

Aus dem Fachbereich Medizin
der Goethe-Universität
Frankfurt am Main

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

**Einfluss der Granulatgröße des Knochenersatzmaterials Herafill und der
bone marrow mononuclear cells auf die Knochendefektheilung unter
Verwendung der induzierten Membrantechnik nach Masquelet in vivo**

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

vorgelegt von
Elias Andreas Thomas Koch

aus Mainz

Frankfurt am Main, 2019

Dekan: Prof. Dr. Josef Pfeilschifter
Referent: Prof. Dr. Dirk Günter Henrich
Korreferent: Prof. Dr. John Howard Barker

Tag der mündlichen Prüfung: 28.08.2019

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung.....	1
1.1 Introduction / English version.....	3
1.2 Knochenheilung	5
1.2.1 Sekundäre Knochenheilung	5
1.2.1.1 Hämatom, Immunreaktion, Granulationsgewebe	5
1.2.1.2 Weicher Kallus	7
1.2.1.3 Harter Kallus.....	7
1.2.1.4 Remodeling.....	8
1.2.2 Primäre Knochenheilung.....	9
1.2.2.1 Kontaktheilung	9
1.2.2.2 Spaltheilung	10
1.2.3 Einfluss des Periosts.....	10
1.2.4 Einfluss der Makrophagen.....	11
1.3 Critical Size Defect.....	13
1.3.1 Therapie von Knochendefekten.....	13
1.3.2 Masquelet-Technik.....	15
1.3.2.1 Operatives Verfahren.....	15
1.3.2.2 Die induzierte Membran.....	17
1.4 bone tissue engineering.....	20
1.4.1 Diamantenkonzept.....	21
1.4.2 Knochenersatzmaterialien.....	22
1.4.2.1 Anorganische Knochenersatzmaterialien.....	22
1.4.2.2 Organische Knochenersatzmaterialien.....	24
1.4.3 Herafill.....	26
1.4.4 Granulatgröße.....	26
1.4.5 Mononukleären Knochenmarkszellen/Bone Marrow Mononuclear Cells	27
1.4.5.1 Zelltherapie mit mononukleären Knochenmarkszellen.....	27
1.5 Fragestellung.....	29
2 Materialien und Methoden.....	31
2.1 Materialliste.....	31
2.1.1 Material Chirurgie.....	33
2.2 Versuchsaufbau.....	34
2.3 Tiere – Vorbereitung/Akklimatisierung.....	35
2.4 Operationsabfolge.....	36
2.4.1 Narkose.....	36
2.4.2 Operationsvorbereitung.....	36
2.4.3 Erster Operationsschritt nach Masquelet (Membraninduktion).....	36
2.4.4 Zweiter Operationsschritt nach Masquelet 38 (Auffüllen der induzierten Membran mit Herafill oder syngener Spongiosa).....	39
2.4.5 Sacrifice & Lagerung.....	40
2.4.6 Herstellung von syngenen Knochenmaterial.....	41
2.5 Isolierung von BMC aus dem Rattenfemur.....	41
2.5.1 Zellzahlbestimmung.....	42
2.5.2 Aussaat auf das Granulat	43
2.5.2.1 Nachweis von BMC auf Herafill.....	44
2.6 Histologie.....	44
2.6.1 Entkalkung.....	44
2.6.2 Paraffinierung.....	45
2.6.3 Anfertigung der Knochenschnitte.....	45
2.6.4 Färbungen.....	46

2.6.4.1 Pentachrom.....	46
2.6.4.2 Hämatoxylin-EosinG-Färbung.....	48
2.6.4.3 α -Smooth muscle actin (α -SMA) - Färbung	49
2.6.4.4 CD-68-FÄRBUNG.....	50
2.6.4.5 CD-80-FÄRBUNG.....	51
2.6.4.6 CD-163-FÄRBUNG.....	52
2.6.4.7 STRO-1 Färbung.....	53
2.6.5 Histologische Auswertung.....	54
2.6.5.1 Mikroskopie, Digitalisierung, Image J.....	54
2.6.5.2 Mikroskopie.....	55
2.6.6 Knochenmineraldichte.....	56
2.7 Statistische Analyse.....	56
3 Ergebnisse.....	57
3.1 Aussaat-effizienz.....	57
3.2 Operationsverlauf.....	58
3.3 Histologie.....	59
3.3.1 Knochenneubildung im Defektbereich in Abhängigkeit von Zellbesiedelung und Granulatgröße.....	59
3.3.2 Periostausdehnung in Abhängigkeit von Zellbesiedelung und Granulatgröße.....	61
3.3.3 Zellinduktion in Abhängigkeit von Zellbesiedelung und Granulatgröße.....	63
3.4 Vaskularisierung.....	74
3.5 Knochenmineraldichte (Bone Mineral Density).....	76
4 Diskussion	79
5 Zusammenfassung.....	86
5.1 Summary / English version.....	88
6 Literaturverzeichnis.....	90
7 Abkürzungsverzeichnis.....	106
8 Curriculum Vitae.....	108
9 Danksagung.....	109
10 Schriftliche Erklärung.....	110

Abbildungsverzeichnis

Makrophagen Differenzierungsschema nach Wu et al. (2013).....	12
Diamond Model of Bone Fracture Healing Interactions (Giannoudis et al., 2007).....	22
Knochensatzstoffe (Giannoudis et al., 2005).....	25
Erster Operationsschritt nach Masquelet.....	38
Zweiter Operationsschritt nach Masquelet.....	40
Fluoreszenzmikroskopie der DAPI Färbung – Granulat Korn.	57
Fluoreszenzmikroskopie der DAPI Färbung – Granulat Korn in Zellsuspension.	57
Knochenschnitt mit Pentachromfärbung aus Gruppe 1 (kleines Granulat).....	59
Auswertung der Pentachrom-Färbung - Dient zur Quantifizierung der Kallusneubildung im Defektbereich.....	60
Beispiel der Periostausdehnung bei unbesiedelten mittelgroßen Granulat. Die Pfeile zeigen das Wachstum der periostähnlichen Strukturen.....	61
Auswertung der Pentachrom-Färbung - Nachweis der Ausdehnung periostähnlicher Strukturen in den Defektbereich.....	62
Auswertung der CD68-Färbung - Dient zur Quantifizierung der Gewebemakrophagen. In diesem Diagramm ist ein Durchschnitt aus dem Übergangsbereichs (vom Periost zur Membran) und der Membran dargestellt.....	63
Auswertung der CD68-Färbung - Dient zur Quantifizierung der Gewebemakrophagen. In diesem Diagramm ist die Auswertung der Membran dargestellt.....	64
Auswertung der CD68-Färbung - Dient zur Quantifizierung der Gewebemakrophagen. In diesem Diagramm ist die Auswertung des Übergangsbereichs dargestellt.....	65
Nachweis der CD68 positiven Zellen im Vergleich der verschiedenen Gruppen im Übergangsbereich. Die roten Pfeile zeigen beispielhaft positiv gefärbte Zellen.....	66
Nachweis der CD68 positiven Zellen im Vergleich der verschiedenen Gruppen in der Membran. Die roten Pfeile zeigen beispielhaft positiv gefärbte Zellen.....	67
Auswertung der CD163-Färbung - Dient zum immunhistologischen Nachweis und Quantifizierung von M2 - Makrophagen.....	68
Auswertung der CD80-Färbung - Dient zum immunhistologischen Nachweis und Quantifizierung von M1 - Makrophagen.....	69
Berechnung der M1/M2-Ratio aus der Quantifizierung von M1- (CD80-positiv, Abb. 16) und M2-Makrophagen (CD163-positiv, Abb. 15).....	70
Exemplarische histologische Färbungen, obere Reihe CD80, untere Reihe CD163.	71
Auswertung der STRO-1 Färbung - Dient zur Quantifizierung der mesenchymalen Stammzellen. In diesem Diagramm ist die Auswertung des Übergangsbereichs des Periost von Knochen zu Defekt dargestellt.....	72
Auswertung der STRO-1 Färbung - Dient zur Quantifizierung der mesenchymalen Stammzellen. In diesem Diagramm ist die Auswertung der Membran dargestellt.....	73
Auswertung der Alpha-SMA Färbung – Dient zur Quantifizierung der Vaskularisierung.....	74
Alpha-SMA-Färbung: Darstellung der Vaskularisierung von einem unbesiedelten kleinen Scaffold der Gruppe 1. Die roten Pfeile markieren beispielhaft angefärbte Blutgefäße.....	75
Auswertung der BMD, alle Gruppen im Vergleich zum Referenzknochen.....	76
Auswertung der BMD, autologer Knochen vs zellfreies Granulat vs Referenzknochen.....	77
Auswertung der BMD, autologer Knochen vs besiedeltes Granulat vs Referenzknochen.....	78

Tabellenverzeichnis

1. Tabelle: Gruppeneinteilung.....	35
2. Tabelle: Übersicht Gruppenkennzeichen.....	37
3. Tabelle: Pentachrom Färbungsprotokoll nach Verhöff.....	47
4. Tabelle: Hämatoxylin-Färbungsprotokoll.....	48
5. Tabelle: α -Smooth muscle actin (α -SMA) – Färbungsprotokoll.....	49
6. Tabelle: CD-68 Färbungsprotokoll.....	50
7. Tabelle: CD-80-Färbungsprotokoll.....	51
8. Tabelle: CD-163-Färbungsprotokoll.....	52
9. Tabelle: STRO-1-Färbungsprotokoll.....	54

1 Einführung

Der menschliche Knochen besitzt, als Folge einer Verletzung oder eines chirurgischen Eingriffs, eine große Fähigkeit zur Reparatur und Regeneration. Die Knochenheilung beinhaltet ein komplexes Zusammenspiel von Zellen, Wachstumsfaktoren, Zytokinen sowie der extrazellulären Matrix (Hoerth et al. 2014). Nichtsdestotrotz führt ein Knochenbruch zu einer dramatischen Veränderung der mechanischen Belastbarkeit an der Verletzungsstelle. Der Abstand zwischen den beiden Fraktarenden bildet einen entscheidenden Faktor in der Knochenheilung. Hier wird zwischen der primären, der osteonalen Knochenheilung und der sekundären, der kallusformierenden Knochenheilung unterschieden. Umso größer der Frakturspalt ist, desto größer wird die Instabilität, die Heilungsverzögerung und damit auch die Gefahr einer Pseudoarthrose (Hoerth et al., 2014; Marsell et Einhorn, 2011).

Große diaphysale Defekte werden meistens durch Traumata, Infektionen oder Tumore bedingt. Sie werden als *critical size defects* (CSD) bezeichnet, wenn eine chirurgische Intervention zur Heilung notwendig ist (Rosset et al., 2014). Langstreckige Knochendefekte stellen immer noch eine sehr große Herausforderung in der rekonstruktiven Chirurgie dar. Deswegen ist die Untersuchung und Weiterentwicklung von implantierbaren biomedizinischen Materialien bei der Behandlung von CSD eine wichtige Aufgabe.

Im Augenblick ist die häufigste Behandlungsmethode großer diaphysaler Defekte die Autologe Spongiosaplastik (ASP) und wird als Goldstandard der Therapie bezeichnet. Jedoch stehen die autologen Knochenmaterialien nur begrenzt zur Verfügung und verursachen viele Entnahmemorbiditäten. Darüber hinaus gibt es allogene, xenogene und synthetische Knochentransplantate. Dennoch ist noch keine der Therapiemöglichkeiten so ausgereift, dass die ASP dadurch ersetzt werden könnte. Die allogenen und xenogenen Materialien sind von der Menge unbegrenzt, besitzen aber eine niedrigere Biokompatibilität, höhere Infektionsgefahr und schlechtere Ergebnisse in der Langzeitwirkung

(Wang et al., 2014).

Ein weiterer Nachteil gegenüber der ASP besteht darin, dass die synthetischen Knochenersatzmaterialien keine osteoinduktiven und osteogenen Eigenschaften besitzen. Eine Möglichkeit diese Qualitäten zu erhalten ist, sie mit Zellsuspensionen, wie z.B. *bone marrow mononuclear cells* (BMC), zu kombinieren und somit zu versuchen ein ausgereiftes Therapiekonzept zu entwickeln.

Zugleich beschreibt Masquelet et al. (2000) eine neue Technik, ein zweistufiges Verfahren zur Rekonstruktion von Knochendefekten. Es wird eine biologisch aktive Membran induziert, welche verschiedene Wachstumsfaktoren (wie z.B. VEGF, TGF beta1, BMP-2) sezerniert, die osteoinduktiv wirksam sind. Mit diesem operativen Verfahren wurden bereits gute klinische Ergebnisse bei Knochendefekten nach Tumorresektionen und Traumata erzielt.

Das Ziel dieser Studie ist es einen anorganischen Knochenersatzstoff von Heraeus Herafill unter Verwendung der induzierten Membrantechnik nach Masquelet am Rattenfemur zu testen. Die Forschung erfolgt dabei unter der Hypothese, dass die Korngröße des Knochenersatzmaterials Herafill in Kombination mit BMC-Besiedelung Einfluss auf die Heilung eines kritischen Knochendefekts hat.

1.1 Introduction / English version

Human bone has a great ability to repair and regenerate following injuries or surgeries. Bone healing involves a complex interaction of cells, growth factors, cytokines and the extracellular matrix (Hoerth et al., 2014). Nonetheless, bone fracture dramatically changes the mechanical stability of the bone. The distance between the two fracture ends plays a crucial role in bone healing. Here a distinction is made between the primary, the osteonal bone healing and the secondary, the callus-forming bone healing. The larger the fracture gap, the greater is the instability, the healing delay and thus the danger of a pseudarthrosis (Hoerth et al., 2014, Marsell et Einhorn, 2011).

Large diaphyseal defects are usually caused by trauma, infection or tumor. They are referred to as a critical size defect (CSD) when surgical intervention is needed to induce the healing process (Rosset et al., 2014). Long bone defects still represent a major challenge in reconstructive surgery. Therefore research and development of implantable biomedical materials is an important task in the treatment of CSD.

Currently the most common treatment for large diaphyseal defects is Autologous Spongiosaplasty (ASP) and it is the gold standard of therapy. However, the autologous bone materials are limited and cause many comorbidities. In addition there are allogeneic, xenogeneic and synthetic bone grafts. Nevertheless, none of the treatment options is so advanced that the ASP could be replaced. The allogeneic and xenogenic materials are unlimited in quantity, but have lower biocompatibility, higher risk of infection, and worse long-term efficacy results (Wang et al., 2014).

Another disadvantage over the ASP is that the synthetic bone replacement materials have no osteoinductive and osteogenic properties. One way to obtain all the required qualities is to combine them with cell suspensions, such as bone marrow mononuclear cells (BMC) and thus try to develop a mature therapy concept.

Moreover Masquelet et al. (2000) describes a new technique, a two-step

procedure for the reconstruction of large bone defects. Through this technique a biologically active membrane is induced and secretes various growth factors (such as VEGF, TGF beta1, BMP-2), which have osteoinductive effects. This surgical procedure has already produced good clinical results in bone defects after tumor resection and trauma.

The aim of this study is to test an anorganic bone substitute from Heraeus Herafill using the induced Masquelet membrane technique on rat femur. The research is based on the hypothesis that the granules size of the bone substitute material Herafill in combination with BMC colonization has an influence on the healing of a critical bone defect.

1.2 Knochenheilung

Die Knochenheilung ist ein sehr komplexer, physiologischer Vorgang, welcher die räumliche und zeitliche Koordination von mehreren Zelltypen, Proteinen, Wachstums- und Transkriptionsfaktoren sowie von hunderten Genen benötigt, um eine Regeneration zu erhalten (Giannoudis et al., 2007). In der Natur unterliegt in aller Regel die Knochenbruchformation einer sekundären Gewebeneubildung, einer Kallusreaktion zur Überbrückung des Knochendefektes. Allerdings kann oftmals unter Verwendung von Osteosynthesematerialien ein direkter Kontakt der Fragmente hergestellt werden, was eine direkte, primäre Knochenheilung ermöglicht.

1.2.1 Sekundäre Knochenheilung

Die sekundäre, indirekte Knochenheilung ist die am häufigsten vorkommende Form der Knochenheilung und benötigt bei fehlender Dislokation keine anatomische Rekonstruktion. Sie erlaubt eine minimale Spaltbewegung. Therapeutisch reicht oft eine konservative Behandlung aus. Hierbei kommt es zur Kallusbildung und zu keiner direkten osteonalen Überbrückung. Deswegen wird sie auch nicht-osteonale Knochenheilung genannt (Marsell and Einhorn, 2011). Abhängig von der Frakturformation können hierbei auch ausgeprägte Trümmerfrakturen überbrückt werden.

1.2.1.1 Hämatom, Immunreaktion, Granulationsgewebe

Kurz nach der Fraktur kommt es zur Einblutung in die Frakturstelle und zu einer initialen Entzündungsreaktion. Hierbei werden Blut- und Knochenmarkzellen (u.a. mesenchymale Stammzellen, Makrophagen, Monozyten, Mastzellen) in den Frakturspalt gespült. Daraufhin kommt es zu einer Koagulation und anschließend zur Phagozytose des Frakturhämatoms durch die Zellen des angeborenen Immunsystems (Makrophagen, neutrophile Granulozyten usw.). Daraus entsteht die Grundlage für den späteren Kallus (Gerstenfeld LC et al., 2003). Das adaptive Immunsystem tritt durch die T- und B-Zellen zwischen den Frakturrenden in Erscheinung. Die zellvermittelte Immunantwort bietet einen

ergänzenden Schutz gegen verschiedene Krankheitserreger. Somit kann bei Erregerkontakt eine schnelle spezifische Immunantwort ermöglicht werden (Pape et al., 2010). Die Entzündungsreaktion hat ihren Peak nach 24 Stunden und ist nach 7 Tagen komplett beendet (Cho et al., 2002). In dieser Zeit entsteht das Granulationsgewebe und es werden eine Anzahl von Mediatoren von hinzutretenden Makrophagen und weiteren Entzündungszellen freigesetzt, welche sowohl die Angiogenese, als auch die Rekrutierung von weiteren Zellen stimulieren.

Diese Moleküle sind unter anderem: Tumor Nekrose Faktor-Alpha (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-11 und IL-18 (Gerstenfeld et al., 2003). Die bedeutsamsten Interleukine für die Knochenheilung sind IL-1 und IL-6. IL-1 wird in derselben Menge wie TNF- α freigesetzt und ist für die Sekretion von IL-6 aus Osteoblasten verantwortlich. Des Weiteren stimuliert IL-6 insbesondere die Sekretion von *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Diese Faktoren unterstützen nicht nur die Angiogenese, sondern auch die Stimulierung der Zellrekrutierung und der Differenzierung zu Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten. Somit wird die Entstehung des ersten knorpeligen Kallus in Gang gesetzt (Mountziaris and Mikos, 2008; Einhorn and Gerstenfeld, 2015; Wang et al., 2013).

Damit der Knochen gut regenerieren kann, ist es erforderlich, dass mesenchymale Stammzellen (MSC) in den Frakturspalt rekrutiert werden und sich anschließend zu osteogenen Zellen differenzieren. Es wird angenommen, dass MSC aus dem umliegenden Gewebe, dem Periost und dem Knochenmark stammen (Kitaori et al., 2009). Jedoch unterstützen nicht alle Faktoren eine Einwanderung der MSC. So wurde beobachtet, dass *bone-morphogenetic-protein-2* (BMP-2) und BMP-7 bei osteoporotischen Patienten die Einwanderung (der MSC) vermindert (Haasters et al., 2014). Nichtsdestotrotz ist BMP-2 absolut notwendig für die Knochenheilung, da unter anderem konstatiert wurde, dass mesenchymale Vorläuferzellen im Frakturspalt ohne BMP-2 undifferenziert bleiben und dadurch frühe Schritte in der Frakturheilung

geblockt werden (Tsuji et al., 2006). Außerdem wird die Sekretion vom *stromal cell-derived factor-1* (SDF-1) stimuliert, welcher über den *G-protein-coupled receptor* CXCR-4, auf der Oberfläche der MSC, die Migration der Stammzellen aus dem Periost in den Frakturspalt fördert und somit ebenfalls die enchondrale Ossifikation induziert (Kitaori et al., 2009).

1.2.1.2 Weicher Kallus

Im Frakturspalt kommt es nun zur enchondralen Ossifikation und damit über die zunehmenden knorpeligen Anteile zu einer indirekten Knochenbildung, da MSC zu Chondroblasten differenzieren. Dadurch verändert sich das Granulationsgewebe zu einem fibrovaskulären, knorpeligen Gewebe, während es an dem außen liegendem Periost zu einer desmalen, direkten Ossifikation kommt. Mesenchymale Stammzellen differenzieren dort zu Osteoblasten, welche das Osteoid, die verkalkte Knochengrundsubstanz, bilden (Little et al., 2011). Der *transforming growth factor-beta 2* (TGF- β 2), TGF- β 3 und die BMP leiten diese Phase ein (Gerstenfeld et al., 2003; Cho et al., 2002).

Des Weiteren wird der *platelet-derived growth factor* (PDGF) von Thrombozyten, Makrophagen, Osteoblasten und Fibroblasten gebildet und besitzt ebenfalls einen positiven Effekt auf die Angiogenese und die Wundheilung. Obendrein stimuliert PDGF die Produktion von Osteoprotegerin (OPG), welches den Abbau von Knochensubstanz durch Osteoklasten verhindert (Graham et al., 2009; McCarthy et al., 2009).

So erhält der Knochen nach 2 Wochen wieder die erste Stabilität. Der neu entstandene Bindegewebs-/Faserknochen wird als Geflechtknochen bezeichnet (Gerstenfeld et al., 2006; Little et al., 2011).

1.2.1.3 Harter Kallus

In diesem Stadium produzieren die neu entstandenen Osteoblasten und Chondrozyten hohe Mengen an VEGF, was dazu führt, dass das ansonsten gefäßfreie, knorpelige Gewebe zu einem gefäßreichen Gewebe umgewandelt

wird. Durch die anhaltende Vaskularisierung und Umstrukturierung kommt es zunehmend zu einer Mineralisierung des Kallus und dadurch zu einer fortschreitenden Aushärtung (Keramaris et al., 2008). OPG, *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) und *receptor for activation of nuclear factor kappa B* (RANK-Ligand) sind an diesem Prozess beteiligt. Des Weiteren unterstützt TNF- α die Apoptose der Chondrozyten und eine weitere Rekrutierung der MSC (Little et al., 2011; Gerstenfeld et al., 2003). Dieser Prozess ist der embryonalen Knochenentwicklung sehr ähnlich. Die Knorpelzellen werden in steigender Anzahl abgebaut und die Interzellulärsubstanz vermindert sich. Es entstehen zunehmend Mineraldepots und durch die Gefäße werden weiterhin MSC eingespült, welche zu Osteoblasten differenzieren. Somit wird der weiche knorpelige Kallus durch einen harten, knöchernen Kallus ersetzt (Mountziaris and Mikos, 2008; Little et al., 2011). Dieser Prozess findet in einer Zeit von 6 Wochen bis zu 3 Monaten nach der Fraktur statt. Zu dieser Zeit darf der Knochen erstmals wieder belastet werden.

1.2.1.4 Remodeling

Der harte Kallus gibt dem Knochen eine gute biomechanische Stabilität. Diese ist jedoch noch nicht mit einem herkömmlichen Knochen gleichzusetzen. Daher ist das Remodeling, eine weitere resorptive Phase infolge erster Belastung erforderlich (Gerstenfeld et al., 2003). Bei diesem Schritt wird wieder eine hohe Expression von IL-1, IL-6, IL-11, und TNF- α festgestellt, was darauf schließen lässt, dass diese Moleküle diesen Schritt stimulieren (Rundle et al., 2006). Beim Remodeling wird ein Teil des harten Kallus von den Osteoklasten abgebaut und gleichzeitig, von außen beginnend, Lamellenknochen durch Osteoblasten aufgebaut. Diese beiden Vorgänge laufen in einer guten Balance miteinander ab und dafür ist eine gute Vaskularisierung erforderlich (Marsell and Einhorn, 2011). Bis der Knochen wieder eine normale Struktur mit einem Markraum und vergleichbare zelluläre Signalwege besitzt vergeht mindestens ein Jahr.

1.2.2 Primäre Knochenheilung

Die primäre oder direkte Knochenheilung kommt nicht so häufig vor und tritt auch oft parallel zur sekundären Knochenheilung in Erscheinung. Die primäre Knochenheilung erfordert immer eine anatomische Rekonstruktion des Knochens und einen direkten, kortikalen Kontakt. Es ist keine Bewegung zwischen den Fraktarenden erlaubt. Das erfordert eine absolute Stabilität, welche oft durch Plattenosteosynthese oder Zugschrauben erreicht wird. Daraus entsteht die osteonale, nicht kallusformierende Knochenheilung (Shapiro, 1988). Allerdings ist es in den meisten Fällen nicht möglich, dass die beiden Knochenenden über die gesamte Frakturoberfläche Kontakt haben. Es kommt zwischen den Enden immer zu kleinen Spalten mit der Folge, dass die primäre Knochenheilung histologisch in zwei Bereiche aufgeteilt wird. Hier wird zwischen der Kontaktheilung (contact healing) und der Spaltheilung (gap healing) unterschieden (Schenk, 1975).

1.2.2.1 Kontaktheilung

Die Kontaktheilung erfolgt nur, wenn der Frakturspalt nicht größer als 0,01 mm ist. Wichtig ist, dass die Kortex beider Fraktarenden Kontakt miteinander haben, damit eine mechanische Kontinuität besteht. Es entsteht eine lamelläre Knochenneubildung, die auch internes Remodeling genannt wird.

Osteoklasten, welche in den Osteonen der Knochen liegen, bauen Kanäle, bzw. longitudinale Hohlräume in die anliegenden Knochen (bis zu 50–100 µm/Tag) auf und Osteoblasten bilden neue Knochensubstanz (Osteoid). Dies ermöglicht eine direkte osteonale Überbrückung und ein neu etabliertes Havers System. Durch die Kanäle des Havers System können neue Gefäße einwachsen, was zum Remodeling in lamellären Knochen führt (Einhorn, 1998; Shapiro, 1988; Marsell and Einhorn, 2011).

1.2.2.2 Spaltheilung

Die Spaltheilung ist ein zweistufiger Prozess. Zuerst kommt es zur Bildung von ungerichteten, geflechtartigen Knochen im Frakturspalt, welcher nicht größer als 800 µm sein darf (sonst kommt es zur sekundären Knochenheilung). Anschließend wird der Knochen umstrukturiert. Er wird in gerichtete, longitudinale Osteone umgewandelt, durch die eine Revaskularisierung, wie bei der Kontaktheilung, ermöglicht wird. Es gelangen neue Osteoprogenitorzellen in den Spalt und können den gesamten Frakturspalt mit neuem, lamellären Knochen ausfüllen und organisieren (Hoerth et al., 2014; Shapiro, 1988).

1.2.3 Einfluss des Periosts

Das Periost lässt sich elektronenmikroskopisch in drei Zonen einteilen. Die erste Zone liegt direkt oberhalb des Knochens und besteht aus Osteoblasten und Osteoprogenitorzellen. Die zweite Zone ist sehr lichtdurchlässig und enthält viele Kapillare. Die dritte Zone ist eine klassische Faserschicht mit vielen Fibroblasten und Kollagenfibrillen (Squier et al., 1990). Anatomisch wird das Periost in zwei Schichten eingeteilt. Die innere Schicht wird als das zellreiche Kambium zusammengefasst und die Äußere ist eine zellarme Faserschicht (Allen et al., 2004).

Aufgrund seiner zellreichen Potenz dient die Knochenhaut als Zell-Quelle für die Knochenregeneration und scheint ein wichtiger Faktor bei der Knochenheilung von kritischen Defekten zu sein. Durch das große Reservoir an mesenchymalen Stammzellen und Osteoprogenitorzellen besitzt es eine wichtige Rolle in der Knochenregeneration und Formation (Arnsdorf et al., 2009; DeBari et al., 2008; Yu et al., 2010). Das Periost reagiert bereits sehr früh bei der Knochenheilung und es kann bereits 24-48 Stunden nach der Fraktur eine verstärkte Zellproliferation und Verdickung des Periosts festgestellt werden (Lu et al., 2005). Dieser Prozess wird die Periostaktivierung genannt und darauf folgend ist ein großer Teil der MSC aus dem Periost für die Bildung des

späteren Kallus und Knorpels mitverantwortlich. Andere Zellen aus dem Endost und dem Knochenmark verweilen überwiegend dort und immigrieren nicht (Colnot et al., 2009). Des Weiteren sind auch Stammzellen aus den Muskeln und Fettgewebe und Perizyten aus den Blutgefäßen an der Kallusbildung beteiligt (Colnot et al., 2012). Grcevic et al. (2012) konstantiert, dass viele Kalluszellen von *smooth muscle actin-9* positiven Zellen abstammen und geht davon aus, dass diese Zellen durch lokale Gefäße in das Frakturgebiet gespült werden. Die zahlreichen Kapillaren, welche in dem Periost liegen, sind Voraussetzung für eine schnelle Regeneration.

1.2.4 Einfluss der Makrophagen

Die Makrophagen bilden sich aus den im Knochenmark gebildeten Monozyten, welche im Blut zirkulieren und in alle Gewebe infiltrieren können. Dort können sie als residente Gewebsmakrophagen verweilen oder sie migrieren als Makrophagen in entzündliches oder verletztes Gewebe.

Die residenten Gewebsmakrophagen befinden sich auch im Periost, wie auch im Endost und werden dort als *osteomacs* bezeichnet. Sie besitzen ein sehr komplexes und adaptives Transkriptom und exprimieren viele Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine, proteolytische Enzyme und viele Oberflächenrezeptoren (Murray et al., 2011). Das macht es den Makrophagen möglich, sich schnell an Veränderungen in der Mikroumgebung anzupassen. Somit treten die Makrophagen oft in unterschiedlichen Phänotypen in Erscheinung, was die Differenzierung der Subtypen erschwert.

Chang et al., (2008) konnte in einem Mausmodell zeigen, dass die residenten Gewebsmakrophagen im Knochen für die physiologische Homöostase der Knochen, insbesondere für die Aufrechterhaltung der Osteoblastenfunktion und für einen effizienten Mineralisationsprozess erforderlich sind.

Die Makrophagen, welche in entzündliches oder verletztes Gewebe migrieren,

unterscheiden sich in M1 und M2 (a,b,c) Zellen. Die M1 Zellen sind proinflammatorische Zellen, welche Fremdkörper und Noxen phagozytieren. Die M2 Zellen sind an Wundheilungsprozessen, an der Regeneration von Gewebe und der Angiogenese beteiligt (Mosser et al., 2008).

In Knock-Out Mäusen konnte gezeigt werden, dass es durch das Fehlen von Makrophagen zu einer Osteopenie kommt. Es entsteht eine Hemmung des Knochenwachstums, sowie eine progressive Osteoporose (Vi et al., 2015; Cho et al., 2015). Darüber hinaus blieb in einem anderem Mausmodell die Osteoinduktion bei der Verwendung von Tricalciumphosphat (β -TCP) durch die Hemmung der Makrophagen komplett aus (Davison et al., 2014). Diese Studien belegen die Wichtigkeit der Makrophagen bei der Konsolidierung von Knochen.

