

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Roberto Köstlin

Angefertigt an der Plastisch- und Handchirurgischen Klinik  
des Universitätsklinikums Erlangen  
(Mentor: PD Dr. med. Justus P. Beier)

Optimierung der axial vaskularisierten primär stabilen  
Knochengewebszüchtung im arteriovenösen Gefäßschleifenmodell  
des Schafes mit dem Ziel der Therapie von Knochendefekten  
kritischer Größe

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Annika Weigand  
aus Hamburg

München, 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Roberto Köstlin

Korreferenten: Univ.-Prof. Dr. Manfred Stangassinger  
Univ.-Prof. Dr. Gabriela Knubben-Schweizer  
Univ.-Prof. Dr. Hartmut Gerhards  
Univ.-Prof. Dr. Rüdiger Wanke

Tag der Promotion: 09. Februar 2013

*Meinen Eltern*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturübersicht.....</b>	<b>3</b>
2.1 Knochengewebe – Funktion, Aufbau, Regeneration .....	3
2.1.1 Funktion und Aufbau von Knochengewebe .....	3
2.1.2 Knochenneubildung und Regenerationspotenzial .....	8
2.1.3 Derzeitige Therapieoptionen von Knochendefekten .....	10
2.2 Tissue Engineering von Knochengewebe.....	13
2.2.1 Knochenersatzmaterialien.....	14
2.2.2 Osteogene Zellen .....	18
2.2.3 Knochenwachstumsfaktoren.....	20
2.2.4 Bisherige Strategien zur Züchtung von vaskularisiertem Knochenersatz .....	22
2.3 Mikrochirurgische Tiermodelle und das Gerinnungssystem .....	27
2.3.1 Mikrochirurgie und Thromboembolieprophylaxe .....	27
2.3.2 Überblick über das Gerinnungssystem .....	29
2.3.3 Unterschiede im Gerinnungssystem von Mensch und Schaf.....	34
2.3.4 Antikoagulationsstrategien im Menschen und im Tiermodell Schaf.....	36
2.3.4.1 Acetylsalicylsäure, Clopidogrel und Ticagrelor.....	36
2.3.4.2 Enoxaparin-Natrium.....	40
2.3.4.3 Dabigatranetexilat .....	41
2.3.5 Zielsetzung.....	43
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>44</b>
3.1 Versuchstiere .....	44
3.1.1 Art, Rasse und Herkunft .....	44
3.1.2 Haltungssystem .....	44
3.2 Versuche zur Gerinnungshemmung.....	45
3.2.1 Diagnostik .....	45
3.2.1.1 Verwendetes Material .....	45
3.2.1.2 Impedanzaggregometrie (Multiplate®).....	46
3.2.1.3 Lichttransmissionsaggregometrie.....	47
3.2.1.4 Referenzwerte für die aggregometrischen Untersuchungen .....	49
3.2.1.5 Clopidogrel- und Clopidogrelcarbonsäurekonzentration im Blutplasma.....	49
3.2.1.6 Blutungszeit.....	50
3.2.1.7 Anti-Faktor Xa Bestimmung.....	50
3.2.1.8 Dabigatrankonzentration im Blutplasma.....	51
3.2.2 Versuchsgruppen – Gerinnungshemmung.....	52
3.2.3 Statistische Auswertung – Gerinnungshemmung .....	55
3.3 Knochen Tissue Engineering .....	56



3.3.1	NanoBone® .....	56
3.3.2	Isolationskammer .....	57
3.3.3	Mesenchymale Stammzellen .....	58
3.3.3.1	Verwendetes Material .....	58
3.3.3.2	Gewinnung der mesenchymalen Stammzellen .....	59
3.3.3.3	Aufarbeitung der mesenchymalen Stammzellen.....	60
3.3.3.4	DiI Markierung.....	62
3.3.4	Wachstumsfaktor rhBMP-2 .....	63
3.3.5	Matrix.....	63
3.3.6	Narkoseregime und perioperatives Management.....	63
3.3.6.1	Verwendetes Material .....	63
3.3.6.2	Anästhesie der Schafe .....	65
3.3.6.3	Versuchsabschnitt 1: subkutane Versuchsgruppen .....	66
3.3.6.4	Versuchsabschnitt 2: AV-loop Versuchsgruppe .....	68
3.3.7	Histologische Auswertung .....	71
3.3.7.1	Verwendetes Material .....	71
3.3.7.2	Aufarbeitung der Proben .....	74
3.3.7.3	Histologische Färbungen.....	75
3.3.7.4	Immunhistologische Färbungen .....	77
3.3.7.5	Auswertung der Färbungen/Histomorphometrie.....	80
3.3.8	Rasterelektronenmikroskopie/energiedispersive Röntgenspektroskopie.....	83
3.3.9	Molekularbiologische Untersuchung mittels quantitativer real-time PCR.....	83
3.3.9.1	Verwendetes Material .....	83
3.3.9.2	Subkutane Versuchsgruppen .....	84
3.3.10	Bildgebende Diagnostik.....	87
3.3.10.1	Farbkodierte Dopplersonographie.....	87
3.3.10.2	Intravitale Magnetresonanztomographie.....	87
3.3.10.3	Mikro-Computertomographie .....	89
3.3.11	Statistische Auswertung – Knochen Tissue Engineering .....	90
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>91</b>
4.1	Etablierung einer optimalen Gerinnungshemmung im Schaf.....	91
4.1.1	Verfahren zur Messung der Thrombozytenfunktion im Schaf .....	91
4.1.2	Verträglichkeit der Medikamente .....	91
4.1.3	Wirkung von Acetylsalicylsäure auf die ovine Thrombozytenaggregation .....	92
4.1.4	Wirkung von Clopidogrel auf die ovine Thrombozytenaggregation.....	93
4.1.5	Blutplasmakonzentration von Clopidogrel und Clopidogrelcarbonsäure.....	96
4.1.6	Wirkung von Ticagrelor auf die ovine Thrombozytenaggregation .....	98
4.1.7	Anti-Faktor Xa Spiegel nach Enoxaparin-Natrium Gabe.....	100
4.1.8	Thrombininhibitor Dabigatranetexilat im Schaf.....	103
4.2	Knochen Tissue Engineering .....	105
4.2.1	Ergebnisse der subkutanen Versuchsgruppen.....	105
4.2.1.1	Operativer und postoperativer Verlauf.....	105

4.2.1.2	Makroskopische Beurteilung der Explantate .....	105
4.2.1.3	Histologische Analyse der Explantate.....	106
4.2.1.4	Knochenneubildungsrate .....	108
4.2.1.5	Quantifizierung der Querschnittsfläche .....	114
4.2.1.6	Quantifizierung der NanoBone® Fläche.....	115
4.2.1.7	Matrixwechsel und Vitalfläche von NanoBone® .....	117
4.2.1.8	Osteoklastische Aktivität im Gruppenvergleich .....	120
4.2.1.9	Mesenchymale Stammzellen – direkt reimplantiert versus kultiviert.....	122
4.2.1.10	Vaskularisierung nach 12 Wochen Implantationsdauer.....	125
4.2.2	Ergebnisse der AV-loop Versuchsgruppe.....	127
4.2.2.1	Operativer und postoperativer Verlauf.....	127
4.2.2.2	Histologische Analyse der Explantate.....	127
4.2.2.3	Zusammensetzung des Gewebes in den AV-loop Konstrukten .....	128
4.2.2.4	Matrixwechsel und Vitalfläche von NanoBone® .....	131
4.2.2.5	Osteoklastische Aktivität.....	134
4.2.2.6	Zellproliferation und Apoptoseverhalten .....	135
4.2.2.7	Vaskularisierung nach 18 Wochen Implantationsdauer.....	136
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>142</b>
5.1	Etablierung einer optimalen Gerinnungshemmung im Schaf.....	142
5.1.1	Methoden zur Messung der Thrombozytenaggregation im Schaf.....	142
5.1.2	Thrombozytenaggregationshemmung mit Acetylsalicylsäure, Clopidogrel und Ticagrelor.....	144
5.1.3	Antikoagulation mit Enoxaparin-Natrium und Dabigatranetexilat.....	151
5.1.4	Verifizierung der Ergebnisse im AV-loop Modell .....	155
5.2	Knochen Tissue Engineering .....	156
5.2.1	Verhalten implantierter NanoBone® Blöcke.....	157
5.2.1.1	NanoBone® – ein biokompatibles Knochenersatzmaterial .....	157
5.2.1.2	Unterschiede in Resorption und Biodegradierbarkeit .....	158
5.2.1.3	Erfolgreicher Matrixwechsel.....	163
5.2.2	NanoBone® Block als Knochenaufbaumaterial.....	164
5.2.2.1	Optimale Zellpopulation: Überlegenheit der kultivierten mesenchymalen Stammzellen .....	165
5.2.2.2	Optimierung der Knochenbildung durch Zugabe von rhBMP-2 .....	171
5.2.2.3	Moderate Knochenneubildungsrate im AV-loop Modell.....	173
5.2.3	Vaskularisierung von NanoBone® Block .....	175
5.2.4	Das AV-loop Modell und alternative Strategien zur Generierung von axial vaskularisiertem Knochengewebe .....	182
5.2.5	Relevanz für die Tiermedizin .....	184
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>186</b>
<b>7</b>	<b>Summary.....</b>	<b>188</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>190</b>

---

<b>9</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>208</b>
A.1	Daten .....	208
A.2	Abbildungsverzeichnis .....	215
A.3	Tabellenverzeichnis .....	219
<b>10</b>	<b>Wissenschaftliche Publikationen</b> .....	<b>222</b>
10.1	Originalarbeiten .....	222
10.2	Konferenzbeiträge .....	222
<b>11</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>224</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AA</b>	arachidonic acid, Arachidonsäure
<b>ABC</b>	avidin biotin complex
<b>ADP</b>	Adenosindiphosphat
<b>ADSC</b>	adipose derived stem cells, Stammzellen aus dem Fettgewebe
<b>ANOVA</b>	analysis of variance, Varianzanalyse
<b>Anti-FXa</b>	Anti-Faktor Xa
<b>AP</b>	Alkalische Phosphatase
<b>aPTT</b>	activated partial thromboplastin time, aktivierte partielle Thromboplastinzeit
<b>ASS</b>	Acetylsalicylsäure
<b>AT III</b>	Antithrombin III
<b>ATF-4</b>	aktivierender Transkriptionsfaktor 4
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>Au</b>	Gold
<b>AV-bundle</b>	arteriovenöses Gefäßbündel
<b>AV-loop</b>	arteriovenöse Gefäßschleife
<b>BCP</b>	biphasic calcium phosphate, biphasisches Calciumphosphat
<b>bFGF</b>	basic fibroblast growth factor, basaler Fibroblastenwachstumsfaktor
<b>bid</b>	bis in die, lat.: zweimal täglich
<b>BMP</b>	bone morphogenetic protein, Knochen-Morphogeneseprotein
<b>BOLD</b>	blood oxygenation level dependent, abhängig vom Blutsauerstoffgehalt
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin
<b>BZ</b>	Blutungszeit
<b>cAMP</b>	cyclic, zyklisches Adenosinmonophosphat
<b>Cbfa</b>	core binding factor $\alpha$
<b>CD</b>	cluster of differentiation
<b>cDNA</b>	complementary deoxyribonucleic acid, komplementäre Desoxyribonukleinsäure
<b>CM-DiI</b>	chlormethyliertes DiI
<b>Col</b>	collagen, Kollagen
<b>COX</b>	Cyclooxygenase
<b>CPPV</b>	continuous positive pressure ventilation

---

<b>CSA</b>	catalyzed signal amplification, katalysierte Signalamplifikation
<b>Ct</b>	cycle of threshold
<b>CYP</b>	Cytochrom P450
<b>DAB</b>	3,3'-Diaminobenzidin
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2'-phenylindol Dihydrochlorid
<b>DiI</b>	1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-perchlorat
<b>Dlx5</b>	distal-less homeobox 5
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>EDTA</b>	ethylenediaminetetraacetic acid, Ethylendiamintetraessigsäure
<b>EDX</b>	energy dispersive x-ray spectroscopy, energiedispersive Röntgenspektroskopie
<b>ESC</b>	embryonic stem cells, embryonale Stammzellen
<b>FA</b>	final aggregation, Endaggregation
<b>FBS</b>	fötales bovines Serum
<b>FGF</b>	fibroblast growth factor, Fibroblastenwachstumsfaktor
<b>Fn</b>	Fibronektin
<b>GDP</b>	Guanosindiphosphat
<b>GP</b>	Glykoprotein
<b>GTP</b>	Guanosintriphosphat
<b>HA</b>	Hydroxylapatit
<b>HE</b>	Hämatoxylin Eosin
<b>HPLC-MS/MS</b>	high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie
<b>HRP</b>	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
<b>IGF</b>	insulin-like growth factor, Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
<b>Il</b>	Interleukin
<b>i. m.</b>	intramuskulär
<b>i. v.</b>	intravenös
<b>Lam</b>	Laminin
<b>LTA</b>	Lichttransmissionsaggregometrie
<b>M-CSF</b>	macrophage colony-stimulating factor, Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
<b>MG</b>	Masson Goldner
<b>μCT</b>	Mikro-Computertomographie

<b>MIP</b>	Maximum Intensity Projection, Maximumintensitätsprojektion
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>MSC</b>	mesenchymal stem cells, mesenchymale Stammzellen
<b>Na</b>	Natrium
<b>NB<sup>®</sup></b>	NanoBone <sup>®</sup>
<b>NMH</b>	niedermolekulares Heparin
<b>ON</b>	Osteonectin
<b>OPG</b>	Osteoprotegerin
<b>Osx</b>	Osterix
<b>PAF</b>	plättchenaktivierender Faktor
<b>PAI-1</b>	Plasminogenaktivatorinhibitor 1
<b>PAR</b>	Protease-aktivierter Rezeptor
<b>PAS</b>	periodic acid Schiff, Perjodsäure Schiff
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline, phosphatgepufferter Salzlösung
<b>PCR</b>	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
<b>Pd</b>	Palladium
<b>PDGF</b>	platelet derived growth factor, Wachstumsfaktor aus Blutplättchen
<b>PECAM-1</b>	platelet endothelial cell adhesion molecule 1, Thrombozyten-Endothelzell Adhäsionsmolekül 1
<b>PEEP</b>	positive endexpiratory pressure
<b>PG</b>	Prostaglandin
<b>PL</b>	Phospholipid
<b>pNA</b>	p-Nitroanilin
<b>p. o.</b>	per os
<b>PPP</b>	platelet poor plasma, plättchenarmes Plasma
<b>PRP</b>	platelet rich plasma, plättchenreiches Plasma
<b>PT</b>	prothrombin time, Prothrombinzeit
<b>PTT</b>	partial thromboplastin time, partielle Thromboplastinzeit
<b>RANKL</b>	receptor activator of nuclear factor kappa B ligand
<b>REM</b>	Rasterelektronenmikroskopie
<b>rhBMP- 2</b>	recombinant human bone morphogenetic protein-2, rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2
<b>RNA</b>	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
<b>ROI</b>	region of interest
<b>RTU</b>	ready-to-use
<b>RUNX2</b>	runt-related transcription factor 2

---

<b>s. c.</b>	subcutan
<b>TAFI</b>	Thrombin aktivierbarer Fibrinolyse Inhibitor
<b>TBE</b>	Tris-Borat-EDTA
<b>TBS-T</b>	tris buffered saline with Tween 20, Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween 20
<b>TCP</b>	Tricalciumphosphat
<b>TF</b>	tissue factor, Gewebsthromboplastin
<b>TFPI</b>	tissue factor pathway inhibitor, Gewebsthromboplastin Inhibitor
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	transforming growth factor $\beta$ , Transformierender Wachstumsfaktor $\beta$
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
<b>TRAP</b>	tartrat-resistant acidic phosphatase, Tartrat-resistente saure Phosphatase
<b>TRAP-6</b>	thrombin receptor-activating peptide 6
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
<b>TT</b>	thrombin time, Thrombinzeit
<b>TUNEL</b>	terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Thromboxan A <sub>2</sub>
<b>UFH</b>	unfraktioniertes Heparin
<b>VEGF</b>	vascular endothelial growth factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
<b>vWF</b>	von-Willebrand-Faktor
<b>W</b>	Woche
<b>ZPI</b>	Z-abhängiger Protease-Inhibitor
<b>ZVK</b>	zentraler Venenkatheter

# 1 Einleitung

Knochendefekte, die mit ausgedehnten Gewebeverlusten einhergehen und mittels alleiniger Stabilisierung nicht therapierbar sind, stellen ein ernstzunehmendes Problem im klinischen Alltag dar. Umfangreiche Knochendefekte können durch Frakturen oder nach radikaler chirurgischer Exzision von Knochentumoren entstehen. Häufig kommt es durch Bestrahlung, Traumata oder Infektionen zu begleitender Schädigung des umliegenden Gewebes und nachfolgender erheblicher Beeinträchtigung der lokalen körpereigenen Heilungsbedingungen. Für den Patienten sind derartige Situationen mit einem großen Leidensdruck verbunden, es müssen Schmerzen, Funktionsverluste, Einschränkungen im Alltag und nötige langwierige Behandlungen in Kauf genommen werden. Derzeitige Therapieoptionen stützen sich oft auf Methoden, die zu einer nicht optimalen Versorgung führen oder mit beträchtlichen Nachteilen und Leiden für die Patienten verbunden sind. Der Transfer von autologen nicht-vaskularisierten oder vaskularisierten Transplantaten gilt gegenwärtig als Goldstandard, führt jedoch an der Spenderstelle gewöhnlich zu signifikanten Hebemorbiditäten wie Schmerzen oder Narbenbildung.

Zur Etablierung einer optimalen Behandlungsstrategie für umfangreiche Knochendefekte wurde in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl von Ansätzen verfolgt, u. a. im Forschungszweig des Knochen Tissue Engineerings, der sich mit der Züchtung von Knochenersatzgewebe beschäftigt. Die Defektüberbrückung mittels eines aus einem Knochenersatzstoff, osteogenen Zellen sowie wachstumsfördernden Substanzen gezüchteten Konstruktes scheiterte bislang jedoch vor allem an einer mangelhaften initialen Vaskularisierung großvolumiger Konstrukte. Die Generierung von axial vaskularisiertem, d. h. über eine einzige Gefäßachse versorgtem Knochenersatz, stellt eine Möglichkeit zur Überwindung des Problems dar. Mittels einer im Körper an unversehrter Stelle angelegten arteriovenösen Gefäßschleife (AV-loop) kann ein Knochenersatzstoff über mehrere Wochen vaskularisiert werden und nachfolgend an der Gefäßachse in den Defekt transferiert und an das lokale Gefäßnetzwerk angeschlossen werden, so dass eine umgehende Versorgung des Konstruktes mit Sauerstoff und Nährstoffen gewährleistet ist. Dadurch werden bestmögliche Voraussetzungen für eine erfolgreiche Einheilung des Knochenersatzes sowie eine rasche Defektheilung geschaffen, ohne dass relevante Hebemorbiditäten für den Patienten entstehen.

Die Etablierung dieses Modells erfolgte in den letzten Jahren in der Ratte und wurde nachfolgend aufgrund des zentralen Therapieziels der Generierung von Knochenersatz in ausgedehnten Dimensionen auf das Großtier Schaf übertragen. Bislang konnte jedoch infolge unzureichender Knochenneubildung und fehlender Primärstabilität kein für eine Transplantation optimaler Knochenersatz gezüchtet werden. Ein weiteres Problem des Versuchsmodells besteht in einer oft hohen Ausfallrate der Tiere bedingt durch



thromboembolische Verschlüsse in der mikrochirurgisch angelegten Gefäßschleife. Eine Optimierung der Durchgängigkeitsrate bedarf einer effizienten und verlässlichen Gerinnungshemmung, für die es im Schaf bislang kein etabliertes Protokoll gibt.

Im Rahmen des ersten Studienabschnittes soll ein für das Schaf geeignetes Behandlungsschema für eine effektive Gerinnungshemmung etabliert werden. Damit wird die Grundlage für optimale Bedingungen für den zweiten Abschnitt, der u. a. die Untersuchungen im AV-loop Modell des Schafes impliziert, geschaffen. Weiterhin können die Informationen einen Beitrag zur Minimierung des Risikos von thromboembolischen Gefäßverschlüssen in anderen Studien im Schafmodell leisten und damit zukünftig unnötige Erhöhungen der Tierzahlen vermeiden.

Der Fokus des zweiten Studienabschnittes liegt in der Evaluierung des primär stabilen nanokristallinen Knochenaufbaumaterials NanoBone<sup>®</sup> Block bezüglich seiner Eignung für die Therapie von ausgedehnten Knochendefekten. Im subkutanen Modell soll die Austestung optimaler Zell- sowie Wachstumsfaktorzusätze hinsichtlich Knochenbildung, Vaskularisierung sowie Um- und Abbau von NanoBone<sup>®</sup> mittels histologischer und molekularbiologischer Methoden erfolgen. Anschließend wird die Vaskularisierung des Knochenaufbaumaterials im AV-loop Modell mittels histologischer und bildgebender Modalitäten untersucht.

Bei erfolgreichem Abschluss könnte dieses Konzept in die klinische Anwendung übertragen werden. Die Züchtung von axial vaskularisiertem, transplantierbarem Knochenersatz an unverletzter Stelle im Patienten selbst, könnte die mit einer Reihe von Limitationen verbundenen herkömmlichen Methoden ersetzen und zu einer verbesserten Lebensqualität beitragen.

---

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Knochengewebe – Funktion, Aufbau, Regeneration

#### 2.1.1 Funktion und Aufbau von Knochengewebe

##### **Funktion von Knochengewebe**

Der Knochen ist Teil des Skelettsystems (Knochen, Knorpel, Bänder, Gelenke) und damit dem passiven Bewegungsapparat zugehörig. Demgegenüber steht das Muskelsystem, welches den aktiven Bewegungsapparat darstellt (KÖNIG & LIEBICH, 2001; NICKEL et al., 2004). Dem Knochengewebe werden drei Hauptaufgaben für den Organismus zugeschrieben. Als größter Mineralspeicher (Calcium, Phosphat, Magnesium, Kalium, Bikarbonat) interagiert der Knochen als Hauptorgan in der Calcium-Homöostase. Seine hohe Stabilität bietet dem Körper zum einen eine Stützfunktion sowie die Grundlage für die Muskelaktivität und die damit verbundene Lokomotion, zum anderen werden den Organen Schutzräume geboten (z. B. Schädel, Brust-, Beckenhöhle) (RODAN, 1992; SALOMON, 2008). Im adulten Organismus kommt dem Knochen als zentraler Ort der Hämatopoese (rotes Knochenmark) die lebensnotwendige Aufgabe der Blutbildung zu (RODAN, 1992).

##### **Aufbau von Knochengewebe**

Strukturell wird der phylogenetisch ältere und sich rasch bildende Faserknochen (Geflechtknochen), bei dem die Kollagenfasern geflechtartig angeordnet sind (SMITH, 1960), vom sich langsamer bildenden Lamellenknochen mit parallel oder konzentrisch geschichteten Kollagenfasern unterschieden (KÖNIG & LIEBICH, 2001; CURREY, 2002). Insbesondere während der Knochenneubildung im Fetus sowie im Neugeborenen kommt es zur Anlage von Faserknochen, weiterhin wird dieses Knochengewebe vor allem während der Frakturheilung und bei Knochenerkrankungen beobachtet (SHAPIRO, 2008). Makroskopisch kann zwischen einem äußeren Knochenmantel (Substantia compacta), der an den Knochenenden von einer dünnen Knochenrinde (Substantia corticalis) überzogen wird und einem inneren aus Knochenbälkchen bestehenden Schwammwerk (Substantia spongiosa) unterschieden werden (NICKEL et al., 2004). Die Substantia spongiosa ist in den Epi- und Metaphysen der Röhrenknochen sowie in kurzen und platten Knochen lokalisiert. Die Anordnung der Knochenbälkchen erfolgt der mechanischen Belastung entsprechend (HEES, 2000). Auf histologischer Ebene ist die Substantia compacta in Havers-Systemen bzw. Osteonen organisiert. Ein Osteon wird durch mehrere 3–7 µm dicke Lamellen gebildet, die konzentrisch um einen Blutgefäße und Nerven führenden Zentralkanal (Havers-Kanal) angeordnet sind (PHILLIPS et al., 2007;

CASTROGIOVANNI et al., 2011). Eine Verbindung der Havers-Kanäle untereinander sowie mit dem Markraum und Periost erfolgt über die quer zur Längsachse des Knochens verlaufenden Volkmannschen Kanäle, durch die kleinste Blutgefäße ziehen (HEES, 2000). Es kann zwischen einem periostalen und einem mit diesem verbundenen medullären Blutgefäßsystem unterschieden werden. Ersteres ist für die Versorgung der Knochenhaut sowie des äußeren Drittels der Substantia compacta zuständig, Letzteres für die inneren zwei Drittel der Substantia compacta und das Knochenmark (RHINELANDER, 1968). Zwischen den Lamellen liegen die Knochenzellen (Osteozyten) in Lakunen, die mit angrenzenden Knochenzellen über Zellfortsätze in Verbindung stehen und ein umfangreiches Netzwerk bilden (CASTROGIOVANNI et al., 2011). Die Struktur der Osteone ist zum einen abhängig von der mechanischen Anforderung, der der Knochen ausgesetzt ist (PETRITYL et al., 1996), zum anderen wurden speziesspezifische Unterschiede festgestellt. So führt im Vergleich zum humanen Knochen die hohe osteoklastische Aktivität im Schafknochen zu einem unregelmäßigen Aufbau der Osteone mit einer hohen Anzahl von sogenannten Schaltlamellen, die Reste abgebauter Osteone darstellen (CASTROGIOVANNI et al., 2011).

### **Knochenmark**

In den Maschenräumen der Spongiosa sowie in den einheitlichen Markhöhlen der langen Röhrenknochen ist das Knochenmark lokalisiert (SINOWATZ, 2000). Das rote Knochenmark wird neben seiner Funktion als primäres lymphatisches Organ als das wichtigste blutbildende Organ im Körper beschrieben (TRAVLOS, 2006). Nach Abschluss des Wachstums wandelt es sich in vorwiegend aus Fettzellen bestehendem Fettmark um, nach schweren Krankheiten oder im hohen Alter kann es zu Gallertmark transformieren. Schwere Blutverluste induzieren die Umorganisation von Fettmark in blutbildendes Knochenmark (SINOWATZ, 2000). Das aktive rote Knochenmark besteht aus hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen für die Granulo-, Erythro-, Thrombo-, und z. T. Lymphopoese sowie dem Stroma, welches von einem komplexen sinusoidalen System durchzogen wird (SINOWATZ, 2000). Das Knochenmarkstroma setzt sich aus einer Vielzahl von Zellen, wie z. B. Adipozyten, Retikulumzellen, Endothelzellen und Fibroblasten, zusammen. Diese Zellpopulation ist für die Produktion der extrazellulären Matrix (z. B. Fibronectin, Kollagen, Laminin, Proteoglykane) zuständig (DORSHKIND, 1990). Die schwammartige Gewebestruktur bietet den hämatopoetischen Zellen ein strukturelles Gerüst (WEISS, 1976), die in der extrazellulären Matrix beherbergten Zytokine und Wachstumsfaktoren tragen zur Errichtung eines optimalen Milieus bei, welches Einfluss auf z. B. Zellwachstum und -differenzierung nehmen kann (MARASTONI et al., 2008).

## Zellen des Knochengewebes

**Osteoprogenitorzellen** stammen von den mesenchymalen Stammzellen (mesenchymal stem cells, MSC) ab und wandeln sich fortwährend in Osteoblasten um. Sie zeichnen sich durch einen spindelförmigen Zellkörper und die Expression osteoblastenspezifischer Knochenmarker wie runt-related transcription factor 2 (RUNX2), Osterix (Osx) und distal-less homeobox 5 (Dlx5) aus (DEL FATTORE et al., 2012).

Aufgabe der **Osteoblasten** ist die Synthese der nicht-mineralisierten Knochenmatrix (Osteoid), vor allem durch die Produktion von Kollagen Typ I sowie von knochenspezifischen Proteinen, wie z. B. Osteocalcin und Bone Sialoprotein, und die anschließende Mineralisierung durch Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen. Ihre Differenzierung wird durch die Transkriptionsfaktoren RUNX2, Osx und ATF-4 (aktivierender Transkriptionsfaktor 4) gefördert (LEFEBVRE & BHATTARAM, 2010). Mittels des phänotypischen Osteoblastenmarkers Alkalische Phosphatase (AP) können die Osteoblasten im Gewebe immunhistologisch detektiert werden (NODA & RODAN, 1986; MORRIS et al., 1992). Durch die Produktion von Makrophagen-Kolonie-stimulierendem Faktor (macrophage colony-stimulating factor, M-CSF) und RANKL (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand) fördern die Osteoblasten die Entstehung von Osteoklastenvorläuferzellen bzw. die Differenzierung der Osteoklasten. Im Gegensatz dazu inhibiert das von Osteoblasten synthetisierte Osteoprotegerin (OPG) die Osteoklasten (KORNAK et al., 2003). Nach der Produktion der mineralisierten Knochenmatrix werden die Osteoblasten entweder als Osteozyten in die Matrix eingebaut, wandeln sich in inaktive Formen der Osteoblasten zu sogenannten Oberflächenzellen um oder es kommt zur Einleitung des apoptotischen Zelltodes (ROCHEFORT et al., 2010).

**Oberflächenzellen (bone lining cells/Knochenbelegzellen)** sind längliche, flache Knochenzellen, die auf der Oberfläche von ruhenden Knochenstrukturen vorkommen (DUDLEY & SPIRO, 1961; MILLER et al., 1980). Es ist anzunehmen, dass Oberflächenzellen eine Barriere zwischen Knochen und der Extrazellulärflüssigkeit darstellen und damit von grundlegender Relevanz für die Regulierung der Mineralisierung und von Knochenstoffwechselfvorgängen sind (LIEBICH, 2010).

Der **Osteozyt** ist mit einem Anteil von 90–95 % aller Knochenzellen der dominierende Zelltyp im Knochengewebe (BONEWALD, 2007). Es handelt sich um spindelförmige bis runde Zellen mit dendritischen Zellausläufern, über die Verbindungen zu weiteren Osteozyten bzw. Oberflächenzellen sowie zu Osteoblasten hergestellt werden (DUDLEY & SPIRO, 1961; PARFITT, 1984; MAROTTI, 2000). Die Osteozyten entstehen durch die Transformation von Osteoblasten und sind, von der mineralisierten Knochenmatrix umgeben, in sogenannten Lakunen lokalisiert (NOBLE, 2008). Neben der Funktion als Mechanosensoren konnten entgegen früheren Annahmen einer inaktiven Zellgruppe

weitere Funktionen festgestellt werden (DEL FATTORE et al., 2012). So wird beispielsweise die Möglichkeit einer regulativen Aufgabe in der Knochenmineralisierung und Mineralhomöostase angeführt (BONEWALD, 2006; TETI & ZALLONE, 2009). Durch die Differenzierung zu Osteozyten wird die Expression spezifischer Knochenmarker vermindert (AP, Bone Sialoprotein, Osteocalcin, Kollagen Typ I, RUNX2), die einiger anderer Markern bleibt auf demselben Niveau (Osteopontin,  $\beta$ 3 Integrin, E11/gp38 Antigen) oder nimmt zu (CD44, Dentin Matrix Protein, extrazelluläres Matrix-Phosphoglykoprotein) (Tabelle 1) (FRANZ-ODENDAAL et al., 2006; ROCHEFORT et al., 2010). RUNX2, auch als *core binding factor  $\alpha$  1* (Cbfa1) bezeichnet (VAUGHAN et al., 2002), ist ein Transkriptionsfaktor, dem eine wichtige Rolle in der Regulation der Differenzierung von multipotenten MSC in die osteoblastische Zelllinie obliegt und der somit fördernd auf die Knochenbildung einwirkt (OTTO et al., 1997). Die Expression von RUNX2 in nicht-osteoblastischen Zellen induzierte *in vitro* ein osteoblastenspezifisches Genexpressionsmuster (DUCY et al., 1997).

Tabelle 1: Übersicht der Expression verschiedener ausgewählter Biomarker in Osteoblasten, unreifen und reifen Osteozyten (modifiziert nach (ROCHEFORT et al., 2010))

Biomarker	Osteoblast	unreifer Osteozyt	reifer Osteozyt
Alkalische Phosphatase	++	-	-
Bone Sialoprotein	++	+/-	+/-
Osteocalcin	++	+/-	+/-
Kollagen Typ I	++	+/-	+/-
RUNX2	++	-	-
Osteopontin	++	++	++

Anmerkungen. RUNX2 = runt-related transcription factor 2; ++ = exprimiert, +/- = variabel, - = nicht exprimiert

Die primär für Resorptionsprozesse verantwortlichen vielkernigen bis zu 100  $\mu$ m großen **Osteoklasten** entstammen den hämatopoetischen Vorläuferzellen des Monozyten-Makrophagen-Systems im Knochenmark (DUDLEY & SPIRO, 1961; ROODMAN, 1996). Die Differenzierung zu Osteoklasten wird primär durch die Bindung von RANKL sowie zusätzlich durch M-CSF stimuliert und durch OPG eingedämmt (FELIX et al., 1990; KONG et al., 1999; SUDA et al., 1999). Durch die in Falten gelegte Zytoplasmamembran (ruffled border/Faltensaum) an der dem Knochen zugewandten Seite kommt es zu einer Vergrößerung der Resorptionszone (RODAN, 1992). Die von Osteoklasten synthetisierten Protonen induzieren ein saures Milieu, welches zur Demineralisierung der Knochenmatrix beiträgt, während durch Proteinase die organischen Knochengewebekomponenten degradiert werden. Dieser zwischen Osteoklast und Knochen liegende Raum ist nach außen hin abgedichtet und trägt zur Aufrechterhaltung des sauren Mikromilieus bei, in dem die Resorption optimal ablaufen kann (SCHINDELER et al., 2008). Der enzymatische Abbau ist histologisch an

Vertiefungen im Knochengewebe, den sogenannten Howship- oder Resorptionslakunen zu erkennen (SUDA et al., 1992). Aufgrund ihrer Mobilität können die Osteoklasten spezifische Bewegungen koordinieren und von einer zur nächsten Knochenfläche wandern (BUCKWALTER et al., 1996). Die Tartrat-resistente saure Phosphatase (tartrat-resistant acidic phosphatase, TRAP) wird, im Gegensatz zur Tartrat-sensitiven sauren Phosphatase, die zusätzlich auch in Osteoblasten und Osteozyten produziert wird, nur von Osteoklasten synthetisiert und dient ihrer immunhistochemischen Detektion (COLE & WALTERS, 1987).

Der Knochenumbauprozess unterliegt der Steuerung einer Vielzahl von Signalmolekülen. Unter anderem zählt dazu der Einfluss verschiedener Hormone (ALLORI et al., 2008b). Zusammengefasst lässt sich die Wirkung von Kalzitinin als eine direkt hemmende, die von Parathormon sowie Thyroxin über Osteoblasten als eine indirekt fördernde Wirkung auf die Osteoklastenaktivität beschreiben. Östrogen kann als Gegenspieler von Parathormon betrachtet werden und induziert ebenfalls indirekt über die Osteoblasten die Hemmung der Osteoklastenaktivität. Somatotropin hingegen führt zu einer Proliferations- und Differenzierungsförderung von Osteoblasten (ALLORI et al., 2008b).

### **Zusammensetzung des Knochengewebes**

Das Knochengewebe besteht in der Trockenmasse zu etwa einem Drittel aus organischer und zu etwa zwei Dritteln aus anorganischer Substanz. Der organische Anteil besteht zu ca. 90 % aus Kollagen Typ I, die übrigen Komponenten umfassen Glykosaminoglykane und Proteoglykane sowie Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat und Keratansulfat (KÖNIG & LIEBICH, 2001). Als Reservoir für lösliche induktive Faktoren enthält die Knochenmatrix Wachstumsfaktoren wie z. B. knochenmorphogenetische Proteine (bone morphogenetic protein, BMP) (SHEKARAN & GARCIA, 2011).

Das zu den nicht-kollagenen Proteinen zählende Glykoprotein Osteonectin wird in der Extrazellulärmatrix einer Vielzahl von Geweben exprimiert, ist im Knochen jedoch in viel höheren Konzentrationen anzutreffen (MALAVAL et al., 1987). Erst nach Ausreifung von Geflecht- in Lamellenknochen wird vermehrt Osteonectin exprimiert (CONN & TERMINE, 1985), wodurch es als Förderer und Marker für die späte Knochenbildung sowie -ausreifung klassifiziert wurde (ALLORI et al., 2008a). Es bindet Kollagen Typ I wie auch Hydroxylapatitkristalle und scheint eine Schlüsselrolle in der anfänglichen Mineralisierung sowie in der Verbindung von Knochenmineral und organischer Matrix zu spielen (TERMINE et al., 1981). Nach Osteonectin ist Osteocalcin das zweithäufigste nicht-kollagene Protein in der Extrazellulärmatrix des Knochengewebes und besitzt eine hohe Affinität zu Hydroxylapatit (HEINEGARD & OLDBERG, 1989; PORTER et al., 2009). Zusammen mit Osteopontin ist es ein wichtiger Biomarker für das Vorkommen von reifen Osteoblasten (PORTER et al., 2009). Osteopontin gehört zur Gruppe der Sialoproteine, die 15 % der nicht-kollagenen Extrazellulärmatrix ausmachen. Zusammenfassend wird beschrieben, dass es vor allem kurz nach einer Knochenfraktur in

Osteoblasten signifikant hochreguliert ist und damit auf eine Beteiligung bei der raschen Rekrutierung von Zellen in Frakturheilungs- oder Umbauprozessen schließen lässt. Neben der Produktion in Osteoblasten wird es auch von Osteozyten sowie deren Vorläufern und in Osteoklasten, Chondrozyten und Fibroblasten produziert (ALLORI et al., 2008a).

Die anorganische Substanz des Knochengewebes liegt in Form von Hydroxylapatitkristallen vor (DEL FATTORE et al., 2012), zusammengesetzt aus Calciumphosphat (85 %), weiterhin aus Calciumcarbonat (10 %), Magnesiumphosphat und Calciumfluorid (NICKEL et al., 2004).

Eine Vielzahl der Wechselwirkungen zwischen der Extrazellulärmatrix und den Zellen des Knochengewebes wird über Integrine vermittelt. Durch Bindung an Proteine der Extrazellulärmatrix (z. B. Kollagen Typ I als Ligand für die Integrine  $\alpha_1\beta_1$ ,  $\alpha_2\beta_1$  und  $\alpha_3\beta_1$ ) wird das Zellverhalten, wie z. B. Proliferation, Zellüberleben, Apoptose, Form, Polarität, Motilität, Genexpression und Differenzierung, moduliert (HYNES, 2002; FENG, 2009).

## 2.1.2 Knochenneubildung und Regenerationspotenzial

### Knochenneubildung

Man unterscheidet die desmale und die enchondrale Ossifikation (SHAPIRO, 2008; LEFEBVRE & BHATTARAM, 2010).

Grundlage der desmalen Ossifikation ist die Differenzierung der MSC zu Osteoblasten. Es kommt zur direkten Abscheidung einer unverkalkten Knochenmatrix (Osteoid) und nachfolgender Verkalkung (Ossein) durch die Einlagerung von u. a. Calcium und Phosphat durch Osteoblasten. Die fortwährende Produktion der Knochenmatrix hat die Einmauerung der Osteoblasten und Umwandlung in Osteozyten zur Folge. Durch die desmale Ossifikation entstehen die platten Schädelknochen und die meisten Gesichtsknochen. Auch während der Heilung einiger Frakturen kann man eine desmale Ossifikation beobachten (BUCKWALTER et al., 1996).

Bei der enchondralen Ossifikation dient eine hyalinknorpelige Vorstufe als Grundlage für die Knochenbildung. Durch kontinuierliche Auflagerung neuer Knochensubstanz entsteht eine perichondrale Knochenröhre, die die knorpelige Diaphyse umfasst (NICKEL et al., 2004). Dieser auch als perichondrale Ossifikation bezeichneter Prozess läuft nach dem Schema der desmalen Ossifikation ab (KÖNIG & LIEBICH, 2001; NICKEL et al., 2004). Die Differenzierung der Zellen des Knorpelmantels (Perichondrium) in Osteoblasten und die damit verbundene nachfolgende Synthese von Knochengewebe wird durch die Produktion von Indian hedgehog von prähypertrophen Chondrozyten induziert (ST-JACQUES et al., 1999). Ausgehend von der Mitte des Knorpels wächst der Knochenmantel (Periost) bis zum proximalen bzw. distalen Ende (MACKIE et al., 2008). Es kommt zu einer Größenzunahme der Knorpelzellen sowie Verkalkung der Knorpelmatrix (BUCKWALTER et al., 1996). Durch das neugebildete Periost sprossen

Kapillaren ein, u. a. induziert durch die VEGF (vascular endothelial growth factor, vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) Produktion von hypertrophen Chondrozyten (ZELZER et al., 2004). Über Kapillaren einwandernde Chondroklasten und Osteoklasten bauen den kalzifizierten Knorpel im Bereich der Diaphyse ab, während Osteoblasten an den Randbereichen mit der Knochenbildung beginnen (BUCKWALTER et al., 1996; KÖNIG & LIEBICH, 2001). Weitere Auf- und Abbauvorgänge führen zur Formierung der primären Markhöhle (KÖNIG & LIEBICH, 2001). In ähnlicher Weise entstehen sekundäre Ossifikationszentren in den Epiphysen, die nach einiger Zeit mit den primären Ossifikationszentren verschmelzen (MACKIE et al., 2008).

