerhalb der ersten 10 Tage statt.

*Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) ist ein Faktor, der essentiell für die Differenzierung der EPC und die Vaskularisierung des neugebildeten Knochens ist.<sup>67</sup> Wir konnten auf allen Materialien an Tag 2 eine signifikant erhöhte VEGF-Produktion feststellen. Die Produktion von VEGF an Tag 2 auf DBM war im Trend ( $p < 0,09$ ) höher als die durch BMC auf *Cerabone*<sup>®</sup> (siehe Abbildung 3-14). Mittels Real-Time-PCR ließ sich eine VEGF-Genexpression in BMC auf

allen Materialien bis Tag 14 und auf DBM über die kompletten 21 Tage nachweisen. SDF-1 $\alpha$ -Genexpression als chemotaktisches Signal für regenerative Zellen<sup>100</sup> sowie als Trigger für die Adhäsion von Stammzellen in der Knochenmarknische<sup>100</sup> ließ sich einzig an Tag 21 auf ChronOs® nachweisen. Ebenfalls mittels Real-Time-PCR ließ sich auf allen Materialien über den gesamten Zeitraum vWF-Genexpression nachweisen. Auch dieser Nachweis spricht für eine endotheliale Differenzierung von BMC. Es ist jedoch festzuhalten, dass nicht notwendigerweise alle BMC endothelial differenzieren, sondern nur bestimmte Subpopulationen.

Der Nachweis der Genexpression der osteogenen Marker Kollagen-1- $\alpha$ , Osteocalcin und alkalischer Phosphatase gelingt auf allen Materialien, jedoch zeigen sie dabei ein sehr unregelmäßiges Auftreten. Dieses kann in der sehr geringen Zellzahl, die für die Proben verwendet wurde, begründet liegen. Dadurch bewegen sich die verschiedenen Werte nahe an der Nachweisgrenze, was einen sicheren Nachweis erschwerte.

Zusammengefasst konnte durch diese Studie belegt werden, dass die initiale Adhärenz von BMC auf unbeschichteten Knochenersatzmaterialien generell hoch ist, aber signifikante materialspezifische Unterschiede in der Aussaat-effizienz und nachfolgend der metabolischen Aktivität und der VEGF-Synthese der BMC existieren. Die Unterschiede könnten in der unterschiedlichen Oberflächen-, Porenbeschaffenheit und in der Verarbeitung des Grundmaterials begründet liegen. Humanes Knochenersatzmaterial zeigt sich in unserer Studie in Punkten wie Aussaat-effizienz, Aktivität der Zellen vor allem ab Tag 14 und der VEGF-Produktion der adhärierenden Zellen als überlegen. Daher sollte die Art des Knochenersatzmaterials für den künftigen klinischen Einsatz von BMC Berücksichtigung finden.

Für 2014 ist die Absicherung der *in vitro* Ergebnisse durch adäquate *in vivo* Untersuchungen unter Verwendung derselben Knochenersatzstoffe im Femurdefektmodell der athymischen Nacktratte geplant.

## 5 Zusammenfassung

Bei Knochendefekten kritischer Größe ist es notwendig, den Knochen bei der Heilung zu unterstützen. Der derzeitige Goldstandard bei der Behandlung von *critical size defects* ist die Entnahme von autologem Knochen aus dem Beckenkamm, dies ist jedoch mit Nachteilen wie Entnahmemorbidität und Limitierung der entnehmbaren Menge vergesellschaftet. Das Knochen tissue engineering, bei welchem regenerative Zellen mit einem Knochenersatzmaterial kombiniert werden, könnte eine vielversprechende Alternative sein. Stromale Knochenmarkzellen, die Osteoblasten differenzieren können, und endotheliale Vorläuferzellen, die die Vaskularisierung der Defektzone unterstützen, zeigten sich effektiv in tierexperimentellen Studien; jedoch müssen diese Zellen vor Verwendung über einen längeren Zeitraum in Kultur expandiert werden. Dies kann jedoch zu einer Akkumulation genetischer Schäden und möglicherweise zu einer Entartung der transplantierten Zellen führen. *Bone marrow mononuclear cells* (BMC) stellen eine interessante Alternative dar, sie können innerhalb weniger Stunden isoliert und dem Patienten zurückgegeben werden. Ziel dieser Arbeit war daher, die Adhäsion und funktionelle Aspekte von BMC auf drei verschiedenen Knochenersatzmaterialien zu analysieren.

Im ersten Versuchsteil wurde untersucht, ob es möglich ist, BMC auf einem  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP)-Scaffold auszusäen, und ob eine Beschichtung des Scaffolds eine positive Auswirkung auf die BMC-Adhäsion und Aktivität hat. Hierbei wurde eine Beschichtung mit humanem Plasma (FFP) und Fibronectin gegen eine Kontrolle verglichen. Es konnte gezeigt werden, dass BMC auf unbeschichtetem  $\beta$ -TCP adhären und dass eine Vorbeschichtung des Scaffolds mit Fibronectin oder mit FFP zu keiner weiteren Verbesserung der initialen Adhäsion führt. FACS-Analysen zeigten, dass der Prozentsatz der auf dem Material adhärenen Fraktionen regenerativer Zellen dem Prozentsatz der in der Kontrolle enthaltenen regenerativen Zellen entspricht. Überdies konnte eine endotheliale Differenzierung der ausgesäten BMC beobachtet werden. Die Anzahl adhärenender BMC war zum ersten Messpunkt an Tag zwei unabhängig von der Vorbeschichtung am höchsten. Interessanterweise

war die Zahl der adhärierenden BMC auf unbeschichtetem Material signifikant gegenüber den beschichteten Materialien erhöht.

Basierend auf der Beobachtung, dass eine Vorbeschichtung der Trägersubstanz nicht zu einer Verbesserung der BMC-Adhäsion auf dem Gerüststoff führt, wurden im zweiten Versuchsteil unbeschichtete Gerüststoffe miteinander verglichen. Für diese Arbeit wurden drei aus verschiedenen Klassen der Knochenersatzmaterialien stammende Scaffolds gewählt. *ChronOs*<sup>®</sup> als Vertreter der  $\beta$ -TCPs, *Cerabone*<sup>®</sup>, eine verarbeitete bovine Knochenmatrix, und *Demineralized Bone Matrix* (DBM), ein sterilisiertes humanes Knochentransplantat. Die Untersuchungen ergaben signifikante Unterschiede in der Aussaat-effizienz der Zellen auf den Materialien und der Zellaktivität im Verlauf über 21 Tage. DBM zeigte hier im Materialvergleich die besten Ergebnisse. In unserem Versuch zeigte sich die Menge der absorbierten Flüssigkeit im Verhältnis zur Materialmenge bei DBM signifikant erhöht gegenüber den beiden anderen Materialien. Zudem konnte mittels HE- und Kern-Färbung (DAPI) der Nachweis erbracht werden, dass sich Zellen tief im Inneren des Materials anlagern. MTT-Tests zeigten an Tag 14 eine signifikant erhöhte metabolische Aktivität auf DBM gegenüber *Cerabone*<sup>®</sup> und an Tag 21 gegenüber beiden Vergleichsmatrizes. Wir konnten auf allen Materialien an Tag 2 eine signifikant erhöhte VEGF-Produktion feststellen. Mittels Real-Time-PCR ließ sich eine VEGF-Genexpression in BMC auf allen Materialien bis Tag 14 und auf DBM über die kompletten 21 Tage nachweisen. Die Genexpression von vWF konnte ebenfalls auf allen Materialien über den gesamten Zeitraum nachgewiesen werden.