An der Knochenheilung sind alle Makrophagen-Formen beteiligt und sie besitzen einen entscheidenden Anteil an dessen Regulierung. Speziell bei aktiver Knochenneubildung lässt sich ein Anstieg der Makrophagenpopulation feststellen. (Alexander et al., 2011).

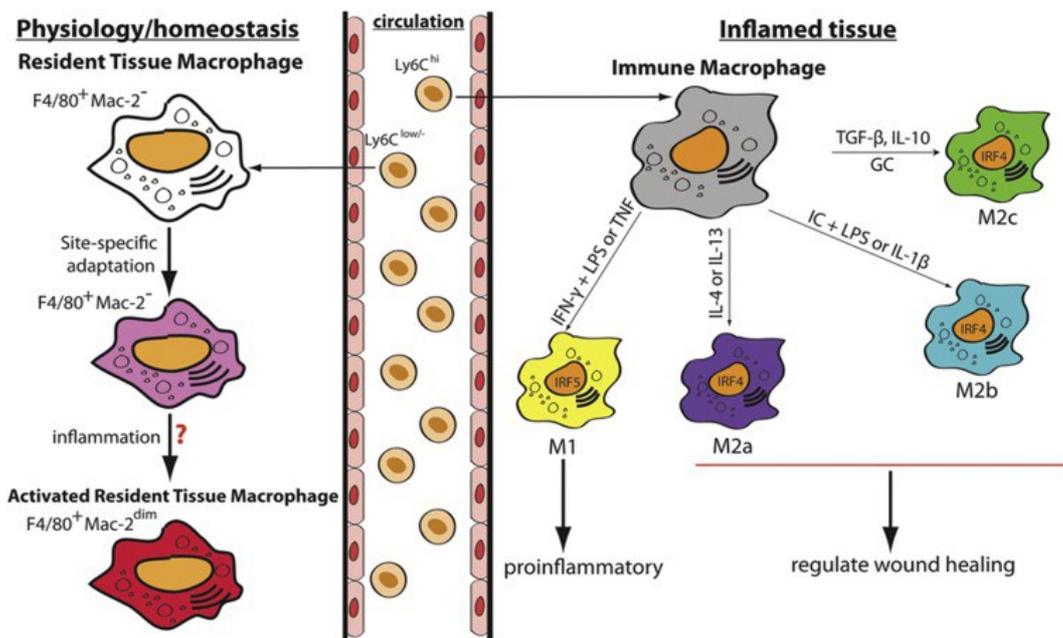


Abbildung 1: Makrophagen Differenzierungsschema nach Wu et al. (2013)

1.3 Critical Size Defect

Ein *critical size defect* (CSD) ist definiert als kleinster Knochendefekt, der im natürlichen Verlauf des Lebens, ohne Intervention nicht wieder spontan verheilt (Spicer et al., 2012). Allgemein lässt sich sagen, dass der Defekt als kritisch zu bezeichnen ist, sobald er die 2 bis 2,5-fache Länge des Durchmessers des Knochens besitzt. Um solche Defekte zu kurieren ist es erforderlich, Membranen zu konstruieren oder zu induzieren und diese in Kombination mit autologen Knochen oder anderen geeigneten Knochenersatzstoffen aufzufüllen. Wichtig zu erwähnen ist, dass sich der CSD nur durch die Größe des Defekts definiert. Er ist daher von anderen Modellen zu unterscheiden. Denn es gibt noch weitere Faktoren, die die Knochenheilung kritisch machen, wie z.B. die anatomische Lage der Fraktur, das Alter des Patienten, metabolische und systemische Vorerkrankungen sowie assoziierte Komorbiditäten des Patienten (Spicer et al., 2012; Fayaz et al., 2011; Cooper et al., 2010).

1.3.1 Therapie von Knochendefekten

Defekte, die kleiner als 6 cm sind und adäquate Unversehrtheit des umliegenden Gewebes aufweisen, werden mit konventionellen Nägeln, Platten oder mittels Fixateur externe therapiert. Bei Defekten > 6 cm und stark beschädigtem Weichteilgewebe, wie etwa schwerwiegenden Muskel- und Nervenläsionen, kann die Amputation diskutiert werden. In Fällen, in denen das umliegende Weichteilgewebe nicht verletzt ist, ist als Goldstandard der Therapie die ASP anzuwenden. Oft wird die ASP in Kombination mit einer Kallusdistraction (Ilizarov-Technik) benutzt, wodurch der im Periostschlauch gebildete Kallus distrahiert wird, so dass sich erneut ein Röhrenknochen bilden kann (Fayaz et al., 2011).

Nach der Transplantation füllt die ASP zuverlässig die Defektstelle und gibt der

Fraktur, abhängig von Defektgröße, Chipgröße und Qualität, eine gute Anfangsstabilität (Kneser et al., 2006). Gleichwohl erfüllt die ASP alle biologischen Erfordernisse, welche im *tissue engineering* an ein Transplantat gestellt werden: die osteogene, osteoinduktive und osteokonduktive Eigenschaft. Osteogen bedeutet, sie beinhaltet lebende Zellen, welche zu knochenspezifischen Zellen differenzieren können. Osteoinduktiv heißt, dass lokal Zellen zur Differenzierung zu Osteoblasten stimuliert werden und somit positiv die Knochenheilung beeinflusst wird. Osteokonduktive Materialien dienen als Leitstruktur für den neu entstehenden Knochen (Lichte et al., 2011).

Alldem ungeachtet ist die Menge von autologen Knochenersatzstoffen sehr begrenzt und es kommt zu enormen Entnahmemorbiditäten. Die Häufigsten sind Blutungen, Hämatome, Nervenläsionen, Infektionen und chronische Schmerzen. Des Weiteren besteht immer die Gefahr der Transplantatresorption sowie Nekrose.

Entscheidend für das Ausmaß der Entnahmemorbidität ist die Chirurgische Technik mit der das Transplantat entnommen wird (was auch Auswirkungen auf die Einheilung des Transplantats hat) und natürlich die Menge/das Volumen der zu entnehmenden Spongiosa. Die größten Mengen können aus dem hinteren Beckenkamm (30 cm^3) und aus dem Tibiakopf ($25\text{--}70 \text{ cm}^3$) entnommen werden (Dimitriou et al., 2011; Tjardes et al., 2012; Giannoudis et al., 2011).

Die Weiterentwicklung der Entnahmetechnik durch den „Reamer aspirator irrigator“ (RIA) hat zu einer Reduzierung der Komorbiditäten und zu einer erhöhten Menge, bis zu 90 cm^3 an verfügbarer Spongiosa geführt. Mit dieser Technik kann das beim Markraumbohren entstehende Bohrmehl herausgefiltert werden, welches über einen hohen Anteil an osteogenen und osteoinduktiven Substanzen (MSC, VEGF, BMP-2, PDGF usw.) verfügt. Jedoch sind die Techniken, vor allem für große Defekte noch nicht ausreichend und vollends ausgereift (Dimitriou et al., 2011; Tjardes et al., 2012).

Des Weiteren gibt es die Möglichkeit bei größeren Defekten die autologen Knochenersatzmaterialien mit anderen Knochenersatzmaterialien zu kombinieren,

um die Menge des körpereigenen Knochengewebes für die Rekonstruktion zu vermindern (Kneser et al., 2006).

Nichtsdestoweniger ist die Verfügbarkeit von Transplantaten in Qualität und Quantität eingeschränkt und bietet ein großes Feld zur Forschung.

1.3.2 Masquelet-Technik

Die Masquelet-Technik beschreibt ein operatives Verfahren zur Rekonstruktion von Defekten bis zur Länge von 25 cm. Weltweit genießt das operative Verfahren steigendes Interesse und wird zunehmend praktiziert, insbesondere in Frankreich. Es können somit weitaus größere Defektstrecken als bisher geschlossen werden und die klinischen Studien sind diesbezüglich vielversprechend. Alle Studien sind in Bezug auf die Knochenheilung und Gliedmaßenfunktion sehr zufriedenstellend - beim Menschen, sowie im Tiermodell. Obendrein konnte bei komplizierten Fällen gute Ergebnisse erzielt werden. Beispielsweise ist der erfolgreiche Behandlungsverlauf nach Tumorresektion bei einem 12 Jahre alten Mädchen mit einem 16cm langen Defekt, nach multiplen Schusswunden im Mittelfuß oder nach langwierigen Osteomyelitiden publiziert (Biau et al., 2009; O'apost et al., 2012; Huffman et al., 2009; Wong et al., 2014).

Die Auswahl der Patienten ist entscheidend für das Outcome. Komorbiditäten bei den Patienten sowohl in Anzahl und Schweregrad gehen mit einer erhöhten Komplikationsrate (z.B. Gefäßthrombosen, Pseudoarthrosen usw.) einher. Allerdings besitzt diese Technik für die Klinik zwei entscheidende Vorteile: sie ist kostengünstig und weitestgehend unkompliziert (Giannoudis et al., 2005).

1.3.2.1 Operatives Verfahren

Dieses Verfahren, welches erstmals von Masquelet beschrieben wurde, besteht aus zwei operativen Eingriffen. Bevor man mit dem ersten Schritt anfängt, muss man das umliegende Weichteilgewebe begutachten und gegebenenfalls zuerst

therapieren, z.B. mit einer freien Lappenplastik. Wenn das Weichteilgewebe intakt ist, kann man mit der ersten Stufe beginnen. Sie besteht aus einem radikalen Debridement im Defektbereich. Dabei sollte gewissenhaft gereinigt werden und jedes infizierte, nekrotische oder nicht vaskularisierte Gewebe entnommen werden. Die in den Defektraum endenden Knochen sollten unversehrt und gut vaskularisiert sein. Anschließend erfolgt die überbrückende Frakturstabilisierung bzw., die knöchernen Defektüberbrückung mittels Fixateur externe, einer Schraubplatte oder mit Marknägeln. Lokalisation und Länge des Segmentes bestimmen das operative Verfahren (Mauffrey et al., 2015; Gouron et al., 2013). Daraufhin folgt die Implantation von einem Polymethylmethacrylat (PMMA) Zementspacer zwischen den Knochenenden. PMMA besteht in der Regel aus einer Flüssigkeit und einem Pulver, welches vermischt zu einer modellierbaren Masse wird und innerhalb von 10 Minuten durch exotherme Polymerisation aushärtet. Der Zementspacer erfüllt als Fremdkörper mehrere Rollen: Zum einen eine mechanische Rolle, er verhindert die Akkumulation von fibrinösem Gewebe im Frakturspalt und dient als Platzhalter (Spacer) für das Knochentransplantat. Zum anderen erfüllt er eine biologische Rolle. Im Rahmen einer Fremdkörper-Reaktion wird um den Zementspacer herum die Bildung einer fibrinösen Abkapselungsmembran induziert. Diese Membran ist hypervaskularisiert, biologisch aktiv, aber weitestgehend impermeabel. Darüber hinaus kann der Zement als Antibiotikaträger dienen. Das ist besonders bei Patienten mit einer hohen komorbiden Belastung nötig (Giannoudis et al., 2011). Des Weiteren sollte der Zement-Platzhalter etwas größer gestaltet werden, als der zu rekonstruierende Knochen, dadurch lässt sich später die induzierte Membran besser ablösen.

Es ist auch sinnvoll das umliegende Weichteilgewebe für die Zementapplikation vorzubereiten und dieses z.B. mit halb longitudinal geöffneten 50 ml Spritzen über die Knochenenden hinaus auszukleiden. Dies ist zu einem hilfreich für die Applikation und auch protektiv für das umliegende Gewebe. Zusätzlich sollte der Zement-Platzhalter während der Aushärtung mit NaCl-Lösung gekühlt werden, um Gewebnekrosen zu vermeiden. Die Spritzenteile sollten nach der

Aushärtung wieder entfernt werden (Gouron et al., 2013; Mauffrey et al., 2015). Damit ist der erste Operationsschritt beendet und die Weichteilschichten können nacheinander vernäht werden.

Nach dem ersten Schritt kommt es innerhalb von circa 2 Monaten zur Membraninduktion und einer Heilung des umliegenden Weichteilgewebes. Das bietet nun die passenden Voraussetzungen für die zweite operative Stufe. Es sollte möglichst genau der gleiche Zugang verwendet werden wie im ersten operativen Schritt. Die Membran wird longitudinal geöffnet und der Zementspacer wird vorsichtig entfernt. Dazu muss der Zement oft zergliedert werden, wobei besonders darauf geachtet werden muss, dass die Membran unversehrt bleibt. Sobald der Zement entfernt ist, sollte ein Hohlraum begrenzt durch eine glänzend rote und vaskularisierte Membran vorhanden sein (Gouron R, 2015). Die Knochenenden müssen angefrischt werden und der Markraum sollte eröffnet sein, damit der Knochen und die Knochenmarkzellen mit den Transplantat interagieren können. Daraufhin wird der Defektraum innerhalb der Membran mit einem Knochentransplantat aufgefüllt. Meistens wird dazu die autologe Spongiosaplastik, eigenständig oder in Kombination mit einem Knochenersatzmaterial verwendet. Bei großen Defekten kann die „Reamer aspirator irrigator“ zur Anwendung kommen. Die Membran wird vorsichtig zugenäht, um den Defektraum rundum zu verschließen. Die verbliebenen Weichteilschichten werden nacheinander in Schichten zusammengenäht (Giannoudis et al., 2011; Pelissier et al., 2004; Karger et al., 2012; Mauffrey et al., 2015).

1.3.2.2 Die induzierte Membran

In der Literatur wird die induzierte Membran als eine 1-2 mm dicke Membran beschrieben, mit ähnlichen osteoinduktiven Eigenschaften wie das Periost, die günstige Voraussetzungen für die Knochenheilung schafft (Masquelet et al., 2000). Eine Studie im Schafmodell zeigt, dass die Membran alleine nicht in der Lage ist Knochen zu heilen. Allerdings wenn autologe Spongiosa in die Membrantasche transplantiert wird, konnten alle Defekte ausheilen (Viateau et al., 2006). Masquelet et al. (2000) legt die Membran als impermeabel dar, was

das Knochenransplantat vor Resorption schützt. Des Weiteren wird durch die Membran die Vaskularisierung des Transplantats gesteigert. Somit fördert es die Konsolidierung des Knochens im Defektraum.

An einem Hasenmodell werden die histologischen und biomechanischen Eigenschaften der induzierten Membran geschildert, wozu PMMA in eine subkutane Tasche injiziert wurde. Die induzierte Membran stellt sich hypervaskularisiert dar, was einhergeht mit einer erhöhten Synthese von VEGF. Überdies ist eine signifikant erhöhte Produktion vom Wachstumsfaktor TGF- β 1 und BMP-2 festgestellt worden. Zusätzlich konnte durch die Membran eine hohe Aktivität der Alkalischen Phosphatase in den HBMSC (*human bone marrow stroma cells*) konstatiert werden, die aus der Membran kultiviert werden konnten. Die erhöhte Enzymaktivität beweist eine gesteigerte Zellproliferation und Zelldifferenzierung zu knochenbildenden Zellen (Pelissier et al., 2004).

Henrich et al. (2016) vergleicht in einem Ratten-CSD-Modell die biologische Aktivität der induzierten Membran im Defektraum mit einer Membran induziert in einer subkutanen Tasche. Nach zwei Wochen weist die Membran im Defektraum eine höhere VEGF Expression und eine niedrigere zelluläre Dichte als die subkutan induzierte Membran auf. Des Weiteren konnten mesenchymale Stammzellen in der Membran im Defektraum festgestellt werden, welche subkutan nicht nachweisbar waren. Obendrein ist in diesem Rattenmodell zwischen der 2 und 4 Woche nach Zementapplikation die höchste osteogene und neovaskuläre Aktivität ermittelt worden, welche in folgenden Wochen abnimmt. Diese Erkenntnis deckt sich mit anderen Studien, z.B. Pelissier et al. (2004). Daher ist anzunehmen, dass der zweite Operationsschritt der Masquelet-Technik früher durchgeführt werden sollte, um eine bessere Knochenheilung zu erhalten.

Außerdem wurden im Schafsmodell CBFA1 positive Zellen in der Membran konstatiert. Dies deutet darauf hin, dass die Membran als Lager für Osteoprogenitorzellen dient. Diese Eigenschaft in Verbindung mit einem osteokonduktiven Transplantat bietet sehr gute Voraussetzungen für eine gute

Knochenregeneration (Viateau et al., 2006).

Zusammengefasst ist die Membran hypervaskularisiert, impermeabel und biologisch aktiv. Sie schützt das Knochentransplantat vor Resorption und sekretiert viele osteoinduktive Wachstumsfaktoren, wie VEGF, TGF- beta 1 und BMP-2. Dadurch fördert sie die Vaskularisierung sowie die Konsolidierung des Knochens im Defektraum.

1.4 bone tissue engineering

Im *tissue engineering* (TE) wird sich auf die Wiederherstellung und Bewahrung von Form und Funktion bei Gewebeschäden durch die Kombination von Gerüsten mit vitalen Zellen konzentriert. Das *bone tissue engineering* (BTE) beschäftigt sich mit der Rekonstruktion von Knochen und des umliegenden Gewebes. Ein besonderes Augenmerk wird hier auf den CSD gelegt, der immer noch eine große Herausforderung in der chirurgischen Therapie darstellt (Hollinger J et al., 1996). Es stellen sich die Fragen: Wie lässt sich die besondere Fähigkeit des Knochens zur spontanen Regeneration und Remodellierung auf eine kritische Defektgröße übertragen? Was sind die Voraussetzungen für eine Wiederherstellung der Knochenintegrität?

Dazu ist besonders eine gute Vaskularisierung sowie gesundes, umliegendes Gewebe nötig, um die erforderliche Interaktion zwischen den intra- und extrazellulären Bestandteilen des Gewebes zu ermöglichen. Darüber hinaus braucht es einen Ersatzstoff, welcher den kritischen Bereich ausfüllt und einige biologische Ansprüche erfüllt. Im BTE wird meistens die Kombination von Osteoinduktivität, Osteokonduktivität und Osteogenität angestrebt.

Osteoinduktivität beschreibt die Mobilisierung von undifferenzierten und pluripotenten Zellen im Frakturspalt und deren Stimulation zur Differenzierung in reife, knochenbildende Zellen. Hierfür sind einige Proteine, Wachstumsfaktoren und Zytokine zuständig. Die Osteokonduktivität bezeichnet die Eigenschaft des Materials als Leitstruktur zu dienen, an der sich neuer Knochen bilden kann. Das kann z.B. die Oberfläche und die Poren des Knochenersatzstoffes sein. Die Osteogenität bezieht sich auf das Vorhandensein von Zellisolaten, welche die Fähigkeit besitzen in knochenbildende Zellen auszureifen – *de novo* Knochen zu bilden. Sie werden entweder transplantiert oder wandern durch osteoinduktive Faktoren ein (Lee et al., 2009; Williams DF et al., 1987; Albrektsson T. et al., 2001).

Dessen ungeachtet muss der Ersatzstoff auch grundlegende, fundamentale

Eigenschaften aufweisen. Er muss im klinischen Alltag risikoarm anwendbar, gut prognostizierbar und ausreichend reproduzierbar sein (Shrivats AR et al., 2014).

1.4.1 Diamantenkonzept

Im BTE sind bisher nur die osteoinduktiven Faktoren, wie die Wachstumsfaktoren und Zytokine, die osteokonduktiven Materialien und die osteogenen Zellen, wie die MSCs, beachtet worden. Diese Eigenschaften werden oft als Dreieck dargestellt. Giannoudis et al. erklärte, dass der mechanischen Stabilität mehr Bedeutung geschenkt werden muss. Er vertritt den Standpunkt, dass die mechanische Stabilität als vierte Entität anerkannt werden soll und beschreibt das im Diamantenkonzept (Abb.2). Denn die mechanischen Begebenheiten des Knochendefekts, in welchen das Transplantat eingebaut wird, haben mindestens die gleiche Wertigkeit wie die biologischen Eigenschaften des zu implantierenden Materials. Obendrein ist die Reifung vom Geflechtknochen zum lamellären Knochen von der mechanischen Stabilität, der Vaskularisierung und der Qualität und der Dichte des Spenderknochens abhängig (Giannoudis et al., 2007; Giannoudis et al., 2008).

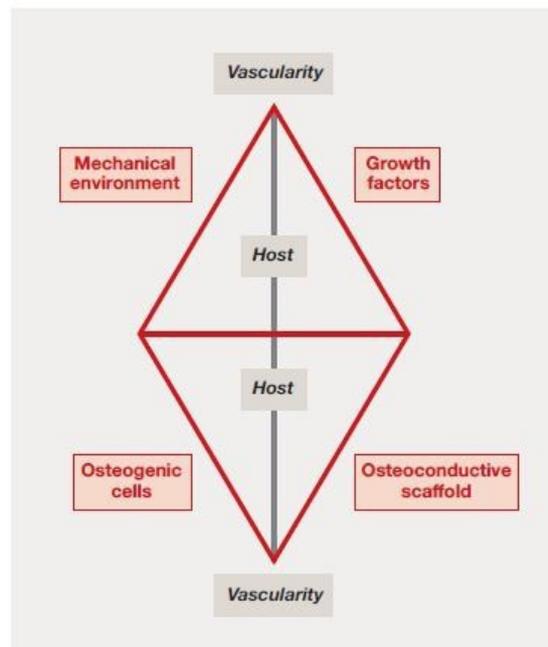


Abbildung 2: *Diamond Model of Bone Fracture Healing Interactions*
(Giannoudis et al., 2007)

1.4.2 Knochenersatzmaterialien

Alternativ zur autologen Spongiosaplastik (ASP) gibt es zahlreiche, in Studien getestete Knochenersatzmaterialien. Diese kann man grob in zwei Gruppen einteilen: organische und anorganische Materialien. Zudem versucht man die Materialien zu kombinieren und erhält somit die sog. "Composites". Der große Vorteil der Biomaterialien ist: eine hohe Verfügbarkeit und keine Entnahmemorbidity.

Da eine große Vielfalt an Materialien und Kombinationen besteht, sind hier nur die größten Gruppen aufgeführt:

1.4.2.1 Anorganische Knochenersatzmaterialien

- Anorganische Materialien sind allgemein als Zemente und Keramiken bekannt, welche sich vor allem durch das Aushärtungsverfahren und deren Anwendung unterscheiden. Die Basis der Stoffe bilden

Kalziumphosphate, Kalziumsulfate, bzw. Hydroxylapatite.

- **Keramiken:** Die meist verbreitetsten Knochenersatzstoffe sind die Kalzium-Phosphat(CaP) Keramiken. Jedoch gibt es viele Verschiedene wie die Hydroxylapatit (Hap), Trikalzium-Phosphat (TCP) und biphasische Kalzium-Phosphat (BCP) Keramiken. Kalzium-Phosphat Keramiken haben eine hervorragende Biokompatibilität und gute Bioaktivität. Da sie dem anorganischen Anteil des Knochens (2/3 des gesamten Knochens) sehr ähnlich sind, verbinden sie sich mit dem Knochen und verbessern somit die Gewebekonstruktion. Somit sind sie insbesondere osteokonstruktiv: es bildet sich Geflechtknochen an der Oberfläche ohne eine trennende Zwischenschicht. Im Verlauf des Prozesses entsteht Lamellenknochen (Lichte et al., 2011). Allerdings ist für die Gewebeintegration und die Knochenneubildung nicht nur die Zusammensetzung des Materials, sondern auch die Größe der Keramikstücke wichtig. Mit der Größe verändert sich unter anderem die Gesamtoberfläche der Keramikstücke, die mechanische Stabilität der Fraktur und die Leerfläche des Defekts. Des Weiteren kommt der Porengröße, der Porosität und den Porenverbindungen (sog. *pore interconnection*) eine wichtige Rolle in der Qualität der Gewebeintegration zu (Karageorgiou and Kaplan, 2005). Die Porosität soll dem menschlichen Knochen entsprechen und zudem als Porengröße idealerweise eine Größe von 300–500µm haben (Kühne et al., 1994). Dagegen sinkt die mechanische Stabilität der Fraktur durch zunehmende Porosität und Resorbierbarkeit der Keramik (Hoppe et al., 2011).
- **Biogläser:** Biogläser bestehen aus sauren Oxiden (z.B. Phosphorpentoxid, Siliciumdioxid und Aluminiumoxid) und basischen Oxiden (z.B. Calciumoxid, Magnesiumoxid, Zinkoxid) (Lichte et al., 2011). Sie verfügen über eine wesentlich höhere mechanische Stabilität im Vergleich zu den Kalzium-Phosphat Keramiken. Allerdings sind sie

sehr schlecht formbar und zerbrechen leicht. Durch die geringe Porosität verbinden sie sich schlechter mit dem Knochen wie die Keramiken (Giannoudis et al., 2005).

1.4.2.2 Organische Knochenersatzmaterialien

- **Allogene Knochentransplantate:** Die allogenen Knochentransplantate stellen nach dem heutigen Therapieverfahren die zweite Wahl des Chirurgen dar. Die Transplantate sind vom Spender und Empfänger genetisch nicht identisch. Allerdings steht viel mehr Material zu Verfügung und es werden nur frisch eingefrorene und gefriergetrocknete Produkte verwendet (Ehrler and Vaccaro, 2000). Es besteht die Gefahr bei allogenen Knochentransplantaten Krankheiten und Infektionen zu übertragen. Das kann durch eine chemische Aufbereitung reduziert werden, aber darunter kommt es auch zu einer Senkung der biologischen und mechanischen Eigenschaften. Die aufbereiteten Stoffe verfügen nur noch über eine sehr schwache osteoinduktive Fähigkeit (VandeVord et al., 2005; Keating and McQueen, 2001). Dennoch sind allogene Transplantate komplett biokompatibel und sie vereinen alle Eigenschaften die ein Knochen(ersatz)stoff haben sollte.
- ***Demineralized bone matrix* (DBM):** DBM kann durch eine Dekalzifikation von allogenen oder xenogenen (tierisches Material auf Menschen) Knochen produziert werden. Dieser Prozess reduziert unter anderem die Infektionsgefahr und die immunologische Antwort des Empfängers. Die daraus zurückbleibende Knochenmatrix besteht aus dem ursprünglichen Kollagengerüst des Knochens und kann als biologisches osteokonduktives Transplantat verwendet werden (Ludwig and Boden, 1999). Allerdings sind die klinischen Ergebnisse nicht einheitlich gut, was den ungleichmäßigen Verarbeitungsmethoden zugeschrieben wird (Giannoudis et al., 2005). Allerdings bleiben verschiedene Proteine an der Knochenmatrix haften, wie z.B. die BMP. Somit bleibt ein Teil der osteoinduktiven Komponente des Knochens

erhalten (Keating and McQueen, 2001).

- Polymere: Die Polymere besitzen, bedingt durch ihre Biokompatibilität und gute Degradierbarkeit Potenzial als Knochenersatzstoff. Sie basieren auf Polyethylenglycol, Polylactid, Polyurethan und *composites*. Die am besten untersuchten Stoffe sind die Polyester, welche meistens als Bolzen, Schrauben, Nahtmaterial oder chirurgische Netze verwendet werden. Bedenken bestehen, dass Abbauprodukte (z.B. Mikrokristalle) immunologische Reaktionen hervorrufen können. Zudem aktivieren Erosionspartikel Makrophagen, was eine Osteolyse auslösen kann (Böstman et al., 2005). Bisher finden Polyester, wie auch die Biopolymere, selten klinische Anwendung. In Studien werden sie meistens in Kombination mit anderen Materialien benutzt. Die Kombination von Polymeren mit Hydroxylapatit erscheint als sinnvoll, da sie osteogene und biokompatible Eigenschaften vereinen (Laschke et al., 2010).

Type	Graft	Osteoconduction	Osteoinduction	Osteogenesis	Advantages
Bone	Autograft	3	2	2	“Gold standard”
	Allograft	3	1	0	Availability in many forms
Biomaterials	DBM	1	2	0	Supplies osteoinductive BMPs, bone graft extender
	Collagen	2	0	0	Good as delivery vehicle system
Ceramics	TCP, hydroxyapatite	1	0	0	Biocompatible
	Calcium phosphate cement (CPC)	1	0	0	Some initial structural support
Composite grafts	β -TCP/BMA composite	3	2	2	Ample supply
	BMP/synthetic composite	—	3	—	Potentially limitless supply

Score: 0 (none) to 3 (excellent). DBM: demineralised bone matrix, TCP: tricalcium phosphate, BMA: bone marrow aspirate, BMP: bone morphogenetic protein.

Abbildung 3: Knochenersatzstoffe (Giannoudis et al., 2005)

1.4.3 Herafill

Das in dieser Studie benutzte Knochenersatzmaterial gehört zu den Keramiken und ist ein Granulat in verschiedenen Größen von HERAFILL. Es wird von der Heraeus Medical GmbH (Wehrheim, Deutschland) synthetisch hergestellt und besteht aus Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat und hydrierten Triglycerid Tripalmitat als Bindungsmittel. Des Weiteren kann es auch als Antibiotikaträger fungieren und wurde diesbezüglich bereits in einer Studie getestet (Coraça-Huber et al., 2014). Darüber hinaus bestehen bisher keine weiteren Studien zu diesem Knochenersatzstoff.

1.4.4 Granulatgröße

Für die Gewebeintegration und die Knochenneubildung ist nicht nur die Zusammensetzung des Knochenersatzmaterials von Bedeutung, sondern auch die Korngröße. Mit der Größe verändert sich unter anderem die Gesamtoberfläche der Granulatkörner, die mechanische Stabilität der Fraktur und die Leerfläche des Defekts. Es gibt verschiedene Studien zum Einfluss der Granulatgröße auf das Knochenheilungsergebnis, z.B. konnte Coathup et al., (2013) an einem Schaf-Femurdefektmodell zeigen, dass die Größe von 250–500 µm *silicate-substituted calcium phosphate* Granulat förderlich für die Heilung von Knochendefekten ist. Noch kleineres Granulat führte in dieser Studie nicht zur Konsolidierung und wurde phagozytiert. Des Weiteren konnte Prieto et al., (2015) unter Verwendung von einem Allograft-Polymer-Komposit in einem Hasen-Femurdefektmodell konstatieren, dass es bei sehr kleinem Granulat (<105 µm) zu einer signifikant schlechteren Knochenheilung nach 12 Wochen kommt als bei größerem Granulat (105 – 500 µm).

1.4.5 Mononukleären Knochenmarkszellen/Bone Marrow Mononuclear Cells

Die mononukleären Knochenmarkszellen (BMC) werden durch die Dichtegradientenzentrifugation aus Knochenmark isoliert. Sie bestehen aus ca. 2–4% hämatopoetischen Vorläuferzellen (HPC). Der Anteil mutmaßlicher MSC-Vorläuferzellen beträgt ca. 0.01% (Henrich, Verboket et al, 2015). Der restliche Teil von BMC besteht aus hämatologischen, mononukleären Zellen in allen Reifungsstufen (Civin and Gore, 1993; Dimmeler and Zeiher, 2009). Der Anteil monozytärer Zellen beläuft sich auf ca. 10% (Henrich et al, Eur Cells Mater, 2018).

