

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

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

**Ersatz der induzierten Masquelet-Membran durch eine
Kombination aus dezellularisierter Dermis und reparativen
Zellen in Hinblick auf den zellulären Besatz**

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

vorgelegt von
Tobias Kolb

aus Rüsselsheim am Main

Frankfurt am Main, 2022

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Dirk Henrich
Korreferent/in:	Prof. Dr. Roland Kaufmann
Tag der mündlichen Prüfung:	17.10.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Knochenheilung.....	1
1.1.1 Direkte (primäre) Knochenheilung.....	2
1.1.2 Indirekte (sekundäre) Knochenheilung.....	2
1.2 Tissue engineering.....	3
1.3 β -Tri-Calcium-Phosphat (β -TCP).....	5
1.4 Osteoinduktive Zellen.....	5
1.5 Masquelet Technik.....	7
1.6 Epiflex.....	8
1.7 Ziel der Arbeit.....	10
2. Material und Methoden:.....	11
2.1 Material.....	11
2.1.1 Geräte und Material.....	11
2.1.2 Chemikalien.....	13
2.1.3 Antikörper.....	15
2.1.4 Medikamente.....	15
2.1.5 Chirurgische Instrumente.....	15
2.2. Methoden.....	16
2.2.1 Auswahl und Pflege der Tiere.....	16
2.2.2 Versuchsaufbau.....	17
2.2.3 Isolierungen der BMC aus der Spenderratte.....	18
2.2.4 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer.....	18
2.2.5 Beladung der Epiflex-Membran.....	19
2.2.6 Beladung des β -TCP.....	20
2.2.7 Erfolgskontrolle mittels DAPI.....	20
2.2.8 Operation der Versuchstiere.....	21
2.2.9 Markierung der Tiere.....	23
2.2.10 Postoperative Versorgung der Versuchstiere.....	24
2.2.11 Sacrifice.....	24
2.2.12 Dekalzifizierung der Knochen.....	25
2.2.13 Einbettung und Schneiden der Knochen.....	25
2.2.14 Entparaffinierung.....	26
2.2.15 MOVAT-Färbung (Übersichtsfärbung Knochen-Knorpel).....	26
2.2.16 CD68-Färbung zum Nachweis von Makrophagen.....	27
2.2.17 Von-Willebrand Färbung zum Nachweis unreifer Blutgefäße.....	28
2.2.18 α -SMA Färbung zum Nachweis reifer Blutgefäße.....	29
2.2.18 CAE Färbung zum Nachweis neutrophiler Granulozyten.....	29
2.2.19 Auswertung der Färbungen.....	29

2.3 Statistik	30
3. Ergebnisse.....	31
3.1 Kontrolle der β -TCP-Beladung mit BMC über die DAPI-Färbung.....	31
3.2 Chirurgische Komplikationen	31
3.3 Beurteilung der Knochenneubildung mittels MOVAT	32
3.4 Beurteilung des Entzündungsvorgangs	37
3.4.1 CAE-Färbung.....	37
3.4.2 CD68-Färbung	41
3.5 Beurteilung der Angiogenese	46
3.5.1 vWF-Färbung.....	46
3.5.2 α -SMA-Färbung	50
4. Diskussion	54
4.1 Die Epiflex-Membran ist ein vergleichbares Medium zur Knochenheilung im Vergleich zur induzierten Membran	55
4.2 Die Epiflex-Membran ist immunologisch nicht reaktiv und führt auch in Kombination mit BMCs nicht zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion	57
4.3 Die Epiflex-Membran bildet kein Hindernis für die Vaskularisierung und wird im gleichen Umfang im Vergleich zur induzierten Membran mit Gefäßen durchzogen .	59
4.4 Einfluss der BMCs auf den Heilungsprozess	60
4.5 Das einzeitige Verfahren ist dem zweizeitigen Verfahren nach Masquelet nicht unterlegen	63
5. Zusammenfassung	66
6. Summary	68
7. Quellen	70
8. Anhänge	84
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	84
8.2 Abbildungsverzeichnis.....	85
8.3 Tabellenverzeichnis.....	85
8.4. Danksagung	86
8.5. Schriftliche Erklärung.....	87

1. Einleitung

Knochendefekte sind ein häufig anzutreffendes Krankheitsbild im klinischen Alltag. Ihre Entstehung ist multifaktoriell, wie etwa Trauma, onkologische Resektion oder Osteomyelitiden. Gerade große Defekte stellen eine Herausforderung für Behandler, Patient und das Gesundheitssystem dar^{1,2}. Heilt ein Knochendefekt auch bei korrekter Stabilisierung mittels Osteosynthese nicht in der Lebenszeit des Patienten aus, spricht man von einem „*Critical Size Defect*“ (CSD)³. Diese Defekte benötigen eine zusätzliche Versorgung, wie etwa allogene Knochentransplante - zum Beispiel ein Stück Beckenkamm. Die Vorhersage, ob ein gegebener Knochendefekt kritisch ist, ist allerdings nach wie vor sehr schwierig, da es von vielen verschiedenen Faktoren, wie etwa dem umliegenden Weichteilgewebe, Blutversorgung, Menge des fehlenden Knochens⁴, etc. abhängig ist^{5,6}. Ein kritische Grenze, bei der die Rate an CSD stark ansteigt, scheint allerdings ein Defekt von mehr als ein bis zwei Zentimetern oder ein Verlust der Zirkumferenz um mehr als 50% zu sein^{3,4}.

1.1 Knochenheilung

Die Knochenheilung beschreibt das Wiederherstellen der Knochenkontinuität nach Verlust dieser. Das Besondere am Organ „Knochen“ ist jedoch, dass der Knochen auch im Erwachsenenalter noch zur Regeneration fähig ist und nicht durch minderwertiges Narbengewebe ersetzt wird⁷. Dieser Prozess ist jedoch hochkomplex und beinhaltet das Zusammenspiel einer Vielzahl von Zellen, Umgebungsfaktoren und Proteinen. Um ungehindert ablaufen zu können, benötigt die Knochenheilung osteogene Zellen, Wachstumsfaktoren, eine geeignete mechanische Umgebung⁸ und eine osteokonduktive extrazelluläre Matrix (diamond concept)⁹. Darüber hinaus spielen viele weitere beeinflussbare und nicht beeinflussbare Faktoren hinein wie der Ernährungszustand des Patienten, Vorerkrankungen wie Diabetes oder Osteoporose, Alter und Nikotinabusus oder auch die Dauermedikation des Patienten wie NSAR, Steroide¹⁰ oder Osteoporosemedikamente¹¹.

1.1.1 Direkte (primäre) Knochenheilung

Zur direkten Knochenheilung kommt es bei direktem Kontakt der Frakturrenden bei absoluter Stabilität. Der große Vorteil der direkten Knochenheilung ist die fehlende bis minimale Kallusbildung und der schnelle Ablauf allerdings findet man diese aufgrund dieser strikten Anforderungen nur selten. Sie wird meist chirurgisch durch das ORIF-Verfahren (*open reduction internal fixation*) angestrebt, indem die Frakturrenden fest aufeinandergedrückt und z.B. mit einer Platte fixiert werden. Bei einer Spaltdicke von unter 0,01 mm kommt es zur Kontaktheilung. Dabei beginnen die Osteoklasten der fraktur nahen Osteone neue Havers-Kanäle entlang der Knochenachse durch den Frakturspalt zu ziehen. Hinter den Osteoklasten folgen Osteoblasten, welche die Knochenmatrix wiederaufbauen. Der Komplex aus Osteoklasten und Osteoblasten wird in diesem Zusammenhang „*cutting cone*“ genannt. Im nächsten Schritt können neue Blutgefäße einsprießen, welche weitere Zellen und Nährstoffe an die Frakturstelle befördern. Abschließend wird der neugebildete Knochen nach Wolffs-Gesetz den Belastungsanforderungen des Knochens entsprechend umgebaut (Remodelling)¹².

Ist der Spalt größer 0,01 mm und kleiner als 0,5 mm kommt es zur Spaltheilung, indem osteogene Vorläuferzellen in den Frakturspalt einwandern und sich zu Osteoblasten differenzieren. Diese füllen den Spalt mit Lamellenknochen, der noch nicht an die Belastungsachse des Knochens angepasst ist und dementsprechend noch keine ausreichende Stabilität besitzt. Erst sekundär kommt es zur Bildung der *cutting cones*, welche den neugebildeten Knochen in oben beschriebener Weise umbauen.

1.1.2 Indirekte (sekundäre) Knochenheilung

Sind obige Bedingungen nicht gegeben, wie beispielsweise bei Fixierungen im Gips oder mit Marknagel, kommt es zur indirekten Knochenheilung. Dabei werden je nach Quelle 3-5 Phasen unterschieden, welche sich allerdings nicht klar trennen lassen. Zunächst kommt es durch das Trauma zu einem Hämatom im Frakturspalt, welches Immunzellen und Thrombozyten an die Frakturstelle transportiert (Hämatomphase). Die Immunzellen beginnen nun Zytokine und

Entzündungsfaktoren, wie z.B. IL-1, IL-6 und TNF- α , zu sezernieren und damit weitere Immunzellen und mesenchymale Stammzellen (MSC) chemotaktisch anzulocken (Inflammationsphase). Wichtig in diesem Zusammenhang sind auch die *bone morphogenic proteins* (BMP). Diese fördern die Differenzierung der MSCs zu Chondrozyten und Osteoblasten. Weiterhin beginnt die erste Koagulation des Frakturhämatoms mit einem Netz aus Fibrin und Thrombozyten, wodurch die Fraktur eine erste Stabilität erhält.

Nach Abklingen der Entzündung folgt die Granulationsphase oder auch Phase des weichen Kallus. Dabei beginnen die Makrophagen nekrotisches Gewebe abzutragen, welches durch Granulationsgewebe ersetzt wird. Daraufhin bauen Chondrozyten im Sinne einer enchondralen Ossifikation Knorpelgewebe im Defekt auf und verbessern durch diesen „weichen Kallus“ die Knochenstabilität. Gleichzeitig bilden Osteoblasten subperiostal an den Frakturrenden durch desmale Ossifikation eine Knochenmanschette um den weichen Kallus. Zusätzlich sezernieren Chondrozyten und Osteoblasten pro-angiogene Substanzen wie *vascular endothelial growth factor* (VEGF), um die Blutversorgung des neuen Gewebes sicherzustellen. In der folgenden Phase des harten Kallus hypertrophieren die Chondrozyten, sezernieren Calcium in die extrazelluläre Matrix (EZM) und sterben ab. Die so vorbereitete EZM wird nun von Osteoklasten und -blasten in gewohnter Weise zu Geflechtknochen umgebaut. Auch wenn der entstehende „harte Kallus“ bereits steif und stabil ist, erreicht er dennoch nicht die Eigenschaften des originalen Knochens. Um dies zu bewerkstelligen, schließt sich auch hier ein Remodelling an, bei dem der Geflechtknochen durch Lamellenknochen ersetzt wird und der Knochen so seine alte Stabilität erhält.

1.2 Tissue engineering

Beim *Tissue engineering* geht es darum Körpergewebe künstlich aufzubauen. Besonders relevant ist dies bei sehr großen Knochendefekten, da hier die körpereigenen Zellen die Lücke häufig nicht überbrücken können und chirurgisch eine „Brücke“ zwischen den Bruchenden aufgebaut werden muss. Der Goldstandard ist hierfür autologes Knochenmaterial, z.B. aus dem Beckenkamm.

Dieses führt zu keiner Immunreaktion, bietet ein gutes Gerüst und Reservoir für osteogene Zellen und besitzt, falls chirurgisch mittransplantiert, eine intakte Blutversorgung. Allerdings steht nur begrenzt viel Knochenmaterial zur Transplantation zur Verfügung und an der Entnahmestelle können zusätzliche Komplikationen, wie Schmerzen und Bewegungseinschränkungen entstehen¹³. Außerdem sind vaskularisierte Transplantate zwar im Outcome den unvaskularisierten Transplantaten überlegen, allerdings sind diese technisch schwierig zu gewinnen, verpflanzen, verlängern die OP Dauer und den Krankenhausaufenthalt¹⁴ und bieten eine unbefriedigende Gefäßdurchgängigkeit¹⁵.

Allo- oder xenogene Transplantate, wie etwa von Rindern¹⁶, stehen zwar in ausreichenden Mengen zur Verfügung, können jedoch zu Immunreaktionen führen und mit Bakterien und Viren kontaminiert sein. Außerdem müssen sie sterilisiert werden, wobei alle Zellen abgetötet werden und die Osteogenität eliminiert wird.

Künstliche Materialien aus dem Labor scheinen eine vielversprechende Alternative darzustellen¹⁷. Wichtig sind dabei drei Eigenschaften: Osteokonduktivität, Osteoinduktivität und die Möglichkeit zur Vaskularisierung¹⁸. Das optimale Knochenersatzmaterial interagiert mit der Knochenmatrix und bietet ein gutes Gerüst für osteogene Zellen. Außerdem ist es idealerweise biologisch abbaubar in einer Rate, die dem Knochenaufbau entspricht. So kann nach und nach das Ersatzmaterial durch echten Knochen ersetzt werden. Zersetzt es sich zu schnell wird die Fraktur wieder instabil. Zersetzt es sich zu langsam wird die Knochenheilung gehemmt. Weiterhin sollte es die Knochenheilung selbst anregen und so osteoinduktiv wirken. Dies kann erreicht werden, indem das Material mit Zellen oder Botenstoffen, wie etwa BMPs, beladen wird. Darüber hinaus muss auch eine ausreichende Vaskularisierung gewährleistet werden, um zum einen körpereigene Immun- und Stammzellen zur Fraktur zu bringen, als auch um die eingebrachten Zellen und die beginnende Heilung mit Nährstoffen zu versorgen. Dazu kann zum Beispiel das Ersatzmaterial mit Wachstumsfaktoren, wie VEGF oder PDGF, beladen werden.

1.3 β -Tri-Calcium-Phosphat (β -TCP)

Beim β -TCP handelt es sich um eine Calciumphosphat-Keramik, welche sich durch eine ausgezeichnete Biokompatibilität auszeichnet und bereits erfolgreich in der Behandlung von Patienten eingesetzt wird^{19,20}. Des Weiteren zeigen bereits einige Studien eine vergleichbare Effektivität wie autologer Knochen²¹. So lagert es sich an vorhandenen Knochen an und fördert dessen Bildung. Das Material an sich hat zwar keine osteoinduktiven Eigenschaften, es lässt sich aber, wie unsere Arbeitsgruppe bereits untersucht hat^{16,22,23}, sehr gut mit verschiedensten Zellen und Botenstoffen beladen, um diesen Nachteil auszugleichen. Außerdem zeigt es eine gute Resorption und kann sowohl von Osteoklasten abgebaut als auch zellunabhängig zersetzt werden. Der große Nachteil liegt jedoch in seiner Brüchigkeit und fehlenden mechanischen Stabilität.

1.4 Osteoinduktive Zellen

Ein zusätzlicher Baustein in der Versorgung von CSD besteht im Einsatz von osteoinduktiven Zellen, welche direkt die Knochenheilung unterstützen. Häufig werden dabei mesenchymale Stammzellen (MSC) eingesetzt. Diese sind die Vorläufer der osteogenen Zellen, und in verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass diese die Knochenheilung unterstützen, indem sie den Spiegel proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF- α reduzieren und zu Osteoblasten differenzieren²⁴. Allerdings sind sie anspruchsvoll in ihrer Gewinnung und Verarbeitung und mit Entnahme, Kultivierung und schließlich Anwendung vergehen einige Wochen. Große Probleme sind dabei die Gefahr der Kontaminierung mit Bakterien oder Viren und das maligne Entarten^{25,26}. Außerdem könnte es durch die veränderten äußeren Umstände zu Veränderungen der Genmethylierung und damit verändertem Verhalten und Stabilität der Zellen kommen²⁷. Auch besteht die Gefahr, dass je nach Extraktionsort nur eine geringe Ausbeute oder schwache Proliferation erreicht werden kann²⁸. Des Weiteren verzögert sich so die eigentliche Versorgung des Knochenschadens.

Eine einfachere Alternative stellen *bone marrow mononuclear cells* (BMCs) dar, ein heterogenes Zellgemisch, welches aus Knochenmarksaspirat gewonnen wird. Sie enthalten unter anderem Mono- und Lymphozyten aber auch verschiedene Stammzellpopulationen, darunter hämatopoetische Stammzellen (HSC), MSC und endotheliale Vorläuferzellen (EPC)²². Sie können einfach gewonnen und zügig reimplantiert werden, sodass die Gefahr der Kontaminierung oder Entartung minimiert werden kann und die Behandlung nicht verzögert wird. Zusätzlich konnte in einer Arbeit von Seebach et al.²⁹ gezeigt werden, dass sie ähnlich gute Auswirkungen auf die Knochenheilung haben wie ein Gemisch aus aufbereiteten MSC und EPC. BMC wurden bereits in unserer Arbeitsgruppe erfolgreich in einer Phase-I-Studie an Patienten mit proximaler Humerusfraktur eingesetzt³⁰. Welche Mechanismen diesem Effekt zugrunde liegen, sind allerdings noch ungeklärt. Henrich et al. konnten aber in einem Vorversuch zeigen, dass vor allem die Monozyten einen großen Anteil am therapeutischen Effekt haben. Die CD34 exprimierende Stammzellen selbst scheinen dabei eher eine untergeordnete Rolle zu spielen³¹.

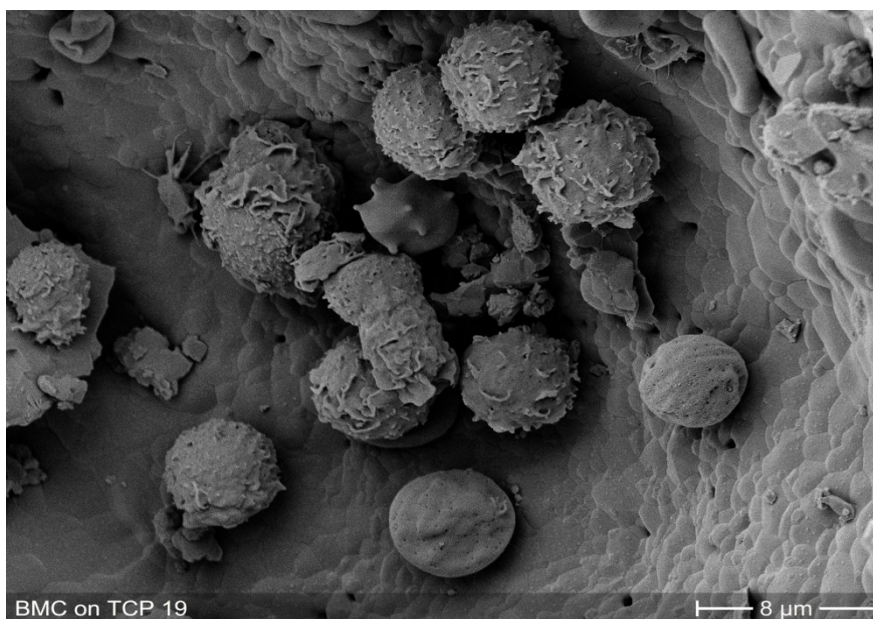


Abbildung 1 β -TCP, mit BMC beladen

Zu sehen ist eine rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer Pore des verwendeten β -TCP-Granulats. Der Maßstabsbalken entspricht hierbei 8 μ m. Zu sehen ist die erfolgreiche Beladung mit BMC, welche eng an dem Material adhären. Bildquelle: Unfallchirurgisches Forschungslabor

1.5 Masquelet Technik

Die Masquelet-Technik dient zur Versorgung von größeren Knochendefekten unabhängig ihrer Genese. Sie wurde bereits erfolgreich an verschiedensten Körperstellen verwendet, wie Tibia, Femur, Hand, Humerus und auch Kiefer³²⁻³⁴, und ermöglicht die Therapie von Knochendefekten bis zu 25 cm³⁵. Diese Methode erfolgt zweizeitig. Bei der ersten Operation erfolgt ein ausgiebiges Debridement und Wundspülung. Ist der Knochen so vorbereitet, wird der Defekt mit einem Spacer aus Knochenzement (Polymethylmethacrylat, PMMA) gefüllt und der Defekt mittels Osteosynthese stabilisiert. Anschließend werden die Weichteile wieder verschlossen. Im Laufe der nächsten Wochen bildet sich nun im Sinne einer Fremdkörperreaktion eine etwa 1-2 mm starke Membran, die sogenannte Masquelet-Membran oder auch induzierte Membran, um den Spacer. Diese Membran ist stark vaskularisiert und schützt die spätere Defektfüllung vor der Resorption durch den Körper. Zusätzlich dient sie als Reservoir für reparative Zellen³⁶, fördert die Differenzierung zu osteogenen Zellen³⁷ und exprimiert verschiedenste Botenstoffe, wie etwa TGF- β , VEGF, vWF, IL-6 und IL-8³⁸. In einer zweiten OP erfolgt nun die definitive Versorgung.

Der zeitliche Abstand zwischen den beiden OPs variiert je nach Größe des Defekts und beträgt im Schnitt ein bis zwei Monate, wobei erfolgreiche Zweit-OPs auch noch 14 Monate nach dem Ersteingriff durchgeführt wurden³⁹. Die Membran wird vorsichtig eröffnet und der PMMA-Spacer entfernt. Nun kann die Membran mit dem gewünschten Material, wie etwa autologen Knochentransplantaten oder Knochenersatzstoffen wie β -TCP, aufgefüllt werden. Anschließend wird die Membran verschlossen und der Defekt kann ausheilen. Der Hauptnachteil dieser Methode liegt in der Notwendigkeit einer zweiten OP, welche zusätzliche perioperative Risiken und Folgekomplikationen bedingt⁴⁰ und die endgültige Versorgung hinauszögert. In dieser Arbeit geht es darum, diesen Umstand zu ändern, indem beide Schritte in einer OP zusammengefasst werden. Durch Einsatz einer Kunstmembran, welche im folgenden Abschnitt genauer erläutert wird, kann der Defekt direkt umhüllt und gefüllt werden, ohne dass sich zunächst eine körpereigene Membran bilden muss.

1.6 Epiflex

Bei der Epiflex-Membran handelt es sich um eine humane azelluläre Dermis. Sie wird vom Deutschen Institut für Zell- und Gewebeersatz (DIZG gGmbH, Berlin) hergestellt und kann dort in verschiedenen Größen und Dicken erworben werden. Des Weiteren ist sie als einziges allogenes Dermistransplantat in Deutschland als Arzneimittel zugelassen.

Zur Herstellung wird von einem Körperspender, welcher im Vorfeld auf verschiedenste Infektionen, wie unter anderem HIV und Hepatitis-Viren, getestet wurde, Hautgewebe mittels eines Dermatoms entnommen und bei -40°C gelagert. Zur weiteren Verarbeitung wird das Gewebe manuell von Blut-, Fett- und Gewebsresten gereinigt und Schadstellen wie Löcher oder Nekroseareale ausgeschnitten. Anschließend wird das Transplantat für 48h in einer hypertonen Salzlösung bei Raumtemperatur auf einem Rüttler eingelegt, um dann die Epidermis mit einer Pinzette abziehen und verwerfen zu können. Nun wird die Dermis für 24 Stunden in eine verdünnte, anionische Detergenzienlösung einlegt, um sie zu dezellularisieren. Daraufhin wird die Detergenzienlösung ausgewaschen und die Dermis mittels Peressigsäure sterilisiert. Nach dieser Behandlung sind laut Herstellerangaben nur noch ≤ 2 DNA-Kopien pro mg Dermis vorhanden und diese damit praktisch zellfrei. Das Produkt wird gefriergetrocknet aufbewahrt und muss zur klinischen Anwendung rehydriert werden. Anwendung findet die Epiflex Membran bereits zum Beispiel in der Versorgung größerer Hernien oder Brandwunden⁴¹.

Das Epiflex zeichnet sich durch hohe Sterilität und fehlende Immunreaktivität aus. Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass sie auch nach dem Herstellungsprozess ihre ursprüngliche Struktur beibehält und so menschlichem Gewebe entspricht. Sie besteht dabei hauptsächlich aus den Kollagenen I, III und IV, Fibronektin, Laminin, Vitronektin und Hyaluronsäuren und bietet eine ideale Matrix für Zellinfiltration, Angiogenese und Geweberegeneration. Außerdem zeigt sie strukturell einen ähnlichen Aufbau wie die induzierte Masquelet-Membran.⁴²

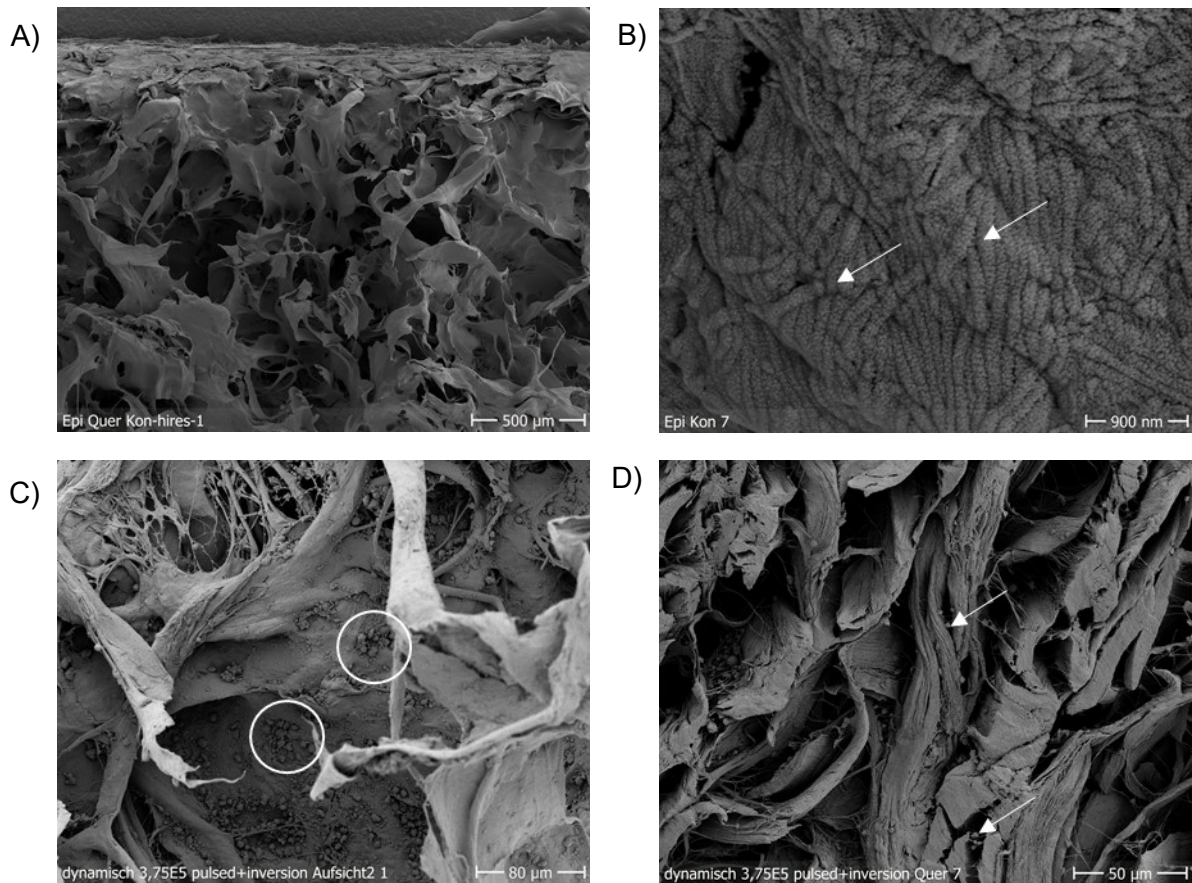


Abbildung 2 A-D) Epiflex im Rasterelektronenmikroskop

Zu sehen sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Epiflex-Membran in verschiedenen Vergrößerungsstufen. Dabei zeigen Abbildungen A) und B) unbeladene und C) und D) mit BMC beladene Membranen. In der Übersichtsaufnahme A) sieht man den Aufbau der Membran. Auffällig ist die raue Oberfläche, welche das Adhären der Zellen und das Verwachsen mit der Umgebung fördert. In der Detailaufnahme B) sieht man die einzelnen Fibrillen (weiße Pfeile) welche geflechtartig verwoben sind. In den Abbildungen C) und D) erkennt man die erfolgreiche Besiedelung mit BMC (weiß markiert). In D) ist die Ansiedelung der BMC an den fibrillären Strukturen zu erkennen (weiße Pfeile).