Zusammengefasst konnte durch diese Studie belegt werden, dass die initiale Adhärenz von BMC auf unbeschichteten Knochenersatzmaterialien generell hoch ist, aber signifikante materialspezifische Unterschiede in der Aussaat-effizienz und nachfolgend der metabolischen Aktivität und der VEGF-Synthese der BMC existieren. Humanes Knochenersatzmaterial zeigte sich in unserer Studie als überlegen. Daher sollte die Art des Knochenersatzmaterials für den künftigen klinischen Einsatz von BMC Berücksichtigung finden.

## 6 Summary

Critical size bone defects require arrangements to support bone healing. Actual gold standard in critical size defect treatment is the harvest of autologous bone from the ischiadic spine. This is associated with the disadvantage of extraction morbidity and the limit of extractable amount.

Bone tissue engineering using regenerative cells and a bone substitute material could be a promising alternative. Stromal bone marrow cells capable of differentiating into osteoblasts and endothelial progenitor cells which support vascularisation of the defect zone are shown promising in animal trials. These cells have to be expanded in cell culture over a longer period of time increasing the risk of genetic damage to accumulate and possibly leading to degeneration of the transplanted cells.

Bone marrow mononuclear cells (BMC) represent an interesting solution. It is possible to isolate them within a couple of hours and give them back to the patient. Therefore the goal of this study was to evaluate adhesion and functional aspects of BMC on three different kinds of bone substitute material.

The first part of the study analysed if it is possible to seed BMC on a  $\beta$ -tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP)-scaffold and if there is a positive effect of coating the scaffold in adhesion and activity. In this setting we compared human plasma (FFP) and fibronectin against a control group without coating. We were able to show adherence of BMC on uncoated  $\beta$ -TCP as well as non-improved adhesion on scaffolds coated with fibronectin or FFP. FACS-analysis demonstrated correlating percentages of regenerative cells adhering on the material and in a control group. Moreover we were able to observe an endothelial differentiation of the seeded BMC. The number of adhering BMC was highest on day two irrespective of a coating. Interestingly the number of adhering BMC on uncoated material was significantly superior to the number on coated material.

Based on the observation that a pre-coating of the bone substitute material does not lead to an improved BMC adhesion, we compared in the second part of the study uncoated bone substitute materials. We chose for this study scaffolds from three different classes of bone substitute materials. *ChronOs*<sup>®</sup>

representing the  $\beta$ -TCPs, *Cerabone*<sup>®</sup>, a processed bovine bone matrix, and *Demineralized Bone Matrix* (DBM), a sterilised human bone transplant. The analyses demonstrated significant differences in seeding efficiency and cell activity over the period of 21 days. DBM was able to outrange the other matrices. In our study we were able to show that the liquid absorbance to amount ratio significantly was higher on DBM compared to the other matrices. Furthermore using HE- and nucleus-staining (DAPI) we could provide evidence of BMC accumulating deep inside the material. MTT-tests on day 14 demonstrated a significantly increased metabolic activity on DBM compared to *Cerabone*<sup>®</sup> and on day 21 compared to both other matrices. We were able to show a significantly increased VEGF production on day 2 on all matrices. Via real time PCR we were able to show a VEGF-gene expression on all materials until day 14 and on DBM until day 21. Likewise we were able to show a vWF-gene expression on all materials until day 21.

Summarised, we were able to show an initially high adherence of BMC on uncoated bone substitute material albeit differences between the biomaterials exist. Besides differences in the seeding efficiency, metabolic activity and VEGF synthesis were observed. Human bone substitute material appeared to be superior in our study. Hence, the kind of biomaterial should be considered for future clinical use of BMC.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ALP	Alkalische Phosphatase
BGLAP	bone gamma-carboxyglutamate protein
BMC	bone marrow mononuclear cells
BMP	bone morphogenetic protein
BS	bovine Spongiosa
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
Col-1 $\alpha$	Kollagen 1 alpha
cT	cycle threshold
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DBM	demineralisierte humane Knochenmatrix
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DiL	DiL-Acetylated LDL
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium
DNA	deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EKG	Elektrokardiogramm
EPC	endothelial progenitor cells
EtOH	Ethanol
FACS	fluorescence activated cell sorting
FFP	fresh frozen plasma
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FN	Fibronectin
h	Stunde
HA	Hydroxyapatit
HE	Hämatoxylin-Eosin
HSC	hämatopoetische Stammzellen
MAPC	multipotent adult progenitor cells
mg	Milligramm

MHC	major histocompatibility complex
MIAMI	marrow-isolated adult multilineage inducible cells
min	Minute
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MSC	mesenchymal stem cell
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
PBS	phosphate buffered saline
PEI	Paul-Ehrlich-Institut
pg	Picogramm
PRP	plättchenreiches Plasma
REM	Rasterelektronenmikroskop
RIA	reamer-irrigator-aspirator
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDF	stromal cell-derived factor
sec	Sekunde
TCP	Tricalciumphosphat
TSCS	tissue committed stem cells
VEGF	vascular endothelial growth factor
VSEL	very small embryonic-like stem cells
vWF	Von-Willebrand-Faktor
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1	Das verschieden beschichtete $\beta$ -Tricalciumphosphat vor Aussaat der BMC	37
Abbildung 3-1	Aussaateffizienz der BMC ist unabhängig von Beschichtung und Kulturmedium	51
Abbildung 3-2	Keine An- oder Abreicherung der BMC in Abhängigkeit von Beschichtung und Kulturmedium.	52
Abbildung 3-3	Keine An- oder Abreicherung bestimmter Vorläuferzellsorten in Abhängigkeit von Beschichtung und Kulturmedium	53
Abbildung 3-4	Repräsentative Darstellung DAPI-gefärbter BMC an Tag 2 nach Aussaat	54
Abbildung 3-5	Signifikanter Abfall der Anzahl adhärerender BMC im Zeitverlauf (Tage 2, 7, 14 und 21 nach Aussaat)	55
Abbildung 3-6	Signifikanter Anstieg der Anzahl adhärerender endothelial differenzierter Zellen im Zeitverlauf (Tag 21 nach Aussaat) bei in Mesencult kultivierten BMC	57
Abbildung 3-7	Metabolische Aktivität von BMC im Beschichtung – Kulturmedium Vergleich im zeitlichen Verlauf über 21 Tage	59
Abbildung 3-8	Repräsentative Darstellung von REM-Aufnahmen der verschiedenen zellfreien Knochenersatzmaterialien in verschiedenen Vergrößerungen	61
Abbildung 3-9	Aussaateffizienz der BMC abhängig vom Trägermaterial	65
Abbildung 3-10	Keine An- oder Abreicherung der BMC in Abhängigkeit vom Trägermaterial	66