Es werden folgende ineinander übergehende Zonen beobachtet: (1) Zone mit ruhenden Chondrozyten (Reservezone), (2) Zone der Proliferation, (3) Zone des Säulenknorpels mit längs angeordneten Zellgruppen, (4) Zone mit hypertrophen, großblasigen und teilweise mineralisierten Chondrozyten (Blasenknorpel), (5) Zone der Verknöcherung mit zugrunde gehenden Chondrozyten, (6) Zone des Knorpelabbaus mit zahlreichen Chondroklasten (Eröffnungszone). Daran anschließend befindet sich ein Bereich der Knochenneubildung mit Osteoblasten, Osteoid und verkalkten Knochenlamellen (MACKIE et al., 2008; LIEBICH, 2010).

### **Regenerationspotenzial**

Die Heilung von Knochenfrakturen unterliegt einem komplexen physiologischen Prozess, bei dem es im Gegensatz zu der Heilung in anderen Geweben nicht zu einer Narbenbildung und einem damit einhergehenden Funktionsverlust kommt. Durch den Umbau des neugebildeten Knochengewebes kann die Funktion des ursprünglichen Gewebes weitestgehend wiederhergestellt werden. Der Heilungsverlauf ähnelt in seinen zellulären und biochemischen Prozessen dem der Knochenneubildung in der Wachstumsfuge während der Skelettentwicklung (EINHORN, 1998).

Knochenfrakturen mit enger Vereinigung der Frakturenden und absoluter Stabilität lösen eine primäre Knochenheilung aus, bei der über interne Umbauprozesse der Osteone eine Funktionswiederherstellung erreicht wird. Frakturen mit einer relativen Stabilität induzieren eine sekundäre bzw. indirekte Knochenheilung, die sich in vier ineinander übergehenden Phasen vollzieht (MCKIBBIN, 1978; MEURER & WOLF, 2007).

Unmittelbar nach Frakturierung entsteht ein **Frakturhämatom**, welches durch Bereitstellen von Wachstumsfaktoren die Proliferation der Osteoblasten fördert (TACHIBANA et al., 1991). Es kommt zur raschen Infiltration von zahlreichen Entzündungszellen sowie zu einer erhöhten Zellteilungsaktivität (MCKIBBIN, 1978). In Abhängigkeit von der Heilungsphase werden regenerationsstimulierende Wachstumsfaktoren sezerniert, initial wird dem platelet derived growth factor (PDGF) eine wichtige Rolle zugeschrieben (BOURQUE et al., 1993). Weitere wichtige Zytokine umfassen Interleukin-1 (Il-1) und -6 sowie den Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Bereits in dieser initialen Phase kommt es zur Expression von RANKL, OPG und M-CSF, die



wichtige Regulatoren der Osteoklastogenese darstellen (AI-AQL et al., 2008). Die Invasion von Entzündungszellen und MSC sowie das Einwachsen von Gefäßen und die Neo-Angiogenese werden gefördert, u. a. durch die Sekretion von Mitgliedern der Angiopoietin- und VEGF-Familie (FAZZALARI, 2011). Anschließend formiert sich ein **knorpeliger/bindegewebiger Kallus**, der für eine geringgradige Stabilisierung der Fraktur sorgt und eine Leitschiene für den sich nachfolgend bildenden knöchernen Kallus bietet. In der Endphase kommt es zu einer Hypertrophierung der Chondrozyten mit anschließender Mineralisierung des Kallus und abschließender Apoptose der Knorpelzellen (SCHINDELER et al., 2008). Unterschiedliche Wachstumsfaktoren dienen der Regulierung dieser Phase (z. B. Transformierender Wachstumsfaktor  $\beta 2$  und  $\beta 3$  [transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ ], PDGF, Fibroblastenwachstumsfaktor [fibroblast growth factor 1, FGF-1], Insulinähnlicher Wachstumsfaktor [insulin-like-growth factor, IGF], Mitglieder der BMP-Familie) (BOURQUE et al., 1993; SCHINDELER et al., 2008). Nach Mineralisierung des knorpeligen Kallus wird dieser unter koordinierender Expression von RANKL, OPG und M-CSF resorbiert und durch knöcherne Strukturen ersetzt (AI-AQL et al., 2008). Diese Phase ist gekennzeichnet durch das gehäufte Vorkommen von Osteoblasten, die durch die Differenzierung von Knochenvorläuferzellen entstanden sind (SCHINDELER et al., 2008). Die **knöcherne Kallusbildung** beginnt am Ort der niedrigsten Belastung peripher an den Frakturenden und verläuft in Richtung Frakturzentrum. Diese desmale Ossifikation wird ergänzt durch die enchondrale Ossifikation des knorpeligen Kallus (RÜEDI et al., 2007).

Die letzte Heilungsphase umfasst den **Umbau** von Faser- in Lamellenknochen. Der Lamellenverlauf wird der Belastung entsprechend angepasst (MEURER & WOLF, 2007). Die Wiederherstellung der ursprünglichen Knochenstruktur kann mehrere Monate bis Jahre in Anspruch nehmen (RÜEDI et al., 2007).

### 2.1.3 Derzeitige Therapieoptionen von Knochendefekten

Trotz der sehr guten Heilungskapazitäten des Knochengewebes gibt es eine Vielzahl von Frakturen, die eine Knochenregeneration über das normale Selbstheilungspotenzial des Gewebes hinausgehend erfordern. Dies impliziert beispielsweise ausgedehnte Knochendefekte durch Traumata, Infektionen, Tumorsektionen sowie Situationen, die mit einer Beeinträchtigung der regenerativen Prozesse verbunden sind wie z. B. bei Osteoporose, avaskulären Nekrosen oder nach Bestrahlung (DIMITRIOU et al., 2011). Die kritische Größe der Knochendefekte, ab der eine Heilung durch eine alleinige Stabilisierung nicht mehr ausreichend ist, wird in Abhängigkeit von der Lokalisation bestimmt (Unterarm > 3 cm, Femur/Tibia > 5 cm, Humerus > 6 cm) (CALORI et al., 2011). Historisch betrachtet war die Amputation eine häufig durchgeführte Operation im Falle von Frakturen mit signifikantem Knochenverlust aufgrund der Schwierigkeiten des

Gewebeerhalts sowie der fehlenden Rekonstruktionsoptionen. In der Vergangenheit wurde ein breites Spektrum an Techniken entwickelt, mit dem Ziel der Verbesserung der Therapiemöglichkeiten großer Knochendefekte (KEATING et al., 2005).

### **Distraktionsosteogenese**

Eine Therapiemöglichkeit große Knochendefekte zu heilen oder ein Knochenlängenwachstum zu induzieren, ist die Distraktionsosteogenese bzw. Kallusdistraktion oder Ilizarov-Methode genannt (ILIZAROV, 1988). Durch Osteotomie an einer anderen unverletzten Stelle und nachfolgender kontinuierlicher Distraktion der Frakturenden von täglich ca. 0,5–1 mm mittels einer Osteosynthese kommt es im Defektbereich zu einer physiologischen Kallusbildung. Der anfangs bindegewebige Kallus wird nach Beendigung der Distraktion zu einem knöchernen Kallus und schließlich zu reifem Knochengewebe umgebaut (MAHESHWARI et al., 2011). So konnte durch diese Therapiemethode die Heilung eines ausgedehnten Knochendefekts im Tibiotarsus eines Papageis erreicht werden (JOHNSTON et al., 2008). Die Vorteile, wie z. B. das Mitwachsen des umliegenden Gewebes, das die neugebildeten Knochenstrukturen umgibt, wie auch die mögliche Generierung von relativ großen Knochenanteilen und der nur kleine operative Eingriff, müssen gegen die Nachteile wie die lange Therapiedauer und die großen Belastungen für den Patienten abgewogen werden (MAHESHWARI et al., 2011).

### **Autograft**

Ein weiterer Ansatz stellt die Transplantation von autologem d. h. körpereigenem Knochengewebe dar, die für eine Reihe von Indikationen als Goldstandard bezeichnet wird (ZIMMERMANN & MOGHADDAM, 2011). Die osteogenen, osteoinduktiven und osteokonduktiven Eigenschaften sowie die gute Osseointegration machen Autografts zu optimalen Knochentransplantaten (MOORE et al., 2001). Osteogenität beschreibt die Eigenschaft, eine direkte Knochenbildung induzieren zu können und ist an das Vorkommen von Zellen im Transplantat gebunden. Osteoinduktive Transplantate stimulieren die Proliferation und osteogene Differenzierung von MSC und fördern damit die Knochenbildung. Osteokonduktiv bedeutet, dass über eine optimale dreidimensionale Architektur, z. B. eine hohe Porosität und ausreichend große interkonnektierende Poren, die Anhaftung, Migration und Besiedelung von Zellen sowie ein optimales Einwachsen von Gefäßen gefördert werden können (HELM et al., 2001). Trotz der positiven Eigenschaften kann es in Abhängigkeit des transplantierten Materials (z. B. Spongiosaplastik, kortikaler oder kortiko-spongiöser Span (HIERNER et al., 2009)), bzw. der Transplantationsstelle, zu einer zu raschen Resorption des Autografts kommen (FELLAH et al., 2008). Die Entnahme von autologem Knochen macht einen zweiten, oft mit Hebermorbiditäten, wie z. B. Infektionen, Wundheilungsstörungen, Blutungen oder Schmerzen, einhergehenden Eingriff notwendig (YOUNGER & CHAPMAN, 1989). Hauptsächliches Hebeareal ist der Beckenkamm, Alternativen bieten der Radius, die

proximale Tibia, der distale Femur oder die Fibula. Eine neuere Technik umfasst die Entnahme von Knochenmaterial aus dem Markraum langer Röhrenknochen mittels des RIA-Systems (Reamer/Irrigator/Aspirator), wodurch die Entnahme eines größeren Volumens an Knochenmaterial möglich wird (GIANNOUDIS et al., 2009).

Der vaskularisierte autologe Knochentransfer stellt eine weitere Option dar, die im Gegensatz zu nicht-vaskularisierten Transplantaten zu einer schnelleren und verlässlicheren Heilung von Defekten in Röhrenknochen führen kann (PEDERSON & PERSON, 2007). Ein Knochen oder Knochenabschnitt mit eigener Blutversorgung wird vom Spender- zum Empfängerort verlagert. Die Transplantate werden entweder frei transplantiert und im Gewebedefekt an lokale Gefäße angeschlossen, so dass eine sofortige Durchblutung möglich ist oder es erfolgt eine gestielte Transplantation, bei der das über einen Stiel (Haut-/Muskel-/Gefäßstiel) versorgte Gewebe in das Empfängerlager geschwenkt wird (HIERNER et al., 2009). Die vorhandene, bzw. eventuell nur kurzzeitig unterbrochene, Blutzirkulation stellt die Versorgung der Zellen in der neuen Umgebung sicher. Dadurch sind optimale Voraussetzungen für das Überleben des Transplantates samt Zellen gegeben und die Heilung im Transplantatlager wird erleichtert (RENTSCH et al., 2012). Bei Vorliegen eines großen Gewebedefektes mit freiliegenden Knochen, Gelenken, Sehnen oder Nerven und mangelhafter Perfusion dient das vaskularisierte Transplantat nicht nur der Defektauffüllung, sondern kann im weiteren Sinne auch als Nährstofflieferant für das geschädigte Gewebe angesehen werden (KNESER et al., 2006a). Die Einheilungsdauer verläuft rasch und Nekrosen können vermieden werden. Ergänzend zu den für Autografts bereits aufgeführten Nachteilen ist der Eingriff mit einer technisch sehr anspruchsvollen und zeitaufwendigen mikrochirurgischen Operation verbunden. Als Transplantate werden z. B. vaskularisierte Anteile der Fibula, des Beckenkamms, des Radius oder der Skapula eingesetzt (HIERNER et al., 2009).

### **Allograft**

Eine Alternative zur autogenen stellt die allogene Transplantation dar, d. h. die Entnahme von Gewebe von einem Individuum und der Transfer in ein anderes Individuum derselben Spezies (BAUER & MUSCHLER, 2000). Dadurch muss am Empfänger kein zweiter mit möglichen Hebmorbiditäten und Schmerzen verbundener Eingriff vorgenommen werden und die Menge an Knochenmaterial ist nicht limitiert (CALORI et al., 2011). Abhängig von der benötigten Form und Größe können sowohl demineralisierte Knochenmatrizes als auch spongiöse Späne sowie kortikospongiöse oder kortikale Transplantate, osteochondrale oder ganze Knochenblöcke eingesetzt werden (FINKEMEIER, 2002). In Abhängigkeit von ihrer Verarbeitung zur Verminderung des Risikos der Krankheitsübertragung sowie zur Form- und Größenanpassung variieren die Eigenschaften der Transplantate. So kann über einen Demineralisierungsvorgang das osteoinduktive Potenzial von Menschenknochen durch die Freilegung von Wachstumsfaktoren erhöht werden. Es handelt sich bei allogenem Knochengewebe nicht um ein standardisiertes

Produkt, so dass diese Transplantate hinsichtlich ihrer biologischen und mechanischen Eigenschaften gewissen Schwankungen unterworfen sein können (DELLOYE et al., 2007). Die kombinierte Anwendung eines Allotransplantates und eines freien vaskularisierten Autografts, wie z. B. der Fibula, nach der sogenannten Capanna-Methode stellt eine weitere Option für die Rekonstruktion langer Röhrenknochen dar. Das Zusammenwirken der durch das Allograft vermittelten Primärstabilität und der die Knochenbildung und Integration fördernden Eigenschaften des Autografts erzielte gute Ergebnisse in einer Langzeitstudie bezüglich der Defektheilung der proximalen Tibia (INNOCENTI et al., 2009).

### **Xenograft**

Bei einer xenogenen Transplantation handelt es sich um die Übertragung von Gewebe eines Individuums auf ein Individuum einer anderen Spezies (BAUER & MUSCHLER, 2000). Es gibt derzeit eine große Auswahl kommerziell erhältlichen xenogenen Knochenersatzes, der sich je nach Verarbeitung (z. B. Sinterung) und Spezies (z. B. Rind, Pferd, Schwein) in seinen Eigenschaften unterscheidet (KOLK et al., 2012). Ein häufig verwendetes Material ist bovine Spongiosa (RENTSCH et al., 2012). Neben seinen biodegradierbaren und biokompatiblen Eigenschaften wurde für PBBM (porous bovine bone mineral) bei einer relativ langsamen Resorptionskinetik ein gutes osteokonduktives Potenzial nachgewiesen (ARTZI et al., 2001). Oftmals werden Bedenken bezüglich der Übertragung von Infektionen oder von potenziellen Krankheitserregern, die als nicht infektiös gelten oder im Spendertier nicht detektierbar sind, geäußert (LAURENCIN & EL-AMIN, 2008). Es wird berichtet, dass Knochenersatzmaterialien bovinen Ursprungs das Risiko der Übertragung von Prionen mit sich bringen können (KIM et al., 2011), andere Studien wiederum wiesen die Sicherheit bestimmter Xenografts nach (WENZ et al., 2001).

## **2.2 Tissue Engineering von Knochengewebe**

Die bislang nicht zufriedenstellenden Strategien zur Heilung von kritischen Knochendefekten machten die Entwicklung neuer Konzepte zur Optimierung der konventionellen Therapiemethoden nötig. Skalak und Fox definierten den Begriff Tissue Engineering bereits 1988 wie folgt: „Tissue Engineering ist die Anwendung von Prinzipien und Methoden des Ingenieurwesens und der Lebenswissenschaften, um die grundlegenden Beziehungen zwischen Struktur und Funktion in normalem sowie pathologischem Säugetiergewebe zu verstehen und biologische Konstrukte zu entwickeln, die der Wiederherstellung, dem Erhalt oder der Verbesserung von Funktionen dienen“ (SKALAK & FOX, 1988).

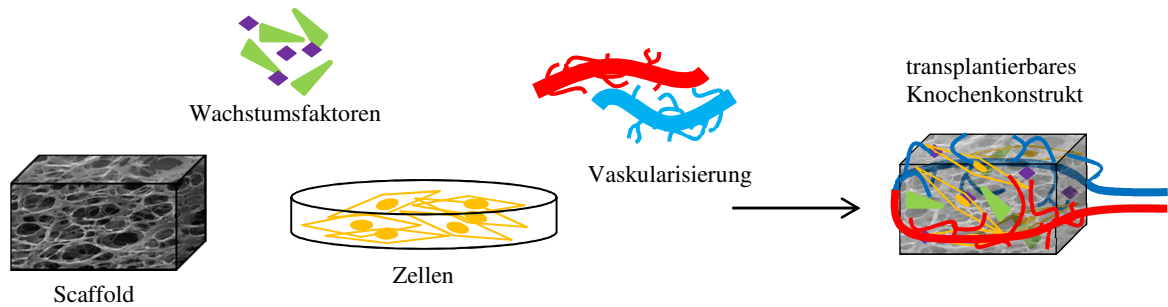


Abbildung 1: **Prinzip des Knochen Tissue Engineerings**

Aus der Kombination einer osteokonduktiven Matrix (Scaffold), Wachstumsfaktoren, Zellen und einer ausreichenden Vaskularisierung kann ein transplantierbares Knochenkonstrukt generiert werden.

Langer und Vacanti gehören zu den Pionieren auf dem Gebiet des Tissue Engineerings und beschreiben es als ein interdisziplinäres Forschungsgebiet, welchem durch die Züchtung von ektodermalem, endodermalem und mesodermalem Gewebe ein bedeutendes Potenzial für die positive Beeinflussung der Lebensqualität und -länge zukommt (LANGER & VACANTI, 1993). Durch die Möglichkeit ein auf den Patienten zugeschnittenes Gewebe zu züchten, welches in seiner Form, Mechanik und der Zellzusammensetzung den Bedürfnissen angepasst werden kann, erlangte das Tissue Engineering mehr und mehr einen hohen Stellenwert in der Regenerativen Medizin. Ziel ist die Erschaffung von künstlich generiertem Gewebe durch die Kombination folgender Strategien: (1) osteogene Vorläuferzellen, (2) osteokonduktive und/oder osteoinduktive Matrices (Scaffolds), (3) osteoinduktive Wachstumsfaktoren und (4) eine ausreichende Vaskularisierung (DROSSE et al., 2008) (Abbildung 1).

## 2.2.1 Knochenersatzmaterialien

In den vergangenen Jahrzehnten wurde eine Vielzahl von synthetischen, die dreidimensionale Knochenstruktur imitierenden Ersatzmaterialien entwickelt. Die Vorteile gegenüber herkömmlich verwendeten autogenen, allogenen und xenogenen Transplantaten umfassen z. B. den Ausschluss der Übertragung von Krankheitskeimen, ein reduziertes Infektionsrisiko, geringere immunogene Abstoßungsreaktionen, die unbegrenzte Verfügbarkeit und weniger chirurgische Eingriffe (PORTER et al., 2009). Der Einsatz von einem Knochenersatzstoff ohne Zellen oder Wachstumsfaktoren kann jedoch unzureichend sein, um eine vollständige Heilung von Knochendefekten zu erreichen (CALORI et al., 2011). Die Anforderungen an ein optimales Knochenersatzmaterial sind hoch und umfassen folgende Punkte: (1) rasches Inkorporieren und Zurückhalten der mit dem Scaffold transplantierten Zellen, (2) Induktion der fibrovaskulären Migration aus dem umgebenden Gewebe, (3) Osteokonduktivität, (4) Biokompatibilität (Gewebeverträglichkeit), (5) eine dem Knochengewebe vergleichbare Biomechanik, (6) eine der Knochenneubildungsrate vergleichbare und kontrollierbare Biodegradierbarkeitsrate,

(7) Abwesenheit von toxischen Abbauprodukten, (8) Bindung von osteogenen Biomolekülen zur Erhöhung der Osteoinduktion (HELM et al., 2001). Knochenersatzmaterialien kann man ihrer Herkunft nach in organische sowie anorganische Materialien einteilen. Eine Sonderstellung obliegt den Kompositen.

### **Organische Knochenersatzmaterialien**

**Biologische Knochenersatzmaterialien** umfassen die bereits beschriebenen autogenen, allogenen und xenogenen Transplantate. Als biologisches Polymer nimmt Kollagen eine wichtige Stellung ein, so konnte in einer Reihe von Studien festgestellt werden, dass es Wachstumsfaktoren binden kann. Es wird als geeignete Trägermatrix für osteogene Wachstumsfaktoren vorgeschlagen (SWEENEY et al., 1995). Kollagen wird in Kombination mit einer Vielzahl von Knochenersatzstoffen und in unterschiedlichen Konsistenzklassen, wie z. B. als Gel, Pulver oder Schwamm, angeboten (BAUER & MUSCHLER, 2000).

Zu den **synthetischen Knochenersatzmaterialien** zählen synthetische Polymere, von denen vor allem aliphatische Polyester wie Polyglycolid, Poly-L-lactid und Copolymere zum Einsatz kommen. Sie können Zellen aufnehmen und haben sich als effektive Abgabesysteme für bioaktive Moleküle bewiesen. Beim Abbau einiger Polymere können Säuren entstehen, die potenzielle Auslöser von Entzündungsreaktionen darstellen können (HELM et al., 2001). Weitere Nachteile sind die schwierige Formanpassung nach Herstellung und die fehlende Röntgenopazität (SCHNURER et al., 2003). Demgegenüber stehen nicht-resorbierbare Polymere wie z. B. Polymethylmethacrylat-Zement, welches vor allem bei der Augmentation von Implantaten (Verbundosteosynthese) und bei der Vertebroplastie Verwendung findet (RENTSCH et al., 2012).

### **Anorganische Knochenersatzmaterialien**

Hierbei handelt es sich z. B. um **Metalle**, zu denen Titan, Edelstahl oder Kobalt-Chrom zählen. Diese Materialien sind biokompatibel, belastbar, prozessierbar und relativ kostengünstig. Bedingt durch die fehlende Biodegradierbarkeit ist eine zweite Operation zur Entnahme des Implantates oft notwendig. Im Gegensatz zu Knochengewebe besitzen Metalle ein höheres Elastizitätsmodul, so dass die Gefahr der Induktion einer Inaktivitätsatrophie der Knochen besteht (PORTER et al., 2009). Konventionell verwendete hochporöse Titanimplantate weisen meist keine optimalen mechanischen Eigenschaften auf (TIAINEN et al., 2010). Aufgrund der möglichen zytotoxischen und immunogenen Wirkungen einiger Elemente bedarf es noch weiterer Forschung, um eine Verbesserung der Biokompatibilität zu erreichen (SABETRASEKH et al., 2010).

**Calciumphosphat Keramiken** werden in unterschiedlicher Zusammensetzung verwendet. Darunter fallen z. B. Knochenersatzmaterialien aus Hydroxylapatit (HA,  $\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{OH}]_2$ ) oder Tricalciumphosphat (TCP,  $\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$ ) (LEGEROS, 2002). Wegen der raschen Resorption von TCP, bzw. der sehr langsamen von HA, wurde eine Kombination beider

Materialien, das biphasische Calciumphosphat (*biphasic calcium phosphate*, BCP), entwickelt (KOHRI et al., 1993). Keramiken gelten als osteokonduktiv, die mögliche Besiedelung und Proliferation von Knochenzellen auf ihrer Oberfläche führt zu einer Knochenbildung in unmittelbarem Kontakt zum Knochenersatzmaterial (ZIMMERMANN & MOGHADDAM, 2011). Dies ist auf die der Mineralphase des Knochengewebes ähnlichen Zusammensetzung und Struktur der Knochenersatzmaterialien zurückzuführen (HELM et al., 2001). Die Kombination ihrer osteokonduktiven Eigenschaften, die Fähigkeit endogene BMPs zu binden und zu konzentrieren, ferner die Möglichkeit sie mit Knochenzellen zu besiedeln, machen sie im Knochen Tissue Engineering im Menschen und im Tier zu effektiven Knochenersatzstoffen (LEGEROS, 2002; SPECTOR et al., 2007; SEGAL & SHANI, 2010). Die Herstellung bei hohem Druck im Hochtemperaturesinterungsprozess (1 000–1 500 °C) hat negative Eigenschaften auf die Porosität der Materialien, so dass Porensysteme über nachfolgende Herstellungsschritte generiert werden müssen (SCHNURER et al., 2003). Keramiken weisen meist nur eine geringe mechanische Stabilität auf und sind oft spröde (SALGADO et al., 2004).

**Biogläser** werden über einen Schmelzprozess der Ausgangsmaterialien (saure und basische Oxide) bei 1 500 °C hergestellt und bestehen aus einem dreidimensionalen Phosphoroxid-Siliziumoxid-Netzwerk, an das sich die Metallionen der basischen Oxide binden (Calciumoxid, Magnesiumoxid, Zinkoxid) (KOLK et al., 2012). Ihre Bioaktivität ist von der chemischen Zusammensetzung, insbesondere vom Siliziumdioxidgehalt abhängig. Es wird angenommen, dass die guten osteokonduktiven Eigenschaften der bioaktiven Gläser *in vivo* die Knochenbildung auf ihrer Oberfläche fördern (VALIMAKI & ARO, 2006). Durch Hitzebehandlung der Biogläser können **Glaskeramiken** hergestellt werden, die bessere Eigenschaften hinsichtlich Bioaktivität und mechanischer Festigkeit aufweisen (RENTSCH et al., 2012).

In den letzten Jahren kam es zu einer zunehmenden Optimierung der Eigenschaften von **Calciumphosphat-Zementen**, z. B. konnte eine erhöhte Resistenz gegenüber Scherkräften erreicht werden. Sie werden in Knochendefekte injiziert oder können als Paste angewendet werden, sind formbar und härten nach einiger Zeit aus (ZIMMERMANN & MOGHADDAM, 2011). Sie erwiesen sich für die Therapie von Tibiaplateau-Frakturen als gute Alternative zum Autograft (RUSSELL & LEIGHTON, 2008). Mit zunehmender Porosität sinken die mechanischen Eigenschaften der Calciumphosphat-Zemente, die Umbau- wie auch Resorptionsraten werden gesteigert (TAKAGI & CHOW, 2001).

### **Komposite**

Komposite bestehen aus mehreren Komponenten und weisen im Idealfall osteokonduktive, osteogene und osteoinduktive Eigenschaften auf. NanoBone<sup>®</sup> kann aufgrund seiner Zusammensetzung aus 76 % nanokristallinem Hydroxylapatit und 24 % Siliziumdioxid (Kieselgel) zu den Kompositen gezählt werden (KOLK et al., 2012). Silizium ist ein essenzielles Spurenelement und spielt u. a. im Rahmen der Knochenbildung eine wichtige

Rolle, mitunter durch die Beteiligung an der Knochenmineralisierung sowie an der Kollagensynthese (JUGDAOHSINGH, 2007). Weiterhin fördert es die Adhäsion von autologen Proteinen an der Oberfläche und führt so zu einem raschen Ab- und Umbau der Knochenersatzmatrix (KOLK et al., 2012). Die Herstellung von NanoBone<sup>®</sup> erfolgt im Sol-Gel-Verfahren. Die pulverförmigen Hydroxylapatitkristalle im Nanometerbereich werden in einem Siliziumdioxid-Sol homogen verteilt und anschließend während der Phase des Gelüberganges durch das Siliziumdioxid verbunden. Die Trocknungsphase, in der das Lösungsmittel entweicht, läuft bei maximal 700 °C ab. Durch diese im Vergleich zum Sinterungsprozess sehr niedrige Temperatur kann ein hochporöses Gerüst mit einer Vielzahl von interkonnektierenden nano- bis mikrometergroßen Poren entstehen, die zu einem Porositätsgrad von ca. 60 % (BIENENGRABER et al., 2006) und einer Oberfläche von 84 m<sup>2</sup>/g (GERBER, 2006) führen (Abbildung 2). Dadurch werden optimale osteokonduktive Eigenschaften sowie eine weitestgehende Imitation der anorganischen Struktur des Knochengewebes geschaffen (BIENENGRABER et al., 2006). Der geringe Feststoffgehalt von 20 Vol.-% führt dazu, dass 80 Vol.-% von autologem Blut aus der Operationswunde eingenommen werden können, wobei vor allem der Anlagerung von Proteinen in den Nanoporen eine besondere Bedeutung zukommt (GERIKE et al., 2006). Trotzdem verfügt NanoBone<sup>®</sup> über eine hohe Bruchfestigkeit von 40 MPa (GERBER, 2006). Eine Vielzahl von wissenschaftlichen *in vitro*- und *in vivo*-Studien belegt die Biokompatibilität und Eignung von NanoBone<sup>®</sup> als potentes Knochenersatz- bzw. Knochenaufbaumaterial. Nach einer relativ kurzen Implantationszeitspanne kommt es zu einem sogenannten Matrixwechsel, der den Abbau des anorganischen Siliziums und den Aufbau einer organischen Matrix impliziert (XU et al., 2009). Die Ergebnisse der Tierversuche und der klinischen Vorstudien lassen darauf schließen, dass NanoBone<sup>®</sup> osteokonduktiv und osteoinduktiv wie auch induzierend auf den frühen Knochenumbau wirkt (GOTZ et al., 2008).

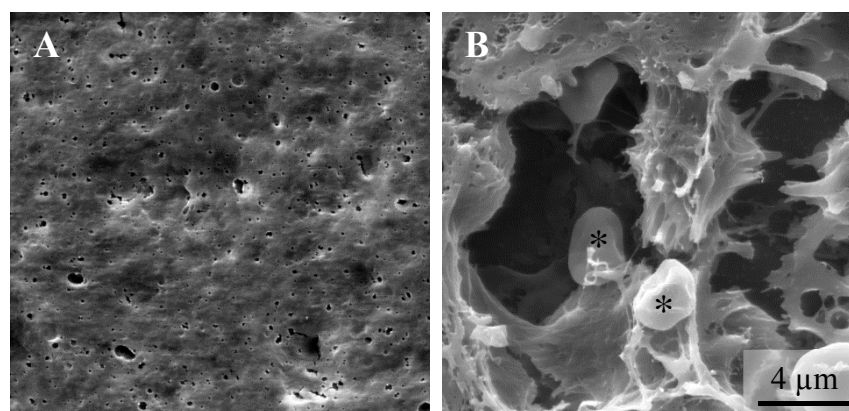


Abbildung 2: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines NanoBone<sup>®</sup> Blockes in 5 000facher Vergrößerung

Poren im Nanometer- (A) und Mikrometerbereich (B) mit eingedrungenen Erythrozyten (\*)



## 2.2.2 Osteogene Zellen

Die häufigsten zellbasierten Tissue Engineering Verfahren umfassen die Implantation von differenzierten Osteoblasten, kultivierten MSC, gentechnisch modifizierten Zellen, die Wachstumsfaktoren exprimieren oder von unfraktionierter frischer Knochenmark (KOLK et al., 2012), welches zum Zwecke der Optimierung der Zellausbeute auch in konzentrierter Form zur Anwendung kommt (HERNIGOU & HOMMA, 2012).

### Osteoblasten

Aus Gewebebiopsien entnommene autologe bereits differenzierte Osteoblasten können *in vitro* expandiert und nachfolgend transplantiert werden. Im Vergleich zu MSC zeigten sie *in vitro* eine geringere Mineralisierung und Zelldichte, während sie *in vivo* jedoch hinsichtlich des osteogenen Potenzials den MSC überlegen waren (REICHERT et al., 2010). Aufgrund einer Reihe von Limitationen, wie einer relativ aufwendigen Isolierungsprozedur, einer geringen Zellausbeute und häufig nicht ausreichend hohen Expansionsraten, werden oft alternative Zellquellen für das Knochen Tissue Engineering vorgeschlagen. Eine Möglichkeit ist die Verwendung von xenogenen Osteoblasten, hier müssen jedoch dieselben Nachteile beachtet werden, die bereits für xenogene Knochenersatzstoffe beschrieben wurden (SALGADO et al., 2004).

### Mesenchymale Stammzellen

MSC wurden erstmals von Friedenstein et al. als undifferenzierte Zellen beschrieben, die dem Knochenmark entstammen und Knochenbildung induzieren können (FRIEDENSTEIN et al., 1968). Ihre Isolation erfolgt hauptsächlich aus dem Knochenmark, in dem sie in einer Anzahl von 0,01–0,0001 % aller kernhaltigen Zellen vorkommen (DAZZI et al., 2006). Derzeit werden alternative, mit einem weniger invasiven Eingriff verbundene Isolationsquellen, wie peripheres Blut, Fett- sowie Muskelgewebe, erforscht (DIMITRIOU et al., 2011). Die International Society for Cellular Therapy beschreibt diese Zellen als „multipotente mesenchymale Stromazellen“ und ersetzt damit den üblich gebräuchlichen Begriff der Stammzelle, um auf die noch nicht bewiesene Eigenschaft der lebenslangen Selbsterneuerung hinzuweisen (JONES & YANG, 2011). Die Vielzahl von Isolations- und Charakterisierungstechniken führte zu der Festlegung folgender Kriterien für humane MSC: Plastikadhärenz; Expression von CD105 (cluster of differentiation), CD73 und CD90; keine Expression von CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79 $\alpha$  oder CD19 und HLA-DR; *in vitro* Differenzierungspotenzial in Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten (DOMINICI et al., 2006). Ovine MSC weisen ein anderes Markerprofil auf. Sie werden durch die Expression von CD44, CD166 und CD29, außerdem durch das Fehlen des Monozyten- und Makrophagenmarkers CD14, des Leukozytenmarkers CD45 und des Endothelzellmarkers CD31 charakterisiert (MCCARTY et al., 2009). Das Differenzierungspotenzial in Osteoblasten, Adipozyten und

Chondroblasten sowie die Plastikadhärenz konnten für ovine MSC bewiesen werden. Im Gegensatz zu humanen MSC wurden höhere Proliferationsraten festgestellt und eine fehlende AP Aktivität nach Kultur unter osteogenen Bedingungen (RENTSCH et al., 2010). Aufgrund der Expression von zahlreichen Oberflächenproteinen (Integrine, Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Zelladhäsionsmoleküle) wird von einem effektiven Ansprechen auf osteogene Wachstumsfaktoren und osteokonduktive Matrices ausgegangen (HELM et al., 2001). Bruder et al. konnten zeigen, dass es auch nach vielen Kulturpassagen zu keiner Expression eines differenzierten Phänotyps kommt und ihr multipotentes Differenzierungspotenzial trotz mehrfacher Kultivierung aufrechterhalten bleibt. Auch nach Kryokonservierung wurde keine Beeinträchtigung ihres osteogenen Differenzierungspotenzials festgestellt (BRUDER et al., 1997). Neben den regenerativen Eigenschaften, d. h. die Differenzierung in u. a. osteogene Progenitoren und die Sekretion von regenerationsunterstützenden Faktoren, werden auch antiinflammatorische Eigenschaften der MSC diskutiert, z. B. die Sekretion von antiinflammatorischen Mediatoren und die Beeinflussung der Aktivität von Entzündungs- bzw. Immunzellen (ZOMORODIAN & BAGHABAN ESLAMINEJAD, 2012).

### **Genetisch modifizierte Zellen**

Eine weitere Strategie ist der Einsatz von genetisch modifizierten Zellen im Knochen Tissue Engineering. Durch virale (Transduktion) oder nicht-virale (Transfektion) Vektoren werden spezifische Gene in Zellen inkorporiert, die nachfolgend z. B. Wachstumsfaktoren produzieren und freisetzen können (PHILLIPS et al., 2007). Es besteht die Möglichkeit, die Vektoren direkt *in vivo* in das Gewebe zu applizieren, jedoch stellt die unter kontrollierten Bedingungen ablaufende *ex vivo* Transfektion von entnommenen Zellen eine verlässlichere und sicherere Alternative dar (MEYER et al., 2006). Es muss gewährleistet werden, dass der Gentransfer effizient und ausschließlich in die Zielzelle erfolgt und diese das Transgen nachfolgend adäquat exprimiert (RENTSCH et al., 2012). Der virale Gentransfer ist mit einer Reihe von Nachteilen verbunden, u. a. werden mögliche immunogene Reaktionen (z. B. Adenovirus, Adeno-assoziierte Viren), schwierige Herstellungsprozesse (z. B. Adenovirus 3. Generation, Adeno-assoziierte Viren), Mutagenität (z. B. Retrovirus) oder Zytotoxizität (z. B. Herpes Simplex Virus) aufgeführt. Die alternative nicht-virale Transfektion ist ungefährlicher und kostengünstiger, jedoch weniger effizient (CALORI et al., 2009). Eine optimale Kombination aus Vektoren für den Gentransfer, regenerativen Molekülen und Zellen für eine effektive, aber kontrollierte Knochenbildungsrate in immunkompetenten Patienten ist bislang noch nicht etabliert (PHILLIPS et al., 2007).

### **Autologes frisches Knochenmark**

Vor allem in den ersten Versuchen der Generierung von gezüchtetem Knochengewebe wurde unfraktioniertes frisches autologes oder syngenes Knochenmark eingesetzt. Im

Knochenmark kommen u. a. osteogene Vorläuferzellen vor (s. 2.1.1 Funktion und Aufbau von Knochengewebe). Es kann keine sichere Vorhersage über die Effektivität von transplantiertem Knochenmark gemacht werden, da die Anzahl der osteogenen Vorläuferzellen im Knochenmark sehr variabel und meist zu gering ist sowie einer altersabhängigen Abnahme unterliegt (MEYER et al., 2006). Infolge der einfachen und kostengünstigen Gewinnung des Knochenmarks wird in speziellen klinischen Situationen die Implantation von einem mit Knochenmark getränkten Scaffold und eventuell dem Zusatz von Wachstumsfaktoren als effektive Therapieoption vorgeschlagen (HELM et al., 2001). Die Konzentrierung der Zellen im Knochenmark über einen Dichtegradientenzentrifugationsschritt kann zu einer Erhöhung der Wirkungseffizienz des Knochenmarks führen (HERNIGOU & HOMMA, 2012).

### 2.2.3 Knochenwachstumsfaktoren

Über die Zugabe von Wachstumsfaktoren kann die Zelladhäsion, -proliferation, -migration und -differenzierung gesteuert werden. Im Tissue Engineering werden hauptsächlich folgende Wachstumsfaktoren angewendet: TGF- $\beta$ , FGF, IGF I/II, PDGF sowie verschiedene BMPs (SALGADO et al., 2004). Physiologisch liegen die Wachstumsfaktoren im Knochengewebe in gebundener Form vor und werden während Knochenumbauprozessen kontinuierlich in ihrer aktiven Form freigesetzt, in der sie ihre Wirkung entfalten können (DROSSE et al., 2008). Der Einsatz im Tissue Engineering macht die Anwendung eines Applikationsmediums notwendig, welches die Faktoren aufnimmt und die Freisetzung in der benötigten Menge über einen optimalen Zeitraum gewährleistet. Natürliche Polymere, wie Kollagen, Fibrin, Alginat, Gelatine oder Glykosaminoglykane, sind häufig verwendete biokompatible und bioaktive Trägerstoffe. Von Nachteil sind u. a. die geringe mechanische Belastbarkeit, die schlechte Sterilisierbarkeit und das Hervorrufen einer möglichen immunogenen Reaktion (PORTER et al., 2009). Die Eigenschaft Fibrins im Körper nach Verletzungen hämostatisch zu wirken und hier als eine Art natürliches Scaffold für Gewebereparaturen zu dienen, indem es u. a. ein Reservoir für Wachstumsfaktoren darstellt, führte dazu, dass es in den letzten Jahren im Tissue Engineering als Trägermaterial für Zellen sowie Biomoleküle vermehrt eingesetzt wurde (BREEN et al., 2009). Es ist für die klinische Anwendung zugelassen, in steriler Applikationsform erhältlich, weist keine immunogenen Eigenschaften auf, ist biodegradierbar und kann aufgrund seiner Formbarkeit passgenau in Defekte unterschiedlichster Dimensionen eingebracht werden (LEE et al., 2011). In mehreren Studien wurden positive Eigenschaften von Fibrin festgestellt, so führte die Vorkultivierung von MSC auf Fibrin zu einer höheren Proliferationsrate und zu einer besseren Erhaltung ihres osteogenen Differenzierungspotenzials (COLLEY et al., 2012).

**BMPs** gehören zur Familie der TGF- $\beta$  und wurden erstmals von Urist beschrieben (URIST, 1965). Sie werden als effektivste Wachstumsfaktoren für die Therapie von nicht heilenden Frakturen (non-unions) sowie zur Unterstützung von Wirbelfusionen und Einheilung von Zahnimplantaten bezeichnet (LO et al., 2012). Bislang konnte für BMP-2, -4 und -7 die *in vitro* Differenzierung von Knochenvorläuferzellen in reife Osteoblasten nachgewiesen werden (PORTER et al., 2009). Über die Bindung an Transmembranrezeptoren wird die Hochregulation von knochenspezifischen Genen, wie z. B. Osteocalcin, RUNX2, AP, Kollagen Typ I oder Bone Sialoprotein, induziert (JADLOWIEC et al., 2003). Neben der osteogenen Differenzierung von MSC stimulieren BMPs die Migration weiterer MSC in den Defektbereich (SALGADO et al., 2004). BMP-2 und -7 sind seit einigen Jahren für die klinische Anwendung zugelassen (LO et al., 2012). In einer Vielzahl von Femurdefektmodellen in Ratte, Kaninchen, Hund, Schaf und Affe konnte die Applikation von BMP-2 und -7 in einem osteokonduktiven Trägerstoff die Knochenheilung signifikant beschleunigen (HELM et al., 2001). In der klinischen Anwendung konnte ein 5 cm langer Defekt in der Mandibula eines Hundes durch die Applikation von BMP-2 in Kombination mit einem Kollagenschwamm und HA/TCP-Granula geschlossen werden (SPECTOR et al., 2007). Neben ihrem osteoinduktiven Potenzial spielen sie in einer Reihe von Prozessen in der Embryonalentwicklung und der Organogenese eine wichtige Rolle (ZHAO, 2003).