1.7 Ziel der Arbeit

Da *critical sized bone defects* auch weiterhin die moderne Medizin vor große Herausforderungen stellen und alle verfügbaren Behandlungsmethoden mit großen Nachteilen einhergehen, wurde nach Möglichkeiten gesucht, diese weiter zu verbessern. Das größte Problem bei der Masquelet-Technik liegt in dem zweizeitigen Vorgehen mit entsprechend doppeltem OP- und Narkoserisiko und verlängerter Heilungszeit im Vergleich zu einer einzeitigen Vorgehensweise. Aus diesem Grund postulierten wir, dass ein einzeitiges Verfahren unter Verwendung einer Ersatzmembran bestehend aus dezellularisierter Dermis und besiedelt mit BMC dem zweizeitigen Vorgehen in den Parametern Stabilität und Vaskularisierung mindestens gleichwertig ist und somit beitragen könnte das bisherige zweizeitige Verfahren auf eine einzeitige Prozedur zu reduzieren. Hierzu werden folgende Hypothesen untersucht:

- I. Epiflex unterstützt die Knochenheilung in mindestens gleichem Maße wie die zweizeitige induzierte Membrantechnik. Das Ausmaß der Knochenheilung wird histomorphometrisch anhand einer MOVAT-Färbung evaluiert.
- II. Die Epiflex-Membran ist immunologisch inaktiv und führt zu keiner vermehrten Inflammation des Defekts. Dies wird mittels CD68- und CAE Färbung an histologischen Schnittpräparaten untersucht.
- III. Die Epiflex-Membran wird vaskularisiert und unterstützt die Vaskularisierung im Defekt mindestens im gleichen Maße wie die zweizeitige induzierte Membrantechnik. Dies wird immunhistologisch über eine vWF- und eine α -SMA-Färbung überprüft.
- IV. Die Besiedelung des Knochenersatzmaterials und/oder des Epiflex mit BMCs unterstützt die Knochenheilung zusätzlich.

Zur Überprüfung der Hypothesen I-IV dient eine tierexperimentelle Studie unter Verwendung eines 10 mm Defekts des Femurs der SD-Ratte. Dabei wird die Knochenheilung, Vaskularisierung und Immunantwort anhand von histologischen Kriterien beurteilt.

2. Material und Methoden:

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Material

Tabelle 1 Geräte und Materialien

6, 12, 24, 96- Wellplatte	SARSTEDT AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Ausgießstation, Histostar	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
DeepL Software	DeepL SE, Köln, Deutschland www.DeepL.com/Translator
Dermis, Epiflex 0.3–0.8mm	DIZG, Berlin, Deutschland
Digitalmikroskop BZ 9000	Keyence
Einbettkassetten	Sanowa GmbH, Leimen, Deutschland
Einmalkanülen, BD Microlance 3	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Eppendorf Cups 1,5 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Eppendorf-Pipetten 0,1-10 µl, 0,5-10 µl, 2- 20 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf, Deutschland; Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Falcontubes 15 ml, 50 ml (+Filter)	Greiner GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Färbeautomat, Mirastainer II	EMD Chemicals, Inc., Gibbstown, USA
Filter, Porengröße 100 µm, 70 µm	BD-Biosciences, Franklin Lakes, USA
Gefrierschrank -80 °C	Heraeus AG, Hanau, Deutschland
Gewebeeinbettautomat, Excelsior ES	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Heizeinheit, Inkubator 1000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland

ImageJ Software	National Institute of Health (NIH), Wayne Rasband (https://imagej.nih.gov/ij/)
Inkubator 37°C, 5% CO ₂	Jouan Inc., Winchester, USA
kleiner Löffel, Volumen ca. 50 µl	Omnilab GmbH, Bremen, Deutschland
Knochenersatzstoff, Chronos	Synthes, Pennsylvania, USA
Kryotubes	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Kühlschrank +4 °C bis -20 °C	Bosch AG, Stuttgart, Deutschland
Messzylinder	Brand, Wertheim, Deutschland
Mikrotom, Leica RM 2235	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland
Mikrotomklinge, S35	Feather Safety Razor, Osaka, Japan
Mikroskop, Axio Observer Z1	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	NanoEnTek Inc., Seoul, Südkorea
Objektträger, Menzel Glas, Superfrost Plus	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Paraffinstreckbad, Leica HI 1210	Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Deutschland
Pasteurpipette 3,5 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Petrischale aus Glas	Carl Roth GmbH + Co, KG, Karlsruhe, Deutschland
Pinzette (steril)	Omnilab GmbH, Bremen, Deutschland
Pipettenspitzen 0,1-10 µl, 1-20 µl, 1-100 µl, 1-200 µl, 101-1000 µl	Starlab GmbH, Ahrensburg, Deutschland
Pipettierhilfe (elektrisch)	Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Deutschland
Racks	
Rüttler, Unimax 1010	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Schere (steril)	Omnilab GmbH, Bremen, Deutschland
Schlauchverband Gr. 1	Fink und Walter GmbH, Merchweiler, Deutschland

Serologische Pipetten, 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Sigma-Aldrich Inc., New York und Falcon Inc., Franklin Lakes, USA	BD
Sicherheitswerkbank	Antares GmbH, Hartmannsdorf, Deutschland	
Spritzen 10 ml, 20 ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	
Tischrüttler, Heidolph Rotamax 120	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland	
Vortex MSI Minishaker	IKA Instruments Inc., Wilmington, USA	
Wärmebad	GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland	
Zentrifuge, VWR Mega Star 1.6R	VWR, Pennsylvania, USA	

2.1.2 Chemikalien

Tabelle 2 Chemikalien

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland	
3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) 2-Komponenten-Chromogen-Kit	DCS (Dr. Christian Sartori GmbH & Co. KG), Hamburg, Deutschland	
Alcianblau 1%	Merck Darmstadt, Deutschland	
Antikörper-Verdünnungspuffer	Dako, zugehörig zur Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA	
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen, Deutschland	
Dulbecco's phosphate buffered saline without calcium chloride and magnesium chloride (PBS (-/-))	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich	
Dulbecco's phosphate buffered saline with calcium chloride and magnesium chloride (PBS (+/+))	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland	
Erythrozyten- Lyse-Puffer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland	

Essigsäure (1%ig, 3%ig)	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Ethanol 100%	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethanol 70%, 95%	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fast Red Violet LB Standardlösung 15 mg/ml	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Formalinlösung	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropranol	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Lab Vision™ Hydrogen Peroxide Block	Thermo Scientific, Waltham, USA
Mayers Hämatoxylin-Lösung	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MOVAT-Pentachrom nach Verhöff (Färbekit)	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Naphthol AS-D Chloracetat-Lösung 8 mg/ml	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Naphthyl-Acetat-Lösung 12,5 mg/ml	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Paraplast	Leica Biosystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Phosphorwolframsäure (2%ig)	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Proteinkinase K	Dako, zugehörig zur Agilent Technologies Inc., Santa Clara, USA
Safran du Gatinais	Morphisto GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Shandon Zinc Formal-Fixx Concentrate (Formalinlösung)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
TitriPlex (EDTA)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Trizma Base (Puffer)	Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland
Türks Lösung	Merck AG, Darmstadt, Deutschland

Xylol 98%	Merck AG, Darmstadt, Deutschland
-----------	----------------------------------

2.1.3 Antikörper

Tabelle 3 Antikörper

Anti-alpha smooth muscle Actin antibody, ab 7817	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
Anti-rat-CD68, ab125212	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich
anti-rat v.Willebrand, SM 1686	Origene, Rockville, USA
Histofine® Simple Stain MAX PO (goat anti-mouse – HRP)	Nichirei, Chūō, Japan
Isotypenkontrolle Mouse IgG2a-Antikörper	BioLegend, San Diego, USA

2.1.4 Medikamente

Tabelle 4 Medikamente

Wirkstoff	Handelsname
β-TCP	ChronOS
Carprofen	Rimadyl
Dexpanthenol	Bepanthen Augensalbe
Humane azelluläre Dermis	Epiflex
Isofluran	Forene
Ketamin	Ketamin Rotexmedica
Midazolam	Midazolam Rotexmedica
Octenidin	Octenisept
Octenidin	Octeniderm
Tramadol	Tramador Hexal
Xylazin	Rompun

2.1.5 Chirurgische Instrumente

Tabelle 5 Chirurgische Instrumente

6-Loch-Platte, Edelstahl	DePuy-Synthes AG, Obersdorf, Schweiz
Bohrer 1,1mm	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bohrhülse 1,1mm	DePuy-Synthes AG, Obersdorf, Schweiz

Bohrmaschine (luftdruckbetrieben)	DePuy-Synthes AG, Obersdorf, Schweiz
ChronOs, Größe 0,7-1,4mm	DePuy-Synthes AG, Obersdorf, Schweiz
Coated Vicryl 5-0 V303H	Ethicon Inc., Somerville, USA
Gigli wire saw	RISystem, Davos, Schweiz
Knochenzement, Palacos R+G	Heraeus Medical GmbH, Wehrheim, Deutschland
Kodan Antiseptikum	Schülke GmbH, Norderstedt, Deutschland
Luer	Fine Science Tools GmbH, Heiderberg, Deutschland
Mullkompressen	Fink & Walter GmbH, Heidelberg, Deutschland
Nadelhalter	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pinzette (anatomisch, chirurgisch)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Prolene 4-0 EH7151H	Ethicon Inc., Somerville, USA
Rasierer HC 5010	Braun GmbH, Kronberg im Taunus, Deutschland
Retraktor	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Schere	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Schrauben 1,5mm	DePuy-Synthes AG, Obersdorf, Schweiz
Schraubendreher, Stardrive	DePuy-Synthes AG, Obersdorf, Schweiz
Skalpell (Größe 11)	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Tierrohr-Lochzange	LabArt UG & Co. KG, Waldbüttelbrunn, Deutschland

2.2. Methoden

2.2.1 Auswahl und Pflege der Tiere

112 männliche Sprague Dawley Ratten (Harlan-Winkelmann, Horst, Niederlande), welche aufgrund ihres ruhigen Gemüts, einfachen Haltung und bereits vorliegenden Vergleichsdaten aus anderen Studien gewählt wurden, wurden im Alter von 8 bis 10 Wochen und mit 250 bis 300 g Gewicht in

kontrollierter Umgebung (12 Stunden Licht und 12 Stunden Dunkelheit) in Käfigen zu je 4 Tieren bei 21,8 °C gehalten.

Sie erhielten freien Zugang zu Wasser und Futter. Alle Versuche wurden nach Maßgabe der Regularien des Tierschutz- und Aufsichtsausschusses des Regierungspräsidiums Darmstadt, Deutschland nach den ARRIVE Richtlinien (Projekt Nr. FK10/57) im Einklang mit deutschem Recht durchgeführt.

2.2.2 Versuchsaufbau

Es wurden 6 Gruppen aus jeweils 16 Tieren gebildet. Von diesen wurden jeweils 6 Tiere biomechanisch mittels Dreipunktbiegetest und μ -CT ausgewertet und die verbleibenden 10 Tiere histologisch aufgearbeitet. Die Gruppen 1 und 2 wurden mittels Masquelet-Technik versorgt. Die Gruppen 3 und 4 erhielten das einzeitige Verfahren mit der unbeladenen Epiflex-Membran und die Gruppen 5 und 6 schließlich wurden mit der BMC beladenen Epiflex-Membran versorgt. Als Defektfüllung erhielten die Gruppen 1, 3 und 5 unbeladenes β -TCP und bei den Gruppen 2, 4 und 6 wurde das β -TCP mit BMC beladen. Die Tiere wurden randomisiert auf die Versuchsgruppen verteilt. Weitere 16 Tiere wurden zur Gewinnung der BMCs benötigt. Daraus ergibt sich ein Tierbedarf von 112 Tieren. Die Tiere, die biomechanisch mittels Dreipunktbiegetest und μ -CT ausgewertet wurden, sind einer anderen Dissertation zugeordnet und werden daher nicht weiter erwähnt.

Tabelle 6 Gruppeneinteilung

1	Masquelet + β -TCP	6	10	-
2	Masquelet + (β -TCP + BMC)	6	10	4
3	Epiflex + β -TCP	6	10	-
4	Epiflex + (β -TCP + BMC)	6	10	4
5	(Epiflex + BMC) + β -TCP	6	10	4
6	(Epiflex + BMC) + (β -TCP + BMC)	6	10	4

2.2.3 Isolierungen der BMC aus der Spenderratte

Die Gewinnung der BMC aus dem syngenem Spendertier zur Transplantation erfolgte am Morgen der OP. Das Tier wurde durch eine Überdosis Pentobarbital (500mg/kg KG) getötet. Die Femora und Tibiae wurden freipräpariert, entnommen und in eine Lösung aus 5% Penicillin/Streptomycin in PBS w/o gegeben. Danach erfolgte der schnellstmögliche Transport ins Labor zur weiteren Isolierung der BMC.

Im Labor wurden die Knochen unter der sterilen Werkbank in eine Petrischale überführt. Anschließend wurden mittels eines Seitenschneiders die Kondylen entfernt und der Markraum mit PBS w/o unter Verwendung einer Spritze mit 20G Kanüle in ein weiteres Gefäß ausgespült. Das so gewonnene Knochenmark wurde in ein 50 ml Falcon-Tube überführt und mit einer serologischen Pipette durchmischt bis makroskopisch alle Aggregate suspendiert waren.

Anschließend erfolgte eine Zentrifugation mit 420 g für 10 Minuten mit Bremse. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml PBS w/o resuspendiert. Im nächsten Schritt wurde die Zellsuspension zunächst mit einem sogenannten *cell strainer* mit einer Maschenweite von 100 µm und anschließend mit 70 µm filtriert, um Fasern und größeren Debris zu entfernen. Das Filtrat wurde erneut für 10 min bei 420 g mit Bremse zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde erneut der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml PBS w/o resuspendiert. Nun erfolgte die Auszählung der Zellkonzentration mittels einer Neubauer-Zählkammer.

2.2.4 Zellzahlbestimmung mittels Neubauer-Zählkammer

10 µl der gewonnenen Zellsuspension wurde mit 90 µl Erythrozyten-Lysepuffer versetzt und für 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit 100 µl Türcks-Lösung gefärbt und eine Neubauer-Zählkammer mit 10 µl der gefärbten Zellsuspension beschickt.

Unter dem Lichtmikroskop wurden anschließend in 100-facher Vergrößerung die vier Eckquadrate der Zählkammer ausgezählt und mit der Formel $\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der Quadrate} \times 200.000$ die Zellkonzentration der Stammzellsuspension errechnet.

2.2.5 Beladung der Epiflex-Membran

Die Beladung der Membran erfolgte nach dem Protokoll von Ceyhan Yaman⁴³. Zunächst wurde die Zellsuspension mit PBS (w/o) auf 30×10^6 Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurde die Epiflex-Membran unter sterilen Kautelen unter der Werkbank in 2×1 cm große Rechtecke geschnitten und mit der glatten Seite nach oben in eine 6 Well-Platte überführt. Daraufhin wurden die Membranstücke mit 1 ml PBS ++ für 10 min bei Raumtemperatur rehydratisiert, überschüssiges PBS wurde danach wieder abgesaugt. Dann wurden jeweils 3 Tropfen à $12,5 \mu\text{l}$ der Zellsuspension auf die Membran aufgetragen, sodass 1 Tropfen mittig und die anderen versetzt nebendran zu liegen kommen, damit noch ein etwa 4 mm großer Rand auf beiden Seiten frei bleibt, um die Membran später intraoperativ befestigen zu können (siehe Abb. 3).

Anschließend wurden die Membranstücke für 10 min im Brutschrank (37°C , 5% CO_2) inkubiert und danach mit einer langen feinen Pinzette aus der Well-Platte entnommen und auf den Filter eines 50 ml-Falconröhrchens platziert. Hierbei wurde streng darauf geachtet, dass die Ausrichtung der Membran erhalten, sprich die glatte Seite oben bleibt. Die Falconröhrchen wurden daraufhin fünfmal für 1 min mit 300g bei Raumtemperatur mit Bremse zentrifugiert. Anschließend wurden die Membranstücke aus dem Falcon entnommen und invertiert wieder in die Well-Platte überführt, sodass die porige Seite oben war. Daraufhin wurde die Membran wieder für 10 min bei Raumtemperatur mit 1 ml PBS ++ gewässert. Das PBS ++ wurde erneut abgesaugt und 3 Tropfen der BMC-Suspension à $12,5 \mu\text{l}$ in eben beschriebener Weise aufgetropft. Danach wurden die Membranstücke wieder für 10 min im Brutschrank (37°C , 5% CO_2) inkubiert und anschließend für 1 min auf dem Rotationsrüttler auf Stufe 4 bewegt. Daraus ergeben sich sechs Tropfen à $12,5 \mu\text{l}$ mit je 375.000 Zellen und damit $2,2 \times 10^6$ BMC pro Epiflex-Implantat.

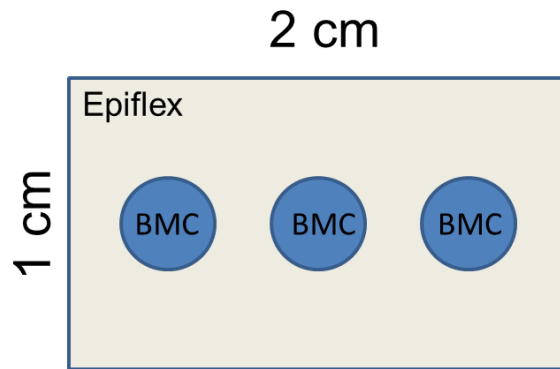


Abbildung 3 Beladung der Epiflex-Membran.

BMC bezeichnet jeweils 12,5 μL BMC-Zellsuspension mit jeweils $3,75 \times 10^5$ BMC. Zuzüglich der analogen BMC-Beladung auf der Rückseite der Membran ergibt sich eine Gesamtzahl von $2,2 \times 10^6$ BMC pro Implantat.

2.2.6 Beladung des β -TCP

Zunächst wurde die Zellsuspension auf 1×10^6 Zellen/ $350 \mu\text{l}$ mit PBS (w/o) verdünnt. Dann wurden unter sterilen Kautelen die Bohrungen einer 24-Well-Platte ca. 3 mm hoch mit β -TCP gefüllt und mit jeweils $350 \mu\text{l}$ der Zellsuspension versetzt. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und erneut über das Knochenersatzmaterial pipettiert. Dies wurde fünfmal wiederholt, gefolgt von 10 min Inkubation bei 37°C , 5% CO_2 . Dieses Prozedere wurde noch zweimal wiederholt.

2.2.7 Erfolgskontrolle mittels DAPI

Um den Erfolg der Beladung mit BMC zu kontrollieren, wurden in unregelmäßigen Abständen einzelne Granulatstücke β -TCP aus einer Charge entnommen und in eine 96-Well-Platte überführt. Daraufhin wurden sie mit Formaldehyd [1% v/v] für 10 min im Dunklen fixiert und anschließend dreimalig mit PBS (w/o) gewaschen. Anschließend wurde $10 \mu\text{L}$ DAPI-Lösung ($1000 \mu\text{g/mL}$) auf 1 ml mit PBS(w/o) aufgefüllt und bis zum Rand in die Well-Platte gegeben. Nach einem abschließenden Waschschrift aus dreimaligem Waschen mit PBS (w/o) wurden die Kammern auf $100 \mu\text{l}$ mit PBS (w/o) aufgefüllt und unter dem Fluoreszenzmikroskop der Erfolg der Zellbeladung überprüft.

2.2.8 Operation der Versuchstiere

Zu Beginn des Operationstages erfolgte die Randomisierung der Versuchstiere. Dabei wurde darauf geachtet möglichst viele unterschiedliche Gruppen pro Tag zu operieren, um einheitliche Bedingungen für alle Gruppen zu schaffen. Dabei musste jedoch der Bedarf an Spendertieren für die BMC beachtet werden, um die vorhandenen Zellen bestmöglich auszunutzen. Daraufhin wurden alle benötigten Materialien aus dem Labor, sowie dem Lager und Arzneimittellager der Zentralen Forschungseinrichtung in den Versuchsraum gebracht. Dann wurde der Arbeitsplatz vorbereitet und die Versuchstiere aus dem Lager in den Versuchsraum verbracht. Die Käfige wurden mittels eines Tuches abgedunkelt.

Zur Operation erhielten die Tiere eine gewichts- und raumtemperaturadaptierte, intraperitoneale Narkose mit Ketamin (100 mg/kg KG), Xylazin (10mg/kg KG) und Midazolam (1mg/kg KG). Daraufhin wurde das rechte Bein rasiert, von Haaren und Schmutz gesäubert, mit einer Octinidinlösung gründlich desinfiziert und anschließend steril abgedeckt.

Unter semisterilen Bedingungen wurde das Femur ertastet und eine longitudinale Hautinzision oberhalb selbigem durchgeführt. Anschließend erfolgte die Präparation auf das Femur indem die Faszie durchtrennt und die Fasern des M. quadriceps femoris und M. biceps femoris stumpf beiseitegeschoben wurden. Um die 5-Loch Platte am Femur zu befestigen, wurde diese mit einer Pinzette am antero-lateralen Rand des Femurs fixiert und anschließend mit vier bicorticalen Schrauben, jeweils zwei an jedem Ende befestigt, sodass das mittlere Loch freiblieb. Dabei wurde ein 1,1 mm Bohrer und 1,5 x 6 mm lange Schrauben verwendet.

Nun konnte die Osteotomie erfolgen. Es wurde in der Schaftmitte ein 10 mm großes Knochenstück mittels einer *Gigli wire saw* (Bandsäge) ausgesägt und in einem mit 70-prozentiger Ethanol Lösung gefüllten Kryotube im Kühlschrank aufbewahrt. Der entstandene Defekt wurde nun gruppenspezifisch aufgefüllt und zum Abschluss erfolgte der Wundverschluss mittels einer fortlaufenden

Subkutannaht mit 4-0 Prolene-Nylonfaden und einer Intrakutannaht mittels 5-0 Vicrylfaden. Außerdem erfolgten eine letzte Wundreinigung und Desinfektion.



Abbildung 4 Intraoperative Präparation

Zu sehen ist die intraoperative Umhüllung des Defekts mit der Epiflex-Membran. Eine Platte wird mittels vier bicorticalen Schrauben am Femur befestigt zwischen denen die Osteotomie erfolgt. Anschließend wird die Epiflex-Membran um den Defekt gelegt und mit Knochenersatzmaterial befüllt und vernäht.

Die Gruppen 1 und 2 erhielten so in der ersten Operation eine Füllung mit nach Herstellerangaben zubereitetem Knochenzement (Palacos). Danach bildeten sie innerhalb von 3 Wochen die Masquelet-Membran, welche dann in der zweiten Operation eröffnet und gruppenspezifisch befüllt wurde. Während der 3 Wochen, in denen die Tiere der Gruppen 1 und 2 die Masquelet-Membran bildeten, blieben die Tiere der Gruppen 3 bis 6 im Stall um „mitzualtern“, sodass alle Tiere bei der definitiven Versorgung (Operation 2 der Masquelet-Tiere beziehungsweise Operation 1 der Epiflex-Tiere) gleich alt waren.

Tabelle 7 Zeitlicher Ablauf

	Woche 0	Woche 3	Woche 11
Gruppen 1 + 2	Induktion der Masquelet-Membran	Definitive Versorgung mit β -TCP (+BMCs)	Sacrifice
Gruppen 3 - 6	Pause	Einzeitige Versorgung mit Epiflex (+BMCs) und β -TCP (+BMCs)	Sacrifice

2.2.9 Markierung der Tiere

Es wurde ein Clipper verwendet, um die Ohren der Tiere mit Löchern zu markieren. Dabei stand die Anzahl der Löcher im rechten Ohr für die Defekthüllung und im linken Ohr für die Defektfüllung. Sollten zwei Tiere mit derselben Behandlung im gleichen Käfig sitzen, markierten wir eines mit 3 Löchern im linken Ohr (RxL3). Daraus ergab sich folgender Markierungsschlüssel:

Tabelle 8 Markierungsschema der Versuchstiere

Markierung re Ohr	R0 (kein Loch)	R1 (ein Loch)	R2 (zwei Löcher)
Markierung li Ohr			
L1 (ein Loch)	Induzierte Membran + β -TCP (Grp 1)	Epiflex + β -TCP (Grp 3)	Epiflex mit BMC + β -TCP (Grp 5)
L2 (zwei Löcher)	Induzierte Membran + β -TCP mit BMC (Grp 2)	Epiflex + β -TCP mit BMC (Grp 4)	Epiflex mit BMC + β -TCP mit BMC (Grp 6)

Tiere mit der Markierung RxL3 besaßen keine einheitliche Zuordnung und finden sich daher nicht in der Tabelle. Diese mussten in den OP-Protokollen nachgeschlagen werden.