1.4.5.1 Zelltherapie mit mononukleären Knochenmarkszellen

Viele Studien haben bereits gezeigt, dass MSC die Knochenheilung signifikant verbessern. Weitere Studien zeigen einen positiven Effekt von endothelialen Vorläuferzellen (EPC) auf die Knochenheilung. Der beste Effekt insbesondere in Bezug auf die Gefäßneubildung und Knochenzuwachs ließ sich in Kombination von beiden Zelltypen feststellen (Seebach et al., 2012; Eldesoqi et al., 2013; Zigdon-Giladi et al., 2013). Jedoch stellt sich die Frage, ob sich der positive Effekt der MSC auf die Klinik übertragen lässt. Wenn man eine größere Anzahl an Zellen für die Klinik benötigt, muss man die Zellen für mehrere Wochen kultivieren. Eine Gefahr ist, dass man in den Kulturen genetische Fehler akkumuliert, was Krebs verursachen könnte (Rubio et al., 2005). Außerdem ist in Deutschland die Kultivierung und die darauf folgende Implantation von MSC nur unter strengen Auflagen im Rahmen von klinischen Studien möglich.

Im Gegensatz zu MSC können BMC innerhalb weniger Stunden isoliert, aufgereinigt und dem Patienten reimplantiert werden. Eine Kultivierungsphase ist nicht notwendig. Ihre Sicherheit und Wirksamkeit konnte in großen kardiologischen Studien bei Patienten mit Myokardinfarkt nachgewiesen werden (Assmus B et al, 2015).

Im Bereich der Knochenheilung konnte unsere Arbeitsgruppe ein vergleichbar

hohes osteogenes Potential von BMC im Vergleich zu der Kombination von EPC und MSC im etablierten Knochendefektmodell am Rattenfemur nachweisen (Seebach et al, 2015). Darüber hinaus konnte in einer klinischen Phase I-Studie die Verträglichkeit autologer BMC bei Patienten mit proximaler Humerusfraktur nachgewiesen werden. Das Nichtauftreten von sekundären Komplikationen, die bis zu 30% erwartbar sind, sowie die vollständige Heilung aller Frakturen legen eine klinische Effizienz der BMC im Bereich der Frakturheilung nahe (Seebach et al., 2016).

Obendrein lassen sich BMC mit Knochenersatzstoffen kombinieren. β -TCP und DBM bieten sehr gute Voraussetzungen für die Aussaat der Zellen (Henrich et al., 2015).

1.5 Fragestellung

Wie bereits beschrieben bietet der Goldstandard (die ASP) für die Therapie von langstreckigen Knochendefekten keine Zufriedenheit, weder für den Chirurgen noch für den Patienten. Unter Verwendung von BTE Techniken wird versucht ein besseres Therapiekonzept zu entwickeln. Man möchte die verschiedenen Eigenschaften, welche die ASP besitzt, durch eine Kombination von Knochenersatzmaterialien und Zellpräparaten erlangen.

Arbeiten anderer Arbeitsgruppen zeigten, dass die Granulatgröße ebenfalls einen signifikanten Einfluss auf das Knochenheilungsergebnis haben kann (Coathup et al., 2013; Prieto et al., 2015). Bezüglich des Materials Herafill sowie bezüglich der Anwendung der Masquelettechnik liegen hierzu jedoch keine Daten vor.

Ziel dieser Arbeit war es daher den Einfluss der Korngröße des Knochenersatzmaterials Herafill auf die BMC-unterstützte Therapie eines kritischen Knochendefekts unter Verwendung der induzierten Membrantechnik nach Masquelet im Knochendefektmodell am Rattenfemur zu evaluieren.

Aus dieser Zielsetzung ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Gibt es eine optimale Granulatgröße des Materials Herafill für die Knochenheilung?
- Hat die unterschiedliche Granulatgröße Auswirkungen auf den Zuwachs von Knochen?
- Hat die unterschiedliche Granulatgröße Auswirkungen auf die Vaskularisierung?

Es wurde versucht, die osteokonduktiven Eigenschaften des Knochenersatzstoffes Herafill mit der Osteoinduktivität und Osteogenität der

BMC zu kombinieren. Hierbei stellen sich die Fragen:

- Bringt die Aussaat von BMC eine zusätzliche Steigerung für die Knochenheilung unter Verwendung der Masquelet-Technik?
- Haben BMC Auswirkungen auf die Membranbildung?

Des Weiteren wurde die Masquelet Technik untersucht und die damit verbundene Vaskularisierung. Hierbei stellen sich die Fragen:

- Wie ist die Neoangiogenese in der induzierten Membran und in der Defektzone?
- Welche Zelltypen mit besonderem Fokus auf Makrophagen (M1/M2-Makrophagen) können in der induzierten Membran und/oder im Defektbereich nachgewiesen werden?
- Wie ist die Morphologie/räumliche Ausdehnung des angrenzenden Periosts im Vergleich zu der induzierten Membran?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden (immun)histologische Präparate der Knochendefekte erstellt und histomorphometrisch ausgewertet.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialliste

2-Propanol (Isopropanol)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
24-Well-Platte	Sarstedt Inc., Newton, USA
4',6-Diamidin-2-phenylindol Färbung (DAPI)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
AEC Chromogen Substrat (Labvision TA -060-HA)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Alcianblau 1%ig	Morphisto – Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt Deutschland
Alpha-SMA Antikörper	Abcam plc, Cambridge, UK
Brilliant-Crocein-Säurefuchsin	Morphisto – Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt Deutschland
C-Chip Neubauer-Zählkammer	NanoEnTek Inc., Seoul, Korea
CD-68 Antikörper	Abcam plc, Cambridge, UK
CD-80 Antikörper	Abcam plc, Cambridge, UK
CD-163 Antikörper	Abcam plc, Cambridge, UK
Einbettkassetten	Sanowa GmbH, Leimen, Deutschland
Einbettmaschine	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Eisen(III)chlorid 1%ig	Morphisto – Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt Deutschland
Elektische Pipette	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland
Eosin G 0.5% Lösung	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Erythrozytenlyse	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

2 Materialien und Methoden

Essigsäure 3%ig	Morphisto – Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt Deutschland
Ethanol 70%, 80%, 90%, 100%	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Falcon-Röhrchen	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Ficoll (Biocoll, 1,077 g/cm ³)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Observer	Zeiss Axio Carl Zeiss AG, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop BIOREVO	HS BZ-9000 Keyence GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Heraeus AG, Hanau, Deutschland
Image-J®	National Institutes of Health, Maryland, USA
Kühlschrank	Bosch AG, Stuttgart, Deutschland
Meyer's Hämatoxylin	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehydlösung(4%)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Pasteurpipetten	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
PBS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Peroxidase (Labvision TA-125-HP)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Phosphorwolframsäure 2%ig	Morphisto – Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt Deutschland
Pipetten	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Pipettenspitzen	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Polymer Raumtemperatur	anti-mouse-HRP,
Rotationsmikrotom 2335	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland
Safron du Gatinais	Morphisto – Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt

	Deutschland
Software BZ-II-Viewer/Analyser	Keyence GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland
STRO-1 Antikörper	Abcam plc, Cambridge, UK
Titriplex (EDTA Dinatriumsalz, 6381-92-6; J.T. Baker 1073, 1 Kg)	Cas: Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Trizma Base (Cas.:77-86-1; T1503-1 kg)	Sigma Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Türks Lösung	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
v. Willebrand Antikörper	Abcam plc, Cambridge, UK
Verhoeff Gebrauchslösung 1,2,3	Morphisto – Evolutionsforschung und Anwendung GmbH, Frankfurt Deutschland
Xylol	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Zink-Formalin 4%	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland

2.1.1 Material Chirurgie

Augensalbe – Bepanthen®	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Bandsäge, Gigli-Säge	
Bohrbüchsen	DePuy Synthes Companies, Zuchwil, Schweiz
Bohrer	DePuy Synthes Companies, Zuchwil, Schweiz
Chlorhexidin	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland
Heracell – Granulat	Heraeus AG, Hanau, Deutschland
Ketavet® - Ketamin	Pfizer GmbH, Berlin, Deutschland
Prolene 5.0 Faden	Ethicon, Norderstedt, Deutschland

Schrauben	DePuy Synthes Companies, Zuchwil, Schweiz
Sechs-Loch-Platte	DePuy Synthes Companies, Zuchwil, Schweiz
Sprague Dawley Ratte	Harlan Laboratories GmbH, Venray Niederlande
Vicryl-Faden 4.0	Ethicon, Norderstedt, Deutschland
Xylazin – Rompun®	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
Zement, Palacos R+G	Heraeus AG, Hanau, Deutschland

2.2 Versuchsaufbau

Bei dem Versuchsvorhaben ging es um den Einfluss der Granulatgröße des Knochenersatzmaterials Herafill und den Einfluss der BMC auf die Knochendefektheilung. Dazu wurden Sprague Dawley Ratten unter Verwendung der Masquelet-Technik operiert. Das Versuchsdesign sah 7 verschiedene Gruppen vor, die sich anhand des Transplantats unterschieden.

Den Knochenersatzstoff Herafill gab es in Form von Granulat in drei verschiedenen Größen. Gruppe 1-3 bekam das reine Granulat in unterschiedlichen Größen transplantiert. Gruppe 1 das kleine (0,5-1 mm), Gruppe 2 das mittlere (1-3 mm) und Gruppe 3 das große Granulat (3-5 mm). Zusätzlich wurden alle drei Größen mit BMC kombiniert. Gruppe 5 war das kleine Granulat mit BMC, Gruppe 6 das mittlere Granulat mit BMC und Gruppe 7 das große Granulat mit BMC. Des Weiteren gab es die Gruppe 4 als Vergleichsgruppe, in der der aktuelle Therapiestandard, die autologe Spongiosaplastik, transplantiert wurde.

Jede Gruppe umfasste 18 Tiere. Pro Gruppe waren acht Tiere für die histologischen Analysen und zehn Tiere für die biomechanischen Tests vorgesehen.

1. Tabelle: Gruppeneinteilung

Gruppe	Material	Ohne BMC		Gruppe	Mit BMC	
		Histologie	Radiologie/Biomechanik		Histologie	Radiologie/Biomechanik
G1	Herafill klein	N=8	N=10	G5	N=8	N=10
G2	Herafill mittel	N=8	N=10	G6	N=8	N=10
G3	Herafill groß	N=8	N=10	G7	N=8	N=10
G4	Syngene Spongiosa	N=8	N=10			

Spender-/Reservetiere	N= 2/2	N= 3/1		N= 2/2 + 4 Tiere für Präparation	N= 3/1 + 4 Tiere für BMC-Präparation
-----------------------	--------	--------	--	----------------------------------	--------------------------------------

2.3 Tiere – Vorbereitung/Akklimatisierung

Für dieses Tiermodell wurde die Ratte von dem Sprague Dawley Stamm (SD – Ratte) gewählt, da sie im Bezug auf die labortechnischen Immun- und Molekularmarker dem Menschen ähnlich ist.

Die Tiere wurden eigens für die Tierversuche gezüchtet und stammten von der Firma Harlan-Winkelmann (Harlan Laboratories GmbH, Venray Niederlande).

Nach der Lieferung verweilten die Tiere für mindestens eine Woche zur Akklimatisierung in den Ställen der Zentralen Forschungseinrichtung (ZFE) in Frankfurt. Die Tiere befanden sich dort in großen Käfigen mit maximal vier Tieren pro Käfig. Kurz vor der Operation wurden die Tiere in den Ratten-Operationsraum gefahren. Dort erfolgte die Narkose und die Operation.

Nach der Operation verweilten die Ratten in einem extra „Aufwachkäfig“ bis sie unter ständiger Aufsicht wieder bei Bewusstsein waren. Danach wurden sie wieder in die Ställe gebracht.

Nach dem ersten chirurgischen Eingriff blieben sie dort weitere drei Wochen bis es auf den Tag genau zum zweiten Eingriff kam.

Die Tierversuche erfolgten unter Anwendung der geltenden Tierschutzgesetzgebung und wurden durch das Regierungspräsidium in

Darmstadt genehmigt (Genehmigungsnummer: FK/K1053).

Die Versuchstiergruppen wurden nach einem vor Versuchsbeginn erstellten Randomisierungsmuster operiert.

2.4 Operationsabfolge

2.4.1 Narkose

Alle chirurgischen Eingriffe zur Defektinduktion und zur Implantierung, wurden unter Vollnarkose durchgeführt. Die Ratten wurden durch eine intraperitoneale Injektion narkotisiert. Dazu wurde in eine 10ml Spritze 0,5ml Rompun, 2ml Ketavet, sowie 9ml NaCl aufgezogen und anschließend appliziert. Die Dosis betrug 70mg/kg KG Ketavet und 10 mg/kg KG Rompun pro Tier. Nach der Injektion wurde die Ratte in ein extra Käfig gelegt bis das Narkosemittel seine Wirkung entfaltetete. Bis zur Operation wurde die Atmung der Ratte regelmäßig überprüft.

2.4.2 Operationsvorbereitung

Nach der Narkose wurden die Tiere gewogen und bekamen einen Tropfen Augensalbe (Bepanthen®) in beide Augen. Anschließend wurde das rechte, zu operierende Hinterteil der Ratte rasiert (ca.3x3cm), das Tier in Linkslage platziert und der Bereich gründlich mit Chlorhexidin desinfiziert.

2.4.3 Erster Operationsschritt nach Masquelet (Membraninduktion)

Bevor die Tiere das erste Mal operiert wurden, bekamen sie eine Markierung in das Ohr gestanzt.

2. Tabelle: Übersicht Gruppenkennzeichen

Gruppe	Kennzeichnung
G1	Kein Loch
G2	Linkes Ohr 1 Loch, rechts kein Loch
G3	Linkes Ohr 2 Löcher, rechtes Ohr kein Loch
G4	Linkes Ohr 3 Löcher, rechts Ohr kein Loch
G5	Linkes Ohr kein Loch, rechtes Ohr 1 Loch
G6	Linkes Ohr kein Loch, rechtes Ohr 2 Löcher
G7	Linkes Ohr kein Loch, rechtes Ohr 3 Löcher

Unter aseptischen Bedingungen wurde eine laterale longitudinale Inzision über dem Femur durchgeführt. Die Faszie wurde durchtrennt und die Muskulatur freigelegt. Der *musculus quadriceps femoris* und der *musculus biceps femoris* wurden stumpf voneinander getrennt und der *Femur* wurde freipräpariert. Nun wurde die 6-Lochplatte anterolateral angebracht. Dazu war es erforderlich, die Platte mit der Pinzette zu fixieren und die Bohrbüchsen auf der Platte anzubringen. Daraufhin wurden jeweils 2 Löcher an den epiphyseal liegenden Enden der Platte gebohrt, sodass die zwei zentralen Löcher in der Platte frei blieben. Dazu wurde ein 1,1 mm Bohrer benutzt. Anschließend wurde die Platte mit 4 Schrauben (1,5 x 6mm), welche in die vorgebohrten Löcher geschraubt wurden, an dem Knochen fixiert.

Danach kam es zur Osteotomie mit Hilfe einer diamantbesetzten Bandsäge (Gigli-Säge). Der Knochendefekt wurde im diaphysalen Bereich des Knochens gesetzt, wo sich die zwei unbesetzten Löcher der 6-Lochplatte befanden. Die Bandsäge wurde vorsichtig um den Knochen geführt und in die richtige Position gebracht. Nun wurde der Knochen durch kräftiges hin und her bewegen der Säge sauber durchtrennt. Der Vorgang wurde wiederholt, sodass ein ca. 10 mm großer Defekt produziert wird. Das Knochenfragment wurde entnommen und die Länge gemessen (variierte zwischen 8-11 mm). Im Anschluss erfolgte das Anmischen des Zements (Palacos R+G, Heraeus HmbH). Es wurde 1,9 g Zementpulver mit 1 ml Zementflüssigkeit in einem sterilen Plastikbehälter angerührt und daraufhin vorsichtig in den Knochendefekt als Zementspacer

eingefügt. Der überschüssige Zement wurde verworfen. Nachdem der Zement (unter NaCl Kühlung) ausgehärtet war, wurde die Wunde wieder verschlossen. Die Faszien wurden mit mehreren Einzelknopfnähten durch einen 4.0 Vicryl-Faden adaptiert und die Haut wurde durch eine fortlaufende subkutane Naht mit Hilfe eines Prolene 5.0 Faden wieder verschlossen.

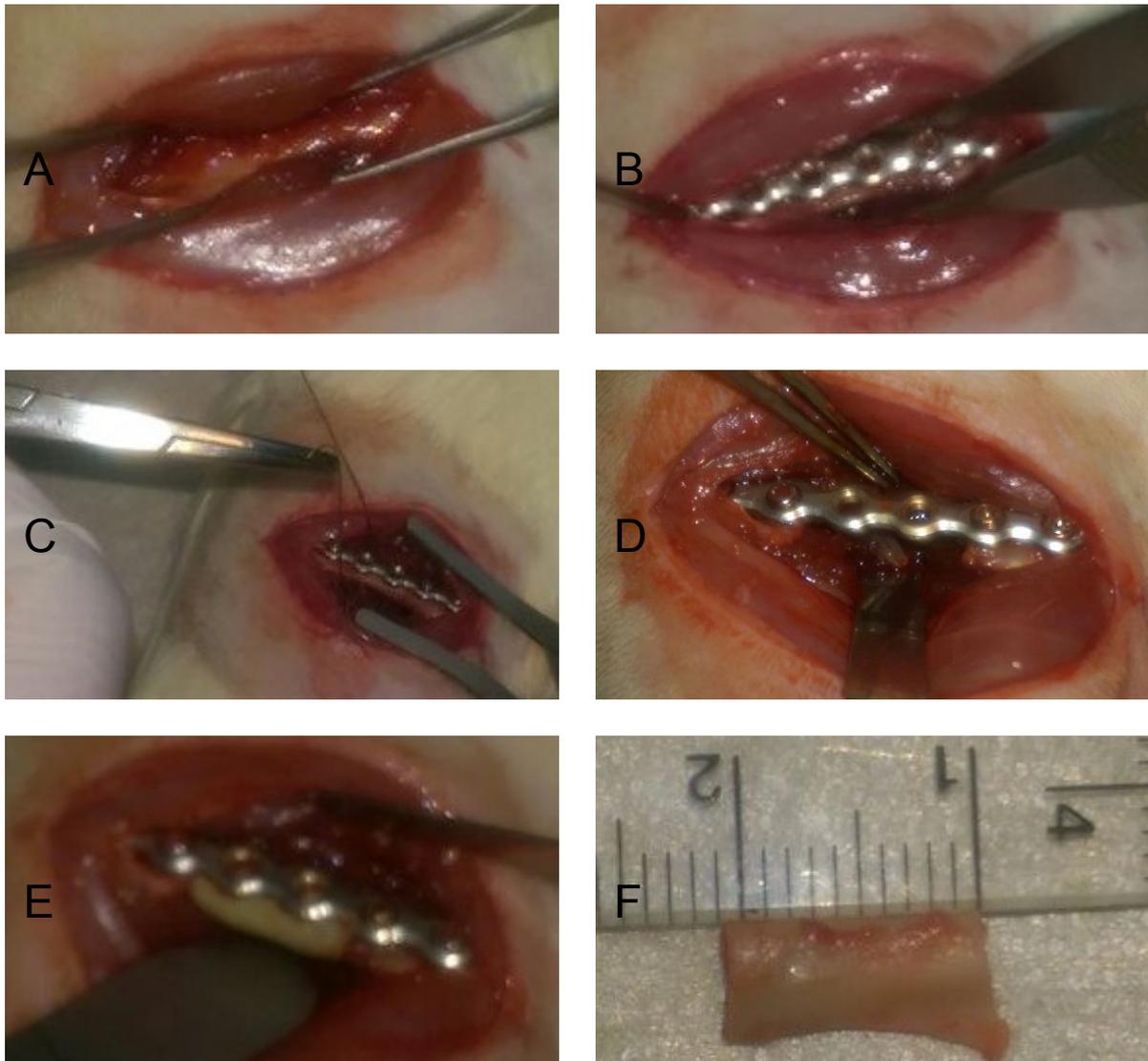


Abbildung 4: Erster Operationsschritt nach Masquelet

A) Freipräparierter Femurknochen B) Anbringung der Platte C) Herausschneiden des Defekts mit Hilfe der Gigli-Säge D) Nach Entfernung des Knochenfragments E) Anbringung des Knochenzements als Spacer E) Darstellung des herausgelösten Knochenfragments

2.4.4 Zweiter Operationsschritt nach Masquelet 38 (Auffüllen der induzierten Membran mit Herafill oder syngener Spongiosa)

Drei bis vier Wochen nach der ersten Operation erfolgte der zweite Operationschritt, in welchem die Entfernung des Zementspacers und die Auffüllung des Knochendefekts mit Herafillgranulat der verschiedenen Größenklassen (mit bzw. ohne BMC) oder syngemem Knochenmaterial durchgeführt wurde.

Die Tiere wurden identisch zum ersten Operationsschritt vorbereitet und narkotisiert. Es wurde erneut der anterolaterale Zugang verwendet und die Muskelfazie nach der Inzision stumpf durchtrennt, sodass die neu entstandene Membran zum Vorschein kam. Die Membran wurde vorsichtig longitudinal durchtrennt, wodurch der Zementspacer in Erscheinung tritt. Dieser musste nun mit Hilfe der Pinzette oder der Luer-Zange entfernt werden. Von großer Bedeutung war es, dass das umliegende Weichteilgewebe (insb. die Membran) bei diesem Schritt nicht verletzt wird. Daraufhin folgte die Anfrischung des Knochens durch das Anritzen, bzw. Kratzen mit dem Skalpell an den Knochenenden. Nun wurde die neu entstandene Membranloge mit den für die Gruppe entsprechenden Knochenersatzstoff aufgefüllt. Nach sorgfältiger Füllung der Loge wurde die Membran mit mehreren Einzelknopfnähten (4,0 Vicryl-Faden) adaptiert und die Haut durch eine fortlaufende, subkutane Naht mit Hilfe eines Prolene 5.0 Faden wieder verschlossen.

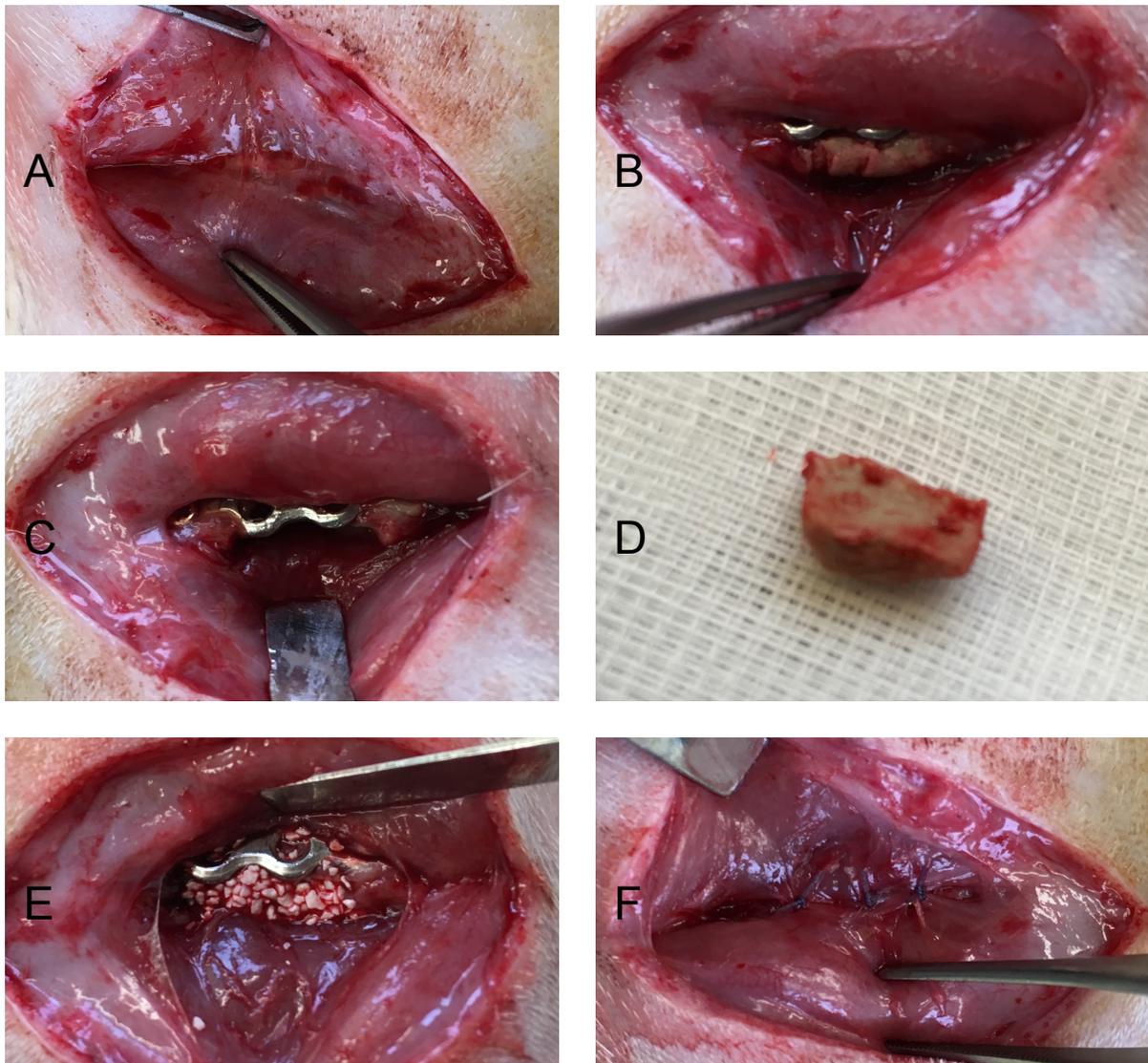


Abbildung 5: Zweiter Operationsschritt nach Masquelet

A) Vorsichtiges freipräparieren des Knochendefekts B) Öffnen der Defekttasche C) Nach Entfernung des Spacers D) Darstellung des Zementspacers E) Auffüllen der Tasche mit kleinen Granulatkörnern F) Verschluss der Membrantasche

2.4.5 Sacrifice & Lagerung

Acht Wochen nach der zweiten Operation wurden die Tiere mittels einer Überdosis Pentobarbital (500mg/kg) intraperitoneal getötet. Daraufhin wurde der operierte Femurknochen entnommen. Entsprechend der zugehörigen

Gruppe (Histologie oder Biomechanik) wurde der Knochen weiterverarbeitet.

Die Knochen, welche histologisch untersucht wurden, wurden in Einbettkassetten gelegt, beschriftet und für 22-24 Stunden in Formalin fixiert. Anschließend wurden sie in 70% Ethanol bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Die Knochen für die Biomechanik wurden in PBS-Puffer gewaschen, in eine feuchte Mullkompressen eingewickelt, in ein Gefrierbeutel verpackt, beschriftet und bis zum Beginn der Tests bei -80 °C eingefroren.

2.4.6 Herstellung von syngenen Knochenmaterial

Tiere der Kontrollgruppen erhielten syngenes Knochenmaterial als Defektfüllung. Syngenes Knochenmaterial wurde aus Femura und Tibiae gleichaltriger Spendertiere gewonnen. Die Tiere wurden durch eine Überdosis Pentobarbital (500 mg/kg KG) getötet und die Femura und Tibiae chirurgisch entfernt. Transport in PBS supplementiert mit 2% Penicillin/Streptomycin in das Labor. Dort wurden die Knochen unter sterilen Kautelen gesäubert und mittels Seitenschneider und Skalpell in ca 1 – 3mm große Stücke zerkleinert. Das Material wurde steril verpackt in die Tierversuchsanlage verbracht. Dort wurde es innerhalb von 60 min bei den entsprechenden Versuchstieren in den Knochendefekt implantiert.

2.5 Isolierung von BMC aus dem Rattenfemur

Bei der Entnahme des Femurknochen aus dem Spendertier, wurde der Knochen in ein 50ml Falcon-Röhrchen mit einer Antibiotikallösung (1 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung und 40ml PBS w/o Ca⁺⁺/Mg⁺⁺) gelegt und in das Labor transportiert.

Dort wurde unter der Werkbank mit sterilen Werkzeugen gearbeitet. Die

Knochen wurden mit einer Pinzette aus dem Falcon-Röhrchen in eine Petrischale gelegt. Über der Petrischale wurden die Kondylen mit Hilfe eines sterilen Seitenschneiders entfernt. Danach wurde das Knochenmark mittels einer 10ml Spritze und aufgesetzter Kanüle mit ca. 20 ml PBS aus der Markhöhle heraus in eine neue Petrischale gespült.

Das Knochenmark wurde zusammen mit dem PBS wiederholt aspiriert (ca. 10-20 Mal) bis eine für das Auge homogene Flüssigkeit entstand, welche anschließend in ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen pipettiert wurde. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation über 10 min bei 1500 rpm und RT.

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet durch Vibration gelockert und in 2,5 mL PBS/Femur resuspendiert.

Der nächste Schritt bestand aus der Überschichtung der Zellsuspension mit Ficoll, welches den Dichtergrad von $1,077 \text{ g/cm}^3$ haben muss. Dieser Schritt wurde sehr vorsichtig durchgeführt, da sich die beiden Flüssigkeiten nicht vermischen dürfen. Dazu wurde die elektrische Pipette benutzt und auf Ex (Auslauf) gestellt. Das Ficoll wurde im Verhältnis 1:1 mit der Knochenmarksuspension überschichtet, welche seitwärts langsam in das schräg gehaltene Falcon-Röhrchen pipettiert wurde.

Daraufhin wurde es mit den Einstellungen 25min, 1500rpm, RT, mit freiem Auslauf zentrifugiert.

Die Fraktion der mononukleären Zellen befand sich in der schmalen Interphase. Diese Fraktion wurde via Pasteurpipetten (Einwegs-1ml-Transferpipetten) abgesaugt, in ein neues Falcon-Röhrchen überführt, welches wiederum mit PBS auf 50ml resuspendiert und erneut zentrifugiert (10min, 1800rpm, Bremse) wurde.

Der Überstand wurde verworfen, der Absatz aufgelockert und erneut in PBS resuspendiert. Pro Femur wurde wie zuvor 2,5 ml PBS verwendet.

2.5.1 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurde 10 μl Zellsuspension, 90 μl Erylyse Puffer und 100 μl Türks Lösung benötigt.

Die Erythrozytenlyse-Lösung wurde für 5 Minuten auf 37 °C im Wasserbad aufgewärmt. Zunächst wurde sie mit der Zellsuspension und anschließend mit der Türks Lösung vermischt und 5 min inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe der Türkslösung. Nach Mischen mittels Vortex wurden 10 µL der Zellsuspension in eine C-Chip Einwegs-Zählkammer pipettiert und anschließend unter dem Mikroskop ausgezählt (4 Großquadrate). Die Zellzahl pro mL Zellsuspension wurde wie folgt berechnet:

Zellzahl/ml = Mittelwert gezählte Zellen x 10.000 x Verdünnungsfaktor

2.5.2 Aussaat auf das Granulat

Bei der Aussaat wurden 1 Million Zellen in einer 350 µl Zellsuspension vorsichtig und schrittweise gleichmäßig auf jeweils ca. 250 µL in individuellen Wells einer 24-Wellplatte Granulat pipettiert. Nicht absorbierte Zellsuspension wurde aspiriert und wieder über das Granulat pipettiert. Danach erfolgte eine 10 minütige Inkubation im Zellinkubator. Hieran anschließend wurde die nicht absorbierte Zellsuspension wiederum über das Granulat pipettiert, gefolgt von einer 10 minütigen Inkubation bei 37°C. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt. Das Granulat wurde steril verpackt bei RT in die zentrale Forschungseinrichtung verbracht und dort innerhalb von 60 Minuten in die jeweiligen Knochendefekte transplantiert. Pro Defekt wurde ein Granulatvolumen von ca. 200 µL benötigt. Einige Granulate wurden steril mittels Pinzette entnommen, um die Adhäsion der BMC auf dem Material nachzuweisen (siehe folgender Abschnitt).