**TGF- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 und - $\beta$ 3** regulieren eine Vielzahl von Vorgängen während der Gewebeheilung und -verletzung, wie z. B. Angiogenese, Chemotaxis und die Fibroblastenproliferation (GOVINDEN & BHOOLA, 2003). Von den drei in Säugetieren vorkommenden Isoformen nimmt man an, dass TGF- $\beta$ 2 und wahrscheinlich TGF- $\beta$ 3 eine größere Rolle in der Knochenheilung spielen als TGF- $\beta$ 1, während diese Isoform jedoch im unfrakturierten Knochen am meisten exprimiert wird (CHO et al., 2002). Es wird berichtet, dass TGF- $\beta$  die Mineralisierung *in vitro* verhindert, *in vivo* jedoch die Knochenbildung fördert (BONEWALD & DALLAS, 1994). Neben einer Reihe von Studien, in denen TGF- $\beta$  die Knochenheilung verbessern konnte, gibt es Studien, in denen die Applikation in adulten Tieren zu keiner signifikanten Erhöhung der Knochenbildungsrate führte sowie lokale Reaktionen auslöste (CRITCHLOW et al., 1995). Es wurde festgestellt, dass TGF- $\beta$  unterschiedlich auf verschiedene Zellarten einwirkt. So kann die Proliferation einiger Zellarten potent inhibiert, einiger anderer jedoch stimuliert werden (CROWTHER et al., 1991). TGF- $\beta$  nimmt an einer Reihe unterschiedlicher zellulärer Prozesse teil, seine biologische Wirkung wird als sehr vielfältig beschrieben (SALGADO et al., 2004).

**FGFs** tragen zur Förderung der Knochenbildung und Blutgefäßentwicklung bei (JADLOWIEC et al., 2003) und sind in der Knochenentwicklung, -regeneration und im Heilungsprozess von großer Bedeutung. Rezeptoren für FGF-1, -2 und -3 werden im Mesenchym, auf Osteoblasten und Chondrozyten exprimiert. FGF-1 und -2 werden

vornehmlich in Zusammenhang mit der Osteogenese gesehen, während FGF-3 eine bedeutendere Rolle in der Chondrogenese zugeschrieben wird. Unter den beschriebenen FGFs konnten neben FGF-1 und -2 auch für FGF-4, -8 und -19 Effekte auf die Knochenbildung festgestellt werden. Aufgrund des Vorkommens dieser Wachstumsfaktoren in pathologischen Situationen werden vor der klinischen Anwendung Langzeittests empfohlen, um die Sicherheit der FGFs zu bestätigen (DU et al., 2012). FGF-2 wird als therapeutisches Agens zur Unterstützung der Distraktionsosteogenese vorgeschlagen, es bedarf vor klinischer Anwendung allerdings noch einer exakteren Bestimmung der Dosis und des Applikationsweges (ALLORI et al., 2008b).

**IGF I und II** steigern die mitogene Aktivität von Osteoblasten in geringem Ausmaß und führen zu einer Erhöhung der Kollagen Typ I Produktion. Durch die hemmende Wirkung auf die Kollagenase Synthese im Knochengewebe wirken sie einer Degradierung von Kollagen entgegen (CANALIS et al., 1995).

**PDGF**, exprimiert von einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen, wie z. B. Thrombozyten, Makrophagen oder Fibroblasten, hat eine mitogene Wirkung auf z. B. Fibroblasten und glatte Muskelzellen (HELDIN & WESTERMARK, 1999), weiterhin auf Endothelzellen und Osteoklasten (ALLORI et al., 2008b). Neben seiner Funktion als osteogener Wachstumsfaktor wird PDGF als angiogener Faktor beschrieben (KANCZLER & OREFFO, 2008), welcher durch einen migrationsfördernden Effekt auf perivaskuläre Zellen ihr Anhaften an das Endothel induziert (CASSELL et al., 2002). Zusätzlich wird durch die Hochregulation der VEGF Expressierung indirekt eine angiogene Wirkung vermittelt. Durch Anlocken sowie Proliferationsinduktion von Knochenvorläuferzellen und Stimulierung der Angiogenese hat PDGF einen positiven Einfluss auf die Knochenregeneration (DELGADO et al., 2012). In mehreren Tiermodellen und der klinischen Anwendung konnte PDGF seine stimulierende Effekte auf die Knochenheilung bereits beweisen (ALLORI et al., 2008b).

## **2.2.4 Bisherige Strategien zur Züchtung von vaskularisiertem Knochenersatz**

Die bislang beschriebenen Strategien zur Züchtung von Knochengewebe umfassen Knochenersatzstoffe, Zellen sowie Wachstumsfaktoren. Im Falle der Rekonstruktion von kleinen Defekten kann die Kombination dieser Strategien zu einem guten Therapieerfolg führen. Im Gegensatz dazu können ausgedehnte Knochendefekte mit den beschriebenen Konstrukten nicht suffizient versorgt werden. Limitierender Faktor für das Überleben eines Großteils der transplantierten Zellen und zentrales Problem im Tissue Engineering ist eine ausreichende Blutgefäßversorgung, die die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen und den Abtransport von Stoffwechselprodukten sicherstellt. Vor allem im Hinblick auf die Fabrikation großvolumiger Knochenersatzstoffe ist eine umfassende Durchblutung von

grundlegender Bedeutung, damit das Überleben der transplantierten und zentral liegenden Zellen nicht gefährdet wird. Im Gegensatz zur physiologischen Gewebeentwicklung oder -heilung, bei der ein gleichmäßiges Wachstum von Gewebe und Blutgefäßen eine Versorgung der Zellen sicherstellt, ist dies bei den bislang beschriebenen Tissue Engineering Strategien nicht gegeben. Bis zur Ausbildung eines funktionellen Blutgefäßnetzwerkes können die transplantierten Zellen nur über Diffusion mit einer maximalen Diffusionsstrecke von 200 µm aus der Umgebung ernährt werden (KAULLY et al., 2009). Dem zugrunde liegend konnte die Anwendung von Tissue Engineering Konzepten zur Wiederherstellung von sehr dünnen oder metabolisch wenig aktiven Geweben, wie z. B. Haut- oder Knorpelgewebe, bereits große klinische Erfolge verzeichnen (BLAND et al., 2012). Werden große zellbesiedelte Konstrukte *in vitro* kultiviert, so kann ein von außen zum Zentrum hin abnehmender Sauerstoffgradient wahrgenommen werden, der letztlich zu zentralen nekrotischen Bereichen führen kann (KELLNER et al., 2002).

Integraler Bestandteil eines erfolgreichen Tissue Engineering Konzeptes ist somit die Generierung einer Mikrozirkulation im gezüchteten Konstrukt, über die Anastomosen zum Blutgefäßnetzwerk an der Empfängerstelle geschlossen werden können. Derzeit beschriebene Strategien stützen sich auf *in vitro* und *in vivo* Methoden, die z. B. durch den Zusatz von angiogenen Wachstumsfaktoren und/oder Zellen ergänzt werden können (LOKMIC & MITCHELL, 2008).

**Angiogene Wachstumsfaktoren** sind eine Möglichkeit das Blutgefäßwachstum zu fördern. Die parallele Entwicklung von Blutgefäßen und Knochengewebe wurde mit einem Knochenersatzstoff erzielt, der als BMP-2 und VEGF Trägerstoff fungierte und mit humanen MSC besiedelt wurde. Im Maus Femurdefektmodell eingesetzt, konnte eine rasche Generierung eines vaskularisierten Knochenkonstruktes erreicht werden (KANCZLER & OREFFO, 2008). Aufgrund ihres mitogenen Effektes auf Blutgefäßendothelzellen gelten VEGFs als zentrale Elemente in der Angiogenese. Neben ihren Wirkungen in der Blut- und Lymphgefäßangiogenese sind sie in der embryonalen Entwicklung sowie in weiteren physiologischen und pathologischen Prozessen, wie z. B. Wundheilung, rheumatoide Arthritis oder kardiovaskulären Erkrankungen, involviert (ROY et al., 2006). Die kontinuierliche Abgabe von bFGF (basic fibroblast growth factor, auch als FGF-2 bezeichnet) aus einem in das Peritoneum von Ratten implantierten Konstrukt induzierte das Wachstum von großen ausgereiften Gefäßen und führte zu einer höheren Kapillardichte als in der Kontrollgruppe. Die Bildung von reifen Gefäßen ist auf die mitogene Wirkung von bFGF auf Endothel- und Gefäßwandzellen sowie auf die Induktion der VEGF Expression zurückzuführen (PERETS et al., 2003). Ein weiterer Wachstumsfaktor ist PDGF, der neben seinem Einsatz als angiogener Faktor auch zur Förderung der Knochenheilung angewendet wird (2.2.3 Knochenwachstumsfaktoren).

*In vitro* können Gefäßnetzwerke im zu transplantierenden Scaffold generiert werden und die vollständig vaskularisierten Konstrukte anschließend *in vivo* eingesetzt werden. Die Implantation von einem mit Blutgefäßendothelzellen und mesenchymalen Vorläuferzellen *in vitro* besiedelten Fibronectin-Kollagen Typ I Scaffold führte im Mausmodell zur Ausbildung eines funktionellen und stabilen Gefäßnetzwerkes (KOIKE et al., 2004). Endotheliale Vorläuferzellen sind aufgrund ihres hohen angiogenen und proliferativen Potenzials sowie der hohen Überlebensrate *in situ* eine geeignete Alternative zu reifen Endothelzellen (AMINI et al., 2012). Von grundlegender Bedeutung ist eine schnelle Anastomosierung des im Scaffold generierten Gefäßnetzwerkes mit den Gefäßen an der Empfängerstelle, die jedoch mehrere Tage in Anspruch nehmen kann und folglich zur lokaler Ischämie führen kann (LOKMIC & MITCHELL, 2008). Während in einigen Studien gute Ergebnisse erzielt wurden (UNGER et al., 2010), konnten andere Forschergruppen nur eine begrenzte Anastomosierung der Gefäße zeigen (ROUWKEMA et al., 2006).

Die *in vivo* Generierung eines Blutgefäßnetzwerkes stützt sich auf zwei unterschiedliche Strategien, die extrinsische und die intrinsische Gefäßnetzwerkausbildung (Abbildung 3) (LOKMIC & MITCHELL, 2008). Die Implantation des Knochenersatzstoffes in ausreichend durchblutetes Gewebe, wie z. B. in das subkutane Gewebe, induziert einen Wundheilungsprozess, der zusammen mit der Hypoxie im Implantat die endogene Expression von angiogenen Faktoren fördert. Aus lokalen Blutgefäßen sprossen nach einem zufälligen Muster von peripher Kapillaren hin zum Zentrum des Konstruktes ein, es bildet sich eine **extrinsische Blutgefäßversorgung** aus (Abbildung 3A). Eine Strategie zur Optimierung der Vaskularisationsrate ist die zusätzliche Implantation von Zellen und Wachstumsfaktoren. Hier gilt zu beachten, dass die Zellen ausreichend versorgt werden müssen und dass ein hochgradiges Einwachsen von fibrovaskulärem Gewebe zu einer Verdrängung der implantierten Zellen führen kann (CASSELL et al., 2002). Der vaskularisierte Knochenersatzstoff wird nach einer ausreichenden Prävaskularisation entnommen und in die Defektstelle transplantiert. Ein großer Nachteil besteht darin, dass

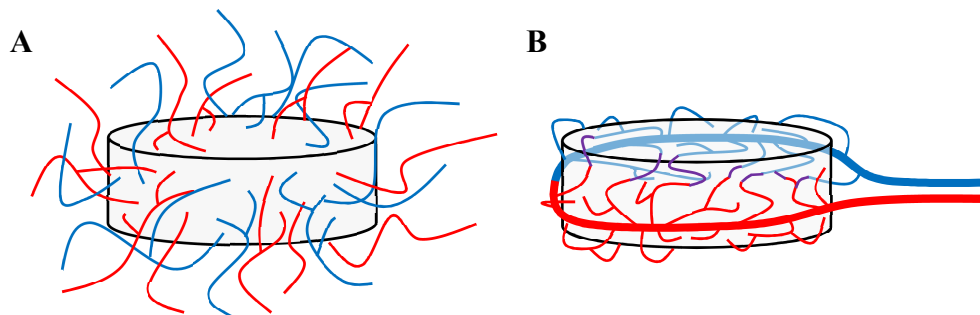


Abbildung 3: **Darstellung der extrinsischen und intrinsischen Blutgefäßversorgung**

(A): Bei der extrinsischen Gefäßversorgung erfolgt die Gefäßeinsprossung nach einem zufälligen Muster von peripher nach zentral. (B): Im Gegensatz dazu liegt bei der intrinsischen Gefäßversorgung eine zentrale Gefäßachse vor, von der ausgehend Kapillaren in das Konstrukt sprossen.

mit der Entnahme die Blutversorgung unterbrochen wird und das neugebildete Gefäßnetzwerk erst Anschluss an die Gefäße im Empfängerbett finden muss. Wie bereits beschrieben, kann es in dieser Zeit zu hypoxischen Zuständen mit Absterben der Zellen im Konstrukt kommen. Der Erfolg dieser Strategie ist zu einem Großteil durch die lokalen Umgebungsbedingungen bedingt (DROSSE et al., 2008), die oftmals aufgrund Schädigung der Weichteile oder einer insuffizienten Durchblutung ungünstig sind. Für die Vaskularisierung großvolumiger Konstrukte ist diese Technik ungeeignet und beschränkt sich aufgrund des langsamen Gefäßwachstums auf die Vaskularisierung von Knochenersatzstoffen geringerer Dimensionen (LOKMIC & MITCHELL, 2008).

Eine gerichtete Vaskularisation von Knochenersatzstoffen kann durch die Generierung einer **intrinsischen Blutgefäßversorgung** mittels mikrochirurgischer Techniken erreicht werden (DROSSE et al., 2008) (Abbildung 3B). Klinisch angewandte Methoden zur Generierung von vaskularisierten Knochenkonstrukten sind die Lappenpräfabrikation und -prälamination. Die Lappenpräfabrikation umfasst die Implantation einer Gefäßachse in einen Gewebebereich, der als Ersatz für verlorengangenes Gewebe dienen soll. Nach Ausbildung eines Gefäßnetzwerkes kann der Lappen an der axialen Gefäßachse in einen Knochendefekt transplantiert und an lokale Gefäße angeschlossen werden (PRIBAZ et al., 1994). Durch die autonome Gefäßversorgung des Konstruktes ist die Erfolgsrate nicht mehr durch die oft ungünstigen lokalen Bedingungen im Empfängerbett bestimmt (POLYKANDRIOTIS et al., 2006). Die Lappenprälamination wird in der Literatur oft mit dem Begriff der Präfabrikation gleichgesetzt, jedoch handelt es sich um eine andere Methode, bei der im ersten Schritt ein mit Zellen und/oder Wachstumsfaktoren beladener Scaffold oder autologer Knochen in einen gut durchbluteten Gewebebereich, wie z. B. Muskelgewebe, mit einer vorhandenen axialen Gefäßachse implantiert wird. Nach einer angemessenen Vaskularisationszeit wird das Konstrukt mitsamt Muskelanteilen und der Gefäßachse in den Gewebebereich transplantiert und hier mit lokalen Gefäßen anastomosiert (PRIBAZ et al., 1994). Die erfolgreiche klinische Anwendbarkeit wurde mehrfach beschrieben (WARNKE et al., 2006; KARCHER & FEICHTINGER, 2011), jedoch darf die hohe Hebmorbidity durch den Verlust von oftmals großen Muskelanteilen, sowohl im Falle der Präfabrikation als auch der Prälamination, nicht ungeachtet bleiben.

Infolgedessen wurden neue Ansätze etabliert, die mit geringeren Hebedefekten verbunden sind. Im Körper kann an unverletzter Stelle eine definierte Gefäßachse in eine Knochenersatzmatrix gelegt werden, von der ausgehend Kapillaren in das umgebende Ersatzgewebe einwachsen. Anschließend wird das vaskularisierte Konstrukt entnommen und in die Defektstelle eingebracht, in der es über seine zentrale Gefäßachse, von der das intrinsische Gefäßnetzwerk ausgehend gebildet wurde, an lokale Gefäße mikrochirurgisch angeschlossen wird (CASSELL et al., 2002). Wie auch bei der Lappenpräfabrikation und -prälamination ist der Therapieerfolg aufgrund der autonomen Gefäßversorgung des



Transplantates weitestgehend unabhängig von der Blutzirkulation im Empfängerlager. Die Hebmorbidity ist in diesem Modell jedoch weitaus geringer, da es nur der Opferung einer von mehreren im Menschen verfügbaren Gefäßachsen bedarf (KNESER et al., 2006a). Die zentrale Gefäßachse wird entweder in Form eines ligierten oder nicht-ligierten arteriovenösen Gefäßbündels (AV-bundle) oder einer arteriovenösen Gefäßschleife (AV-loop) angelegt. Der AV-bundle zeichnet sich durch seine einfachere chirurgische Durchführung aus und erscheint aufgrund dessen für klinische Zwecke bezüglich einer gefäßbildenden Quelle geeigneter als das AV-loop Modell. Dolderer et al. implantierten jeweils einen AV-bundle bzw. AV-loop in geschlossene sowie perforierte Kammern und konnten hinsichtlich des Gewebavolumens keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Gefäßbündel und -schleife in den einzelnen Kammerarten feststellen. Das höchste Maß an vaskularisiertem Gewebe wurde in der AV-bundle Gruppe in der perforierten Kammer erzielt (DOLDERER et al., 2010). Tanaka et al. demonstrierten im AV-loop Modell eine gesteigerte Rate an neugebildetem Gewebe und Kapillaren im Vergleich zum AV-bundle, empfehlen für die klinische Anwendung jedoch den AV-bundle (TANAKA et al., 2003).

Die erfolgreiche Vaskularisierung eines Hautlappens mittels eines AV-loops im Rattenmodell wurde 1979 von Erol und Spira erstmalig beschrieben (EROL & SPIRA, 1979). Mian et al. legten den AV-loop in eine Isolationskammer aus Polycarbonat und konnten ohne Zugabe von einer Matrix, Zellen oder Wachstumsfaktoren die Bildung von Gewebe beobachten (MIAN et al., 2000). Durch die Isolationskammer wird nicht stabilen Knochenersatzstoffen Schutz vor Deformation oder Degradierung geboten (CASSELL et al., 2002). Die Generierung von Geweben variabler Dimensionen und das individuelle Anfertigen von Knochenersatz unterschiedlicher Maße werden durch die Modifikation der Kammerform und -größe möglich. Durch Zugabe verschiedener Matrizes, Zellen sowie Wachstumsfaktoren können in der Kammer neben Knochengewebe auch diverse andere Gewebearten gezüchtet werden. Lokmic et al. erwähnen eine Vielzahl von Faktoren, die eine Stimulierung der Angiogenese im AV-loop zur Folge haben können, wie z. B. das hypoxische Kammernmilieu, die Scherkräfte im AV-loop oder metabolische Reize (LOKMIC et al., 2007).

Erste experimentelle Versuche bezüglich des AV-loops wurden im Kleintiermodell der Ratte durchgeführt. Die Vaskularisierung verschiedener Knochenersatzmatrizes konnte bereits erfolgreich demonstriert werden (KNESER et al., 2006b; ARKUDAS et al., 2012b). Mittels Zugabe der angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF zu einer Fibrinmatrix wurde eine dosisabhängig effektivere Angiogenese beobachtet (ARKUDAS et al., 2007b). Anfänglich wurden nur Knochensubstitute mit einem Volumen von maximal 1 cm<sup>3</sup> vaskularisiert. Ein Schritt in Richtung klinischer Anwendbarkeit wurde mit der Etablierung des AV-loop Modells im Großtier Schaf gemacht, in dem die Generierung von axial vaskularisiertem Neoknochengewebe in den benötigten klinisch relevanten

Dimensionen demonstriert werden kann. Zwei klinisch zugelassene Knochenersatzmatrizes wurden bereits erfolgreich vaskularisiert (BEIER et al., 2010; LOEW, 2011; BOOS et al., 2012), als Nachteile erwiesen sich jedoch die nur sehr geringe Knochenneubildung sowie die mangelnde mechanische Stabilität. Vor dem klinischen Einsatz sind weitere Studien erforderlich, um große Volumina an stabilem Knochengewebe mittels des AV-loops zu züchten, die sich für eine Transplantation eignen und damit die Therapielücke in der Heilung von Knochendefekten kritischer Größe schließen können.

## **2.3 Mikrochirurgische Tiermodelle und das Gerinnungssystem**

### **2.3.1 Mikrochirurgie und Thromboembolieprophylaxe**

Die Anwendung einer neuartigen Therapiemethode im klinischen Alltag bedarf meist einer präklinischen Evaluierung in einem Tiermodell bezüglich Sicherheit, Verlässlichkeit und Effektivität. Die Wahl des Versuchstieres ist von einer Reihe von Faktoren abhängig, wie z. B. einer dem Menschen vergleichbaren Anatomie, Physiologie und Größe der jeweiligen Organsysteme wie auch der Verfügbarkeit, des Gemüts und der finanziellen Kosten des Tieres. Das Schaf ist eines der häufigsten genutzten Versuchstiere bezüglich kardiovaskulärer Implantate und gilt als Goldstandard für die Evaluierung von bioprothetischen Herzklappen (BYROM et al., 2010). Auch die Untersuchung von Gefäßprothesen, kardiovaskulären Unterstützungssystemen oder neuartigen Stenttechnologien erfolgt hauptsächlich in dieser Spezies (MATTHIASSON et al., 1995; WESTABY et al., 1997; TOZZI et al., 2001). In der Orthopädie wird das Schaf aufgrund der dem Menschen vergleichbaren Makrostruktur der Knochen und des sehr ähnlichen Umbaus und der Zusammensetzung des Knochengewebes häufig eingesetzt (PEARCE et al., 2007). Für ein sicheres Gelingen vieler, insbesondere kardiovaskulärer Versuche ist eine optimale Thromboembolieprophylaxe meist unabdingbar. Bislang wurden jedoch noch keine entsprechenden Protokolle für (mikro)chirurgische Eingriffe am Schaf in der experimentellen Forschung etabliert, obwohl das ungelöste Problem einer effektiven Antikoagulation im Schafmodell von weiteren Autoren erkannt wurde (BONI et al., 2012). Es wird eine große Vielfalt unterschiedlicher Medikamente in variablen Dosierungen eingesetzt, die häufig auf Erfahrungen in der Humanmedizin beruhen und selten in ihrer Wirksamkeit überprüft werden. Die angewendeten Prophylaxeregimes sind sehr uneinheitlich, ein verlässliches Therapieschema lässt sich nicht ableiten.

Ein häufig verwendeter Thrombozytenaggregationshemmer ist Acetylsalicylsäure (ASS), die im Schaf sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit Antikoagulanzen zur Anwendung kam (SPANOS & HECKER, 1979; WESTABY et al., 1997; TOZZI et al., 2001; PENG et al., 2012). Nicht in allen Studien konnten Thrombosen sicher verhindert

werden (SPANOS & HECKER, 1979; WESTABY et al., 1997; PENG et al., 2012). Die Gabe von oral verfügbaren, antikoagulatorisch wirksamen Cumarinderivaten, wie Phenprocoumon (Marcumar®) oder Warfarin, resultierte in einer insuffizienten Antikoagulation und war nicht in allen Schafen effektiv (WESTABY et al., 1997; PENG et al., 2012). Heparin als nur intravenös oder subkutan applizierbares Antikoagulans ist ebenfalls weitverbreitet, jedoch wird auf ein individuell variables Ansprechen der Schafe hingewiesen (BONI et al., 2012). Trotz Applikation kann es zur Thrombenbildung kommen, z. T. musste hochdosiertes Heparin eingesetzt werden, um eine sichere Prophylaxe zu garantieren (SPANOS & HECKER, 1979). Das niedermolekulare Heparin (NMH) Enoxaparin sowie Dextran konnten die Gefäßdurchgängigkeitsraten im Schafmodell erhöhen (MATTHIASSEN et al., 1995). Nach mikrochirurgischer Implantation eines kleinkalibrigen Gefäßes ohne Gabe einer Langzeitantikoagulation wurden postoperativ in der Hälfte der Versuchstiere thromboembolische Verschlüsse festgestellt. Malm et al. betonen die Unerlässlichkeit der Erhöhung der Durchgängigkeitsrate vor dem Einsatz in klinischen Studien (MALM et al., 2012).

Vergleichsweise gibt es auch in der Humanmedizin wenige Studien oder allgemeingültige Regimes und keine evidenzbasierte Leitlinie zur antithrombotischen Prophylaxe in der Mikrochirurgie (SCHMITZ et al., 2011; JOKUSZIES et al., 2012), obwohl Thrombosen im Bereich von Anastomosen als häufigste Ursachen für die Erfolglosigkeit von mikrochirurgischen Operationen gelten (LECOQ et al., 2006). Das perioperative Gerinnungsmanagement in der Mikrochirurgie zeigt eine große Vielfalt an Behandlungsprotokollen und klinikinternen Standards (SCHMITZ et al., 2011; JOKUSZIES et al., 2012). So wird z. T. eine präoperative Gabe von NMH empfohlen, intraoperativ eine Bolusgabe von unfraktioniertem Heparin (UFH) (1 500–2 500 IE) und vor Anastomosefreigabe sowie postoperativ die Gabe von NMH ein- bis zweimal täglich. Die Verwendung von UFH unter PTT-Kontrolle (partial thromboplastin time, partielle Thromboplastinzeit) wird nur bei spezifischen operativen Eingriffen, wie z. B. an der unteren Extremität sowie bei Vorliegen von Risikofaktoren, befürwortet. Mit Ausnahme der Fingerreplantation stellt die Gabe von ASS nach mikrochirurgischen Lappenplastiken nicht das Standardvorgehen in den deutschsprachigen mikrochirurgischen Zentren dar (SCHMITZ et al., 2011). Die Etablierung eines allgemeingültigen Regimes ist eine große Herausforderung, da patientenabhängige Faktoren, wie pathogenetische Aspekte, Risikofaktoren und Begleiterkrankungen, zu berücksichtigen sind und dementsprechend verschiedene Behandlungsprotokolle für unterschiedliche operative Settings erarbeitet werden müssen (JOKUSZIES et al., 2012).

## 2.3.2 Überblick über das Gerinnungssystem

Nach Verletzung eines Gefäßes werden komplexe und streng regulierte Vorgänge induziert, die zur Blutstillung (Hämostase) führen. Die Hämostase verläuft in drei Schritten: (1) Vasokonstriktion, (2) Bildung eines Thrombozytenaggregats (primäre Blutstillung), (3) Blutgerinnung (sekundäre Blutstillung) (PICHLER, 2008).

### Vasokonstriktion

Die Verringerung des Blutflusses und somit die Verminderung des Blutverlustes wird durch eine nach Gefäßverletzung rasch einsetzende Vasokonstriktion induziert. Durch neuronale Reflexe, lokale myogene Spasmen und humorale Faktoren (z. B. Thromboxan A<sub>2</sub> [TXA<sub>2</sub>]) wird eine Retraktion der Gefäßwand hervorgerufen (KASPERS et al., 2004).

### Bildung eines Thrombozytenaggregats (Primäre Hämostase) (Abbildung 4)

Thrombozyten (Blutplättchen) sind neben ihren wichtigen Funktionen in der Hämostase und der Thromboseentstehung auch an der innate Immunabwehr, Wundheilung sowie an der hämatogenen Metastasierung von Tumoren beteiligt (KEHREL, 2003). Ort der Thrombopoese ist das Knochenmark, in dem sie aus den Megakaryozyten gebildet werden (ITALIANO & SHIVDASANI, 2003). Nach Fragmentierung und endgültiger Trennung in den Kapillaren der Lunge und Milz entstehen die Thrombozyten (KEHREL, 2003). Die Größe der kernlosen Thrombozyten der Säugetiere liegt zwischen 2–4 µm (KASPERS et al., 2004). Die Anzahl im Blut unterliegt tierartlichen Schwankungen (KASPERS et al., 2004), für das Schaf wurden in einer Studie von Sato et al.  $475\,470 \pm 191\,380/\mu\text{l}$  angegeben (SATO & HARASAKI, 2002). Nach einer Lebensdauer von 7–10 Tagen werden sie in der Milz und Leber abgefangen und phagozytiert (LINDEN & JACKSON, 2010). Das Zytoplasma enthält Mikrofilamente, Glykogen, Mitochondrien, Lysosomen und Speichergranula, die in alpha- und elektronendichte Granula unterteilt werden und eine wichtige Rolle bei der Plättchenaggregation spielen (KEHREL, 2003). Alpha-Granula enthalten u. a. Adhäsionsmoleküle, Chemokine, Koagulations- und Fibrinolyseproteine, Wachstumsfaktoren sowie immunogene Faktoren. Im Gegensatz dazu sind in den elektronendichten Granula v. a. Calcium, Magnesium, Phosphate, ATP (Adenosintriphosphat), GTP (Guanosintriphosphat), ADP (Adenosindiphosphat) und GDP (Guanosindiphosphat) sowie Serotonin zu finden (LINDEN & JACKSON, 2010).

In Arterien und Venen tragen die Thrombozyten in unterschiedlichem Ausmaß zur Hämostase bei. Durch die geringen Flussraten im venösen System kann es zu einer Akkumulation von aktivierten Gerinnungsfaktoren sowie der damit verbundenen Thrombingenerierung kommen. Es entsteht ein Thrombus, der nur zu einem geringen Teil aus Thrombozyten und einem Großteil aus Erythrozyten besteht. Im arteriellen Schenkel wird durch die hohen Flussraten die Auswaschung der Gerinnungsfaktoren begünstigt und

durch die entstehenden hohen Scherkräfte eine Aktivierung der Thrombozyten induziert. Die Zusammenlagerung und Quervernetzung der Thrombozyten lässt Aggregate entstehen, die eine Anheftung von Gerinnungsfaktoren erleichtern und nachfolgend die Thrombinbildung induzieren können (BRASS, 2010).

Die primäre Hämostase läuft in vier Schritten ab: (1) **Adhäsion**, (2) **Formänderung**, (3) **Sekretion**, (4) **Aggregatbildung** der Thrombozyten (PREISSNER, 2004) (Abbildung 4).

Durch Schädigungen des Gefäßendothels kommt es zur Freilegung von Kollagenstrukturen, an die der im Blut und im Subendothel vorkommende von-Willebrand-Faktor (vWF) bindet (KASPERS et al., 2004). Die Bildung des vWF erfolgt in Endothelzellen und Megakaryozyten, die Speicherung in alpha-Granula der Thrombozyten und in Weibel-Palade-Körperchen der Endothelzellen (SUGIMOTO & MIYATA, 2002). Die Thrombozyten werden über ihren membranständigen Rezeptor Glykoprotein (GP)-Ib/V/IX-Komplex an den vWF gebunden (KEHREL, 2003). Vor allem bei hohen Flussraten kommt dem vWF eine wichtige Funktion in der vorübergehenden Fixierung der rasch vorbeifließenden Thrombozyten zu (SUGIMOTO & MIYATA, 2002). Die auf diese Weise aktivierten Thrombozyten können durch die induzierte Konformationsänderung ihres membranständigen Rezeptors GPIIb/IIIa (Integrin  $\alpha_{IIb}\beta_3$ ) Fibrinogen binden und leiten damit die irreversible Bindung am Ort der Gefäßverletzung ein (BRASS, 2010). Die Interaktion von Fibrinogen mit jeweils zwei GPIIb/IIIa

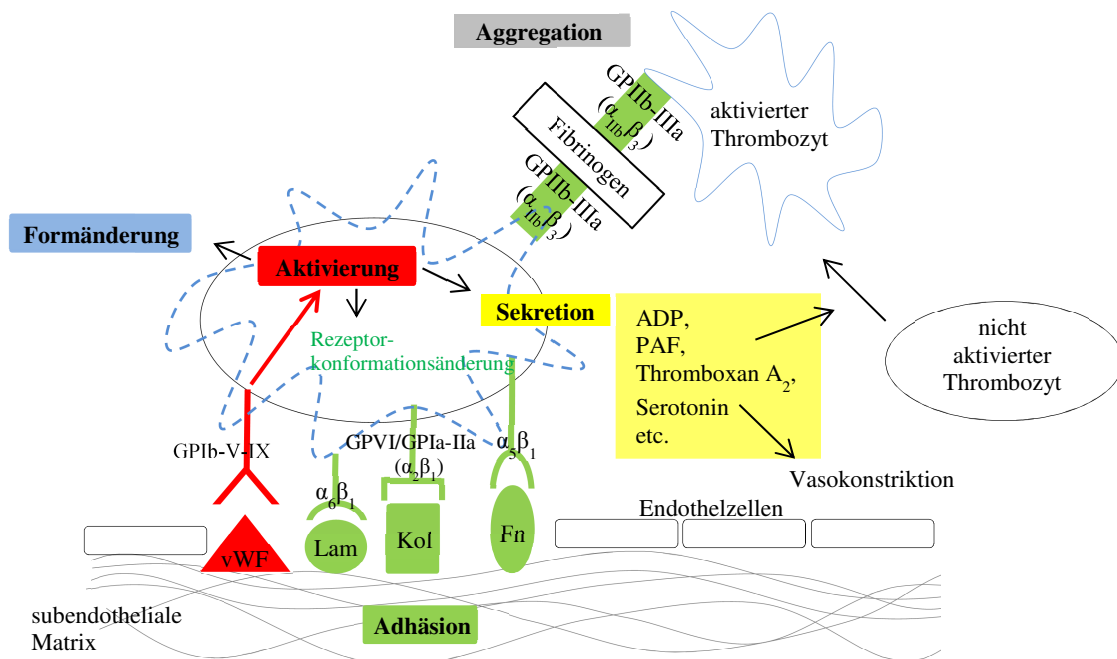


Abbildung 4: Schematische und vereinfachte Darstellung der Bildung eines Thrombozytenaggregats

(ADP = Adenosindiphosphat, Fn = Fibrinogen, Kol = Kollagen, Lam = Laminin, PAF = plättchen-aktivierender Faktor, vWF = von-Willebrand-Faktor)

Rezeptoren resultiert in einer Brückenbildung zwischen den aktivierten Thrombozyten und Ausbreitung der Aggregate auf der verletzten Oberfläche (KEHREL, 2003). Die Adhäsion der Thrombozyten an freigelegte Kollagenstrukturen der subendothelialen Matrix über z. B. GPVI und GPIIb/IIIa (Integrin  $\alpha_2\beta_1$ ) potenziert die progressive Quervernetzung der Thrombozyten untereinander sowie auf der geschädigten Oberfläche (WATSON & GIBBINS, 1998). Weitere Rezeptoren sind für die Stabilisierung der Bindung an den verletzten Gefäßstrukturen zuständig (Laminin [Integrin  $\alpha_6\beta_1$ ], Fibronectin [Integrin  $\alpha_5\beta_1$ ]). Neben der möglichen Initiierung der Plättchenadhäsion über Kollagen ist Thrombin ein weiterer Auslöser für die primäre Hämostase, der über Rezeptoren (Protease-aktivierter Rezeptor 1 und 4, PAR) auf der Thrombozytenoberfläche wirkt (KAPLAN & JACKSON, 2011).

Während der Aktivierung der Thrombozyten kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Calcium ermöglicht die Interaktion von Myosin- und Aktinfilamenten, die zu der charakteristischen Formänderung von einer diskoiden zu einer abgerundeten Form der Blutplättchen und zur Ausbildung von Pseudopodien führt (ZUCKER & NACHMIAS, 1985).

Aktiviert Thrombozyten sezernieren proaggregatorische Substanzen, wie z. B. ADP,  $\text{TXA}_2$ , Serotonin, Katecholamine oder plättchenaktivierenden Faktor (PAF), die u. a. über spezifische (Auto-)Rezeptoren weitere Thrombozyten aktivieren (positive Rückkoppelung) (BRASS, 2010). Die sezernierten proaggregatorischen Substanzen Serotonin und Katecholamine haben zeitgleich einen vasokonstriktorisches Effekt (KEMKES-MATTHES & OEHLER, 2001). ADP wirkt über drei membranständige Rezeptoren aggregationsinduzierend: (1)  $\text{P2Y}_1$  ( $G_q$ -gekoppelt) ist verantwortlich für die ADP-induzierte Formwandlung, vermittelt über die Aktivierung der Phospholipase C und dem nachfolgenden Calciumeinstrom, (2)  $\text{P2Y}_{12}$  ( $G_i$ -gekoppelt) führt zu einer Hemmung der Adenylatzyklase, (3)  $\text{P2X}_1$  ist ein Calciumkanal, von dem jedoch angenommen wird, dass er nur eine untergeordnete Rolle in der Thrombozytenaggregation spielt. Für eine vollständige Thrombozytenaggregation muss es sowohl zu einer Aktivierung von  $\text{P2Y}_1$  als auch von  $\text{P2Y}_{12}$  kommen (FOSTER et al., 2001; LEON et al., 2001).

Das entstandene Thrombozytenaggregat wird auch als weißer Abscheidungsthrombus bezeichnet. Durch die Fibrinbildung sowie Anlagerung von Erythrozyten kommt es zur Formierung des sogenannten roten Abscheidungsthrombus, der eine erhöhte Stabilität aufweist (KASPERS et al., 2004). Die Kontraktion von Filamenten des Thrombozytenzytoskeletts bewirkt eine Retraktion und weitere Stabilisierung des Gerinnsels (FOX, 1993).

### **Blutgerinnung (Sekundäre Hämostase) (Abbildung 5)**

Für die Blutgerinnung sowie Fibrinolyse sind ca. 50 verschiedene Faktoren zuständig, die je nach Funktion als Prokoagulanzen oder Antikoagulanzen bezeichnet werden. Einige dieser Faktoren wirken als Enzyme und können durch proteolytische Spaltung andere

Faktoren in ihre aktive Form (Bezeichnung mit „a“) überführen (KASPERS et al., 2004). Die *in vivo* ablaufende Gerinnungskaskade wird auch als extrinsischer Weg bezeichnet. Er beginnt mit der Bindung des Faktors VII an Gewebsthromboplastin (Faktor III, tissue factor [TF]) (OFFERMANN, 2012). TF befindet sich auf der Oberfläche vieler Zellen, wie z. B. Fibroblasten und glatten Muskelzellen, weiterhin eventuell auf Endothelzellen sowie Leukozyten (KAPLAN & JACKSON, 2011). Infolge einer Gefäßverletzung kann der TF mit dem Faktor VII oder VIIa in Kontakt kommen und eine Komplexbindung eingehen (PICHLER, 2008). Der Komplex aus TF und Faktor VIIa ist proteolytisch aktiv. Der Komplex aus TF und Faktor VII kann allerdings über eine Autoaktivierung durch VIIa in die proteolytisch aktive Form umgewandelt werden. Dieser Komplex induziert die Spaltung von Faktor X zu Xa und von Faktor IX zu IXa (YAMAMOTO et al., 1992). Nach einiger Zeit kommt es zur Inhibierung von Faktor Xa durch Bildung eines binären Komplexes mit dem tissue factor pathway inhibitor (TFPI) sowie zu einer Inhibierung des TF-VIIa Komplexes durch Bildung des quaternären Komplexes FXa-TFPI-TF-VIIa (BROZE, 1992; PERARAMELLI et al., 2012). Der Faktor IXa dient der Verstärkung der Gerinnungskaskade durch Komplexbildung mit dem Kofaktor VIIIa (Tenase-Komplex), der den Faktor X zu Xa spaltet. Über die Interaktion zwischen Faktor Xa und dem Kofaktor Va (Prothrombinaktivator-Komplex) wird Faktor II (Prothrombin) zu IIa (Thrombin) gespalten (PICHLER, 2008). Unter Vermittlung von Thrombin findet die

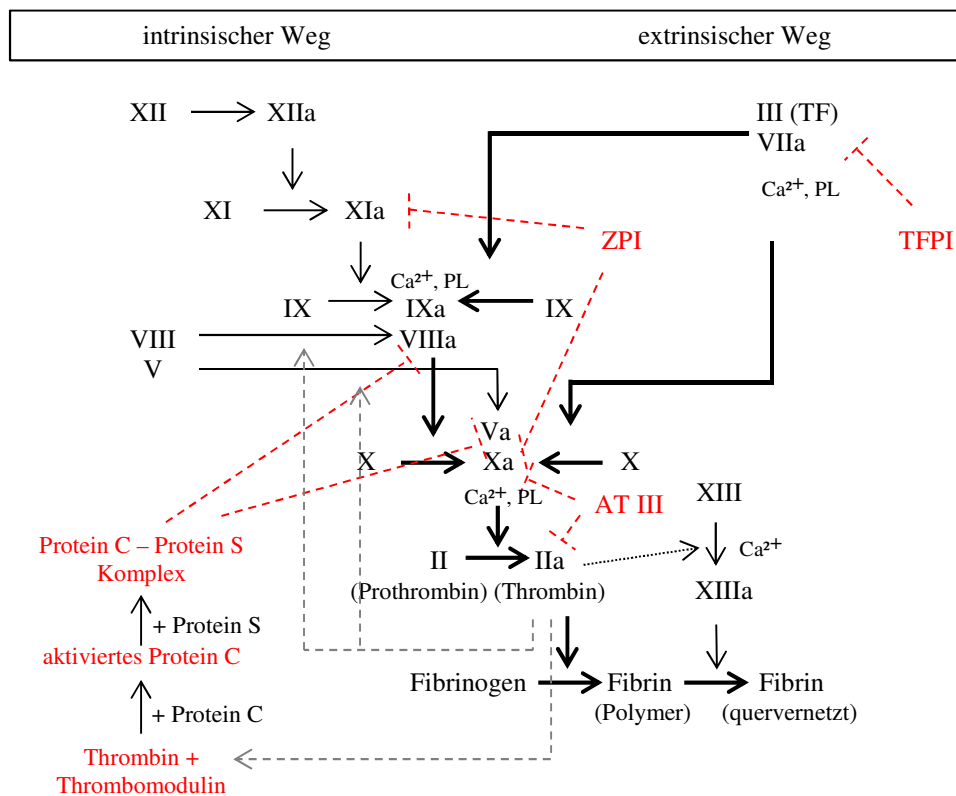


Abbildung 5: Schematische Darstellung der sekundären Hämostase sowie ihrer Inhibitoren

(AT III = Antithrombin III, PL = Phospholipid, TF = tissue factor, TFPI = tissue factor pathway inhibitor, ZPI = Z-abhängiger Protease-Inhibitor)

Umwandlung von Fibrinogen zu Fibrin statt. Durch die Abspaltung von vier Peptiden werden Bindungsstellen freigelegt, die die Grundlage für die spontane Vernetzung der Fibrinmonomere darstellen (KASPERS et al., 2004). Ein weiterer thrombinabhängiger Schritt in Anwesenheit von Calcium ist die Spaltung von Faktor XIII zur Transamidase XIIIa, die durch kovalente Kreuzvernetzung der Fibrinpolymere untereinander zur mechanischen Stabilisierung des Thrombus beiträgt (LORAND, 1983). Die klassische Einordnung des Gerinnungssystems in einen extrinsischen und intrinsischen Weg hat heute weniger Bedeutung (BROZE, 1992; PREISSNER, 2004; SCHNEPPENHEIM & ZIEGER, 2006). Das intrinsische System scheint vor allem *in vitro* eine Rolle zu spielen (OFFERMANN, 2012). Es beginnt mit der autokatalytischen Aktivierung von Faktor XII zu XIIa durch den Kontakt zu negativ geladenen Oberflächen wie z. B. Glas oder Kaolin. Über die Spaltung von Faktor XI zu XIa und IX zu IXa wird die Bildung von Faktor Xa induziert. Die Überlegenheit des extrinsischen über das intrinsische System in einer *in vivo* ablaufenden Gerinnung wird durch die Beobachtung gestützt, dass auch ein hochgradiger Mangel an Faktor XII nicht zwingend mit einer Blutung verbunden sein muss (BRUNNEE et al., 1993).