Abbildung 3-11	Keine An- oder Abreicherung bestimmter Vorläuferzellen in Abhängigkeit vom Trägermaterial	67
Abbildung 3-12	Repräsentative Darstellung DAPI-gefärbter BMC an Tag 2 und Tag 21 nach Aussaat auf $\beta$ -TCP (a), boviner Spongiosa (b) und demineralisierter humaner Knochenmatrix (c)	68
Abbildung 3-13	Metabolische Aktivität von BMC im Materialvergleich im zeitlichen Verlauf über 21 Tage	70
Abbildung 3-14	Maximum der VEGF-Sekretion durch BMC an Tag 2 nach Aussaat	72
Abbildung 3-15	Absorbiertes Flüssigkeitsvolumen im Verhältnis zum Materialvolumen bei $\beta$ -TCP, BS und DBM	79
Abbildung 3-16	Rasterelektronenmikroskopischer Nachweis von BMC auf den Knochenersatzmaterialien an Tag 2 nach Aussaat	81
Abbildung 3-17	Nachweis von BMC im Inneren der DBM-Partikel	83
Abbildung 3-18	Nachweis von BMC im Inneren der DBM-Partikel	85
Abbildung 3-19	Nachweis von CD14 positiven Zellen im Inneren der DBM-Partikel 2 Tage nach Aussaat der Zellen	87
Abbildung 4-1	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von BS zellfrei (a) und der Oberfläche eines Lotusblattes (b)	98

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1	Anwendungsgebiete des nicht stammzellbasierten Tissue Engineering	17
Tabelle 1-2	Anwendungsgebiete des stammzellbasierten Tissue Engineering	18
Tabelle 1-3	Drei wichtige Gruppen der aus dem Knochenmark stammenden Vorläuferzellen und ihre Funktion.	21
Tabelle 2-1	Apparaturen und Materialien	27
Tabelle 2-2	Hersteller und Größe der untersuchten Knochenersatzstoffe	30
Tabelle 2-3	Eigenschaften der Knochenersatzmaterialien	31
Tabelle 2-4	Zellen und Blutplasma	31
Tabelle 2-5	Nährmedien	32
Tabelle 2-6	Puffer und Lösungen	32
Tabelle 2-7	Materialien zur Zellfärbung	34
Tabelle 2-8	Materialien ELISA	34
Tabelle 2-9	Materialien RT-PCR	35
Tabelle 2-10	In der FACS Analyse verwendete Antikörperkombinationen	42
Tabelle 3-1	Nachweis vom vWF auf den drei Knochenersatzmaterialien über 21 Tage	74
Tabelle 3-2	Nachweis von VEGF-Genexpression auf den drei Knochenersatzmaterialien über 21 Tage	74
Tabelle 3-3	Nachweis von Col-1 $\alpha$ -Genexpression auf den drei Knochenersatzmaterialien über 21 Tage	75

Tabelle 3-4	Nachweis von BGLAP-Genexpression auf den drei Knochenersatzmaterialien über 21 Tage	76
Tabelle 3-5	Nachweis von ALP-Genexpression auf den drei Knochenersatzmaterialien über 21 Tage	76
Tabelle 3-6	Genexpression von endothelialen und osteogenen Markergenen in BMC kultiviert auf $\beta$ -TCP, boviner Spongiosa und DBM im Zeitverlauf über 21 Tage, Übersichtstabelle.	77

## 10 Literaturverzeichnis

1. Wanner G.A., Rechl H., Frank J., Marzi I. et al. Chirurgie: mit 335 Tabellen und 343 Praxisfragen. In: *Chirurgie: mit 335 Tabellen und 343 Praxisfragen*; 6 ed. München [u.a.]: Elsevier; 2008: XVI–1280 S.
2. Maier M., Mutschler W.: Praxis der Orthopädie und Unfallchirurgie. In: *Praxis der Orthopädie und Unfallchirurgie*. 1st ed. [s.l.]: THIEME; 2007.
3. Hollinger JO., Kleinschmidt JC.: The critical size defect as an experimental 112ft he112112 test bone repair materials. *The Journal of craniofacial surgery*. 1990; 1(1): 60–68.
4. Schmitz JP., Hollinger JO.: The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clinical orthopaedics and related research*. 1986; (205): 299–308.
5. Gugala Z., Gogolewski S.: Regeneration of segmental diaphyseal defects in sheep tibiae using resorbable polymeric membranes: a preliminary study. *Journal of orthopaedic trauma*. 1999; 13(3): 187–195.
6. Conway JD.: Autograft and nonunions: morbidity with intramedullary bone graft versus iliac crest bone graft. *The Orthopedic clinics of North America*. 2010; 41(1): 75–84– table of contents. doi: 10.1016/j.ocl.2009.07.006.
7. Bruchle H.: [Treatment of pseudarthrosis 112ft he scaphoid bone]. *Handchirurgie*. 1975; 7(3): 121–124.
8. Martini AK., Schumacher G.: [Critical study on the operative treatment of scaphoidpseudarthrosis (author's transl)]. *Archives of orthopaedic and traumatic surgery Archiv für orthopädische und Unfall-Chirurgie*. 1979; 93(4): 265–272.
9. Narr H., Reill P., Weller S.: [Corrective operations for restoration of secondary prehensile function]. *Aktuelle Probleme in Chirurgie und Orthopädie*. 1981; 20: 185–196.
10. McCall TA., Brokaw DS., Jelen BA. et al.: Treatment of large segmental bone defects with reamer-irrigator-aspirator bone graft: technique and case series. *The Orthopedic clinics of North America*. 2010; 41(1): 63–73– table of contents. doi: 10.1016/j.ocl.2009.08.002.
11. Russe O.: [Therapeutic results with cancellous bone filling in pseudoarthrosis 112ft he navicular bone]. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete*. 1951; 81(3): 466–473.