2.2.10 Postoperative Versorgung der Versuchstiere

Die Tiere erhielten im Anschluss an die OP 800 mg Caprofen s.c. und zudem wurde dem Trinkwasser für eine Woche 2,5 g/100 ml Tramadol zugegeben. Zusätzlich erfolgten in der ersten postoperativen Woche tägliche Visiten der Tiere, um etwaige Wundinfektionen frühzeitig festzustellen. Dabei wurde auf das Fress- und Bewegungsverhalten der Tiere geachtet und die Wunde nach Dehiszenzen und Entzündungszeichen, wie etwa Rötung, Schwellung oder eitrige Sekretion untersucht. Bei leichten Dehiszenzen erfolgte eine Sekundärnaht durch den Chirurgen. Bei schwerwiegenden Komplikationen erfolgte ein vorzeitiges Sacrifice wie in 2.2.11 „Sacrifice“ beschrieben. Ab der zweiten postoperativen Woche erfolgten diese Visiten alle zwei Tage.

Nach der Operation wurden die Tiere zunächst in der Zentrale Forschungseinrichtung untergebracht, wo sie dann auch visitiert wurden. Nach etwa 4 Wochen wurden sie dann bis zu ihrem Sacrifice 8 Wochen postoperativ aus Kapazitätsgründen zu mfd Diagnostics GmbH (Mikroforum Ring 5, 55234 Wendelsheim, Deutschland) ausgelagert.

2.2.11 Sacrifice

Acht Wochen nach der Operation bzw. elf Wochen nach der ersten Operation für die Gruppen 1 und 2 erfolgte das Sacrifice der Versuchstiere. Hierzu wurden sie erneut in die zentrale Forschungsanstalt verbracht und mittels einer Überdosis Pentobarbital (500mg/kg KG intraperitoneal) getötet. Anschließend wurden sie gewogen. Nun erfolgte unter semisterilen Bedingungen die Entfernung der operierten Femora. Bei einem Tier pro Gruppe wurde zusätzlich auch das gesunde Femur entfernt, um als Referenz für die histologische Auswertung zu dienen.

Die Femora wurden sofort nach der Explantation in beschriftete Einbettkassetten gelegt und in Formalin fixiert. Nachdem diese für 24 Stunden im Formalin eingelegt waren, wurde selbiges mit Leitungswasser ausgewaschen und die Knochen in 70%igem Ethanol bis zur Dekalzifizierung im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt.

2.2.12 Dekalzifizierung der Knochen

Zunächst wurde eine Entkalkungslösung angesetzt, indem für 1 L Lösung 100 g Titriplex und 34 g Trizma Base mit 1L aqua dest. gemischt wurden. Die in 70%igem Ethanol eingelegten Knochen wurden in beschriftete Schlauchverbände verpackt und in ein Gefäß mit der Entkalkungslösung gegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Knochen nicht auf dem Boden des Gefäßes aufliegen, um eine dortige Minderbenetzung mit der Lösung zu vermeiden. Das Gefäß wurde anschließend auf den Rüttler gestellt und dieser auf 37°C im Dauerbetrieb eingestellt.

Die Lösung wurde am ersten Tag zweimal, am zweiten Tag einmal und dann zweimal die Woche gewechselt, um eine Sättigung mit Calcium-Ionen zu vermeiden. Nach etwa 7-10 Tagen ist die Entkalkung abgeschlossen. Als Erfolgskontrolle wurde ein zufällig ausgewählter Knochen entnommen und mit einer schmalen Kanüle an der Epiphyse punktiert. Lässt sich die Nadel ohne Widerstand vorschieben, ist der Knochen ausreichend entkalkt. Sollte dies nicht der Fall sein müssen die Knochen noch einen Tag in der Lösung verbleiben und die Nadelprobe am nächsten Tag wiederholt werden. Nach Abschluss der Entkalkung wurden die Knochen unter fließendem Leitungswasser ausgiebig ausgespült.

2.2.13 Einbettung und Schneiden der Knochen

Die entkalkten Knochen wurden in den Gewebeeinbettautomaten gegeben und paraffiniert. Darin wurden sie zunächst dreimal für eine Stunde in 70%iges Ethanol, dreimal für eine Stunde in 95%iges Ethanol und schließlich einmal für eine Stunde und einmal für zwei Stunden in 100%iges Ethanol gegeben. Darauf folgte zweimal ein einstündiges Bad in Xylol und einmal ein zweistündiges Bad.

So vorbereitet erfolgte die Paraffinierung mittels Paraplast für zweimal 60 Minuten und einmal 80 Minuten. Die Knochen wurden daraufhin in Blöcke gegossen und am Rotationsmikrotom in 3 µm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte wurden in einem Wasserbecken aufgefangen und auf einen Objektträger aufgezogen. Anschließend wurde der Schnitt im Streckbad bei 47°C fixiert und im Wärmeschrank über Nacht bei 40°C getrocknet.

2.2.14 Entparaffinierung

Die Schnitte wurden zunächst zweimal für jeweils 5 Minuten in ein Bad aus Xylol gegeben. Anschließend wurden sie jeweils zweimal 5 Minuten in 100%igem Ethanol, 95%igem Ethanol, 70%igem Ethanol und schließlich Aqua dest. inkubiert.

2.2.15 MOVAT-Färbung (Übersichtsfärbung Knochen-Knorpel)

Für diese Färbung wurde das Färbekit „MOVAT Pentachrom nach VERHÖFF“ der Firma Morphisto genutzt. Zunächst wurden die Schnitte wie in 2.2.13 „Entparaffinierung“ beschrieben vorbereitet und für 30 sec in Essigsäure 3%ig inkubiert. Daraufhin folgte die erste Färbung mit Alcianblau 1% (pH 2,5 in Essigsäure) für 30 min. Anschließend wurde die überschüssige Farbe für 2 min unter fließendem Leitungswasser ausgewaschen und die Schnitte für 8 min in „Verhöff Gebrauchslösung“ inkubiert.

Daraufhin wurde für 1 min mit Eisen(III)Chlorid 1%ig gebeizt und anschließend für 10 min mit nicht-fließendem Leitungswasser gewässert. Dann schloss sich die 6-minütige Färbung mit Brilliant-Crocein-Säurefuchsin an. Anschließend folgte ein Bad in Essigsäure [1% v/v] für 30 sec und ein weiteres Beizen für 15 min in Phosphorwolframsäure [2% v/v]. Nach einem weiteren Bad in Essigsäure [1% v/v] für eine Minute folgte die Entwässerung mittels Ethanol [99%] für 3 min und anschließend erneut für 15 min. Nun konnte die letzte Färbung für 15 min mit *Safron du Gatinais* erfolgen. Daraufhin erfolgte die letzte Entwässerung mit zwei 2-minütigen Bädern in Ethanol [99%], einem 3-minütigen Bad in 2-Propanolol und schließlich zwei 10-minütigen Bädern in Xylol. Dann wurden die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

2.2.16 CD68-Färbung zum Nachweis von Makrophagen

Die Schnitte wurden zunächst wie in 2.2.13 „Entparafinierung“ beschrieben vorbereitet. Anschließend erfolgte zur Epitopdemaskierung eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit Proteinase K (PIER; *protein-induced epitope retrieval*). Daraufhin wurden die Schnitte für 3 min mit Leitungswasser und anschließend für 5 min mit TBS gespült. Dann erfolgte eine weitere 10-minütige Inkubation bei RT mit Peroxidase-Substrat und erneut ein dreiminütiges Spülen mit Leitungswasser und anschließend für 5 min mit TBS.

Nun folgte die Inkubation mit 50 µl des Primärantikörper (anti-rat-CD68, Abcam ab125212), welcher mit Antikörperverdünnungspuffer (Dako S3022) auf 2 µg/ml verdünnt wurde. Parallel wurde zur Isotypkontrolle ein Maus IgG2a Antikörper im selben Verhältnis verdünnt und 50 µl auf einen weiteren Schnitt gegeben. Dies wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dann wurden die Schnitte für 3 min mit Leitungswasser und anschließend für 5 min mit TBS gespült. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Hierzu wurden 50 µl Sekundärantikörper (Histofine simple stain goat anti-mouse – HRF) auf die Schnitte gegeben und für 30 min bei RT inkubiert.

Anschließend erfolgte ein weiterer Spülschritt mit Leitungswasser für 3 min und TBS für 5 min. Zur Detektion wurde danach das Peroxidase-Substrat (hier wurde AEC genutzt) aufgetragen und bis zur gewünschten Farbintensität inkubiert. Hierzu erfolgten minütlich Kontrollen unter dem Lichtmikroskop bis die gewünschte Intensität erreicht wurde. Dann wurde die Reaktion durch Abspülen mit aqua dest. gestoppt und zusätzlich für 5 min mit aqua dest. gespült. Anschließend erfolgte die Kernfärbung mittels Hämatoxylin. Dafür wurden die Schnitte für 10 min in Hämatoxylin inkubiert und anschließend für 10 min im Scott Puffer gebläut. Abschließend wurden die Schnitte kurz in Aqua dest eingetaucht und mit Kaisers Glyceringelatine eingedeckt.

2.2.17 Von-Willebrand Färbung zum Nachweis unreifer Blutgefäße

Anfänglich wurden die Schnitte wie in 2.2.13 „Entparaffinierung“ beschrieben vorbereitet und für 5 min mit Leitungswasser und 7 min in TBS gespült. Zur Epitopdemaskierung wurden die Schnitte in mit EDTA (pH 9) gefüllte Küvetten gegeben und für 10 min gekocht (HIER; *heat-induced epitope retrieval*). Anschließend kühlten sie 30 min bei RT ab und wurden zweimalig für 5 min mit TBS gespült. Daraufhin wurden die Schnitte für 10 min bei RT mit Peroxidaseblock inkubiert und erneut für 5 min in Leitungswasser und 7 min in TBS gespült.

Anschließend wurden 50 µl des Primärantikörpers (anti-Rat v.Willebrand, Acris SM 1686), welcher im Verhältnis 1:50 mit Antikörperverdünnungspuffer (Dako S3022) verdünnt wurde, auf die Schnitte aufgetropft und für 1 Stunde bei RT inkubiert. Parallel wurde in gleicher Weise die Isotypkontrolle mittels einem Maus IgG2a Antikörper durchgeführt. Daraufhin wurde erneut für 5 min in Leitungswasser und 7 min in TBS gespült. Dann erfolgte die Inkubation mit 50 µl des Sekundärantikörpers (Histofine simple stain goat anti-mouse – HRP). Nach einem weiteren Waschschrift durch 5-minütiges Spülen mit Leitungswasser und 7 min TBS erfolgte die Inkubation mit AEC als Peroxidasesubstrat bis die gewünschte Farbintensität erreicht war. Hierzu erfolgten minütlich Kontrollen unter dem Lichtmikroskop. Zum Abstoppen wurde mit aqua dest. abgespült und für weitere 5 min mit aqua dest. gespült.

Anschließend erfolgte die Kernfärbung, indem die Schnitte für 10 min in Hämatoxylin gebadet und anschließend für 10 min in fließendem Leitungswasser gebläut wurden. Abschließend erfolgte die Eindeckung mit Kaisers Glyceringelatine.

2.2.18 α -SMA Färbung zum Nachweis reifer Blutgefäße

Zunächst wurden die Schnitte wie in 2.2.13 „Entparaffinierung“ beschrieben vorbereitet. Anschließend erfolgt die Färbung analog zum Protokoll 2.2.17 „von-Willebrand-Färbung“ mit Anti- α -SMA-Antikörper (abcam, ab7817), welcher mit Antikörperverdünnungspuffer (Dako S3022) auf 2 μ g/ml verdünnt wurde, als Primärantikörper.

2.2.18 CAE Färbung zum Nachweis neutrophiler Granulozyten

Zunächst wurde die Färbelösung angesetzt, indem 1 ml Natriumnitrit-Lösung mit 1 ml Fast Red Violet LB Standardlösung durch mehrfaches Invertieren gemischt wurde und für 2 min bei RT inkubiert wurde. Zu dieser Lösung kam 40 ml, auf 37°C erwärmtes entionisiertes Wasser, 5 ml TRIZMAL 6,3 Pufferkonzentrat und 1 ml Naphthol AS-D Chlorazetat-Lösung. Dabei sollte sich die Lösung rot färben. Daraufhin wurden die Schnitte wie in 2.2.13 „Entparaffinierung“ beschrieben vorbereitet und in Zitrat-Azeton-Formaldehyd (CAF)-Lösung, welche vorher auf Raumtemperatur gebracht wurde, durch 30-sekündiges Eintauchen fixiert. Anschließend wurde der Objektträger für 45-60 Sekunden unter fließendem Leitungswasser gespült und in die zuvor angesetzte Färbelösung gegeben. Wichtig hierbei ist, dass der Objektträger nicht austrocknet. Daraufhin wurden sie für 15 min bei 37°C unter Ausschluss von Licht inkubiert und dann für 2 min gründlich mit entionisiertem Wasser abgespült. Nun folgte die Gegenfärbung für 2 min in Hämatoxylin-Lösung Gill Nr.3. Abschließend wurden die Schnitte mit Leitungswasser gespült und eingedeckt.

2.2.19 Auswertung der Färbungen

Zur Auswertung wurden die Schnitte am Biorevo BZ-9000 Mikroskop (Keyence) mit der Software „BZ-II-Viewer HS all in one microscope“ und „BZ-II-Analyzer“ in 40-facher Vergrößerung aufgenommen, zu einem Panorama zusammengefügt und unkomprimiert im .tif-Format abgespeichert. Dabei wurde darauf geachtet, dass der Defektbereich komplett abgebildet wurde. Die entstandenen Aufnahmen wurden anschließend mit der Software „ImageJ“ von NIH Image analysiert. Bei der MOVAT Färbung erfolgte die Auswertung indem der Defekt

freihändig markiert und anschließend der prozentuale Anteil von Knochengewebe an der Defektfläche berechnet wurde. Analog wurde bei der CD68 Färbung der Anteil an CD68-positiven Zellen bestimmt.

Die Auswertung der CAE Färbung erfolgte händisch. Hierbei wurde zunächst eine gleichmäßige Vergrößerung gewährleistet, indem das Bild auf eine Fettvakuole des Knochenmarks eingestellt wird, sodass diese etwa 1 cm auf dem Bildschirm einnimmt. Dann wurde jeweils in einer kreisförmigen Fläche mit 400 Pixeln Durchmesser proximal, zentral und distal im Defekt die Zahl der gefärbten Zellen gezählt. Bei den Gefäßfärbungen (vWF und α -SMA) erfolgte analog die Auswahl der Zählflächen im Defekt und der Membran mit anschließender Auszählung der Gefäße.

2.3 Statistik

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der Software Bias 11.02 (Epsilon Verlag, Darmstadt, Germany). Die Zahlen wurden graphisch als Box-Plot des Medians dargestellt. Gruppenvergleiche wurden mittels nicht parametrischen Kruskal-Wallis-Test mit anschließender Bonferroni-Holm adjustierter posthoc-Analyse durchgeführt. Ein $p < 0,05$ betrachteten wir dabei als statistisch signifikant. Die explorative Signifikanz p^* , welche ohne Alphakorrektur berechnet wurde, wird genutzt um einen statistischen Trend aufzuzeigen, welcher nach erfolgter alpha-Korrektur nicht das Signifikanzniveau erreicht hat.

3. Ergebnisse

3.1 Kontrolle der β -TCP-Beladung mit BMC über die DAPI-Färbung

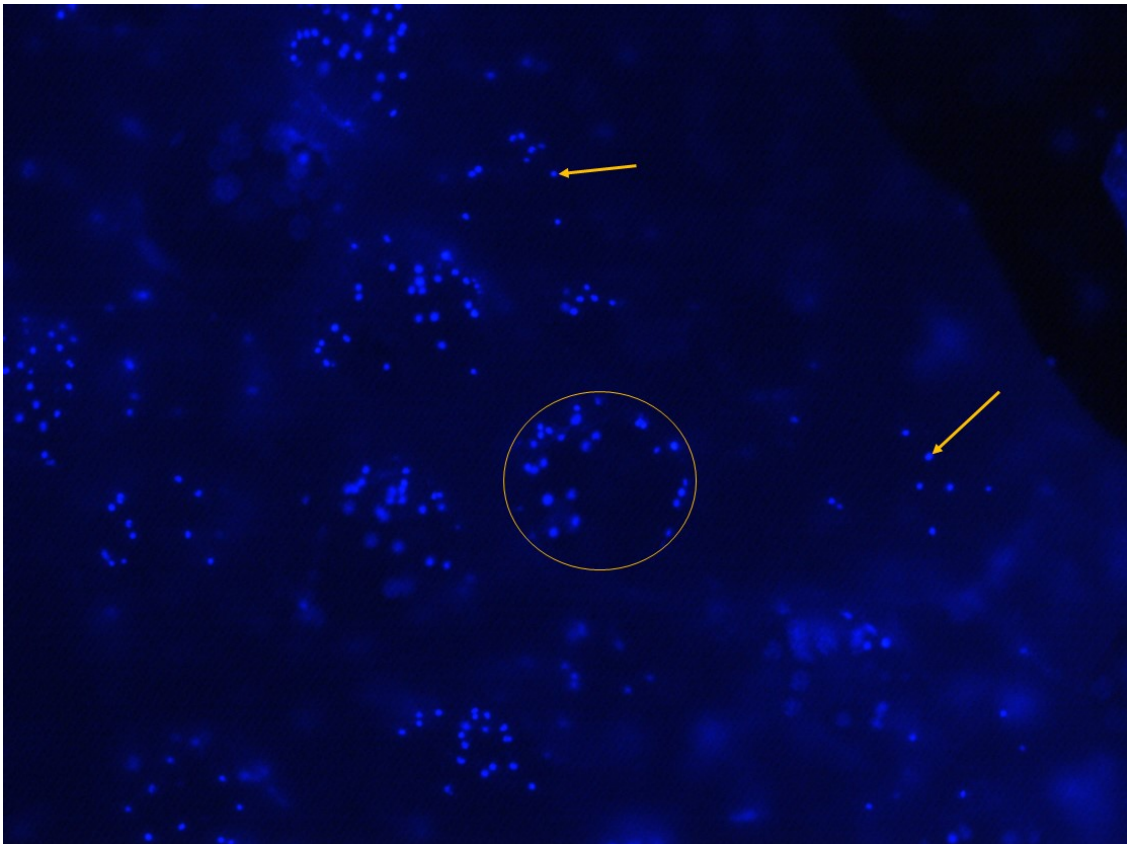


Abbildung 5 Erfolgskontrolle mittels DAPI

Zu sehen ist eine repräsentative Aufnahme einer Zell-Beladungskontrolle in dargestelltem Projekt. DAPI bindet an DNA und kann zur Fluoreszenz angeregt werden. So ermöglicht es die Darstellung von adhätierenden BMC auf den β -TCP-Scaffolds. BMC (oranger Pfeil) sind primär in den Poren (oranger Kreis) des Materials zu finden, welche gleichmäßig verteilt auf der Scaffoldoberfläche vorliegen.

3.2 Chirurgische Komplikationen

11 Tiere wurden im Laufe der Versuchsphase aus der Arbeit ausgeschlossen. Gründe waren hierbei Versterben bei Narkose (2 Tiere), das Ausbrechen von Schrauben beziehungsweise das Dislozieren der Platte (8 Tiere) und Infekt (1 Tier). So wurde 1 Tier aus Gruppe 1, 5 in Gruppe 2, 4 in Gruppe 4 und 1 in Gruppe 6 ausgeschlossen. Daraus ergibt sich bei 11 ausgeschlossenen und 85 erfolgreich operierten Tieren eine Ausfallquote von 11,5%.

3.3 Beurteilung der Knochenneubildung mittels MOVAT

In der MOVAT-Färbung werden mehrere Farbstoffe (Alcianblau, Eisenhämatoxylin, Brillant-Crocein-Säurefuchsin und Safran du Gâtinais) kombiniert um die verschiedenen Gewebe eindeutig voneinander abzugrenzen⁴⁴. Dabei färben sich Zellkerne blauschwarz, das Zytoplasma rötlich, elastische Fasern rot, kollagenes Bindegewebe hellgelb, die Muskulatur rot, Knorpelgewebe blau-grün und mineralisierter Knochen dunkelgelb. So kann der Anteil an Knochen- und Knorpelgewebe im Defekt quantifiziert werden. Die folgende Abbildung (Abb. 6) zeigt zur Verdeutlichung den Aufbau aller folgenden Schnitte.

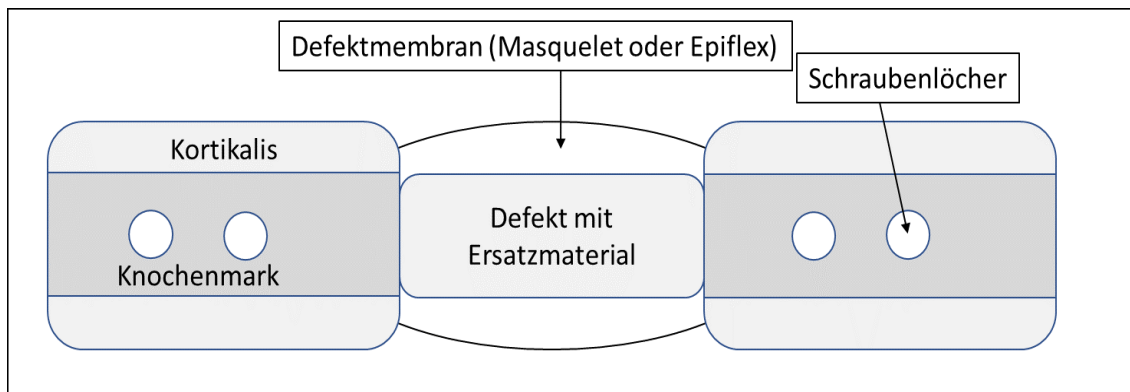
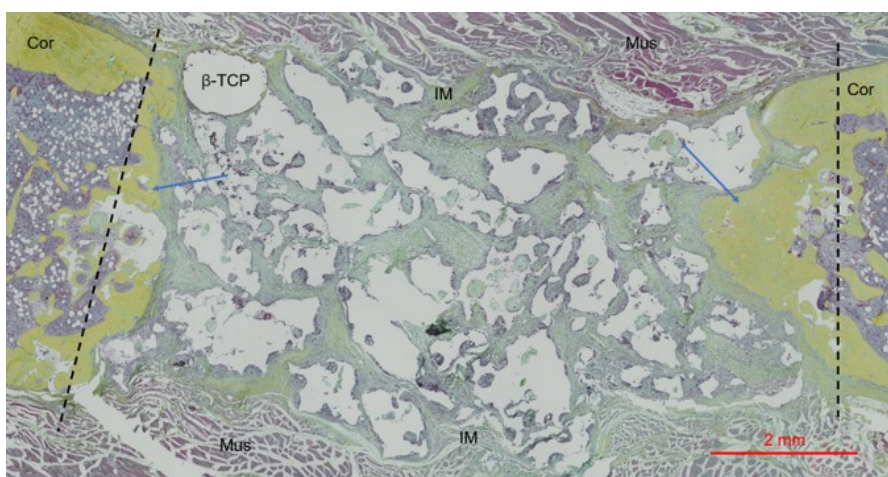
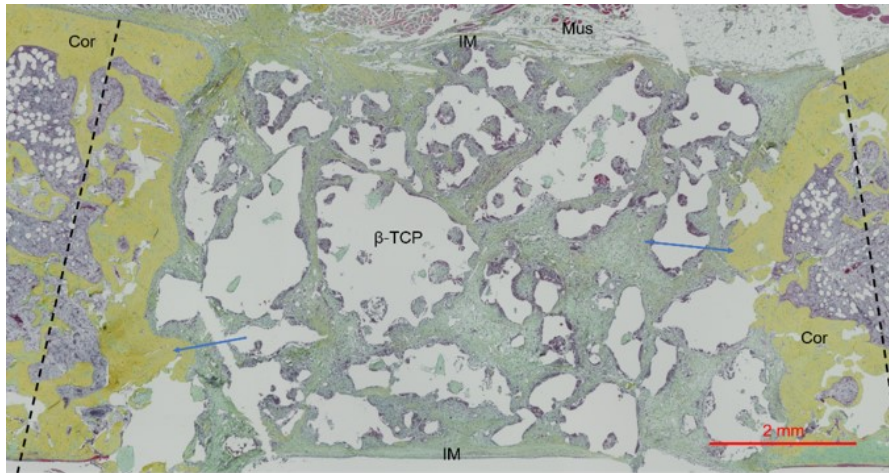


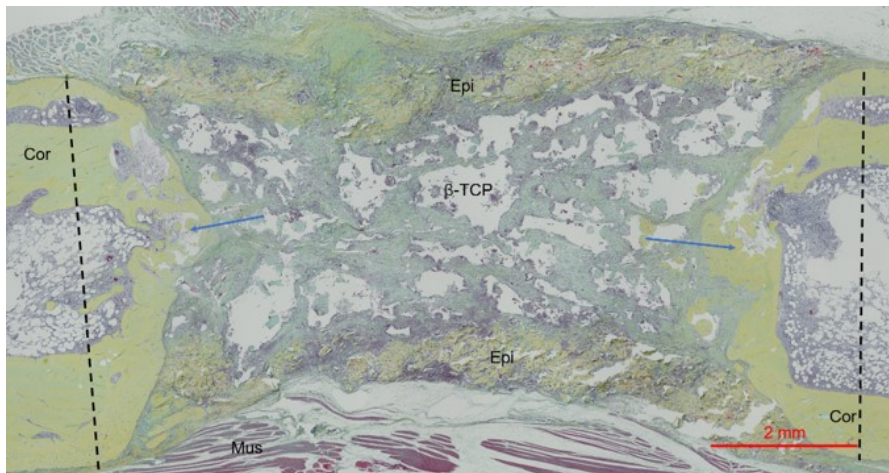
Abbildung 6 Aufbau der histologischen Schnitte



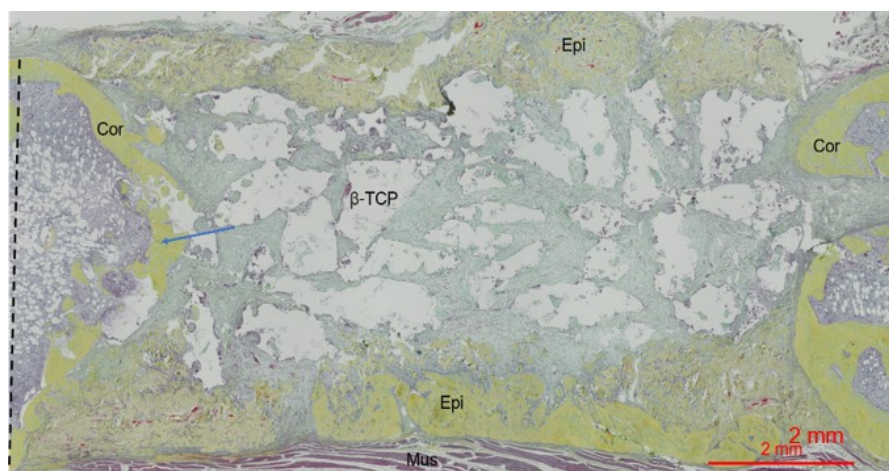
IM + β -TCP



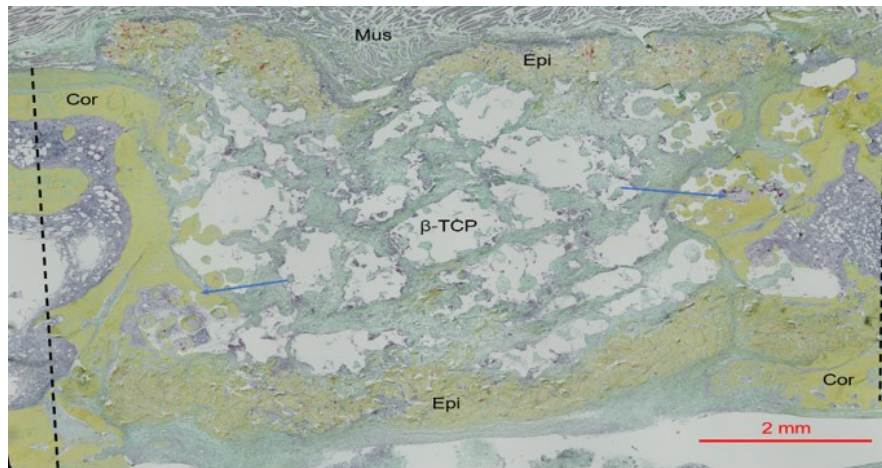
IM + (β -TCP + BMC)



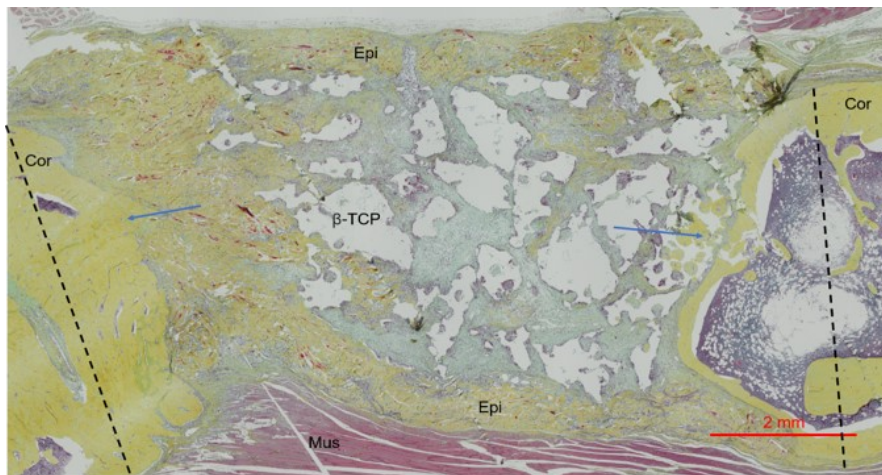
Epi + β -TCP



Epi + (β -TCP + BMC)



(Epi + BMC) + β -TCP



(Epi + BMC) + (β -TCP + BMC)

Abbildung 7 Movat-Färbung

Gezeigt werden repräsentative Schnitte jeder Gruppe. Die gestrichelte Linie zeigt den ehemaligen chirurgischen Schnitttrand an. Der rote Maßstabsbalken entspricht 2 mm. Zu beachten ist außerdem, dass sich das β -TCP als „Leerstellen“ darstellt, da es beim Dekalzifizieren aufgelöst wird. In den mit blauen Pfeilen markierten Arealen findet man eine deutliche Einsprossung des Knochens (in der Färbung gelb) in den Defektbereich. Diese Einsprossung findet sich in unterschiedlicher Ausprägung in allen Gruppen. Auch findet sich in den Epiflex-Gruppen ein deutlicher knöcherner Umbau der Membran.