Die beschriebenen Vorgänge laufen nur im Bereich der Gefäßläsion ab. Diese Membranassoziation wird durch die Phospholipide der Zellmembranen sowie die Faktoren V und VIII bewirkt, die durch Thrombin zu Va und VIIIa gespalten werden und nachfolgend an die Zellmembran binden. Calcium spielt eine entscheidende Rolle für die Vermittlung der Bindung der negativ geladenen Gerinnungsfaktoren an die ebenfalls negativ geladene Phospholipidmembran der Zellen (z. B. VIIa-TF-, Prothrombinaktivator- und Tenase-Komplex) (KASPERS et al., 2004).

Die primäre und sekundäre Hämostase sind komplex miteinander verbunden und weisen zahlreiche Interaktionsstellen auf. Das im plasmatischen System gebildete Thrombin ist ein potenter Thrombozytenaggregator. PAF 3, sezerniert durch aktivierte Thrombozyten, wirkt als direkter Aktivator von Faktor II und X. Weiterhin kommt es zur Freisetzung von Calcium und Fibrinogen, die zu einer Potenzierung der Abläufe in der sekundären Hämostase beitragen. Die Exponierung von Faktor Va sowie anionischer Phospholipide auf den Thrombozyten unterstützt die Bildung des Prothrombinaktivator-Komplexes und die nachfolgende Fibrinogenbildung auf der Thrombozytenoberfläche (KEMKES-MATTHES & OEHLER, 2001; OFFERMANN, 2012).

### **Inhibitoren der Hämostase und Fibrinolyse (Abbildung 5)**

Neben dem bereits beschriebenen tissue factor pathway inhibitor (TFPI) reguliert das im Plasma vorkommende Antithrombin III (AT III) vor allem die Thrombin und Faktor Xa Aktivität. Eine Potenzierung der Effektivität wird durch die Bindung an Endothelzellen über Heparansulfat vermittelt (OFFERMANN, 2012), ein Mechanismus, der bei der



therapeutischen Anwendung von Heparin als Gerinnungshemmer ausgenutzt wird (PREISSNER, 2004). Thrombomodulin kommt vor allem auf der Oberfläche von Endothelzellen vor und bildet mit Thrombin einen Komplex, der zur Aktivierung von Protein C führt. Die nachfolgende Komplexbildung aus Protein C und Protein S induziert die proteolytische Spaltung von Faktor VIIIa und Va (WALKER & FAY, 1992). ZPI (Z-abhängiger Protease-Inhibitor) führt zu einer zelloberflächenmedierten Inaktivierung von Faktor Xa sowie XIa (PREISSNER, 2004).

Das Prostazyklin Prostaglandin I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) bewirkt eine Erhöhung der thrombozytären cAMP (cyclic, zyklisches Adenosinmonophosphat) Konzentration durch Aktivierung der Adenylatzyklase. Infolge kommt es zu einer Verminderung aller Plättchenaktivitäten (Aktivierung, Aggregation, Sekretion) (KEHREL, 2003).

Die Fibrinolyse sowie der Abbau von Faktor Va und VIIIa erfolgen über die Serinprotease Plasmin. Für die Aktivierung von Plasminogen zu Plasmin sind Aktivatoren (Gewebeplasminogen-Aktivator/Urokinase) aus dem Gewebe oder aus Endothelzellen notwendig, weiterhin Kallikrein, welches durch Faktor XIIa aus Präkallikrein gebildet wird (KASPERS et al., 2004). Gegenspieler der Fibrinolyse sind TAFI (Thrombin aktivierbarer Fibrinolyse Inhibitor), α<sub>2</sub>-Antiplasmin sowie PAI-1 (Plasminogenaktivatorinhibitor-1) (PICHLER, 2008).

### 2.3.3 Unterschiede im Gerinnungssystem von Mensch und Schaf

Viele Studien befassten sich in den letzten Jahrzehnten mit der Vergleichbarkeit des Gerinnungssystems von Mensch und Schaf, um die Frage der sinnvollen Übertragbarkeit tierexperimenteller Versuche beantworten zu können. Eine Reihe von Untersuchungen beschränken sich allerdings auf kleine Stichproben (CONNELL et al., 2007) oder kommen zum Teil zu widersprüchlichen Aussagen (HANLEY et al., 1988; KARGES et al., 1994).

#### Primäre Hämostase und Thrombozytencharakteristika

Schafe weisen höhere Thrombozytenzahlen ( $475\,470 \pm 191\,380/\mu\text{l}$ ) als Menschen ( $261\,440 \pm 47\,590/\mu\text{l}$ ) auf (SATO & HARASAKI, 2002). In Kombination mit der abgeschwächten Fibrinolyse wurde die Hypothese der Hyperkoagulabilität des Schafblutes im Vergleich zum Menschenblut aufgestellt (BYROM et al., 2010). In einer weiteren Studie konnte keine Korrelation zwischen Thrombozytenzahl und -aggregation festgestellt werden (SATO & HARASAKI, 2002). Eine altersabhängige Veränderung in der Thrombozytenzahl und der Blutgerinnung wurde mittels der Rekalzifizierungszeit und Thrombelastographie von Blut fötaler, neonataler und adulter Schafe ausgeschlossen (MOALIC et al., 1989). Im Vergleich zu humanen Thrombozyten wird von einer geringeren adhäsiven Fähigkeit oviner Thrombozyten an autologes immobilisiertes Fibrinogen (PELAGALLI et al., 2003) sowie an Biomaterialien für kardiovaskuläre Implantate berichtet (GOODMAN, 1999). Die Adhäsion an weitere Fremdoberflächen, wie

z. B. Cellulosehydrat, wird jedoch als vergleichbar beschrieben (GRABOWSKI et al., 1977).

In der Literatur finden sich bezüglich des agonisteninduzierten Aggregationsverhaltens oviner Thrombozyten im Vergleich zu humanen oft konträre Aussagen. So wird von einer höheren Ansprechbarkeit oviner Thrombozyten auf Kollagen berichtet (ADDONIZIO et al., 1978), in einer anderen Studie jedoch von einer verminderten (TILLMAN et al., 1981). Ebenso wird die Induktion der Aggregation durch ADP zum einen als abgeschwächt (ADDONIZIO et al., 1978), zum anderen als vergleichbar zum Menschen beschrieben (TILLMAN et al., 1981). Ristocetin, Arachidonsäure (arachidonic acid, AA) sowie thrombin receptor-activating peptide 6 (TRAP-6) konnten im Schafblut keine Aggregation hervorrufen (BAUMGARTEN et al., 2010). Der Agonist Epinephrin wirkt im Schafblut nicht oder nur vermindert aggregationsstimulierend (ADDONIZIO et al., 1978; TILLMAN et al., 1981). Trotz eines schafspezifischen PAF-Rezeptors wird das Schaf als geeignetes Modell für die Untersuchung von PAF-Thrombozyten-Interaktionen im Menschen empfohlen. Die Zugabe von PAF induzierte eine analoge Aggregation, Formänderung und Sekretion oviner und humaner Thrombozyten (SLATTERY & BEAUMONT, 1989).

### **Sekundäre Hämostase**

Karges et al. konnten zeigen, dass die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (activated partial thromboplastin time, aPTT) und Thrombinzeit (thrombin time, TT) der Schafe sehr nah an humanen Referenzwerten liegen, im Gegensatz zu der verlängerten Prothrombinzeit (prothrombin time, PT) (KARGES et al., 1994). Die verlängerte PT wurde in mehreren Untersuchungen bestätigt (HANLEY et al., 1988; SILLER-MATULA et al., 2008). Die ähnlichen aPTT-Werte, die jedoch in einer anderen Studie widerlegt wurden (HANLEY et al., 1988), deuten auf ein vergleichbares intrinsisches Blutgerinnungssystem von Schaf und Mensch hin (SILLER-MATULA et al., 2008). Aufgrund einer dem Menschen ähnlichen Blutgerinnungszeit und endogenen Thrombinpotenzials wird das Schaf als geeignetes Modell für Gerinnungsstudien angesehen (SILLER-MATULA et al., 2008).

Die vergleichende Untersuchung von humanem und ovinem Blut in einer umfassenden Studie zur Übertragbarkeit tierexperimenteller endovaskulärer Studien beschreibt eine erniedrigte Aktivität der Gerinnungsfaktoren II, VII, X, XI, XII, XIII sowie eine erhöhte Aktivität von V und VIII des Schafes im Vergleich zum Menschen (HOEHLE, 2000). Insgesamt wurde die endogene Aktivierung (VIII, IX, XI, XII) des Gerinnungssystems des Schafes geringgradig erhöht, die exogene (VII) jedoch mittelgradig erniedrigt eingestuft. Die Fibrinbildung (II, V, X) wird als abgeschwächt angegeben, die jedoch durch eine ebenfalls abgeschwächte Fibrinolyse (XI, XII, XIII,  $\alpha_2$ -Antiplasmin) kompensiert wird. Die Gegenregulation (AT III, Protein C) wird als mittelgradig geringer beschrieben. Die AT III- sowie Fibrinogen-Werte von Mensch und Schaf sind vergleichbar, im Gegensatz dazu weist das Schaf eine 3,5fach erhöhte vWF-Aktivität auf. In einer weiteren Untersuchung wurden für die meisten Gerinnungsfaktoren ähnliche, jedoch bezüglich

Faktor V niedrigere und Faktor XII höhere Werte als in der Studie von Hoehle et al. festgestellt (KARGES et al., 1994).

## **2.3.4 Antikoagulationsstrategien im Menschen und im Tiermodell Schaf**

### **2.3.4.1 Acetylsalicylsäure, Clopidogrel und Ticagrelor**

Thrombozyten sind eine wichtige Komponente der normalen Hämostase, können jedoch bei abnormalen Verhältnissen oder in spezifischen mikrochirurgischen Settings durch eine unkontrollierte Aktivierung zu schwerwiegenden Komplikationen, wie z. B. intraluminaler Thrombusbildung, führen. Thrombozytenaggregationshemmer greifen in diese Kaskade ein, indem sie beispielsweise  $\text{TXA}_2$ , ADP, GPIIb/IIIa, Thrombin, Kollagen oder vWF hemmen (MEADOWS & BHATT, 2007). In der Humanmedizin sind Acetylsalicylsäure und Clopidogrel häufig verwendete Thrombozytenaggregationshemmer (DIENER et al., 2010).

#### **Acetylsalicylsäure (ASS)**

ASS führt zur irreversiblen Inaktivierung der Prostaglandin H (PGH)-Synthase-1 und -2, die auch als Cyclooxygenase-1 bzw. -2 (COX-1/-2) bekannt sind (BURCH et al., 1978), die hauptsächliche Wirkung ist jedoch auf die Hemmung der COX-1 zurückzuführen (MEADOWS & BHATT, 2007) (Abbildung 8). Die Inaktivierung der COX-Aktivität ist Folge der Blockade des COX-Kanals durch Acetylierung eines Serinrestes, so dass das Substrat das katalytische Zentrum nicht mehr erreichen kann (LOLL et al., 1995). Dadurch wird die PGH-2 Synthese aus Arachidonsäure verhindert (PATRONO et al., 2008). PGH-2 dient u. a. als Substrat für die  $\text{TXA}_2$  und  $\text{PGI}_2$  Generierung.  $\text{TXA}_2$ , hauptsächlich über COX-1 synthetisiert, ist ein wichtiger Mediator für die humane Thrombozytenaggregation und Vasokonstriktion,  $\text{PGI}_2$ , hauptsächlich über COX-2 synthetisiert, hat den gegenteiligen Effekt (MCADAM et al., 1999). Plasmaspitzenpiegel werden im Menschen 30–40 Minuten nach oraler Einnahme von ASS erreicht, zu einer Thrombozytenhemmung kommt es ca. eine Stunde nach Einnahme. In Dosierungen von 50–1 500 mg/d konnte eine Thrombozytenaggregationshemmung festgestellt werden. Es werden sowohl Studien beschrieben, in denen eine Dosiserhöhung zu einer Optimierung der Wirkung führte als auch Studien, in denen keine Veränderung nach Applikation einer höheren Dosis festgestellt wurde (EIKELBOOM et al., 2012). Aufgrund der irreversiblen Hemmung der COX-1 bleibt der inhibitorische Effekt auf die Thrombozyten für den Rest ihrer Lebensdauer erhalten (PATRONO et al., 1985). Die Thrombozytenaktivierung durch mechanischen Scherstress sowie chemische Mediatoren und spätere Schritte bis zur Aktivierung der thrombozytären GP-IIb/IIIa-Rezeptoren sind nicht ASS-sensitiv (SCHROR, 2012). Aufgrund dessen kann die Kombination von verschiedenen

Thrombozytenaggregationshemmern mit unterschiedlichen Angriffspunkten einer Monotherapie überlegen sein (WONG et al., 2010). In der Humanmedizin ist ASS Bestandteil der Prophylaxe von thromboembolischen Ereignissen, u. a. beim akuten Myokardinfarkt oder ischämischen Schlaganfall, bei stabiler oder instabiler Angina pectoris, weiterhin bei zerebraler Ischämie oder Vorhofflimmern (ANTITHROMBOTIC TRIALISTS' COLLABORATION, 2002).

Aufgrund des in der Humanmedizin weitverbreiteten Einsatzes sowie der guten Erfahrungen mit ASS als Thrombozytenaggregationshemmer wurde es bereits in vielen experimentellen Studien im Schafmodell angewendet (WESTABY et al., 1997; TOZZI et al., 2001; KOCH et al., 2010). Es sind Studien über die Pharmakokinetik von ASS im Wiederkäuer (Schaf, Ziege, Rind) publiziert (DAVIS & WESTFALL, 1972; GINGERICH et al., 1975; ALI, 2003). Der aggregationshemmende Effekt wurde bislang noch nicht *in vivo* untersucht, jedoch konnten Spanos et al. im *in vitro* Versuch keine Wirkung von ASS (Endkonzentration 500 µM) auf Schafthrombozyten feststellen (SPANOS, 1993).

### **Clopidogrel**

Clopidogrel gehört zu den Thienopyridinen und hemmt unabhängig vom Arachidonsäurestoffwechsel die ADP-induzierte Aktivierung der Thrombozytenaggregation (Abbildung 8). Clopidogrel bindet über eine Disulfidbrücke irreversibel an den G-Protein gekoppelten P2Y<sub>12</sub> ADP-Rezeptor auf der Thrombozytenoberfläche (SAVI et al., 2000). Die Verstärkung der über den P2Y<sub>1</sub> Rezeptor initiierten Plättchenaggregation sowie die Stabilisierung der Aggregate bleibt aus (GACHET, 2001). Nach Resorption werden ca. 85 % des Clopidogrels über Esterasen zum inaktiven Metaboliten abgebaut (SHARMA et al., 2009). Zum anderen wird es als Prodrug in der Leber über einen zweistufigen Cytochrom P450 (CYP) abhängigen Schritt (hauptsächlich beteiligte Enzyme: 1. Stufe: CYP1A2, CYP2C19, CYP2B6; 2. Stufe: CYP3A4/5, CYP2C9, CYP2C19, CYP2B6) zuerst zu 2-Oxo-Clopidogrel oxidiert und anschließend in den aktiven Metaboliten mit freier Thiolgruppe umgewandelt (SAVI et al., 2000; CLARKE & WASKELL, 2003; WALLENTIN, 2009; KAZUI et al., 2010) (Abbildung 6). Die Bestimmung des inaktiven und im Blut hauptsächlich zirkulierenden Metaboliten Clopidogrelcarbonsäure eignet sich für Studien bezüglich der Resorption und Eliminierung von Clopidogrel (CAPLAIN et al., 1999). Im Menschen konnte eine maximale Thrombozytenaggregationshemmung von 40–50 % innerhalb von 2–5 Stunden nach einer Auf sättigungs-dosis (loading dose) von 400 mg beobachtet werden, die vergleichbar zu der im Steady State nach 3–7 Tagen täglicher Einnahme von 75 mg war (SAVCIC et al., 1999). Aufgrund der irreversiblen Wirkung von Clopidogrel kommt es vergleichbar zu ASS etwa 7 Tagen nach der letzten Dosis zu einer Normalisierung der Thrombozytenfunktion (PATRONO et al., 2008).

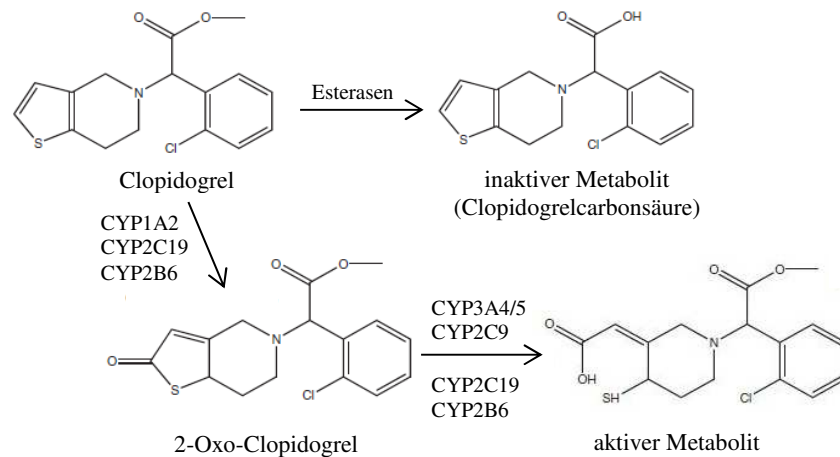


Abbildung 6: *Clopidogrelmetabolismus (modifiziert nach (WALLENTIN, 2009; SILVESTRO et al., 2010))*

Clopidogrel wird in der Humanmedizin als sicherer und effektiver Thrombozytenaggregationshemmer für die Anwendung bei atherothrombotischen Erkrankungen beschrieben (CAPRIE STEERING COMMITTEE, 1996). Die Wirkung auf Thrombozyten des Wiederkäuers wurde nur in wenigen Studien untersucht, so konnte im Schaf und in der Ziege in einer sehr kleinen Versuchsgruppe ( $n = 2$ ) ein geringer Effekt von Clopidogrel nachgewiesen werden (CONNELL et al., 2007). In einem weiteren Versuch wurde die bovine Thrombozytenaggregation durch Clopidogrel gehemmt (COOMBER et al., 2006).

### Aspirin und Clopidogrel Non-Responder

Sowohl für Aspirin als auch für Clopidogrel ist das Vorkommen von Non-Respondern in vielen humanmedizinischen Studien beschrieben. So können u. a. eine unzureichende Compliance, schlechte Resorption, eine nicht optimale Dosis, rauchen, genetische Polymorphismen oder Arzneimittelinteraktionen zu einer verminderten Wirkung der Thrombozytenaggregationshemmer führen (SHARMA et al., 2009). Das Vorkommen von Clopidogrel Non-Respondern im Menschen schwankt je nach Studie zwischen 5–44 % (GURBEL & TANTRY, 2007), das von Aspirin Non-Respondern zwischen 5,5–61 %, jedoch sind diese Schätzungen nicht verlässlich aufgrund kleiner Gruppengrößen sowie uneinheitlicher Patientengruppen, Definitionen der Resistenz und Testverfahren (HANKEY & EIKELBOOM, 2006). Mögliche Therapieoptionen sind u. a. Dosiserhöhungen und der Einsatz von neu entwickelten Thrombozytenaggregationshemmern. Eine Dosiserhöhung von Aspirin führte in einigen Patienten zu einer besseren Wirkung (LEE et al., 2005). Die Steigerung der Standarddosierung von 75 mg auf 150 mg Clopidogrel einmal täglich konnte eine verbesserte Thrombozytenaggregationshemmung in Patienten nach elektiver perkutaner Koronarintervention erzielen (ANGIOLILLO et al., 2008). Die Erhöhung der Aufsättigungsdosis bis zu 400 mg steigerte die Wirkung, die Erhöhung auf 600 mg erbrachte keinen zusätzlichen Effekt (THEBAULT et al., 1999).

## Ticagrelor

Der neu entwickelte Thrombozytenaggregationshemmer Ticagrelor, ein Cyclopentyl-Triazolopyrimidin, ist wie Clopidogrel ein oraler ADP-Rezeptorantagonist, benötigt für seine Wirkung jedoch keinen Metabolisierungsschritt und gehört damit nicht zur Gruppe der Prodrugs (HUSSAR & SCHARTEL, 2011). Ticagrelor wird aufgrund seiner Strukturähnlichkeit zum natürlichen Antagonisten des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors auch als ATP-Analogon bezeichnet (Abbildung 7) (SPRINGTHORPE et al., 2007). Es bindet an einer Stelle des P2Y<sub>12</sub> Rezeptors, die nicht der ADP-Bindungsstelle entspricht und induziert dadurch eine nicht-kompetitive und reversible Hemmung des Rezeptors (JJ et al., 2009) (Abbildung 8). Der inaktive Zustand des Rezeptors wird nach Abtrennung von Ticagrelor aufgehoben und erst wieder induziert, wenn ein neues Molekül bindet, somit kommt es zu einer konzentrationsabhängigen Wirkung von Ticagrelor im Blut (HUSTED & VAN GIEZEN, 2009). Die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation konnte bereits 2 Stunden nach Einnahme nahezu vollständig gehemmt werden. Durch eine Dosiserhöhung (100–400 mg) kann die Wirkung gesteigert werden (TENG & BUTLER, 2010). Nach der letzten Einnahme kommt es in den ersten 72 Stunden zu einem raschen Wirkungsverlust, eine vollständige Normalisierung der Thrombozytenfunktion wird nach 5 Tagen erreicht (GURBEL et al., 2009). Ticagrelor weist gegenüber Clopidogrel einige Vorteile auf, wie z. B. die reversible und konzentrationsabhängige direkte Wirkung ohne notwendige Metabolisierung, eine effektivere Thrombozytenaggregationshemmung ohne die Erhöhung von Blutungskomplikationen sowie ein rascheres An- und Abfluten der Wirkung und die Hemmung der P2Y<sub>12</sub> gesteuerten Vasokonstriktion der glatten Gefäßmuskelzellen (HUSTED & VAN GIEZEN, 2009). Die gute Wirksamkeit sowie Überlegenheit von Ticagrelor konnten in einer klinischen Vergleichsstudie von Clopidogrel und Ticagrelor bestätigt werden (BLIDEN et al., 2011). In Phase II-Studien wurde eine vergleichbare Sicherheit und Verträglichkeit festgestellt (HUSTED & VAN GIEZEN, 2009). Die Häufigkeit von signifikanten Blutungen war ähnlich, jedoch kam es in den Ticagrelor Gruppen vermehrt zu klinisch nicht relevanten Blutungen sowie zu

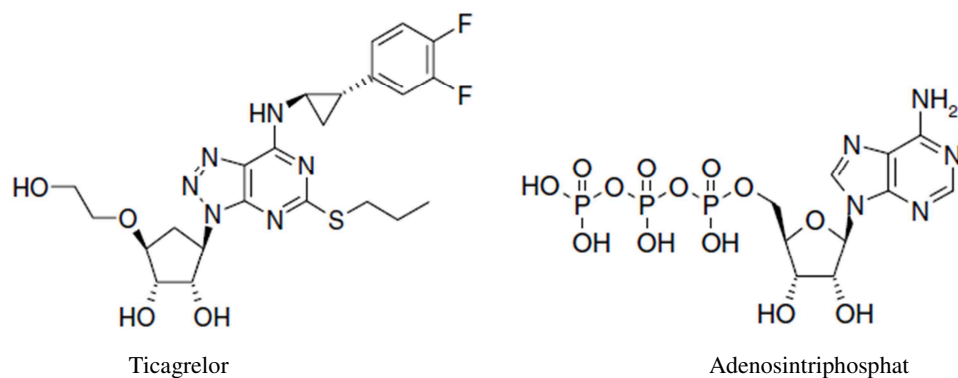


Abbildung 7: Strukturformel von Ticagrelor im Vergleich zu Adenosinriphosphat (modifiziert nach (SPRINGTHORPE et al., 2007))

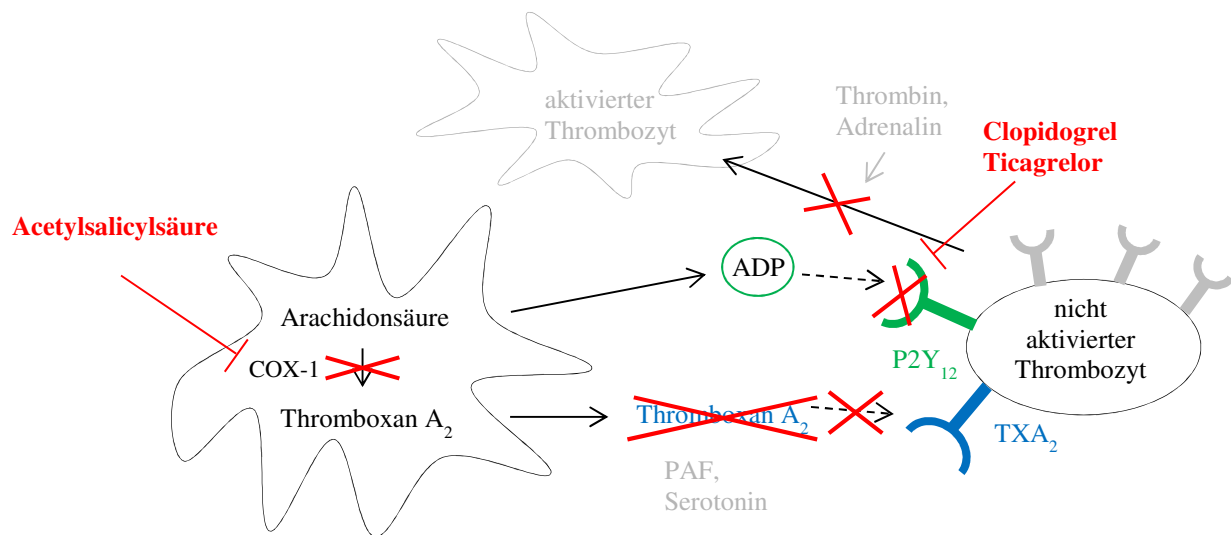


Abbildung 8: Vereinfachtes Schema zur Wirkungsweise der in dieser Studie verwendeten Thrombozytenaggregationshemmer Acetylsalicylsäure, Clopidogrel und Ticagrelor

(ADP = Adenosindiphosphat, COX = Cyclooxygenase, PAF = plättchenaktivierender Faktor, TXA<sub>2</sub> = Thromboxan A<sub>2</sub>)

asymptomatischen ventrikulären Pausen und Dyspnoe (CANNON et al., 2007; WALLENTIN et al., 2009). Im Tierversuch wurde Ticagrelor u. a. erfolgreich in der Ratte (DAI et al., 2009), in der Maus (PATIL et al., 2010) und im Hund (WANG et al., 2010) angewendet. Bislang sind noch keine Studien zur Wirkung von Ticagrelor im Wiederkäuer veröffentlicht.

### 2.3.4.2 Enoxaparin-Natrium

Der Anti-Faktor Xa (Anti-FXa) Hemmer Enoxaparin-Natrium gehört zur Gruppe der niedermolekularen Heparine (NMH) (mittleres Molekulargewicht 4 000–6 500 d (HIRSH & LEVINE, 1992)), die aus unfraktioniertem Heparin (UFH) über eine chemische oder enzymatische Depolymerisierung gewonnen werden (OFOSU & BARROWCLIFFE, 1990). Vergleichbar zu UFH wirken NMH über die Aktivierung von AT III über eine Pentasaccharidgruppe (Abbildung 9). Der Heparin-AT III Komplex hemmt vor allem die Faktoren IIa und Xa (HIRSH et al., 2001). Je kleiner die Moleküle desto weniger können sie die Faktor IIa Aktivität hemmen. NMH besitzen ein Anti-FXa : IIa Verhältnis von ca. 4 : 1 – 2 : 1, UFH im Gegensatz dazu ein Verhältnis von 1 : 1 (HIRSH & LEVINE, 1992). Nach subkutaner Applikation von Enoxaparin-Natrium werden im Menschen nach ca. 4 Stunden Plasmaspitzen Spiegel erreicht. Für therapeutische Indikationen (z. B. Therapie tiefer Venenthrombosen/instabiler Angina pectoris) wird eine subkutane Gabe von 1 mg/kg zweimal täglich empfohlen (FACHINFORMATION CLEXANE® MULTIDOSE 100 MG/ML, 2010).

In vielen tierexperimentellen Studien wird Heparin zur Prophylaxe thromboembolischer Ereignisse verwendet. Bedingt durch Erfahrungen hoher interindividueller Unterschiede im Schaf bezüglich des Ansprechens auf UFH wird vor Beginn der Therapie ein

Sensitivitätstest sowie die Bestimmung der Thrombozytenzahl, aufgrund einer möglichen Heparin-induzierten Thrombozytopenie, empfohlen (PARK et al., 2003; BONI et al., 2012). Der kurzzeitige Effekt macht eine Applikation alle 4 Stunden notwendig (PARK et al., 2003). In humanmedizinischen Studien haben sich NMH durch eine längere Plasmahalbwertszeit, eine höhere Wirksamkeit ohne die Erhöhung von klinisch relevanten Blutungskomplikationen ausgezeichnet und zeigen in gewichtsadaptierten Dosierungen eine deutliche Reduktion in der Wirkungsvariabilität (HIRSH et al., 1995). Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen zur Wirkung von NMH im Schaf, die sich hauptsächlich auf die Hemmung der Intimahyperplasie konzentrieren (AO et al., 1999; FLETCHER et al., 2004). In der Humanmedizin ist bekannt, dass Neugeborene höhere Dosierungen benötigen, um eine ausreichend hohe Anti-FXa Aktivität zu induzieren (MERKEL et al., 2006). Auch im Tiermodell Schwein wurde in juvenilen Tieren eine geringere Halbwertszeit von NMH festgestellt als in adulten Tieren (ANDREW et al., 1989). Studien über die Wirksamkeit von NMH im Lamm sind nicht beschrieben.

### 2.3.4.3 Dabigatranetexilat

Eine Langzeitthromboembolieprophylaxe mit parenteral zu verabreichenden Antikoagulanzen ist häufig impraktikabel und unangenehm für die Patienten. Eine Alternative stellt die orale Antikoagulation dar, die in den letzten Jahrzehnten hauptsächlich auf oralen Vitamin K Antagonisten basierte (WEITZ, 2012). Vitamin K wird für die gamma-Carboxylierung von bestimmten Gerinnungsfaktoren und damit für ihre Aktivierung benötigt (CHOONARA et al., 1988). Es kommt somit zur indirekten Hemmung des extrinsischen und intrinsischen Systems sowie zur Hemmung der Initiierung und Amplifizierung der Blutgerinnung (WEITZ, 2012). Jedoch ist die Antikoagulation mit einer Reihe von Nachteilen verbunden, wie z. B. möglichen Arzneimittelinteraktionen, einer geringen therapeutischen Breite, der individuellen unterschiedlichen Ansprechbarkeit sowie einer möglichen Wechselwirkung mit Nahrungsmitteln und einer schwierigen Wirkungskontrolle (ANSELL et al., 2004).

Aufgrund dessen wurden in den letzten Jahren neue orale Antikoagulanzen entwickelt, die sich z. B. in der Behandlung von Vorhofflimmern als überlegen erwiesen haben (MILLER et al., 2012). Der direkte Thrombininhibitor Dabigatranetexilat wird nach oraler Aufnahme durch unspezifische Esterasen rasch zu Dabigatran hydrolysiert (BLECH et al., 2008), welches an das aktive Zentrum des Thrombinmoleküls bindet und die Wirkung von freiem als auch von fibringebundenem Thrombin hemmt (VAN RYN et al., 2007) (Abbildung 9). Die Bioverfügbarkeit im Menschen wird mit 7,2 % angegeben, Plasmaspitzenpiegel werden bereits nach 1,5 Stunden erreicht (BLECH et al., 2008). Nach der Einnahme von zweimal täglich 150 mg Dabigatranetexilat können im Steady State nach 2 Stunden Plasmaspiegel von 175 ng/ml (117–275 ng/ml im Bereich der 25. bis 75. Perzentile) gemessen werden (FACHINFORMATION PRADAXA® 150 MG HARTKAPSELN,



2012). Die gemeinsame Aufnahme mit einer Mahlzeit verlängert die Zeit bis zum Erreichen der Plasmaspitzenpiegel von 2 auf 4 Stunden (STANGIER et al., 2005). Die mittlere Halbwertszeit beträgt nach einmaliger Einnahme ca. 8 Stunden, nach mehreren Dosen 12–14 Stunden (HANKEY & EIKELBOOM, 2011). Aufgrund der geringen Bindung von Dabigatranetexilat an Plasmaproteine und der vom Cytochrom P450 weitestgehend unabhängigen Metabolisierung, lassen sich mögliche Arzneimittelinteraktionen größtenteils ausschließen (BLECH et al., 2008). Seine vorhersehbaren pharmakodynamischen Wirkungen machten es möglich, in der Humanmedizin feste Dosierungen ohne die Notwendigkeit einer Überwachung bzw. Dosisanpassung zu etablieren (VAN RYN et al., 2010). Die gute Wirksamkeit von Dabigatranetexilat und die Möglichkeit der Therapieumstellung von Enoxaparin-Natrium auf Dabigatranetexilat wurden bereits in mehreren Studien bestätigt (CLEMENS et al., 2012). Nachteile sind u. a. mögliche Interaktionen mit anderen Substraten des P-Glykoprotein-Transporters, das Fehlen eines Antidots sowie die Akkumulation in Patienten mit Nierenfunktionsstörungen (HANKEY & EIKELBOOM, 2011). Im Tierversuch konnte Dabigatranetexilat erfolgreich im Schwein (SCHOMBURG et al., 2012), im Kaninchen (WIENEN et al., 2007b) und in der Ratte (WIENEN et al., 2007a) eingesetzt werden. Über die Wirkung von Dabigatranetexilat im Schafmodell gibt es bislang keine Studien.

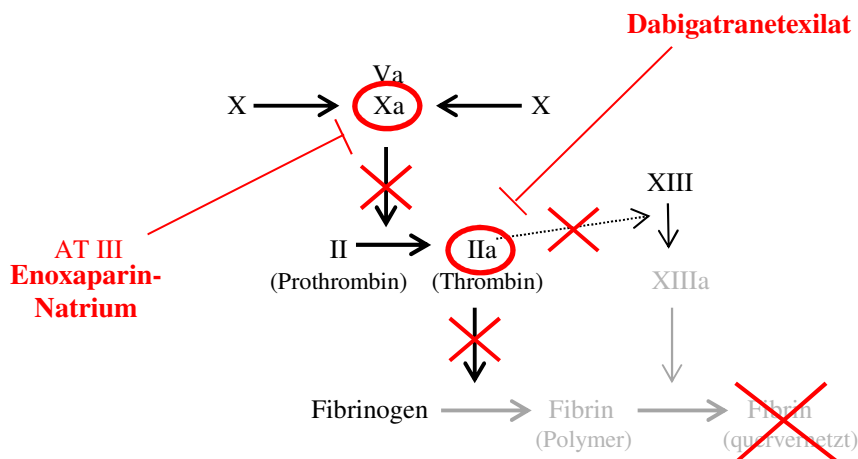


Abbildung 9: Vereinfachtes Schema zur Wirkungsweise der in dieser Studie verwendeten Antikoaganzien Enoxaparin-Natrium und Dabigatranetexilat

(AT III = Antithrombin III)

### 2.3.5 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Generierung von *de novo* gebildetem vaskularisiertem Knochengewebe in klinisch relevanten Dimensionen basierend auf einem mikrochirurgischen Tissue Engineering Ansatz. Dieses Versuchsmodell erfordert den Einsatz eines Großtieres, wie z. B. des Schafes, und setzt zur Verhinderung von thromboembolischen Ereignissen und dem damit verbundenen vorzeitigen Ausschluss aus dem Versuch eine optimale Gerinnungshemmung voraus.

Der erste Abschnitt der Studie verfolgt die Etablierung eines effektiven antikoagulatorischen bzw. thrombozytenaggregationshemmenden Therapieregimes im Schaf zur Anwendung in der experimentellen Forschung. Die Ergebnisse sind nicht nur von grundlegender Bedeutung für den zweiten Abschnitt der Arbeit, sondern können auch weiteren Forschungsgruppen zu einer Optimierung der Bedingungen bei Verwendung des Schafes als Versuchstier dienen. Es soll ein wirkungsvolles Protokoll zur Vermeidung von Gefäßverschlüssen im Schaf bereitgestellt werden und damit ein wichtiger Beitrag zur Reduzierung von unnötig hohen Versuchstierausfällen bedingt durch thromboembolische Ereignisse geleistet werden.

Der zweite Abschnitt wird durchgeführt, um die bislang limitierten Therapieoptionen zur Behandlung von ausgedehnten Knochendefekten zu verbessern, so dass die Nachteile vieler konventioneller Behandlungsverfahren nicht länger in Kauf genommen werden müssen. Im subkutanen Schafmodell sollen optimale Zell- und Wachstumsfaktorzusätze für das primär stabile Knochenaufbaumaterial NanoBone® Block für die Generierung eines vaskularisierten und knochendurchbauten Konstruktes ermittelt werden. Durch die Evaluierung des NanoBone® Blockes im AV-loop Modell des Schafes soll erforscht werden, ob dieser Knochenersatzstoff durch die mikrochirurgisch angelegte Gefäßschleife optimal vaskularisiert werden kann.

Das übergeordnete Ziel besteht darin zu überprüfen, ob mittels NanoBone® Block und unter Zugabe von osteogenen Zellen sowie Wachstumsfaktoren ein primär stabiles axial vaskularisiertes Knochenersatzgewebe gezüchtet werden kann, welches sich für den Transfer in einen Knochendefekt kritischer Größe eignet.

## **3 Material und Methoden**

### **3.1 Versuchstiere**

#### **3.1.1 Art, Rasse und Herkunft**

Für alle Versuche wurden weibliche Merinolandschafe verwendet, die von einem lokalen Schäfer bezogen wurden. Für die Versuche zur Gerinnungshemmung wurden weibliche Merinolandschafe ( $n = 5$ ) im Alter von 1 ½ Jahren mit einem Körpergewicht von 60–70 kg sowie weibliche Merinolämmer ( $n = 5$ ) im Alter von 4–5 Monaten mit einem Körpergewicht von 25–30 kg verwendet. Für die Etablierung von Referenzwerten für die Thrombozytenaggregometrie wurde Blut von gesunden, unbehandelten weiblichen Merinolandschafen aus einer Schafherde von einem lokalen Schäfer genommen ( $n = 20$ ) (Az. 54.2532.2-2/11).