Die Granulatmenge pro Knochendefekt wurde vorsichtig und steril unter der Werkbank in eine Bohrung einer 24-Wellplatte gegeben. Daraufhin wurde die 350 µl Zellsuspension mit einer Pipette darüber geträufelt und der Überstand wieder aufgesaugt. Dies wurde zwei weitere Male wiederholt. Anschließend wurde die 24-Well-Platte für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert.

2.5.2.1 Nachweis von BMC auf Herafill

Adhärenz der ausgesäten BMC auf Herafill wurde fluoreszenzmikroskopisch mittels DAPI-Färbung nachgewiesen. Hierzu wurden einige BMC besiedelte Granulate in ein Well einer 96-Wellplatte transferiert und für 10 min mit einer 2% Formaldehydlösung inkubiert. Die Fixierung verstärkt zum einen die Bindung der Zellen zum Granulat, und durch das Abtöten der Zellen wird die Diffusion des Farbstoffs DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) in die Zellen erleichtert. Danach wurden die Granulate 3x mit jeweils 200 µL PBS gewaschen und anschließend 5 Minuten mit einer DAPI-Lösung [1 µg/mL in PBS ohne Calcium] im Dunklen inkubiert. Nach 3 weiteren Waschschritten mit jeweils 200 µL PBS wurden die Granulate am Fluoreszenzmikroskop Axioobserver Z1 bei 50 facher und 100 facher Vergrößerung unter Verwendung des DAPI-Filters fotografiert.

2.6 Histologie

Nach den durchgeführten Operationen und dem Sacrifice müssen die Knochen zuerst entkalkt, paraffiniert und geschnitten werden, um sie histologisch färben zu können.

2.6.1 Entkalkung

Die Entkalkung der Knochen ist erforderlich damit sich die Knochen fein schneiden lassen. Zunächst wurden die Knochen, direkt nach der Entnahme, für 20-24 Stunden in 4% Zink-Formalin gegeben. Im Anschluss wurden die formalin-fixierten Knochen für mehrere Stunden fließend gewässert und in einen Schlauchverband gebunden und beschriftet. Nun wurden die Knochen in einer Entkalkungslösung angesetzt, welche pro Liter destilliertes Wasser aus 100 g Titriplex (EDTA Dinatriumsalz, Cas: 6381-92-6; J.T. Baker 1073, 1 Kg)

und 34 g Trizma Base (Cas.:77-86-1; Sigma T1503-1 kg) besteht. Wichtig war es zu kontrollieren, dass die Lösung am Ende des Mischvorgangs einen pH von 7.4 hatte. Es wurde pro Gramm Knochen mindestens 100 ml Lösung verwendet und es wurde sichergestellt, dass die Knochen in dem Glasgefäß hängen (und nicht auf dem Boden liegen). Anschließend wurden die Glasgefäße mit den Knochen bei $>37^{\circ}\text{C}$ für circa zwei Wochen auf eine Rüttelplatte gestellt. Die Entkalkungslösung wurde am ersten Tag zweimal gewechselt und im Anschluss einmal täglich. Die Kontrolle der Entkalkung fand mittels einer Nadelprobe statt und sobald der Entkalkungsprozess abgeschlossen war, wurden die Knochen erneut für mehrere Stunden gewässert.

2.6.2 Paraffinierung

Um die entkalkten Knochen in gleichmäßige, 3 μm dicke Schnitte schneiden zu können, benötigten sie Stabilität und mussten zuerst in Paraffin eingebettet werden. Dies erfolgte im Einbettautomaten.

Da Paraffin nicht wasserlöslich ist, mussten die Knochen zuerst entwässert werden. Dies geschah durch Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe (Ethanol 70%, 80%, 90%, 100%) und abschließend in Xylol. Nun konnten sie in erwärmten Paraffin eingebettet werden, wodurch das Xylol durch das Paraffin ersetzt wurde. Es entstanden um den Knochen herum Paraffinblöcke, welche nach dem Erkalten geschnitten werden konnten.

2.6.3 Anfertigung der Knochenschnitte

Zum Anfertigen der Knochenschnitte wurde ein Rotationsmikrotom benutzt. Dazu wurden die gekühlten Paraffinblöcke in eine Haltevorrichtung eingespannt und in der am Mikrotom eingestellten Dicke von 3 μm geschnitten. Das Rotationsmikrotom überträgt den Schnitt automatisch auf die Wasseroberfläche

eines gekühlten Wasserbades. Jetzt wurde der neu angefertigte Schnitt mit Hilfe eines Pinsels vorsichtig auf einen Objektträger übertragen und zur Fixierung in ein 47°C heißes Wasserbad getaucht.

2.6.4 Färbungen

2.6.4.1 Pentachrom

Die Pentachrom Färbung wurde nach Verhöff (MOVAT Pentachrom nach VERHÖFF, Art.-Nr.:12061) erstellt. Durch fünf verschiedene Farbstoffe bietet sie eine gute Differenzierung der unterschiedlichen zellulären und extrazellulären Gewebekomponenten und ist gut als Übersichtfärbung geeignet. Das Ergebnis lässt folgende Unterscheidung zu: Zellkerne blauschwarz, Muskeln rot, Grundsubstanz blau, Kollagen (Knochen) gelb, Knorpel blau-grün, elastische Fasern rot.

3. Tabelle: Pentachrom Färbungsprotokoll nach Verhöff

Schritt	Lösung/Reagenzien	Dauer/Einwirkzeit
Entparaffinieren		
1	Xylol	00:10:00
2	Xylol	00:10:00
Wässern		
3	Ethanol 90%	00:05:00
4	Ethanol 80%	00:05:00
5	Ethanol 70%	00:05:00
6	Ethanol 60%	00:05:00
7	Aqua dest	00:05:00
Vorbehandeln		
8	Essigsäure 3%ig	00:00:30
Färben		
9	Alcianblau 1%ig	00:30:00
Wässern		
10	Aqua non-dest	00:02:00
Färben der Kerne		
11	Verhoeff Gebrauchslösung	00:08:00
Beizen		
12	Eisen(III)chlorid 1%ig	00:01:00
Wässern		
13	Aqua non-dest	00:10:00
Färben Zellplasma		
14	Brilliant-Crocein-Säurefuchsin	00:06:00
Differenzieren		
15	Essigsäure 1%ig	00:00:30
Beizen		
16	Phosphorwolframsäure 2%ig	00:15:00
Differenzieren		
17	Essigsäure 1%ig	00:01:00
Entwässern		
18	Ethanol 99%	00:03:00
19	Ethanol 99%	00:15:00
Färben der Fasern		
20	Safron du Gatinais	00:15:00
Entwässern		
21	Ethanol 99%	00:02:00
22	Ethanol 99%	00:02:00
23	2-Propanol (Isopropanol)	00:03:00
24	Xylol	00:10:00
25	Xylol	00:10:00
Eindecken		
26	Eindeckmittel	

2.6.4.2 Hämatoxylin-EosinG-Färbung

Wie die Pentachromfärbung eignet sich die Hämatoxylin-EosinG-Färbung (HE-Färbung) als Übersichtsfärbung. Das Hämatoxylin färbt dabei die basophilen Bestandteile, wie z.B. die Zellkerne blau. Die azidophilen Substanzen wie das Zytoplasma und die Kollagenfasern werden durch das saure Eosin in unterschiedlichen Intensitäten rötlich angefärbt.

4. Tabelle: Hämatoxylin-Färbungsprotokoll

Schritt	Lösung/Reagenzien	Dauer/Einwirkzeit
Entparaffinieren		
1	Xylol	00:10:00
2	Xylol	00:10:00
Wässern		
3	Ethanol 90%	Kurz eintauchen
	Ethanol 90%	00:05:00
4	Ethanol 80%	Kurz eintauchen
	Ethanol 80%	00:05:00
5	Ethanol 76%	Kurz eintauchen
	Ethanol 76%	00:05:00
6	Aqua dest	00:05:00
Kernfärbung		
7	Hämatoxylin	00:10:00
8	Aqua dest	Kurz eintauchen
9	Fließend wässern	00:10:00
10	Aqua dest	00:02:00
Strukturfärbung		
11	Eosin	00:03:00
12	Aqua non-dest	00:00:30
13	Ethanol 76%	00:01:00
Entwässern		
14	2x 96% Ethanol	00:05:00
15	2x 100% Ethanol	00:05:00
16	3x Xylol	00:05:00
Eindecken in Eukitt		

2.6.4.3 α -Smooth muscle actin (α -SMA) - Färbung

Zur Darstellung der Gefäße sowie der glatten Muskulatur wurde die α -SMA Färbung angewendet. Durch die Anfärbung der glatten Gefäßmuskelzellen können etablierte Gefäße im Defektraum detektiert und quantifiziert werden.

5. Tabelle: α -Smooth muscle actin (α -SMA) – Färbungsprotokoll

Schritt	Lösung/Reagenzien	Dauer/Einwirkzeit
Entparaffinieren		
1	Xylol	00:10:00
2	Xylol	00:10:00
Wässern		
3	Ethanol 90%	Kurz eintauchen
	Ethanol 90%	00:05:00
4	Ethanol 80%	Kurz eintauchen
	Ethanol 80%	00:05:00
5	Ethanol 76%	Kurz eintauchen
	Ethanol 76%	00:05:00
6	Aqua dest	00:05:00
Demaskierung		
7	Kochen im Citrat-Puffer (pH 6,0) im Dampfgarer >100 °C	00:10:00
8	Auf Raumtemperatur abkühlen lassen	00:30:00
9	Aqua dest	00:05:00
Peroxidaseblock		
10	Peroxidase auf Schnitte auftropfen, bei Raumtemperatur	00:10:00
11	Aqua non-dest	00:05:00
12	PBS-Puffer	00:07:00
Inkubation Primärantikörper		
13	monoclonaler mouse anti-ASMA Primärantikörper	01:00:00
14	Aqua non-dest	00:05:00
15	PBS-Puffer	00:07:00
Inkubation Sekundärantikörper		
16	Polymer anti-Mouse-HRP, Raumtemperatur	00:30:00
17	Aqua non-dest	00:05:00
18	PBS-Puffer	00:07:00
Detektion		
19	ACE Substrat auftropfen und warte bis gewünschte Intensität erreicht wird	~00:10:00
20	Aqua dest	00:05:00
Kernfärbung		
21	Hämatoxylin	00:10:00
22	Fließend wässern	00:10:00
Eindecken in Serumglycerin Gelatine		

2.6.4.4 CD-68-FÄRBUNG

CD68 wird besonders von Monozyten im Blut und Gewebemakrophagen exprimiert, somit hilft es bei der Detektierung von spezifischen Zelltypen, insbesondere Makrophagen, die es an der Oberfläche der Zell-, Endosom- und Lysosommembranen exprimieren.

6. Tabelle: CD-68 Färbungsprotokoll

Schritt	Lösung/Reagenzien	Dauer/Einwirkzeit
Entparaffinieren		
1	Xylol	00:10:00
2	Xylol	00:10:00
Wässern		
3	Ethanol 90%	Kurz eintauchen
	Ethanol 90%	00:05:00
4	Ethanol 80%	Kurz eintauchen
	Ethanol 80%	00:05:00
5	Ethanol 76%	Kurz eintauchen
	Ethanol 76%	00:05:00
6	Aqua dest	00:05:00
Demaskierung		
7	Kochen im Citrat-Puffer (pH 6,0) im Dampfgarer >100 °C	00:10:00
8	Auf Raumtemperatur abkühlen lassen	00:30:00
9	Aqua dest	00:05:00
Peroxidaseblock		
10	Peroxidase auf Schnitte auftropfen, bei Raumtemperatur	00:10:00
11	Aqua non-dest	00:05:00
12	PBS-Puffer	00:07:00
Inkubation Primärantikörper		
13	Monoclonaler mouse Anti-CD-68 antibody [KP 1]	01:00:00
14	Aqua non-dest	00:05:00
15	PBS-Puffer	00:07:00
Inkubation Sekundärantikörper		
16	Polymer anti-Mouse-HRP, Raumtemperatur	00:30:00
17	Aqua non-dest	00:05:00
18	PBS-Puffer	00:07:00
Detektion		
19	ACE Substrat auftropfen und warte bis gewünschte Intensität erreicht wird	~00:10:00
20	Aqua dest	00:05:00
Kernfärbung		
21	Hämatoxylin	00:10:00
22	Fließend wässern	00:10:00
Eindecken in Serunglycerin Gelatine		

2.6.4.5 CD-80-FÄRBUNG

7. Tabelle: CD-80-Färbungsprotokoll

Schritt	Lösung/Reagenzien	Dauer/Einwirkzeit
Entparaffinieren		
1	Xylol	00:10:00
2	Xylol	00:10:00
Wässern		
3	Ethanol 90%	Kurz eintauchen
	Ethanol 90%	00:05:00
4	Ethanol 80%	Kurz eintauchen
	Ethanol 80%	00:05:00
5	Ethanol 76%	Kurz eintauchen
	Ethanol 76%	00:05:00
6	Aqua dest	00:05:00
Demaskierung		
7	Kochen im EDTA-Puffer im Dampfgarer >100 °C	00:10:00
8	Auf Raumtemperatur abkühlen lassen	00:30:00
9	Aqua dest	00:05:00
Peroxidaseblock		
10	Peroxidase auf Schnitte auftropfen, bei Raumtemperatur	00:10:00
11	Aqua non-dest	00:05:00
12	PBS-Puffer	00:07:00
Inkubation Primärantikörper		
13	Anti-CD80; 1:200 in AK-Verdünnungspuffer (= 5µg/ml)	01:00:00
	Isotypkontrolle: Rabbit IgG	
14	Aqua non-dest	00:05:00
15	PBS-Puffer	00:07:00
Inkubation Sekundärantikörper		
16	Histofine Simple Stain goat-anti-Rabbit – HRP	00:30:00
17	Aqua non-dest	00:05:00
18	PBS-Puffer	00:07:00
Detektion		
19	Substrat auftropfen und inkubieren bis die gewünschte Farbintensität erreicht wurde	~00:10:00
20	Aqua dest	00:05:00
Kernfärbung		
21	Hämatoxylin- Kernfärbung	00:10:00
22	Bläuen in Scott-Puffer	00:10:00
Wässrig eindecken		

Die Aufschlüsselung nach M1- und M2-Makrophagen wurde immunhistologisch durchgeführt. Zum Nachweis von M1 Makrophagen, des inflammatorischen Subtyps, verwendeten wir das CD80- Molekül.

2.6.4.6 CD-163-FÄRBUNG

Zum Nachweis von M2 Makrophagen, des anti-inflammatorischen Subtyps, verwendeten wir das CD163- Molekül.

8. Tabelle: CD-163-Färbungsprotokoll

Schritt	Lösung/Reagenzien	Dauer/Einwirkzeit
Entparaffinieren		
1	Xylol	00:10:00
2	Xylol	00:10:00
Wässern		
3	Ethanol 90%	Kurz eintauchen
	Ethanol 90%	00:05:00
4	Ethanol 80%	Kurz eintauchen
	Ethanol 80%	00:05:00
5	Ethanol 76%	Kurz eintauchen
	Ethanol 76%	00:05:00
6	Aqua dest	00:05:00
Demaskierung		
7	Kochen im EDTA-Puffer im Dampfgarer >100 °C	00:10:00
8	Auf Raumtemperatur abkühlen lassen	00:30:00
9	Aqua dest	00:05:00
Peroxidaseblock		
10	Peroxidase auf Schnitte auftropfen, bei Raumtemperatur	00:10:00
11	Aqua non-dest	00:05:00
12	PBS-Puffer	00:07:00
Inkubation Primärantikörper		
13	Anti-CD80; 1:200 in AK-Verdünnungspuffer (= 5µg/ml)	01:00:00
	Isotypkontrolle: Rabbit IgG	
14	Aqua non-dest	00:05:00
15	PBS-Puffer	00:07:00
Inkubation Sekundärantikörper		
16	Histofine Simple Stain goat-anti-Rabbit – HRP	00:30:00
17	Aqua non-dest	00:05:00
18	PBS-Puffer	00:07:00
Detektion		
19	Substrat auftropfen und inkubieren bis die gewünschte Farbintensität erreicht wurde	~00:10:00
20	Aqua dest	00:05:00
Kernfärbung		
21	Hämatoxylin- Kernfärbung	00:10:00
22	Bläuen in Scott-Puffer	00:10:00
Wässrig eindecken		

2.6.4.7 STRO-1 Färbung

STRO-1 ist eine Oberflächenprotein, welches von Stromazellen im Knochenmark und von erythroiden Vorläuferzellen exprimiert wird. Ein Großteil der STRO-1 exprimierenden Zellen ist in der Lage in viele Zellen zu differenzieren. Dazu gehören „hematopoiesis supportive stromal cells with vascular smooth muscle like phenotype“, Osteoblasten, Chondrozyten und Adipozyten (Dennis, J.e. Et al., 202, Cells Tissues Organs 170). Der STRO-1 Antikörper ist der beste bekannte Marker zur Detektion von mesenchymalen Stammzellen (Ning H et al.,2011).

9. Tabelle: STRO-1-Färbungsprotokoll

Schritt	Lösung/Reagenzien	Dauer/Einwirkzeit
Entparaffinieren		
1	Xylol	00:10:00
2	Xylol	00:10:00
Wässern		
3	Ethanol 90%	Kurz eintauchen
	Ethanol 90%	00:05:00
4	Ethanol 80%	Kurz eintauchen
	Ethanol 80%	00:05:00
5	Ethanol 76%	Kurz eintauchen
	Ethanol 76%	00:05:00
6	Aqua dest	00:05:00
Demaskierung		
7	Kochen im Citrat-Puffer (pH 6,0) im Dampfgarer >100 °C	00:10:00
8	Auf Raumtemperatur abkühlen lassen	00:30:00
9	Aqua dest	00:05:00
Peroxidaseblock		
10	Peroxidase auf Schnitte auftropfen, bei Raumtemperatur	00:10:00
11	Aqua non-dest	00:05:00
12	PBS-Puffer	00:07:00
Inkubation Primärantikörper		
13	Monoclonaler mouse IgM #STRO – 1	01:00:00
14	Aqua non-dest	00:05:00
15	PBS-Puffer	00:07:00
Inkubation Sekundärantikörper		
16	Polymer anti-Mouse-HRP, Raumtemperatur	00:30:00
17	Aqua non-dest	00:05:00
18	PBS-Puffer	00:07:00
Detektion		
19	ACE Substrat auftropfen und warte bis gewünschte Intensität erreicht wird	~00:10:00
20	Aqua dest	00:05:00
Kernfärbung		
21	Hämatoxylin	00:10:00
22	Fließend wässern	00:10:00
Eindecken in Serumglycerin Gelatine		

2.6.5 Histologische Auswertung

2.6.5.1 Mikroskopie, Digitalisierung, Image J

Damit man die angefärbten Schnitte mit der Software *Image J* histologisch auswerten kann, mussten sie zuerst digitalisiert werden. Die Digitalisierung fand mit Hilfe des Fluoreszenz-Mikroskop HS der Modellreihe BZ-9000 BIOREVO

(Keyence GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) und der dazugehörigen Software BZ-II-Viewer/Analyser (Keyence GmbH, Neu-Isenburg, Deutschland) statt. Dadurch wurde der komplette histologische Schnitt abfotografiert und zu einem nicht komprimierten, hochaufgelösten Kompositbild mit 16 bit Farbtiefe zusammengesetzt (TIF-Format), welches die Auswertung des gesamten Defektbereichs erlaubte.

In der Folge wurden diese Bilddateien (siehe 6.5.5.) an einem Computer ausgewertet. Die Analyse fand mit Hilfe der Software *Image-J* (National Institutes of Health, Maryland, USA) statt. Dazu wurde die zu bestimmende Morphologie, wie der Kalluszuwachs oder die Gefäße, anhand eines Farben - Threshold markiert und durch die Pixelanzahl quantitativ ausgemessen. Diese Werte wurden ins Verhältnis zu der Defektfläche gesetzt und miteinander verglichen.

2.6.5.2 Mikroskopie

Für die Analyse des Periosts und der induzierten Membran, sowie der CD68-, der CD80-, der CD163- und der Stro-1-Färbung wurde das Fluoreszenz-Mikroskop „AxioObserver“ und die AxioCam ICC-1 der Firma Zeiss verwendet.

Mikroskop und Kamera wurden über die Software Axiovision gesteuert. Bildanalysen, z.B. Vermessung von Strecken, wurden ebenfalls mit der Software Axiovision durchgeführt. Für diese Analysen wurde in der Regel das 20x-Objektiv verwendet.

Vor der Mikroskopie wurde der histologische Schnitt mit Aqua-dest. gereinigt, um störende Staubpartikel zu entfernen.

Es wurden von jedem Präparat 5 Aufnahmen erstellt, die zusätzlich zu dem zentralen Bereich des Knochendefekts die Übergänge zwischen Knochen und Membran bzw. Defekt abdeckten.

Zur Auswertung der STRO-1- und der CD-68-Färbung wurde die Anzahl positiver Zellen im Membranbereich und im Übergangsbereich Periosteum-

Defekt semiquantitativ beurteilt. Dabei wurde eine Staging von 0 (keine positive Zellen) – 3 (hohe Anzahl positiver Zellen) angewendet.

Die Auswertung der CD-80 und CD-163 Färbungen erfolgte unter Auszählung von jeweils 5 Gesichtsfeldern pro Defekt (4 jeweils im Bereich der Frakturenden und der Membran, 1x zentral). Da Endothelzellen ebenfalls beide Marker exprimieren können, wurden positive Zellen im direkten lokalen Zusammenhang mit Blutgefäßen nicht berücksichtigt. Zur Bestimmung der M1/M2-Ratio wurden positive Zellen in den jeweiligen Färbungen (benachbarte Schnitte) ausgezählt und die M1/M2-Ratio als Mittelwert über 5 Bildausschnitte pro Präparat berechnet.

Die Längenbestimmung periostealer Strukturen erfolgte von der Übergangszone Periost-Defekt Richtung Defektmittle bis zur nicht sicheren Identifizierung der Struktur als Endpunkt anhand von überlappenden Fotos. Abschließend erfolgte die Aufaddierung der Teilstücke zur Gesamtstrecke.

2.6.6 Knochenmineraldichte

Die Knochenmineraldichte ist ein Maß für den Kalksalzgehalt pro Rauminhalt im Knochen und hat somit entscheidenden Einfluss auf dessen Festigkeit. Sie wird durch Mikrocomputertomografie (μ CT) gemessen und wurde im Zentrum der Physiologie (Frankfurt/Deutschland) durchgeführt.

2.7 Statistische Analyse

Die Ergebnisse werden als Boxplot des Medians präsentiert, 25% Quartil und 75%-Quartil bilden den unteren bzw. oberen Rand der Box, Whisker repräsentieren Minimum und Maximum.

Der nicht parametrische Kruskal-Wallis-Test mit Bonferoni-Holm korrigierter posthoc Analyse wurde für den Vergleich zwischen den Gruppen verwendet. Es wurde die Software Bias 11.02 (Epsilon-Verlag) verwendet. P-Werte < 0.05 werden als statistisch signifikanter Unterschied, p-Werte zwischen 0.05 und 0.1 als ein statistischer Trend gewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Aussaat-effizienz

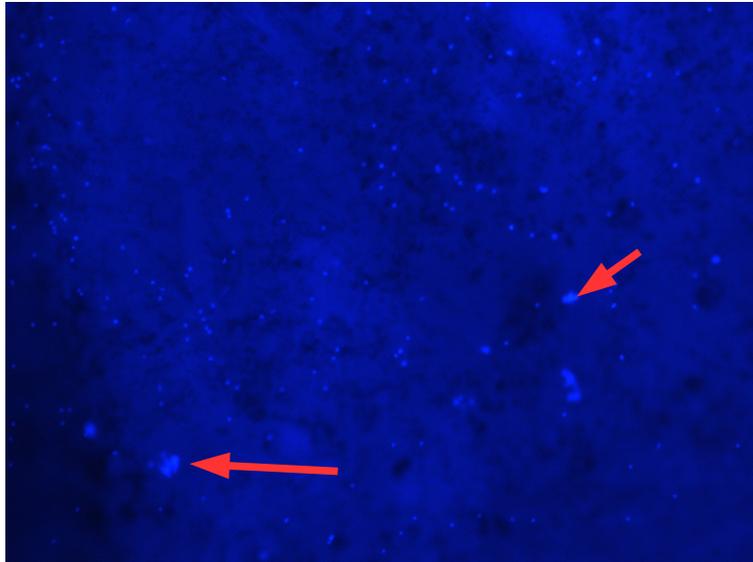


Abbildung 6: Fluoreszenzmikroskopie der DAPI Färbung – Granulat Korn.

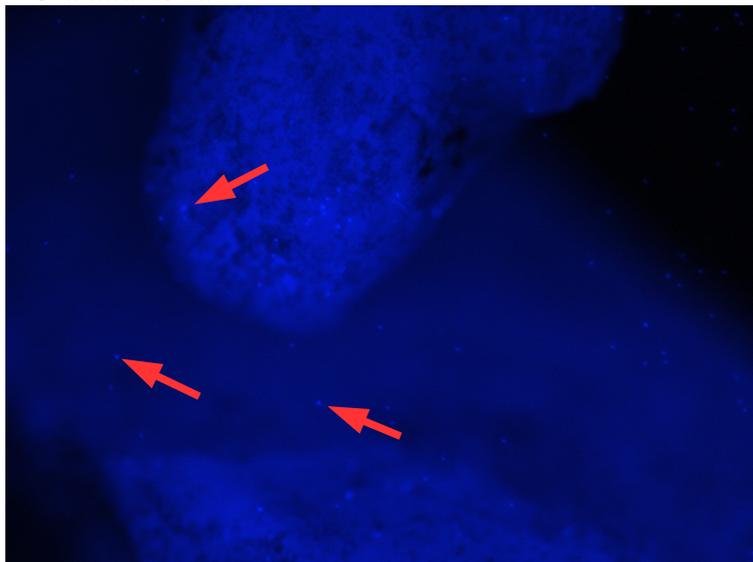


Abbildung 7: Fluoreszenzmikroskopie der DAPI Färbung – Granulat Korn in Zellsuspension.

Die roten Pfeile in Abb. 6 und 7 stellen beispielhaft die positiven DAPI-Zellen dar.

Ob BMC auf Herafill adhärieren, wurde mittels DAPI-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Auf den Bildern zeigt sich, dass Zellen auf

den Granulatkörnern adhären (Abb. 6). Ein Teil der Zellen bleibt allerdings in der Zellsuspension zurück (Abb. 7).

3.2 Operationsverlauf

Insgesamt wurden 273 Operationen ausgeführt und dabei wurden 21 Komplikationen dokumentiert, was zum Ausschluss und zum Ersatz der Tiere führte. Die häufigste Komplikation stellte der Narkosetod mit insgesamt 13 Tieren dar. Fünfmal erfolgte der Ausschluss aufgrund einer Infektion, zweimal durch eine proximale Femurfraktur während der Knochenentnahme und einmal durch einen Tod nach der Zementapplikation. Die restlichen Operationen erfolgten komplikationslos und die Tiere erwachten ohne Probleme aus der Narkose. Unter der anschließenden Tramadol-Behandlung fand ein Tag nach der Operation eine normale Futter und Wasseraufnahme statt.

Bei drei Ratten fand nach der ersten Operation eine Wunddehiszenz mit folgender Wundrevision statt, die alle im Verlauf aufgrund von Infektion ausgeschlossen wurden. Zweimal wurde eine Plattenkorrektur unternommen, wo anschließend ein Tier aufgrund von Infektion ersetzt werden musste. Der fünfte infektiöse Knochen wurde aufgrund eines granulomatösen Umbaus und einer Kallushypertrophie ausgeschlossen.

Das Gewicht der Tiere lag am Tag der ersten Operation im Bereich von 330-486g, zum Zeitpunkt der zweiten Operation betrug es 465-595g und am Tag des Sacrifice 510g-750g.

Komplikationen traten nicht gehäuft in bestimmten Gruppen auf, signifikante Gewichtsunterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht beobachtet werden.

3.3 Histologie

3.3.1 Knochenneubildung im Defektbereich in Abhängigkeit von Zellbesiedelung und Granulatgröße

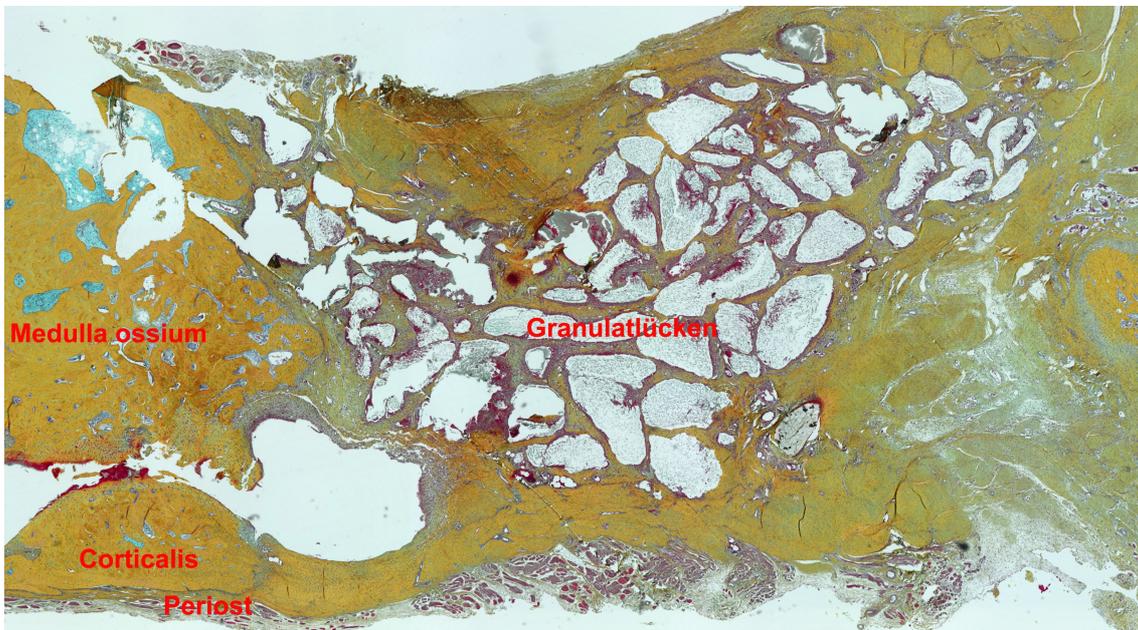


Abbildung 8: Knochenschnitt mit Pentachromfärbung aus Gruppe 1 (kleines Granulat)

Da sich die Morphologie der Gewebestrukturen des Knochens in der Pentachrom-Färbung hervorragend unterscheiden lässt (siehe 6.5.4.1.), eignete sich die Färbung hervorragend als Quantifizierung des Knochenzuwachs in der Defektzone.