Die Epiflex-Membran zeigte in Gruppen mit BMC einen deutlich gesteigerten knöchernen Umbau und, unabhängig von der Füllung, eine signifikant bessere Knochenneubildung als die Masquelet-Membran. So zeigte die Epiflex-Membran

in den Gruppen 4 und 6 eine histologisch deutlichere Transformation in knöchernes Gewebe als ihre Schwestergruppen 1 und 2 mit der induzierten Membran. Dieser Unterschied zeigte sich jedoch nicht im Defektbereich. Hier konnten keine signifikanten Abweichungen in der Knochenneubildung gezeigt werden.

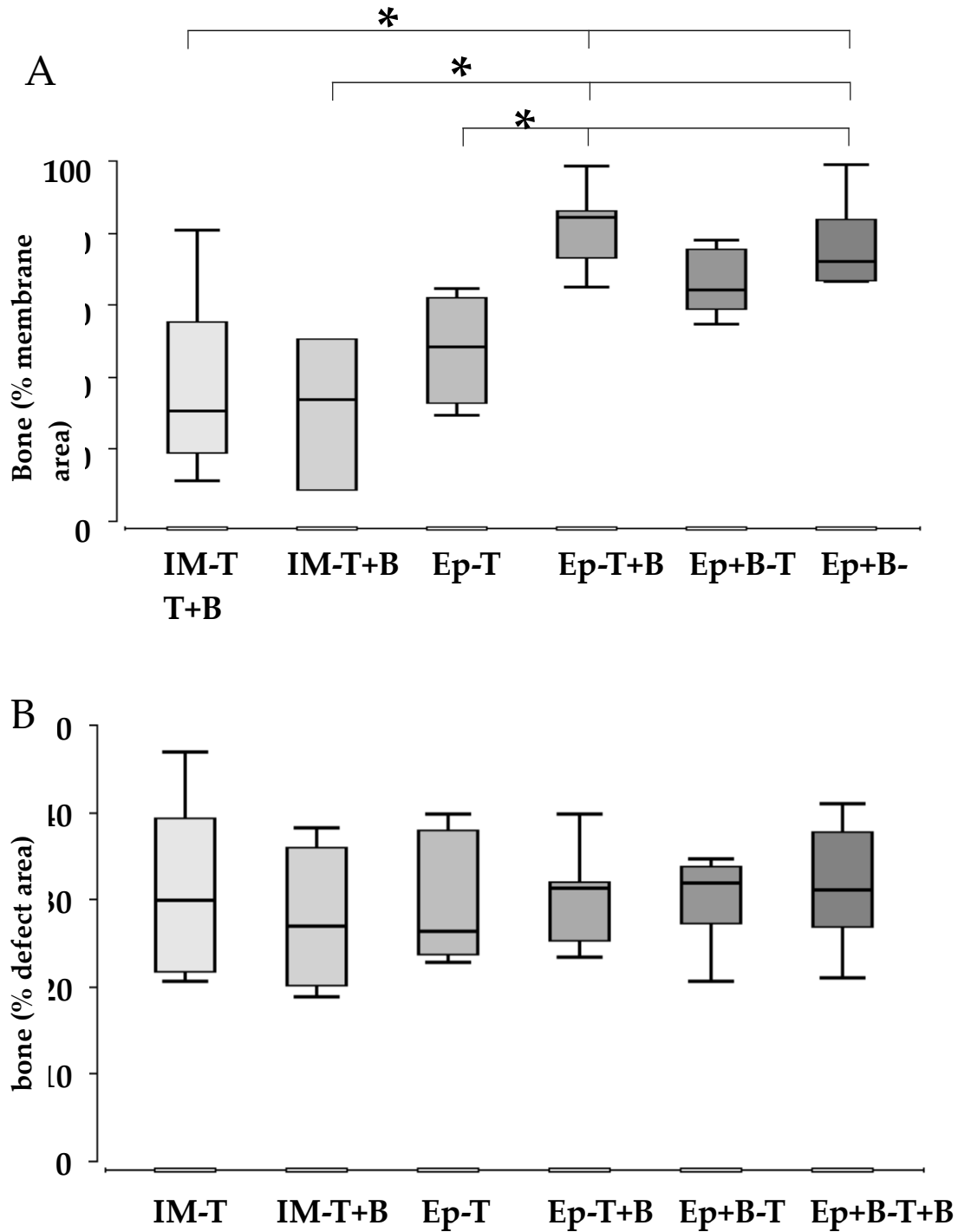


Abbildung 8 Anteile an Knochengewebe in Membran (A) und Defekt (B)

Gezeigt sind Boxplots des Medians. Die Gruppengröße beträgt n=6-8 Tiere. Auf der y-Achse ist der Anteil von Knochengewebe in Prozent der Membranfläche (A) und der Defektfläche (B) dargestellt. Auf der x-Achse finden sich die Gruppen.

IM-T	= induzierte Membran mit β -TCP
IM-T+B	= induzierte Membran mit β -TCP + BMC
Ep-T	= Epiflex mit β -TCP
Ep-T+B	= Epiflex mit β -TCP + BMC
Ep+B-T	= Epiflex + BMC mit β -TCP
Ep+B-T+B	= Epiflex + BMC mit β -TCP + BMC

* = $p < 0,05$ zwischen den mit der schwarzen Linie verbundenen Versuchsgruppen

Des Weiteren färbten wir auch eine native Epiflex-Membran, welche sich in der MOVAT-Färbung rot darstellt. Daher kann eine gelbliche Färbung in den Versuchen als Knochengewebe interpretiert werden.

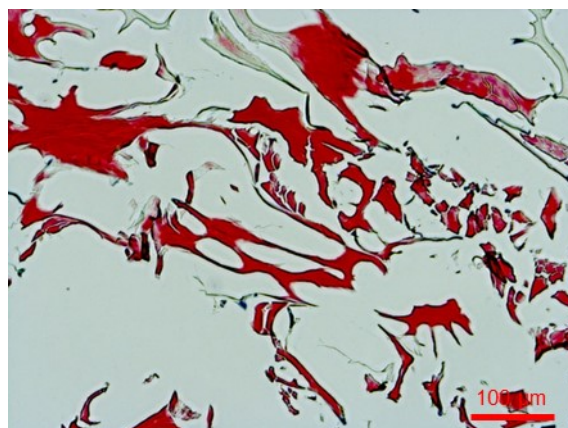


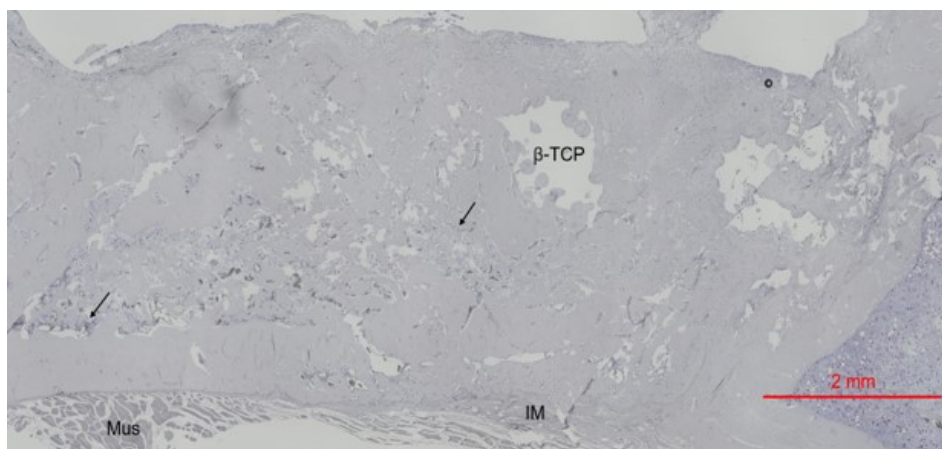
Abbildung 9 Native Epiflex-Membran, MOVAT-Färbung.

Der rote Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Die Membran ist nahezu vollständig rot eingefärbt, was den hohen Anteil an elastische Fasern widerspiegelt.

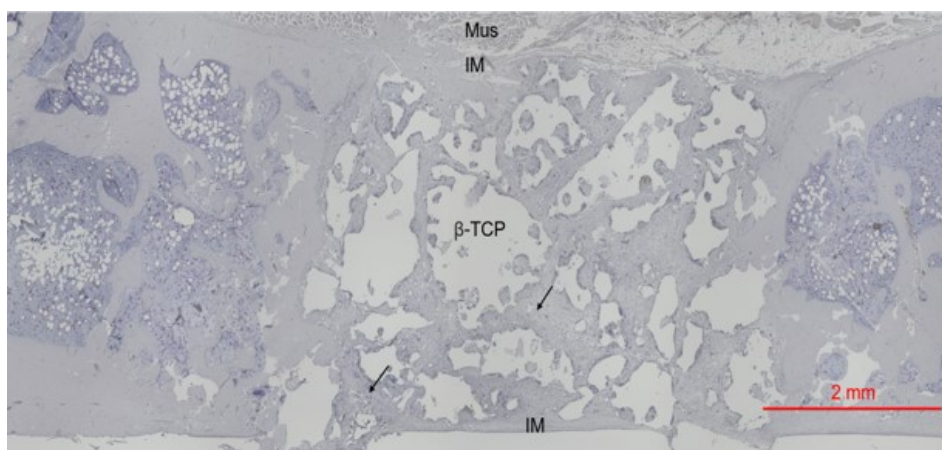
3.4 Beurteilung des Entzündungsvorgangs

3.4.1 CAE-Färbung

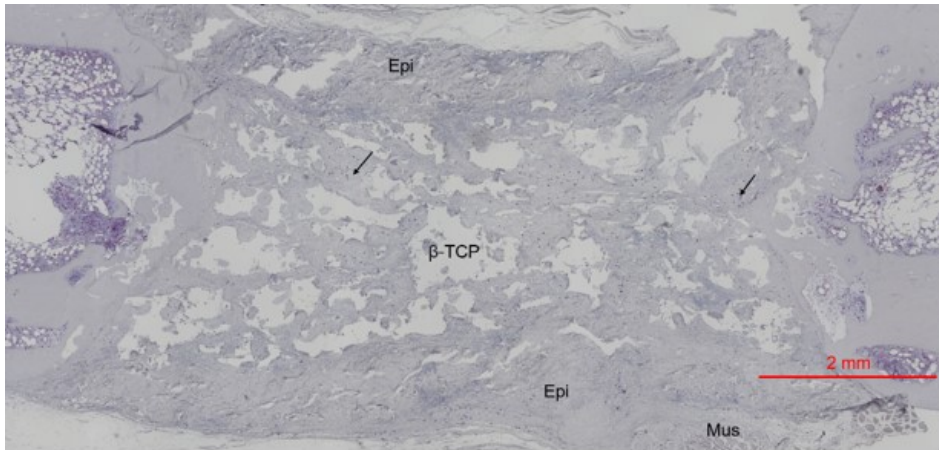
Durch Anfärbung der CAE (Chlorazetatesterase) können Granulozyten dargestellt werden, welche Hinweise auf akut ablaufende Entzündungsprozesse liefern.



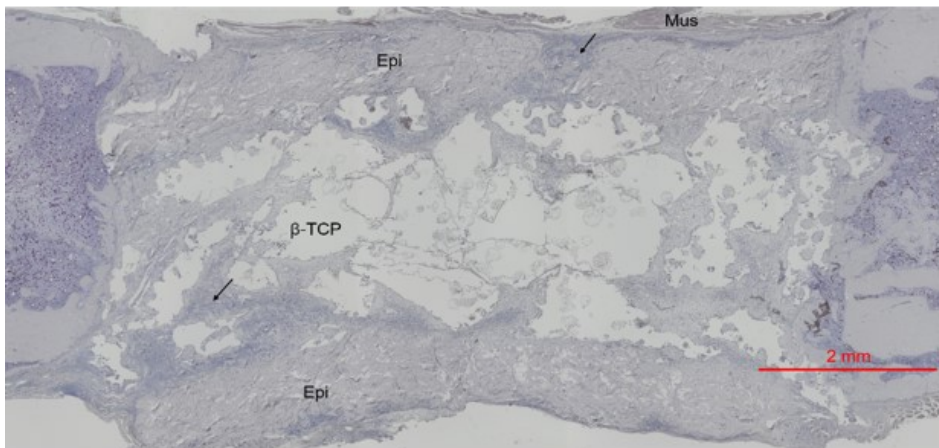
IM + β -TCP



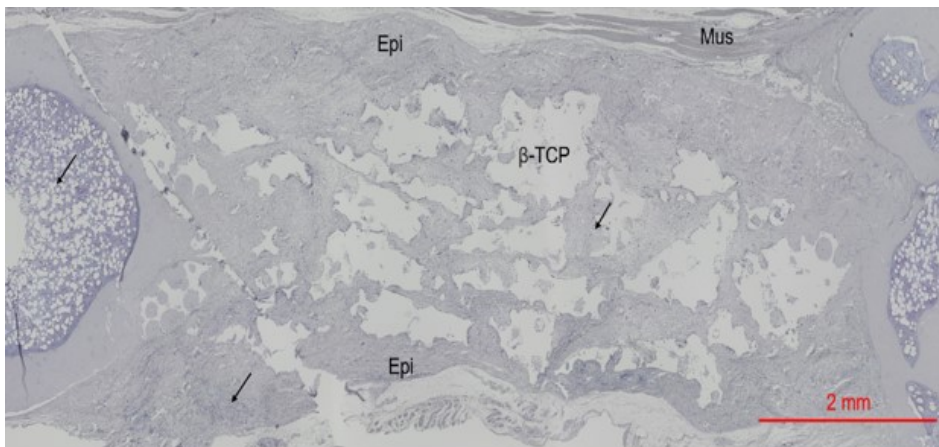
IM + (β -TCP + BMC)



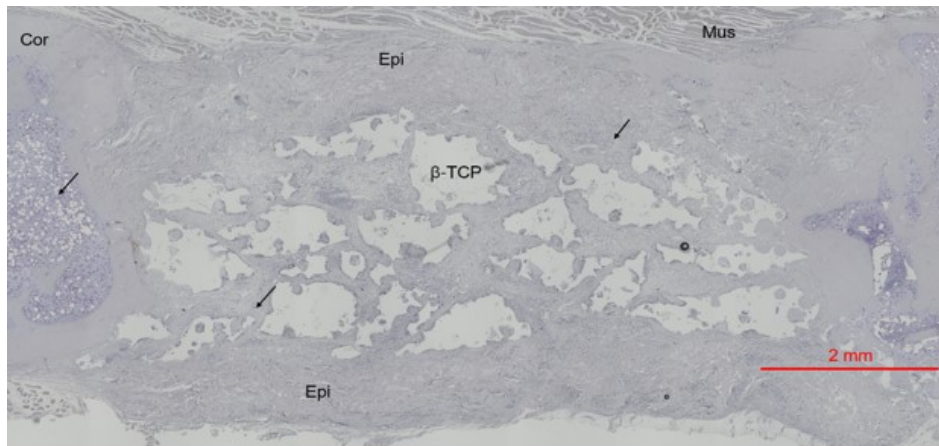
Epi + β -TCP



Epi + (β -TCP + BMC)



(Epi + BMC) + β -TCP



(Epi + BMC) + (β-TCP + BMC)

Abbildung 10 CAE-Färbung (Übersicht)

Gezeigt werden repräsentative Schnitte jeder Gruppe. Der rote Maßstabsbalken entspricht 2mm. Auch hier ist das β-TCP ausgewaschen worden und zeigt sich nur als Leerstellen im Schnitt. Die schwarzen Pfeile zeigen CAE-positive Zellen (lila Färbung), welche meist in Gruppen am Rand des Defekts angeordnet sind und auch im Knochenmark stark vertreten sind.

CAE-positive Zellen konnten in geringem Ausmaß in allen Gruppen dargestellt werden. Dabei zeigte sich bei der Masquelet-Membran eine tendenziell niedrigere Anzahl an CAE-positiven Zellen nach der Zugabe von BMCs (Gruppe 1 gegen 2) ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen. Unter den Epiflex Gruppen findet man hierbei keine signifikanten Unterschiede. Einzig Gruppe 6 [(Epi + BMC)+(β-TCP + BMC)] zeigt im Zentralbereich des Defekts signifikant weniger CAE positive Zellen als in den anderen Gruppen.

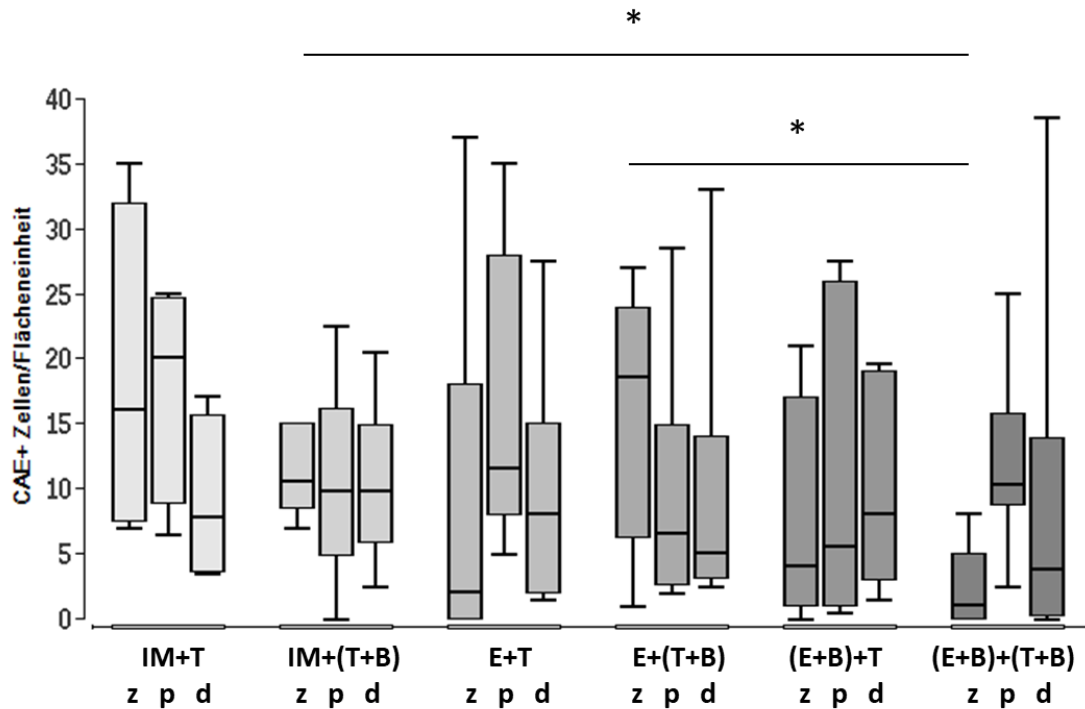


Abbildung 11 Anzahl CAE-positiver Zellen in verschiedenen Bereichen des Defekts

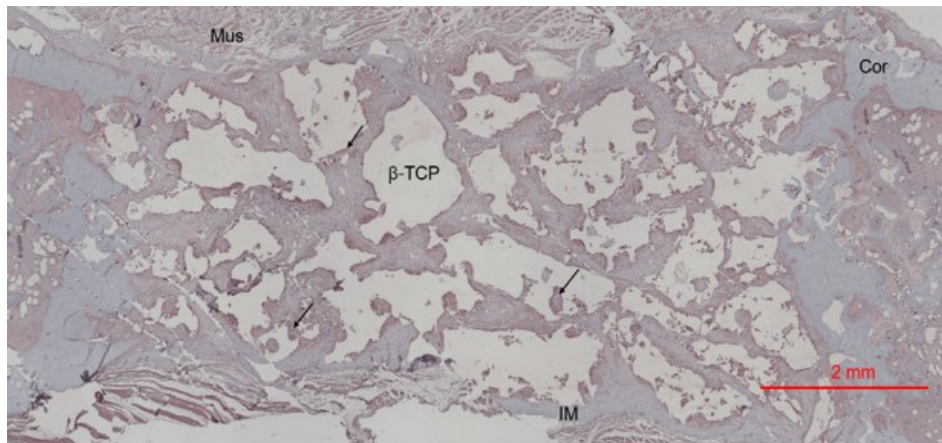
Gezeigt sind Boxplots des Medians. Die Gruppengröße beträgt n=6-8 Tiere. Auf der y-Achse ist die Anzahl an CAE-positiven Zellen zentral (z), proximal (p) und distal (d) im Defekt pro Flächeneinheit (125.000 pixel²= dargestellt. Auf der x-Achse finden sich die Gruppen.

- IM+T = induzierte Membran mit β -TCP
- IM+(T+B) = induzierte Membran mit β -TCP + BMC
- E+T = Epiflex mit β -TCP
- E+(T+B) = Epiflex mit β -TCP + BMC
- (E+B)+T = Epiflex + BMC mit β -TCP
- (E+B)+(T+B) = Epiflex + BMC mit β -TCP + BMC

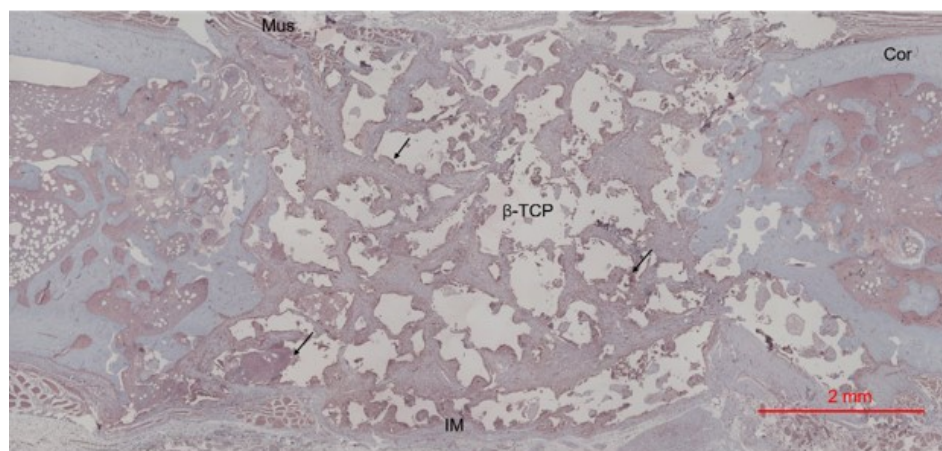
* = p < 0,05 zwischen den mit der schwarzen Linie verbundenen Versuchsgruppen

3.4.2 CD68-Färbung

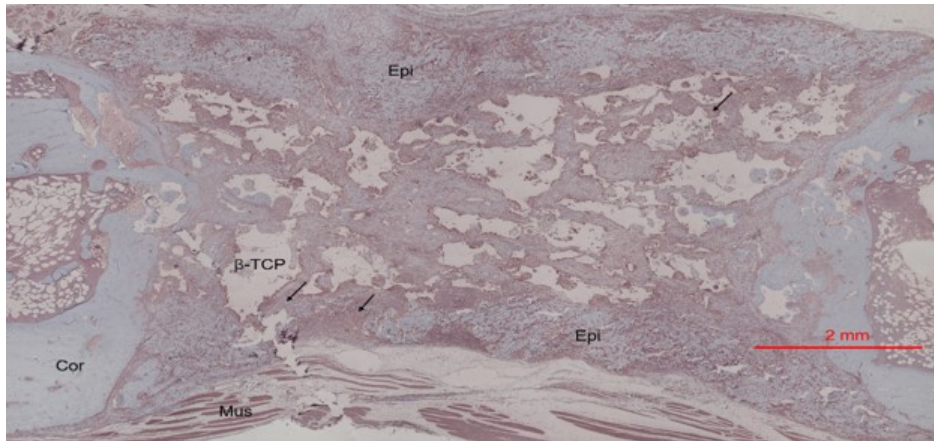
CD68 stellt ein Oberflächenprotein monozytärer Zellen dar und wird in der Histologie zur Darstellung von Makrophagen eingesetzt, welche CD68 auf ihrer Oberfläche exprimieren.