12. Schreurs BW., Slooff TJ., Buma P., Verdonschot N.: Basic science of bone impaction grafting. *Instructional course lectures*. 2001; 50: 211–220.
13. Ilizarov GA.: *Transosseous osteosynthesis : theoretical and clinical aspects 113ft he regeneration and growth of tissue*. Berlin [u.a.]: Springer; 1992: VIII–800 S.
14. Kandziora F., Schnake KJ., Klostermann CK., Haas NP.: [Vertebral body replacement in spine surgery]. *Der Unfallchirurg*. 2004; 107(5): 354–371. doi: 10.1007/s00113-004-0777-z.
15. Goulet JA., Senunas LE., DeSilva GL., Greenfield ML.: Autogenous iliac crest bone graft. Complications and functional assessment. *Clinical orthopaedics and related research*. 1997; (339): 76–81.
16. Arrington ED., Smith WJ., Chambers HG., Bucknell AL., Davino NA.: Complications of iliac crest bone graft harvesting. *Clinical orthopaedics and related research*. 1996; (329): 300–309.
17. Younger EM., Chapman MW.: Morbidity at bone graft donor sites. *Journal of orthopaedic trauma*. 1989; 3(3): 192–195.
18. Aaboe M., Pinholt EM., Hjorting-Hansen E.: Healing of experimentally created defects: a review. *The British journal of oral & maxillofacial surgery*. 1995; 33(5): 312–318.
19. Kakaiya R., Miller WV., Gudino MD.: Tissue transplant-transmitted infections. *Transfusion*. 1991; 31(3): 277–284.
20. Togawa D., Bauer TW., Lieberman IH., Sakai H.: Lumbar intervertebral body fusion cages: histological evaluation of clinically failed cages retrieved from humans. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2004; 86-A(1): 70–79.
21. Boyce T., Edwards J., Scarborough N.: Allograft bone. The influence of processing on safety and performance. *The Orthopedic clinics of North America*. 1999; 30(4): 571–581.
22. Wetzel AC., Stich H., Caffesse RG.: Bone apposition onto oral implants in the sinus area filled with different grafting materials. A histological study in beagle dogs. *Clinical oral implants research*. 1995; 6(3): 155–163.
23. Schieker M., Heiss C., Mutschler W.: [Bone substitutes]. *Der Unfallchirurg*. 2008; 111(8): 613–9– quiz 620. doi: 10.1007/s00113-008-1489-6.
24. Giannoudis PV., Einhorn TA., Marsh D.: Fracture healing: the diamond concept. *Injury*. 2007; 38 Suppl 4: S3–6.

25. Skalak R.: *Tissue engineering : proceedings of a workshop held at Granlibakken, Lake Tahoe, Calif., February 26-29, 1988*. New York: Liss; 1988: XXI–343.
26. Panetta NJ., Gupta DM., Quarto N., Longaker MT.: Mesenchymal cells for skeletal tissue engineering. *Panminerva medica*. 2009; 51(1): 25–41.
27. Clines GA.: Prospects for osteoprogenitor stem cells in fracture repair and osteoporosis. *Current opinion in organ transplantation*. 2010; 15(1): 73–78. doi: 10.1097/MOT.0b013e328333d52c.
28. Wintermantel E., Ha S-W.: *Medizintechnik mit biokompatiblen Werkstoffen und Verfahren*. 3rd ed. Berlin [u.a.]: Springer; 2002: XXXI–686 S.
29. Langer R., Vacanti JP.: Tissue engineering. *Science*. 1993; 260(5110): 920–926.
30. Matsumoto T., Kuroda R., Mifune Y. et al.: Circulating endothelial/skeletal progenitor cells for bone regeneration and healing. *Bone*. 2008; 43(3): 434–439. doi: 10.1016/j.bone.2008.05.001.
31. Van Heest A., Swiontkowski M.: Bone-graft substitutes. *Lancet*. 1999; 353 Suppl 1: S128–9.
32. Niedhart C.: Klinische Anforderungen an Knochenersatzstoffe. In: Stuttgart, Germany; 2008: 46–50.
33. Henkel K-O., Gerber T., Lenz S., Gundlach KKH., Bienengraber V.: Macroscopical, histological, and morphometric studies of porous bone-replacement materials in minipigs 8 months after implantation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006; 102(5): 606–613. doi: 10.1016/j.tripleo.2005.10.034.
34. Bauer TW.: Particles and periimplant bone resorption. *Clinical orthopaedics and related research*. 2002; (405): 138–143.
35. Schnürer SM., Gopp U., Kühn K-D., Breusch SJ.: [Bone substitutes]. *Orthopäde*. 2003; 32(1): 2–10. doi: 10.1007/s00132-002-0407-9.
36. Winter M., Griss P., de Groot K. et al.: Comparative histocompatibility testing of seven calcium phosphate ceramics. *Biomaterials*. 1981; 2(3): 159–160.
37. Wang J., Chen W., Li Y., Fan S., Weng J., Zhang X.: Biological evaluation of biphasic calcium phosphate ceramic vertebral laminae. *Biomaterials*. 1998; 19(15): 1387–1392.

38. Kessler S., Mayr-Wohlfart U., Ignatius A., Puhl W., Claes L., Günther KP.: Histomorphological, histomorphometrical and biomechanical analysis of ceramic bone substitutes in a weight-bearing animal model. *J Mater Sci Mater Med.* 2002; 13(2): 191–195.
39. Berger G., Gildenhaar R., Ploska U.: Rapid resorbable, glassy crystalline materials on the basis of calcium alkali orthophosphates. *Biomaterials.* 1995; 16(16): 1241–1248.
40. Daculsi G.: Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute. *Biomaterials.* 1998; 19(16): 1473–1478.
41. Povacz F.: *Geschichte Der Unfallchirurgie.* Springer DE; 2007.
42. Dinopoulos HTH., Giannoudis PV.: Safety and efficacy of use of demineralised bone matrix in orthopaedic and trauma surgery. *Expert Opin Drug Saf.* 2006; 5(6): 847–866. doi: 10.1517/14740338.5.6.847.
43. Mulliken JB., Glowacki J., Kaban LB., Folkman J., Murray JE.: Use of demineralized allogeneic bone implants 115ft he115 correction of maxillocraniofacial deformities. *Ann Surg.* 1981; 194(3): 366–372.
44. Narang R., Wells H., Lloyd WS.: Demineralization of bone transplants in vivo. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1973; 36(2): 291–304.
45. Scarborough NL., White EM., Hughes JV., Manrique AJ., Poser JW.: Allograft safety: viral inactivation with bone demineralization. *Contemp Orthop.* 1995; 31(4): 257–261.
46. Stock UA., Vacanti JP.: Tissue engineering: current state and prospects. *Annual review of medicine.* 2001; 52: 443–451. doi: 10.1146/annurev.med.52.1.443.
47. Kocher AA., Schuster MD., Szabolcs MJ. et al.: Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature medicine.* 2001; 7(4): 430–436. doi: 10.1038/86498.
48. Jackson KA., Majka SM., Wang H. et al.: Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *The Journal of clinical investigation.* 2001; 107(11): 1395–1402. doi: 10.1172/JCI12150.
49. Lagasse E., Connors H., Al-Dhalimy M. et al.: Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo. *Nature medicine.* 2000; 6(11): 1229–1234. doi: 10.1038/81326.