Die Versuche zum Knochen Tissue Engineering wurden an weiblichen Merinolämmern ( $n = 15$ ) im Alter von 4–5 Monaten mit einem Körpergewicht von 25–35 kg durchgeführt. Alle Versuche wurden von der Regierung Mittelfranken genehmigt (Az. 54-2532.1-44/11).

#### **3.1.2 Haltungssystem**

Die Tiere wurden für die Dauer der Versuche in der Forschungseinrichtung Franz-Penzoldt-Zentrum der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg untergebracht. Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen bei 55 % Luftfeuchtigkeit und 18 °C Raumtemperatur mit einer Belichtung, die einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus entspricht. Die Schafe wurden in 5,2 m<sup>2</sup> großen Boxen in Kleingruppen (gewichtabhängig 2–5 Schafe pro Box) auf Stroheinstreu gehalten. Wenigstens fünfmal wöchentlich erhielten die Schafe für mehrere Stunden Auslauf in einem ca. 100 m<sup>2</sup> großen Gehege. Die Tiere bekamen einmal täglich rationiert Kraftfutter für Schafe (ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) sowie Heu und Wasser ad libitum.

Neuzugänge wurden bei Ankunft einer Allgemeinuntersuchung unterzogen und nachfolgend für mindestens 2 Wochen in räumlich abgetrennten Boxen unter Quarantäne gestellt, um erkrankte Tiere rechtzeitig zu erkennen und eine Krankheitsübertragung auf bereits im Versuch stehende Tiere zu verhindern. Alle 3–4 Monate sowie nach parasitärer positiver Kotuntersuchung erfolgte eine Entwurmung gegen Endo- und Ektoparasiten. Die Schafe erhielten eine Klauenpflege, die alle 6–8 Wochen wiederholt wurde sowie eine Schur im Frühjahr bzw. Sommer.

## 3.2 Versuche zur Gerinnungshemmung

### 3.2.1 Diagnostik

#### 3.2.1.1 Verwendetes Material

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Medikamente, Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Versuche zur Gerinnungshemmung

Chemikalien, Medikamente	Hersteller
Acetonitril hypergrade für LC-MS	Merck KGaA, Darmstadt, D
Acetylsalicylsäure i. v., Aspirin <sup>®</sup> i. v. 500 mg	Bayer Vital GmbH/Bayer AG, Leverkusen, D
Acetylsalicylsäure p. o., Godamed <sup>®</sup> 500	Dr. R. Pfleger Chemische Fabrik GmbH, Bamberg, D
Agonisten für LTA	möLab GmbH, Langenfeld, D
Agonisten für Multiplate <sup>®</sup>	Dynabyte Informationssysteme GmbH, München, D
Anti-FXa Bestimmung Reagenzien: Coamatic <sup>®</sup> Heparin Kalibrationsplasma LMW H 1–3 Kontrollplasma LMW H Low und High	Chromogenix, Mailand, I
aqua ad injectabilia	Bayer Vital GmbH/Bayer AG, Leverkusen, D
Clopidogrel, Plavix <sup>®</sup> 75 mg Filmtabletten	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, D
Clopidogrelcarbonsäure, Clopidogrel-d3 Hydrogensulfat	Bertin Pharma, Montigny-le-Bretonneux, F
Clopidogrelhydrogensulfat	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Dabigatranetexilat, Pradaxa <sup>®</sup> 150 mg Hartkapseln	Boehringer Ingelheim International GmbH, Ingelheim am Rhein, D
Enoxaparin-Natrium, Clexane <sup>®</sup> multidose 100 mg/ml	Sanofi-Aventis/Sanofi S. A., Paris, F
Hemoclot <sup>®</sup> Thrombininhibitor Assay, Dabigatran Kalibrationsplasma 1–3, Dabigatran Kontrollplasma	Hyphen BioMed, Neuville-sur-Oise, F
Natriumchloridlösung, 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Procainlösung, 2,0 %	Steigerwald Arzneimittel GmbH, Darmstadt, D
Ticagrelor, Brilique <sup>™</sup> 90 mg Filmtabletten	AstraZeneca, London, GB
Verdünnungspuffer, STA Diluent Buffer	Diagnostica Stago S. A. S., Asnières sur Seine, F

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Blutmischpipette nach Thoma	Karl Hecht GmbH & Co. KG „Assistent“, Sondheim/Rhön, D
Magnetrührer (plastikbeschichtet, micro)	Bio/Data Corporation, Horsham, USA
Reaktionsgefäß, 2 ml, Safe-lock	Eppendorf AG, Hamburg, D
Sarstedt Monovette®: 3,13 % Citrat/ Kalium-EDTA/r-Hirudin	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
Spritze (BD Discardit™ II)	Becten Dickinson, Franklin Lakes, USA
Surgicutt Adult	International Technidyne Corporation, Edison, USA
Teströhrchen für LTA (micro)	Bio/Data Corporation, Horsham, USA
Venenverweilkanüle Blutabnahme: Introcan® Safety i. v. Gabe ASS: Vasofix® Safety	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Geräte	Hersteller
Aggregometer, Platelet Aggregation Profiler®, PAP-8E	Bio/Data Corporation, Horsham, USA
Agilent 1 100 HPLC System	Agilent Technologies, Waldbronn, D
Blutdruckmanschette, SoftCheck free Neonatal mit Druckmesser boso-classic	CAS Medical Systems, Inc., Branford, USA Bosch + Sohn GmbH & Co. KG, Jungingen, D
HPLC-MS/MS System, API 4 000	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Koagulometer, STA-R Evolution®	Roche Diagnostics/Roche, Basel, CH
Mikro-Pipettierhelfer	Karl Hecht GmbH & Co. KG „Assistent“, Sondheim/Rhön, D
Multiplate® Analyzer	Dynabyte Informationssysteme GmbH, München, D
Phasenkontrastmikroskop	Nikon Eclipse 50i, Nikon Corporation, Tokio, J
Schüttler für 8 Blutmischpipetten, Vibrator 338	Karl Hecht GmbH & Co. KG „Assistent“, Sondheim/Rhön, D
Zentrifuge, Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

### 3.2.1.2 Impedanzaggregometrie (Multiplate®)

#### Prinzip

Zur Bestimmung der Thrombozytenaggregation im Schaf wurde das impedanzaggregometrische Verfahren mit dem Multiplate® Analyzer getestet. Es handelt sich bei dieser Methode um eine Weiterentwicklung der Impedanzaggregometrie nach Cardinal und Flower (CARDINAL & FLOWER, 1979), bei der die Thrombozytenaggregation im Vollblut gemessen wird. Dieses System basiert auf vier parallel angeordneten

Sensordrähten, bei dem jeweils zwei eine Einheit bilden. Nach Stimulation der Thrombozyten durch proaggregatorische Substanzen (Agonisten) kommt es zur Konformationsänderung von Oberflächenrezeptoren und Freilegung von Ligandenbindungsstellen, woraufhin eine Reihe von spezifischen Reaktionen (Adhäsion, Formänderung, Sekretion, Aggregation) ausgelöst wird. Die Thrombozyten heften sich an die Sensordrähte und induzieren dadurch eine Widerstandserhöhung. Diese wird kontinuierlich gegen die Zeit aufgetragen und ist ein Maß für das Aggregationspotenzial der Thrombozyten.

### **Durchführung**

Die Blutabnahme erfolgte nach Scheren und lokaler Desinfektion über die Vena jugularis nach geringer Stauung mit einer großlumigen Venenverweilkanüle (14-gauge), um Verwirbelungen und eine dadurch induzierte Aktivierung der Thrombozyten zu verhindern. Nach Verwerfen der ersten Milliliter wurde das Blut in einer 5 ml Spritze aufgenommen und umgehend in 2,6 ml Hirudin-Monovetten gefüllt. Eine Vermischung von Antikoagulans und Blut erfolgte durch vorsichtiges Schwenken des Röhrchens. Aufgrund des refraktären Zustandes der Thrombozyten unmittelbar nach Blutentnahme wurden die Proben vor Beginn der Messung für 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert. 300 µl einer auf 37 °C vorgewärmten Natriumchloridlösung (0,9 %) wurden bei 37 °C mit 300 µl Blut für 180 Sekunden gemischt. Durch die Zugabe von 20 µl des jeweiligen Agonisten wurde die Reaktion gestartet und die Thrombozytenaggregation für 6 Minuten aufgezeichnet. Verwendete proaggregatorische Reagenzien umfassen Adenosindiphosphat (ADP) (Endkonzentration 6,5 µM), thrombin receptor-activating peptide 6 (TRAP-6) (Endkonzentration 32 µM und 320 µM) und Arachidonsäure (arachidonic acid, AA) (Endkonzentration 0,5 mM und 6,56 mM). Alle Messungen erfolgten innerhalb von 2 Stunden nach der Blutabnahme.

### **3.2.1.3 Lichttransmissionsaggregometrie**

#### **Prinzip**

Als zweites Verfahren wurde der aktuelle Goldstandard, die Lichttransmissions-aggregometrie (LTA) nach Born (BORN, 1962), verwendet. Es handelt sich um ein photometrisches Messprinzip, mit welchem die Lichtdurchlässigkeit im plättchenreichen Plasma (platelet rich plasma, PRP) bestimmt werden kann. Vergleichbar zum Multiplate<sup>®</sup> System aktivieren zugegebene aggregationsauslösende Induktoren die Thrombozyten durch die Bindung an Thrombozytenrezeptoren. Infolge der Plättchenaggregatbildung kommt es zu einer Abnahme der optischen Dichte in der Probe. Während der Messung wird die Änderung der optischen Dichte (Aggregationskurve) kontinuierlich von einem Schreiber geräteintern mit einer Geschwindigkeit von 25 mm/min aufgezeichnet. Vor Zugabe der Agonisten wird in Referenzküvetten die Lichtdurchlässigkeit im

plättchenarmen Plasma (platelet poor plasma, PPP) sowie im PRP bestimmt und auf 0 % (0 % optische Übertragung) bzw. 100 % (100 % optische Übertragung) Basislinie gesetzt.

### **Durchführung**

Die Blutabnahme und Handhabung der Blutröhrchen erfolgten wie bereits beschrieben (3.2.1.2 Impedanzaggregometrie (Multiplate<sup>®</sup>)) mit dem Unterschied der Verwendung von 10 ml Citrat-Monovetten und 2,7 ml Kalium-EDTA-Monovetten (ethylenediaminetetraacetic acid, Ethylendiamintetraessigsäure). Für die PRP Herstellung wurde das Blut bei 60 x g für 70 Minuten zentrifugiert und der mit Thrombozyten angereicherte Überstand abpipettiert. Die PPP Gewinnung erfolgte über die Zentrifugation des Rückstandes bei 3 200 x g für 20 Minuten. Die Thrombozytenzahl wurde mittels manueller Methode bestimmt (s. u.) und durch Verdünnung mit PPP auf 150 000–250 000/μl eingestellt. Alle Messungen wurden an einem 8-Kanal-Aggregometer durchgeführt. Nach Vorinkubation von 225 μl PRP in silikonisierten Teströhrchen mit einem Magnetrührer für eine Minute bei 37 °C wurden 25 μl der jeweiligen Agonisten zugegeben. Der Magnetrührer (1 200 rpm) setzte zum einen die Thrombozyten unter kontinuierliche Scherspannung und sorgte zum anderen für eine permanente Durchmischung der Probe. Zugesezte Agonisten waren Kollagen (collagen, col) (Endkonzentration 0,19 mg/ml), ADP (Endkonzentration  $2 \times 10^{-2}$  mM) und AA (Endkonzentration 1,64 mM und 10,93 mM). Das Ausmaß der induzierten Thrombozytenaggregation wurde photometrisch gemessen. Die nach 10 Minuten erreichte prozentual angegebene Aggregation (final aggregation, FA) wurde für alle weiteren statistischen Analysen verwendet. Alle Messungen fanden innerhalb von 4 Stunden nach Blutentnahme statt.

### **Bestimmung der Thrombozytenzahl im PRP und Blut**

Die Bestimmung der Thrombozytenzahl im PRP bzw. im EDTA-Blut erfolgte mit manueller Methode. Eine Blutmischpipette nach Thoma für Erythrozyten wurde mittels eines Mikro-Pipettierhelfers bis zur Marke 1 mit PRP bzw. EDTA-Blut gefüllt. Durch Zugabe einer 2%igen Procainlösung bis zur Markierung 101 ergab sich eine Verdünnung von 1 : 100. Nachfolgend wurde die Blutmischpipette für 5 Minuten auf einen Schüttler gelegt und anschließend für weitere 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dadurch kam es zu einer Quellung der Thrombozyten sowie im Falle der Verwendung von EDTA-Blut zur Lyse der Erythrozyten. Nach Befüllung einer Neubauerzählkammer wurde diese für 5–10 Minuten in eine feuchte Kammer gelegt (Sedimentation der Thrombozyten) und anschließend fünf Gruppenquadrate bei 400facher Vergrößerung in einem Phasenkontrastmikroskop ausgezählt. Das Zählergebnis, multipliziert mit dem Faktor 5 000, entsprach der Thrombozytenzahl pro Mikroliter (3.1).

$$\begin{aligned}
 &\text{ausgezähltes Volumen pro Gruppenquadrat: } 0,2 \times 0,2 \times 0,1 \text{ mm}^3 = 0,004 \text{ }\mu\text{l} \\
 &\text{ausgezähltes Volumen in 5 Gruppenquadraten: } 5 \times 0,004 \text{ }\mu\text{l} = 0,02 \text{ }\mu\text{l} \\
 &\text{Thrombozytenzahl}/\mu\text{l: Zählergebnis} \times 100/0,02 = \text{Zählergebnis} \times 5\,000
 \end{aligned}
 \tag{3.1}$$

### 3.2.1.4 Referenzwerte für die aggregometrischen Untersuchungen

Um die Wirksamkeit der thrombozytenaggregationshemmenden Medikamente festzustellen, wurden Referenzwerte von unbehandelten, gesunden weiblichen Merinolandschafen ( $n = 20$ ) erhoben. Die Blutabnahme sowie Analyse erfolgten wie bereits beschrieben (3.2.1.3 Lichttransmissionsaggregometrie). Dadurch war es möglich, das natürliche Aggregationspotenzial der Thrombozyten nach Stimulation mit aggregationsinduzierenden Reagenzien zu messen. Unter Verwendung dieser Referenzwerte wurden Cut-off Werte (Toleranzwerte) für die einzelnen Agonisten berechnet (3.2). Bei Hemmung der Thrombozytenaggregation unterhalb dieser Werte wurde das jeweilige Medikament als wirksam eingestuft.

$$\text{Cut-off (\%)} = \text{Mittelwert} - \text{Standardabweichung} - \text{Standardabweichung}
 \tag{3.2}$$

### 3.2.1.5 Clopidogrel- und Clopidogrelcarbonsäurekonzentration im Blutplasma

#### Durchführung

Die Blutabnahme und Handhabung der Blutröhrchen erfolgten wie bereits beschrieben (3.2.1.2 Impedanzaggregometrie (Multiplate<sup>®</sup>)) mit dem Unterschied der Verwendung von 7,5 ml Kalium-EDTA-Monovetten. Umgehend nach Schwenken der Proben wurden diese auf Eis gelagert und nachfolgend bei  $3\,400 \times g$  für 10 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wurde abgenommen und in je drei sterile 2 ml Reaktionsgefäße pipettiert und sofort auf Trockeneis gestellt. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur Analyse bei  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### Analyse

Die Bestimmung von Clopidogrel und dem Metaboliten Clopidogrelcarbonsäure wurde in Kooperation mit Frau Dr. Maren Mieth (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Erlangen-Nürnberg) durchgeführt und erfolgte in Anlehnung an eine publizierte Methode für die Bestimmung in humanem Plasma (SILVESTRO et al., 2011). Die Analyse wurde mittels HPLC-MS/MS System (high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Tandem-Massenspektrometrie) vorgenommen. Es handelt sich bei dieser Methode um eine Kopplung der analytischen HPLC und der Massenspektrometrie. Die Probe wird anfangs chromatographisch aufgetrennt und nachfolgend ihre Zusammensetzung mittels Massenspektrometer identifiziert und quantifiziert.



100 µl der Schafplasmaprobe wurden durch die Zugabe von 100 µl interner Standardlösung (10 ng/ml Clopidogrel-d3 in Acetonitril) und 110 µl Acetonitril ausgefällt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand in ein Autosampler Vial übertragen und 10 µl in das HPLC-MS/MS System gegeben, welches mit einem Agilent 1100 HPLC System ausgestattet war. Die Probenaufarbeitung erfolgte unter gekühlten Bedingungen.

Die Massenübergänge und Kollisionsenergien waren für Clopidogrel  $m/z$  321,9  $\rightarrow$  212,2 (23 eV), für Clopidogrel-d3  $m/z$  327,1  $\rightarrow$  217,3 (23 eV) und für Clopidogrelcarbonsäure  $m/z$  308,2  $\rightarrow$  113,1 (59 eV).

Kalibrationsplasmen wurden in folgenden Konzentrationen hergestellt: Clopidogrel: 200, 300, 400, 450, 900, 1 800, 3 600 pg/ml; Clopidogrelcarbonsäure: 100, 200, 300, 400, 450, 900, 1 800, 3 600 ng/ml. Für die Kontrolle dienten folgende Konzentrationen: Clopidogrel: 200, 300, 1 800, 3 600 pg/ml; Clopidogrelcarbonsäure: 100, 200, 300, 1 800, 3 600 ng/ml.

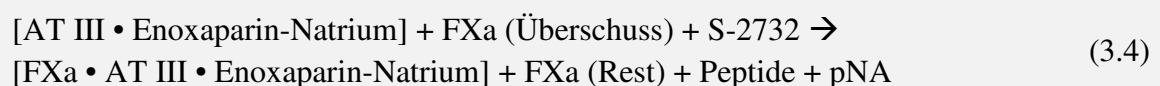
### 3.2.1.6 Blutungszeit

Zur Bestimmung der Blutungszeit (BZ) wurden die Schafe in Sitzposition fixiert und der ventrale Bereich des Schwanzansatzes gereinigt und desinfiziert. Eine Blutdruckmanschette wurde um die Schwanzwurzel gelegt und auf einen Druck von 40 mmHg aufgepumpt. Nach dem Setzen eines 5 mm langen und 1 mm tiefen Schnittes auf der Hautoberfläche mittels Surgicutt Adult, wurde eine Stoppuhr gestartet. Alle 30 Sekunden erfolgte die Aufnahme des austretenden Blutes mit einem Filterpapier, ohne dabei den sich bildenden Thrombus zu zerstören. Als BZ wurde die Zeitspanne bis zum Sistieren der Blutung bezeichnet. Alle Bestimmungen wurden verblindet von derselben Person durchgeführt.

### 3.2.1.7 Anti-Faktor Xa Bestimmung

#### Prinzip

Grundlage für dieses Messprinzip sind zwei Reaktionen, die kompetitiv ablaufen. Der zum Plasma zugegebene Faktor Xa (FXa) wird durch den physiologisch gebildeten Antithrombin (AT) III–Enoxaparin-Natrium Komplex inhibiert (3.3), während freier FXa vom chromogenen Substrat (S-2732) p-Nitroanilin (pNA) abspaltet und eine Änderung der Absorption induziert (3.4). Die Absorptionsänderung wird gemessen und verhält sich umgekehrt proportional zur Enoxaparin-Natrium Konzentration im Blut.



### **Durchführung**

Die Blutabnahme und Handhabung der Blutröhrchen erfolgten wie bereits beschrieben (3.2.1.2 Impedanzaggregometrie (Multiplate®)) mit dem Unterschied der Verwendung von 3 ml Citrat-Monovetten. Nach Zentrifugation bei 2 200 x g für 10 Minuten wurde im gewonnenen Plasma die Anti-FXa Aktivität bestimmt. Dem verdünnten Plasma (1 : 2 in Verdünnungspuffer) wurden 50 µl entnommen, mit 100 µl des chromogenen Substrates S-2732 (Suc-Ile-Glu[y-pip]-Gly-Arg-pNA HCl lyophilisiert mit Detergens und Mannitol als Trägersubstanz) für eine Minute inkubiert und anschließend 125 µl FXa (lyophilisierter FXa vom Rind, Trispuffer, EDTA, Natriumchlorid, Dextransulfat und Rinder Serumalbumin) zugegeben. Die Absorptionsänderung wurde bei 405 nm im STA-R Evolution® Koagulometer gemessen. Die Messungen fanden innerhalb von einer Stunde nach Blutentnahme statt, anderenfalls wurden die Proben bei -20 °C für maximal 24 Stunden eingefroren. Allen Standards bzw. Kontrollen lagen kommerziell erhältliche Kalibrations- bzw. Kontrollplasmen zugrunde.

### **3.2.1.8 Dabigatrankonzentration im Blutplasma**

#### **Prinzip**

Die Dabigatranbestimmung im Blutplasma wurde mittels des Hemoclot® Thrombininhibitor Assays vorgenommen. Es handelt sich um einen von der Thrombinzeit abgeleiteten Test mittels dem Thrombininhibitoren quantitativ im Citratplasma bestimmt werden können. Nach Zugabe einer bestimmten Menge von humanem, gepooltem Normalplasma zu der zu untersuchenden Probe wird zur Auslösung der Gerinnung eine konstante Menge von humanem, hochgereinigtem Thrombin ( $\alpha$ -Form) zugesetzt. Aufgrund einer direkten Proportionalität lässt sich die Konzentration der Thrombininhibitoren im Probenplasma mit der bis zur Bildung eines Gerinnsels gemessenen Zeit berechnen.

#### **Durchführung**

Die Plasmagewinnung erfolgte wie bereits beschrieben (3.2.1.7 Anti-Faktor Xa Bestimmung). Zur Vorbereitung auf den Test wurde das zu untersuchende Probenplasma 1 : 8 in Verdünnungspuffer verdünnt. Es folgte die Inkubation von 100 µl Thrombin (Reagenz 2) bei 37 °C. In ein auf 37 °C vorgewärmtes Teströhrchen wurden 100 µl Normalplasma (Reagenz 1) und 50 µl des verdünnten Probenplasmas gegeben und für eine Minute bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl des auf 37 °C erwärmten Thrombins (Reagenz 2) wurde der Test gestartet und die Gerinnungszeit im STA-R Evolution® Koagulometer gemessen. Die Messungen fanden innerhalb von einer Stunde nach Blutentnahme statt, anderenfalls wurden die Proben bei -20 °C für maximal 24 Stunden eingefroren. Allen Standards bzw. Kontrollen lagen kommerziell erhältliche Kalibrations- bzw. Kontrollplasmen zugrunde.

### 3.2.2 Versuchsgruppen – Gerinnungshemmung

Eine Gruppe von Merinolandschafen ( $n = 5$ ) wurde jeweils über 7 Tage nacheinander mit verschiedenen Thrombozytenaggregationshemmern und Antikoagulanzen in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt (Acetylsalicylsäure, ASS [Gruppe 1a–b], Clopidogrel [Gruppe 2a–c], Ticagrelor [Gruppe 3a–d], Enoxaparin-Natrium [Gruppe 4a–b], Dabigatranetexilat [Gruppe 5]).

Eine Gruppe von Merinolämmern ( $n = 5$ ) wurde nacheinander mit Clopidogrel über 28 Tage (Gruppe 2d) und mit Enoxaparin-Natrium über 28 Tage in einer niedrigen (Gruppe 4c) sowie über 7 Tage in einer hohen Dosierung (Gruppe 4d) behandelt (Tabelle 3). Zwischen den einzelnen Behandlungszeiträumen wurden 14 Tage keine Medikamente appliziert, um jeweils dieselben Voraussetzungen zu gewährleisten.

#### Versuchsgruppe 1: Thrombozytenaggregationshemmer Acetylsalicylsäure

*In vivo* Versuche (Gruppe 1a–b):

Die Schafe ( $n = 5$ ) wurden zweimal täglich (*bid* = *bis in die*, lat.) mit 500 mg (7,14–8,33 mg/kg) ASS *per os* (p. o.) behandelt (Gruppe 1a). Dafür wurden die Tabletten in Wasser aufgelöst und den Tieren mittels einer 10 ml Spritze p. o. verabreicht. In Gruppe 1b erhielten die Schafe ( $n = 5$ ) 500 mg (7,14–8,33 mg/kg) ASS *intravenös* (i. v.) *bid* über die Vena auricularis mittels eines peripheren Venenkatheters (18-gauge). Nach Injektion erfolgte eine Nachspülung mit mindestens 5 ml isotonomischer 0,9%iger Natriumchloridlösung. Der periphere Venenkatheter wurde alle 2–3 Tage oder im Falle von Anzeichen einer Infektion oder Dislozierung erneuert.

*In vitro* Versuche (Gruppe 1c):

Um die aggregationshemmende Wirkung von ASS auf Schafthrombozyten zu überprüfen und die effektivste Dosis zu evaluieren, wurden *in vitro* Versuche durchgeführt. Hierfür wurde Blut von unbehandelten, gesunden, weiblichen Merinolandschafen ( $n = 3$ ) verwendet. Die Blutabnahme sowie die PRP und PPP Herstellung erfolgten wie bereits beschrieben (3.2.1.3 Lichttransmissionsaggregometrie). Die ASS-Lösung wurde unmittelbar vor den Versuchen durch Auflösen von ASS-Pulver (Aspirin® i. v.) in aqua ad injectabilia hergestellt. Es folgte die Inkubation von 200  $\mu$ l PRP mit 25  $\mu$ l einer 1 mg/ml sowie einer 10 mg/ml konzentrierten ASS-Lösung für 3 Minuten bei 37 °C. Nach Zugabe von 25  $\mu$ l der jeweiligen Agonisten (AA, Endkonzentration 10,93 mM und Kollagen, Endkonzentration 0,19 mg/ml) wurde die LTA gestartet. Als Kontrolle wurde aqua ad injectabilia statt ASS verwendet. Die Erhebung von Referenzwerten erfolgte durch Pipettieren von 25  $\mu$ l der verwendeten Agonisten zu jeweils 225  $\mu$ l PRP.

Zusätzlich wurde dieser Versuch mit einer humanen Blutprobe durchgeführt, die als Positivkontrolle diente (Herstellung PRP: 190 x g, 10 Minuten; Herstellung PPP: 1 950 x g, 20 Minuten).

### **Versuchsgruppe 2: Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel**

Versuche zur Messung der Thrombozytenaggregation:

Die Schafe (n = 5) wurden mit Clopidogrel p. o. bid in drei verschiedenen Dosierungen behandelt: Gruppe 2a: 150 mg (2,14–2,5 mg/kg), Gruppe 2b: 225 mg (3,21–3,75 mg/kg), Gruppe 2c: 375 mg (5,36–6,25 mg/kg). Zusätzlich wurde am Tag 1 eine einmalige Aufsättigungsdosis (loading dose) gegeben (Gruppe 2a: 300 mg [4,29–5,0 mg/kg], Gruppe 2b: 450 mg [6,43–7,5 mg/kg], Gruppe 2c: 600 mg [8,57–10,0 mg/kg]). Um die Übertragbarkeit auf Lämmer (n = 5) zu überprüfen, erhielten diese über 28 Tage 150 mg (5,0–6,0 mg/kg) Clopidogrel p. o. bid beginnend mit einer Aufsättigungsdosis von 300 mg (10,0–12,0 mg/kg) (Gruppe 2d). Für die Applikation wurden die Tabletten mit einem Tablettenmörser zerkleinert, in Wasser aufgelöst und mittels einer 10 ml Spritze p. o. verabreicht.

Versuche zur Konzentrationsbestimmung im Blut:

In Gruppe 2c und d wurden jeweils Clopidogrel- und Clopidogrelcarbonsäurebestimmungen im Blutplasma vorgenommen. Die Untersuchungszeitpunkte entsprachen denen der LTA, bzw. denen der BZ-Bestimmung.

### **Versuchsgruppe 3: Thrombozytenaggregationshemmer Ticagrelor**

Ticagrelor wurde den Schafen (n = 5) in vier verschiedenen Dosierungen p. o. bid verabreicht: Gruppe 3a: 90 mg (1,29–1,5 mg/kg), Gruppe 3b: 180 mg (2,57–3 mg/kg), Gruppe 3c: 360 mg (5,14–6 mg/kg), Gruppe 3d: 540 mg (7,71–9 mg/kg). Am Tag 1 erhielten die Schafe jeweils eine Aufsättigungsdosis (Gruppe 3a: 180 mg [2,57–3 mg/kg], Gruppe 3b: 360 mg [5,14–6 mg/kg], Gruppe 3c: 540 mg [7,71–9 mg/kg], Gruppe 3d: 720 mg [10,29–12 mg/kg]). Für die Applikation wurden die Tabletten mit Hilfe von einem Tablettenmörser zerkleinert, in Wasser aufgelöst und mit einer 10 ml Spritze p. o. verabreicht.

Die Evaluierung der Medikamentenwirkung in den Versuchsgruppen 1–3 erfolgte am Tag 1, 4 und 7. Jeweils 3 Stunden nach Applikation wurden Blutproben für die Untersuchung mittels LTA entnommen sowie die Bestimmung der BZ vorgenommen. Diese Tests wurden in Gruppe 1b am Tag 7 zusätzlich ½ Stunde nach Applikation durchgeführt, um ein mögliches rasches Anfluten der i. v. injizierten ASS zu überprüfen. Für die Evaluierung des Langzeiteffektes von Clopidogrel wurden diese Messungen in Gruppe 2d zusätzlich am Tag 28 3 Stunden nach Gabe durchgeführt. Die Erhebung dieser Parameter zu Beginn von jedem Behandlungsprotokoll diente der Festlegung von Basalwerten.

### **Versuchsgruppe 4: Antikoagulans Enoxaparin-Natrium**

Die Schafe (n = 5) wurden mit dem niedermolekularen Heparin Enoxaparin-Natrium in zwei verschiedenen Dosierungen behandelt. Gruppe 4a erhielt 1 mg/kg subkutan

(subcutan, s. c.) bid sowie am Tag 1 eine Aufsättigungsdosis von 2 mg/kg. Gruppe 4b wurden 3 mg/kg s. c. bid appliziert. Für die Überprüfung der Übertragbarkeit auf jüngere Schafe sowie des Langzeiteffektes wurde eine Gruppe von Lämmern (n = 5) in Gruppe 4c über 28 Tage mit 3 mg/kg und in Gruppe 4d mit 5 mg/kg über 7 Tage s. c. bid behandelt. Die Medikamentenwirkung wurde in jeder Gruppe am Tag 1, 4 und 7, bzw. Tag 28 4 Stunden nach Applikation bestimmt. Eine Verlaufskontrolle mit Blutabnahmen nach 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden nach Gabe wurde am Tag 7 bei 2 Schafen (Gruppe 4b) vorgenommen. Für die Bestimmung von Basalwerten wurde in allen Tieren vor Beginn der Behandlungsprotokolle einmalig die Anti-FXa Aktivität bestimmt.

### Versuchsgruppe 5: Antikoagulans Dabigatranetexilat

Die Schafe (n = 5) erhielten den Thrombininhibitor Dabigatranetexilat in einer Dosierung von 600 mg (8,57–10,0 mg/kg) p. o. bid. Für die orale Applikation wurden die Kapseln jedem Schaf separat mit Kraftfutter verabreicht, so dass ein sicheres Abschlucken der Kapseln überprüft werden konnte. Die Wirksamkeit des Medikaments wurde am Tag 1 (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 Stunden nach Applikation), am Tag 4 (4, 6, 8, 10 Stunden nach Applikation) und am Tag 7 (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 Stunden nach Applikation) bestimmt. Die Erhebung von Basalwerten erfolgte vor Beginn der Medikamentengabe.

Tabelle 3: Übersicht über die Versuchsgruppen

Medikament/ Versuchsgruppe	Alter		Dosis (bid)	Aufsätti- gungs- dosis	Test- verfahren		
	Schaf n =	Lamm n =					
Acetyl- salicyl- säure	1	a	5	500 mg p.o.	LTA/BZ		
		b	5	500 mg i.v.			
		c	3	1 mg/ml 10 mg/ml	<i>in vitro</i>		
Clopidogrel p.o.	2	a	5	150 mg	LTA/BZ		
		b	5	225 mg		LTA/BZ/Plasma- konzentrations- bestimmung	
		c	5	375 mg	600 mg		
		d		5	150 mg	300 mg	
Ticagrelor p.o.	3	a	5	90 mg	LTA/BZ		
		b	5	180 mg		360 mg	
		c	5	360 mg		540 mg	
		d	5	540 mg		720 mg	
Enoxaparin- Natrium s.c.	4	a	5	1 mg/kg	Anti-Faktor Xa Aktivität		
		b	5	3 mg/kg			
		c		5		3 mg/kg	
		d		5		5 mg/kg	
Dabigatran- etexilat p.o.	5	5	600 mg		Thrombininhibitor Assay		

Anmerkungen. bid = bis in die (lat.: zweimal täglich), BZ = Blutungszeit, LTA = Lichttransmissions-  
aggregometrie

### 3.2.3 Statistische Auswertung – Gerinnungshemmung

Alle statistischen Analysen erfolgten mit der Statistiksoftware SPSS (SPSS 18.0, SPSS Inc., IL, USA). Die Änderung der Thrombozytenaggregation, BZ, Clopidogrel- bzw. Clopidogrelmetabolitkonzentration, der Anti-FXa Aktivität sowie der Dabigatrankonzentration im Blutplasma (abhängige Variable) zwischen den einzelnen Messzeitpunkten (Basalwert [Tag 0], Tag 1, 4, 7, 28) (unabhängige Variable, Messwiederholungsfaktor) wurde mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) mit Messwiederholung untersucht. Bei signifikanter ANOVA kam nachfolgend als post-hoc-Test der Bonferroni's Multiple Comparison-Test zur Anwendung. Aufgrund der kleinen Gruppengröße wurde die Normalverteilung mit dem Shapiro Wilk-Test überprüft. Die Kontrolle der Sphärizität erfolgte durch Anwendung des Mauchly-Tests. Aufgrund der geringen Gruppengröße wurde in jedem Fall, auch bei Annahme der Sphärizität, die Greenhouse-Geisser Korrektur angewendet. Waren die Werte nicht normalverteilt, wurde mit dem nicht-parametrischen Friedman-Test geprüft. Bei Signifikanz schlossen sich Mehrfachvergleiche mit dem Wilcoxon-Test mit einem nach Bonferroni korrigierten Signifikanzniveau an ( $\alpha' = \alpha/m$ ;  $\alpha$  = Signifikanzniveau,  $m$  = Anzahl der Vergleiche).

Mittelwertvergleiche zwischen den verschiedenen Altersgruppen bezüglich der Anti-FXa Aktivität, der Thrombozytenaggregationshemmung nach Clopidogrelgabe sowie der Clopidogrel- und Clopidogrelmetabolitkonzentration an den einzelnen Messzeitpunkten wurden mit dem Student's t-Test für unabhängige Stichproben vorgenommen. Die Normalverteilung wurde wie oben beschrieben überprüft, die Varianzhomogenität mittels Levene-Test. Bei nicht normalverteilten Werten erfolgte die Durchführung des nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Tests.

Die statistische Analyse des Einflusses des Alters (Schaf versus Lamm) auf die entsprechenden Werte an den einzelnen Messzeitpunkten wurde bei Vorliegen einer Normalverteilung durch eine zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung vorgenommen.

Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Ein  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant, ein  $p$ -Wert  $\leq 0,01$  als statistisch hochsignifikant angesehen.

In Ergänzung zu der oben beschriebenen statistischen Auswertung wurden die Ergebnisse von Gruppe 1–3 (Thrombozytenaggregationshemmer) zusätzlich qualitativ ausgewertet, indem diese mit den berechneten Cut-off Werten verglichen wurden. Bei einer Thrombozytenaggregation unterhalb dieser Grenzwerte konnte von der Wirksamkeit der applizierten Medikamente ausgegangen werden.

### 3.3 Knochen Tissue Engineering

#### 3.3.1 NanoBone®

Für alle Versuche wurde das vollsynthetische und klinisch zugelassene Knochenaufbaumaterial NanoBone® (ARTOSS GmbH, Rostock, D) in der primär stabilen Blockform verwendet. Für die subkutanen Versuchsgruppen wurde der kommerziell erhältliche NanoBone® Block mit Abmessungen von 15 x 10 x 5 mm verwendet. Um ein größeres Volumen und damit eine bessere Aussagekraft in Vorbereitung auf die AV-loop (arteriovenous loop, arteriovenöse Gefäßschleife) Versuche mit einem wesentlich größeren Block zu erhalten, wurden zwei Blöcke mit einem nicht-resorbierbaren 3-0 Polypropylenfaden (RESORBA Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg, D) aneinander gebunden. Dadurch entstanden Blöcke mit den Abmessungen 15 x 10 x 10 mm und einem Volumen von 1,5 cm<sup>3</sup> (Abbildung 10).

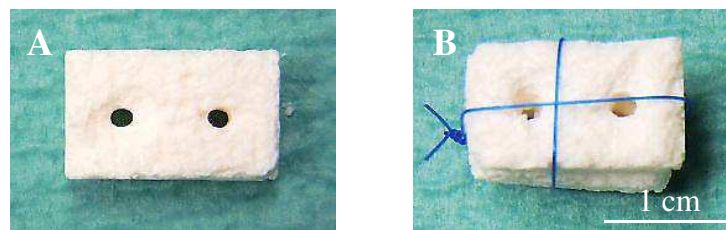


Abbildung 10: NanoBone® Block für die subkutanen Implantationen

Für die subkutanen Implantationen wurden zwei kommerziell erhältliche NanoBone® Blöcke (A) mit einem nicht-resorbierbaren Faden aneinander gebunden (B).

Für die im AV-loop Modell des Schafes bereits etablierte Isolationskammer wurde in Kooperation mit Prof. Gerber (Universität Rostock, Institut für Physik) eine passgenaue Form des NanoBone® Blockes mit einem Volumen von 15 cm<sup>3</sup> angefertigt. Der Block weist vier Quer- und zwei Radiärbohrungen auf, die die Durchdringung mit der Matrix sowie eine verbesserte Gefäßeinsprossung erleichtern sollten. Eine eingefräste Nut dient für die Platzierung der Gefäßschleife (Abbildung 11).

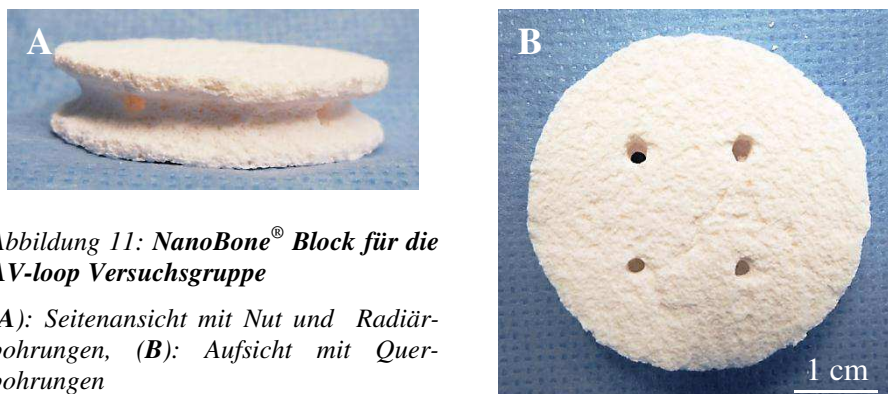


Abbildung 11: NanoBone® Block für die AV-loop Versuchsgruppe

(A): Seitenansicht mit Nut und Radiärbohrungen, (B): Aufsicht mit Querbohrungen

### 3.3.2 Isolationskammer

Für die AV-loop Versuchsgruppe wurde eine für das Schaf AV-loop Modell konstruierte Isolationskammer aus medizinisch getestetem, hitzestabilem Teflon verwendet. Sie wurde bereits für vorausgegangene Studien in Zusammenarbeit mit Prof. Greil (Institut für Werkstoffwissenschaften [Glas und Keramik], Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) entworfen und hergestellt (BOOS et al., 2012) (Abbildung 12). Sie weist einen Außendurchmesser von 6 cm und eine Außenhöhe von maximal 2 cm auf. Der für die Implantation genutzte innere Raum misst im Durchmesser 4 cm sowie in der geringsten Höhe 1,2 cm. Dadurch kann sie ein Volumen von maximal 15,08 cm<sup>3</sup> aufnehmen. Das Gewicht der Kammer beträgt 25 g. Am Außenrand wurden sechs Löcher mittels einer 14-gauge Kanüle für die Befestigung an der Muskelfaszie angebracht. Zusätzlich wurden vier Löcher für die Befestigung des Kammerdeckels am unteren Deckelrand angefertigt.