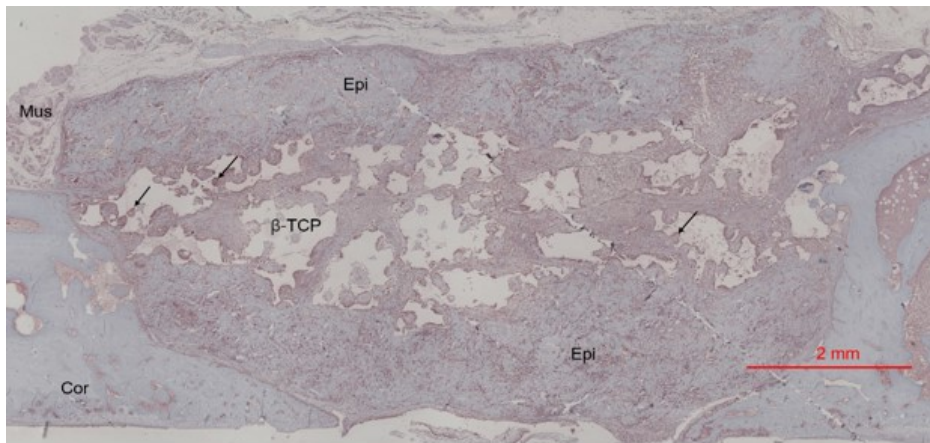
IM + β -TCP



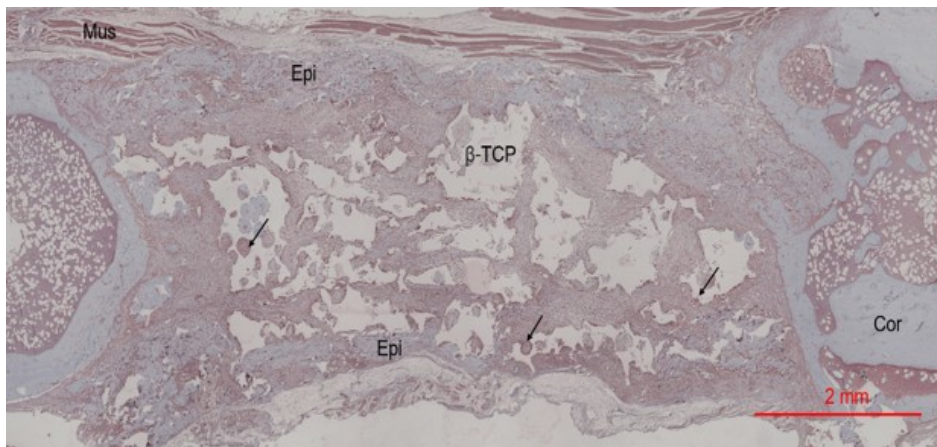
IM + (β -TCP + BMC)



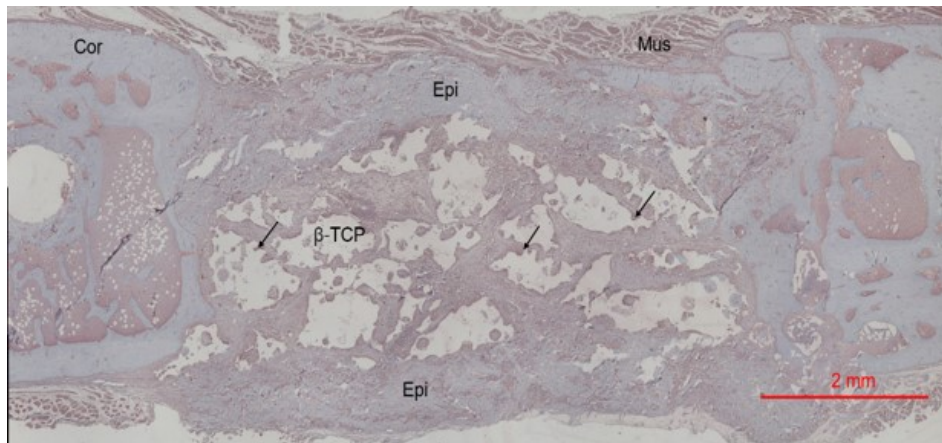
Epi + β -TCP



Epi + (β -TCP + BMC)

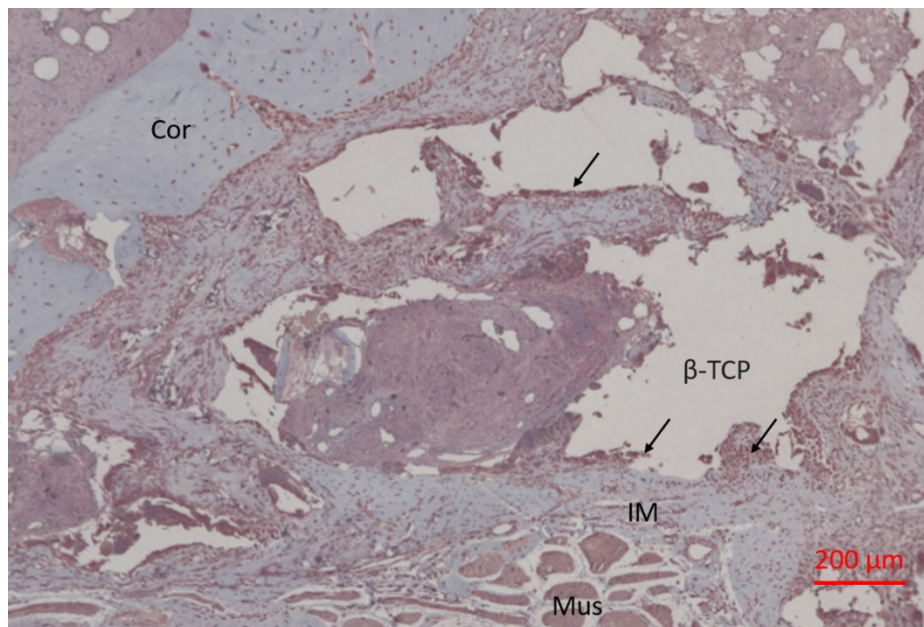


(Epi + BMC) + β -TCP



(Epi + BMC) + (β -TCP + BMC)

Abbildung 12 CD68 Färbung (Übersicht)



IM + (β -TCP + BMC)

Abbildung 13 CD68 Färbung (Detail)

Gezeigt werden repräsentative Übersichtsaufnahmen jeder Gruppe und exemplarisch eine repräsentative Detailaufnahme aus Gruppe 2. Der rote Maßstabsbalken entspricht in den Übersichtsaufnahmen 2mm und in der Detailaufnahme 200 μ m. Das β -TCP stellt sich als Leerstellen dar, da es bereits ausgewaschen wurde. Die CD68-positiven Zellen stellen sich rötlich-braun dar und liegen meist gruppiert um das β -TCP oder die Membran. Einzelne Ansammlungen sind mit Pfeilen exemplarisch markiert.

In Knochendefekten, welche mit der Epiflex-Membran behandelt wurden, zeigte sich ein signifikant niedriger Anteil an CD68-positiven Zellen. Auch scheint der Anteil an CD68-positiven Zellen in den Gruppen, die zusätzlich BMC erhielten, niedriger zu sein, jedoch ohne Signifikanzen zu zeigen. Betrachtet man die Verteilung der Zellen in den Gruppen, findet man die Entzündungszellen in den Masquelet-Gruppen ausschließlich um das β -TCP gruppiert. In den Epiflex-Gruppen befinden sich die CD68-positiven Zellen hingegen auch im Bereich der Membran.

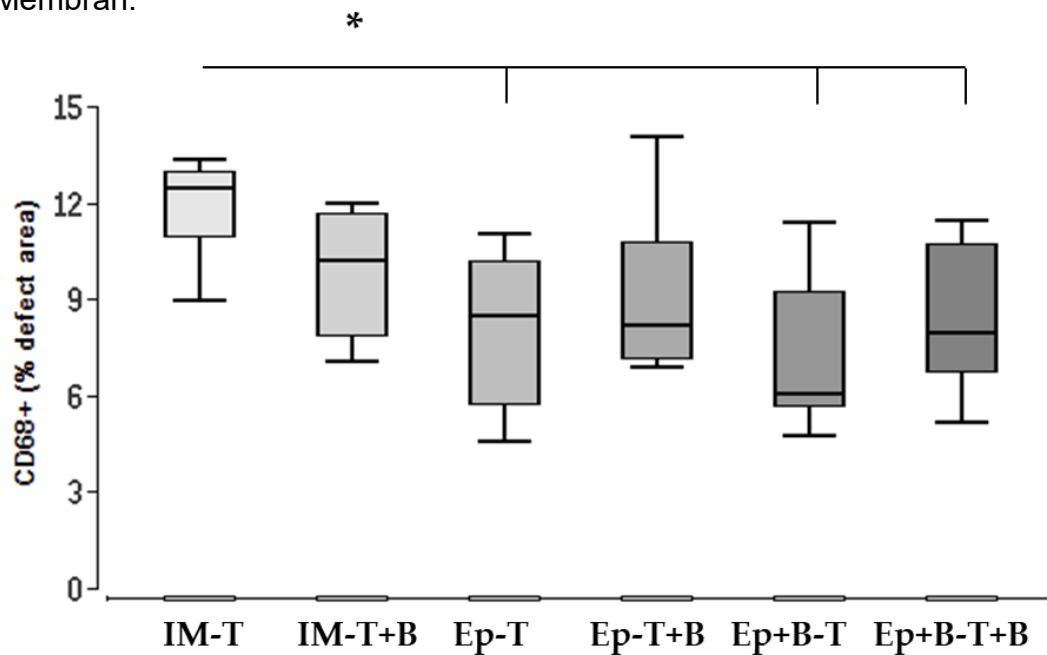


Abbildung 14 Anteil an CD68-positiven Zellen im Defekt

Gezeigt sind Boxplots des Medians. Die Gruppengröße beträgt n=6-8 Tiere. Auf der y-Achse ist der Anteil an CD68-positiven Zellen in Prozent der Defektfläche aufgetragen. Auf der x-Achse finden sich die Gruppen.

- IM-T = induzierte Membran mit β -TCP
- IM-T+B = induzierte Membran mit β -TCP + BMC
- Ep-T = Epiflex mit β -TCP
- Ep-T+B = Epiflex mit β -TCP + BMC
- Ep+B-T = Epiflex + BMC mit β -TCP
- Ep+B-T+B = Epiflex + BMC mit β -TCP + BMC

* = p < 0,05 zwischen den mit der schwarzen Linie verbundenen Versuchsgruppen

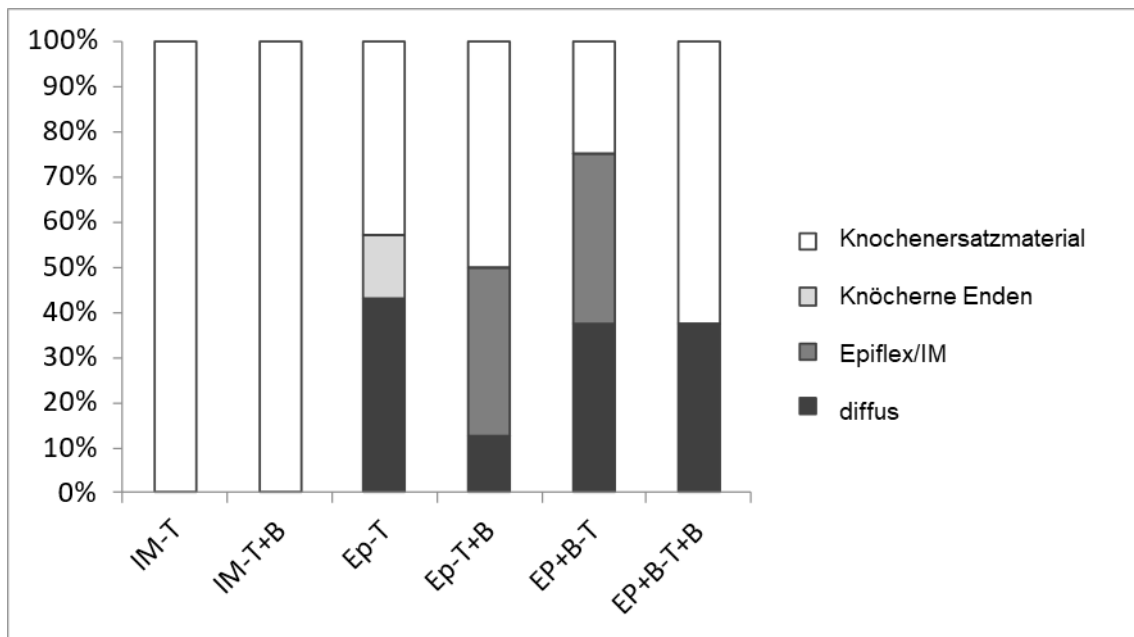


Abbildung 15 Lokalisation CD68-positive Zellen

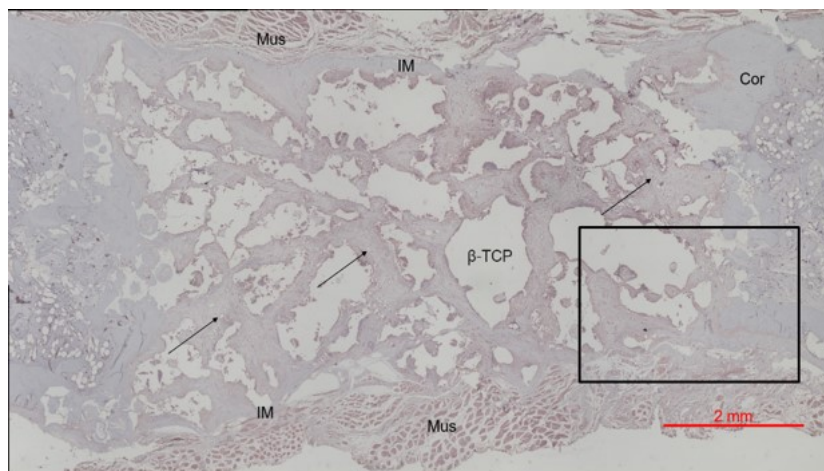
Zu sehen ist ein Balkendiagramm mit einer Gruppengröße von n=6-8 Tiere. Dabei stellt der Balken die Häufigkeit der betreffenden Lokalisation in Prozent der Schnitte dar. Auf der x-Achse finden sich die Gruppen.

- IM-T = induzierte Membran mit β -TCP
- IM-T+B = induzierte Membran mit β -TCP + BMC
- Ep-T = Epiflex mit β -TCP
- Ep-T+B = Epiflex mit β -TCP + BMC
- Ep+B-T = Epiflex + BMC mit β -TCP
- Ep+B-T+B = Epiflex + BMC mit β -TCP + BMC

3.5 Beurteilung der Angiogenese

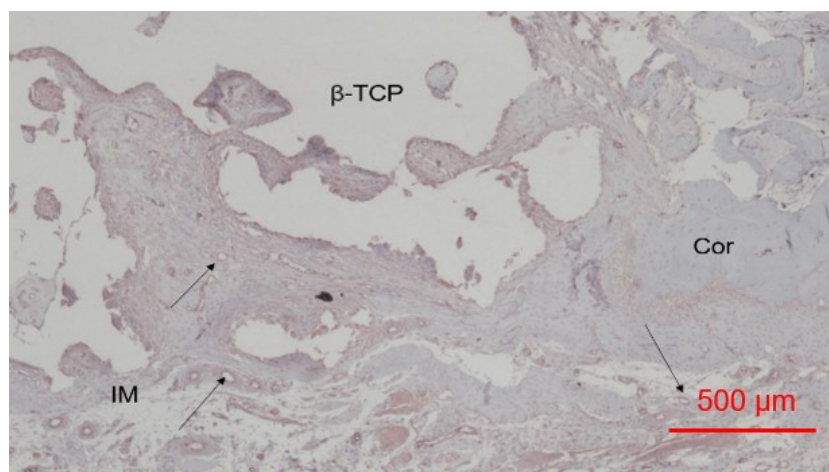
3.5.1 vWF-Färbung

Der von-Willebrand-Faktor spielt eine wichtige Rolle in der Hämostaseologie und bewirkt unter anderem die Aggregation von Thrombozyten. Allerdings ist er auch, gebunden an Endothelzellen, an der Angiogenese beteiligt und kann so zur Markierung reiferer Gefäße eingesetzt werden.

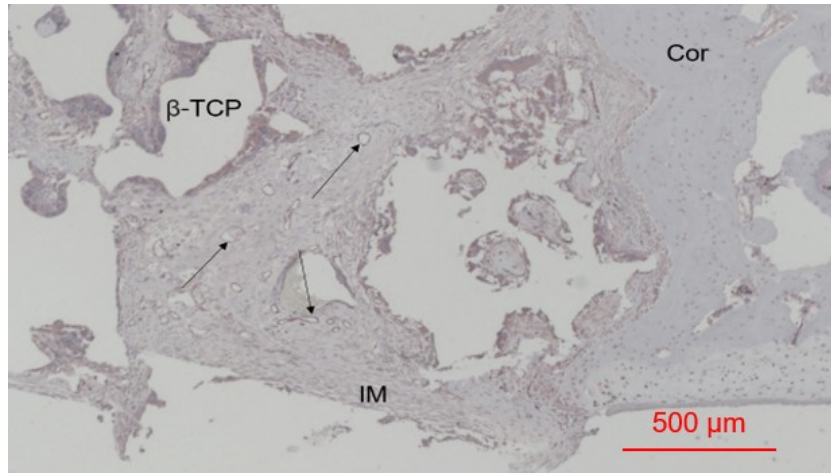


IM + β -TCP

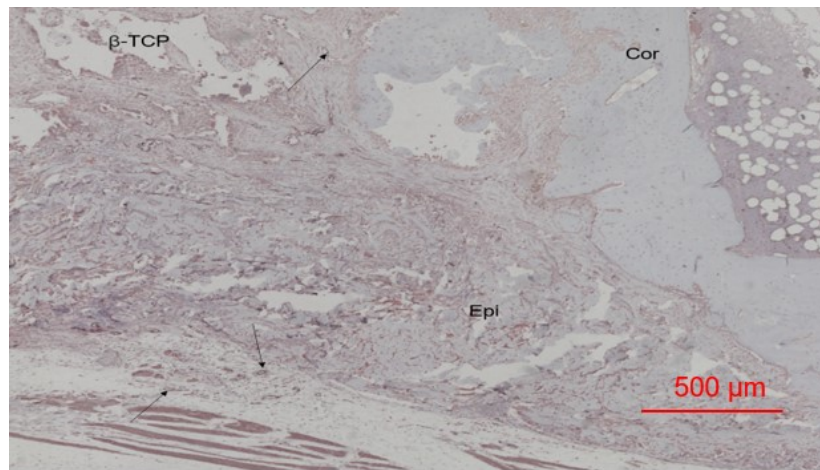
Abbildung 16 vWF-Übersichtsaufnahme



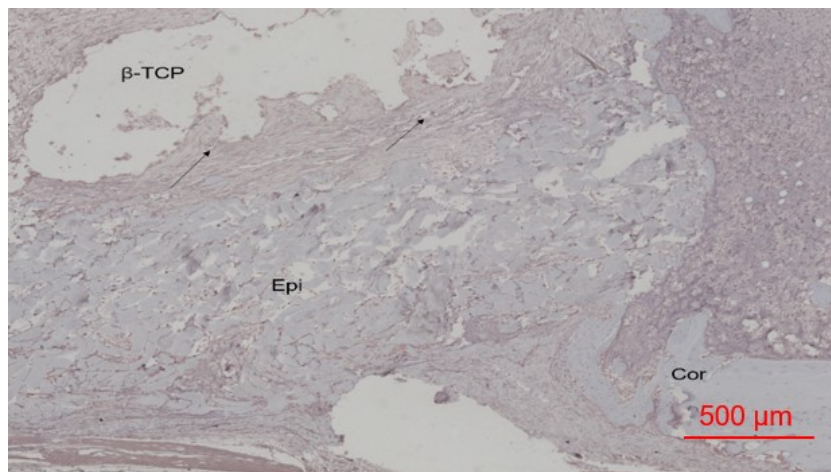
IM + β -TCP



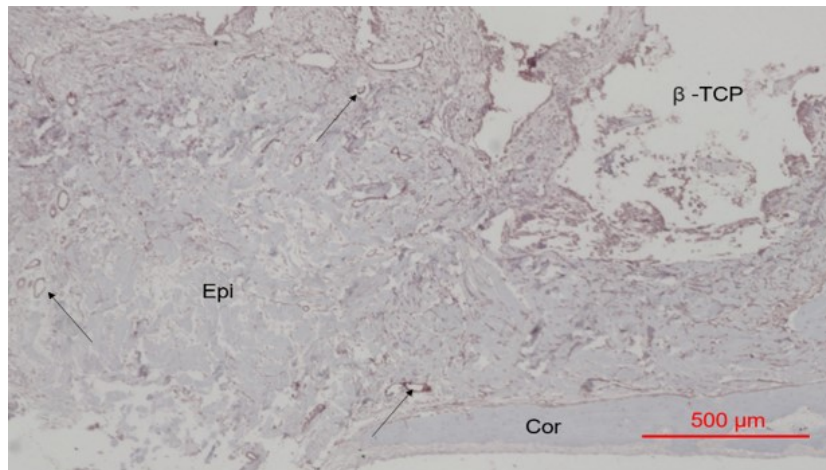
IM + (β -TCP + BMC)



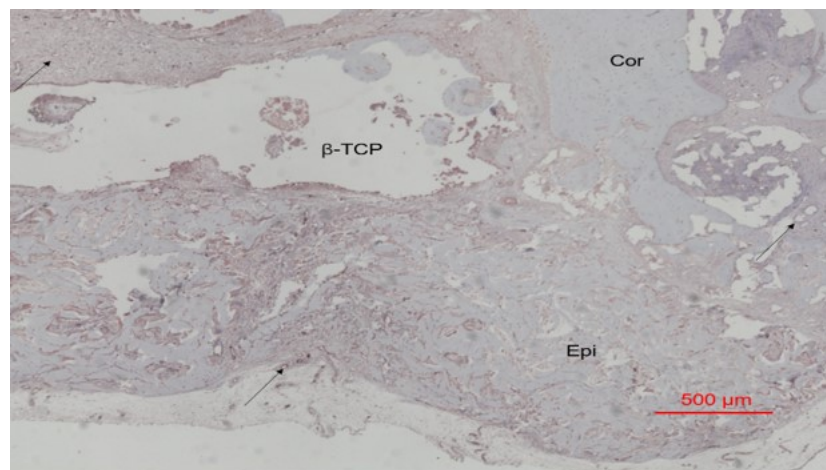
Epi + β -TCP



Epi + (β -TCP + BMC)



(Epi + BMC) + β -TCP



(Epi + BMC) + (β -TCP + BMC)

Abbildung 17 vWF Detailaufnahmen

Gezeigt wird eine Übersichtsaufnahme aus Gruppe 2 und repräsentative Detailaufnahmen aus jeder Gruppe. Der schwarze Kasten in der Übersichtsaufnahme markiert dabei die Entnahmestelle der Detailaufnahmen. Der rote Balken entspricht 2 mm in der Übersichtsaufnahme und 500 μm in den Detailaufnahmen. Das β-TCP stellt sich durch das Auswaschen als Hohlraum dar. VWF-positive Gefäße sind mit Pfeilen exemplarisch markiert.

Es zeigte sich eine höhere Anzahl vWF-positive Gefäße in den Epiflex Gruppen verglichen mit den Masquelet-Tieren. In den Epiflex-Gruppen befinden sich diese auch vorwiegend im Defekt. In den Gruppen 1 und 2 hingegen finden sie sich auch in großen Teilen in der Membran. Die Anwesenheit von BMCs allerdings führt zu keiner signifikanten Veränderung.

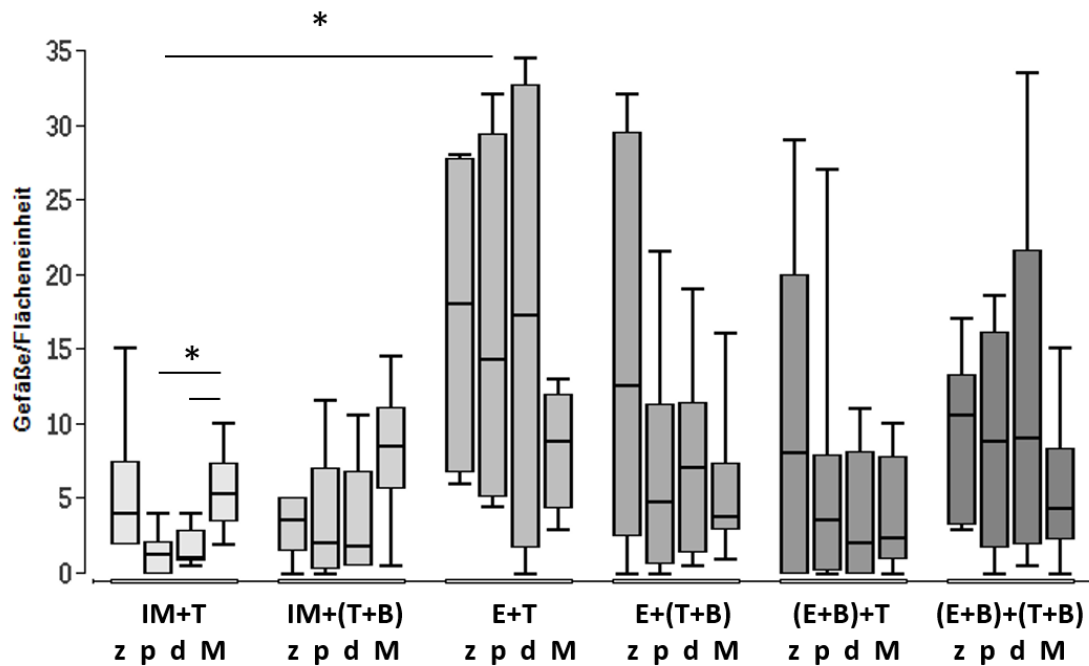


Abbildung 18 Anzahl vWF-pos. GefäÙe pro Flächeneinheit

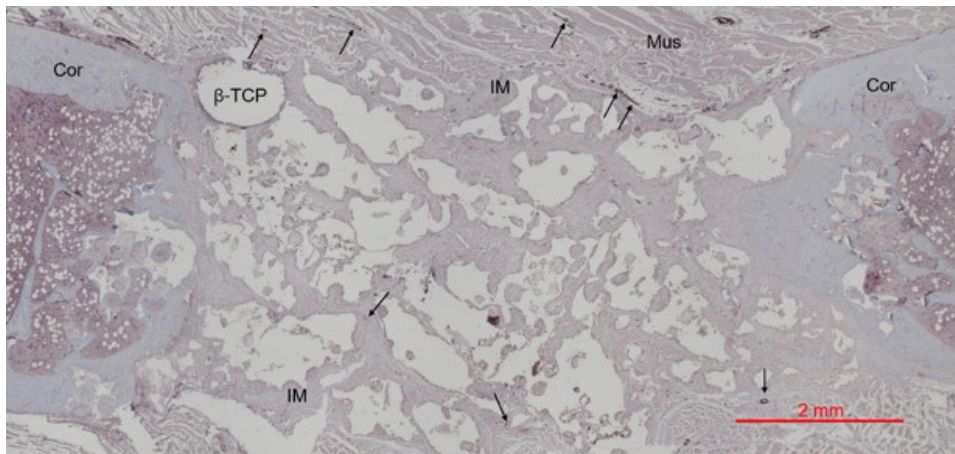
Gezeigt sind Boxplots des Medians. Die GruppengröÙe beträgt n=6-8 Tiere. Auf der y-Achse ist die Anzahl an vWF-positiven GefäÙen zentral (z), proximal (p) und distal (d) im Defekt und in der Membran (M) pro Flächeneinheit (125.000 pixel²= dargestellt. Auf der x-Achse finden sich die Gruppen.