50. Ramiya VK., Maraist M., Arfors KE., Schatz DA., Peck AB., Cornelius JG.: Reversal of insulin-dependent diabetes using islets generated in vitro from pancreatic stem cells. *Nature medicine*. 2000; 6(3): 278–282. doi: 10.1038/73128.
51. Johnstone B., Yoo JU.: Autologous mesenchymal progenitor cells in articular cartilage repair. *Clinical orthopaedics and related research*. 1999; (367 Suppl): S156–62.
52. Bjorklund A., Lindvall O.: Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nature neuroscience*. 2000; 3(6): 537–544. doi: 10.1038/75705.
53. Pellegrini G., Traverso CE., Franzi AT., Zingirian M., Cancedda R., De Luca M.: Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. *Lancet*. 1997; 349(9057): 990–993. doi: 10.1016/S0140-6736(96)11188-0.
54. Tsai RJ., Li LM., Chen JK.: Reconstruction of damaged corneas by transplantation of autologous limbal epithelial cells. *The New England journal of medicine*. 2000; 343(2): 86–93. doi: 10.1056/NEJM200007133430202.
55. Ferrari G., Cusella-De Angelis G., Coletta M. et al.: Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science*. 1998; 279(5356): 1528–1530.
56. Gussoni E., Soneoka Y., Strickland CD. et al.: Dystrophin expression in the mdx mouse restored by stem cell transplantation. *Nature*. 1999; 401(6751): 390–394. doi: 10.1038/43919.
57. Gronthos S., Mankani M., Brahimi J., Robey PG., Shi S.: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings 116th National Academy of Sciences 116th United States of America*. 2000; 97(25): 13625–13630. doi: 10.1073/pnas.240309797.
58. Ruszczak Z., Schwartz RA.: Modern aspects of wound healing: An update. *Dermatologic surgery : official publication for American Society for Dermatologic Surgery [et al]*. 2000; 26(3): 219–229.
59. Chistolini P., De Angelis G., De Luca M., Pellegrini G., Ruspantini I.: Analysis 116th the mechanical properties of in vitro reconstructed epidermis: preliminary results. *Med Biol Eng Comput*. 1999; 37(5): 670–672.
60. Makino S., Fukuda K., Miyoshi S. et al.: Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *The Journal of clinical investigation*. 1999; 103(5): 697–705. doi: 10.1172/JCI5298.

61. Bruder SP., Kurth AA., Shea M., Hayes WC., Jaiswal N., Kadiyala S.: Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication 117ft he Orthopaedic Research Society*. 1998; 16(2): 155–162. doi: 10.1002/jor.1100160202.
62. Krebsbach PH., Mankani MH., Satomura K., Kuznetsov SA., Robey PG.: Repair of craniotomy defects using bone marrow stromal cells. *Transplantation*. 1998; 66(10): 1272–1278.
63. Petite H., Viateau V., Bensaid W. et al.: Tissue-engineered bone regeneration. *Nature biotechnology*. 2000; 18(9): 959–963. doi: 10.1038/79449.
64. Beddington RS., Robertson EJ.: An assessment 117ft he developmental potential of embryonic stem cells in the midgestation mouse embryo. *Development*. 1989; 105(4): 733–737.
65. Jiang Y, Jahagirdar BN., Reinhardt RL. et al.: Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002; 418(6893): 41–49. doi: 10.1038/nature00870.
66. Seebach C., Henrich D., Kahling C. et al.: Endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells seeded onto beta-TCP granules enhance early vascularization and bone healing in a critical-sized bone defect in rats. *Tissue engineering Part A*. 2010; 16(6): 1961–1970. doi: 10.1089/ten.TEA.2009.0715.
67. Henrich D., Seebach C., Kaehling C. et al. Simultaneous cultivation of human endothelial-like differentiated precursor cells and human marrow stromal cells on beta-tricalcium phosphate. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2009; 15(4): 551–560. doi: 10.1089/ten.TEC.2008.0385.
68. Hristov M., Weber C.: Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2004; 8(4): 498–508.
69. Risau W.: Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997; 386(6626): 671–674. doi: 10.1038/386671a0.
70. Yin AH., Miraglia S., Zanjani ED. et al.: AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997; 90(12): 5002–5012.
71. Asahara T., Murohara T., Sullivan A. et al.: Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997; 275(5302): 964–967.

72. Rafii S., Lyden D.: Therapeutic stem and progenitor cell transplantation for organ vascularization and regeneration. *Nature medicine*. 2003; 9(6): 702–712. doi: 10.1038/nm0603-702.
73. Urbich C., Dimmeler S.: Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circulation research*. 2004; 95(4): 343–353. doi: 10.1161/01.RES.0000137877.89448.78.
74. Rehman J., Li J., Orschell CM., March KL.: Peripheral blood “endothelial progenitor cells” are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*. 2003; 107(8): 1164–1169.
75. Laufs U., Werner N., Link A. et al.: Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation*. 2004; 109(2): 220–226. doi: 10.1161/01.CIR.0000109141.48980.37.
76. Werner N., Priller J., Laufs U. et al.: Bone marrow-derived progenitor cells modulate vascular reendothelialization and neointimal formation: effect of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2002; 22(10): 1567–1572.
77. Friedenstein AJ., Petrakova KV., Kurolesova AI., Frolova GP.: Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968; 6(2): 230–247.
78. Bruder SP., Kraus KH., Goldberg VM., Kadiyala S.: The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 1998; 80(7): 985–996.
79. Pittenger MF., Mackay AM., Beck SC. et al.: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; 284(5411): 143–147.
80. Kolf CM., Cho E., Tuan RS.: Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis research & therapy*. 2007; 9(1): 204. doi: 10.1186/ar2116.
81. Sacchetti B., Funari A., Michienzi S. et al.: Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007; 131(2): 324–336. doi: 10.1016/j.cell.2007.08.025.
82. Dazzi F., Horwood NJ.: Potential of mesenchymal stem cell therapy. *Current opinion in oncology*. 2007; 19(6): 650–655. doi: 10.1097/CCO.0b013e3282f0e116.