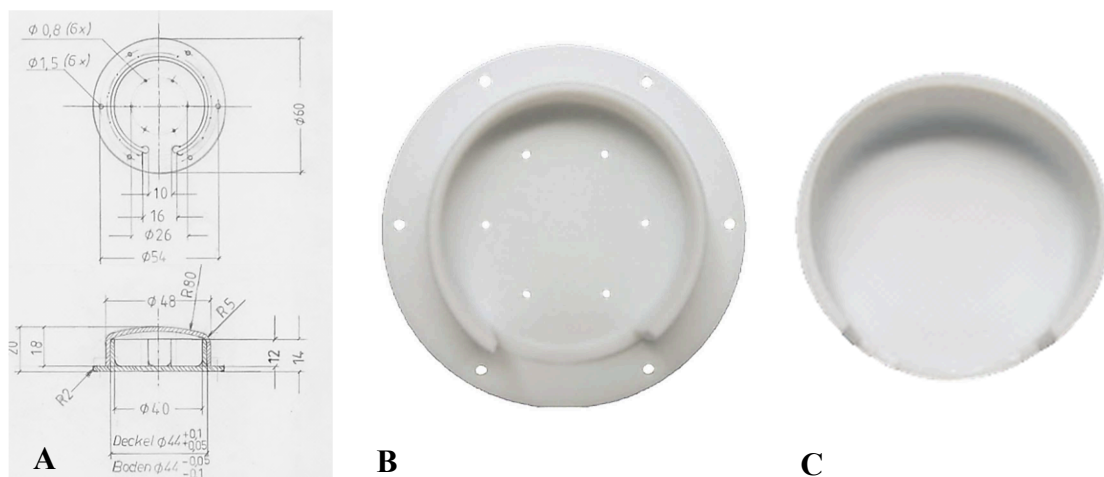


Abbildung 12: Isolationskammer für die AV-loop Versuchsgruppe

(A): Entwurf der Isolationskammer, (B–C): Isolationskammer aus Teflon mit Boden (B) und Deckel (C)



### 3.3.3 Mesenchymale Stammzellen

#### 3.3.3.1 Verwendetes Material

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Medikamente, Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Versuche mit mesenchymalen Stammzellen

Chemikalien, Medikamente	Hersteller
Aluminiumspray, Alu-Spray „trocken“	Pharma Partner Vertriebs-GmbH, Hamburg, D
Carprofen, Rimadyl <sup>®</sup>	Pfizer GmbH, Berlin, D
Cefquinom, Cobactan <sup>®</sup>	Intervet International GmbH, Unterschleißheim, D
DiI, CellTracker <sup>™</sup> CM-DiI	Invitrogen <sup>™</sup> , Life Technologies <sup>™</sup> , Carlsbad, USA
DMEM (1X) + GlutaMAX <sup>™</sup> -I	Gibco <sup>®</sup> , Life Technologies <sup>™</sup> , Carlsbad, USA
DMSO, Hybri Max <sup>™</sup>	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
FBS superior	Biochrom AG, Berlin, D
Hautdesinfektion, Cutasept <sup>®</sup> G	Bode Chemie/Hartmann Gruppe, Heidenheim an der Benz, D
Heparin-Natrium 25 000 ratiopharm <sup>®</sup>	ratiopharm GmbH, Ulm, D
Ketamin, Ketavet <sup>®</sup>	Pharmacia GmbH/Pfizer, Berlin, D
Lymphoprep <sup>™</sup>	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
Midazolam-ratiopharm <sup>®</sup>	ratiopharm GmbH, Ulm, D
Natriumchloridlösung 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
PBS, Dulbecco's PBS w/o Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG, Berlin, D
Penicillin/Streptomycin 10 000 U/ml	Biochrom AG, Berlin, D
Prilocainhydrochlorid, Xylonest <sup>®</sup> 1 %	AstraZeneca, London, GB
Reaktionsgefäß, Safe-lock 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
rhBMP-2, InductOs <sup>®</sup>	Wyeth Pharmaceuticals, Pfizer Inc., New York City, USA
Sarstedt Serum-Monovette <sup>®</sup>	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, D
TISSEEL ready to use (Calciumchlorid, Aprotinin, humanes Fibrinogen, humanes Thrombin)	Baxter Healthcare S. A., Zürich, CH
Trypanblau 0,5 %	Biochrom AG, Berlin, D
Trypsin/EDTA Solution 0,05 %/0,02 % (w/v) in PBS w/o Ca <sup>2+</sup> w/o Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG, Berlin, D
Vollelektrolytlösung, Jonosteril <sup>®</sup>	Fresenius Kabi, Bad Homburg, D
Verbrauchsmaterial	Hersteller
Combi Stopper	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

Leucosep™ Röhren	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, A
Luer Lock Spritze, Omnifix Solo Luer Lock	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Polypropylenfaden, Mopylen®	RESORBA Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg, D
Skalpell, 11er	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, J
Sterilfilter, Whatman FP 30/0,2 Celluloseacetat, 0,2 µm	Whatman plc, Kent, GB
Trachealtubus, Rüsichelit® super-safety-clear	Teleflex Medical, Athlone, IRL
Yamshidi Biopsienadel, Präapplus Biopsienadel 11 G 10 cm	Peter Pflugbeil GmbH, Zorneding, D
Zellfilter, Cell Strainer 100 µm Nylon	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	Corning® Incorporated, Corning, USA
zentraler Venenkatheter, 14-gauge, Ein-Lumen-ZVK	Arrow International Inc., Teleflex Medical, Athlone, IRL
Zentrifugenröhrchen, Falcon™, Blue Max	Becten Dickinson, Franklin Lakes, USA
Geräte	Hersteller
Brutschrank, HERAcell 240i	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Fluoreszenz-Inversmikroskop, IX81	Olympus Corporation, Tokio, J
Laryngoskop, Classic + Miller, 4 FO	HEINE Optotechnik GmbH & Co. KG, Herrsching, D
Phasenkontrastmikroskop, Leitz Fluovert FU	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Sicherheitswerkbank HERAsafe®	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Wärmematte	Störk-Tronic Störk GmbH & Co. KG, Stuttgart, D
Zentrifuge, Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

### 3.3.3.2 Gewinnung der mesenchymalen Stammzellen

#### Knochenmarkpunktion

Die Knochenmarkpunktion erfolgte im Falle der Gewinnung von mesenchymalen Stammzellen (mesenchymal stem cells, MSC) für die direkte Reimplantation im Rahmen des operativen Eingriffes (3.3.6.3 Versuchsabschnitt 1: subkutane Versuchsgruppen), im Falle der Gewinnung von MSC für die Kultivierung mehrere Wochen vor der Implantation. Zur Vorbereitung wurden die Schafe einer klinischen Untersuchung auf Anästhesiefähigkeit unterzogen und ihr Gewicht festgestellt. Es folgte eine Nüchternhaltung über 24 Stunden auf Einstreu bei freiem Zugang zu Wasser. Nach Eintritt

der Sedation mit Midazolam (0,5–1 mg/kg intramuskulär, i. m.) wurden die Schafe mit Ketamin (5–10 mg/kg i. m.) anästhesiert. Bei Eintritt eines ausreichend tiefen Narkosestadiums wurden die Schafe aus der Stallbox in den Operationssaal verbracht. Zur Verhinderung einer Hypothermie erfolgte die Lagerung der Tiere auf einer 40 °C temperierten Wärmematte auf der rechten Körperseite mit erhöhter Kopflagerung. Es wurde insbesondere auf eine gute Polsterung der Hüft- sowie der Schulterregion geachtet. In die linke Vena jugularis wurde ein zentraler Venenkatheter (ZVK) zur intraoperativen Versorgung mit 5 ml/kg/h Vollelektrolytlösung gelegt. Die Intubation (7,5–8,5 I.D.mm) erfolgte in Seitenlage unter Sichtkontrolle mit einem Laryngoskop. Der Bereich über der Spina iliaca dorsalis cranialis wurde nach großzügigem Scheren und Desinfizieren mit ca. 10 ml des Lokalanästhetikums Prilocainhydrochlorid infiltriert und steril abgedeckt. Nach Einsetzen der lokalanästhetischen Wirkung wurde eine Stichinzision mit einem 11er Skalpell vorgenommen. Die Aspiration des Knochenmarkes erfolgte mit einer heparingspülten Yamshidi Biopsienadel in eine 10 ml Luer Lock Spritze, in die 6 000 IE Heparin vorgelegt wurden. Nach der Gewinnung von ca. 20 ml Knochenmark wurde die Spritze mit einem Combi Stopper verschlossen und bis zur Isolation der MSC bei 4 °C gelagert. Durch Kompression der Punktionsstelle erfolgte die Blutstillung. Die Inzisionsstelle wurde mit einem nicht-resorbierbaren 2-0 Polypropylenfaden verschlossen und mit Aluminiumspray abgedeckt. Nach Erwachen der Schafe aus der Narkose und Wiedererlangen des Schluckreflexes wurden sie extubiert und zurück in den Stall gebracht. Eine unmittelbar postoperative Beobachtung der Schafe wurde bis zum vollständigen Wiedererlangen des Bewusstseins und Standvermögens sowie bis zum Beginn der Futteraufnahme sichergestellt.

Die Schafe erhielten präoperativ sowie bis zu 3 Tage nach Punktion das Analgetikum Carprofen (4 mg/kg s. c.) und das Antibiotikum Cefquinom (1–1,25 mg/kg i. m.). Der Fadenzug erfolgte 10–14 Tage postoperativ.

### **3.3.3.3 Aufarbeitung der mesenchymalen Stammzellen**

Alle Arbeitsschritte wurden steril unter einer Sicherheitswerkbank mit ausschließlich sterilen Arbeitsmaterialien durchgeführt.

#### **Isolation der mesenchymalen Stammzellen**

Die Isolation der MSC erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation. Dafür wurde das gewonnene Knochenmark im Verhältnis 1 : 4 mit phosphatgepufferter Salzlösung (phosphate buffered saline, PBS) verdünnt und mittels eines Zellfilters in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen filtriert. In ein 50 ml Leucosep<sup>TM</sup> Röhrchen wurden 16 ml Lymphoprep gegeben, für eine Minute bei 196 x g zentrifugiert und der Überstand auf dem Filter abgesaugt und verworfen. Nachfolgend wurden bis zu 35 ml verdünntes Knochenmark in das Röhrchen gegeben und für 12 Minuten bei 1 225 x g zentrifugiert.

Dadurch erfolgte die Phasenauftrennung: oben sammelte sich das Plasma und PBS, darunter befand sich die angereicherte Zellfraktion (MSC), es folgte eine Lymphoprep Schicht, der Trennfilter, erneut eine Lymphoprep Schicht und ganz unten sammelten sich Erythrozyten, Granulozyten sowie Zelldebris. Nach vorsichtigem Abpipettieren der obersten Schicht wurden die MSC in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Maximierung der Zellausbeute wurde der Trennfilter mit 5 ml PBS gespült und diese Spüllösung zusammen mit den bereits gewonnenen MSC durch einen Zellfilter filtriert. Abschließend erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen in PBS und eine Zentrifugation bei 440 x g für 10 Minuten. Für die Versuchsgruppen mit direkt reimplantierten MSC konnten diese nach DiI Markierung (3.3.3.4 DiI Markierung) verwendet werden. Für die Versuchsgruppen mit kultivierten MSC erfolgten weitere Schritte wie unten beschrieben.

### **Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen**

Das isolierte Zellpellet wurde in 10 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), dem 1 % Penicillin/Streptomycin sowie 10 % fötales bovines Serum (FBS) zugesetzt wurden, aufgenommen (im Folgenden bezeichnet als Wachstumsmedium). Es folgte die Kultivierung in einer Zellkulturflasche in einem Brutschrank unter konstanten Bedingungen bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C. Eine Kontrolle der Zellkulturflaschen hinsichtlich Zelldichte, -morphologie, -adhärenz und Kontamination erfolgte täglich durch Begutachtung der Flaschen unter einem Phasenkontrastmikroskop. Alle 2 Tage wurde das verbrauchte Medium mitsamt Stoffwechselendprodukten und Zelldebris unter sterilen Bedingungen abgesaugt und der Zellrasen mit 10 ml PBS gespült. Nach Schwenken und Absaugen der Spüllösung wurden die Zellkulturflaschen mit 10 ml Wachstumsmedium aufgefüllt und umgehend in den Brutschrank zurückgestellt.

### **Subkultivierung der mesenchymalen Stammzellen**

Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % erfolgte die Subkultivierung der Zellen unter sterilen Bedingungen. Das verbrauchte Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 ml PBS gespült. Nach Absaugen der Spüllösung wurde in jede Flasche 3 ml der Serinprotease Trypsin gegeben und bei 37 °C für maximal 3 Minuten inkubiert. Dieser Schritt induziert die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden durch Spaltung der extrazellulären Proteine. Falls in der anschließenden Mikroskopkontrolle nicht alle Zellen abgelöst waren, führte ein Klopfen der Seitenränder der Flasche zur weiteren Ablösung der verbleibenden Zellen vom Boden. Nach Abstoppen der Reaktion mit 10 ml PBS unter Zusatz von 10 % FBS wurde dieses in 50 ml Zentrifugenröhrchen transferiert und bei 440 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Wachstumsmedium pro neue Zellkulturflasche resuspendiert und in Zellkulturflaschen gegeben, in die bereits 9 ml Wachstumsmedium vorgelegt wurden. Im Anschluss an eine Mikroskopkontrolle wurden die Flaschen wieder zurück in den Brutschrank gestellt.

### 3.3.3.4 DiI Markierung

Die Markierung der Zellen mit einem fluoreszierenden Farbstoff diente dem Auffinden der MSC in den später hergestellten histologischen Schnitten. Als Farbstoff wurde ein chlormethyliertes (CM) Analogon von DiI (1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-perchlorat) (rot), CellTracker™ CM-DiI, verwendet, welches durch seine besseren hydrophilen Eigenschaften eine einfachere Herstellung von Lösungen für Zellfärbungen zulässt. Seine hohe Lipophilie erlaubt die Einlagerung in die Zellmembran durch die Bindung einer thiolreaktiven Chlormethylgruppe an Thiole der Lipoproteine. Der Farbstoff zeichnet sich durch eine gute Stabilität auch nach Fixierung sowie immunhistologischen Färbungen aus und eignete sich daher sehr gut für die vorliegende Studie.

Für die DiI Markierung wurde zu Beginn der Versuche eine 1 µg/µl konzentrierte Stammlösung aus 1 mg CellTracker™ CM-DiI und 1 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt, die bei -20 °C gelagert wurde. Im Falle der Markierung von kultivierten MSC erfolgte die Ablösung und Zentrifugation der Zellen wie bereits beschrieben (Subkultivierung der MSC). Für die MSC Zählung wurde das Zellpellet in 5 ml PBS resuspendiert und eine Vitalfärbung mittels Trypanblau (0,5 % in 0,9%iger Natriumchloridlösung) durchgeführt. Dafür wurden zu 100 µl der Zellsuspension 100 µl Trypanblau pipettiert. Der Farbstoff dringt durch beschädigte Zellmembranen toter Zellen und färbt sie dunkelblau an, vitale Zellen bleiben farblos. Aufgrund der Zytotoxizität muss die Zellauszählung umgehend nach der Färbung erfolgen. In einer Neubauerzählkammer wurden die ungefärbten Zellen in vier Großquadraten ausgezählt. Das Zählergebnis, mit 5 000 multipliziert, entsprach der Zellzahl pro Milliliter (3.5).

ausgezähltes Volumen pro Großquadrat: $1,0 \times 1,0 \times 0,1 \text{ mm}^3 = 0,1 \text{ }\mu\text{l}$	
ausgezähltes Volumen in vier Großquadraten: $4 \times 0,1 \text{ }\mu\text{l} = 0,4 \text{ }\mu\text{l}$	(3.5)
Zellzahl/ml: Zählergebnis $\times 2/0,4 \times 1\ 000 =$ Zählergebnis $\times 5\ 000$	

Die DiI Markierung erfolgte für die direkt reimplantierten und kultivierten MSC nach dem gleichen Protokoll. Das Zellpellet wurde in 5 ml Wachstumsmedium mit dem Zusatz von 5 µg/ml DiI resuspendiert und bei 37 °C für 15 Minuten inkubiert. Es folgten ein Zentrifugationsschritt bei 880 x g für 4 Minuten und ein zweimaliges Waschen der Zellen in 25 ml PBS mit nachfolgender Zentrifugation bei 440 x g für 4 Minuten. Die MSC wurden im Falle der kultivierten gezählt und je nach Versuchsgruppe 6 Millionen in Fibrinogen oder autologem Serum aufgenommen. Im Falle der direkt reimplantierten MSC wurden alle aus 20 ml Knochenmark isolierten Zellen in Fibrinogen aufgenommen. Vor Implantation wurde die Färbung der Zellen durch Prüfen der Fluoreszenz in einem Fluoreszenz-Inversmikroskop kontrolliert. Die Implantation der Zellen erfolgte umgehend.

### 3.3.4 Wachstumsfaktor rhBMP-2

Als Wachstumsfaktor wurde rekombinantes menschliches Knochen-Morphogenese-protein-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2, rhBMP-2) verwendet. Aus rhBMP-2 in Pulverform (InductOs<sup>®</sup>) wurde unter sterilen Bedingungen durch Mischen mit dem mitgelieferten Lösungsmittel (Wasser für Injektionszwecke) eine 10 µg/µl konzentrierte Stammlösung hergestellt. Nach Aliquotieren in 10 µl Vials in sterilen Reaktionsgefäßen erfolgte die Lagerung bis zur Verwendung bei -80 °C.

### 3.3.5 Matrix

Als Matrix, in der die Zellen und der Wachstumsfaktor aufgenommen wurden, diente Fibrinkleber (TISSEEL, ready to use) oder intraoperativ entnommenes autologes Serum. Zur Herstellung des Fibrinogens wurde unter sterilen Bedingungen das pulverförmige Sealer Protein Concentrate (human) in der im Kit enthaltenen Fibrinolyse-Inhibitor Lösung (3 000 KIU/ml, S-Aprotinin, bovine) aufgelöst. Durch Zufügen von Fibrinogenpuffer wurde das Fibrinogen auf eine Konzentration von 20 mg/ml verdünnt. Das pulverförmige Thrombin (500 IU/ml, human) wurde in 5 ml Calciumchloridlösung (40 µmol/ml) aufgelöst. Die Lagerung der beiden Lösungen erfolgte bis zur Verwendung bei 4 °C.

Für die Herstellung von autologem Serum diente intraoperativ entnommenes Blut aus dem ZVK. Das Blut wurde in 7,5 ml Serum-Monovetten transferiert und 20–30 Minuten bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Gerinnung stehen gelassen. Die Serumgewinnung erfolgte durch Zentrifugieren des Röhrchens bei 3 400 x g für 10 Minuten. Das Serum wurde vorsichtig abpipettiert und durch einen Sterilfilter in ein steriles Reaktionsgefäß übertragen.

### 3.3.6 Narkoseregime und perioperatives Management

#### 3.3.6.1 Verwendetes Material

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Medikamente, Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Durchführung der Operationen

Chemikalien, Medikamente	Hersteller
Aluminiumspray, Alu-Spray „trocken“	Pharma Partner Vertriebs-GmbH, Hamburg, D
Augensalbe, Bepanthen	Bayer Vital GmbH/Bayer AG, Leverkusen, D
Clopidogrel, Plavix <sup>®</sup> 75 mg Filmtabletten	Sanofi-Aventis/Sanofi S. A., Paris, F
CT-Kontrastmittel, Microfil <sup>®</sup> MV-122 yellow/Härtungsmittel MV Curing Agent	Flow Tech, Inc., Carver, USA

Enoxaparin-Natrium, Clexane <sup>®</sup> multidose 100 mg/ml	Sanofi-Aventis/Sanofi S. A., Paris, F
Enrofloxacin, Baytril 5 % Infusionslösung	Bayer Vital GmbH/Bayer AG, Leverkusen, D
Formalinlösung, Roti <sup>®</sup> -Histofix 4 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Heparin-Natrium 25 000 ratiopharm <sup>®</sup>	ratiopharm GmbH, Ulm, D
Isofluran, Forene <sup>®</sup> 100 %	Abbott Laboratories, Abbott Park, North Chicago, USA
Natriumchloridlösung 0,9 %	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Papaverinhydrochlorid, Paveron <sup>®</sup> N	Linden Arzneimittel Vertrieb GmbH, Heuchelheim, D
T 61 <sup>®</sup>	Intervet International GmbH, Unterschleißheim, D
Verbrauchsmaterial	Hersteller
Doppelkammerspritze, DUPLOJECT	Baxter Healthcare S. A., Zürich, CH
Harnblasenkatheter, UROMED-Kinder-Ballon-Katheter	Uromed Kurt Drews GmbH, Oststeinbek, D
Introcan <sup>®</sup> Safety	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Kendall Curity <sup>™</sup> Katheter Set, Tyco Healthcare	Tyco International Ltd., Schaffhausen, CH
Klemmen, Biemer-Clip 0,29–0,39	Aesculap AG/B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Ligatur Clips, Horizon <sup>™</sup>	Teleflex Medical, Athlone, IRL
Luer Lock Spritze, Omnifix Solo Luer Lock	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Nylonfaden, Ethilon	Ethicon, Norderstedt, D
Polyesterfaden, Sulene <sup>®</sup>	Serag-Wiessner KG, Naila, D
Polypropylenfaden, Mopylen <sup>®</sup>	RESORBA Wundversorgung GmbH & Co. KG, Nürnberg, D
Zentrifugenröhrchen, Falcon <sup>™</sup> , Blue Max	Becton Dickinson Bioscience, Franklin Lakes, USA
Säge, CONNEX Mini-Säge 150 mm	CONMETALL GmbH & Co. KG, Celle, D
Skalpell, 10er	FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, J
Vicrylfaden	Ethicon, Norderstedt, D
6-Well Platte, Zellkultur Multiwellplatte, Cellstar <sup>®</sup>	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, A
Wunddrain soft, Drain Set 4 x 10 mm	pfm medical AG, Köln, D
Zentrifugenröhrchen, lichtundurchlässig	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Geräte	Hersteller
Absaugpumpe, New Askir 30	CA-MI srl, Pilastro, I
Anästhesiegas-Monitor, Dräger Vamos	Dräger Medical AG & Co. KGaA, Lübeck, D

biopolare Diathermie, VIO 300D	ERBE GmbH, Tübingen, D
Blutdruckmessung, Siemens Sirecust 404	Siemens AG, Erlangen, D
Narkosegerät, Dräger Fabius®-CE	Dräger Medical AG & Co. KGaA, Lübeck, D
Operationsmikroskop, Leica M680	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Perfusor® segura FT	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D

### 3.3.6.2 Anästhesie der Schafe

Die Vorbereitung auf die Implantationen und Explantationen sowie die Narkoseeinleitung erfolgten wie bereits beschrieben (3.3.3.2 Gewinnung der mesenchymalen Stammzellen). Aufgrund der langen Narkosedauer wurden die Schafe an ein Narkosegerät angeschlossen und die Narkose mittels Inhalation von 1,3–1,8 % Isofluran in bis zu 50 % Sauerstoff bei Spontanatmung fortgeführt. Ein zunehmendes tiefes Narkosestadium machte die Beatmung der Schafe mittels CPPV (continuous positive pressure ventilation) bei einem PEEP (positive endexpiratory pressure) von 2–6 cm H<sub>2</sub>O möglich. Das Atemvolumen wurde auf ca. 15 ml/kg/min, die Atemfrequenz auf ca. 15–18/min und der maximale inspiratorische Druck auf 18–20 cm H<sub>2</sub>O eingestellt. Das Verhältnis von Inspiration zu Expiration wurde auf 1 : 2, das Verhältnis von Inspirationspause zu Inspiration auf 5 % festgelegt. Es wurde ein Gehalt von 35–45 mmHg CO<sub>2</sub> in der Expirationsluft angestrebt. Anhand eines Pulsoxymeters an der Zunge der Schafe wurden der Sauerstoffgehalt im Blut sowie die Pulsfrequenz mittels Anästhesiegas-Monitor überwacht. Eine Pansensonde (Rüsch-Sonde, Ø 9 x 14 mm) diente der Vorbeugung einer Pansentympanie. Zur Verhinderung der Austrocknung der Augen wurde eine Augensalbe verwendet. Aufgrund der langen Operationsdauer im Falle der AV-loop Implantation wurde zusätzlich eine arterielle Blutdruckmessung (A. auricularis) vorgenommen, um eine sichere Narkose zu gewährleisten sowie ein Harnblasenkatheter (Charr. 08) gelegt.



### 3.3.6.3 Versuchsabschnitt 1: subkutane Versuchsgruppen

Tabelle 6: Übersicht über die subkutanen Versuchsgruppen

	implantiert	ausgewertet	Implantate	Implantations- zeitspanne
Teilabschnitt 1	n = 9	n = 8	NB <sup>®</sup> + Fibrin (Kontrollgruppe)	12 W
	n = 6	n = 5	NB <sup>®</sup> + venöses Blut	12 W
	n = 6	n = 5	NB <sup>®</sup> + Knochenmark	12 W
	n = 5	n = 5	NB <sup>®</sup> + 60 µg/ml rhBMP-2 in Fibrin	12 W
	n = 5	n = 5	NB <sup>®</sup> + 6 Millionen kultivierte MSC in Fibrin	12 W
	n = 5	n = 5	NB <sup>®</sup> + direkt reimplantierte MSC in Fibrin	12 W
Teilabschnitt 2	n = 6	n = 5	NB <sup>®</sup> + 6 Millionen kultivierte MSC + 60 µg/ml rhBMP-2 in Fibrin	12 W
	n = 6	n = 5	NB <sup>®</sup> + 6 Millionen kultivierte MSC + 60 µg/ml rhBMP-2 in Serum	12 W

Anmerkungen. NB<sup>®</sup> = NanoBone<sup>®</sup>, MSC = mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2, W = Wochen

#### Implantation

Für die Implantationen wurden 9 Schafe verwendet, die jeweils mehrere Blöcke implantiert bekamen. In jedem Schaf wurde die Kontrollgruppe (NanoBone<sup>®</sup> + Fibrin) implantiert. Das Operationsfeld wurde großzügig geschoren, gewaschen, desinfiziert und abschließend steril abgedeckt. Auf der rippengestützten linken Brustwand wurden im Abstand von 6 cm horizontale Schnitte mit einer Länge von 4 cm mittels biopolarer Diathermie angelegt. Durch stumpfe Präparation nach ventral wurden subkutane Taschen für die Implantation der NanoBone<sup>®</sup> Blöcke vorbereitet. Je nach Gruppe wurden die NanoBone<sup>®</sup> Blöcke mit den entsprechenden Zusätzen implantiert. Dafür wurden die zuvor aneinander gebundenen Blöcke in 6-Well Platten gelegt und die jeweiligen Zusätze auf den Block gegeben (Abbildung 13). Durch Schwenken des Blockes in den Zusätzen sollte eine maximale Tränkung erzielt werden. In der Fibringruppe sowie in den Gruppen mit rhBMP-2 und/oder Zellen wurden in 1 440 µl von dem zuvor hergestellten Fibrinogen die Zellen und/oder das rhBMP-2 gelöst und mit 60 µl des Thrombins auf den Block gegeben. Für die Blutgruppe erfolgte über einen Dreiweghahn die Entnahme von 2 ml Blut über den ZVK mit einer Luer Lock Spritze, in die 600 IE Heparin vorgelegt wurden. Vor der Gewinnung des Blutes wurden die ersten 10 ml verworfen, um eine Verdünnung durch die über den ZVK verabreichte Infusion zu vermeiden. Für die Gruppe mit Knochenmark sowie mit direkt reimplantierten MSC wurde intraoperativ eine Knochenmarkpunktion vorgenommen (3.3.3.2 Gewinnung der mesenchymalen Stammzellen). In der Knochenmarkgruppe erfolgte die Tränkung des Blockes mit 2 ml des Punktates. Im Falle der direkt zu

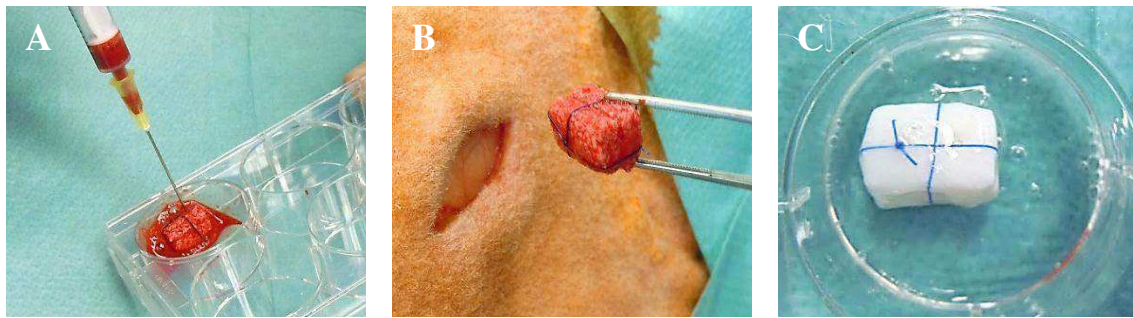


Abbildung 13: *Vorbereitung für die subkutane Implantation der NanoBone® Blöcke*

Tränken eines NanoBone® Blockes mit Blut in einer 6-Well-Platte (A), der nachfolgend in eine der präparierten subkutanen Taschen eingebracht wurde (B). In der Kontrollgruppe wurde der NanoBone® Block mit Fibrin getränkt (C).

reimplantierenden MSC wurden diese aus 20 ml Knochenmark isoliert (3.3.3.3 Aufarbeitung der mesenchymalen Stammzellen). Für die Gruppe mit kultivierten MSC wurden 6 Millionen Zellen aus den Zellkulturflaschen entnommen. Nach DiI Markierung (3.3.3.4 DiI Markierung) der MSC wurden diese jeweils in Fibrinogen aufgenommen und mit Thrombin auf den Block gegeben. In der Wachstumsfaktorgruppe erfolgte die Implantation von 60 µg/ml Fibrin rhBMP-2 (entspricht einer Gesamtmenge von 90 µg rhBMP-2 pro Implantat).

Zur Optimierung der Tränkung der NanoBone® Blöcke für die Kombinationsgruppen im Teilabschnitt 2 diente die Anwendung einer Vakuumtechnik. Nach Befüllen einer Luer Lock Spritze mit dem Block sowie den Zusätzen und Verschluss der Spritzenöffnung wurde durch den Zug am Stempel ein Vakuum für die Dauer von 2 Minuten induziert. In der Fibrin Kombinationsgruppe wurden 6 Millionen kultivierte und DiI markierte Zellen sowie 90 µg rhBMP-2 in Fibrinogen zusammen mit Thrombin in die Spritze gegeben. Für die Serum Kombinationsgruppe wurden 6 Millionen kultivierte und DiI markierte Zellen sowie 90 µg rhBMP-2 in 1,5 ml des zuvor gewonnenen Serums aufgenommen.

Der Hautverschluss erfolgte mittels Rückstichnahttechnik mit einem nicht-resorbierbaren 2-0 Polypropylenfaden und anschließender Abdeckung durch Aluminiumspray. Die Fäden wurden 10–14 Tage postoperativ gezogen. Die postoperative Nachsorge erfolgte wie bereits beschrieben (3.3.3.2 Gewinnung der mesenchymalen Stammzellen).

### **Explantation**

Die Explantation der subkutanen Konstrukte erfolgte nach einer Implantationsdauer von 12 Wochen. Für den operativen Eingriff wurden die Schafe anästhesiert und das Operationsfeld steril vorbereitet wie bereits beschrieben (3.3.6.2 Anästhesie der Schafe / 3.3.6.3 Versuchsabschnitt 1: subkutane Versuchsgruppen). Mittels bipolarer Diathermie wurde die Haut eröffnet und die Konstrukte vorsichtig entnommen. Von jedem NanoBone® Block wurde für die molekularbiologische Auswertung mit einem 10er Skalpell oder im Falle sehr harter Konstrukte mit einer Säge eine ca. 3 mm breite Scheibe quer zur ursprünglichen Längsrichtung abgetrennt. Die Gewebescheibe wurde in

einem sterilen Reaktionsgefäß in flüssigem Stickstoff konserviert und bis zur Probenbearbeitung bei  $-80\text{ °C}$  gelagert. Der übrige Block wurde in einem sterilen Reaktionsgefäß in 4 % gepufferter Formalinlösung bei  $4\text{ °C}$  für 24 Stunden gelagert und diente nachfolgend für die Herstellung von histologischen Gewebeschnitten. Um die markierten MSC vor Ausleuchten zu schützen, erfolgte die Lagerung der Konstrukte in lichtundurchlässigen Zentrifugenröhrchen.

Nach Beendigung der Explantation wurden die Schafe in vertiefter Narkose mit T 61<sup>®</sup> (5–10 ml/50 kg i. v.) euthanasiert.

### 3.3.6.4 Versuchsabschnitt 2: AV-loop Versuchsgruppe

Tabelle 7: Übersicht über die AV-loop Versuchsgruppe

implantiert	ausgewertet	Implantat	Implantationszeitspanne
n = 6	n = 6	AV-loop + NanoBone <sup>®</sup> + venöses Blut	18 Wochen

#### Implantation

Die Vorbereitung auf die AV-loop Implantation erfolgte wie bereits beschrieben (3.3.6.2 Anästhesie der Schafe). Als Lokalisation für den AV-loop erwies sich in vorausgegangenen Studien der mediale Bereich an der Hintergliedmaße als geeignet. In Rechtsseitenlage wurde die linke Hintergliedmaße nach kraniodorsal ausgebunden, so dass ein freier Zugang zum Operationsfeld gewährleistet war. Nach Schur, Desinfektion und steriler Abdeckung wurde ein ca. 18 cm langer Hautschnitt längs im Bereich über der Tibia angelegt (Abbildung 14A). Mittels einer Lupenbrille wurden die Arteria und Vena saphena aus ihrem Gewebeverband in einer Länge von ca. 15 cm vollständig freipräpariert, so dass sie freibeweglich waren. Abzweigende Gefäße wurden mittels biopolarer Pinzette

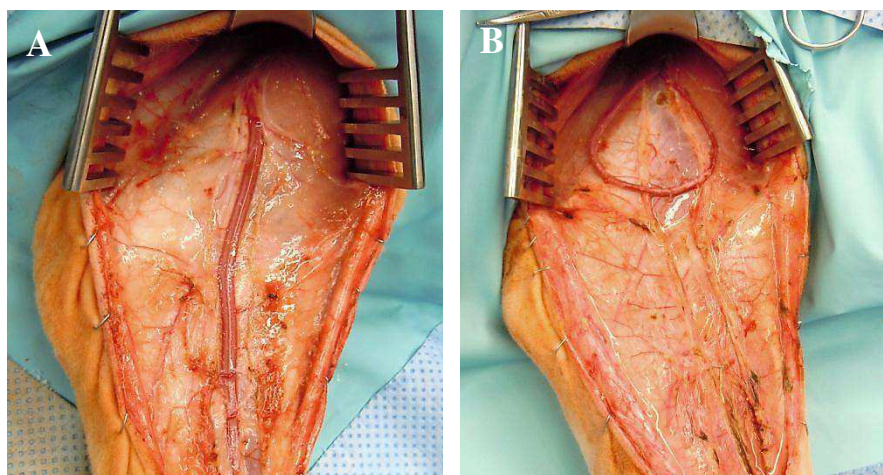


Abbildung 14: Operationsfeld vor und nach Anastomosierung der Loop-Gefäße

Für den AV-loop wurden Arteria und Vena saphena (A) mikrochirurgisch zu einer arteriovenösen Gefäßschleife (AV-loop) anastomosiert (B).

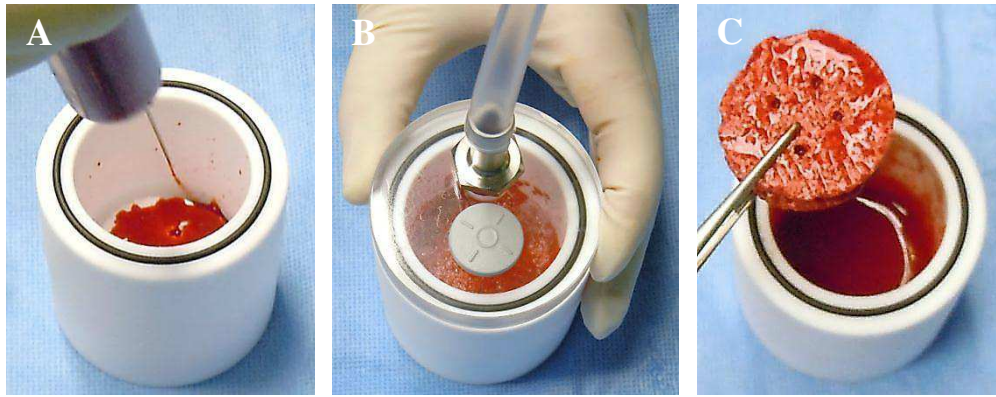


Abbildung 15: **Tränkung des NanoBone® Blockes für die AV-loop Versuchsgruppe**

Der NanoBone® Block, 10 ml venöses Blut und 25 mg Enrofloxacin wurden in die Vakuunkammer gegeben (A), mit dem Deckel verschlossen und für 2 Minuten einem Vakuum ausgesetzt (B). Der blutgetränkte Block wurde entnommen und konnte anschließend implantiert werden (C).

koaguliert. Unter einem Operationsmikroskop schlossen sich die folgenden mikrochirurgischen Arbeitsschritte an. Nach Abklemmen der Gefäße mit mikrovaskulären Klemmen wurden sie distal ligiert und abgesetzt. Für eine optimale Größe der Gefäßschleife wurden die Gefäße auf eine Gesamtlänge von ca. 20 cm gebracht. Die Anastomosierung von Arteria und Vena saphena erfolgte mit 6–8 Einzelknopfnähten mit einem 9-0 Nylonfaden (Abbildung 14B). Vor Freigabe der Gefäße wurden über den ZVK 100 IE/kg Heparin i. v. injiziert. Im Anschluss erfolgte eine Überprüfung der Anastomose auf Durchgängigkeit. Die Blutentnahme für die Tränkung der NanoBone® Blöcke erfolgte wie bereits beschrieben (3.3.6.3 Versuchsabschnitt 1: subkutane Versuchsgruppen) in eine 10 ml Spritze, in die 3 000 IE Heparin vorgelegt wurden. Das Blut (10 ml) wurde zusammen mit 25 mg Enrofloxacin und dem NanoBone® Block in eine speziell für die NanoBone® AV-loop Blöcke konstruierte Vakuunkammer gegeben (Prof. Gerber, Universität Rostock, Institut für Physik).

Nach Verschluss mit dem Deckel wurde die Kammer mit einer Absaugpumpe konnektiert und ein Vakuum im Kammerinneren für 2 Minuten induziert (Abbildung 15). Der AV-loop wurde in der Nut des blutgetränkten Blockes platziert und mit Fibrin fixiert (Abbildung 16A). Anschließend wurde das Konstrukt in die Isolationskammer gelegt. Um eine Polsterung und Fixierung des Konstruktes in der Kammer zu bewirken, erfolgte die Auffüllung mit Fibrinkleber (Abbildung 16B). Für die Applikation des Fibrinklebers wurden das hergestellte Fibrinogen und Thrombin in eine Doppelkammerspritze gegeben. Mit einem nicht-resorbierbaren 0 Polyesterfaden erfolgte die Befestigung des Kammerbodens an der Muskelfaszie sowie des Deckels am Kammerboden (Abbildung 16C). Es wurde eine geschlossene Wunddrainage angelegt und kaudolateral an der Hintergliedmaße durch die Haut nach außen geführt. Der Hautverschluss erfolgte mittels Rückstichnahttechnik mit einem nicht-resorbierbaren 2-0 Polypropylenfaden. Aluminiumspray diente der Abdeckung der Wunde. Der Fadenzug erfolgte 10–14 Tage



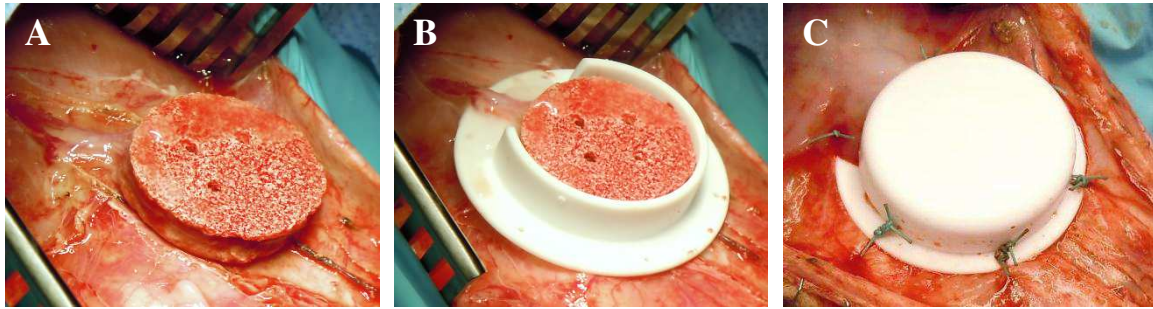


Abbildung 16: NanoBone® Block mit AV-loop und Isolationskammer

Der AV-loop wurde in der Nut des NanoBone® Blockes mittels Fibrin fixiert (A) und in die Isolationskammer gelegt (B), die nach Auffüllen mit Fibrin verschlossen und festgenäht wurde (C).

postoperativ. Die postoperative Nachsorge wurde wie bereits beschrieben (3.3.3.2 Gewinnung der mesenchymalen Stammzellen) durchgeführt. Darüber hinaus wurde das Antibiotikum Cefquinom bis zum Ziehen der Drainage nach ca. 7 Tagen gegeben. Die täglich mindestens je zweimal durchgeführte Kontrolle diente der Überprüfung des Allgemeinbefindens sowie der Operationswunden und Drainagen der Tiere. Um ein Ausreißen der Drainage zu verhindern, wurden die Schafe bis zum Zug dieser in der Box belassen. Zur Verhinderung eines thromboembolischen Verschlusses der Anastomose erfolgte unmittelbar postoperativ die Applikation von 300 mg Clopidogrel p. o. in Kombination mit 5 mg/kg Enoxaparin-Natrium s. c. Zusätzlich wurde diese hochdosierte Enoxaparin-Natrium Gabe am ersten postoperativen Tag vorgenommen. Die bis zum Versuchsende durchgeführte Thromboseprophylaxe setzte sich aus 150 mg Clopidogrel p.o. und 3 mg/kg Enoxaparin-Natrium s. c. je bid zusammen.