Abbildung 9 stellt die Kallusneubildung der verschiedenen Gruppen dar. Der größte Zuwachs an Knochensubstanz ist beim kleinen Granulat mit und ohne BMC und der Kontrollgruppe 4 (syngener Knochen) festgestellt worden. Mit steigender Granulatgröße war die Gewebsneubildung signifikant rückläufig. Bei den Gruppen mit großen Granulatgrößen ist der niedrigste Knochenzuwachs gemessen worden. Diese Werte waren signifikant gegenüber den kleinen Granulat und dem syngenen Knochen.

Unter Verwendung von BMC besiedeltem Herafill wurde im Median eine leicht erhöhte Knochenneubildung im Vergleich zur Verwendung des zellfreien

Materials festgestellt, allerdings nicht signifikant.

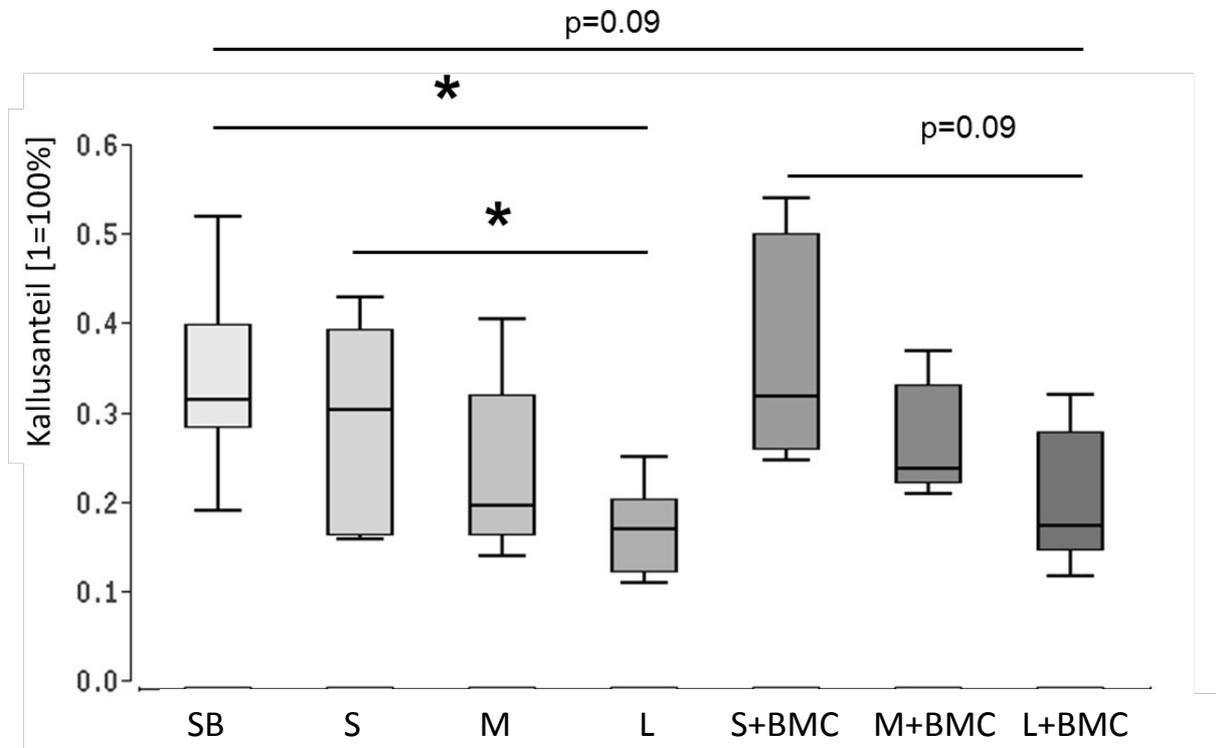


Abbildung 9: Auswertung der Pentachrom-Färbung - Dient zur Quantifizierung der Kallusneubildung im Defektbereich.

SB = Syngener Knochen; S = kleines Granulat, M = mittleres Granulat, L = großes Granulat, S+BMC = kleines BMC besiedeltes Granulat, M+BMC = mittleres BMC besiedeltes Granulat, L+BMC = großes BMC besiedeltes Granulat. * = $p < 0.05$

3.3.2 Periostausdehnung in Abhängigkeit von Zellbesiedelung und Granulatgröße

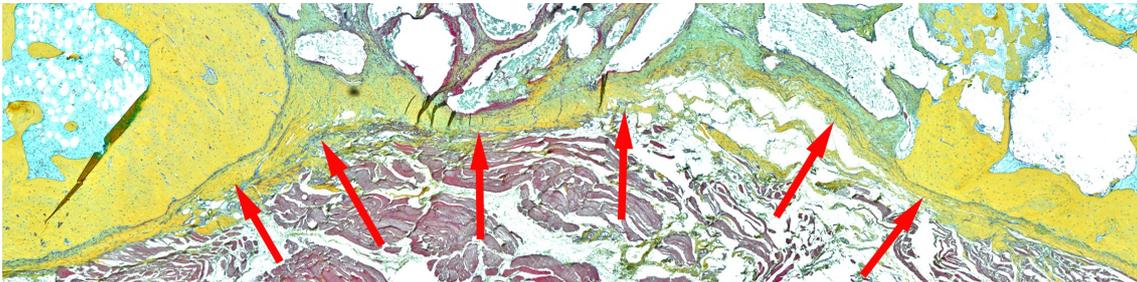


Abbildung 10: Beispiel der Periostausdehnung bei unbesiedelten mittelgroßen Granulat. Die Pfeile zeigen das Wachstum der periostähnlichen Strukturen.

Zur Analyse des Periostwachstums diente ebenfalls die Pentachromfärbung. Hierzu wurde der Abstand gemessen, wie weit das Periost ab Defektbeginn in den Defektbereich hineinwächst. Die Daten wurden als Summe der Strecken rechter Rand sowie linker Rand angegeben. Umgerechnet entspricht z.B. ein Wert von 7000 μm einer aufsummierten Einwachsstrecke vom rechten und linken Frakturrand in den Defekt von insgesamt 7 mm. Bei einer Defektgröße von 10 mm ergibt sich somit rechnerisch eine Lücke von 3 mm im zentralen Bereich. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied zwischen dem großen und dem kleinen Granulat festgestellt werden, jeweils mit und bzw. BMC-Besiedelung. Des Weiteren gab es keine Signifikanz zwischen den jeweilig gleichgroßen Scaffold-Gruppen mit BMC besiedelten und unbesiedelten Granulat.

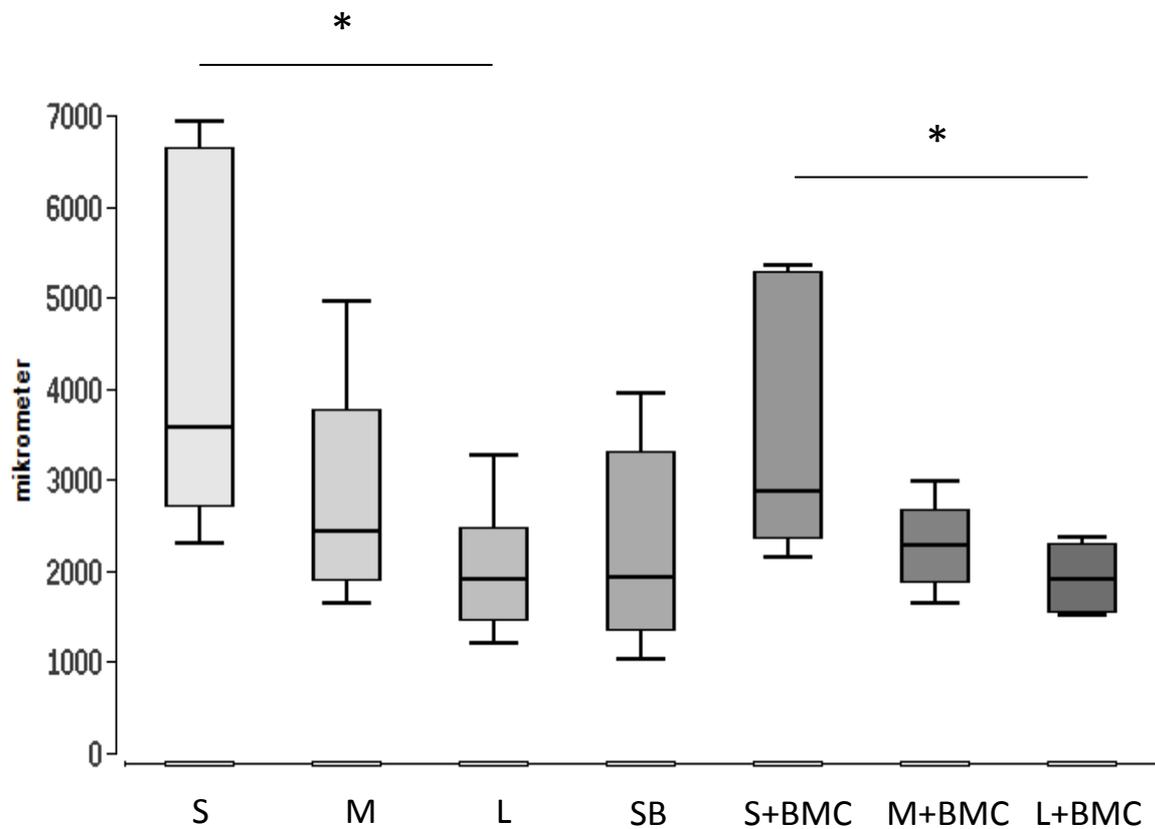


Abbildung 11: Auswertung der Pentachrom-Färbung - Nachweis der Ausdehnung periostähnlicher Strukturen in den Defektbereich.

SB = Syngener Knochen; S = kleines Granulat, M = mittleres Granulat, L = großes Granulat, S+BMC = kleines BMC besiedeltes Granulat, M+BMC = mittleres BMC besiedeltes Granulat, L+BMC = großes BMC besiedeltes Granulat. * = $p < 0.05$

3.3.3 Zellinduktion in Abhängigkeit von Zellbesiedelung und Granulatgröße

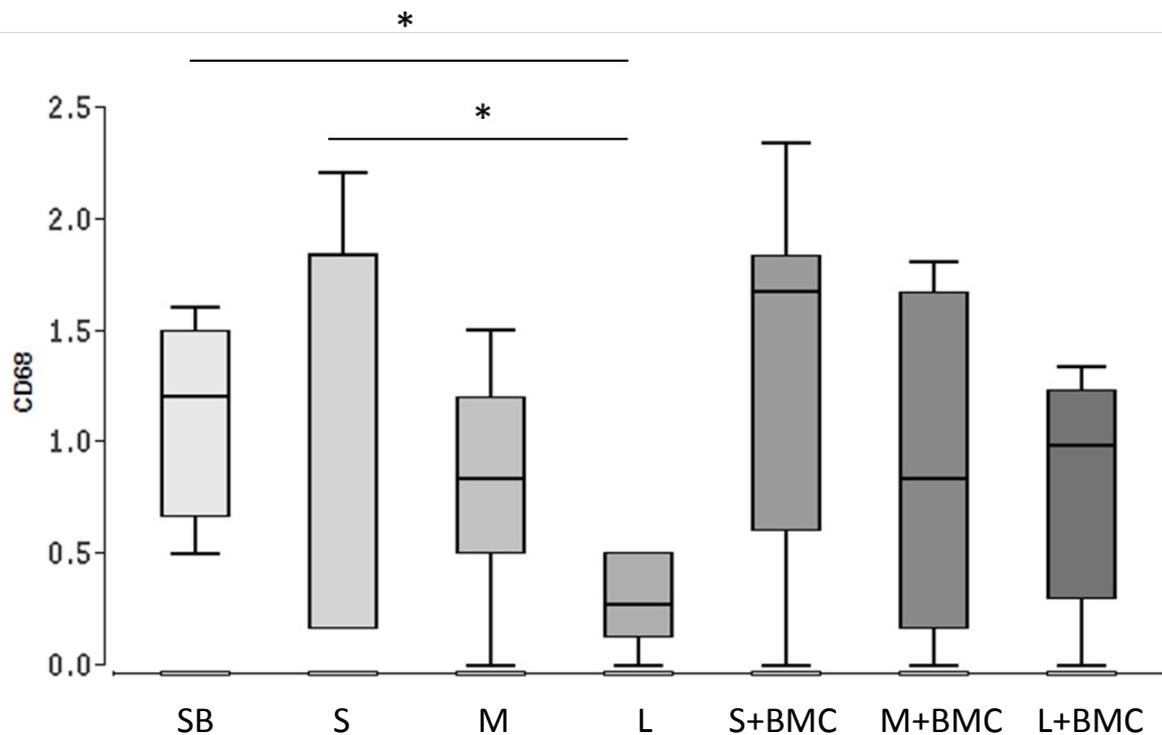


Abbildung 12: Auswertung der CD68-Färbung - Dient zur Quantifizierung der Gewebemakrophagen. In diesem Diagramm ist ein Durchschnitt aus dem Übergangsbereich (vom Periost zur Membran) und der Membran dargestellt.

SB = Syngener Knochen; S = kleines Granulat, M = mittleres Granulat, L = großes Granulat, S+BMC = kleines BMC besiedeltes Granulat, M+BMC = mittleres BMC besiedeltes Granulat, L+BMC = großes BMC besiedeltes Granulat. * = $p < 0.05$

Zur Quantifizierung der Makrophagen diente die CD68-Färbung. Die höchste Makrophagendichte konnten in den Gruppen mit den kleinen Granulatgrößen detektiert werden (Abb.: 12, 13, 14). Mit steigender Korngröße ist eine Abnahme der Makrophagendichte zu verzeichnen, der Rückgang der CD68 positiven Zellen bei Verwendung des großen Granulats ist statistisch signifikant gegenüber Defekten, die mit kleinem Granulat befüllt wurden, sowie als statistischer Trend ($p=0.1$) gegenüber den Defekten befüllt mit syngener Spongiosa, nachweisbar. Ein höherer Median konnte im Vergleich der BMC besiedelten zu den nicht BMC besiedelten Granulat festgestellt werden, jedoch

war dieser Unterschied ohne statistische Signifikanz. Bei den BMC besiedelten Granulatklassen lagen auch keine signifikanten Unterschiede zwischen dem kleinem und großen Granulat vor.

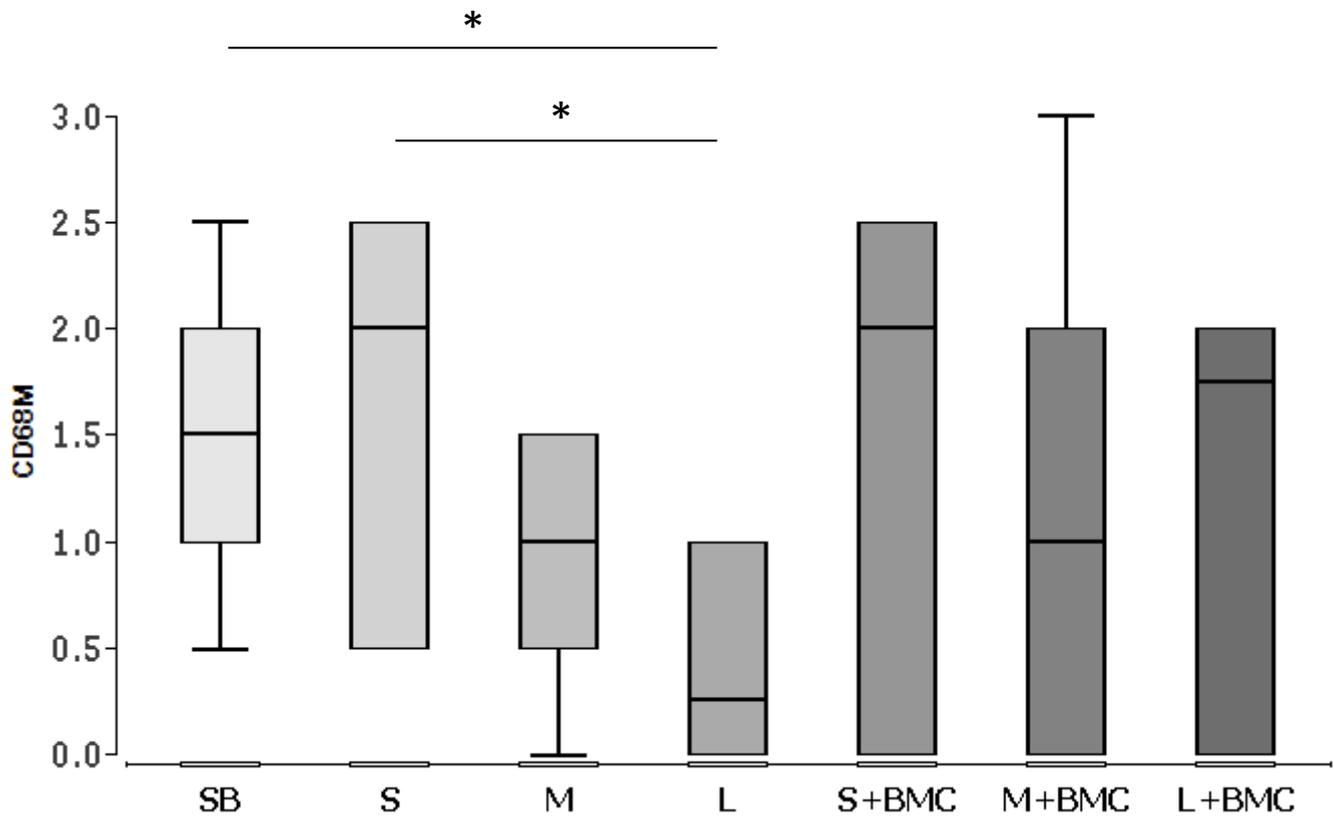


Abbildung 13: Auswertung der CD68-Färbung - Dient zur Quantifizierung der Gewebemakrophagen. In diesem Diagramm ist die Auswertung der Membran dargestellt.

SB = Syngener Knochen; S = kleines Granulat, M = mittleres Granulat, L = großes Granulat, S+BMC = kleines BMC besiedeltes Granulat, M+BMC = mittleres BMC besiedeltes Granulat, L+BMC = großes BMC besiedeltes Granulat. * = $p < 0.05$

Darüber hinaus sind vergleichbar viele CD68 positive Zellen in dem Übergangsbereich (Übergang des Periost von Knochen zu Defekt) und der Membran festzustellen.

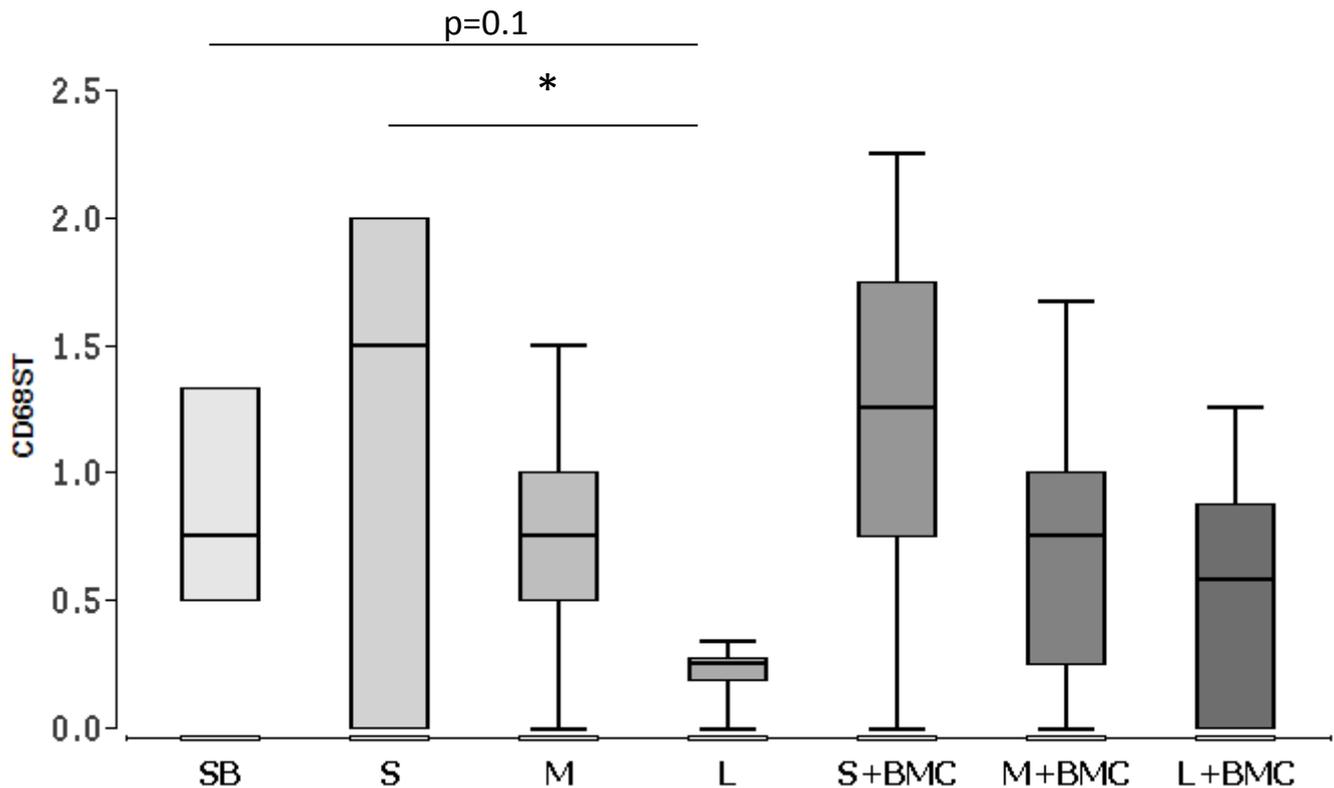
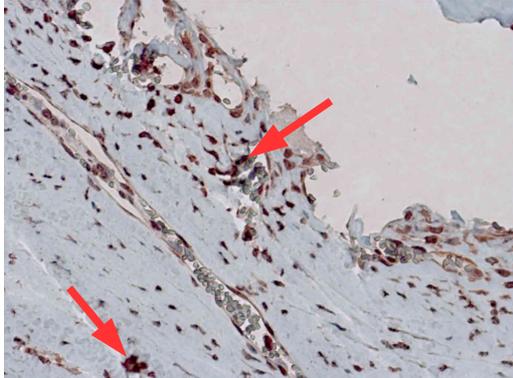


Abbildung 14: Auswertung der CD68-Färbung - Dient zur Quantifizierung der Gewebemakrophagen. In diesem Diagramm ist die Auswertung des Übergangsbereichs dargestellt.

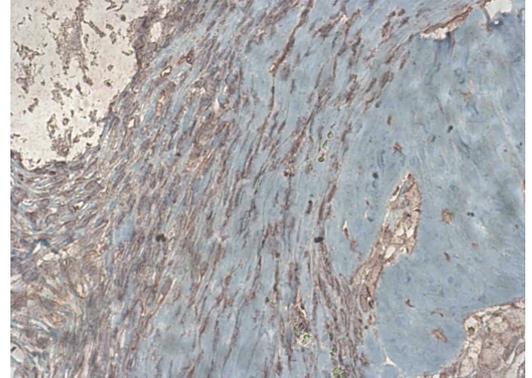
SB = Syngener Knochen; S = kleines Granulat, M = mittleres Granulat, L = großes Granulat, S+BMC = kleines BMC besiedeltes Granulat, M+BMC = mittleres BMC besiedeltes Granulat, L+BMC = großes BMC besiedeltes Granulat. * = $p < 0.05$

CD68 - Übergangsbereich

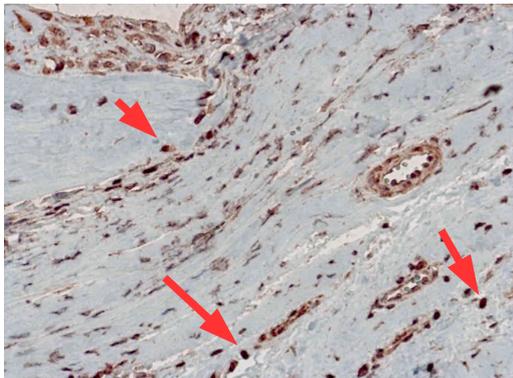
ASP



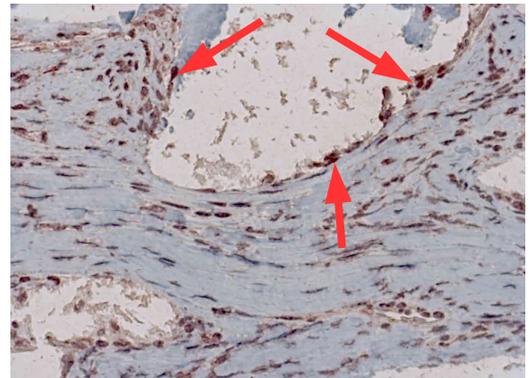
SEK



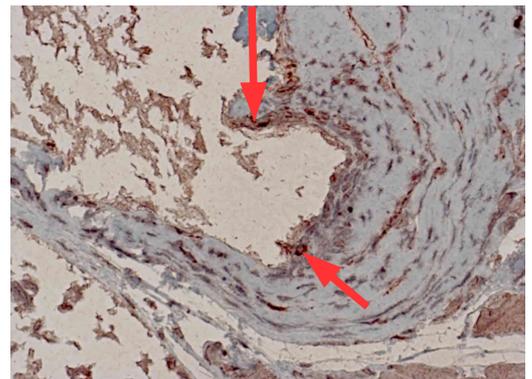
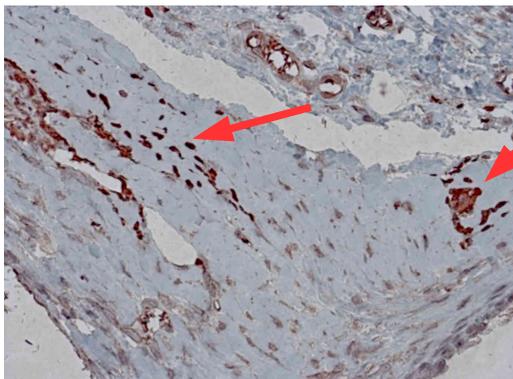
Ohne BMC



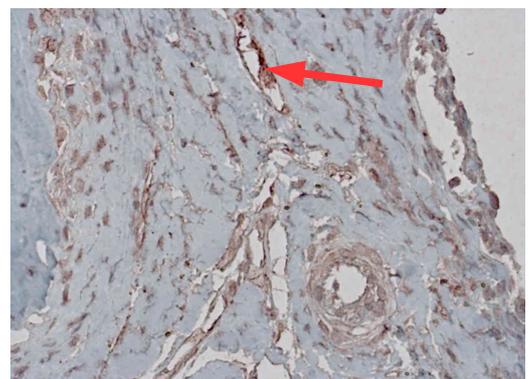
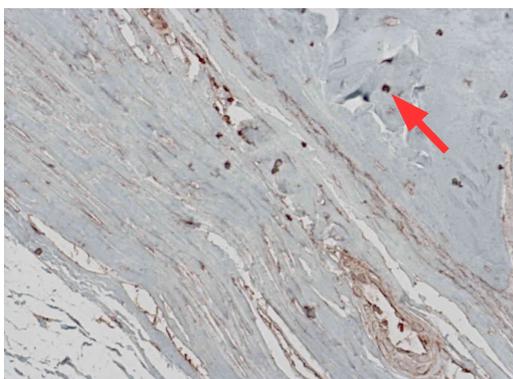
Mit BMC



Kleines Granulat



Mittleres Granulat

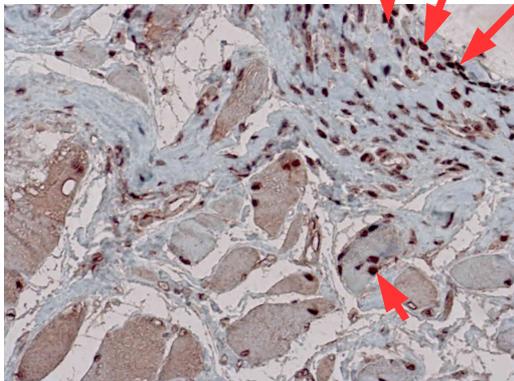


Großes Granulat

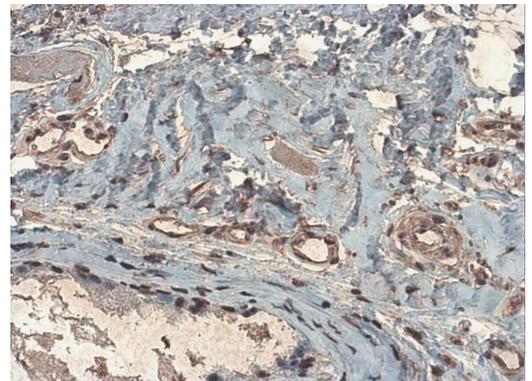
Abbildung 15: Nachweis der CD68 positiven Zellen im Vergleich der verschiedenen Gruppen im Übergangsbereich. Die roten Pfeile zeigen beispielhaft positiv gefärbte Zellen.

CD68 - Membran

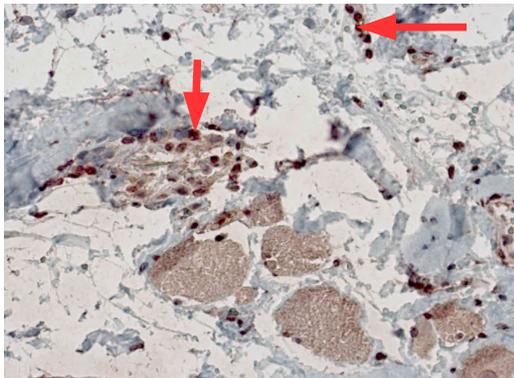
ASP



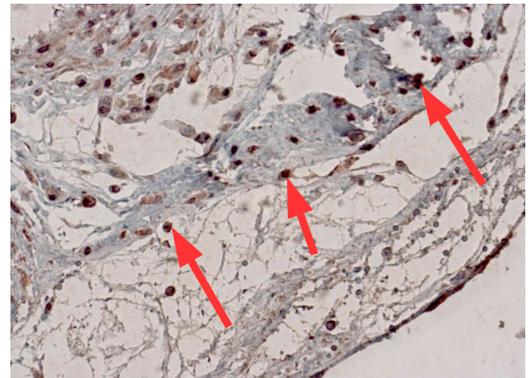
ISO



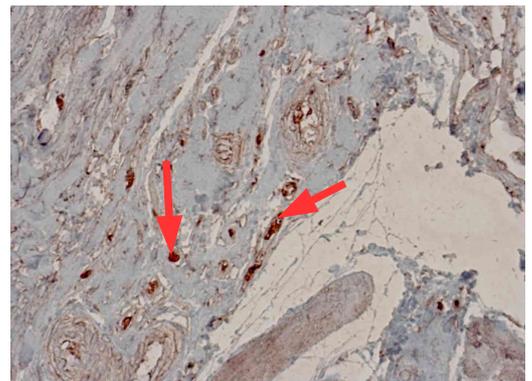
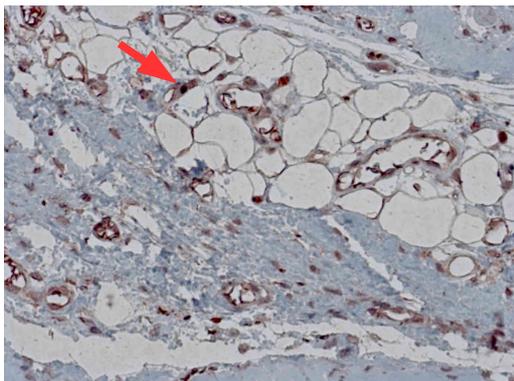
Ohne BMC



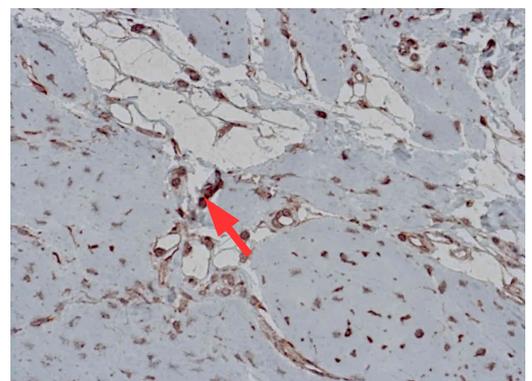
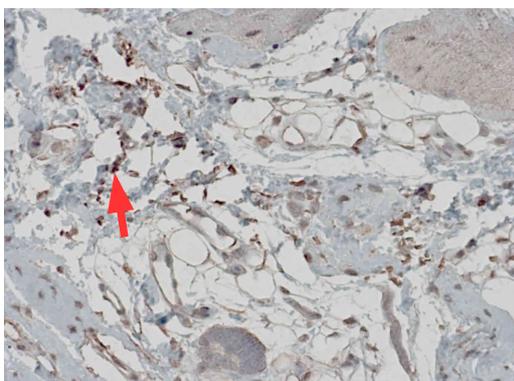
Mit BMC



Kleines Granulat



Mittleres Granulat



Großes Granulat

Abbildung 16: Nachweis der CD68 positiven Zellen im Vergleich der verschiedenen Gruppen in der Membran. Die roten Pfeile zeigen beispielhaft positiv gefärbte Zellen.