- IM+T = induzierte Membran mit β -TCP
- IM+(T+B) = induzierte Membran mit β -TCP + BMC
- E+T = Epiflex mit β -TCP
- E+(T+B) = Epiflex mit β -TCP + BMC
- (E+B)+T = Epiflex + BMC mit β -TCP
- (E+B)+(T+B) = Epiflex + BMC mit β -TCP + BMC

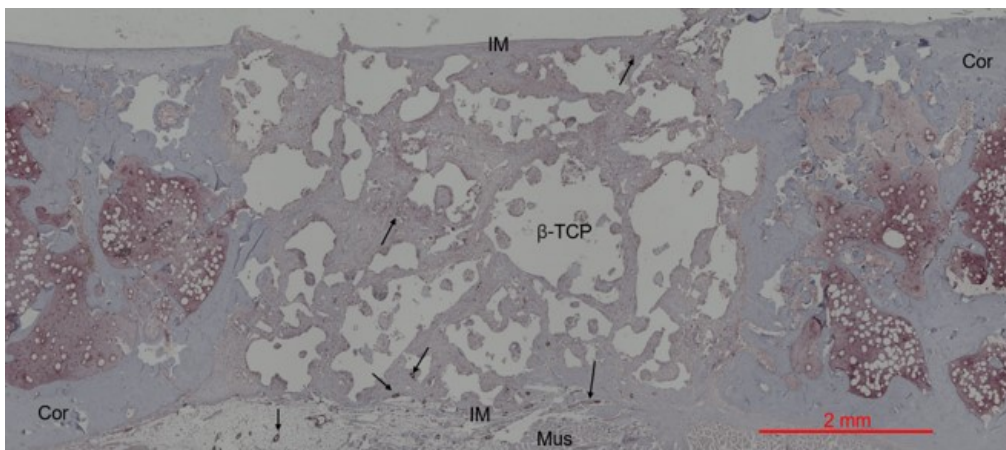
* = p < 0,05 zwischen den mit der schwarzen Linie verbundenen Versuchsgruppen

3.5.2 α -SMA-Färbung

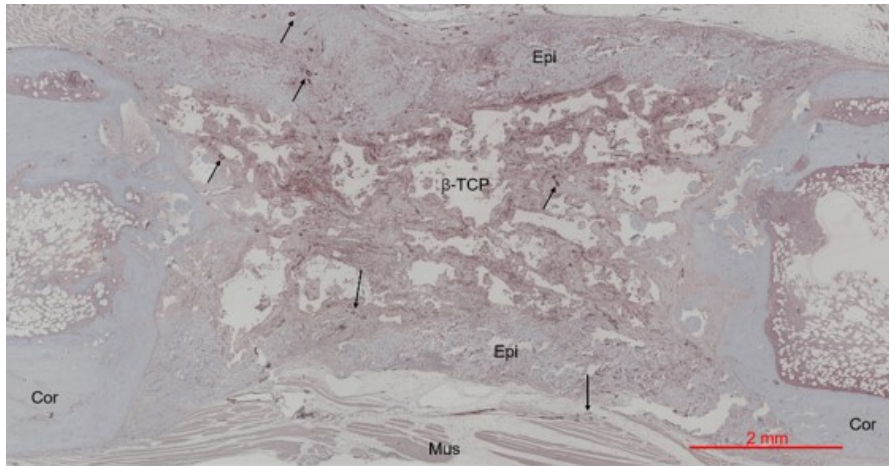
α -SMA (α -smooth muscle actin) ist die Aktin-Isoform, welche den größten Anteil im glatten Muskel von Gefäßen darstellt. So kann mittels Färbung selbiger die Gefäße im und um den Defekt dargestellt werden, um eine Aussage über den Grad der Vaskularisierung zu treffen.



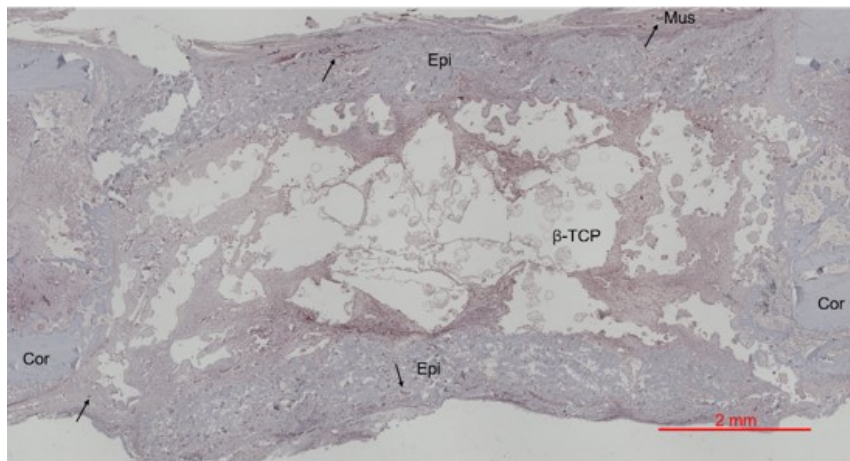
IM + β -TCP



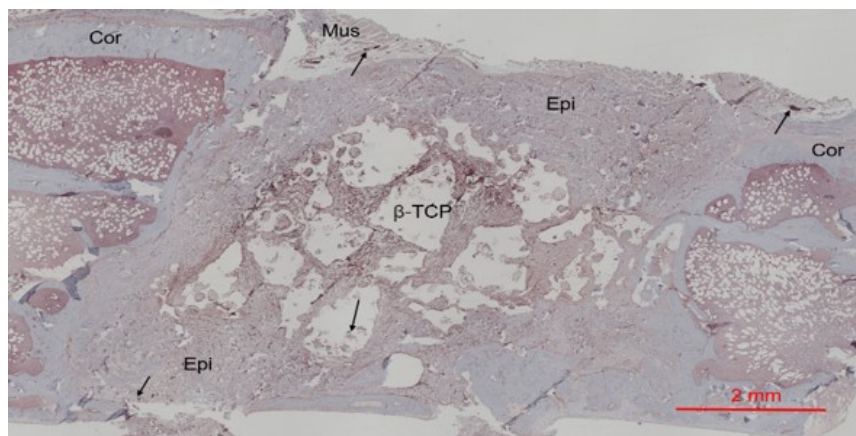
IM + (β -TCP + BMC)



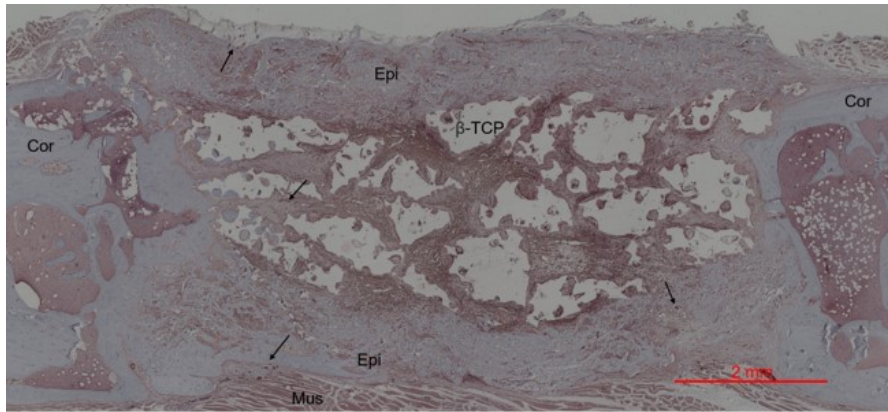
Epi + β -TCP



Epi + (β -TCP + BMC)



(Epi + BMC) + β -TCP



(Epi + BMC) + (β-TCP + BMC)

Abbildung 19 α-SMA Übersichtsaufnahmen

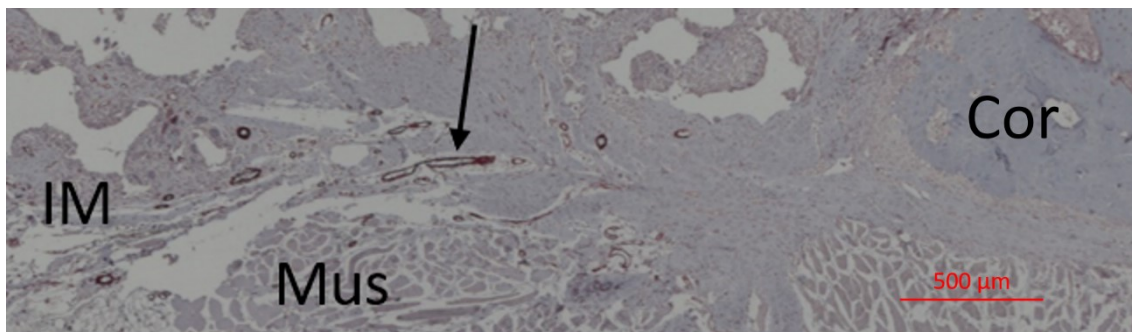


Abbildung 20 α-SMA Detailaufnahme unterer rechter Quadrant Gruppe 2

Gezeigt werden repräsentative Schnitte jeder Gruppe und eine Detailaufnahme der Gruppe 2. Der rote Maßstabsbalken entspricht 2 mm in den Übersichtsaufnahmen und 500 μm in der Detailaufnahme. Auch hier stellt sich das β-TCP durch den Dekalzifizierungsprozess als Leerstelle dar. Man findet in jedem Schnitt Gefäße in der Membran und im Defekt, welche exemplarisch mit einem Pfeil markiert sind, wobei die Gefäße in der Membran hauptsächlich am Rand in der Nähe des Muskels liegen. Gelegentlich sieht man auch, wie in der Detailaufnahme mit einem Pfeil markiert, wie einzelne Gefäße aus dem Muskel in die Membran einwachsen.

Die Vaskularisierung der Membranen ist sowohl bei der Epiflex- als auch der induzierten Membran idem. Auch die Zugabe von BMCs führte zu keiner Veränderung. Unterschiede zeigen sich allerdings im Defektbereich. Hier finden sich die Defektbereiche der Epiflexgruppen im Trend stärker vaskularisiert. Das Hinzufügen von BMCs führte ebenfalls nicht zu einer Veränderung, wobei die meisten Gefäße in Gruppe 6 (Epiflex + BMC und β-TCP + BMC) zu finden sind, ohne dabei einen signifikanten Unterschied zu zeigen. Betrachtet man die

Membranen an sich, findet man Gefäße fast ausschließlich im Randbereich, wo sie meistens um die Muskeln gruppiert auftreten. In einigen Präparaten finden sich auch Gefäße, welche vom Muskel ausgehend in die Membran eindringen.

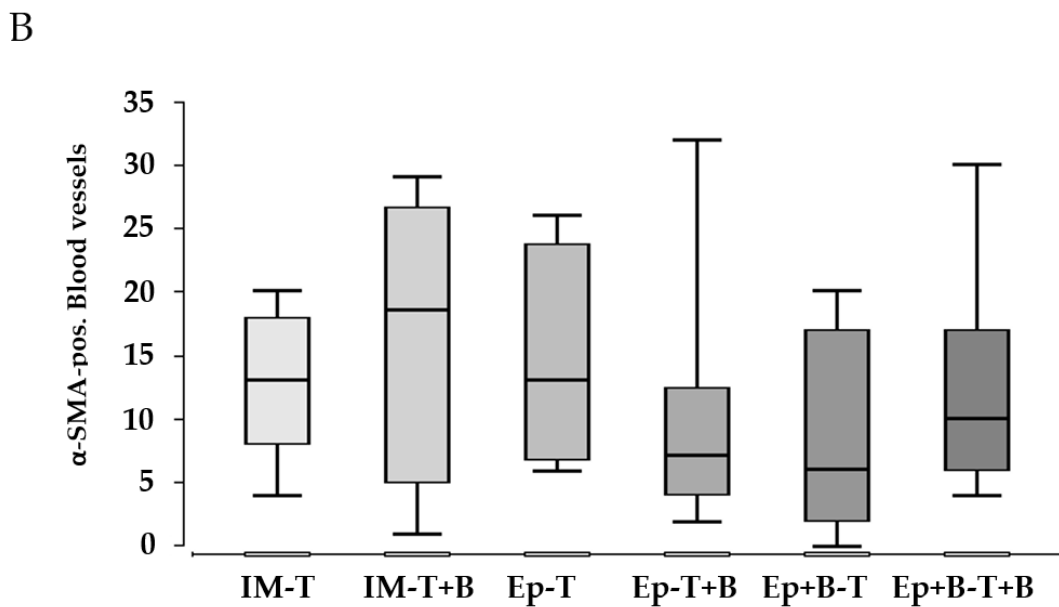
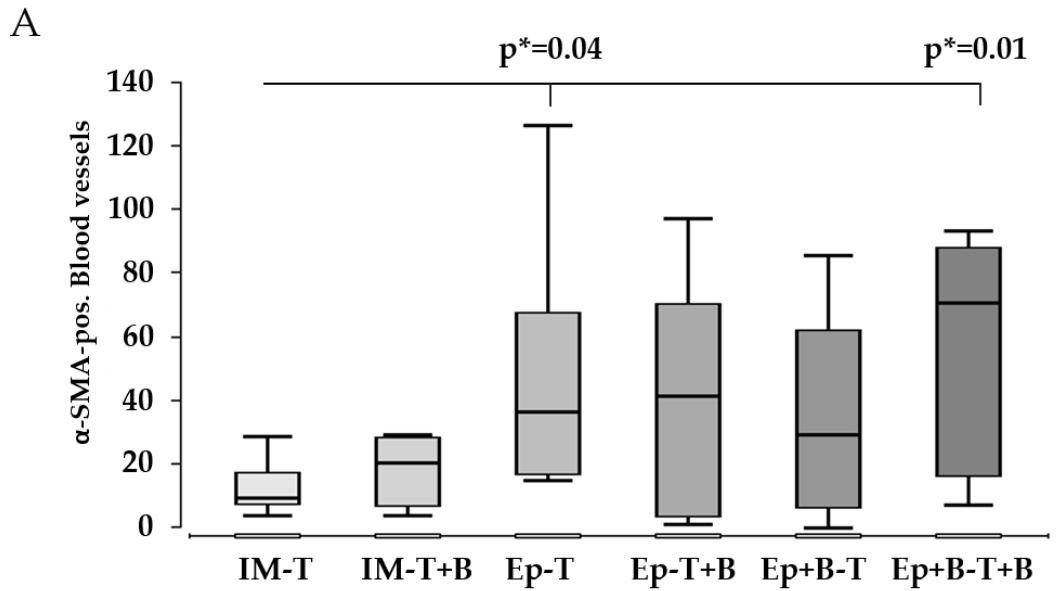


Abbildung 21 Anzahl an α -SMA positiven Gefäßen in Defekt (A) und Membran (B)

Gezeigt sind Boxplots des Medians. Die Gruppengröße beträgt n=6-8 Tiere. Auf der y-Achse ist die Anzahl an α -SMA-positiven Gefäßen im Defekt (A) und der Membran (B) dargestellt. Auf der x-Achse finden sich die Gruppen.

IM-T	= induzierte Membran mit β -TCP
IM-T+B	= induzierte Membran mit β -TCP + BMC
Ep-T	= Epiflex mit β -TCP
Ep-T+B	= Epiflex mit β -TCP + BMC
Ep+B-T	= Epiflex + BMC mit β -TCP
Ep+B-T+B	= Epiflex + BMC mit β -TCP + BMC

p* = p < 0,05 ohne alpha-Korrektur (explorative Signifikanz, statistischer Trend) zwischen den mit der schwarzen Linie verbundenen Versuchsgruppen

4. Diskussion

Wie eingangs beschrieben stellen große Knochendefekte auch heute noch ein Problem für Patienten und Behandler dar. Alle etablierten Verfahren gehen mit Nachteilen einher, wie beispielsweise im Falle der hier beschriebenen Masquelet-Technik die Notwendigkeit einer zweiten Operation, welche die definitive Versorgung weiter hinauszögert und ein zusätzliches Trauma für den Patienten darstellt. In dieser Arbeit wurde nun gezeigt, dass die Kombination aus dezellularisierter Dermis mit BMC, welche diese Nachteile nicht hat, dennoch bezüglich der Parameter Stabilität und zellulärer Besatz gleichwertig zu der induzierten Membran ist.

Wie im Folgenden noch einmal ausführlicher beleuchtet, zeigten sich in der histologischen Auswertung in den Gruppen mit der Epiflex-Membran ein signifikant besserer knöcherner Umbau als in den Masquelet-Gruppen, welcher durch Zugabe von BMC noch gesteigert werden konnte. Auch die Inflammation im Defekt scheint in den CAE- und CD68-Färbungen in den Epiflex-Gruppen niedriger zu sein. Des Weiteren kann in der α -SMA- und vWF-Färbungen eine bessere Vaskularisierung in den Epiflex-Gruppen im Vergleich zu den Masquelet-Gruppen beobachtet werden. Allerdings konnte hier kein positiver Einfluss der BMC nachgewiesen werden.

4.1 Die Epiflex-Membran ist ein vergleichbares Medium zur Knochenheilung im Vergleich zur induzierten Membran

Die klassische Masquelet-Technik zeigt gute Erfolge bei der Behandlung von kritisch großen Knochendefekten^{33,35,45}. Der Nachteil ist jedoch das zweizeitige Vorgehen, welches die definitive Versorgung verzögert, eine weitere OP mit erneutem Narkose- und OP-Risiko bedingt⁴⁶ und den Krankenhausaufenthalt verlängert und damit die Kosten und das Trauma des Patienten vergrößert⁴⁷.

Um die Behandlung nicht infizierter langstreckiger Knochendefekte auf eine einzige OP zu reduzieren, ist das Konzept der einzeitigen Membrantechnik unter Verwendung einer Ersatzmembran an Stelle der induzierten Membran entwickelt worden. Die induzierte Membran unterstützt die Knochenheilung wahrscheinlich über unterschiedliche Mechanismen. Zum einen dient sie als eine physikalische Barriere, die die eingebrachte Defektfüllung lagestabilisiert, das Einwachsen von fibrösem Gewebe sowie die Resorption des eingebrachten Grafts verhindert³⁵, und zum anderen wahrscheinlich als eine Art „Bioreaktor“, indem sie ein Reservoir für reparative Zellen darstellt und verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren sezerniert³⁸. Möglicherweise fungiert sie auch als eine Art Leitschiene für das Knochenwachstum und die Angiogenese⁴⁵.

Als Ersatz für die induzierte Membran wurde eine dezellularisierte humane Dermis ausgewählt, von der angenommen wurde, dass sie diese Funktionen ebenfalls erfüllen könnte. In den vorliegenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass es zu keiner Resorption der Membran gekommen ist und die Defektfüllung an Ort und Stelle gehalten werden konnte. Darüber hinaus wurde die Membran knöchern transformiert und in einigen Fällen konnten knöcherne Verbindungen zwischen der Membran und den Frakturrenden beobachtet werden. Als native, dezellularisierte Membran besitzt die Epiflex-Membran nicht die Möglichkeit selbst biologisch aktiv zu werden. In dieser Hinsicht ist sie der induzierten Membran unterlegen, welche TGF- β , VEGF, vWF, IL-6 und IL-8 ausschüttet³⁸ und verschiedene Zellen, wie etwa Osteoklasten und deren Vorläufer beinhaltet³⁶, welche im Prinzip direkt nach der Defektversorgung im Rahmen des zweiten Eingriffs mit der Defektfüllung interagieren können. Vorversuche haben

allerdings gezeigt, dass die Epiflex-Membran in ihrem hydrierten Zustand große Volumina an Blut absorbieren kann, sodass während der Implantation eine Art „Biologisierung“ stattfindet⁴⁸.

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Arbeit die Membran durch das Aufbringen von BMC mit biologischer Aktivität versehen, wobei Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass die Epiflex-Membran gleichmäßig mit hoher Dichte mit BMC beladen werden kann⁴³. Des Weiteren finden sich in der Literatur signifikante Hinweise, dass dieses Material schnell vaskularisiert wird⁴⁹. BMC haben sich in mehreren Studien unserer Arbeitsgruppe und anderer Forscher im Bereich der Knochenheilung bewährt^{29,50}, zudem weisen sie eine starke proangiogene Aktivität auf^{51,52}. Wie im Folgenden noch einmal ausführlicher beleuchtet wird, in beiden Gefäßfärbungen (vWF, α -SMA) zeigen, dass die Epiflex-Membran in gleichem Maße vaskularisiert wird, wie die induzierte Membran.

Da sich auch die Knochenheilung in dem 10 mm Defekt, ummantelt mit Epiflex, ebenfalls nicht im Vergleich zur induzierten Membran unterschied, kann geschlossen werden, dass die Epiflex-Membran ein tauglicher Ersatz für die induzierte Membran sein kann. Diese Einschätzung wird durch neuere Ergebnisse der Arbeitsgruppe weiter bestätigt. Unter Verwendung eines 5 mm großen Femurdefekts mit spongiösem Knochenmaterial als Defektfüllung konnten biomechanisch hochbelastbare Heilungsergebnisse erzielt werden. Histologisch und radiologisch zeigte sich der 5 mm-Knochendefekt komplett ossär überbrückt⁴⁸. Gründe, warum ein 5 mm Defekt komplett abheilt und der hier untersuchte 10 mm Defekt nicht, könnte eine im Verhältnis zur Defektgröße zu kurze Heilungszeit sein. Sowohl die Tiere mit 5 mm Defekt, als auch die Tiere mit dem 10 mm Defekt wurden nach 8 Wochen zur Femurentnahme getötet. Man könnte nun spekulieren, dass auch der 10 mm Defekt mit einer längeren Heilungszeit ebenfalls abgeheilt wäre. Des Weiteren wurde in der Arbeit mit dem 5 mm Defekt als Defektfüllung ausschließlich mit Spongiosa von der Spenderratte im Vergleich zum β -TCP in dieser Arbeit gearbeitet. Die Spongiosa bringt bereits lebende Zellen und eine passende Matrix mit und muss nicht selbst verknöchern, sondern nur knöchern verbunden werden. Auch dies würde eine

schnellere Abheilung im Vergleich zu einem mit β -TCP versorgten Defekt erklären.

Die Verwendung von zellbesiedelten Membranen zur Behandlung von Gewebe- und/oder Knochendefekten ist ein Konzept, welches auch von anderen Arbeitsgruppen erforscht wird⁵³. So experimentierten Ren et al. mit sogenannten *cell sheets*⁵⁴, künstlich hergestellten biologischen Membranen. Dafür haben sie endotheliale Zellen der Nabelschnurvene (HUVEC) auf einer Lage undifferenzierter humaner mesenchymaler Stammzellen ausgesät. Dabei konnte *in vivo* im Mausmodell eine schnelle Vaskularisierung der entstehenden Membran und auch in verschiedenen immunhistologischen Färbungen eine knöcherne Transformation gezeigt werden⁵⁵. Größere und komplexere Strukturen stellen für die *cell sheets* allerdings nach wie vor ein Problem dar, da hier die mechanische Stabilität und die Nährstoffversorgung der Zellen problematisch ist⁵³. Das Epiflex hingegen zeichnet sich durch einfache Lagerung und gute Handhabbarkeit bei guter Verfügbarkeit aus.

4.2 Die Epiflex-Membran ist immunologisch nicht reaktiv und führt auch in Kombination mit BMCs nicht zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion

Eine weitere zentrale Fragestellung war, inwiefern die Epiflex-Membran als Fremdkörper zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion führt und dadurch gegebenenfalls die Knochenheilung sogar behindert. Da die Epiflex-Membran im Herstellungsprozess dezellularisiert wird, die strukturgebenden Proteine evolutionär hochkonserviert sind und sich zwischen Mensch und Ratte nur marginal unterscheiden⁵⁶, sollte es zu keiner Immunreaktion im Sinne einer Abstoßungsreaktion kommen. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen dieser Arbeit wider.

Die Dichte an CAE positiven Zellen, wie zum Beispiel Granulozyten, ist in beiden Membranen gleich und auch die Zugabe von BMCs führte zu keiner signifikanten Veränderung. Einige Unterschiede finden sich jedoch, wenn man sich die

monozytären Zellen, wie etwa Makrophagen, mittels der CD68-Färbung anschaut. Hier zeigt sich eine signifikant niedrigere Anzahl an CD68-positiven Zellen in den Epiflex-Gruppen im Vergleich zu den Masquelet-Gruppen. Interessant ist jedoch die Verteilung der Zellen. In Gruppen mit der Masquelet-Membran finden sich die Zellen ausschließlich um das β -TCP und nicht in bzw. direkt benachbart zur Membran. Dies deckt sich mit den Arbeiten von Ghanaati et al., dessen Arbeitsgruppe die Formation von CD68-positiven vielkernigen Riesenzellen im Sinne einer Fremdkörperreaktion um das β -TCP beschreibt⁵⁷. Diese zeigen sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften und beeinflussen die Knochenheilung direkt. Des Weiteren spielen sie auch eine wichtige Rolle in der Abbaukinetik des β -TCP⁵⁸.

Epiflex scheint nach unseren Befunden keine ausgeprägte Fremdkörperreaktion zu provozieren. Mikroskopisch konnten überdies keine Lymphozyteninfiltrate beobachtet werden, eine adaptive Immunreaktion gegen das Material scheint ebenfalls nicht induziert zu werden. Dies könnte, wie weiter oben bereits erwähnt, darauf zurückgeführt werden, dass es sich bei Epiflex um eine körperähnliche Struktur handelt, welche keine Fremdkörperreaktionskaskaden auslöst. Das Fehlen einer adaptiven Immunantwort auf das humane Gewebe in der Ratte kann auf die evolutionär hochkonservierten Strukturproteine zurückzuführen sein, die das Epiflex bilden und sich zwischen den Spezies Mensch und Ratte nur geringfügig unterscheiden⁵⁶.