### Explantation

Die Explantation der Konstrukte wurde nach einer Implantationsdauer von 18 Wochen vorgenommen. Die Vorbereitungen erfolgten wie bereits beschrieben (3.3.6.2 Anästhesie der Schafe). Mittels bipolarer Diathermie wurde die Haut über der Kammer t-förmig eröffnet und diese aus ihrem Gewebeverband freigelegt. Die Arteria und Vena saphena wurden freipräpariert und die Fäden zwischen Kammerboden und Muskulatur gelöst. Die Schafe erhielten vor Absetzen des Gefäßbündels 100 IE/kg Heparin i. v. Nach Entnahme der Kammer wurden die Schafe in vertiefter Narkose mit T 61® (5–10 ml/50 kg i. v.) euthanasiert.

Das zuführende Gefäß wurde am Kammereingang des Explantates unter dem Operationsmikroskop aufgesucht und kanüliert (Introcan® Safety 24-gauge). Es folgte die manuelle Durchspülung mit 10 ml einer auf 38 °C temperierten isotonen 0,9%igen Natriumchloridlösung mit dem Zusatz von 100 IU/ml Heparin und 0,1 mg/ml Papaverinhydrochlorid. Zum Schutz vor Verrutschen der Kanüle diente die Befestigung mittels eines 4-0 Vicrylfadens. Mit 100 ml der zuvor beschriebenen Lösung wurden die Gefäße mit einer Flussrate von 90 ml/h perfundiert. Durch diese Schritte sollte das

Herausspülen von Blut und eventuell gebildeten Thromben sichergestellt werden. Die spasmolytische Wirkung von Papaverinhydrochlorid wurde genutzt, um auch kleine und eventuell verengte Gefäße optimal perfundieren zu können. Im Anschluss erfolgte die Perfusion mit 20 ml eines silikonhaltigen Kontrastmittels, dem zuvor 2,5 % des entsprechenden Härtungsmittels zugesetzt wurde. Die Reduktion der Perfusionsrate auf 10 ml/h sollte optimale Voraussetzungen für das Eindringen des Kontrastmittels auch in sehr kleine Verzweigungen des Gefäßbaumes schaffen. Nach der Perfusion wurden die Stielgefäße mit einem 0 Polyesterfaden abgebunden und der NanoBone<sup>®</sup> Block vorsichtig aus der Kammer gelöst. Das gesamte Konstrukt wurde nach Aushärtung des Kontrastmittels in ein 500 ml Becherglas mit 4 % gepufferter Formalinlösung gelegt und für 24 Stunden bei 4 °C gelagert.

### 3.3.7 Histologische Auswertung

#### 3.3.7.1 Verwendetes Material

Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte für die histologische Auswertung

Chemikalien	Hersteller
Aquatex <sup>®</sup>	Merck KGaA, Darmstadt, D
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector laboratories Inc., Burlingame, USA
Azophloxin	Waldeck GmbH & Co. KG, Division Chroma, Münster, D
Citronensäure-Monohydrat	Merck KGaA, Darmstadt, D
CSA II, Biotin-Free Catalyzed Signal Amplification System	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
DakoCytomation EnVision <sup>®</sup> + Dual Link System-HRP (DAB+)	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
Dako Target Retrieval Solution RTU	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
DAPI	Roche Applied Science/Roche, Basel, CH
3,3'-Diaminobenzidin (DAB+) Chromogen, Substratpufferlösung	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
di-Natriumtartrat-Dihydrat, $\geq 99\%$ , p. a. Weinsäure Dinatriumsalz	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Eisenhämatoxylin nach Weigert	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Entellan	Merck KGaA, Darmstadt, D
Eosin G (gelblich)	Merck KGaA, Darmstadt, D
Essigsäure (Eisessig) 100 %	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethanol vergällt, $\geq 70\%$ / $\geq 96\%$ / $\geq 99,8\%$	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D

Ethylendiamintetraessigsäure Tetranatriumsalz Hydrat	Fluka, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Fast Red Violet LB Salt	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Fluorescein FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit	Calbiochem®, Merck KGaA, Darmstadt, D
Fluorprep®	bioMérieux S. A., Marcy l'Etoile, F
Formalin (Roti®-Histofix 4 % / 10 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Hämalaunlösung nach Mayer	Merck KGaA, Darmstadt, D
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Lichtgrün SF gelblich	Merck KGaA, Darmstadt, D
Molybdätosphorsäure-Hydrat	Merck KGaA, Darmstadt, D
Naphthol AS-MX phosphate	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Natriumacetat, wasserfrei zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt, D
Natriumchlorid > 99,8 %	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Natronlauge (2 N)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
N,N-Dimethylformamid	Merck KGaA, Darmstadt, D
Orange G, crist.	Waldeck GmbH & Co. KG, Division Chroma, Münster, D
Paraffin	Sasol Wax GmbH, Hamburg, D
Periodic Acid Schiff (PAS) Färbekit	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
phosphatgepufferte Salzlösung, Dulbecco's PBS w/o Ca <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG, Berlin, D
Protease Type XIV	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Salzsäure (2 N)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt, D
Triton X 100, reinst, Alkylphenylpoly- ethylenglykol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Tween® 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
VECTASTAIN® Elite ABC Reagent, RTU	Vector laboratories Inc., Burlingame, USA
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30 %	Merck KGaA, Darmstadt, D
Xylol (Isomere), > 98 %, rein, für die Histologie, Dimethylbenzol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Ziegen Serum, New Zealand Origin	Gibco®, Invitrogen™/Life Technologies™, Carlsbad, USA
Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser 24 x 50 mm	Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, D
Objektträger, Flex IHC Microscope Slides	Dako, Denmark A/S, Glostrup, DK
Rotilabo®-Einbettkassetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, D
Silikonstift (PAP pen for immunostaining)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA

Geräte	Hersteller
Adobe Photoshop CS3 extended	Adobe Systems Inc., San Jose, USA
Dampfgarer, MultiGourmet	Braun GmbH, Kronberg/Taunus, D
Dampftopf, Pascal-Dampftopf	Dako Denmark A/S, Glostrup, DK
Fluoreszenz-Inversmikroskop, IX81 Fluoreszenzkamera, XM10 Software, cellSens Dimension-V1.5	Olympus Corporation, Tokio, J
Gewebeeinbettautomat, Shandon Hypercenter XP	Thermo Shandon GmbH/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Kamera Leica DFC420 Software, Leica Application Suite V3	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Mikroskop Leitz DM RBE	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Mikrowelle, AEG Micromat	AEG, Frankfurt am Main, D
Objektträgerstrecktisch OTS 40	MEDITE GmbH, Burgdorf, D
Paraffinausgießstation, Shandon Histocenter 2	Thermo Shandon GmbH/Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Rotationsmikrotom HM 355 S	MICROM International GmbH, Walldorf, D
Ultraschallbad Sonocool <sup>®</sup> 255	Bandelin GmbH & Co. KG, Berlin, D
Universalwärmeschrank UNE 500	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, D
Wasserbad, Tissue Flotation Bath TFB 45	MEDITE GmbH, Burgdorf, D

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Antikörper

Antikörper	Hersteller
Alkaline Phosphatase (tissue non-specific) polyklonal Host: Kaninchen	GeneTex Inc., Irvine, USA
biotinyliertes anti-Kaninchen IgG (H+L) Host: Ziege	Vector laboratories Inc., Burlingame, USA
CD31 monoklonal Host/Isotyp: Maus/IgG2a	MorphoSys AG, Martinsried/Planegg, D
Isotypkontrolle IgG2a Isotypkontrolle IgG1 Mouse IgG2a pure, Klon: X39 Mouse IgG1 pure, Klon: X40	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Ki67 monoklonal, Klon: MIB-1 Host/Isotyp: Maus/IgG1-kappa	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, DK
Kollagen Typ I polyklonal Host/Isotyp: Kaninchen/Ig	BIOLOGO Dr. Hartmut Schultheiß e. K., Kronshagen, D
von-Willebrand-Faktor polyklonal Host: Kaninchen	Biocare Medical LLC, Concord, USA



### 3.3.7.2 Aufarbeitung der Proben

#### Entkalkung der Explantate

Nach der Fixierung der subkutanen und AV-loop Explantate für 24 Stunden in 4 % gepufferter Formalinlösung bei 4 °C wurden diese für 10 Minuten in destilliertem Wasser gespült. Es schloss sich die Entkalkung mit 20%iger EDTA-Lösung an, um sie auf die histologischen Untersuchungen, bzw. die AV-loop Explantate zusätzlich auf die mikro-computertomographische ( $\mu$ CT) Analyse, vorzubereiten. Für die EDTA-Lösung wurden 1,3 M EDTA Tetranatriumsalz Hydrat sowie 0,3 M Citronensäure-Monohydrat in 2 l destilliertem Wasser aufgelöst und mit 2 M Salzsäure bzw. 2 M Natriumhydroxid auf einen pH von 7,1 eingestellt. Die Explantate wurden in der EDTA-Lösung in 100 ml Bechergläsern in einem Ultraschallbad mit Kühlung entkalkt. Durch die Anwendung der Ultraschalltechnik kommt es zu einer rascheren und zeitgleich zellschonenden Zerstörung der kristallinen Strukturen von Calciumphosphat, Magnesiumphosphat und Calciumcarbonat. Die Kühlung dient der Verhinderung der durch die chemische Reaktion induzierten Eigenerwärmung der Proben. Ein EDTA-Wechsel erfolgte täglich. Die Entkalkungsdauer betrug für die subkutanen Konstrukte 3–7 Tage, für die AV-loop Konstrukte 1–2 Wochen. Im Falle von Explantaten mit DiI-gelabelten MSC wurde darauf geachtet, dass sie keinem Licht ausgesetzt wurden.

#### Vorbereitung für die histologischen und immunhistologischen Färbungen

Die entkalkten subkutanen Explantate wurden für die Entwässerung in Einbettkassetten mit der Anschnittsfläche nach unten gelegt. Die AV-loop Explantate wurden nach der  $\mu$ CT-Analyse zugeschnitten (Abbildung 17) und nachfolgend ebenfalls mit der Anschnittsfläche nach unten in Einbettkassetten gelegt. Die Entwässerung erfolgte im Gewebeeinbettautomat nach Protokoll (s. Tabelle 10).

Die entwässerten Konstrukte wurden in einer Paraffinausgießstation in Paraffin eingebettet. Die Anfertigung von 3  $\mu$ m dicken histologischen Schnitten erfolgte mit einem Rotationsmikrotom. Nach Streckung in einem auf 46 °C temperierten Wasserbad wurden die Schnitte auf beschichtete Objektträger aufgezo-gen, auf einen Objektträgerstrecktisch

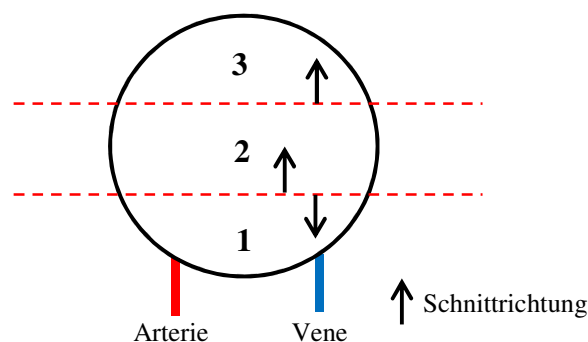


Abbildung 17: Zerschneidung der AV-loop Explantate in drei Loop Anteile für die histologischen und immunhistologischen Analysen

gelegt bis das Paraffin geschmolzen war und nachfolgend im Wärmeschrank bei 58 °C für eine Stunde im Ständer getrocknet.

*Tabelle 10: Entwässerungsprotokoll für die subkutanen und AV-loop Explantate*

Reagenz	Zeit (min)
Formalin 10 %	180
Ethanol 70 %	30
Ethanol 96 %	60
Ethanol 100 %	2 x 60
Isopropanol	2 x 60
Xylol	3 x 60
Paraffin	2 x 60
Spülung mit Paraffin	20

### 3.3.7.3 Histologische Färbungen

Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebeschnitte erfolgte für alle Färbungen nach dem gleichen Protokoll. Eine zweimalige Inkubation in Xylol für 15 Minuten bewirkte die Entparaffinierung der Schnitte. Die anschließende Rehydrierung wurde durch eine absteigende Alkoholreihe (jeweils zweimal 3 Minuten in  $\geq 99,8\%$ , 96 % und 70 % Ethanol) vorgenommen. Im Anschluss wurden die Schnitte zweimal in destilliertem Wasser für 5 Minuten gewaschen. Nach Färbung erfolgte eine abschließende Dehydrierung durch eine aufsteigende Alkoholreihe (Spülung in 70 % Ethanol, 3 Minuten in 96 % Ethanol und zweimal 3 Minuten in  $\geq 99,8\%$  Ethanol) sowie eine zweimalige Inkubation für 5 Minuten in Xylol. Nachfolgend wurden die Schnitte mit Entellan<sup>®</sup> eingedeckt.

#### Hämatoxylin Eosin-Färbung

Von jedem Konstrukt wurden nach Protokoll (3.3.7.5 Auswertung der Färbungen/Histomorphometrie) Schnitte für die morphologische Auswertung ausgewählt und mit Hämatoxylin Eosin (HE) gefärbt. In dieser Übersichtsfärbung werden basophile Strukturen (z. B. Zellkerne) durch Hämalaun blau und azidophile Strukturen (z. B. Zellplasmaproteine) durch Eosin rot angefärbt. Nach Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgte die Inkubation mit Hämalaun nach Mayer für 3 Minuten. Es schlossen sich eine Spülung mit destilliertem Wasser, das Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10–20 Minuten sowie die Inkubation in 0,3%iger wässriger Eosinlösung an. Abschließend wurden die Schnitte für 3 Minuten in Leitungswasser gewaschen.

#### Trichrom Färbung nach Masson Goldner

Eine differenzierte Bindegewebsdarstellung von ausgewählten Schnitten verschiedener Ebenen aller Gruppen wurde durch die Trichrom Färbung nach Masson Goldner (MG)

erzielt. Die Zellkerne werden dunkelbraun bis schwarz angefärbt, Erythrozyten orange, das Zytoplasma sowie die Muskulatur rot und das Bindegewebe und saure Mukosubstanzen grün. Nach Entparaffinierung und Rehydrierung erfolgte die Inkubation mit Eisenhämatoxylin nach Weigert für 6 Minuten. Dieses wurde in destilliertem Wasser abgespült. Die Schnitte wurden in 1%igen Salzsäure-Alkohol eingetaucht und für 5 Minuten in Leitungswasser gespült. Es folgten die Inkubation in einer Azophloxin Lösung (0,5 g Azophloxin und 0,2 ml Eisessig in 100 ml destilliertem Wasser) für 15 Minuten und das Eintauchen in 1%ige Essigsäure. Im Anschluss wurden die Schnitte für 3 Minuten in eine Molybdato-phosphorsäure Orange G Lösung (4 g Molybdato-phosphorsäure-Hydrat und 2 g Orange G in 100 ml destilliertem Wasser) gestellt, in 1%ige Essigsäure eingetaucht, in einer Lichtgrünlösung (0,2 g Lichtgrün-SF gelblich und 0,2 ml Eisessig in 100 ml destilliertem Wasser) für 4 Minuten inkubiert und erneut in 1%ige Essigsäure eingetaucht.

### **Perjodsäure Schiff-Färbung**

Die Perjodsäure Schiff- (periodic acid Schiff, PAS) Färbung dient zum Nachweis von Glykolgruppen in Gewebeschnitten. Diese werden durch die Perjodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert und nachfolgend mit Schiffs Reagenz (fuchsinschweflige Säure) unter Bildung eines rosa bis violetten Farbstoffes angefärbt. Unsubstituierte Polysaccharide, neutrale Mukopolysaccharide, Muko- und Glykoproteine sowie Glyko- und Phospholipide können damit nachgewiesen werden. Es wurde eine Auswahl von Schnitten verschiedener Ebenen aus jeder Gruppe gefärbt. Nach Inkubation in Perjodsäure für 5 Minuten folgte ein Waschschrift zweimal für 5 Minuten in destilliertem Wasser. Die Schnitte wurden 15 Minuten in Schiffs Reagenz gefärbt und anschließend in fließendem Leitungswasser für 5 Minuten gespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun 1 : 10 in destilliertem Wasser für 20–30 Sekunden und anschließendem Bläuen in fließendem Leitungswasser für 10 Minuten.

### **Tartrat-resistente saure Phosphatase-Färbung**

Zur Detektion von Osteoklasten wurde der enzymhistochemische Nachweis der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase (tartrat resistant acidic phosphatase, TRAP) angewendet. Dieses Enzym befindet sich im Zytoplasma von ausgereiften Osteoklasten und bewirkt einen Abbau von anorganischem Phosphat aus der Knochengrundsubstanz. Die Auswahl der Schnitte erfolgte wie in 3.3.7.5 (Auswertung der Färbungen/Histomorphometrie) beschrieben. Nach Entparaffinieren und Dehydrieren wurden die Schnitte für 10 Minuten in TRAP-Puffer gestellt, der durch Lösen von 3,28 g Natriumacetat und 46,01 g di-Natriumtartrat-Dihydrat in 1 l destilliertem Wasser und pH Einstellung auf 5,0 hergestellt wurde. Die Anfärbung erfolgte bei 37 °C in einer TRAP-Färbelösung, die sich aus 10 mg Naphthol AS-Mix Phosphat, 100 µl N-N-Dimethylformamid, 500 µl Triton x 100, 50 ml TRAP-Puffer und 60 mg Fast Red

Violett LB Salt zusammensetzte. Der rote Farbumschlag wurde im Mikroskop beurteilt und je nach Anfärbung der Schnitte nach 10–60 Minuten mit einer zweimaligen Spülung mit destilliertem Wasser für 5 Minuten abgestoppt. Eine Gegenfärbung erfolgte mit 1 : 10 verdünntem Hämalaun in destilliertem Wasser. Die Schnitte wurden für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Als Negativkontrolle diente die Färbung eines Schnittes, welcher zur Inaktivierung des Enzyms für 10 Minuten im Dampfgarer in destilliertem Wasser gekocht wurde.

#### 3.3.7.4 Immunhistologische Färbungen

Die immunhistologischen Färbungen wurden jeweils an einer Auswahl von Schnitten aller Explantate durchgeführt. Die Entparaffinierung und Rehydrierung der Paraffinschnitte erfolgten wie bereits beschrieben (3.3.7.3 Histologische Färbungen). Wenn nicht anders vermerkt, erfolgten die Waschschritte jeweils zweimal für 4 Minuten in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween 20 (tris buffered saline with Tween 20, TBS-T) (0,1 M Tris[hydroxymethyl]-aminomethan, 0,06 M Natriumchlorid, 1 ml Tween 20 auf 1 l destilliertem Wasser, pH 7,6). Alle Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Umrandung des Gewebes mit einem Silikonstift diente der Verhinderung des Abfließens der auf die Schnitte zu pipettierenden Reagenzien. Abschließend wurden die Schnitte mit Aquatex<sup>®</sup> oder im Falle von Fluoreszenzfärbungen mit Fluorprep<sup>®</sup> eingedeckt. Es wurden sowohl für die Primärantikörper als auch für die Sekundärantikörper Negativkontrollen angefertigt, indem diese Reagenzien durch Waschpuffer ersetzt wurden, um unspezifische Färbungen nachweisen zu können.

#### Immunhistochemische Färbungen zur Detektion von Knochenstrukturen

Alkalische Phosphatase-Färbung:

Osteoblasten können durch ihre spezifisch hohe Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase (AP) im Gewebe detektiert werden. Von jedem Explantat wurden ausgewählte Schnitte unter Verwendung des Polymersystems DakoCytomation EnVision<sup>®</sup> + Dual Link System-horseradish peroxidase (HRP) (DAB+, 3,3'-Diaminobenzidin) gefärbt. Zur Antigenmaskierung wurden die Schnitte in einer Küvette mit Citratpuffer mit einem pH von 6,0 aus 0,01 M Citronensäure-Monohydrat in 1 l destilliertem Wasser für 4 Minuten im Dampfgarer inkubiert. Zur Vermeidung einer unspezifischen Hintergrundfärbung folgte ein Blockierungsschritt mit dem Dual Endogenous Enzyme-Blocking Reagent für 15 Minuten und anschließender Spülung. Der zweite Blockierungsschritt wurde mit 10 % Ziegen Serum in PBS für eine Stunde vorgenommen. Der polyklonale Kaninchen-Primärantikörper gegen AP (1 : 100 verdünnt in 10 % Ziegen Serum in PBS) wurde für eine Stunde auf den Schnitten belassen und durch einen Waschschritt entfernt. Im Anschluss wurden die Schnitte mit dem markierten HRP-Polymer für 25 Minuten inkubiert. Nach Waschen wurde die Substratchromogenlösung bestehend aus 1 ml DAB+

Substratpufferlösung mit 20 µl DAB+ Chromogen auf die Schnitte pipettiert. Die braune Anfärbung wurde im Mikroskop kontrolliert und je nach Intensität nach 5–10 Minuten mit zweimaligem Waschen in destilliertem Wasser für 4 Minuten abgestoppt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun wie bereits beschrieben.

#### Kollagen Typ I-Färbung:

Kollagene sind Vertreter der Skleroproteine und kommen u. a. in Haut, Sehnen, Faszien, Bändern sowie in der Grundsubstanz von Knorpel- und Knorpelgewebe vor. Der größte Teil der Knorpelgrundsubstanz wird von Kollagen Typ I gebildet, welches dem Knochen Struktur sowie mechanische Festigkeit verleiht. Diese Färbung diente somit der Visualisierung neugebildeter Knochenstrukturen im Gewebe. Ausgewählte Schnitte aller Explantate wurden mittels Avidin/Biotin Complex (ABC) Methode gefärbt. Nach Entparaffinierung und Rehydrierung schloss sich ein Blockierungsschritt mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in destilliertem Wasser an, der nach 5 Minuten mit einem dreimal zu wiederholenden Waschschrift mit destilliertem Wasser für jeweils 5 Minuten entfernt wurde. Es folgten die Inkubation der Schnitte mit Avidin für 15 Minuten und eine anschließende Spülung. Der Biotinblock wurde aufgetragen und ebenfalls nach 15 Minuten mit einem Waschschrift entfernt. Im Anschluss erfolgte ein Serumblock mit 10 % Ziegen Serum in PBS für 30 Minuten. Der polyklonale Kaninchen-Primärantikörper gegen Kollagen Typ I wurde 1 : 100 in 10 % Ziegen Serum in PBS verdünnt und für eine Stunde inkubiert. Nach einem Waschschrift wurde der 1 : 500 in 10 % Ziegen Serum in PBS verdünnte biotinylierte Ziegen-Sekundärantikörper gegen Kaninchen auf die Schnitte pipettiert und nach einer Einwirkungsdauer von 30 Minuten durch Waschen entfernt. Es schlossen sich die Bedeckung der Schnitte mit dem VECTASTAIN<sup>®</sup> Elite ABC Reagent Ready-To-Use (RTU) für 30 Minuten und eine nachfolgende Spülung an. Die Färbungen mit der Substratchromogenlösung (DAB+) und Hämalaun erfolgten wie bereits beschrieben.

#### **Immunhistochemische Färbungen zur Detektion von Gefäßen**

##### CD31-Fluoreszenzfärbung:

Cluster of differentiation 31 (CD31), auch als platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM-1) bezeichnet, ist ein integrales Membranprotein, welches auf Endothelzellen und auch Thrombozyten sowie einigen Granulozytensubpopulationen exprimiert wird. Für diese Färbung wurde das biotinfreie CSA II (Catalyzed Signal Amplification) System verwendet. Die Schnitte wurden in einer Antigendemaskierungslösung (Dako Target Retrieval Solution RTU) für eine Minute bei 100 kPa und 120 °C im Dampftopf gekocht und anschließend dreimal für 4 Minuten gewaschen. Es folgten der Peroxidaseblock für 15 Minuten sowie ein Waschschrift. Nach einem Serumblock mit 10 % Ziegen Serum in PBS sowie dem Proteinblock für jeweils 30 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem monoklonalen anti-Schaf Maus-Primärantikörper gegen CD31 in einer Verdünnung von 1 : 70 in 10 % Ziegen Serum in PBS für eine Stunde. Zusätzlich wurde eine Isotypkontrolle

durch Inkubation mit IgG2a 1 : 70 in 10 % Ziegen Serum in PBS durchgeführt. Die Schnitte wurden gewaschen und mit dem Anti-Maus Immunglobulin-HRP für 15 Minuten bedeckt. Nach einem Waschschriff schlossen sich die lichtgeschützte Inkubation mit dem Amplifikationsreagenz für 15 Minuten und eine nachfolgende Spülung an. Die Gegenfärbung wurde mit 4',6-Diamidin-2'-Phenylindol Dihydrochlorid (DAPI) (1 : 1 000 verdünnt in destilliertem Wasser) vorgenommen und nach 5 Minuten mit destilliertem Wasser für 5 Minuten abgespült.

Von-Willebrand-Faktor-Färbung:

Die Detektion der Blutgefäße ist durch die Verwendung eines Antikörpers gegen den von-Willebrand-Faktor (vWF) möglich, der u. a. von den Endothelzellen der Blutgefäße gebildet wird. Die Färbung erfolgte unter Verwendung des Polymersystems DakoCytomation EnVision<sup>®</sup> + Dual Link System (HRP) (DAB+). Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte mit einer 0,1%igen Proteaselösung in PBS für 20 Minuten bedeckt. Nach einem Waschschriff wurde der Dual Endogenous Enzyme Block aufgetragen, für 15 Minuten inkubiert und durch Waschen entfernt. Es erfolgte zusätzlich ein Serumblock mit 10 % Ziegen Serum in PBS für 30 Minuten. Der polyklonale Kaninchen-Primärantikörper gegen vWF wurde 1 : 30 in 10 % Ziegen Serum in PBS verdünnt und für 14 Stunden bei 4 °C inkubiert. Es schlossen sich ein Waschschriff sowie das Auftragen des HRP-Polymers an. Nach einer Einwirkungsdauer von einer Stunde und einem Waschschriff wurden die Schnitte mit der Substratchromogenlösung (DAB+) sowie mit Hämalaun wie bereits beschrieben angefärbt.

### **Immunhistochemische Färbungen zur Vitalitätsbeurteilung der implantierten MSC**

Ki67-Fluoreszenzfärbung:

Bei Ki67 handelt es sich um einen Proliferationsmarker. Dieses Antigen wird von Zellen exprimiert, die sich in der G1-, S-, G2- und M-Phase des Zellzyklus befinden. Die Färbung erfolgte, ähnlich wie bereits für die CD31-Färbung beschrieben, mit dem CSA II System. Folgende Schritte wurden modifiziert: Die Antigendemaskierung in einer Antigendemaskierungslösung (Dako Target Retrieval Solution RTU) wurde in der Mikrowelle für 20 Minuten bei 400 Watt durchgeführt. Der monoklonale anti-human Maus-Primärantikörper gegen Ki67 wurde 1 : 50 in 10 % Ziegen Serum in PBS verdünnt und für eine Stunde inkubiert. Zusätzlich erfolgte eine Isotypkontrolle durch Inkubation mit IgG1 1 : 50 in 10 % Ziegen Serum in PBS.

TUNEL:

Mittels der TUNEL-Färbung (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) ist es möglich, Zellkerne von apoptotischen Zellen zu detektieren, indem das Enzym TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) markierte Nukleotide an die Bruchenden fragmentierter DNA-Stränge koppelt. Zu Beginn wurde der für die

Waschschritte verwendete TBS-Puffer (20 mM Tris[hydroxymethyl]-aminomethan, 140 mM Natriumchlorid in 1 l destilliertem Wasser, pH 7,6) sowie ein Tris-Puffer (10 mM Tris[hydroxymethyl]-aminomethan in 500 ml destilliertem Wasser, pH 8) hergestellt. Die Färbung wurde mittels des Fluorescein FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kits vorgenommen. Die Schnitte wurden mit einer hergestellten Proteinase K Lösung (20 µg/ml in Tris-Puffer) für 20 Minuten bedeckt und anschließend gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 20 Minuten mit TdT Equilibration Puffer. TdT Labeling Mixture (3 µl Reaction Mix + 57 µl TdT Enzym, auf Eis) wurde auf die Schnitte aufgebracht und nach 1,5 Stunden Inkubation bei 37 °C abgespült. Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI wie bereits beschrieben.

### **3.3.7.5 Auswertung der Färbungen/Histomorphometrie**

Die Analyse der histologisch und immunhistologisch gefärbten Schnitte erfolgte im Leitz DM RBE Mikroskop. Mittels der angeschlossenen Leica DFC420 Kamera und dem Softwareprogramm Leica Application Suite V3 wurden digitale Fotos der Schnitte angefertigt und analysiert.

Die Analysen der Fluoreszenzfärbungen wurden in einem Olympus Fluoreszenz-Inversmikroskop (IX81) durchgeführt. Mittels angeschlossener Fluoreszenzkamera (XM10) und Softwareprogramm (cellSens Dimension-V1.5) erfolgte die Aufnahme digitaler Fotos.

Für die histomorphometrischen Analysen (Knochenfläche, Querschnittsfläche, Fläche der NanoBone® Partikel, Vitalfläche, TRAP-positive Zellen) wurden von allen Explantaten jeweils zwei Schnitte aus verschiedenen Ebenen des Explantates, bzw. im Falle der AV-loop Explantate je zwei Schnitte aus verschiedenen Ebenen der Loop Anteile 1–3 (Abbildung 17), ausgewertet. Zwischen zwei Ebenen lagen jeweils mindestens 90 µm (entspricht 30 Schnitten à 3 µm). Für die Auswertungen, exklusive der TRAP-Auswertung, wurden die Präparate HE gefärbt und der Gewebeschnitt in 25facher Vergrößerung fotografiert. Die automatisierte Zusammensetzung der Einzelaufnahmen zu einem Gesamtbild erfolgte im Softwareprogramm Adobe Photoshop CS3 extended, die Auswertung nach Import in der Leica Application Suite V3. Es wurden jeweils die Mittelwerte der Messergebnisse beider Ebenen gebildet und für die nachfolgenden statistischen Analysen verwendet.

### **Quantifizierung der Knochenfläche in den subkutanen und AV-loop Konstrukten**

Die Messung der neugebildeten Knochenfläche erfolgte unter Verwendung einer Binärmaske. Mittels der Software konnten nach Markierung der angefärbten Knochenoberfläche alle Pixel in derselben Farbnuance detektiert werden und die so automatisch markierte Fläche ausgemessen werden. Eine manuelle Nachbearbeitung war in einigen Proben aufgrund ähnlicher Anfärbung der Knochenstrukturen und des umgebenden

Bindegewebes erforderlich. Dies erfolgte durch den Ausschluss von fälschlicherweise markierten Bindegewebsbereichen bzw. durch den Einschluss von nicht markierten Knochenstrukturen. Nach Ausmessung der gesamten Gewebefläche konnte die prozentuale Knochenneubildungsrate im Gewebeschnitt berechnet werden.

Um in den subkutanen Versuchsgruppen die Auswirkung des unterschiedlichen Knochenbildungspotenzials der Schafe auf die Studie zu reduzieren, wurde innerhalb jeden Schafes die gemessene prozentuale Knochenfläche der einzelnen Implantate auf die prozentual gebildete Knochenfläche in der Kontrollgruppe in diesem Schaf zurückgerechnet.

$$\text{Knochenneubildung (\%)} = \text{Knochenfläche (\%)} (\text{Versuchsgruppe}) - \text{Knochenfläche (\%)} (\text{Kontrollgruppe}) \quad (3.6)$$

### **Quantifizierung der Querschnittsfläche der subkutanen Konstrukte**

Um die Querschnittsfläche der NanoBone<sup>®</sup> Blöcke nach der subkutanen Implantation zu evaluieren und somit eine Aussage bezüglich Resorption und Umbau von NanoBone<sup>®</sup> zu erhalten, wurde die Gesamtfläche der Gewebeschnitte in Bezug zu der Querschnittsfläche eines NanoBone<sup>®</sup> Blockes vor Implantation (NanoBone<sup>®</sup> nativ) gesetzt. Die Herstellung von Gewebeschnitten des nativen NanoBone<sup>®</sup> Blockes sowie die dafür notwendigen Vorbereitungen erfolgten wie für die subkutanen Explantate beschrieben. Es wurden zwei Ebenen des nativen NanoBone<sup>®</sup> Blockes ausgewertet.

### **Quantifizierung der Fläche der NanoBone<sup>®</sup> Partikel in den subkutanen und AV-loop Konstrukten**

Die NanoBone<sup>®</sup> Partikel konnten bei einem deutlichen Farbunterschied vom umliegenden Gewebe mit einer Binärmaske, wie bereits für die Knochenflächenauswertung beschrieben, markiert werden. Nachfolgend konnte die Fläche berechnet werden, die von Bindegewebe oder Poren, in die noch kein Gewebe eingewachsen war, eingenommen wurde. Als Referenzwert wurde die NanoBone<sup>®</sup> Fläche zweier Ebenen eines Blockes vor Implantation (NanoBone<sup>®</sup> nativ) ausgemessen und in Bezug zur Gesamtfläche gesetzt. Entsprechend der Explantate wurde auch in diesem Block die Porenoberfläche bestimmt.

Mittels dieser Werte konnte die Degradierungsrate des Knochenersatzmaterials in den einzelnen Versuchsgruppen berechnet werden. Weiterhin war ein Vergleich der Poren-/ Bindegeweboberfläche möglich.

### **Quantifizierung der von Gewebe durchwachsenen Fläche in den subkutanen und AV-loop Konstrukten (Vitalfläche)**

Es wurde die von Gewebe durchwachsene, vitalisierte bzw. vaskularisierte Fläche der NanoBone<sup>®</sup> Blöcke ausgemessen und in Bezug zur Gesamtfläche des Gewebeschnittes gesetzt. Dadurch war es möglich, die prozentual vitalisierte Fläche in den einzelnen Versuchsgruppen zu berechnen und miteinander zu vergleichen.



### Quantifizierung der TRAP-positiven Zellen in den subkutanen und AV-loop Konstrukten

Um das Ausmaß der osteoklastischen Aktivität in den einzelnen Präparaten zu bestimmen, wurden von jeweils zwei Ebenen von jedem Konstrukt, bzw. von jedem Loop Anteil, TRAP-Färbungen gemacht. In 200facher Vergrößerung wurden von jeder Ebene jeweils digitale Fotos nach einem standardisierten Schema aufgenommen. Bei den subkutanen Explantaten wurde ausgehend vom Mittelpunkt das Sichtfeld jeweils horizontal sowie vertikal bis zu den Rändern des NanoBone® Blockes verschoben (Abbildung 18A). Bei den AV-loop Explantaten erfolgte die Auswertung jeweils eines Sichtfeldes oberhalb (A1 bzw. V1) sowie unterhalb (A2 bzw. V2) der Arterie bzw. Vene und je zweier peripherer (P1, P2) sowie zentraler (Z1, Z2) Sichtfelder nach dem Schema in Abbildung 18B. Damit wurden für die subkutanen Gruppen je vier und für die AV-loop Gruppen je acht Regions Of Interest (ROI) in die Auswertung miteinbezogen. Es schlossen sich die Auszählung der TRAP-angefärbten Zellen und die Ausmessung der Länge der NanoBone® Ränder pro ROI an. Um Osteoklasten von anderen TRAP-positiven Zellen, wie Gewebsmakrophagen und Fremdkörperriesenzellen sowie von inaktiven Osteoklasten zu differenzieren, mussten folgende Kriterien erfüllt sein: Nähe zu Knochen/NanoBone®, Mehrkernigkeit (> 2 Zellkerne), Faltensaum (ruffeld border), granuliertes Zytoplasma. Aus den Werten wurde die Osteoklastendichte pro Mikrometer NanoBone® Rand berechnet.

In den subkutanen Gruppen wurden die Mittelwerte der Ergebnisse aller ROIs ermittelt, in der AV-loop Gruppe die Mittelwerte der arteriellen, venösen, peripheren und zentralen ROIs. Als Analyse Software diente das Modul Interaktive Messung der Leica Application Suite.

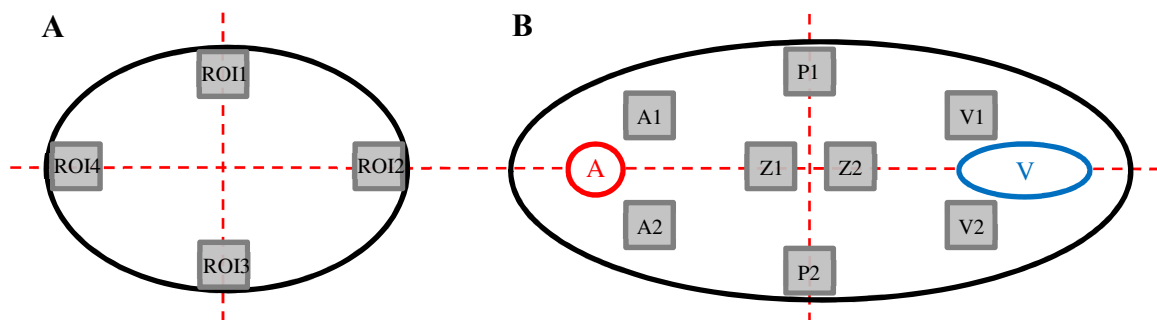


Abbildung 18: Schema für die histologische Auswertung der osteoklastischen Aktivität

Die Anzahl der Osteoklasten pro Mikrometer NanoBone® Rand wurde nach standardisiertem Schema in bestimmten ROIs in den subkutanen (A) und AV-loop (B) Konstrukten ermittelt. (ROI = region of interest, A = Arterie, P = peripher, V = Vene, Z = zentral)

### 3.3.8 Rasterelektronenmikroskopie/energiedispersive Röntgenspektroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) und die energiedispersive Röntgenspektroskopie (energy dispersive x-ray spectroscopy, EDX) dienen der Charakterisierung der Materialarchitektur und -zusammensetzung bzw. des Umbaus (Matrixwechsel) der NanoBone<sup>®</sup> Blöcke. Für diese Untersuchungen wurden 3 µm dicke Gewebeschnitte der entkalkten Explantate aller Versuchsgruppen auf Plexiglasobjektträger (patho-service GmbH, Oststeinbek, D) aufgezogen. Die Analyse in Kooperation mit Dr. Gerd Holzhüter (Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Universität Rostock) erfolgte in einem Rasterelektronenmikroskop DSM 960 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, D) mit Silizium-Detektor (Software, SAMx, Lavardens, F).