Die Aufschlüsselung nach M1- (inflammatorischer Subtypus, CD80-positiv) und M2-Makrophagen (anti-inflammatorischer Subtyp, CD163 positiv) wurde ebenso immunhistologisch durchgeführt.

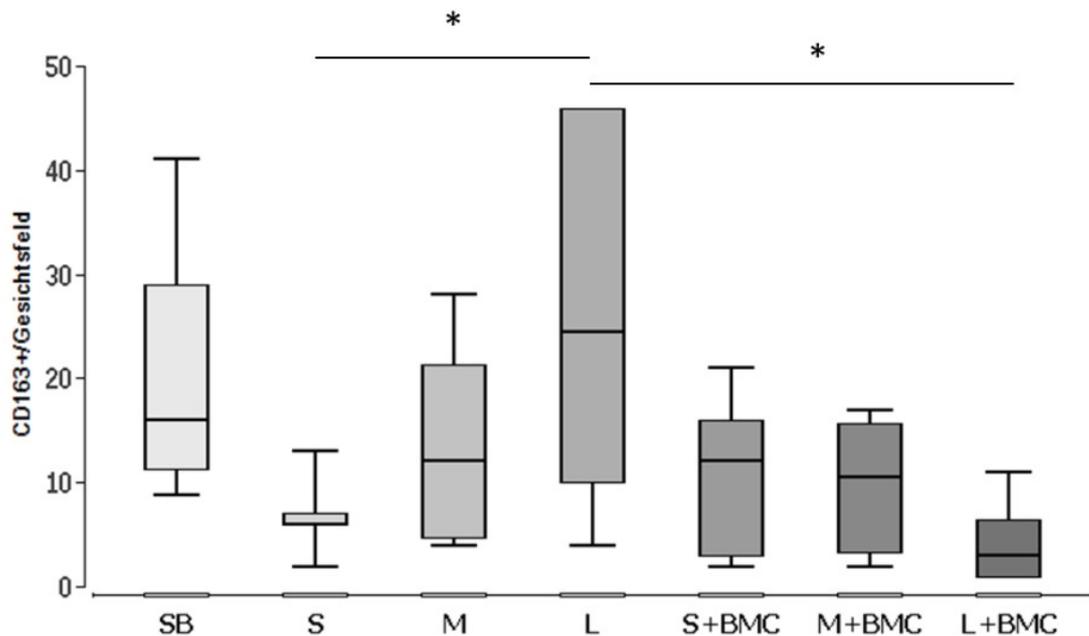


Abbildung 17: Auswertung der CD163-Färbung - Dient zum immunhistologischen Nachweis und Quantifizierung von M2 - Makrophagen.

SB = Syngener Knochen; S = kleines Granulat, M = mittleres Granulat, L = großes Granulat, S+BMC = kleines BMC besiedeltes Granulat, M+BMC = mittleres BMC besiedeltes Granulat, L+BMC = großes BMC besiedeltes Granulat. * = $p < 0.05$

Es konnte eine signifikant erhöhte Anzahl CD163 positiver mutmaßlicher Makrophagen in Defekten nachgewiesen werden, die mit großem Granulat ohne BMC befüllt wurden im Vergleich zu Defekten, die mit kleinem Granulat befüllt wurden. Die Besiedelung mit BMC führte zu einem signifikanten Rückgang der CD163+ Population bei Verwendung des großen Granulats (Abb. 17). Die Population der CD80 positiven inflammatorischen Makrophagen unterschied sich nicht signifikant in den verschiedenen Versuchsgruppen (Abb. 18). Die Subtypenanalyse ergab eine M1/M2-Ratio zwischen 1,5 und 4,1 in den Versuchsgruppen mit Ausnahme der Tiere, die großes Granulat besiedelt mit

BMC erhielten. In dieser Gruppe konnte eine signifikant erhöhte M1/M2-Ratio von 16,2 im Vergleich zur syngenen Knochengruppe und der Gruppe "großes Granulat ohne BMC" verzeichnet werden. (Abb. 19).

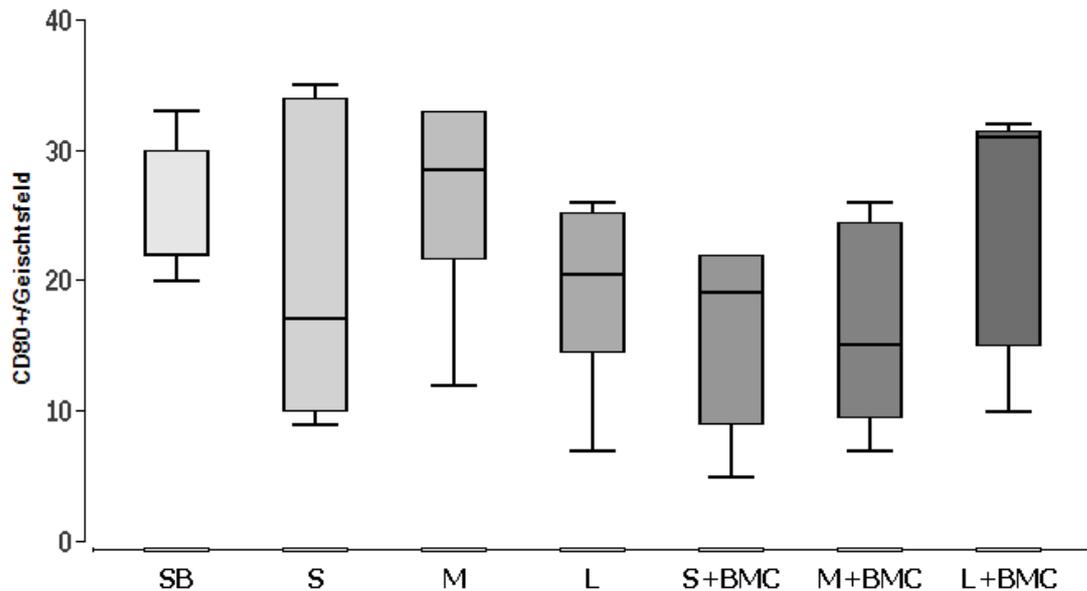


Abbildung 18: Auswertung der CD80-Färbung - Dient zum immunhistologischen Nachweis und Quantifizierung von M1 - Makrophagen.

SB = Syngener Knochen; S = kleines Granulat, M = mittleres Granulat, L = großes Granulat, S+BMC = kleines BMC besiedeltes Granulat, M+BMC = mittleres BMC besiedeltes Granulat, L+BMC = großes BMC besiedeltes Granulat.

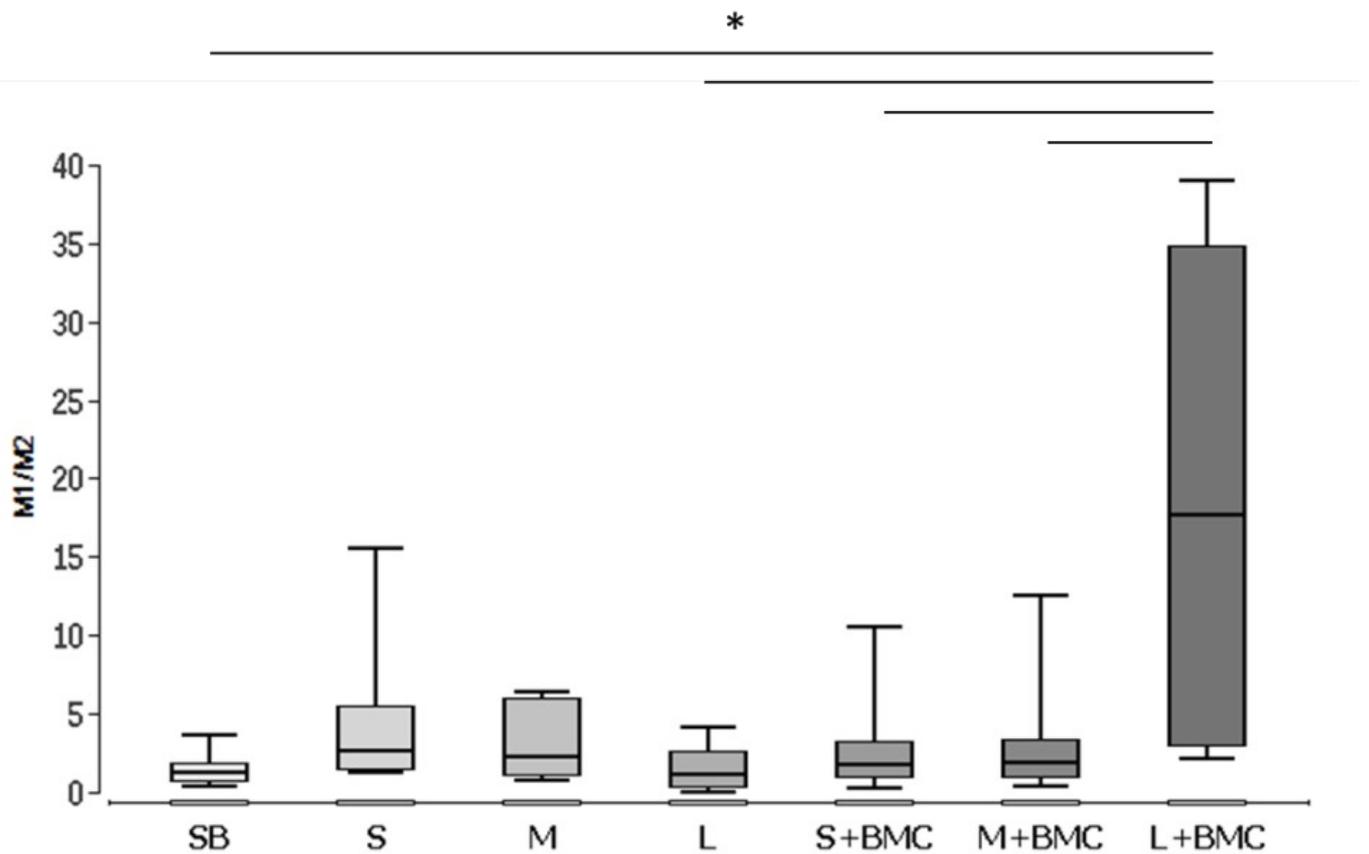


Abbildung 19: Berechnung der M1/M2-Ratio aus der Quantifizierung von M1- (CD80-positiv, Abb. 16) und M2-Makrophagen (CD163-positiv, Abb. 15)

SB = Syngener Knochen; S = kleines Granulat, M = mittleres Granulat, L = großes Granulat, S+BMC = kleines BMC besiedeltes Granulat, M+BMC = mittleres BMC besiedeltes Granulat, L+BMC = großes BMC besiedeltes Granulat. * = $p < 0.05$

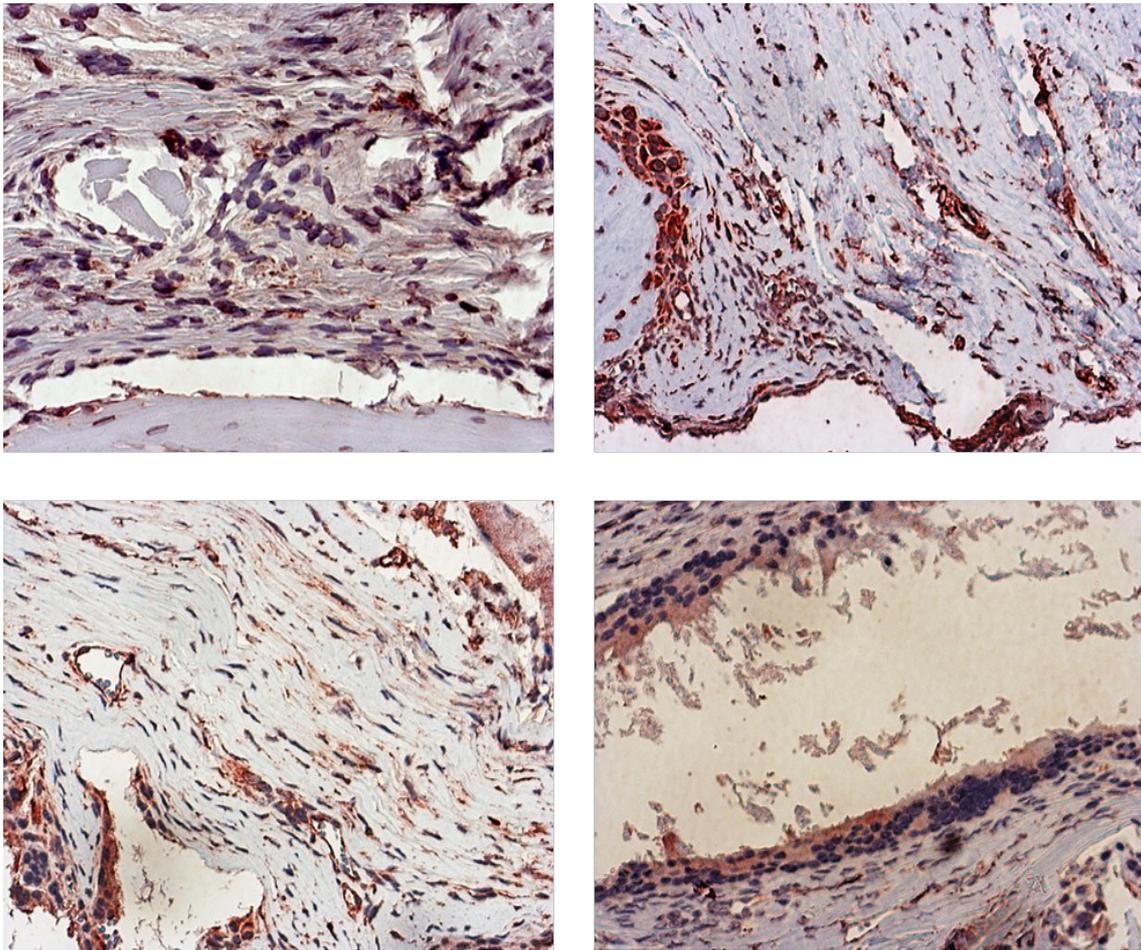


Abbildung 20: Exemplarische histologische Färbungen, obere Reihe CD80, untere Reihe CD163.

Sowohl M1-Makrophagen, als auch M2-Makrophagen sind im Grenzbereich zu den Herafill-Granulat als mehrkernige Riesenzellen lokalisiert. Beide Sorten können aber auch innerhalb der induzierten Membran und an der Frakturstelle vorliegen.

Durch die STRO-1 Färbung konnten mesenchymale Stammzellen in dem Periost sowie in der Membran quantifiziert werden. Die STRO-1 Zelldichte in Periost und induzierter Membran (Ratio) unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Es konnte ein Trend zu höheren Werten in der Gruppe „kleines Granulat+BMC“ im Vergleich zur Gruppe „kleines Granulat“ im Bereich der Membran beobachtet werden ($p=0,08$) und eine signifikant erhöhte Anzahl im Übergangsbereich (Abb. 21, 22).

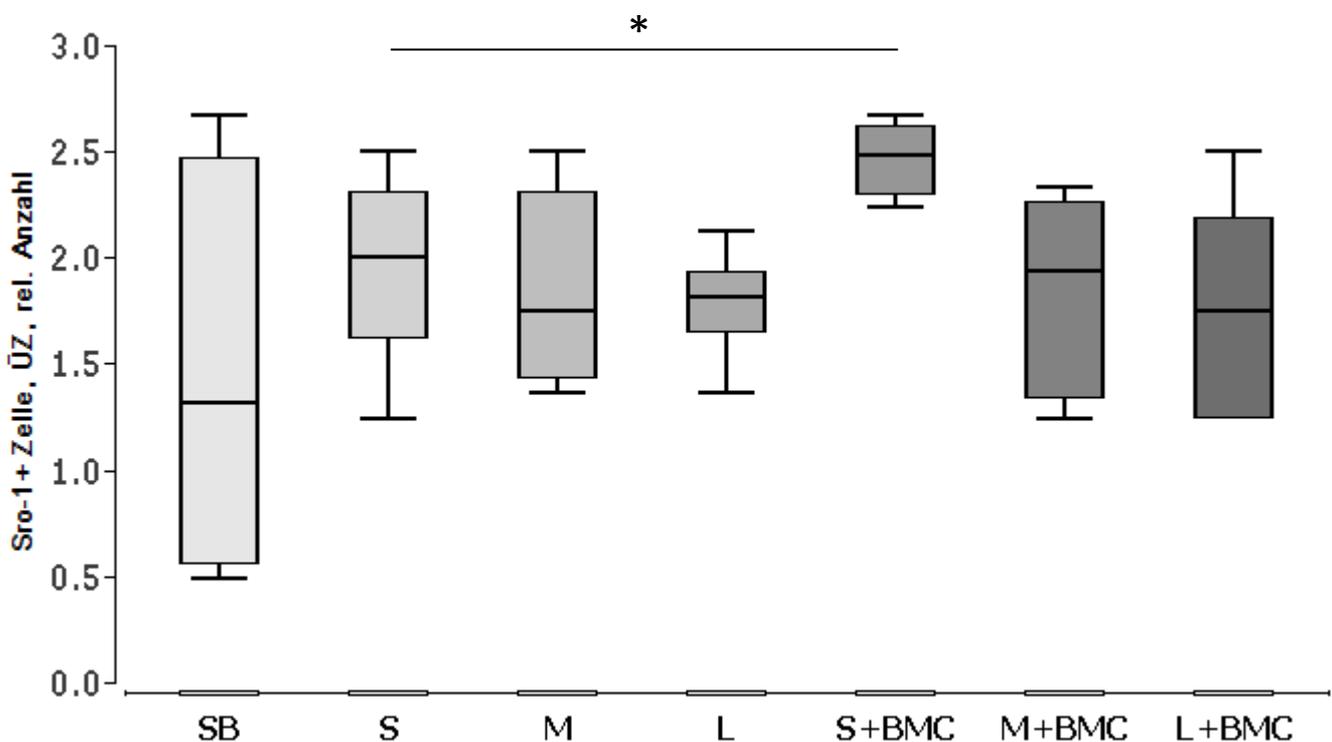


Abbildung 21: Auswertung der STRO-1 Färbung - Dient zur Quantifizierung der mesenchymalen Stammzellen. In diesem Diagramm ist die Auswertung des Übergangsbereichs des Periost von Knochen zu Defekt dargestellt.

SB = Syngener Knochen; S = kleines Granulat, M = mittleres Granulat, L = großes Granulat, S+BMC = kleines BMC besiedeltes Granulat, M+BMC = mittleres BMC besiedeltes Granulat, L+BMC = großes BMC besiedeltes Granulat. * = $p < 0.05$

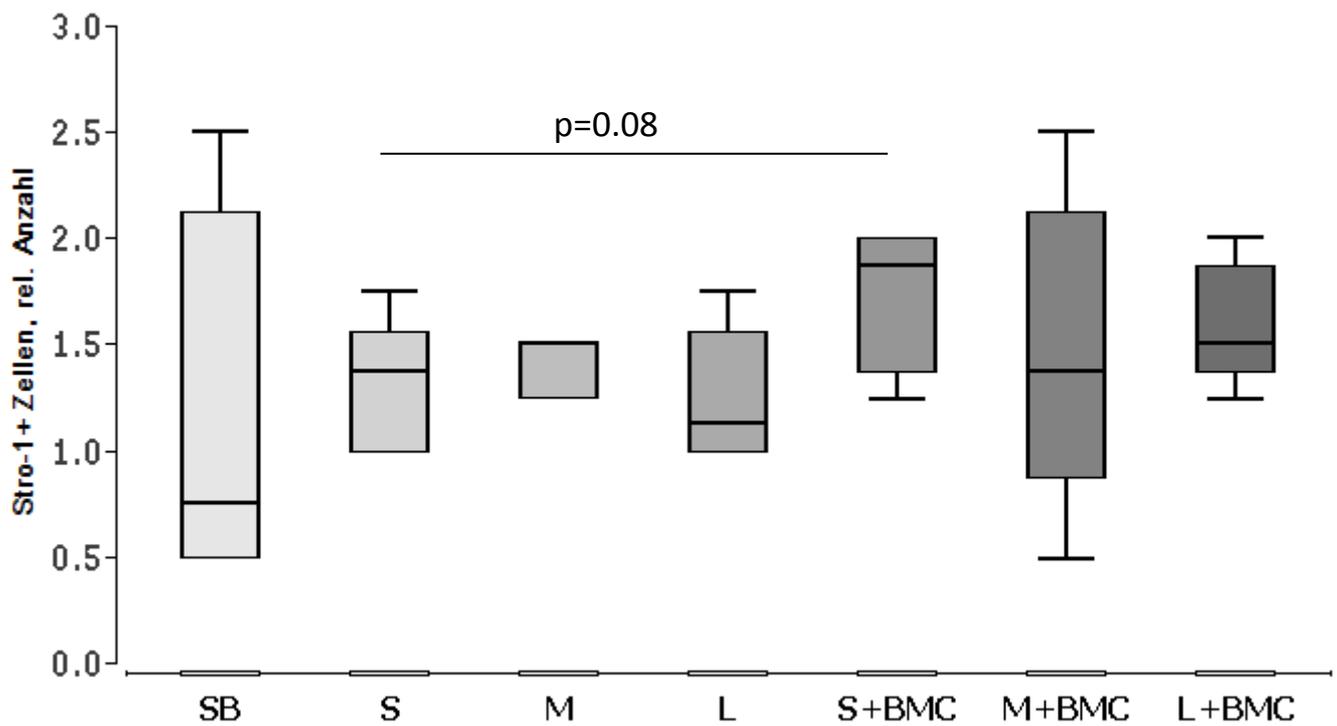


Abbildung 22: Auswertung der STRO-1 Färbung - Dient zur Quantifizierung der mesenchymalen Stammzellen. In diesem Diagramm ist die Auswertung der Membran dargestellt.

SB = Syngener Knochen; S = kleines Granulat, M = mittleres Granulat, L = großes Granulat, S+BMC = kleines BMC besiedeltes Granulat, M+BMC = mittleres BMC besiedeltes Granulat, L+BMC = großes BMC besiedeltes Granulat.

3.4 Vaskularisierung

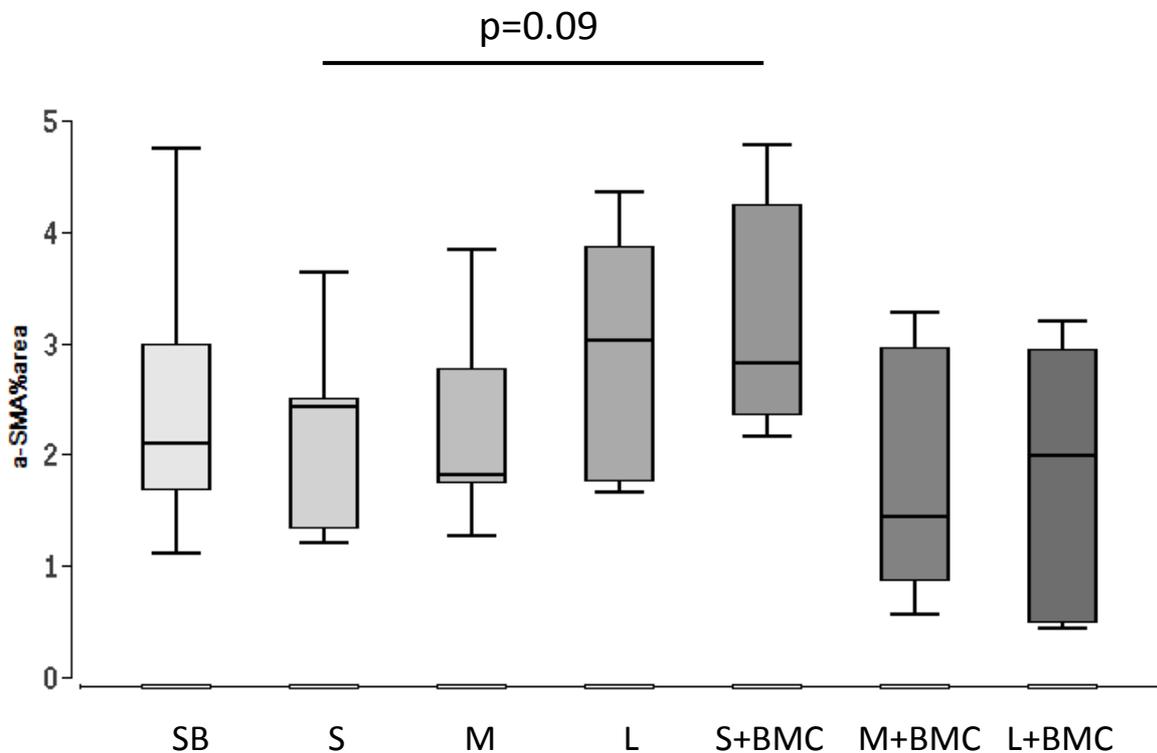


Abbildung 23: Auswertung der Alpha-SMA Färbung – Dient zur Quantifizierung der Vaskularisierung

SB = Syngener Knochen; S = kleines Granulat, M = mittleres Granulat, L = großes Granulat, S+BMC = kleines BMC besiedeltes Granulat, M+BMC = mittleres BMC besiedeltes Granulat, L+BMC = großes BMC besiedeltes Granulat.

Die Vaskularisierung im Knochendefekt unterschied sich nicht signifikant zwischen den verschiedenen Untersuchungsgruppen. Wurden BMC besiedelte Granulate verwendet, konnte bei Verwendung von kleinem Granulat ein tendentiell höherer Vaskularisierungsgrad im Defektbereich gemessen werden im Vergleich zu kleinem Granulat ohne BMC ($p=0,09$) (Abb. 23).

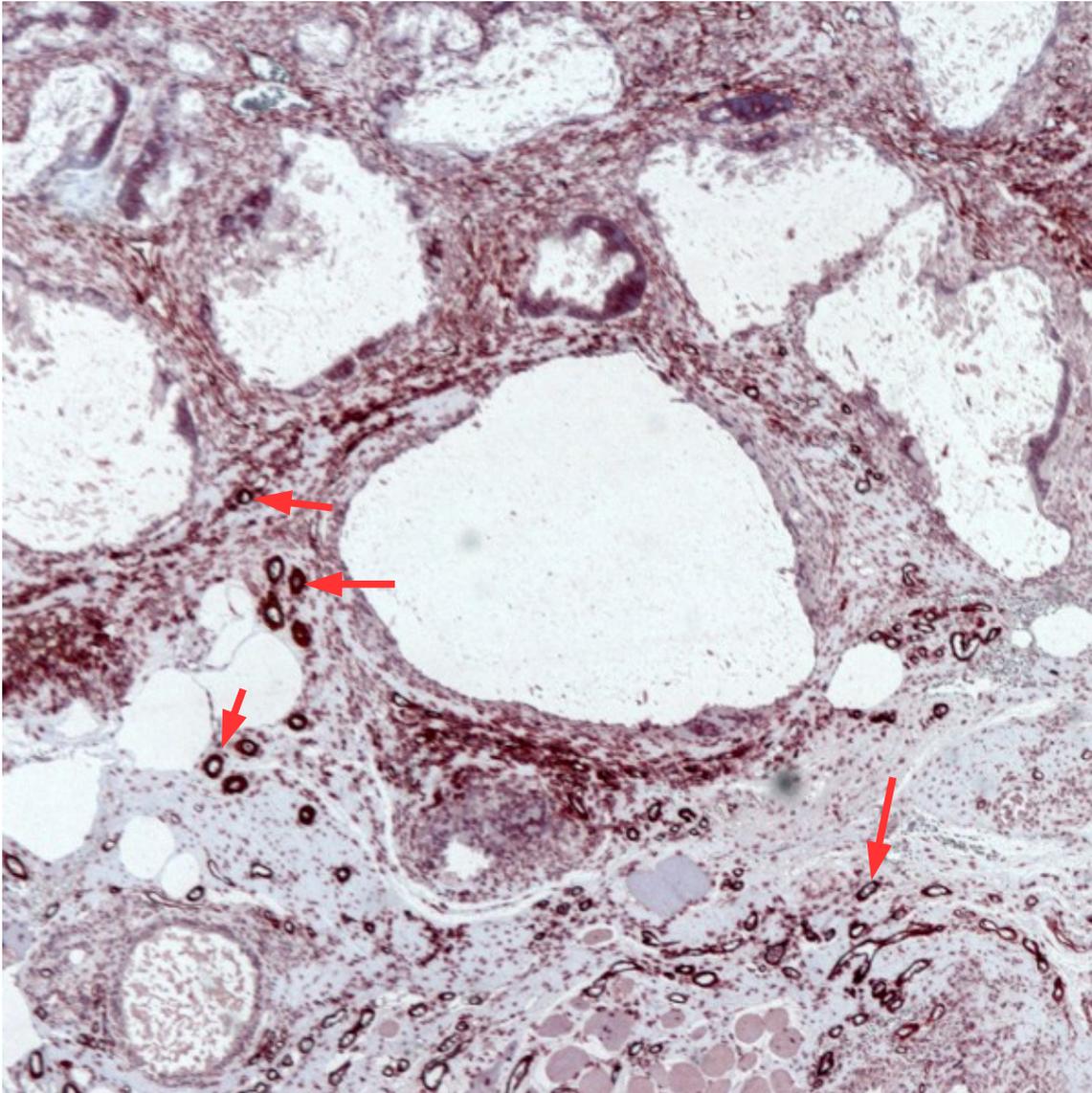


Abbildung 24: Alpha-SMA-Färbung: Darstellung der Vaskularisierung von einem unbesiedelten kleinen Scaffold der Gruppe 1. Die roten Pfeile markieren beispielhaft angefärbte Blutgefäße.