Weiterhin ist denkbar, dass die zugegebenen BMC eine anti-inflammatorische Wirkung ausüben. Die Auswertungen zeigen eine Tendenz zu niedrigeren Makrophagenkonzentrationen in Anwesenheit von BMC, allerdings sind diese Resultate nicht eindeutig. Um dies zu klären, sind weitere Versuche notwendig. So könnte man etwa das Zytokinmilieu im Defektbereich im Zeitverlauf messen und das Epiflex mit anderen künstlichen Membranen vergleichen.

4.3 Die Epiflex-Membran bildet kein Hindernis für die Vaskularisierung und wird im gleichen Umfang im Vergleich zur induzierten Membran mit Gefäßen durchzogen

Eine wichtige Grundlage für die Frakturheilung ist das Vorhandensein einer adäquaten Blutversorgung, durch die Nährstoffe und Zellen zur Fraktur gebracht und Abfallstoffe abtransportiert werden. Viele Arbeiten haben gezeigt, dass es bei fehlender oder gestörter Blutversorgung zu einer erhöhten Rate von Komplikationen und sogenannter *non-unions* kommt. So haben Dick et al. den Einfluss von arteriellen Verschlüssen auf Tibiafrakturen beim Menschen untersucht und konnten eine signifikant höhere Rate von *non-unions* und Osteomyelitiden bei auffälligem Angiogramm nachweisen⁵⁹. Auch Ren et al. konnten an einem Knochendefektmodell der Maus zeigen, dass die Blutversorgung ein wichtiger Prädiktor für erfolgreiche Knochenheilung darstellt, indem sie mittels noninvasiver Bildgebung den Blutfluss im Defekt im Verlauf der Knochenheilung dargestellt haben⁶⁰. Bei allen Mäusen, welche keine erfolgreiche Heilung erzielten, konnten signifikante Einschränkungen der Durchblutung gezeigt werden.

Ueng et al. konnten im Kaninchenmodell nachweisen, dass Zigarettenrauch zu einer schlechteren Mineralisierung und Festigkeit im neugeformten Knochen führt als in der Vergleichsgruppe⁶¹. Die Ursachen dafür wurden in der Arbeit nicht genauer beleuchtet. Man kann allerdings vermuten, dass einerseits durch die gefäßschädigende Wirkung des Zigarettenrauchs die Mikrozirkulation gestört wird. Andererseits fanden Lu et al. in einem Zigarettenrauchmodell der Maus eine Aktivierung von NFκB in Osteoklasten und damit einen gestörten Knochenstoffwechsel⁶². Street et al. haben bei Mäusen, die mit einem löslichen VEGF-Rezeptor behandelt wurden, welcher freies VEGF bindet und so dessen Wirkung unterdrückt, eine deutlich eingeschränkte Frakturheilung gesehen⁶³. Andererseits konnte gezeigt werden, dass durch das gezielte Fördern der Angiogenese der Heilungsprozess positiv beeinflusst werden kann. Zum Beispiel hat Li et al gezeigt, dass eine gezielte Überexprimierung von VEGF in Kaninchen

zu einer verbesserten Frakturheilung und auch einer histologisch nachweisbaren höheren Anzahl von Blutgefäßen führt⁶⁴.

Da auch die Masquelet-Membran stark vaskularisiert ist, wird ersichtlich, dass die Epiflex-Membran nur dann einen adäquaten Ersatz darstellen kann, wenn diese im selben Maß die Bildung von Blutgefäßen unterstützen kann und auch zeitnah selbst vaskularisiert wird.

In dieser Arbeit wurde einerseits die Lokalisation der Gefäße untersucht und andererseits zwischen reifen und unreifen Gefäßen differenziert. Der zeitliche Verlauf kann bei dieser Studie jedoch nicht abgebildet werden und bleibt spekulativ. Die Epiflex-Membran wird ebenfalls gut von Gefäßen penetriert und in den histologischen Schnittpräparaten konnte häufig verzeichnet werden, dass von dem umliegenden Muskelgewebe ausgehend Gefäße in die Epiflex-Membran und den Defekt einsprossen. Da die Epiflex-Membran in ihrem Aufbau menschlichem Bindegewebe entspricht, scheint es naheliegend, dass sie ebenso leicht von Gefäßen durchdrungen werden kann. Des Weiteren fördert die in den elektronenmikroskopischen Aufnahmen gut sichtbare raue, poröse Oberfläche die Integration der Membran in die Umgebung und bietet eine geeignete Matrix zum Einsprossen neuer Blutgefäße, sodass sie sich auch hier als praktikablen Ersatz für die Masquelet-Membran beweist.

4.4 Einfluss der BMCs auf den Heilungsprozess

Als zusätzlichen Parameter in unserer Arbeit untersuchten wir auch den Einfluss von BMCs auf den Heilungsvorgang. Die erste Verwendung in der Knochenheilung fanden sie 2005 in den Versuchen von Hisatomi et al. In seinen Experimenten wurden BMC in Knochendefekte im Femur am Kaninchenmodell eingebracht und führten dort zu einer verbesserten Heilung und Vaskularisierung⁶⁵. Seitdem haben sie sich in vielen weiteren Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe und anderer Forscher als geeignete Zellen zur Unterstützung der Osteosynthese gezeigt^{50,66}.

Sie sind leicht zu gewinnen und können zügig retransplantiert werden. Dabei wurden auch verschiedene Möglichkeiten diese einzusetzen betrachtet. Bei einigen Gruppen wurde die Epiflex-Membran, in anderen Gruppen das Knochenersatzmaterial β -TCP, oder Epiflex-Membran und β -TCP gemeinsam mit Zellen besiedelt. Dabei stellte sich die Frage, ob die Zellen auf bzw. in dem Material adhärten und so in den Defekt eingebracht werden konnten und, falls ja, welchen Effekt sie dort auf Knochenaufbau und Vaskularisierung ausüben. Mithilfe einer DAPI Färbung konnte, wie bereits in Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe gezeigt wurde²², eindeutig bestätigt werden, dass sich BMC auf dem β -TCP ansiedeln und dort vor allem in den Poren als *Cluster* vorliegen. Des Weiteren konnte elektronenmikroskopisch dargestellt werden, dass BMC, nach Anwendung des dynamischen Besiedlungsprotokolls, sowohl innerhalb, als auch auf den äußeren Oberflächen der Epiflex-Membran in hoher Dichte nachweisbar sind.

Es konnte gezeigt werden, dass nach Transplantation von BMC in den Defektbereich die Anzahl von CD68 positiven Zellen signifikant reduziert war. Auch die Konzentration an CAE positiven Zellen war tendenziell niedriger als in den Gruppen ohne BMC, der letzte Befund jedoch ohne statistische Signifikanz. Dies deckt sich auch mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die zeigen konnten, dass es unter der Einwirkung von BMCs zu einer Abschwächung der Entzündungsreaktion kommt⁶⁷⁻⁶⁹. Dort fanden sich niedrigere Spiegel an proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-6. Als Mechanismus wird eine Hochregulierung des PI₃K/AKT-Signalwegs in geschädigtem Gewebe diskutiert, wodurch es zu einer Erniedrigung von NF- κ B und damit zu einer Abschwächung der Immunreaktion kommt^{70,71}.

In Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe aber auch Analysen anderer Arbeitsgruppen, zeigten sich positive Effekte auf die Vaskularisierung durch die Applikation von BMC. So führten intrakoronare Applikationen von BMC nach akuten Myokardinfarkten zu einer niedrigeren Mortalität, schnellerer Erholung und verbesserter linksventrikulärer Funktion⁷². Außerdem konnte gezeigt werden, dass es nach einer intravenösen Gabe von BMCs bei pAVK-Patienten mit kritischer Ischämie, welche nicht mehr für eine revaskularisierende OP in

Frage kamen, zu einer Verbesserung im Sinne einer verlängerten Gehstrecke und einer niedrigeren Rate an Amputationen kam^{51,52}. Kikuchi-Taura et al untersuchten die zugrunde liegenden Mechanismen und fanden eine direkte Interaktion zwischen BMCs und Endothelzellen über Gap-Junctions. Über diese Gap-Junctions kam es zu einem Austausch von Molekülen, inklusive Glucose, zu einer gesteigerten Aufnahme von VEGF und einer erhöhten Produktion von HIF-1⁷³.

In unseren Versuchen konnte allerdings kein positiver Einfluss der BMC auf die Vaskularisierung gezeigt werden. Es zeigten sich weder bei den jungen Gefäßen in der vWF-Färbung noch bei den ausgereiften Blutgefäßen in der α -SMA-Färbung ein signifikanter Unterschied nach 8 Wochen durch die Zugabe von BMC. Ein Grund hierfür könnte eine zu niedrige Zellzahl oder ein im Verhältnis zur eingesetzten Zellzahl zu großer Defekt sein. Auch der zeitliche Aspekt ist nicht zu vernachlässigen. Einige Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten eine verbesserte Vaskularisierung in den frühen Phasen der Heilung zeigen. Janko et al. zeigten eine verbesserte Vaskularisierung und Aktivität regenerativer Gene 1 Woche nach Defekt¹⁶ und auch Nau et al. konnten nach 4 Wochen eine signifikant bessere Vaskularisierung unter dem Einfluss von BMC zeigen⁷⁴. Ein Grund hierfür könnte sein, dass sich, ähnlich wie bei der induzierten Membran⁷⁵, die Vaskularisierung der Epiflex-Membran im Laufe des Heilungsprozesses ändert und gegebenenfalls abnimmt.

In einer weiteren Studie hat unsere Arbeitsgruppe die Effekte von unterschiedlichen Dosen an BMCs auf die Knochenheilung untersucht⁷⁶. Dabei zeigte sich eine Verbesserung der allgemeinen Knochenheilung mit steigender BMC-Konzentration mit einer vermuteten optimalen Dosis zwischen 2×10^6 und 1×10^7 Zellen pro ml. Dabei fand sich allerdings nur eine tendenzielle Verbesserung der Angiogenese mit steigender BMC-Konzentration. Dies deckt sich mit den Befunden von Hernigou et al., welche ebenfalls eine verbesserte Wirkung mit steigender Konzentration an Zellen fanden⁷⁷. In ihrer Arbeit haben sie Patienten mit Tibiadefekten Knochenmarksaspirat entnommen, die Stammzellen separiert und konzentriert und schlussendlich in den Tibiadefekt eingebracht. Dabei erreichten 53 von 60 Patienten einen Defektverschluss. Bei

den 7 Patienten, die dies nicht erreichten, enthielten die verabreichten Zellpräparate signifikant weniger Stammzellen. Außerdem zeigte sich eine negative Korrelation zwischen der Konzentration der Zellen und der Zeit, in welcher die Ausheilung erreicht wurde.

Abschließend zeigte sich auch in der MOVAT-Färbung eine signifikante Transformation der Epiflex-Membran zu histologisch knöchernem Gewebe. Begleitende radiologische Analysen zeigten hierbei auch eine deutliche Mineralisierung der Epiflex-Membran an⁷⁸. Dies lässt sich auf die durch die BMC sezernierten Zytokine und Wachstumsfaktoren zurückführen, für welche die Epiflex-Membran ein geeignetes Milieu schafft und eventuell als eine Art Barriere fungiert, welche diese im Defekt konzentriert. Dies hat sich ebenfalls in weiteren Arbeiten unserer Gruppe bestätigt^{29,79}.

4.5 Das einzeitige Verfahren ist dem zweizeitigen Verfahren nach Masquelet nicht unterlegen

Wie bereits dargestellt, ist das Masquelet-Verfahren eine etablierte Therapie für CSD an den verschiedensten Knochen und Patienten⁸⁰ und bietet insbesondere bei infizierten Frakturen eine aussichtsreiche Behandlungsoption⁸¹. Seit der Erstbeschreibung im Jahr 1986⁸² gab es bereits mehrere Versuche diese Methode weiterzuentwickeln. Zum Beispiel könnte die Möglichkeit Antibiotika⁸³ oder Wachstumsfaktoren in die Membran oder das verwendete Knochenersatzmaterial einzuarbeiten die Methode weiter verbessern.

So hat unsere Arbeitsgruppe bereits gezeigt, dass Antibiotika im Knochenzement die Bildung der induzierten Membran verändern können. Hierbei konnten große Unterschiede zwischen verschiedenen Antibiotika gemessen werden⁸⁴. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, die Defektfüllung zu variieren, um die autologe Knochenentnahme zu ersetzen. So gibt es Versuche mit verschiedensten organischen⁸⁵ und anorganischen Materialien⁸⁶. Ferner wurde die Effektivität verschiedener Korngrößen des granulären Knochenersatzmaterials⁸⁷ und 3D-gedruckter Implantate untersucht^{88,89}.

Biochemisch konnten Tang et al. die im Laufe der Reifung eintretenden Devaskularisierung der induzierten Membran verringern, indem sie in Ratten den *Delta-like ligand 4/ Notch homolog 1* (Dll4/Notch1) Pathway hemmten⁷⁵. Damit erzielten sie eine bessere Vaskularisierung als in der Vergleichsgruppe. Yilmaz et al. testeten den Einfluss von *concentrated growth factor* (CGF) auf die induzierte Membran im Kaninchenmodell und konnten eine signifikant höhere Proliferation und Membrandicke zeigen⁹⁰. In einem zweiten Versuch zeigte sich nach der Behandlung mit CGF auch radiologisch im μ CT eine verbesserte Knochenheilung⁹¹.

Ein weiterer Ansatzpunkt ist die Induktion der Membran. Einige Versuchsgruppen experimentierten mit verschiedenen Alternativen zum klassischen PMMA Spacer^{92,93}. Mathieu et al. nutzen Spritzen aus Polypropylen als *Spacer* und erreichten mit diesem besser verfügbaren und kostengünstigeren Material eine vergleichbare Qualität der Masquelet-Membran in der Ratte⁹⁴. Im Rahmen dieses Versuches zeigten sie auch, dass eine Entfernung der Membran zum Zeitpunkt der definitiven Versorgung fast sicher zum Scheitern des Heilungsprozesses führt. Dies konnte unsere Arbeitsgruppe ebenfalls belegen. Bei einer Vorarbeit unter Verwendung des gleichen Tiermodells wurde bei der Hälfte der Tiere während des Zweiteingriffs auch die induzierte Membran entfernt. Hier zeigte sich eine signifikant schlechtere Knochenheilung als in den Vergleichsgruppen mit induzierter Membran⁹⁵. Diese Experimente zeigen eindeutig die Relevanz der induzierten Membran für die Knochendefektheilung, und dass die Entfernung der induzierten Membran keine Option darstellen sollte.

Das Konzept des zweizeitigen Vorgehens wurde jedoch nicht in Frage gestellt. Durch unseren Ansatz, die erste Operation zur Induktion der Membran durch den Einsatz einer künstlichen Membran zu überspringen, kann die Behandlungszeit, das Trauma für die Patienten und die Kosten reduziert werden. Eine weitere Idee dieses Verfahren zu ergänzen, wäre die Nutzung von resorbierbaren Osteosynthesematerialien. So konnten da Silva et al⁹⁶ in einer Meta-Analyse zeigen, dass der Einsatz von resorbierbaren Magnesiummaterialien dem Goldstandard Titan nicht unterlegen ist. So könnte man sich auch die postoperative Metallentfernung sparen, um zu einem „echten“ einzeitigen

Verfahren zu gelangen. In unserer Arbeit zeigte sich bezüglich der Parameter Vaskularisierung, Immunreaktion und Verknöcherung eine ebenbürtige oder bessere Wirksamkeit der Epiflex-Membran im Vergleich zur induzierten Membran. Eine Limitierung stellt sicherlich das Fehlen einer „Vorbehandlung“ des Defektes da. So könnten infizierte Frakturen problematisch sein. Bei der klassischen Masquelet-Technik kann durch die Nutzung eines mit Antibiotika angereicherten PMMA-Spacer eine Eradikation des Infekts vor der definitiven Versorgung erzielt werden⁹⁷. Bei einem einzeitigen Verfahren ist dies nicht im gleichen Ausmaß möglich. Für alle anderen Frakturen ist das einzeitige Verfahren jedoch eine vielversprechende Alternative, welche einen messbaren Benefit für den Patienten bringen könnte.

5. Zusammenfassung

Knochendefekte sind ein häufig anzutreffendes Krankheitsbild mit multiplen Ursachen wie zum Beispiel Trauma, Infektion und Tumore. Besondere Aufmerksamkeit bedürfen dabei Knochendefekte kritischer Größe (CSD). Diese sind definiert als ein Knochendefekt, der trotz adäquater Stabilisierung in der Lebenszeit des Patienten nicht abheilen wird. Gerade diese sind in der Versorgung sehr zeit- und geldintensiv und stellen eine große Belastung für den Patienten dar. Trotz deren Häufigkeit finden sich nur Behandlungsverfahren, die mit signifikanten Nachteilen einhergehen. Daher ist gerade in der Behandlung von CSD weitere Forschung und die Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten nötig. Ein gut belegtes und klinisch erfolgreich angewandtes Verfahren stellt die Masquelet-Technik dar, welche ein zweizeitiges Verfahren ist, bei dem zunächst in einer ersten OP der Defekt ausgiebig durch Debridieren und die Zugabe von Antibiotika vorbereitet wird und anschließend mit einem *Spacer* aus Knochenzement und einem geeigneten Osteosyntheseverfahren stabilisiert wird. Über mehrere Wochen bildet sich nun eine Biomembran, die Masquelet-Membran, um den Spacer, welche in einer zweiten OP eröffnet wird. Daraufhin wird der Spacer entfernt und zum Beispiel mit autologem Knochen aus dem Beckenkamm gefüllt. Dann wird die Membran wieder verschlossen und der Defekt kann abheilen. Mit diesem Verfahren können auch große Defekte versorgt werden und in der Literatur finden sich Erfolge bei bis zu 25cm langen Defekten. Limitierungen finden sich hier in der Verfügbarkeit von autologem Knochenmaterial. Hier kann mit synthetischen Knochenersatzstoffen, wie zum Beispiel β -TCP, oder xenogenen Materialien zum Beispiel vom Rind gearbeitet werden. Einen weiteren großen Nachteil sahen wir jedoch in der Notwendigkeit einer zweiten OP. Dies setzt den Patienten erneut dem Operations- und Narkoserisiko aus, ist mit erneuten Schmerzen verbunden und führt zu verlängerten Krankenhausaufenthalten mit gesteigerten Kosten. Um dies zu umgehen, wurde in dieser Arbeit die Masquelet-Membran durch eine Membran aus dezellularisierter humaner Dermis (Epiflex) ersetzt, welche bereits erfolgreich bei der Behandlung größerer Bauchwanddefekte eingesetzt wird. So könnte man in einer einzigen OP den Defekt mit der Dermis umhüllen und direkt mit dem gewünschten Knochenersatzmaterial füllen. Hypothese war, dass eine

Defekthülle mit Epiflex die Defektheilung vergleichbar zur induzierten Membran unterstützt. Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war, ob durch den Einsatz von mononukleären Zellen des Knochenmarks (BMC) die Knochenheilung zusätzlich verbessert werden kann. Zu diesem Zweck wurden sechs Gruppen aus männlichen Sprague-Dawley-Ratten gebildet, welche einen 1 cm starken Defekt im Femur gesetzt bekamen. Die Gruppen 1 und 2 wurden mit dem Masquelet-Verfahren, Gruppe 1 ohne und Gruppe 2 mit Zugabe von BMC, behandelt. Die Gruppen 3 bis 6 wurden mit dem einzeitigen Verfahren unter Verwendung der Dermis als Defekthülle und verschiedenen Kombinationen von BMC in einer einzigen OP behandelt. Nach 8 Wochen wurden die operierten Femora, inklusive jeweils eines nicht operierten Referenzfemur pro Gruppe explantiert und histologisch aufgearbeitet. Mittels der MOVAT Färbung wurde die Knochenneubildung im Defekt und die histologische Transformation der Membran in knöchernes Gewebe beurteilt. Es konnte ein signifikanter knöcherner Umbau der Epiflex-Membran beobachtet werden. Da mit der Epiflex-Membran ein Fremdkörper in den Organismus eingebracht wurde, wurde auch das Inflammationsgeschehen anhand histologischer Färbungen für Monozyten/Makrophagen (CD68) sowie für Granulozyten (CAE) beurteilt. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Verfahren. Allerdings konnte eine unterschiedliche Verteilung der Immunzellen nachgewiesen werden. Abschließend wurde anhand von immunhistologischen α -SMA und vWF-Färbungen die Vaskularisierung im Defekt beurteilt. Die Epiflex-Membran wurde in gleichem Maße wie die induzierte Membran von Gefäßen durchdrungen. Dabei wuchsen häufig Gefäße aus dem umliegenden Muskelgewebe in den Defekt ein. Die zusätzliche Transplantation von BMC, welche eine zusätzliche Variable in dieser Arbeit darstellten, beeinflusste die Knochenheilung positiv. In Gruppen mit zusätzlichen BMC wurde geringere Inflammation und eine verbesserte Verknöcherung im Defektbereich beobachtet. Die Gefäßdichte wurde durch zusätzliche BMC jedoch nicht erhöht. Abschließend lässt sich aus den Ergebnissen schließen, dass der Ersatz der Masquelet-Membran durch die einzeitige Versorgung mit einer humanen dezellularisierten Dermis zu mindestens gleichwertigen Ergebnissen im Vergleich zur zweizeitigen induzierten Membrantechnik nach Masquelet führt.

6. Summary

Bone defects are a frequently encountered clinical picture with multiple causes such as trauma, infection and tumors. Bone defects of critical size (CSD) require special attention. These are defined as a bone defect that will not heal during the patient's lifetime despite adequate stabilization. These in particular are very time and money consuming to treat and place a great burden on the patient. Despite their frequency, only treatment procedures that are associated with significant disadvantages can be found. Therefore, especially in the treatment of CSD, further research and the development of new treatment options is needed. A well-documented and clinically successful procedure is the Masquelet technique, which is a two-stage procedure in which the defect is first extensively prepared by debridement and the addition of antibiotics in a first operation and then stabilized with a spacer made of bone cement and a suitable osteosynthesis procedure. Over several weeks, a biomembrane, the Masquelet membrane, now forms around the spacer, which is opened in a second operation. The spacer is then removed and filled with autologous bone from the iliac crest, for example. Then the membrane is closed again and the defect can heal. This procedure can also be used to treat large defects, and literature reports success with defects up to 25 cm long. Limitations are found in the availability of autologous bone material. Synthetic bone substitutes, such as β -TCP, or xenogenic materials, for example from bovine, can be used here. However, we saw another major disadvantage in the need for a second surgery. This again exposes the patient to surgical and anesthetic risk, is associated with renewed pain, and leads to prolonged hospital stays with increased costs. To circumvent this, in this work the Masquelet membrane was replaced by a membrane made of decellularized human dermis (Epiflex), which is already successfully used in the treatment of larger abdominal wall defects. Thus, in a single surgery, the defect could be enveloped with the dermis and filled directly with the desired bone graft substitute. It was hypothesized that defect wrapping with Epiflex would support defect healing comparable to induced membrane. Another question addressed in this work was whether the use of bone marrow mononuclear cells (BMC) could additionally enhance bone healing. For this purpose, six groups were formed from male Sprague-Dawley rats that had a 1 cm defect placed in the femur. Groups 1

and 2 were treated with the Masquelet procedure, group 1 without and group 2 with the addition of BMC. Groups 3 to 6 were treated with the single-stage procedure using the dermis as the defect envelope and various combinations of BMC in a single surgery. After 8 weeks, the operated femora, including one nonoperated reference femur per group, were explanted and histologically processed. MOVAT staining was used to assess new bone formation in the defect and histologic transformation of the membrane into bony tissue. Significant bony remodeling of the Epiflex membrane was observed. Since a foreign body was introduced into the organism with the Epiflex membrane, inflammation was also assessed by histological staining for monocytes/macrophages (CD68) and granulocytes (CAE). This showed no significant differences between the methods. However, a different distribution of immune cells could be detected. Finally, immunohistochemical α -SMA and vWF staining were used to assess vascularization in the defect. The Epiflex membrane was penetrated by vessels to the same extent as the induced membrane. Vessels from the surrounding muscle tissue frequently grew into the defect. Additional transplantation of BMC, which was an additional variable in this work, positively influenced bone healing. In groups with additional BMC, less inflammation and improved ossification in the defect area were observed. However, vascular density was not increased by additional BMC. In conclusion, the results suggest that replacement of Masquelet membrane with single-stage delivery of human decellularized dermis leads to at least equivalent results compared with the two-stage induced membrane technique according to Masquelet.

7. Quellen

1. Nauth A, McKee MD, Einhorn TA, Watson JT, Li R, Schemitsch EH. Managing bone defects. *J Orthop Trauma*. 2011;25(8):462-466. doi:10.1097/BOT.0b013e318224caf0.
2. Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, et al. Delayed union and nonunions: Epidemiology, clinical issues, and financial aspects. *Injury*. 2014;45:S3-S7. doi:10.1016/j.injury.2014.04.002.
3. Sanders DW, Bhandari M, Guyatt G, et al. Critical-sized defect in the tibia: Is it critical? Results from the SPRINT trial. *J Orthop Trauma*. 2014;28(11):632-635. doi:10.1097/BOT.000000000000194.
4. Haines NM, Lack WD, Seymour RB, Bosse MJ. Defining the Lower Limit of a "Critical Bone Defect" in Open Diaphyseal Tibial Fractures. *J Orthop Trauma*. 2016;30(5):e158-63. doi:10.1097/BOT.0000000000000531.
5. Schemitsch EH. Size Matters: Defining Critical in Bone Defect Size! *J Orthop Trauma*. 2017;31 Suppl 5:S20-S22. doi:10.1097/BOT.0000000000000978.
6. 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-sized defect (CSD). *Plast Reconstr Surg*. 2010;125(6):1685-1692. doi:10.1097/PRS.0b013e3181cb63a3.
7. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551-555. doi:10.1016/j.injury.2011.03.031.
8. Xie J, Liu D, Wang H, et al. Effects of topical mechanical stability on the formation of Masquelet membrane in a rabbit radial defect model. *Sci Rep*. 2020;10. doi:10.1038/s41598-020-76112-3.
9. Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: The diamond concept. *Injury*. 2007;38:S3-S6. doi:10.1016/S0020-1383(08)70003-2.