83. Hoogduijn MJ., Crop MJ., Peeters AM. et al.: Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities. *Stem cells and development*. 2007; 16(4): 597–604. doi: 10.1089/scd.2006.0110.
84. Wolbank S., Peterbauer A., Fahrner M. et al.: Dose-dependent immunomodulatory effect of human stem cells from amniotic membrane: a comparison with human mesenchymal stem cells from adipose tissue. *Tissue engineering*. 2007; 13(6): 1173–1183. doi: 10.1089/ten.2006.0313.
85. Keyszer G., Christopeit M., Fick S. et al.: Treatment of severe progressive systemic sclerosis with transplantation of mesenchymal stromal cells from allogeneic related donors: report of five cases. *Arthritis and rheumatism*. 2011; 63(8): 2540–2542. doi: 10.1002/art.30431.
86. Bonaros N., Yang S., Ott H., Kocher A.: Cell therapy for ischemic heart disease. *Panminerva medica*. 2004; 46(1): 13–23.
87. Seebach C., Henrich D., Tewksbury R., Wilhelm K., Marzi I.: Number and proliferative capacity of human mesenchymal stem cells are modulated positively in multiple trauma patients and negatively in atrophic nonunions. *Calcif Tissue Int*. 2007; 80(4): 294–300. doi: 10.1007/s00223-007-9020-6.
88. Tolar J., Nauta AJ., Osborn MJ. et al.: Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2007; 25(2): 371–379. doi: 10.1634/stemcells.2005-0620.
89. Maximov A.: Über experimentelle Erzeugung von Knochenmarkgewebe. *Anat Anz*. 1906; (28): 609–612.
90. Lagasse E., Shizuru JA., Uchida N., Tsukamoto A., Weissman IL.: Toward regenerative medicine. *Immunity*. 2001; 14(4): 425–436.
91. Williams W., Rice KC., Weber RJ.: Nonpeptide opioids: in vivo effects on the immune system. *NIDA research monograph*. 1990; 105: 404–407.
92. Harrison DE., Stone M., Astle CM.: Effects of transplantation on the primitive immunohematopoietic stem cell. *The Journal of experimental medicine*. 1990; 172(2): 431–437.
93. Zander ASN.: Stammzellforschung: Diesseits des Rubikon. *Deutsches Ärzteblatt*. 2002; (99): 341–343.

94. Pang WW., Price EA., Sahoo D. et al. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proceedings 120th National Academy of Sciences 120th United States of America*. 2011; 108(50): 20012–20017. doi: 10.1073/pnas.1116110108.
95. McKinney-Freeman SL., Jackson KA., Camargo FD., Ferrari G., Mavilio F., Goodell MA.: Muscle-derived hematopoietic stem cells are hematopoietic in origin. *Proceedings 120th National Academy of Sciences 120th United States of America*. 2002; 99(3): 1341–1346. doi: 10.1073/pnas.032438799.
96. Majka SM., Jackson KA., Kienstra KA., Majesky MW., Goodell MA., Hirschi KK.: Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. *The Journal of clinical investigation*. 2003; 111(1): 71–79. doi: 10.1172/JCI16157.
97. Reyes M., Lund T., Lenvik T., Aguiar D., Koodie L., Verfaillie CM.: Purification and ex vivo expansion of postnatal human marrow mesodermal progenitor cells. *Blood*. 2001; 98(9): 2615–2625.
98. Jiang Y., Vaessen B., Lenvik T., Blackstad M., Reyes M., Verfaillie CM.: Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. *Experimental hematology*. 2002; 30(8): 896–904.
99. D'Ippolito G., Diabira S., Howard GA., Menei P., Roos BA., Schiller, P. C.: Marrow-isolated adult multilineage inducible (MIAMI) cells, a unique population of postnatal young and old human cells with extensive expansion and differentiation potential. *Journal of cell science*. 2004; 117(Pt 14): 2971–2981. doi: 10.1242/jcs.01103.
100. Kucia M., Ratajczak J., Reza R., Janowska-Wieczorek A., Ratajczak MZ.: Tissue-specific muscle, neural and liver stem/progenitor cells reside in the bone marrow, respond to an SDF-1 gradient and are mobilized into peripheral blood during stress and tissue injury. *Blood cells, molecules & diseases*. 2004; 32(1): 52–57.
101. Kucia M., Ratajczak J., Ratajczak MZ.: Bone marrow as a source of circulating CXCR4+ tissue-committed stem cells. *Biology 120th under the auspices 120th European Cell Biology Organization*. 2005; 97(2): 133–146. doi: 10.1042/BC20040069.
102. Kucia M., Reza R., Campbell FR. et al.: A population of very small embryonic-like (VSEL) CXCR4(+)/SSEA-1(+)/Oct-4+ stem cells identified in adult bone marrow. *Leukemia : official journal 120th Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2006; 20(5): 857–869. doi: 10.1038/sj.leu.2404171.

103. Franz RW., Parks A., Shah KJ., Hankins T., Hartman JF., Wright ML.: Use of autologous bone marrow mononuclear cell implantation therapy as a limb salvage procedure in patients with severe peripheral arterial disease. *J Vasc Surg.* 2009; 50(6): 1378–1390. doi: 10.1016/j.jvs.2009.07.113.
104. Dill T., Schächinger V., Rolf A. et al.: Intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells improves left ventricular function in patients at risk for adverse remodeling after acute ST-segment elevation myocardial infarction: results of the Reinfusion of Enriched Progenitor cells And Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction study (REPAIR-AMI) cardiac magnetic resonance imaging substudy. *Am Heart J.* 2009; 157(3): 541–547. doi: 10.1016/j.ahj.2008.11.011.
105. Jäger M., Herten M., Fochtmann U. et al.: Bridging the gap: bone marrow aspiration concentrate reduces autologous bone grafting in osseous defects. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* 2011; 29(2): 173–180. doi: 10.1002/jor.21230.
106. Cichutek K., Granzer U.: Der Rahmen ist Gesetz: Fortschritte bei Gen-, Zelltherapeutika und Tissue Engineering-Arzneimitteln. *Bundesgesundheitsblatt* 2010. (53): 1–3.
107. Civin CI., Strauss LC., Fackler MJ., Trischmann TM., Wiley JM., Loken MR.: Positive stem cell selection—basic science. *Prog Clin Biol Res.* 1990; 333: 387–401— discussion 402.
108. Krause DS., Fackler MJ., Civin CI., May WS.: CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood.* 1996; 87(1): 1–13.
109. Gangenahalli GU., Singh VK., Verma YK. et al.: Hematopoietic stem cell antigen CD34: role in adhesion or homing. *Stem cells and development.* 2006; 15(3): 305–313. doi: 10.1089/scd.2006.15.305.
110. Attar A., Ghalyanchi Langeroudi A., Vassaghi A., Ahrari I., Maharlooei MK., Monabati A.: Role of CD271 enrichment in the isolation of mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Cell Biol Int.* 2013; 37(9): 1010–1015. doi: 10.1002/cbin.10117.
111. Sasaki T., Sasaki-Irie J., Penninger JM.: New insights into the transmembrane protein tyrosine phosphatase CD45. *Int J Biochem Cell Biol.* 2001; 33(11): 1041–1046.
112. Haisch A., Wanjura F., Radke C. et al.: Immunomodulation of tissue-engineered transplants: in vivo bone generation from methylprednisolone-stimulated chondrocytes. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2004; 261(4): 216–224. doi: 10.1007/s00405-003-0646-3.