Blutgefäße sind generell nicht gleichmäßig über den Defekt verteilt, tendenziell sind Gefäße eher an den Frakturrenden und in Nachbarschaft zu Muskelgewebe und der Membran gehäuft lokalisiert wie in dieser Abbildung beispielhaft dargestellt.

3.5 Knochenmineraldichte (Bone Mineral Density)

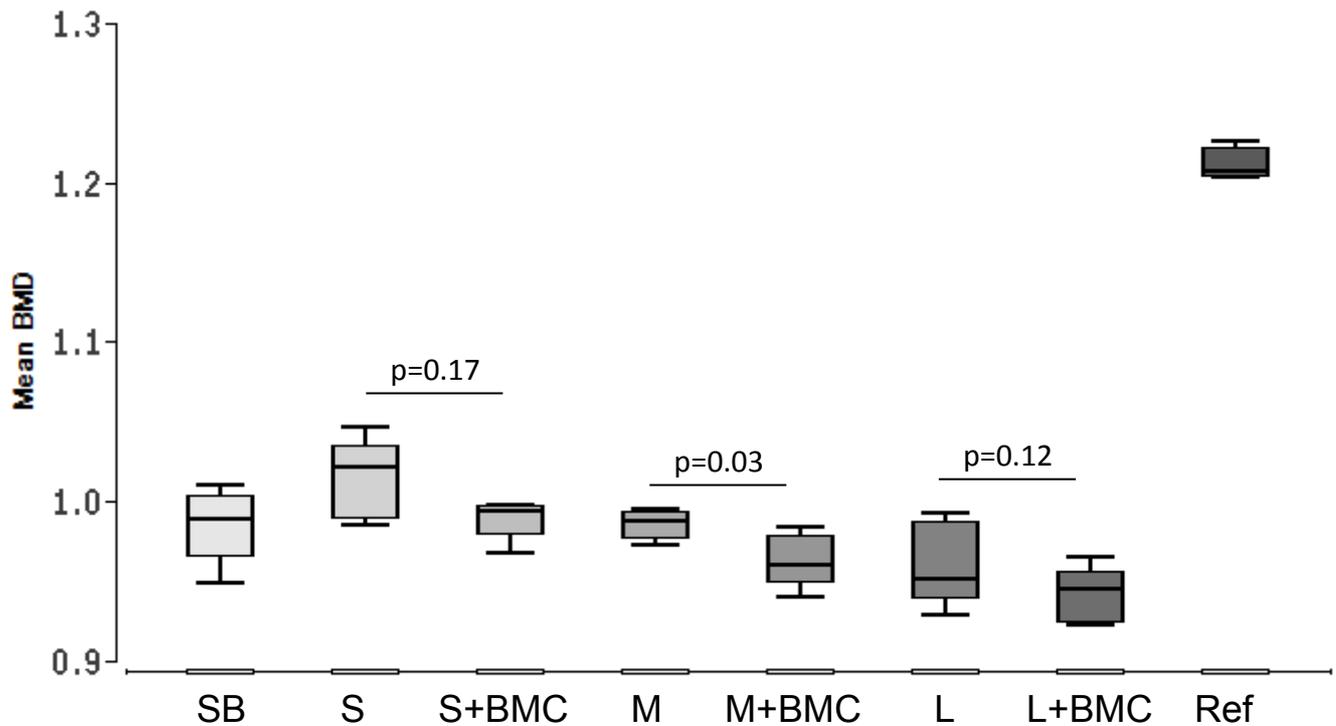


Abbildung 25: Auswertung der BMD, alle Gruppen im Vergleich zum Referenzknochen

SB = Syngener Knochen; S = kleines Granulat, M = mittleres Granulat, L = großes Granulat, S+BMC = kleines BMC besiedeltes Granulat, M+BMC = mittleres BMC besiedeltes Granulat, L+BMC = großes BMC besiedeltes Granulat, Ref = Referenzknochen.

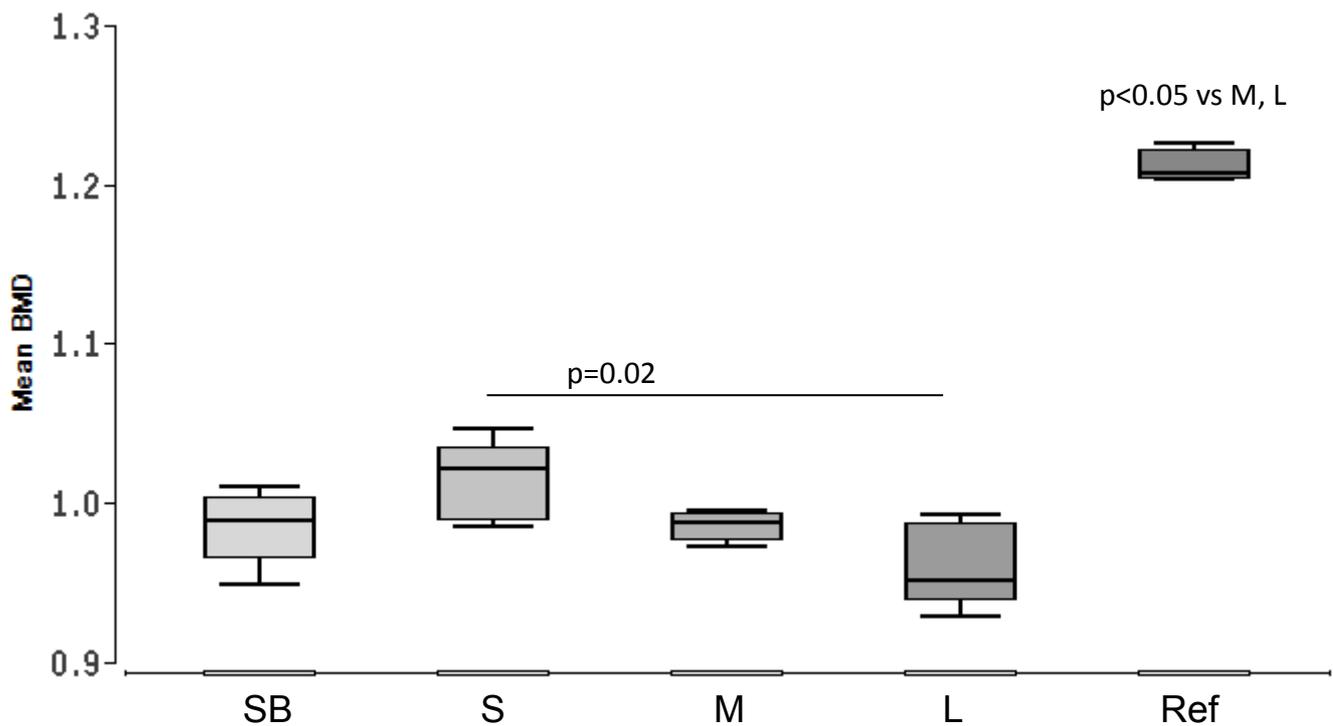


Abbildung 26: Auswertung der BMD, autologer Knochen vs zellfreies Granulat vs Referenzknochen

SB = Syngener Knochen; S = kleines Granulat, M = mittleres Granulat, L = großes Granulat, Ref = Referenzknochen.

Die Knochenmineraldichte im Defektbereich war bei Verwendung der kleinen Granulatgröße signifikant erhöht im Vergleich zu Knochendefekten, die mit dem größten Granulat befüllt wurden ($p < 0.05$). Die Mineralisierung in Defekten befüllt mit syngener Spongiosa war im Median leicht erniedrigt gegenüber Defekten, die mit kleinem Granulat befüllt wurden. Wurden BMC besiedelte Granulate verwendet, so zeigte sich ebenfalls eine erhöhte BMD bei Verwendung des kleinen Granulats im Vergleich zur mittlerern Größe ($p = 0.06$, Trend) und zum großen Granulat ($p < 0.05$).

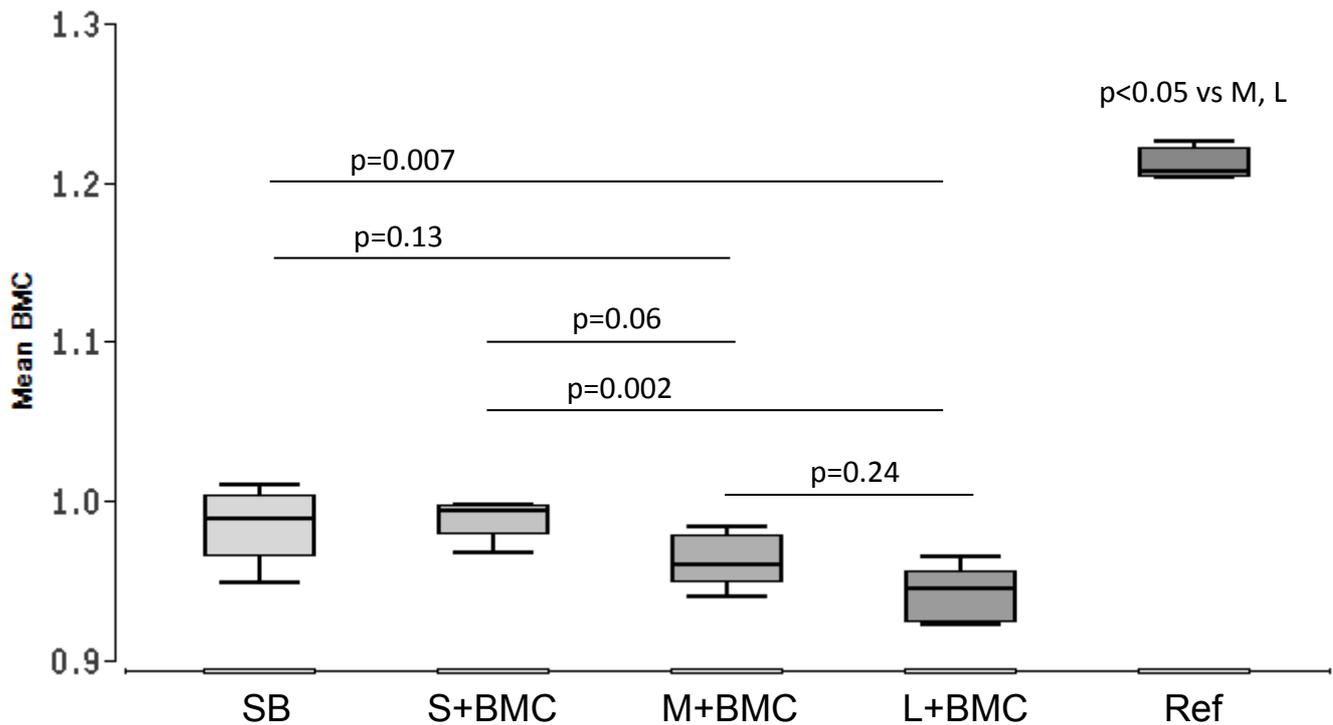


Abbildung 27: Auswertung der BMD, autologer Knochen vs besiedeltes Granulat vs Referenzknochen

SB = Syngener Knochen, S+BMC = kleines BMC besiedeltes Granulat, M+BMC = mittleres BMC besiedeltes Granulat, L+BMC = großes BMC besiedeltes Granulat, Ref = Referenzknochen.

Der direkte Vergleich zwischen unbesiedelten und BMC-besiedelten Granulaten zeigte eine teilweise signifikant erniedrigte Knochenmineraldichte in den BMC-Gruppen. Dieser Unterschied war statistisch signifikant für die mittlere Granulatgröße ($p < 0.05$), ein statistischer Trend konnte bei Verwendung des großen Granulats verzeichnet werden ($p = 0.12$).

Nichtsdestotrotz ist festzuhalten, dass die Knochenmineraldichte in den Defektbereichen deutlich niedriger ist als die entsprechenden Werte der Referenzknochen.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss der Korngröße des Knochenersatzmaterials Herafill auf die BMC-unterstützte Therapie eines kritischen Knochendefekts unter Verwendung der induzierten Membrantechnik nach Masquelet im Knochendefektmodell am Rattenfemur zu evaluieren.

Mit der Masquelet-Technik ist ein zweistufiges operatives Verfahren zur Rekonstruktion von Knochendefekten angewendet worden (siehe 3.2 Masquelet-Technik). Es gibt insbesondere zwei bekannte Techniken die signifikant die Prognose für große diaphysäre Knochendefekte verbessern und klinische Anwendung finden. Zu einem die Ilizarov-Technik und die Masquelet-Technik. Jedoch zeigte sich die Ilizarov-Technik technisch anspruchsvoller und signifikant komplikationsreicher, u.a. im Bezug auf Schmerzen, Pseudoarthrosen und Infektionen (Tong et al., 2017; Tarchala et al., 2016). Somit könnte die Masquelet-Technik, gefüllt mit dem richtigen Transplantat, in Zukunft zum Goldstandard langstreckiger Knochendefekte werden (Gouron et al., 2016). Die Technik wird meistens in Kombination mit der ASP angewendet. Jedoch ist die Menge von autologen Knochenersatzmaterial sehr begrenzt. Es kommt meistens zu Entnahmemorbidityäten und es besteht immer die Gefahr der Transplantatresorption und Nekrose. Alternativ gibt es viele in Studien getestete Knochenersatzmaterialien (siehe 4.2 Knochenersatzmaterialien). Z.B. beschreibt Bosemark et al. (2015), dass β -TCP mit der Granulatgröße von 0,5 mm in Kombination mit BMP-7 (25 μ g pro Defekt), unter Verwendung der Masquelet-Technik im Rattenfemurmodell, zur Knochendefektheilung führen kann.

Die Technik der induzierten Membran in Kombination mit Herafill wurde in dieser Arbeit das erste Mal angewendet.

Es konnte durch die Kombination der induzierten Membran und des Herafill-Granulats ein signifikanter Einfluss der Granulatgröße bezüglich der Knochenneubildung und der Knochenmineraldichte nachgewiesen werden,

wobei die Knochenmineraldichte noch deutlich unter dem Wert des gesunden Knochengewebes liegt. Die histologische Untersuchung zeigte, dass die kleine Granulatgröße, im Vergleich zur Großen, eine signifikante Zunahme der Knochenneubildung im Defektbereich bewirkt, welche im Umfang gleichwertig zum syngenen Knochen ist. Zu erwähnen bleibt, dass die Leerflächen bei dem großen Granulat auch größer sind.

Diese Befunde stehen generell im Einklang mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die einen Einfluss der Partikelgröße, Oberflächenkonnektivität und Packungsdichte auf Knochenbildung und Remodeling beobachten konnten. Coathup et al., (2013) zeigte an einem Schaf-Femurdefektmodell, dass die Größe von 250–500 μm *silicate-substituted calcium phosphate* Granulat förderlich für die Heilung von Knochendefekten ist. Noch kleineres Granulat führte nicht zur Konsolidierung und wurde phagozytiert. Prieto et al., (2015) konnte unter Verwendung von einem Allograft-Polymer-Komposits in einem Hasen-Femurdefektmodell zeigen, dass es bei sehr kleinem Granulat (<105 μm) zu einer signifikant schlechteren Knochenheilung nach 12 Wochen kommt als bei größerem Granulat (105 – 500 μm).

Ein weiterer wichtiger Aspekt für die Knochendefektheilung ist die Vaskularisierung der Defektzone. Bezüglich der Vaskularisierung wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen (kleines, mittleres, großes Granulat) beobachtet. Hier bewirkten BMC bei Verwendung des kleinen Granulats eine leicht verbesserte Vaskularisierung. Die Unterschiede im Vaskularisierungsgrad könnten sich möglicherweise nach 8 Wochen Heilungszeit nivelliert haben. Janko et al. (2018) belegt eine gesteigerte Vaskularisierungsaktivität durch BMC in der frühen Heilungsphase, während nach 8 Wochen die Blutgefäßdichte im Defektbereich signifikant abnimmt.

Die knöcherne Durchbauung und die Knochenmineraldichte, konnten durch BMC nicht weiter gesteigert werden. Der geringe Effekt der BMC auf Knochenheilung und Vaskularisierung könnte in der relativ geringen Adhäsion der BMC an dem hydrophoben Herafill begründet liegen. Die herabgesetzte

Aussaateffizienz könnte zu einer verringerten BMC-Konzentration im Knochendefekt führen. Aus diesem Grund wurde auch die verbleibende Zellsuspension mit der Menge von einer Million Zellen, welche pro Defekt vorgesehen war, mit dem Transplantat in den Defektbereich hinein gegeben. Ob das tatsächlich zu einer Verbesserung des BMC-Effekt führen könnte, ist nicht klar. Es kann auch sein, dass bei nicht adhärierten Zellen ohne Anschluss an Zellkommunikation schnell die Apoptose induziert wird. Ein weiterer Aspekt könnte sein, dass durch die chemische Komposition des Herafills schon eine maximale Stimulierung der lokalen Regenerationskapazität im Defekt erfolgte, die sich durch zusätzliche BMC nicht weiter signifikant steigern ließ. Diese Annahme wird durch vergleichende Beobachtungen gestützt, dass z.B. zellfreies Knochenersatzmaterial auf β -TCP-Basis erst nach Besiedelung mit regenerativ wirkenden Zellen eine signifikante knochenaufbauende Wirkung aufweist (Seebach et al., 2015). Zu diskutieren bleibt, dass die Knochenmineraldichte bei dem BMC besiedelten Granulat signifikant geringer ausgefallen ist wie bei den Unbesiedelten, was zunächst Paradox erscheint, da bei dem besiedelten Granulat ein leicht erhöhter Trend von Makrophagen zu beobachten war, welche ausschlaggebend an der Homöostase der Knochenmineralisierung beteiligt sind (siehe 2.4). Es könnte sein, dass durch die Membran und deren Impermeabilität, die das Transplantat eigentlich vor schneller Resorption schützt, es durch die Zellsuspension, welche immer mit in den Defektbereich gegeben wurde, zu einer langsameren bzw. später beginnenden Knochenmineralisierung und Dichte kommt. Ferner wäre es auch vorstellbar, dass die BMC, die viele Immunzellen enthalten, durch das Herafill proinflammatorisch aktiviert werden, entsprechende Mediatoren freisetzen und somit die Mineralisierung initial inhibiert wird.

Ein weiterer Faktor, der zu einer verbesserten Knochenheilung führen kann, ist das signifikant gesteigerte Wachstum von Perioststrukturen in den Defektbereich in Gruppen, die kleines Granulat erhielten. Somit hat die Granulatgröße entscheidenden Einfluss auf das Wachstum der Knochenhaut, die durch das große Reservoir an mesenchymalen Stammzellen und

Osteoprogenitorzellen ein wichtiger Faktor bei der Knochenheilung von kritischen Defekten ist (Arnsdorf et al., 2009; DeBari et al., 2008; Yu et al., 2010). Nau et al. (2016) konnte einen positiven Effekt auf die Knochendefektheilung von vitalem Periost zeigen, welches in den Knochendefekt implantiert wurde. Allerdings ist noch nicht verstanden, wie die mechanischen und strukturellen Eigenschaften des Periosts auf endogene, mechanische und biophysikalischen Signale bei traumatischen Verletzungen reagieren. Das beinhaltet auch die Regeneration und das Wachstum von Periost über den Knochen post Trauma (Chang et al., 2012). Eigenen Beobachtung zur Folge könnte es wichtig sein, dass das Periost unmittelbar bei Defektbeginn auf ein osteokonduktiven Stoff trifft, wie hier das Granulat. Andererseits besteht die Gefahr, dass es nach medial über das Knochenende abknickt, was die Gefahr einer Pseudoarthrose bergen könnte. Aus diesem Grund ist die Granulatgröße und die damit einhergehende höhere Packungsdichte des Granulats von besonderer Bedeutung. Durch eine kleinere Granulatgröße und eine höhere Packungsdichte wird diese Möglichkeit wahrscheinlicher.

Des Weiteren beschreibt Cuthbert et al. (2013) die architektonischen Gemeinsamkeiten der Membran und des Periost. Es konnten überwiegend vergleichbare Werte in der Neoangiogenese, in der Expression von Wachstumsfaktoren und in der molekularen Analyse, im Vergleich des RNA Profils von den mesenchymalen Stammzellen im Periost und der Membran, aufgezeigt werden. Es wird der Begriff des induzierten Periosts, anstatt der induzierten Membran vorgeschlagen. Auch in dieser Studie sind die Zellen in der Membran sowie im Periost miteinander verglichen worden und es konnte kein Unterschied in der Anzahl der Makrophagen und mesenchymalen Stammzellen festgestellt werden. Es ist wahrscheinlich, dass während der Entstehung der Membran der Großteil der Zellen, die die Membran bilden aus dem Periost stammen, bzw. sie eine Weiterführung des Periosts ist, da die Membran eine sehr ähnliche Morphologie und Zellkultur wie das Periost aufweist und der Übergang oft mikroskopisch nicht einfach zu definieren ist.

Fernerhin könnte es sein, dass bei dem kleinen Granulat ein besserer Einfluss von osteoinduktiven Zellen aus den umliegenden Gewebestrukturen, wie dem Knochenmark, ermöglicht wird. Hier gibt es mehr kleine Zwischenräume in die Zellen einwandern können und es nicht durch ein großes Granulatstück zu einer Obstruktion mit konsekutiver Fluss/Zellkommunikationsbehinderung kommt. Somit könnte durch die kleine Granulatklasse eine bessere Zellproliferation und Zellmigration aus dem Knochenmark/Periost ermöglicht werden.

Darüber hinaus besitzt das kleine Granulat im Vergleich zu den größeren Granulatklassen ein größeres Oberflächen-/Volumenverhältnis und bietet somit eine größere Oberfläche mit der die Immunzellen reagieren können. Phagozyten wie Monozyten und Makrophagen sind die ersten Zellen, die auf Fremdmaterial durch Aktivierung, Adhäsion, Migration und Polarisation reagieren. Makrophagen sind heterogene Zellen mit verschiedenen Subpopulationen mit teilweise fließenden Übergängen (Wu et al., 2013). Nach einer Fraktur kommt es zur Einblutung in den Defektspace und zum konsekutiven Hämatom, welches von Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten infiltriert wird. Durch die eingewanderten Zellen werden verschiedene Zytokine und Chemokine freigesetzt, die u.a. zur weiteren Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen aus der Zirkulation und dem angrenzenden Knochenmark und Periost führt. In Abhängigkeit von dem lokalen Mediatorenmilieu werden sie zum M1 oder M2-Subtyp polarisiert (Ogle et al., 2016). In dieser Arbeit war die relative Anzahl der Makrophagen (CD68 positiv) bei Verwendung des kleinen Granulats signifikant erhöht. Die Zellen waren nicht gleichmäßig über den Defekt verteilt, sondern waren hauptsächlich zwischen Knochengewebe und Granulat sowie auf der zementzugewandten Seite der induzierten Membran lokalisiert. Die Ratio von M1 zu M2-Makrophagen bewegte sich jedoch in allen Gruppen auf einem vergleichbaren Niveau mit Ausnahme der Tiere, die großes Granulat besiedelt mit BMC erhielten. In dieser Gruppe konnte eine signifikant erhöhte M1/M2-Ratio im Vergleich zur syngenen Knochengruppe und der Gruppe "großes Granulat ohne BMC" verzeichnet

werden. Verallgemeinernd kann jedoch für alle Versuchsgruppen eine eher proinflammatorische Polarisierung der Monozyten verzeichnet werden. Es konnte in dieser Arbeit eine steigende relative Makrophagendichte bei Verwendung des kleinen Granulats mit steigender Knochenneubildung und einhergehendem ausgeprägterem Wachstum des Periosts beobachtet werden. Der Anstieg der relativen Makrophagendichte bei aktiver Knochenneubildung ist auch von Alexander et al. (2011) gezeigt worden.

Herafill-Granulat besteht aus Kalziumsulfat, Kalziumkarbonat und hydrierten Triglycerid-Tripalmitat als Bindungsmittel (Firmenangabe). Palmitat ist eine gesättigte, nicht veresterte Fettsäure (NEFA), die eine proinflammatorische Reaktionen in humanen Monozyten auslöst. So wird durch Palmitat die Freisetzung von IL-6, TNF- α (Inflammation), MCP-1 (Chemotaxis) und VEGF (Angiogenese) induziert (Kitahara et al, 2017). Das könnte ein Vorteil gegenüber herkömmlich verwendeten Knochenersatzmaterialien sein. So wurde Vollblut der Ratte für 24h mit Herafill inkubiert, was zu einer deutlich verstärkten Freisetzung von proangiogenen und chemotaktisch wirksamen Mediatoren im Vergleich zu syngenen Knochen oder β -TCP-Granulat führte. Hinzu konstatiert Brodbeck et al., (2002), dass eine hydrophile oder anionische Oberfläche eines Knochenersatzstoffs die Apoptose und eine Inhibition der Verschmelzung von den Makrophagen auslöst. Wohingegen das bei einem hydrophoben, kationischen Knochenersatzstoff nicht der Fall ist. Da das Bindungsmittel Tripalmitat des Knochenersatzmaterials Herafill hydrophobe Eigenschaften besitzt, könnte dies zu dem stimulierenden Effekt auf die Makrophagen-Reaktion beitragen. Obendrein konnte gezeigt werden, dass erhöhte Palmitatkonzentrationen die Polarisierung von Makrophagen beeinflussen und deren Reaktivität gegenüber inflammatorischen Stimuli, über die Aktivierung von JNK-Kinasen, erhöhen kann (Riera-Borull et al, 2017). Des Weiteren wurde belegt, dass hohe Palmitatdosen die Differenzierung von Makrophagen aus dem Knochenmark zum anti-inflammatorisch/prozessregulierend wirkenden M2-Subtyp unterstützt. Bei schon polarisierten Makrophagen löst Palmitat jedoch proinflammatorische

Antworten aus (Xiu et al, 2016). All die genannten Effekte auf Makrophagen und Monozyten sind auf Grund der Wichtigkeit dieser Zellen auf die Knochenheilung (siehe 2.4) von besonderem Interesse.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die Granulatgröße des Knochenersatzmaterials Herafill einen signifikanten Einfluss auf die Heilung eines kritischen Knochendefekts in Kombination mit der Masquelet-Technik aufweist. Granulat in der Größenordnung von 0,5 mm – 1,0 mm führte zu einer signifikant besseren Knochenheilung und zu einem signifikant besseren Periostwachstum im Vergleich zu größeren Granulatklassen. Ein Einfluss auf die Vaskularisierung im Defekt in Abhängigkeit von der Granulatgröße konnte nach der achtwöchigen Heilungszeit retrograd nicht nachgewiesen werden. Vaskularisierung und Knochenheilungsparameter konnten durch BMC-Transplantation nur in geringem Maße verbessert werden. Herafill (kleines Granulat) führte in situ zu einer erhöhten Akkumulation von Makrophagen, die mehrheitlich dem inflammatorischen Subtypus M1 zugeordnet werden konnten.

5 Zusammenfassung

Diese Arbeit stellte den Versuch dar, eine optimale Granulatgröße des Knochenersatzmaterials Herafill für die Knochenheilung im Femurdefektmodell der Ratte mithilfe der Masquelet-Technik zu finden und zusätzlich zu analysieren, ob sich durch die Verwendung von mononukleären Knochenmarkszellen eine weitere Verbesserung der Knochenbruchheilung dokumentieren lässt.

Für diese Studie wurden sieben verschiedene Gruppen erstellt, die sich anhand des Transplantats unterschieden (kleines, mittleres, großes Granulat jeweils mit/ohne BMC; syngener Knochen). Für das Tiermodell wurde die Ratte vom Sprague Dawley Stamm gewählt und die Versuchstiergruppen wurden nach einem vor Versuchsbeginn erstellten Randomisierungsmuster operiert.

Die Operationstechnik nach Masquelet ist eine bereits vielfach publizierte Operationstechnik, wohingegen der verwendete Knochenersatzstoff Herafill von Heraus erst einmalig in der Literatur als Antibiotikaträger gemischt mit Knochenchips beschrieben wurde.

Die Rattenfemura wurden nach den operativen Eingriffen für die Anfertigung mehrerer immunhistochemischer Färbungen aufbereitet und anschließend gefärbt. Die histologische Analyse der Knochen erfolgte zu einem anhand von hochauflösenden Übersichtsbildern der gesamten Defektzone und zu anderem von hochvergrößerten Detailaufnahmen. Die μ CT-Analyse wurde am Vascular Research Center (Uniklinikum Frankfurt) durchgeführt.

Parameter für die Auswertung waren: Knochenneubildung, Knochenmineraldichte, Vaskularisierung, Periostwachstum, Quantifizierung von MSC, Quantifizierung von Makrophagen und deren Subtypus.

Durch die Versuche konnte die Hypothese, dass sich eine geeignete Granulatgröße positiv auf die Knochenneubildung beim CSD auswirkt, bestätigt werden. Es konnte festgestellt werden, dass das Granulat in der Größenordnung von 0,5 mm – 1,0 mm zu einer signifikant besseren Knochenheilung und zu einem signifikant besseren Periostwachstum im

Vergleich zu größeren Granulatklassen führt. Des Weiteren führte das kleine Herafill-Granulat in situ zu einer erhöhten Akkumulation von Makrophagen, die mehrheitlich dem inflammatorischen Subtypus M1 zugeordnet werden konnten. Weiterhin konnte retrograd kein Einfluss auf die Vaskularisierung im Defekt in Abhängigkeit von der Granulatgröße nach achtwöchiger Heilungszeit nachgewiesen werden. Durch die BMC-Transplantation konnten nur in geringem Maße Vaskularisierung und Knochenheilungsparameter verbessert werden.

Es lässt sich sagen, dass das Knochenersatzmaterial Herafill in geeigneter Korngröße eine starke immunologische Reaktion auslöst, was die Zellmigration verstärkt und sich positiv auf die Knochenheilung auswirkt, sodass teilweise vergleichbare bis leicht verbesserte Ergebnisse im Vergleich zu dem syngenen Knochen erzielt wurde, welcher den aktuellen Therapiestandard der autologen Spongiosaplastik repräsentiert. Besonders im Hinblick auf die begrenzte Verfügbarkeit der ASP und deren Entnahmemorbiditäten könnte das Knochenersatzmaterial Herafill in Anwendung mit der Masquelet-Technik bedeutungsvoll werden.

5.1 Summary / English version

This research aims to find the perfect granules size of Herafill, the bone substitution material, using the Masquelet technique to reconstruct a critical size defect on rat femur. In addition, we investigated whether the use of bone marrow mononuclear cells (BMC) brings additional benefit to the fracture healing.

For this study seven groups, which differed by their transplant (i.e. small, middle or big granules with or without BMC) were created.

We choose the Sprague Dawley rat for our animal model and the groups were operated according to a randomization pattern.

The Masquelet technique is an already widely used surgical technique, whereas the bone substitute Herafill which is produced by Hereus was just once described in the literature as an antibiotic carrier mixed with bonechips.

After the surgical procedure, the rat femurs were processed for the immunohistochemical staining and afterwards stained. The histological analysis of the bones was performed on the basis of high-resolution overview images of the entire defect zone and also on highly magnified detailed images. The μ CT analysis was performed at the Vascular Research Center (Uniklinikum Frankfurt).

The parameters for the evaluation were: new bone formation, bone mineral density, vascularization, periosteal growth, quantification of MSC, also the quantification of macrophages and their subtypes.