10. Santolini E, West R, Giannoudis PV. Risk factors for long bone fracture non-union: a stratification approach based on the level of the existing scientific evidence. *Injury*. 2015;46 Suppl 8. doi:10.1016/S0020-1383(15)30049-8.
11. Leiblein M, Henrich D, Fervers F, Konradowitz K, Marzi I, Seebach C. Do antiosteoporotic drugs improve bone regeneration in vivo? *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2020;46(2). doi:10.1007/s00068-019-01144-y.
12. Frost HM. Wolff's Law and bone's structural adaptations to mechanical usage: An overview for clinicians. *Angle Orthod*. 1994;64(3):175-188. doi:10.1043/0003-3219(1994)064<0175:WLABSA>2.0.CO;2.
13. Barone A, Ricci M, Mangano F, Covani U. Morbidity associated with iliac crest harvesting in the treatment of maxillary and mandibular atrophies: a 10-year analysis. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2011;69(9). doi:10.1016/j.joms.2011.01.014.
14. Pogrel MA, Podlesh S, Anthony JP, Alexander J. A comparison of vascularized and nonvascularized bone grafts for reconstruction of mandibular continuity defects. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 1997;55(11):1200-1206. doi:10.1016/s0278-2391(97)90165-8.
15. Chang MA, Bishop AT, Moran SL, Shin AY. The Outcomes and Complications of 1,2-Intercompartmental Supraretinacular Artery Pedicled Vascularized Bone Grafting of Scaphoid Nonunions. *The Journal of Hand Surgery*. 2006;31(3):387-396. doi:10.1016/j.jhssa.2005.10.019.
16. 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. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2018;12(3). doi:10.1002/term.2484.

17. Buser Z, Brodke DS, Youssef JA, et al. Synthetic bone graft versus autograft or allograft for spinal fusion: A systematic review. *J Neurosurg Spine*. 2016;25(4):509-516. doi:10.3171/2016.1.SPINE151005.
18. Klein MO, Götz H, Duschner H, Wagner W. Anforderungen an moderne Knochenersatzmaterialien. *MKG-Chirurg*. 2010;3(4):274-281. doi:10.1007/s12285-010-0186-y.
19. Galois L, Mainard D, Delagoutte JP. Beta-tricalcium phosphate ceramic as a bone substitute in orthopaedic surgery. *International orthopaedics*. 2002;26(2). doi:10.1007/s00264-001-0329-x.
20. Galois L, Mainard D, Cohen P, Pfeffer F, Traversari R, Delagoutte JP. Comblement des pertes de substance osseuse par le phosphatetricalcique β en traumatologie*11 Communication présentée à l'Académie nationale de chirurgie au cours de la séance du 12 avril 2000. *Annales de Chirurgie*. 2000;125(10):972-981. doi:10.1016/S0003-3944(00)00406-5.
21. Hernigou P, Dubory A, Pariat J, et al. Beta-tricalcium phosphate for orthopedic reconstructions as an alternative to autogenous bone graft. *Morphologie*. 2017;101(334):173-179. doi:10.1016/j.morpho.2017.03.005.
22. 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. doi:10.1155/2015/762407.
23. 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). doi:10.1089/ten.TEA.2009.0715.
24. Granero-Moltó F, Weis JA, Miga MI, et al. Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2009;27(8). doi:10.1002/stem.103.

25. Maitra A, Arking DE, Shivapurkar N, et al. Genomic alterations in cultured human embryonic stem cells. *Nat Genet.* 2005;37(10):1099-1103. doi:10.1038/ng1631.
26. Laurent LC, Ulitsky I, Slavin I, et al. Dynamic Changes in the Copy Number of Pluripotency and Cell Proliferation Genes in Human ES and iPS Cells during Reprogramming and Time in Culture. *Cell Stem Cell.* 2011;8(1):106-118. doi:10.1016/j.stem.2010.12.003.
27. Wang Y, Han Z-b, Song Y-p, Han ZC. Safety of Mesenchymal Stem Cells for Clinical Application. *Stem Cells International.* 2012;2012. doi:10.1155/2012/652034.
28. Ahmad Oryan, Amir Kamali, Ali Moshiri, Mohamadreza Baghaban Eslaminejad. Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence? *CTO.* 2017;204(2):59-83. doi:10.1159/000469704.
29. Seebach C, Henrich D, Schaible A, et al. Cell-based therapy by implanted human bone marrow-derived mononuclear cells improved bone healing of large bone defects in rats. *Tissue Eng Part A.* 2015;21(9-10):1565-1578. doi:10.1089/ten.TEA.2014.0410.
30. 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. doi:10.1186/s12967-016-1066-7.
31. Henrich D, Seebach C, Verboket R, Schaible A, Marzi 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. *European cells & materials.* 2018;35. doi:10.22203/eCM.v035a12.

32. Masquelet AC, Obert L. La technique de la membrane induite pour les pertes de substance osseuse de la main et du poignet. *Chirurgie de la Main*. 2010;29:S221-S224. doi:10.1016/j.main.2010.10.007.
33. Masquelet AC, Begue T. The Concept of Induced Membrane for Reconstruction of Long Bone Defects. *Orthopedic Clinics of North America*. 2010;41(1):27-37. doi:10.1016/j.ocl.2009.07.011.
34. Zwetyenga N, Fricain J-C, Mones E de, Gindraux F. Technique des membranes induites en chirurgie maxillo-faciale. *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale*. 2012;113(4):231-238. doi:10.1016/j.stomax.2012.05.008.
35. Masquelet AC, Fitoussi F, Begue T, Muller GP. [Reconstruction of the long bones by the induced membrane and spongy autograft]. *Annales de chirurgie plastique et esthetique*. 2000;45(3). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10929461/>.
36. Gouron R, Petit L, Boudot C, et al. Osteoclasts and their precursors are present in the induced-membrane during bone reconstruction using the Masquelet technique. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2017;11(2). doi:10.1002/term.1921.
37. Gruber HE, Ode G, Hoelscher G, Ingram J, Bethea S, Bosse MJ. Osteogenic, stem cell and molecular characterisation of the human induced membrane from extremity bone defects. *Bone Joint Res*. 2016;5(4):106-115. doi:10.1302/2046-3758.54.2000483.
38. Pelissier PH, Masquelet AC, Bareille R, Pelissier SM, 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.
39. Gindraux F, Loisel F, Bourgeois M, et al. Induced membrane maintains its osteogenic properties even when the second stage of Masquelet's technique

is performed later. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2020;46(2).
doi:10.1007/s00068-019-01184-4.

40. Giannoudis PV, 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.

41. DIZG. epiflex® – Die zugelasene, humane, azelluläre Dermis.
https://www.dizg.de/images/pdf/deutsch/downloads/dizg_datasheet_epiflex_a4_web.pdf. Accessed December 27, 2021.

42. Roessner ED, Vitacolonna M, Hohenberger P. Confocal Laser Scanning Microscopy Evaluation of an Acellular Dermis Tissue Transplant (Epiflex®). *PLoS One.* 2012;7(10). doi:10.1371/journal.pone.0045991.

43. Ceyhan Yaman. *Entwicklung von Besiedlungsprotokollen für mononukleäre Knochenmarkszellen auf einer humanen azellulären Matrix.* [Bachelorarbeit am Studiengang Biowissenschaft, Goethe-Universität Frankfurt]; 2016.

44. Torzewski M. Die Movat-Pentachromfärbung: eine farbenprächtige Darstellung verschiedener zellulärer und extrazellulärer Gewebekomponenten. *Mikroskopie.* 2015;2(4):204-208.
https://www.ronaldschulte.nl/files/MOVAT_stain.pdf.

45. Alford AI, Nicolaou D, Hake M, McBride-Gagyi S. Masquelet's induced membrane technique: Review of current concepts and future directions. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society.* 2021;39(4):707-718. doi:10.1002/jor.24978.

46. Priv.-Doz. Dr. med. O. Boehm, Dr. med. M.K.A. Pfeiffer, Prof. Dr. med. G. Baumgarten, Prof. Dr. med. A. Hoefft. Perioperatives Risiko und Letalität nach großen chirurgischen Eingriffen. *Der Anästhesist.* 2015;(11).

47. Ekegren CL, Edwards ER, de SR, Gabbe BJ. Incidence, Costs and Predictors of Non-Union, Delayed Union and Mal-Union Following Long Bone Fracture. *International journal of environmental research and public health*. 2018;15(12). doi:10.3390/ijerph15122845.
48. Verboket RD, Leiblein M, Janko M, et al. From two stages to one: acceleration of the induced membrane (Masquelet) technique using human acellular dermis for the treatment of non-infectious large bone defects. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2020;46(2):317-327. doi:10.1007/s00068-019-01296-x.
49. Vitacolonna M, Belharazem D, Hohenberger P, Roessner ED. In-vivo quantification of the revascularization of a human acellular dermis seeded with EPCs and MSCs in co-culture with fibroblasts and pericytes in the dorsal chamber model in pre-irradiated tissue. *Cell Tissue Bank*. 2017;18(1):27-43. doi:10.1007/s10561-016-9606-1.
50. El-Gindy S, Obeid MF, Elbatouty KM, Elshaboury E, Hassanien E. Cell therapy: A potential solution for the healing of bone cavities. *Heliyon*. 2021;7(1). doi:10.1016/j.heliyon.2020.e05885.
51. Wahid FSA, Ismail NA, Wan JWF, Muhamad NA, Mohamad IMA, Lai NM. Efficacy and Safety of Autologous Cell-based Therapy in Patients with Non-option Critical Limb Ischaemia: A Meta-Analysis. *Current stem cell research & therapy*. 2018;13(4). doi:10.2174/1574888X13666180313141416.
52. Teraa M, Sprengers RW, van dGY, Peters CE, Moll FL, Verhaar MC. Autologous bone marrow-derived cell therapy in patients with critical limb ischemia: a meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Annals of surgery*. 2013;258(6). doi:10.1097/SLA.0b013e3182854cf1.
53. Lu Y, Zhang W, Wang J, et al. Recent advances in cell sheet technology for bone and cartilage regeneration: from preparation to application. *Int J Oral Sci*. 2019;11(2):17. doi:10.1038/s41368-019-0050-5.

54. Ma D, Ren L, Mao T. [Research progress of cell sheet technology and its applications in tissue engineering and regenerative medicine]. *Sheng wu yi xue gong cheng xue za zhi = Journal of biomedical engineering = Shengwu yixue gongchengxue zazhi*. 2014;31(5).
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25764743/>.
55. Ren L, Kang Y, Browne C, Bishop J, Yang Y. Fabrication, vascularization and osteogenic properties of a novel synthetic biomimetic induced membrane for the treatment of large bone defects. *Bone*. 2014;64:173-182. doi:10.1016/j.bone.2014.04.011.
56. Stover DA, Verrelli BC. Comparative vertebrate evolutionary analyses of type I collagen: potential of COL1a1 gene structure and intron variation for common bone-related diseases. *Molecular biology and evolution*. 2011;28(1). doi:10.1093/molbev/msq221.
57. Ghanaati S, Barbeck M, Orth C, et al. Influence of β -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo. *Acta biomaterialia*. 2010;6(12). doi:10.1016/j.actbio.2010.07.006.
58. Barbeck M, Motta A, Migliaresi C, Sader R, Kirkpatrick CJ, Ghanaati S. Heterogeneity of biomaterial-induced multinucleated giant cells: Possible importance for the regeneration process? *J Biomed Mater Res A*. 2016;104(2):413-418. doi:10.1002/jbm.a.35579.
59. Dickson K, Katzman S, Delgado E, Contreras D. Delayed unions and nonunions of open tibial fractures. Correlation with arteriography results. *Clinical orthopaedics and related research*. 1994;(302).
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8168299/>.
60. Ren J, Han S, Proctor AR, et al. Longitudinal 3D Blood Flow Distribution Provided by Diffuse Correlation Tomography during Bone Healing in a Murine Fracture Model. *Photochemistry and photobiology*. 2020;96(2). doi:10.1111/php.13201.

61. Ueng SW, Lee SS, Lin SS, et al. Hyperbaric oxygen therapy mitigates the adverse effect of cigarette smoking on the bone healing of tibial lengthening: an experimental study on rabbits. *The Journal of trauma*. 1999;47(4). doi:10.1097/00005373-199910000-00023.
62. Lu Y, Di YP, Chang M, et al. Cigarette smoke-associated inflammation impairs bone remodeling through NFκB activation. *J Transl Med*. 2021;19(1). doi:10.1186/s12967-021-02836-z.
63. Street J, Bao M, deGuzman L, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(15):9656-9661. doi:10.1073/pnas.152324099.
64. Li R, Stewart DJ, von SHP, Mackinnon ES, Schemitsch EH. Effect of cell-based VEGF gene therapy on healing of a segmental bone defect. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2009;27(1). doi:10.1002/jor.20658.
65. Hisatome T, Yasunaga Y, Yanada S, Tabata Y, Ikada Y, Ochi M. Neovascularization and bone regeneration by implantation of autologous bone marrow mononuclear cells. *Biomaterials*. 2005;26(22). doi:10.1016/j.biomaterials.2004.11.032.
66. Verboket R, Leiblein M, Seebach C, et al. Autologous cell-based therapy for treatment of large bone defects: From bench to bedside. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2018;44(5):649-665. doi:10.1007/s00068-018-0906-y.
67. Umemura Y, Ogura H, Matsuura H, Ebihara T, Shimizu K, Shimazu T. Bone marrow-derived mononuclear cell therapy can attenuate systemic inflammation in rat heatstroke. *Scandinavian journal of trauma, resuscitation and emergency medicine*. 2018;26(1). doi:10.1186/s13049-018-0566-2.
68. Matsubara T, Umemura Y, Ogura H, et al. Bone Marrow-Derived Mononuclear Cell Transplantation Can Reduce Systemic Inflammation and

Endothelial Glycocalyx Damage in Sepsis. *Shock (Augusta, Ga.)*. 2021;56(2). doi:10.1097/SHK.0000000000001710.

69. Malyar NM, Radtke S, Malyar K, et al. Autologous bone marrow mononuclear cell therapy improves symptoms in patients with end-stage peripheral arterial disease and reduces inflammation-associated parameters. *Cytotherapy*. 2014;16(9). doi:10.1016/j.jcyt.2014.05.001.
70. Lovell MJ, Yasin M, Lee KL, et al. Bone marrow mononuclear cells reduce myocardial reperfusion injury by activating the PI3K/Akt survival pathway. *Atherosclerosis*. 2010;213(1). doi:10.1016/j.atherosclerosis.2010.07.045.
71. Chen N-N, Wang J-P, Liu H-F, et al. The bone marrow mononuclear cells reduce the oxidative stress of cerebral infarction through PI3K/AKT/NRF2 signaling pathway. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2017;21(24):5729-5735. doi:10.26355/eurrev_201712_14019.
72. Micheu MM, Dorobantu M. Fifteen years of bone marrow mononuclear cell therapy in acute myocardial infarction. *World J Stem Cells*. 2017;9(4):68-76. doi:10.4252/wjsc.v9.i4.68.
73. Kikuchi-Taura A, Okinaka Y, Takeuchi Y, et al. Bone Marrow Mononuclear Cells Activate Angiogenesis via Gap Junction–Mediated Cell-Cell Interaction. *Stroke*. 2020;51(4):1279-1289. doi:10.1161/STROKEAHA.119.028072.
74. 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.
75. Tang Q, Jin H, Tong M, et al. Inhibition of Dll4/Notch1 pathway promotes angiogenesis of Masquelet's induced membrane in rats. *Exp Mol Med*. 2018;50(4):1-15. doi:10.1038/s12276-018-0062-9.

76. Janko M, Pöllinger S, Schaible A, et al. Determination of the effective dose of bone marrow mononuclear cell therapy for bone healing in vivo. *Eur J Trauma Emerg Surg.* 2020;46(2):265-276. doi:10.1007/s00068-020-01331-2.
77. Hernigou P, Poignard A, Beaujean F, Rouard H. Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. Influence of the number and concentration of progenitor cells. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87(7). doi:10.2106/JBJS.D.02215.
78. Leiblein M, Kolb T, Christian L, et al. Introduction of a New Surgical Method to Improve Bone Healing in a Large Bone Defect by Replacement of the Induced Membrane by a Human Decellularized Dermis Repopulated with Bone Marrow Mononuclear Cells in Rat. *Materials.* 2020;13(11):2629. doi:10.3390/ma13112629.
79. Gianakos A, Ni A, Zambrana L, Kennedy JG, Lane JM. Bone Marrow Aspirate Concentrate in Animal Long Bone Healing: An Analysis of Basic Science Evidence. *J Orthop Trauma.* 2016;30(1):1-9. doi:10.1097/BOT.0000000000000453.
80. Niikura T, Jimbo N, Komatsu M, et al. Histological analysis of induced membranes in patients whose bone defects were treated with the Masquelet technique to identify factors affecting the vascularity of induced membranes. *J Orthop Surg Res.* 2021;16. doi:10.1186/s13018-021-02404-7.
81. Moghaddam A, Zietzschmann S, Bruckner T, Schmidmaier G. Treatment of atrophic tibia non-unions according to 'diamond concept': Results of one- and two-step treatment. *Injury.* 2015;46:S39-S50. doi:10.1016/S0020-1383(15)30017-6.
82. Han W, Shen J, Wu H, Yu S, Fu J, Xie Z. Induced membrane technique: Advances in the management of bone defects. *International Journal of Surgery.* 2017;42:110-116. doi:10.1016/j.ijssu.2017.04.064.

83. Roukoz S, El KG, Saghbini E, Saliba I, Khazzaka A, Rizkallah M. Does the induced membrane have antibacterial properties? An experimental rat model of a chronic infected nonunion. *International orthopaedics*. 2020;44(2). doi:10.1007/s00264-019-04453-4.
84. Nau C, Seebach C, Trumm A, et al. Alteration of Masquelet's induced membrane characteristics by different kinds of antibiotic enriched bone cement in a critical size defect model in the rat's femur. *Injury*. 2016;47(2):325-334. doi:10.1016/j.injury.2015.10.079.
85. Söhling N, Leiblein M, Schaible A, et al. First Human Leucocyte Antigen (HLA) Response and Safety Evaluation of Fibrous Demineralized Bone Matrix in a Critical Size Femoral Defect Model of the Sprague-Dawley Rat. *Materials*. 2020;13(14):3120. doi:10.3390/ma13143120.
86. Seebach C, Schultheiss J, Wilhelm K, Frank J, Henrich D. Comparison of six bone-graft substitutes regarding to cell seeding efficiency, metabolism and growth behaviour of human mesenchymal stem cells (MSC) in vitro. *Injury*. 2010;41(7):731-738. doi:10.1016/j.injury.2010.02.017.
87. Leiblein M, Koch E, Winkenbach A, et al. Size matters: Effect of granule size of the bone graft substitute (Herafill®) on bone healing using Masquelet's induced membrane in a critical size defect model in the rat's femur. *J Biomed Mater Res*. 2020;108(4):1469-1482. doi:10.1002/jbm.b.34495.
88. Klein A, Baranowski A, Ritz U, et al. Effect of bone sialoprotein coating on progression of bone formation in a femoral defect model in rats. *Eur J Trauma Emerg Surg*. 2020;46(2):277-286. doi:10.1007/s00068-019-01159-5.
89. Söhling N, Neijhoft J, Nienhaus V, et al. 3D-Printing of Hierarchically Designed and Osteoconductive Bone Tissue Engineering Scaffolds. *Materials*. 2020;13(8):1836. doi:10.3390/ma13081836.

90. Yılmaz O, Özmeriç A, Alemdaroğlu KB, Celepli P, Hücümenoğlu S, Şahin Ö. Effects of concentrated growth factors (CGF) on the quality of the induced membrane in Masquelet's technique – An experimental study in rabbits. *Injury*. 2018;49(8):1497-1503. doi:10.1016/j.injury.2018.06.011.
91. Arıcan G, Özmeriç A, Fırat A, et al. Micro-ct findings of concentrated growth factors (cgf) on bone healing in masquelet's technique—an experimental study in rabbits. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2020. doi:10.1007/s00402-020-03596-z.
92. McBride-Gagyi S, Toth Z, Kim D, et al. Altering spacer material affects bone regeneration in the Masquelet technique in a rat femoral defect. *J Orthop Res*. 2018;36(8):2228-2238. doi:10.1002/jor.23866.
93. Toth Z, Roi M, Evans E, Watson JT, Nicolaou D, McBride-Gagyi S. Masquelet Technique: Effects of Spacer Material and Micro-topography on Factor Expression and Bone Regeneration. *Ann Biomed Eng*. 2019;47(1):174-189. doi:10.1007/s10439-018-02137-5.
94. Mathieu L, Murison JC, Rousiers A de, et al. The Masquelet Technique: Can Disposable Polypropylene Syringes be an Alternative to Standard PMMA Spacers? A Rat Bone Defect Model. *Clinical orthopaedics and related research*. 2021; Publish Ahead of Print. doi:10.1097/CORR.0000000000001939.
95. Nau C, Simon S, Schaible A, et al. Influence of the induced membrane filled with syngeneic bone and regenerative cells on bone healing in a critical size defect model of the rat's femur. *Injury*. 2018;49(10). doi:10.1016/j.injury.2018.06.041.
96. da SB, Souto-Souza D, de SGM, et al. Comparison between resorbable plates vs. titanium plates for treatment of zygomatic fractures: a systematic review with meta-analysis. *Oral and maxillofacial surgery*. 2021;25(3). doi:10.1007/s10006-020-00937-5.

97. Wang J, Yin Q, Gu S, Wu Y, Rui Y. Induced membrane technique in the treatment of infectious bone defect: A clinical analysis. *Orthop Traumatol Surg Res.* 2019;105(3):535-539. doi:10.1016/j.otsr.2019.01.007.

8. Anhänge

8.1 Abkürzungsverzeichnis

AEC	3-Amino-9-ethylcarbazo
α -SMA	α -smooth muscle actine
BMC	bone-marrow mononuclear cells
BMP	bone morphogenic protein
β -TCP	β -Tri-calcium-Phosphat
CAE	Chlorazetatesterase
CSD	Critical sized bone Defect
CD68	Cluster of Differentiation 68
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIZG	Deutsches Institut für Zell- und Gewebeersatz
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ep	Epiflex
EZM	Extrazellular-Matrix
Grp	Gruppe
IM	Induzierte Membran/Masquelet Membran
IL	Interleukin
HIER	heat induced epitope retrival
HIV	humanes Immundefizienz Virus
HRP	Meerrettischperoxydase
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
μ -CT	mikro-Computertomografie
MSC	Mesenchymal Stem Cell
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NSAR	Nicht-steroidale Antirheumatika
ORIF	open reduction – internal fixation
PBS	phosphate buffered saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PMMA	Polymethylmethacrylat

RT	Raumtemperatur
s.c.	subcutan
TBS	Tris-buffered saline
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VWF	Von-Willebrand-Faktor

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 β -TCP, mit BMC beladen -----	6
Abbildung 2 A-D) Epiflex im Rasterelektronenmikroskop-----	9
Abbildung 3 Beladung der Epiflex-Membran.-----	20
Abbildung 4 Intraoperative Präparation -----	22
Abbildung 5 Erfolgskontrolle mittels DAPI-----	31
Abbildung 6 Aufbau der histologischen Schnitte-----	32
Abbildung 7 Movat-Färbung -----	34
Abbildung 8 Anteile an Knochengewebe in Membran (A) und Defekt (B) -----	35
Abbildung 9 Native Epiflex-Membran, MOVAT-Färbung.-----	36
Abbildung 10 CAE-Färbung (Übersicht) -----	39
Abbildung 11 Anzahl CAE-positiver Zellen in verschiedenen Bereichen des Defekts -	40
Abbildung 12 CD68 Färbung (Übersicht)-----	43
Abbildung 13 CD68 Färbung (Detail)-----	43
Abbildung 14 Anteil an CD68-positiven Zellen im Defekt-----	44
Abbildung 15 Lokalisation CD68-positiver Zellen-----	45
Abbildung 16 vWF-Übersichtsaufnahme -----	46
Abbildung 17 vWF Detailaufnahmen -----	48
Abbildung 18 Anzahl vWF-pos. Gefäße pro Flächeneinheit -----	49
Abbildung 19 α -SMA Übersichtsaufnahmen-----	52
Abbildung 20 α -SMA Detailaufnahme unterer rechter Quadrant Gruppe 2 -----	52
Abbildung 21 Anzahl an α -SMA positiven Gefäßen in Defekt (A) und Membran (B)---	53

8.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Geräte und Materialien-----	11
Tabelle 2 Chemikalien -----	13
Tabelle 3 Antikörper -----	15
Tabelle 4 Medikamente-----	15
Tabelle 5 Chirurgische Instrumente-----	15
Tabelle 6 Gruppeneinteilung -----	17
Tabelle 7 Zeitlicher Ablauf -----	23
Tabelle 8 Markierungsschema der Versuchstiere -----	23

8.4. Danksagung

Danken möchte ich für die Unterstützung bei dieser Dissertation Herrn Prof. Ingo Marzi und ganz besonders meinem Doktorvater Prof. Dirk Henrich, bei dem ich nie das Gefühl hatte eine unqualifizierte Frage zu stellen und der nie gezweifelt hatte, dass ich diese Arbeit zum Abschluss bringe. Danke für die tatkräftige Unterstützung bei allen Belangen. Gerade in der Schreibphase waren seine Tipps und Expertise Gold wert.

Auch den beiden Chirurgen PD Dr. Maren Janko und PD Dr. Maximilian Leiblein spreche ich meinen Dank aus für die schöne Zusammenarbeit gerade bei den Tierversuchen.

Des Weiteren danke ich Alexander Schaible für die gute Anleitung im Labor, seine tatkräftige Unterstützung bei den Versuchen und die netten Stunden, die wir gemeinsam dort verbracht haben.

Auch Lion Christian, mein Mitdoktorand mit dem ich das Projekt betreut habe, soll nicht unerwähnt bleiben. Vielen Dank für die tolle Zeit während den Versuchen, in der wir uns immer aufeinander verlassen konnten und die gegenseitige Unterstützung beim Schreiben unserer Arbeiten, sodass aus dieser Zusammenarbeit eine gute Freundschaft entstanden ist.

Zu guter Letzt danke ich auch meinen Freunden und meiner Familie, die mir beim Schreiben der Arbeit den Rücken freigehalten haben, mir mit Rat und Tat zu Seite standen und dafür gesorgt haben, dass diese Arbeit auch einen Abschluss findet. Ohne all die Unterstützung wäre ich heute nicht dort, wo ich jetzt bin.

8.5. 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

Ersatz der induzierten Masquelet-Membran durch eine Kombination aus dezellularisierter Dermis und reparativen Zellen in Hinblick auf den zellulären Besatz

in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Dirk Henrich mit Unterstützung durch Lion Christian und den Operateuren PD Dr. Maximilian Leiblein und PD Dr. Maren Janko 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.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Vorliegende Ergebnisse der Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Leiblein M, Kolb T, Christian L, et al. Introduction of a New Surgical Method to Improve Bone Healing in a Large Bone Defect by Replacement of the Induced Membrane by a Human Decellularized Dermis Repopulated with Bone Marrow Mononuclear Cells in Rat. *Materials* (Basel). 2020;13(11).

(Ort, Datum)

(Unterschrift)