113. Stangenberg L., Schaefer DJ., Buettner O. et al.: Differentiation of osteoblasts in three-dimensional culture in processed cancellous bone matrix: quantitative analysis of gene expression based on real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. *Tissue engineering*. 2005; 11(5-6): 855–864. doi: 10.1089/ten.2005.11.855.
114. Kucia M., Reza R., Jala VR., Dawn B., Ratajczak J., Ratajczak MZ.: Bone marrow as a home of heterogeneous populations of nonhematopoietic stem cells. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK*. 2005; 19(7): 1118–1127. doi: 10.1038/sj.leu.2403796.
115. Henrich D., Wilhelm K., Warzecha J. et al.: Human endothelial-like differentiated precursor cells maintain their endothelial characteristics when cocultured with mesenchymal stem cell and seeded onto human cancellous bone. *Mediators Inflamm*. 2013; 2013: 364591. doi: 10.1155/2013/364591.
116. Seebach C., Henrich D., Wilhelm K., Barker JH., Marzi I.: Endothelial progenitor cells improve directly and indirectly early vascularization of mesenchymal stem cell-driven bone regeneration in a critical bone defect in rats. *Cell transplantation*. 2012; 21(8): 1667–1677. doi: 10.3727/096368912X638937.
117. Erbs S., Linke A., Schächinger V. et al.: Restoration of microvascular function in the infarct-related artery by intracoronary transplantation of bone marrow progenitor cells in patients with acute myocardial infarction: the Doppler Substudy of the Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction (REPAIR-AMI) trial. *Circulation*. 2007; 116(4): 366–374. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.671545.
118. Assmus B., Rolf A., Erbs S. et al.: Clinical outcome 2 years after intracoronary administration of bone marrow-derived progenitor cells in acute myocardial infarction. *Circ Heart Fail*. 2010; 3(1): 89–96. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.108.843243.
119. Fischer-Rasokat U., Assmus B., Seeger FH. et al.: A pilot trial to assess potential effects of selective intracoronary bone marrow-derived progenitor cell infusion in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy: final 1-year results of the transplantation of progenitor cells and functional regeneration enhancement pilot trial in patients with nonischemic dilated cardiomyopathy. *Circ Heart Fail*. 2009; 2(5): 417–423. doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.109.855023.
120. Kamihata H., Matsubara H., Nishiue T. et al.: Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. *Circulation*. 2001; 104(9): 1046–1052.

121. Clifford DM., Fisher SA., Brunskill SJ. et al.: Stem cell treatment for acute myocardial infarction. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012; 2: CD006536. doi: 10.1002/14651858.CD006536.pub3.
122. Lawall H., Bramlage P., Amann B.: Stem cell and progenitor cell therapy in peripheral artery disease. A critical appraisal. *Thromb Haemost.* 2010; 103(4): 696–709. doi: 10.1160/TH09-10-0688.
123. Assmus B., Tonn T., Seeger FH. et al.: Red blood cell contamination 123ft he final cell product impairs the efficacy of autologous bone marrow mononuclear cell therapy. *J Am Coll Cardiol.* 2010; 55(13): 1385–1394. doi: 10.1016/j.jacc.2009.10.059.
124. Seebach C., Schultheiss J., Wilhelm K., Frank J., Henrich D.: Comparison of six bone-graft substitutes regarding to cell seeding efficiency, metabolism and growth behaviour of human mesenchymal stem cells (MSC) in vitro. *Injury.* 2010; 41(7): 731–738. doi: 10.1016/j.injury.2010.02.017.
125. Schultheiss J.: *Verhalten mesenchymaler Stammzellen und endothelialer Progenitorzellen auf unterschiedlichen Knochenersatzstoffen.* Aus dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main. 2010.
126. Kadow-Romacker A., Greiner S., Schmidmaier G., Wildemann B.: Effect of  $\beta$ -tricalcium phosphate coated with zoledronic acid on human osteoblasts and human osteoclasts in vitro. *J Biomater Appl.* 2013; 27(5): 577–585. doi: 10.1177/0885328211415722.
127. Leotot J., Coquelin L., Bodivit G. et al.: Platelet lysate coating on scaffolds directly and indirectly enhances cell migration, improving bone and blood vessel formation. *Acta Biomater.* 2013; 9(5): 6630–6640. doi: 10.1016/j.actbio.2013.02.003.
128. Assmann A., Delfs C., Munakata H. et al.: Acceleration of autologous in vivo recellularization of decellularized aortic conduits by fibronectin surface coating. *Biomaterials.* 2013; 34(25): 6015–6026. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.037.
129. Cornelissen CG., Dietrich M., Gromann K. et al.: Fibronectin coating of oxygenator membranes enhances endothelial cell attachment. *Biomed Eng Online.* 2013; 12: 7. doi: 10.1186/1475-925X-12-7.
130. Anitua E., Prado R., Orive G.: Endogenous morphogens and fibrin bioscaffolds for stem cell therapeutics. *Trends Biotechnol.* 2013; 31(6): 364–374. doi: 10.1016/j.tibtech.2013.04.003.