The experiments confirmed the hypothesis that a suitable granule size has a positive effect on the formation of new bone in CSD. It was found that the granule of the order of 0.5 mm - 1.0 mm leads to a significantly better bone healing and to a significantly better periosteal growth compared to larger granule classes. In addition, the small Herafill granules led to an in-situ increased accumulation of macrophages, which could be attributed to the majority of the inflammatory macrophages subtype M1. However, retrograde effects on the vascularization of the defect as a function of the granule size after 8 weeks of healing time could not be demonstrated. By BMC transplantation, only a small amount of vascularization and bone healing parameters could be

improved.

Our experiments have demonstrated that in a suitable particle size, the bone substitute material Herafill triggers a strong immunological reaction, which enhances cell migration and has a positive effect on bone healing. These results are partially comparable and slightly improved compared to the syngeneic bone, which represents the autologous spongiosaplasty the current “gold standard”. Especially from the viewpoint of the limited availability of ASP and its associated comorbidities, the bone substitute material Herafill used in the Masquelet technique could become a more widely used alternative.

6 Literaturverzeichnis

1. Albrektsson T, Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J.* 2001;10(SUPPL. 2). doi:10.1007/s005860100282.
2. Alexander KA, Chang MK, Maylin ER, et al. Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model. *J Bone Miner Res.* 2011;26(7):1517-1532. doi:10.1002/jbmr.354.
3. Allen MR, Hock JM, Burr DB. Periosteum: Biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. *Bone.* 2004;35(5):1003-1012. doi:10.1016/j.bone.2004.07.014.
4. Arnsdorf EJ, Jones LM, Carter DR, Jacobs CR. The periosteum as a cellular source for functional tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 2009;15(9):2637-2642. doi:10.1089/ten.TEA.2008.0244.
5. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 1999;85(3):221-228. doi:10.1161/01.RES.85.3.221.
6. Assmus B, Dimmeler S, Zeiher AM. Cardiac cell therapy: Lost in meta-analyses. *Circ Res.* 2015;116(8):1291-1292. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306330.
7. Bellows CG, Reimers SM, Heersche JNM. Expression of mRNAs for type-1 collagen, bone sialoprotein, osteocalcin, and osteopontin at different stages of osteoblastic differentiation and their regulation by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Cell Tissue Res.* 1999;297(2):249-259. doi:10.1007/s004410051353.
8. Bernardo ME, Zaffaroni N, Novara F, et al. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells do not undergo transformation after long-term in vitro culture and do not exhibit telomere maintenance mechanisms.

- Cancer Res.* 2007;67(19):9142-9149. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4690.
9. Biau DJ, Pannier S, Masquelet AC, Glorion C. Case report: Reconstruction of a 16-cm diaphyseal defect after ewing's resection in a child. *Clin Orthop Relat Res.* 2009;467(2):572-577. doi:10.1007/s11999-008-0605-9.
 10. Bizenjima T, Takeuchi T, Seshima F, Saito A. Effect of poly (lactide-co-glycolide) (PLGA)-coated beta-tricalcium phosphate on the healing of rat calvarial bone defects: A comparative study with pure-phase beta-tricalcium phosphate. *Clin Oral Implants Res.* 2016:1360-1367. doi:10.1111/clr.12744.
 11. Bosemark P, Perdikouri C, Pelkonen M, Isaksson H, T??gil M. The masquelet induced membrane technique with BMP and a synthetic scaffold can heal a rat femoral critical size defect. *J Orthop Res.* 2015;33(4):488-495. doi:10.1002/jor.22815.
 12. Böstman OM, Laitinen OM, Tynninen O, Salminen ST, Pihlajamäki HK. Tissue restoration after resorption of polyglycolide and poly-laevo-lactic acid screws. *J Bone Joint Surg Br.* 2005;87(11):1575-1580. doi:10.1302/0301-620X.87B11.16520.
 13. Brodbeck WG, Patel J, Voskerician G, et al. Biomaterial adherent macrophage apoptosis is increased by hydrophilic and anionic substrates in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(16):10287-10292. doi:10.1073/pnas.162124199.
 14. Chang H, Knothe Tate ML. Concise review: the periosteum: tapping into a reservoir of clinically useful progenitor cells. *Stem Cells Transl Med.* 2012;1(6):480-491. doi:10.5966/sctm.2011-0056.
 15. Chang MK, Raggatt L-J, Alexander KA, et al. Osteal Tissue Macrophages Are Intercalated throughout Human and Mouse Bone Lining Tissues and Regulate Osteoblast Function In Vitro and In Vivo. *J*

- Immunol.* 2008;181(2):1232-1244. doi:10.4049/jimmunol.181.2.1232.
16. Cho SW, Soki FN, Koh AJ, et al. Osteal macrophages support physiologic skeletal remodeling and anabolic actions of parathyroid hormone in bone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2014;111(4):1545-1550. doi:10.1073/pnas.1315153111.
17. Cho T-J, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res.* 2002;17(3):513-520. doi:10.1359/jbmr.2002.17.3.513.
18. Civin CI, Gore SD. Antigenic analysis of hematopoiesis: a review. *J Hematother.* 1993;2(2):137-144. doi:10.1089/scd.1.1993.2.137.
19. Coathup MJ, Cai Q, Champion C, Buckland T, Blunn GW. The effect of particle size on the osteointegration of injectable silicate-substituted calcium phosphate bone substitute materials. *J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater.* 2013;101 B(6):902-910. doi:10.1002/jbm.b.32895.
20. Colnot C, Zhang X, Tate MLK. Current insights on the regenerative potential of the periosteum: Molecular, cellular, and endogenous engineering approaches. *J Orthop Res.* 2012;30(12):1869-1878. doi:10.1002/jor.22181.
21. Colnot C. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. *J Bone Miner Res.* 2009;24(2):274-282. doi:10.1359/jbmr.081003.
22. Cooper GM, Mooney MP, Gosain AK, Campbell PG, Losee JE, Huard J. Testing the critical size in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-size defect. *Plast Reconstr Surg.* 2010;125(6):1685-1692. doi:10.1097/PRS.0b013e3181cb63a3.
23. Coraça-Huber D, Hausdorfer J, Fille M, Nogler M, Kühn K-D. Calcium carbonate powder containing gentamicin for mixing with bone grafts. *Orthopedics.* 2014;37(8):e669-e672. Doi:10.3928/01477447-20140728-

- 50.
24. Cuthbert RJ, Churchman SM, Tan HB, McGonagle D, Jones E, Giannoudis P V. *Induced periosteum a complex cellular scaffold for the treatment of large bone defects. Bone. 2013;57(2):484-492. doi:10.1016/j.bone.2013.08.009.*
25. Cuthbert RJ, Churchman SM, Tan HB, McGonagle D, Jones E, Giannoudis P V. *Induced periosteum a complex cellular scaffold for the treatment of large bone defects. Bone. 2013;57(2):484-492. doi:10.1016/j.bone.2013.08.009.*
26. Cuthbert RJ, Churchman SM, Tan HB, McGonagle D, Jones E, Giannoudis P V. *Induced periosteum a complex cellular scaffold for the treatment of large bone defects. Bone. 2013;57(2):484-492. doi:10.1016/j.bone.2013.08.009.*
27. Davison NL, Gamblin AL, Layrolle P, Yuan H, de Bruijn JD, Barrère-de Groot F. *Liposomal clodronate inhibition of osteoclastogenesis and osteoinduction by submicrostructured beta-tricalcium phosphate. Biomaterials. 2014;35(19):5088-5097. doi:10.1016/j.biomaterials.2014.03.013.*
28. De Bari C, Dell'Accio F, Karystinou A, et al. *A biomarker-based mathematical model to predict bone-forming potency of human synovial and periosteal mesenchymal stem cells. Arthritis Rheum. 2008;58(1):240-250. doi:10.1002/art.23143.*
29. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis P V. *Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: A systematic review. Injury. 2011;42(SUPPL. 2). doi:10.1016/j.injury.2011.06.015.*
30. Dimmeler S, Zeiher AM. *Cell therapy of acute myocardial infarction: Open questions. Cardiology. 2009;113(3):155-160. doi:10.1159/000187652.*

31. Ehrler DM, Vaccaro a R. *The use of allograft bone in lumbar spine surgery. Clin Orthop Relat Res.* 2000;(371):38-45.
doi:10.1097/00003086-200002000-00005.
32. Einhorn T a, Gerstenfeld LC. *Fracture healing: mechanisms and interventions. Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(1):45-54.
doi:10.1038/nrrheum.2014.164.
33. Einhorn TAM. *The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing : Clinical Orthopaedics and Related Research. Clin Orthop Relat Res.* 1998:S7-S21.
http://journals.lww.com/corr/Abstract/1998/10001/The_Cell_and_Molecular_Biology_of_Fracture_Healing.3.aspx.
34. Eldesoqi K, Seebach C, Ngoc CN, et al. *High calcium bioglass enhances differentiation and survival of endothelial progenitor cells, inducing early vascularization in critical size bone defects. PLoS One.* 2013;8(11).
doi:10.1371/journal.pone.0079058.
35. Fayaz HC, Giannoudis P V., Vrahas MS, et al. *The role of stem cells in fracture healing and nonunion. Int Orthop.* 2011;35(11):1587-1597.
doi:10.1007/s00264-011-1338-z.
36. Feldesman MR, Kleckner JG, Lundy JK. *Femur/stature ratio and estimates of stature in mid??? and late???pleistocene fossil hominids. Am J Phys Anthropol.* 1990;83(3):359-372.
doi:10.1002/ajpa.1330830309.
37. Gerstenfeld LC, Alkhiary YM, Krall EA, et al. *Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. J Histochem Cytochem.* 2006;54(11):1215-1228. doi:10.1369/jhc.6A6959.2006.
38. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. *Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. J Cell Biochem.* 2003;88(5):873-884. doi:10.1002/jcb.10435.

39. Giannoudis P V, Faour O, Goff T, Kanakaris N, Dimitriou R. *Masquelet technique for the treatment of bone defects: tips-tricks and future directions.* *Injury.* 2011;42(6):591-598. doi:10.1016/j.injury.2011.03.036.
40. Giannoudis P V., Dinopoulos H, Tsiridis E. *Bone substitutes: An update.* *Injury.* 2005;36(3):S20-S27. doi:10.1016/j.injury.2005.07.029.
41. Giannoudis P V., Einhorn TA, Marsh D. *Fracture healing: The diamond concept.* *Injury.* 2007;38(4 SUPPL.). doi:10.1016/S0020-1383(08)70003-2.
42. Giannoudis P V., Einhorn TA, Schmidmaier G, Marsh D. *The diamond concept - open questions.* *Injury.* 2008;39(SUPPL.2). doi:10.1016/S0020-1383(08)70010-X.
43. Gouron R, Deroussen F, Plancq MC, Collet LM. *Bone defect reconstruction in children using the induced membrane technique: A series of 14 cases.* *Orthop Traumatol Surg Res.* 2013;99(7):837-843. doi:10.1016/j.otsr.2013.05.005.
44. Gouron R. *Surgical technique and indications of the induced membrane procedure in children.* *Orthopaedics and Traumatology: Surgery and Research.* 2015.
45. Graham S, Leonidou A, Lester M, Heliotis M, Mantalaris A, Tsiridis E. *Investigating the role of PDGF as a potential drug therapy in bone formation and fracture healing.* *Expert Opin Investig Drugs.* 2009;18(11):1633-1654. doi:10.1517/13543780903241607.
46. Grcevic D, Pejda S, Matthews BG, et al. *In vivo fate mapping identifies mesenchymal progenitor cells.* *Stem Cells.* 2012;30(2):187-196. doi:10.1002/stem.780.
47. Haasters F, Docheva D, Gassner C, et al. *Mesenchymal stem cells from osteoporotic patients reveal reduced migration and invasion upon stimulation with BMP-2 or BMP-7.* *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;452(1):118-123. doi:10.1016/j.bbrc.2014.08.055.

48. Henrich D, Seebach C, Nau C, et al. Establishment and characterization of the Masquelet induced membrane technique in a rat femur critical-sized defect model. *J Tissue Eng Regen Med.* 2016;10(10):E382-E396. doi:10.1002/term.1826.
49. Henrich D, Seebach C, Verboket R, Schaible A, Marz I, Bonig H. The osteo-inductive activity of bone-marrow-derived mononuclear cells resides within the CD14+ population and is independent of the CD34+ population. *Eur Cells Mater.* 2018;35:165-177. doi:10.22203/eCM.v035a12.
50. Henrich D, Verboket R, Schaible A, et al. Characterization of bone marrow mononuclear cells on biomaterials for bone tissue engineering in vitro. *Biomed Res Int.* 2015;2015:762407. doi:10.1155/2015/762407.
51. Hernigou P, Mathieu G, Poignard a, Manicom O, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Surgical technique. *J Bone Joint Surg Am.* 2006;88 Suppl 1:322-327. doi:10.2106/JBJS.F.00203.
52. Hoerth RM, Seidt BM, Shah M, et al. Mechanical and structural properties of bone in non-critical and critical healing in rat. In: *Acta Biomaterialia.* Vol 10. ; 2014:4009-4019. doi:10.1016/j.actbio.2014.06.003.
53. Hollinger J, Wong MEK. The integrated processes of hard tissue regeneration with special emphasis on fracture healing. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology.* 1996;82(6):594-606. doi:10.1016/S1079-2104(96)80431-8.
54. Hoppe A, Güldal NS, Boccaccini AR. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics. *Biomaterials.* 2011;32(11):2757-2774. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.004.
55. Jäger M, Sager M, Lensing-Höhn S, Krauspe R. The critical size bony

- defect in a small animal for bone healing studies (I): Comparative anatomical study on rats' femur. *Biomed Tech (Berl)*. 2005;50(4):107-110. doi:10.1515/BMT.2005.015.
56. Janko M, Sahm J, Schaible A, et al. Comparison of three different types of scaffolds preseeded with human bone marrow mononuclear cells on the bone healing in a femoral critical size defect model of the athymic rat. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018;12(3):653-666. doi:10.1002/term.2484.
57. Jeon O, Song SJ, Bhang SH, Choi CY, Kim MJ, Kim BS. Additive effect of endothelial progenitor cell mobilization and bone marrow mononuclear cell transplantation on angiogenesis in mouse ischemic limbs. *J Biomed Sci*. 2007;14(3):323-330. doi:10.1007/s11373-007-9145-7.
58. 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.
59. Karger C, Kishi T, Schneider L, Fitoussi F, Masquelet AC. Treatment of posttraumatic bone defects by the induced membrane technique. *Orthop Traumatol Surg Res*. 2012;98(1):97-102. doi:10.1016/j.otsr.2011.11.001.
60. Keating JF, McQueen MM. Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *J Bone Jt Surg Br*. 2001;83(1):3-8. doi:10.1302/0301-620X.83B1.11952.
61. Keramaris NC, Calori GM, Nikolaou VS, Schemitsch EH, Giannoudis P V. Fracture vascularity and bone healing: A systematic review of the role of VEGF. *Injury*. 2008;39(SUPPL.2). doi:10.1016/S0020-1383(08)70015-9.
62. Khramtsova G, Liao C, Khramtsov A, et al. The M2/Alternatively Activated Macrophage Phenotype Correlates with Aggressive Histopathologic Features and Poor Clinical Outcome in Early Stage Breast Cancer. *Cancer Res*. 2010;69(24 Supplement):107-107. doi:10.1158/0008-5472.SABCS-09-107.

63. Kitahara A, Takahashi K, Morita N, et al. *The novel mechanisms concerning the inhibitions of palmitate-induced proinflammatory factor releases and endogenous cellular stress with astaxanthin on MIN6 β -cells.* *Mar Drugs.* 2017;15(6). doi:10.3390/md15060185.
64. Kitaori T, Ito H, Schwarz EM, et al. *Stromal cell-derived factor 1/CXCR4 signaling is critical for the recruitment of mesenchymal stem cells to the fracture site during skeletal repair in a mouse model.* *Arthritis Rheum.* 2009;60(3):813-823. doi:10.1002/art.24330.
65. Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. *Tissue engineering of bone: The reconstructive surgeon's point of view.* *J Cell Mol Med.* 2006;10(1):7-19. doi:10.1111/j.1582-4934.2006.tb00287.x.
66. Kühne JH, Bartl R, Frisch B, Hammer C, Jansson V, Zimmer M. *Bone formation in coralline hydroxyapatite. Effects of pore size studied in rabbits.* *Acta Orthop Scand.* 1994;65(3):246-252. doi:10.3109/17453679408995448.
67. Kurahara H, Shinchi H, Matakai Y, et al. *Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer.* *J Surg Res.* 2011;167(2). doi:10.1016/j.jss.2009.05.026.
68. Laschke MW, Strohe A, Menger MD, Alini M, Eglin D. *In vitro and in vivo evaluation of a novel nanosize hydroxyapatite particles/poly(ester-urethane) composite scaffold for bone tissue engineering.* *Acta Biomater.* 2010;6(6):2020-2027. doi:10.1016/j.actbio.2009.12.004.
69. Lee K, Chan CK, Patil N, Goodman SB. *Cell therapy for bone regeneration--bench to bedside.* *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;89(1):252-263. doi:10.1002/jbm.b.31199.
70. Li J, Zhang H, Yang C, Li Y, Dai Z. *An overview of osteocalcin progress.* *J Bone Miner Metab.* 2016;34(4):367-379. doi:10.1007/s00774-015-0734-7.
71. Lichte P, Pape HC, Pufe T, Kobbe P, Fischer H. *Scaffolds for bone*

- healing: Concepts, materials and evidence. *Injury*. 2011;42(6):569-573. doi:10.1016/j.injury.2011.03.033.
72. Little N, Rogers B, Flannery M. Bone formation, remodelling and healing. *Surgery*. 2011;29(4):141-145. doi:10.1016/j.mpsur.2011.01.002.
73. LK Huffman, JG Harris, M Suk. "Using the bi-masquelet technique and reamer-irrigator-aspirator for post-traumatic foot reconstruction," *Foot and Ankle International*, 2009, vol. 30, no. 9, pp. 895–899,
74. Lu C, Miclau T, Hu D, et al. Cellular basis for age-related changes in fracture repair. *J Orthop Res*. 2005;23(6):1300-1307. doi:10.1016/j.orthres.2005.04.003.1100230610.
75. Ludwig SC, Boden SD. Osteoinductive bone graft substitutes for spinal fusion: A basic science summary. *Orthop Clin North Am*. 1999;30(4):635-645. doi:10.1016/S0030-5898(05)70116-4.
76. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25(12):677-686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015.
77. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551-555. doi:10.1016/j.injury.2011.03.031.
78. Marsell R. The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury*. 2009;40:S4-S7. doi:10.1016/S0020-1383(09)70003-8.
79. Masquelet a C, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft. *Ann Chir Plast Esthet*. 2000;45(3):346-353.
80. Mauffrey C, Hake ME, Chadayammuri V, Masquelet A-C. Reconstruction of Long Bone Infections Using the Induced Membrane Technique: Tips and Tricks. *J Orthop Trauma*. 2015.

- doi:10.1097/BOT.0000000000000500.
81. McCarthy HS, Williams JH, Davie MW, Marshall MJ. Platelet-derived growth factor stimulates osteoprotegerin production in osteoblastic cells. *J Cell Physiol.* 2009;218(2):350-354. doi:10.1002/jcp.21600.
 82. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):958-969. doi:10.1038/nri2448.
 83. Mountziaris PM, Mikos AG. Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2008;14(2):179-186. doi:10.1089/ten.teb.2008.0038.
 84. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol.* 2011;11(11):723-737. doi:10.1038/Nri3073.
 85. Nau C, Henrich D, Seebach C, et al. Treatment of Large Bone Defects with a Vascularized Periosteal Flap in Combination with Biodegradable Scaffold Seeded with Bone Marrow-Derived Mononuclear Cells: An Experimental Study in Rats. *Tissue Eng Part A.* 2016;22(1-2):133-141. doi:10.1089/ten.tea.2015.0030.
 86. Ning H, Lin G, Lue TF, Lin CS. Mesenchymal stem cell marker Stro-1 is a 75kd endothelial antigen. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;413(2):353-357. doi:10.1016/j.bbrc.2011.08.104.
 87. O'Malley NT, Kates SL. Advances on the Masquelet technique using a cage and nail construct. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2012;132(2):245-248. doi:10.1007/s00402-011-1417-z.
 88. Ogle ME, Segar CE, Sridhar S, Botchwey EA. Monocytes and macrophages in tissue repair: Implications for immunoregenerative biomaterial design. *Exp Biol Med.* 2016;241(10):1084-1097. doi:10.1177/1535370216650293.
 89. Pape H-C, Marcucio R, Humphrey C, Colnot C, Knobe M, Harvey EJ.

- Trauma-induced inflammation and fracture healing. J Orthop Trauma. 2010;24(9):522-525. doi:10.1097/BOT.0b013e3181ed1361.*
90. *Pelissier P, Martin D, Baudet J, Lepreux S, Masquelet A-C. Behaviour of cancellous bone graft placed in induced membranes. Br J Plast Surg. 2002;55(7):596-598. doi:10.1054/bjps.2002.3936.*
91. *Pelissier P, Masquelet AC, Bareille R, Mathoulin Pelissier S, Amedee J. Induced membranes secrete growth factors including vascular and osteoinductive factors and could stimulate bone regeneration. J Orthop Res. 2004;22(1):73-79. doi:10.1016/S0736-0266(03)00165-7.*
92. *Petrie Aronin CE, Sadik KW, Lay AL, Rion DB, Tholpady SS, Ogle RC, Botchwey EA. Comparative effects of scaffold pore size, pore volume, and total void volume on cranial bone healing patterns using microsphere-based scaffolds. J Biomed Mater Res A. 2009 Jun;89(3):632-41.*
93. *Prieto EM, Talley AD, Gould NR, et al. Effects of particle size and porosity on in vivo remodeling of settable allograft bone/polymer composites. J Biomed Mater Res - Part B Appl Biomater. 2015;103(8):1641-1651. doi:10.1002/jbm.b.33349.*
94. *Riera-Borrull M, Cuevas VD, Alonso B, et al. Palmitate Conditions Macrophages for Enhanced Responses toward Inflammatory Stimuli via JNK Activation. J Immunol. 2017;ji1700845. doi:10.4049/jimmunol.1700845.*
95. *Rosset P, Deschaseaux F, Layrolle P. Cell therapy for bone repair. Orthop Traumatol Surg Res. 2014;100(1S):S107-S112. doi:10.1016/j.otsr.2013.11.010.*
96. *Rubio D, Garcia-Castro J, Mart??n MC, et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. Cancer Res. 2005;65(8):3035-3039. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4194.*
97. *Rundle C, Wang H, Yu H, et al. Microarray analysis of gene expression*

- during the inflammation and endochondral bone formation stages of rat femur fracture repair. *Bone*. 2006;38(4):521-529.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T4Y-4HNYMMX-1/2/bb40ab4d2fdb1f99e2fb5d8e48faf34d>.
98. Rupp A, Schmahl W, Lederer W, Matiasek K. Strain differences in the branching of the sciatic nerve in rats. *J Vet Med Ser C Anat Histol Embryol*. 2007;36(3):202-208. doi:10.1111/j.1439-0264.2007.00751.x.
99. Schenk, R. K. (1975): *Histology of primary bone healing*. *Fortschr Kiefer Gesichtschir.*, 19:8-12.
100. Seebach C, Henrich D, Kähling 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 Eng Part A*. 2010;16(6):1961-1970. doi:10.1089/ten.tea.2009.0715.
101. Seebach C, Henrich D, Meier S, Nau C, Bonig H, Marzi I. Safety and feasibility of cell-based therapy of autologous bone marrow-derived mononuclear cells in plate-stabilized proximal humeral fractures in humans. *J Transl Med*. 2016;14(1). doi:10.1186/s12967-016-1066-7.
102. Seebach C, Henrich D, Schaible A, et al. Cell based therapy by implanted humane bone marrow-derived mononuclear cells (BMC) improved bone healing of large bone defects in rats. *Tissue Eng Part A*. 2015. doi:10.1089/ten.TEA.2014.0410.
103. Shapiro F. Cortical bone repair. The relationship of the lacunar-canalicular system and intercellular gap junctions to the repair process. *J Bone Joint Surg Am*. 1988;70(7):1067-1081.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2745495>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3042791>.
104. Shrivats AR, McDermott MC, Hollinger JO. Bone tissue engineering: State of the union. *Drug Discov Today*. 2014;19(6):781-786.

- doi:10.1016/j.drudis.2014.04.010.
105. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect . *Nat Protoc.* 2012;7(10):1918-1929. doi:10.1038/nprot.2012.113 [doi].
 106. Squier CA, Ghoneim S, Kremenak CR. Ultrastructure of the periosteum from membrane bone. *J Anat.* 1990;171:233-239. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2081707><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1257144>.
 107. Tarchala M, Harvey EJ, Barralet J. Biomaterial-Stabilized Soft Tissue Healing for Healing of Critical-Sized Bone Defects: The Masquelet Technique. *Adv Healthc Mater.* 2016;5(6):630-640. doi:10.1002/adhm.201500793.
 108. Tjardes T, Otchwemah R, Hausmann D, et al. Rekonstruktion segmentaler Knochendefekte. Stellenwert der spongiosaplastik. *Trauma und Berufskrankheit.* 2012;14(2):77-82. doi:10.1007/s10039-012-1884-7.
 109. Tong K, Zhong Z, Peng Y, et al. Masquelet technique versus Ilizarov bone transport for reconstruction of lower extremity bone defects following posttraumatic osteomyelitis. *Injury.* 2017;48(7):1616-1622. doi:10.1016/j.injury.2017.03.042.
 110. Tsuji K, Bandyopadhyay A, Harfe BD, et al. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet.* 2006;38(12):1424-1429. doi:10.1038/ng1916.
 111. VandeVord PJ, Nasser S, Wooley PH. Immunological responses to bone soluble proteins in recipients of bone allografts. *J Orthop Res.* 2005;23(5):1059-1064. doi:10.1016/j.orthres.2004.12.004.
 112. Veisheh O, Doloff JC, Ma M, et al. Size- and shape-dependent foreign body immune response to materials implanted in rodents and

- non-human primates. Nat Mater. 2015;14(6):643-651.*
doi:10.1038/nmat4290.
113. Verboket R, Leiblein M, Seebach C, et al. Autologous cell-based therapy for treatment of large bone defects: from bench to bedside. *European journal of trauma and emergency surgery : official publication of the European Trauma Society. http://dx.doi.org/10.1007/s00068-018-0906-y. Published 2018.*
114. Vi L, Baht GS, Whetstone H, et al. Macrophages promote osteoblastic differentiation in-vivo: Implications in fracture repair and bone homeostasis. *J Bone Miner Res. 2015;30(6):1090-1102.*
doi:10.1002/jbmr.2422.
115. Viateau V, Guillemin G, Calando Y, et al. Induction of a barrier membrane to facilitate reconstruction of massive segmental diaphyseal bone defects: An ovine model. *Vet Surg. 2006;35(5):445-452.*
doi:10.1111/j.1532-950X.2006.00173.x.
116. Wang C, Zhong D, Zhou X, et al. Preparation of a new composite combining strengthened ??-tricalcium phosphate with platelet-rich plasma as a potential scaffold for the repair of bone defects. *Exp Ther Med. 2014;8(4):1081-1086. doi:10.3892/etm.2014.1912.*
117. Wang X, Wang Y, Gou W, Lu Q, Peng J, Lu S. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: A review. *Int Orthop. 2013;37(12):2491-2498. doi:10.1007/s00264-013-2059-2.*
118. Williams DF. *Definitions in Biomaterials: Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials.;* 1987.
119. Wong TM, Lau TW, Li X, Fang C, Yeung K, Leung F. Masquelet technique for treatment of posttraumatic bone defects. *ScientificWorldJournal. 2014;2014:710302. doi:10.1155/2014/710302.*
120. Wu AC, Raggatt LJ, Alexander KA, Pettit AR. *Unraveling*

- macrophage contributions to bone repair. Bonekey Rep. 2013;2.*
doi:10.1038/bonekey.2013.107.
121. Xiu F, Diao L, Qi P, Catapano M, Jeschke MG. Palmitate differentially regulates the polarization of differentiating and differentiated macrophages. *Immunology. 2016;147(1):82-96. doi:10.1111/imm.12543.*
122. Yu YY, Lieu S, Lu C, Colnot C. Bone morphogenetic protein 2 stimulates endochondral ossification by regulating periosteal cell fate during bone repair. *Bone. 2010;47(1):65-73.*
doi:10.1016/j.bone.2010.03.012.
123. Zigdon-Giladi H, Bick T, Lewinson D, Machtei EE. Co-Transplantation of endothelial progenitor cells and mesenchymal stem cells promote neovascularization and bone regeneration. *Clinical Implant Dentistry and Related Research. 2013.*

7 Abkürzungsverzeichnis

ASP	-	autologe Spongiosaplastik
BMC	-	Mononukleäre Knochenmarkszellen
BMD	-	Knochenmineraldichte
BTE	-	bone tissue engineering
BMP-2	-	bone-morphogenetic-protein-2
ca.	-	circa
CSD	-	critical size defect
EPC	-	Endotheliale Vorläuferzellen
ggr.	-	Geringgradig
HPC	-	hämatopoetischen Vorläuferzellen
hgr.	-	Hochgradig
IL-1	-	Interleukin-1
M-CSF	-	macrophage colony-stimulating factor
mgr.	-	Mittelgradig
MSC	-	Mesenchymale Stammzellen
OPG	-	Osteoprotegerin
PDGF	-	platelet-derived growth factor
RANK-Ligand	-	receptor for activation of nuclear factor kappa-b ligand
SMA	-	smooth muscle antigen
SDF-1	-	stromal cell-derived factor-1
TE	-	tissue engineering
TGF- β 2	-	transforming growth factor-beta 2
T N F - α	-	Tumor Nekrose Faktor-Alpha

7 Abkürzungsverzeichnis

u.a.	-	unter anderem
VEGF	-	vascular endothelial growth factor

8 Curriculum Vitae

Elias Andreas Thomas Koch

9 Danksagung

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

Prof. Dr. phil. nat. Dirk Henrich für die wissenschaftliche Betreuung, die Unterstützung bei der Versuchsdurchführung und den unerschöpflichen Fundus an thematischen und wissenschaftlichen Hinweisen,

Prof. Dr. Ingo Marzi für die initiale Kontaktherstellung und Unterstützung,

Dr. med. Maximilian Leiblein, Andreas Winkenbach und Alexander Schaible für die engagierte Projektunterstützung und immer funktionierende Zusammenarbeit.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, die mich nicht nur in diesem Werk, sondern auch in jeder Lebensphase mit maximalen Beistand unterstützen. Auch meiner restlichen Familie und meinen langjährigen Freunden möchte ich für die Hilfsbereitschaft und die Unterstützung herzlich danken.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Freundin und Partnerin, die mir immer mit viel Rat und Tat zur Seite steht und mir in allen Zeiten eine emotionale Stütze ist.

10 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

„Einfluss der Granulatgröße des Knochenersatzmaterials Herafill und der *bone marrow mononuclear cells* auf die Knochendefektheilung unter Verwendung der induzierten Membrantechnik nach Masquelet in vivo“

in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie unter Betreuung und Anleitung von Prof. 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.

(Ort, Datum)

(Unterschrift)