131. Mueller-Eckhardt-Kiefel, Kiefel V.: *Transfusionsmedizin*. Springer DE; 2004.
132. Soendergaard C., Kvist PH., Seidelin JB., Nielsen OH.: Tissue-regenerating functions of coagulation factor XIII. *J Thromb Haemost*. 2013; 11(5): 806–816. doi: 10.1111/jth.12169.
133. Yip H-K., Sun C-K., Tsai T-H. et al.: Tissue plasminogen activator enhances mobilization of endothelial progenitor cells and angiogenesis in murine limb ischemia. *Int J Cardiol*. 2013; 168(1): 226–236. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.09.090.
134. Heissig B., Ohki-Koizumi M., Tashiro Y., Gritli I., Sato-Kusubata K., Hattori K.: New functions 124ft he fibrinolytic system in bone marrow cell-derived angiogenesis. *Int J Hematol*. 2012; 95(2): 131–137. doi: 10.1007/s12185-012-1016-y.
135. Horváthy DB., Vác G., Cselenyák A., Weszl M., Kiss L., Lacza Z.: Albumin-coated bioactive suture for cell transplantation. *Surg Innov*. 2013; 20(3): 249–255. doi: 10.1177/1553350612451353.
136. Kawamura R., Mishima M., Ryu S. et al.: Controlled cell adhesion using a biocompatible anchor for membrane-conjugated bovine serum albumin/bovine serum albumin mixed layer. *Langmuir*. 2013; 29(21): 6429–6433. doi: 10.1021/la4012229.
137. Volkmer H., Schreiber J., Rathjen FG.: Regulation of Adhesion by Flexible Ectodomains of IgCAMs. *Neurochem Res*. 2013; 38(6): 1092–1099. doi: 10.1007/s11064-012-0888-9.
138. Vogel JP., Szalay K., Geiger F., Kramer M., Richter W., 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(7): 462–469. doi: 10.1080/09537100600758867.
139. Smith IO., Baumann MJ., Obadia L., Boulter J-M.: Surface potential and osteoblast attraction to calcium phosphate compounds is affected by selected alkaline hydrolysis processing. *J Mater Sci Mater Med*. 2004; 15(8): 841–846. doi: 10.1023/B:JMSM.0000036270.68200.97.
140. Khan Y., Yaszemski MJ., Mikos AG., Laurencin CT.: Tissue engineering of bone: material and matrix considerations. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2008; 90 Suppl 1: 36–42. doi: 10.2106/JBJS.G.01260.
141. Kübler A., Neugebauer J., Oh J-H., Scheer M., Zöller JE.: Growth and proliferation of human osteoblasts on different bone graft substitutes: an in vitro study. *Implant Dent*. 2004; 13(2): 171–179.

142. Turhani D., Weissenböck M., Watzinger E. et al.: Invitro study of adherent mandibular osteoblast-like cells on carrier materials. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 34(5): 543–550. doi: 10.1016/j.ijom.2004.10.023.
143. Egli PS., Müller W., Schenk RK.: Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. *Clinical orthopaedics and related research.* 1988; (232): 127–138.
144. Karageorgiou V., Kaplan D.: Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005; 26(27): 5474–5491. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.02.002.
145. Kasten P., Beyen I., Niemeyer P., Luginbühl R., Böhner M., Richter W.: Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. *Acta Biomater.* 2008; 4(6): 1904–1915. doi: 10.1016/j.actbio.2008.05.017.
146. Klenke FM., Liu Y., Yuan H., Hunziker EB., Siebenrock KA., Hofstetter W.: Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 85(3): 777–786. doi: 10.1002/jbm.a.31559.
147. Solga A., Cerman Z., Striffler BF., Spaeth M., Barthlott W.: The dream of staying clean: Lotus and biomimetic surfaces. *Bioinspir Biomim.* 2007; 2(4): S126–34. doi: 10.1088/1748-3182/2/4/S02.
148. Herminghaus S.: Wetting, spreading, and adsorption on randomly rough surfaces. *Eur Phys J E Soft Matter.* 2012; 35(6): 43. doi: 10.1140/epje/i2012-12043-8.
149. *Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines Lotusblattes.* Botanisches Institut und Botanischer Garten, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, Abteilung Systematik und Biodiversität. 2006.
150. Niemeyer P., Krause U., Fellenberg J. et al.: Evaluation of mineralized collagen and alpha-tricalcium phosphate as scaffolds for tissue engineering of bone using human mesenchymal stem cells. *Cells Tissues Organs (Print).* 2004; 177(2): 68–78. doi: 10.1159/000079182.

## **12 Danksagung**

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich beim gesamten Team des wissenschaftlichen Labors der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main unter der Leitung von Prof. Dr. Ingo Marzi, vor allem bei:

Privatdozent Dr. phil. nat. Dirk Henrich für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, die Unterstützung bei der Versuchsdurchführung, den unerschöpflichen Fundus an thematischen und wissenschaftlichen Hinweisen und die vielen angenehmen und konstruktiven Gespräche,

Privatdozent Dr. med. Caroline Seebach für die engagierte Projektunterstützung,

Kerstin Wilhelm, Alexander Schaible und Katrin Jurida für die Hilfsbereitschaft und das stets offene Ohr.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die dieses Werk in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung bedacht haben und ohne deren Hilfestellung das Studium nicht möglich gewesen wäre. Auch meinem Bruder möchte für seine Hilfsbereitschaft und die Unterstützung herzlich danken.

Besonders danken möchte ich auch meiner Freundin und Partnerin, die mir immer mit viel Rat und Tat zur Seite stand und mich seelisch, moralisch und emotional unterstützt hat.

### 13 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel:

„Charakterisierung und Kultivierung von bone marrow mononuclear cells auf verschiedenen Biomaterialien *in vitro*“

in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie unter Betreuung und Anleitung von PD Dr. phil. nat. Dirk Henrich ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Vortrag: Verboket R., Seebach C., Schaible A., Henrich D., Marzi I.: Characterization of bone marrow mononucleated cells on biomaterials for bone tissue engineering in vitro.

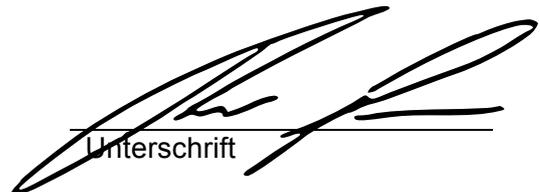
*17. Chirurgische Forschungstage 2013*, Goethe-Universität Frankfurt am Main

Poster: Verboket R., Seebach C., Nau C., Frank J., Marzi I., Henrich D.: Vergleichende Analyse der Adhäsion und Funktion mononukleärer Knochenmarkszellen (BMC) auf demineralisierter Knochenmatrix (DBM),  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) und boviner Spongiosa.

*Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2013*, Berlin

Frankfurt am Main, 17.12.2014

Ort, Datum

  
Unterschrift