### 3.3.9 Molekularbiologische Untersuchung mittels quantitativer real-time PCR

#### 3.3.9.1 Verwendetes Material

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte für die molekularbiologische Untersuchung

Chemikalien	Hersteller
ABsolute™ QPCR SYBR <sup>®</sup> Green Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Agarose, TopVision™	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
Borsäure	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Chloroform z. A., min. 99,5 % (stab.)	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, D
Ethanol absolute for analysis	Merck KGaA, Darmstadt, D
Ethidiumbromidlösung, 10 mg/ml	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, D
Ethylendiamintetraessigsäure Tetranatriumsalz Hydrat	Fluka Analytical, Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, USA
Isopropanol, 2-Propanol z. A., min. 99,7 %	Th. Geyer GmbH & Co. KG, Renningen, D
Omniscript <sup>®</sup> Reverse Transcription Kit/ Oligo-dT-Primer/RNase Inhibitor	Qiagen N.V., Hilden, D
6X Orange DNA Loading Dye	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
O'Range Ruler™ 20bp DNA Ladder, RTU	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, D
PCR-Platte, Low-Profile Multiplate unskirted PCR Plate	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
RNase-Free DNase Set	Qiagen N.V., Hilden, D
RNase freies Wasser, UltraPure™ DEPC- Treated Water	Invitrogen™, Life Technologies™, Carlsbad, USA

RNeasy <sup>®</sup> Mini Kit	Qiagen N.V., Hilden, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt, D
TRIzol <sup>®</sup> Reagent	Ambion <sup>®</sup> , Life Technologies <sup>™</sup> , Carlsbad, USA
Verbrauchsmaterial	Hersteller
Mahlbecher 10 ml, Mahlkugeln Ø 12 mm	Retsch GmbH, Haan, D
Reaktionsgefäß, Safe-lock 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifugenröhrchen, Falcon <sup>™</sup> , Blue Max	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Geräte	Hersteller
Bio-Rad iCycler iQ5 PCR Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, Kalifornien, USA
E-Box 1 000	Vilber Lourmat, Marne-la-Vallée, F
Elektrophoresekammer; Consort E835 Elektrophorese Power Supply	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland; Consort NV, Turnhout, B
Heizblock, Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg, D
Mikrowelle, AEG Micromat	AEG, Frankfurt am Main, D
Photometer, BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, D
Schwingmühle, MM200	Retsch GmbH, Haan, D
Zentrifuge, Heraeus Fresco 21	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA

### 3.3.9.2 Subkutane Versuchsgruppen

#### RNA-Isolation

Das bei  $-80\text{ °C}$  gelagerte Gewebe für die RNA-Isolation (ribonucleic acid, Ribonukleinsäure) und die nachfolgende molekularbiologische Analyse wurde abgewogen. Für die Homogenisierung der Probe wurde diese zusammen mit zwei Mahlkugeln in einen Mahlbecher gegeben und für 2 Minuten in flüssigem Stickstoff gekühlt. Nach Einspannen in eine Schwingmühle wurden die Proben mit einer Schwingfrequenz von 22/s zweimal für 5 Minuten homogenisiert. Zwischen den Intervallen erfolgte die Kühlung in flüssigem Stickstoff für 2 Minuten. Die folgenden Angaben beziehen sich auf ein Probengewicht von 1,5 g. Das Gewebe wurde in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 15 ml TRIzol<sup>®</sup> Reagent zugegeben. Nach Mischen und Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurde es mit dem Zusatz von 3 ml Chloroform kräftig geschüttelt und erneut bei Raumtemperatur für 3 Minuten inkubiert. Die Probe wurde bei  $4\text{ °C}$  und  $20\,000 \times g$  für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen, unter Zugabe von 3 ml Chloroform kräftig geschüttelt und der Zentrifugationsschritt wiederholt. Nach Abnahme des Überstandes erfolgte die Inkubation mit 7,5 ml Isopropanol bei Raumtemperatur für 10 Minuten. Die Probe wurde in 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt bei  $8\,000 \times g$  und  $4\text{ °C}$  für 10 Minuten an. Der

Überstand wurde verworfen, die Pellets mit 1,5 ml Ethanol gepoolt und für 5 Minuten bei 8 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach 5–10 Minuten Trocknung wurde das Pellet in 87,5 µl RNase freiem Wasser gelöst. Es schloss sich der DNase Verdau unter Verwendung des RNase-Free DNase Sets an. Die Probe wurde mit 10 µl RDD Puffer sowie 2,5 µl DNase I für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende RNA Aufreinigung erfolgte mit dem RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit. Zur Vorbereitung wurde eine RNeasy Mini Spin Säule zusammen mit 500 µl RLT Puffer in ein 2 ml Reaktionsgefäß gegeben und für eine Minute bei 300 x g zentrifugiert. Die Probe wurde mit 350 µl RLT Puffer sowie 250 µl Ethanol gemischt und auf die RNeasy Mini Spin Säule pipettiert. Nach Zentrifugation bei 8 000 x g und 4 °C für eine Minute wurde der Durchlauf erneut auf die Säule gegeben, der Zentrifugationsschritt wiederholt und der Durchlauf verworfen. 500 µl RPE Puffer wurden auf die Säule pipettiert, bei 8 000 x g und 4 °C für eine Minute zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Dieser Schritt wurde mit einer Zentrifugationsdauer von 2 Minuten wiederholt. Es folgte die Zentrifugation der Mini Spin Säule bei 13 000 x g. Nach Überführen der Säule in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß wurde die RNA mit 30 µl RNase freiem Wasser bei 8 000 x g und 4 °C für eine Minute eluiert. Dieser Schritt wurde mit dem Eluat wiederholt. Abschließend erfolgte die Messung der RNA Menge in einem Photometer. Die Probe wurde bei -20 °C bis zur weiteren Analyse eingefroren.

### **cDNA-Synthese**

Die cDNA-(complementary deoxyribonucleic acid, komplementäre Desoxyribonukleinsäure) Synthese wurde unter Verwendung des Omniscript<sup>®</sup> Reverse Transcription Kits, Oligo-dT-Primern und RNase Inhibitor durchgeführt. Der Master Mix setzte sich pro Reaktion aus je 2 µl zehnfach RT Puffer, dNTP Mix und 10 µM Oligo-dT-Primer sowie 1 µl 10 units/µl RNase-Inhibitor zusammen. Auf 1 µg isolierte RNA wurden 12 µl RNase freies Wasser gegeben und bei 65 °C für 15 Minuten im Heizblock inkubiert. Nach Zentrifugation bei 8 000 x g für eine Minute wurde die Probe auf Eis gestellt. Es folgten die Zugabe des Master Mix sowie die Inkubation bei 25 °C für 10 Minuten. Pro Reaktion wurde 1 µl Omniscript Reverse Transcriptase in die Probe pipettiert und 60 Minuten bei 37 °C im Heizblock erwärmt. Anschließend erfolgte die Inkubation bei 95 °C für 5 Minuten. Die Probe wurde auf Eis gestellt und bei -20 °C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

### **Quantitative real-time PCR**

Die cDNA Proben wurden mittels einer quantitativen real-time PCR (polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion, PCR) im Bio-Rad iCycler iQ5 PCR Thermal Cycler jeweils als dreifacher Ansatz analysiert. Die Sequenzen der Primer sind in Tabelle 12 aufgeführt. Als Referenzgen diente Actin.

Tabelle 12: Übersicht der Sequenzen der verwendeten Primer

	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
Actin	´gtccacctccagcagatgt´	´atctcgtttctgcgcaagt´
Kollagen Typ I	´aagacatcccaccagtcacc´	´taagttcgtcgcagatcacc´
Osteocalcin	´tgagctcaaccctgactgtg´	´gtcctggagagaagccagag´
Osteonectin	´acgggtacctgtctcacacc´	´gtccagggcgatgtactgt´
Osteopontin	´tcccactgacattccaacaa´	´gcctggggtctgtaactctga´
RUNX2	´cgcatctcatcccagtat´	´gcctggggtctgtaactctga´

Anmerkungen. RUNX2 = runt-related transcription factor 2

Zur Vorbereitung wurde pro Ansatz ein Master Mix aus 5,5 µl RNase freiem Wasser sowie 12,5 µl Absolute™ QPCR SYBR® Green Mix und 5 µl der zu analysierenden cDNA hergestellt. Die Ansätze wurden unter Zugabe von je 1 µl des Vorwärts- und Rückwärtsprimers in eine PCR-Platte pipettiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1 600 x g für 5 Minuten wurde die PCR gestartet (Tabelle 13). Die Lagerung der Platte erfolgte bei -20 °C bis zur weiteren Analyse.

Tabelle 13: Programmierung des Bio-Rad iCycler iQ5 PCR Thermal Cycler

Zyklus	Anzahl	Temperatur (°C)	Zeit (s)
1	1x	95	900
2	50x	95	30
		60	30
3	1x	72	40
		95	30
4	1x	55	30
5	80x	55 (Erhöhung der Temperatur um 0,5 °C/Zyklus)	10
6	1x	4	wird gehalten

### Relative Quantifizierung

Der Nachweis der Expression knochenspezifischer Gene in den subkutanen Versuchsgruppen erfolgte mittels relativer Quantifizierung. Bei dieser Methode werden die Expressionsmuster normalisiert, indem die Genexpression auf ein nicht reguliertes, konstant exprimiertes Referenzgen (housekeeping gene) bezogen wird. Für die Quantifizierung der DNA Ausgangsmenge werden die Anzahl der PCR Zyklen, die notwendig sind, um ein ausreichendes Fluoreszenzsignal zu induzieren, bestimmt. An diesem sogenannten Ct-Wert (cycle of threshold) befindet sich in allen Proben dieselbe Konzentration an DNA. Zur Berechnung von deltaCt wird im ersten Schritt der Ct-Wert

des Referenzgens vom Ct-Wert des Zielgens abgezogen (Normierung). Zusätzlich wird der deltaCt-Wert der Kontrollgruppe (NanoBone<sup>®</sup> + Fibrin) für jedes Zielgen bestimmt. Im nächsten Schritt erfolgt zur Bestimmung der Quantifizierung der Expression von jedem Zielgen die Subtraktion des deltaCt-Wertes der Kontrollgruppe vom deltaCt-Wert der zu untersuchenden Probe. Um den relativen Expressionsunterschied einer Probe zu der Kontrolle, normiert zum Referenzgen, zu erhalten, wird die Ratio mit folgender Formel berechnet (3.7) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

$$\begin{aligned} \text{deltaCt} &= \text{Ct (Zielgen)} - \text{Ct (Referenzgen)} \\ \text{deltadeltaCt} &= \text{deltaCt (Probe)} - \text{deltaCt (Kontrolle)} \\ \text{Ratio} &= 2^{-\text{deltadeltaCt}} \end{aligned} \quad (3.7)$$

### Gelelektrophorese

Als Vorbereitung für die Gelelektrophorese erfolgte die Herstellung eines zehnfach konzentrierten Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffers (0,45 M Tris, 0,44 M Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA in 1 l destilliertem Wasser, pH 8,0). Für das 4%ige Agarosegel wurden 4 g Agarose in 100 ml des in destilliertem Wasser 1 : 10 verdünnten TBE-Puffers gegeben und bei 800 Watt in der Mikrowelle erhitzt. Nach Zugabe von 5 µl 1%iger Ethidiumbromidlösung zu der leicht abgekühlten Agarose erfolgte unmittelbar die Ausgießung des Gels. Ein Kamm zur Aussparung von Probestaschen wurde eingesetzt und das Gel für 30 Minuten stocken gelassen. Zu den Proben wurde 6X Orange DNA Loading Dye gegeben. Die Elektrophoresekammer wurde mit TBE-Puffer 1 : 10 verdünnt in destilliertem Wasser und 5 µl 1%iger Ethidiumbromidlösung befüllt, das Gel eingesetzt und der Kamm entfernt. Nach Spülen der Taschen wurden die Proben aufgetragen und 10 µl des Markers O'Range Ruler<sup>™</sup> 20bp DNA Ladder RTU in das Gel gegeben. Die Elektrophorese lief bei 60 V ab. Den Abschluss bildete eine fotografische Aufnahme des Gels in der E-Box 1 000 bei ultraviolettem Licht.

## 3.3.10 Bildgebende Diagnostik

### 3.3.10.1 Farbkodierte Dopplersonographie

Die Überprüfung der Durchgängigkeit der Gefäßschleife in der AV-loop Versuchsgruppe erfolgte zweimal wöchentlich mit einer farbkodierten Dopplersonographie (ACUSON CV70<sup>™</sup>, Siemens AG, Erlangen, D). Die Schafe wurden in Sitzposition fixiert und die Gefäße am Kammereingang mit einem 13 MHz Schallkopf dargestellt.

### 3.3.10.2 Intravitale Magnetresonanztomographie

Um die von der arteriovenösen Gefäßschleife ausgehend neugebildeten Gefäße intravital visualisieren zu können, wurde in Kooperation mit PD Dr. Andreas Hess und Dr. Lubos

Budinsky (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universität Erlangen-Nürnberg) eine Magnetresonanztomographie (MRT) an 2 Schafen aus der AV-loop Versuchsgruppe nach 16 sowie nach 18 Wochen durchgeführt. Durch diese Untersuchung konnte festgestellt werden, ob der NanoBone<sup>®</sup> Block vollständig vaskularisiert wurde und explantiert werden konnte oder ob der Explantationszeitpunkt verschoben bzw. eine Modifikation des Modells vorgenommen werden sollte. Die Schafe wurden, wie bereits beschrieben (3.3.6.2 Anästhesie der Schafe), mit Midazolam und Ketamin anästhesiert und intubiert.

Die Durchführung der Messungen erfolgte in einem Siemens MAGNETOM Aera 1.5 T (Siemens AG, Erlangen, D). Um das in der Kammer gebildete Gefäßnetzwerk visualisieren zu können, wurde eine flexible Ringspule um die Kammer gelegt und fixiert. Anschließend erfolgte über einen ZVK die langsame intravenöse Injektion des Kontrastmittels Gadotersäure (Dotarem<sup>®</sup> 0,5 mmol/ml, Guebert S. A., Villepinte, F) in einer Dosierung von 0,1 mmol/ml. Über den gesamten Untersuchungszeitraum hinweg erhielten die Schafe über den ZVK eine Infusion mit einer Vollelektrolytlösung (Jonosteril<sup>®</sup>, Fresenius Kabi, Bad Homburg, D).

Ein T1 gewichteter Datensatz wurde unter der Verwendung einer high resolution 3D FLASH Sequenz (TR: 10 ms, TE: 5,02 ms, Flip angle 20, ACQ 3) gescannt, der einen Bereich von 180 x 180 mm mit einer Matrix von 320 x 320 px abdeckte. Die Schnittdicke lag bei 0,5 mm, die Anzahl der Schnitte bei 120. Die Auflösung betrug 0,5625 x 0,5625 mm.

Um die Sauerstoffsättigung in der Kammer zu visualisieren, wurde ein T2\* gewichteter Datensatz unter Verwendung einer 2D Flash Sequenz (TR: 83 ms, TE: 3,63 ms, Flip angle 25, ACQ 1) gescannt, der einen Bereich von 200 x 200 mm mit einer Matrix von 128 x 128 px abdeckte. Die Schnittdicke lag bei 3,0 mm, die Anzahl der Schnitte bei 4. Die Auflösung betrug 1,5625 x 1,5625 mm. Grundlage dieser sogenannten funktionellen MRT-Messung ist der BOLD-Effekt (blood oxygenation level dependent, abhängig vom Blutsauerstoffgehalt), der darauf beruht, dass Hämoglobin im Blut in unterschiedlichen Oxygenierungszuständen vorliegt. Dabei verhält sich desoxygeniertes Hämoglobin aufgrund des Vorliegens von ungepaarten Elektronen paramagnetisch, während oxygeniertes Hämoglobin nur gepaarte Elektronen enthält und somit diamagnetisch wirkt (PAULING & CORYELL, 1936). Die Suszeptibilitätsänderungen im Falle des desoxygenierten Hämoglobins führen zu lokalen Feldinhomogenitäten, die zu einem Signalrückgang führen und eine verkürzte T2\*-Zeit zur Folge haben.

Für die Datenanalyse wurde die Bildverarbeitungssoftware MagnAn (BioCom GbR, Uttenreuth, D) zur Analyse von 4D-Daten verwendet, die auf der Software IDL (Exelis Visual Information Solutions, Boulder, USA) basiert. Zu Beginn erfolgte die Segmentierung der Kammer sowie des Kammerinhaltes mittels eines mathematischen

Algorithmus, dem die bekannte Geometrie der Kammer zugrunde lag. In diesem Kammervolumen wurde nachfolgend der mittlere Grauwert sowie die 1,0fache Standardabweichung für jede Messung bestimmt und diente als Schwellenwert zur Segmentierung des perfundierten Volumens. Als Maß für das perfundierte Gefäßvolumen konnten anschließend alle Voxel oberhalb des Schwellenwertes gemessen werden. Die Darstellung der Daten erfolgte im 3D-Visualisierungs- und Grafikverarbeitungsprogramm Amira (VSG–Visualization Sciences, Merignac Cedex, F) mittels einer Maximum Intensity Projection (MIP, Maximumintensitätsprojektion). Dadurch war es möglich, aus einem Stapel von Bildern dreidimensionale Projektionen zu berechnen, mittels denen ein räumlicher Eindruck geschaffen werden konnte. Die dreidimensionalen Datensätze wurden durch Auswählen des Datenpunktes maximaler Intensität entlang der Projektionsrichtung in zweidimensionale Projektionsbilder umgerechnet und nachfolgend abgebildet. Unter Anwendung eines marching cube Algorithmus konnten die Voxel oberhalb des Schwellenwertes als Isosurface dargestellt werden und das perfundierte Volumen sowie die Oberfläche berechnet werden.

Ergänzend erfolgte die Visualisierung der Sauerstoffsättigung in der Kammer mittels der Software syngo MapIt (Siemens AG, Erlangen, D).

Es wurden die Daten der wiederholt gemessenen Schafe zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (16 Wochen versus 18 Wochen) verglichen. Die Messung der Sauerstoffsättigung wurde zum Zeitpunkt 18 Wochen durchgeführt.

### **3.3.10.3 Mikro-Computertomographie**

In der AV-loop Versuchsgruppe wurde die Gefäßschleife nach Explantation, wie bereits beschrieben (3.3.6.4 Versuchsabschnitt 2: AV-loop Versuchsgruppe), mit einem Kontrastmittel perfundiert, um mittels Mikro-Computertomographie ( $\mu$ CT) die Vaskularisation visualisieren und berechnen zu können. Das Konstrukt wurde in Kooperation mit Dr. Marek Karolczak (Institut für Medizinische Physik, Universität Erlangen-Nürnberg) in einem hochauflösenden „ForBild“ Scanner mit variabler Geometrie gescannt. Die Röhrenspannung betrug 40 kV, die Voxelgröße 50  $\mu$ m und die Messdauer ca. 10 Minuten bei einer Strahlendosis von 200 mGy.

Wie zur Datenanalyse der MRT-Untersuchungen wurde auch hier eine Nachverarbeitung der dreidimensionalen Datensätze mittels MIP vorgenommen. Die Darstellung der von Kontrastmittel perfundierten Gefäße erfolgte als Isosurface-Extraktion. Anhand der Daten erfolgte die Berechnung der Länge, des Radius sowie des Volumens der Gefäßstrukturen. Zusätzlich diente eine farbkodierte Isosurface-Extraktion der Visualisierung der unterschiedlichen Gefäßdurchmesser. Diese Untersuchungen wurden an zwei AV-loop Konstrukten durchgeführt.



### 3.3.11 Statistische Auswertung – Knochen Tissue Engineering

Alle statistischen Analysen wurden mit der Statistiksoftware SPSS (SPSS 18.0, SPSS Inc., IL, USA) durchgeführt.

Die in den histomorphometrischen und molekularbiologischen Analysen ermittelten Werte wurden mit einer einfaktoriellen Varianzanalyse (analysis of variance, ANOVA) untersucht. Bei signifikanter ANOVA schloss sich nachfolgend als post-hoc-Test der Tukey HSD-Test an. Die Überprüfung auf Normalverteilung erfolgte aufgrund der kleinen Gruppengröße mit dem Shapiro Wilk-Test. Die Sphärizität wurde mittels des Mauchly-Tests kontrolliert. Aufgrund der geringen Gruppengröße wurde in jedem Fall, auch bei Annahme der Sphärizität, die Greenhouse-Geisser Korrektur angewendet. Waren die Werte nicht normalverteilt, erfolgte die Prüfung mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test. Bei Signifikanz schlossen sich Mehrfachvergleiche mit dem Mann-Whitney U-Test mit einem nach Bonferroni korrigierten Signifikanzniveau ( $\alpha' = \alpha/m$ ;  $\alpha$  = Signifikanzniveau,  $m$  = Anzahl der Vergleiche) an. Im Falle der Überprüfung der Mittelwerte zweier Stichproben wurde der Student's t-Test für unabhängige Stichproben angewendet. Das Vorliegen von Varianzhomogenität wurde mit dem Levene-Test geprüft. Bei nicht normalverteilten Werten erfolgte die Durchführung des nicht-parametrischen Mann-Whitney U-Tests.

Alle Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Ein  $p$ -Wert  $\leq 0,05$  wurde als statistisch signifikant, ein  $p$ -Wert  $\leq 0,01$  als statistisch hochsignifikant angesehen.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Etablierung einer optimalen Gerinnungshemmung im Schaf

#### 4.1.1 Verfahren zur Messung der Thrombozytenfunktion im Schaf

Für die Evaluierung eines Testsystems zur Überprüfung der Thrombozytenfunktion im Schaf wurde das Verfahren der Impedanzaggregometrie (Multiplate<sup>®</sup> Analyzer) mit dem Blut von unbehandelten gesunden Schafen ( $n = 2$ ) getestet. Die Endkonzentrationen der Agonisten wurden entsprechend laborinterner Standards für humanes Blut gewählt (ADP: 6,5  $\mu\text{M}$ , AA: 0,5 mM, TRAP-6: 32  $\mu\text{M}$ ). Als Zielwerte dienten laborinterne Referenzwerte für humanes Blut: ADP: 534–1220 AU\*min, AA: 745–1361 AU\*min, TRAP-6: 941–1563 AU\*min. ADP konnte eine Thrombozytenaggregation im Bereich der Zielwerte induzieren ( $738 \pm 125,87$  AU\*min). AA und TRAP-6 führten sowohl in Konzentrationen, die für humanes Blut verwendet werden, als auch in erhöhten Konzentrationen (AA: 6,56 mM, TRAP-6: 320  $\mu\text{M}$ ) zu keiner ausreichenden Thrombozytenaggregation.

Die Durchführung der Lichttransmissionsaggregometrie (LTA, Born Aggregometrie) erfolgte ebenfalls unter Verwendung laborintern ermittelter Agonistenkonzentrationen für humanes Blut (Col: 0,19 mg/ml, ADP:  $2 \times 10^{-2}$  mM, AA: 1,64 mM). Kollagen und ADP konnten in den angegebenen Endkonzentrationen eine Thrombozytenaggregation im ovinen PRP induzieren. Die Endkonzentration von AA musste von 1,64 mM auf 10,93 mM erhöht werden, um ein ausreichendes Maß einer Thrombozytenaggregation zu erreichen.

Zur Bestimmung von Referenzwerten für die LTA wurden Daten von 20 unbehandelten, gesunden weiblichen Merinolandschafen erhoben. Die Endaggregationen (FA, final aggregation) lagen in folgenden Bereichen: Col-FA:  $81,6 \pm 14,2$  %; ADP-FA:  $87,4 \pm 11,6$  %, AA-FA:  $81,9 \pm 10,7$  %. Die berechneten Cut-off Werte für die LTA betragen für Col-FA 53,1 %, für ADP-FA 64,2 % und für AA-FA 60,6 %.

#### 4.1.2 Verträglichkeit der Medikamente

Die Schafe wurden zweimal täglich einer Allgemeinuntersuchung unterzogen, um mögliche Nebenwirkungen der Medikamente rechtzeitig zu erkennen. Alle Schafe überstanden die Versuche ohne Anzeichen auf Begleiterscheinungen, wie z. B. Blutungen (subkutan/dermal/gastrointestinal) oder gastrointestinale Beschwerden. Die regelmäßig

durchgeführten Thrombozytenzählungen ergaben Werte von  $424 \times 10^3 \pm 128 \times 10^3/\mu\text{l}$  (Range 179–799  $\times 10^3/\mu\text{l}$ ). In keinem Schaf wurde eine Abnahme der Thrombozytenzahl im Versuchsverlauf festgestellt.

### 4.1.3 Wirkung von Acetylsalicylsäure auf die ovine Thrombozytenaggregation

In Gruppe 1 wurde den Schafen ASS p. o. (Gruppe 1a) bzw. i. v. (Gruppe 1b) in einer Dosierung von 500 mg bid (bis in die, lat.: zweimal täglich) verabreicht. Weder nach p. o. (AA-FA:  $p = 0,412$ , Col-FA:  $p = 0,127$ ) (Abbildung 19A, C) noch nach i. v. Applikation (AA-FA:  $p = 0,310$ , Col-FA:  $p = 0,225$ ) (Abbildung 19B, D) konnten signifikante Veränderungen zwischen den einzelnen Messzeitpunkten beobachtet werden. Zu keiner

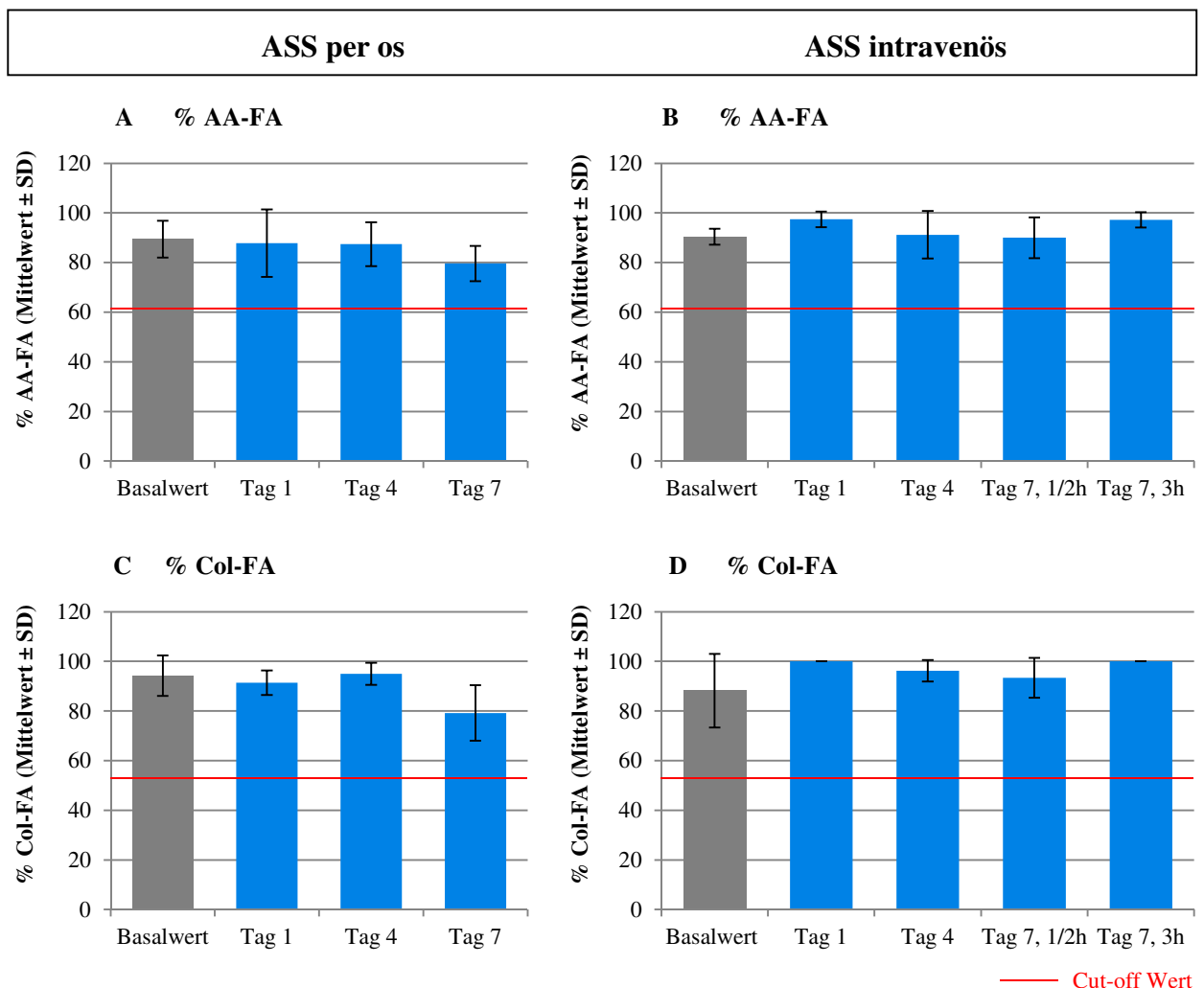


Abbildung 19: In der Lichttransmissionsaggregometrie gemessene Arachidonsäure- (A, B) und Kollagen-induzierte (C, D) Thrombozytenaggregation der Gruppe 1a und b (Acetylsalicylsäure in vivo)

Weder in Gruppe 1a (A, C Acetylsalicylsäure per os, 500 mg bid) noch in Gruppe 1b (B, D Acetylsalicylsäure intravenös, 500 mg bid) wurden signifikante Veränderungen der Thrombozytenaggregation gemessen. (einfaktorielle ANOVA mit Messwiederholung / Friedman-Test,  $p > 0,05$ ) (AA = Arachidonsäure, ASS = Acetylsalicylsäure, bid = bis in die [lat.: zweimal täglich], Col = Kollagen, FA = final aggregation [Endaggregation], i. v. = intravenös, p. o. = per os, SD = Standardabweichung)

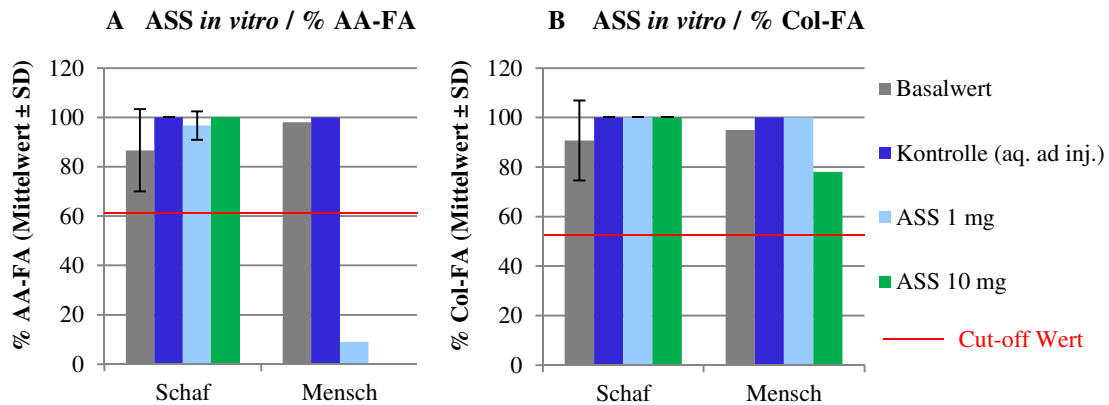


Abbildung 20: In der Lichttransmissionsaggregometrie gemessene Arachidonsäure- (A) und Kollagen-induzierte (B) Thrombozytenaggregation der Gruppe 1c (Zugabe von Acetylsalicylsäure in vitro)

Die Zugabe von ASS zu ovinem plättchenreichem Plasma konnte keine signifikante Änderung der Thrombozytenaggregation induzieren (Friedman-Test,  $p > 0,05$ ). In der humanen Probe wurde die Arachidonsäure-induzierte Thrombozytenaggregation von 98 % (Basalwert) auf 9 % reduziert (A), während die Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation nur geringgradig gehemmt wurde (B). (AA = Arachidonsäure, aq. ad inj. = aqua ad injectabilia [Wasser für Injektionszwecke], ASS = Acetylsalicylsäure, Col = Kollagen, FA = final aggregation [Endaggregation], SD = Standardabweichung)

Zeit sanken die Werte unterhalb des berechneten Cut-off Niveaus. Die Blutungszeit zeigte keine signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Messzeitpunkten (ASS p. o.:  $p = 0,270$ ; ASS i. v.:  $p = 0,127$ ) (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 16, S. 208).

Um eine mögliche Wirkung von hochdosierter ASS auf ovine Thrombozyten auszuschließen, wurde ein *in vitro* Versuch mit Zugabe von unterschiedlichen ASS Konzentrationen zu ovinem PRP durchgeführt. Es konnte keine signifikante Änderung der Thrombozytenaggregation zwischen Basalwert, Kontrolle und nach Zusatz von 1 mg/ml bzw. 10 mg/ml ASS nach Induktion durch AA ( $p = 0,145$ ) oder Kollagen ( $p = 0,392$ ) gemessen werden. Zu keinem Messzeitpunkt lag die Thrombozytenaggregation unterhalb der Cut-off Werte. Als Positivkontrolle diente eine humane PRP Probe, in der ASS in einer Konzentration von 1 mg/ml die AA-induzierte Thrombozytenaggregation von 98 % (Basalwert) auf 9 % hemmen konnte (Kontrolle: 100 %). Die Kollagen-induzierte Aggregation lag nach Zugabe von 1 mg/ml bei 100 % (Basalwert: 95 %, Kontrolle: 100 %), nach Zugabe von 10 mg/ml bei 78 % (Abbildung 20) (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 17, S. 208).

Zusammengefasst konnte ASS weder *in vivo* durch orale bzw. intravenöse Applikation noch *in vitro* eine suffiziente Thrombozytenaggregationshemmung im Schaf erzielen.

#### 4.1.4 Wirkung von Clopidogrel auf die ovine Thrombozytenaggregation

##### Schafe, adult (Gruppe 2a–c):

Der Thrombozytenaggregationshemmer Clopidogrel wurde den Schafen in unterschiedlichen Dosierungen über 7 Tage verabreicht. Es konnte in keiner Gruppe eine

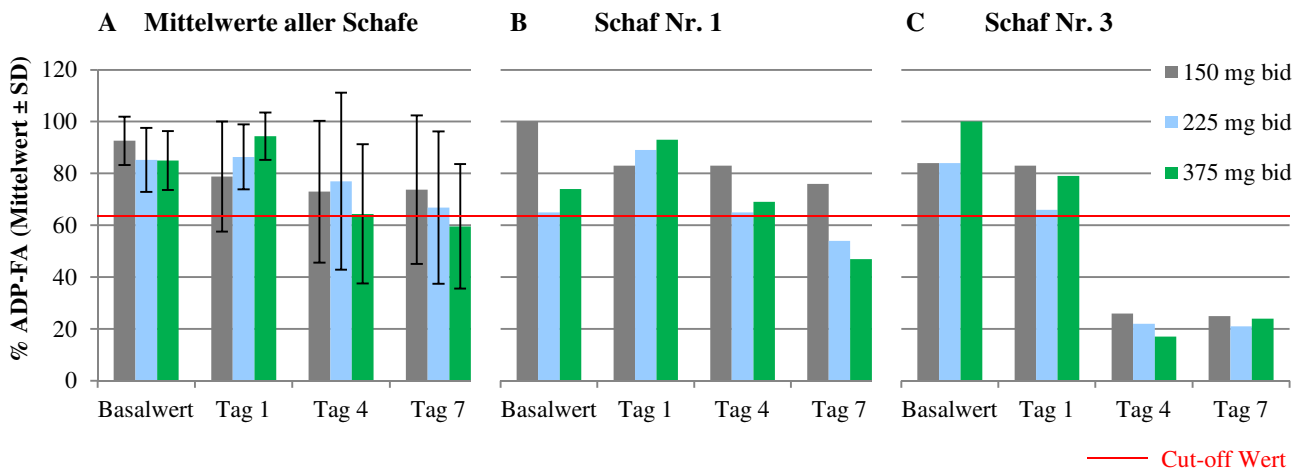


Abbildung 21: In der Lichttransmissionsaggregometrie gemessene Adenosindiphosphat-induzierte Thrombozytenaggregation der Gruppe 2a–c (150 mg, 225 mg, 375 mg Clopidogrel bid)

(A): Bei Betrachtung der Mittelwerte zeigt sich nur in der Gruppe mit der höchsten Dosierung (Gruppe 2c, 375 mg bid) eine Hemmung der Thrombozytenaggregation unterhalb des Cut-off Wertes am Tag 7. Signifikante Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten konnten nicht festgestellt werden (einfaktorielle ANOVA mit Messwiederholung / Friedman-Test,  $p > 0,05$ ). (B): Im Schaf Nr. 1 wurde eine effiziente Hemmung der Thrombozytenaggregation am Tag 7 mit Erhöhung der Dosis auf 225 mg bzw. 375 mg induziert. (C): Im Schaf Nr. 3 wurde bereits am Tag 4 in jeder Dosierung eine Thrombozytenaggregationshemmung unterhalb des Cut-off Wertes erreicht. (ADP = Adenosindiphosphat, bid = bis in die [lat.: zweimal täglich], FA = final aggregation [Endaggregation], SD = Standardabweichung)

signifikante Veränderung der Thrombozytenaggregation gemessen werden (Gruppe 2a: 150 mg bid, Aufsättigungsdosis 300 mg,  $p = 0,328$ ; Gruppe 2b: 225 mg bid, Aufsättigungsdosis 450 mg,  $p = 0,256$ ; Gruppe 2c: 375 mg bid, Aufsättigungsdosis 600 mg,  $p = 0,026$ ; in den anschließenden Mehrfachvergleichen in Gruppe 2c mittels des post-hoc-Tests nach Wilcoxon zeigten sich auf dem nach Bonferroni korrigierten Signifikanzlevel  $p \leq 0,017$  keine signifikanten Veränderungen zwischen Basalwert und den einzelnen Messzeitpunkten [Tag 1:  $p = 0,345$ , Tag 4:  $p = 0,176$ , Tag 7:  $p = 0,080$ ] (Abbildung 21A). Die Blutungszeit veränderte sich in allen Gruppen nicht signifikant zwischen den einzelnen Messzeitpunkten (Gruppe 2a:  $p = 0,656$ , Gruppe 2b:  $p = 0,555$ , Gruppe 2c:  $p = 0,113$ ).

In Gruppe 2c (375 mg bid) konnten am Tag 7 Werte ( $59,6 \pm 24,0 \%$ ) unterhalb des Cut-off Niveaus von 64,2 % erreicht werden (Abbildung 21A, grüner Balken).

Bei Betrachtung der Thrombozytenaggregation der einzelnen Schafe wird deutlich, dass Clopidogrel in 3 von 5 Schafen keine Wirkung zeigt. In Schaf Nr. 1 konnten durch die Erhöhung der Clopidogreldosierung auf 225 mg bzw. 375 mg bid Werte unterhalb des Cut-off Niveaus erreicht werden (Abbildung 21B). Im Gegensatz dazu reduzierte bereits 150 mg bid die Thrombozytenaggregation im Schaf Nr. 3 am Tag 4 auf 26 % (Abbildung 21C). Bei einer weiteren Erhöhung der verabreichten Clopidogrelmenge blieb die Thrombozytenaggregation am Tag 4 und 7 auf diesem Niveau (Range 17–26 %) (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 18, S. 208; Tabelle 19, S. 209).

### Lämmer (Gruppe 2d):

Um eine mögliche alters- sowie zeitabhängige Wirkung von Clopidogrel zu überprüfen, wurde eine Gruppe von Lämmern (Alter 4–5 Monate) über 28 Tage mit Clopidogrel in einer Dosierung von 150 mg bid (Aufsättigungsdosis 300 mg) behandelt (entspricht auf das Gewicht berechnet der Dosierung von 375 mg in der Gruppe der adulten Schafe). Zwischen Basalwert und Tag 1, 4, 7 bzw. 28 wurden keine signifikanten Veränderungen in der Thrombozytenaggregation induziert (Tag 1:  $p = 1,0$ , Tag 4:  $p = 0,138$ , Tag 7:  $p = 0,043$ , Tag 28:  $p = 0,080$ ; Signifikanzniveau nach Bonferroni auf  $p \leq 0,0125$  korrigiert). Jedoch konnte am Tag 7 (ADP-FA:  $51,8 \pm 18,6 \%$ ) und Tag 28 (ADP-FA:  $57,2 \pm 27,8 \%$ ) eine Aggregationshemmung unterhalb des berechneten Cut-off Wertes induziert werden (Abbildung 22). Die Blutungszeit zeigte keine signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen Messzeitpunkten ( $p = 0,036$ , in den anschließenden Mehrfachvergleichen mittels des post-hoc-Tests nach Wilcoxon zeigten sich auf dem nach Bonferroni korrigierten Signifikanzlevel  $p \leq 0,0125$  keine signifikanten Veränderungen zwischen Basalwert und den einzelnen Messzeitpunkten: Tag 1:  $p = 1,0$ , Tag 4:  $p = 0,349$ , Tag 7:  $p = 0,560$ , Tag 28:  $p = 0,388$ ).

Zwischen den einzelnen Messzeitpunkten in den unterschiedlichen Altersklassen (Gruppe 2c: Schafe, Clopidogrel 5,36–6,25 mg/kg bid versus Gruppe 2d: Lämmer, Clopidogrel 5,0–6,0 mg/kg bid) wurde kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt (Tag 1:  $p = 1,0$ , Tag 4:  $p = 0,917$ , Tag 7:  $p = 0,581$ ) (Abbildung 22).

Die Analyse der Einzelwerte der Lämmer ergab eine suffiziente Reduktion der Thrombozytenaggregation in 3 von 5 Lämmern. Am Tag 4, 7 und 28 konnten jeweils Werte unterhalb des Cut-off Niveaus erreicht werden (Abbildung 23) (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 20, S. 209).

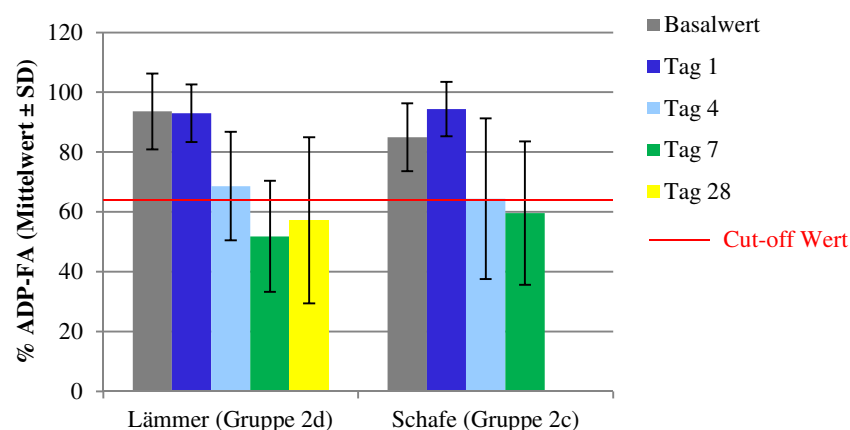


Abbildung 22: In der Lichttransmissionsaggregometrie gemessene Adenosindiphosphat-induzierte Thrombozytenaggregation der Lämmer (Gruppe 2d) und Schafe (Gruppe 2c) im Vergleich

Die Lämmer erhielten 150 mg (entspricht 5,0–6,0 mg/kg), die Schafe 375 mg (entspricht 5,36–6,25 mg/kg) Clopidogrel bid. Die Werte an den einzelnen Messzeitpunkten unterschieden sich zwischen den Altersgruppen nicht signifikant voneinander. (*t*-Test für unabhängige Stichproben / Mann-Whitney U-Test,  $p > 0,05$ ) (ADP = Adenosindiphosphat, bid = bis in die [lat.: zweimal täglich], FA = final aggregation [Endaggregation], SD = Standardabweichung)

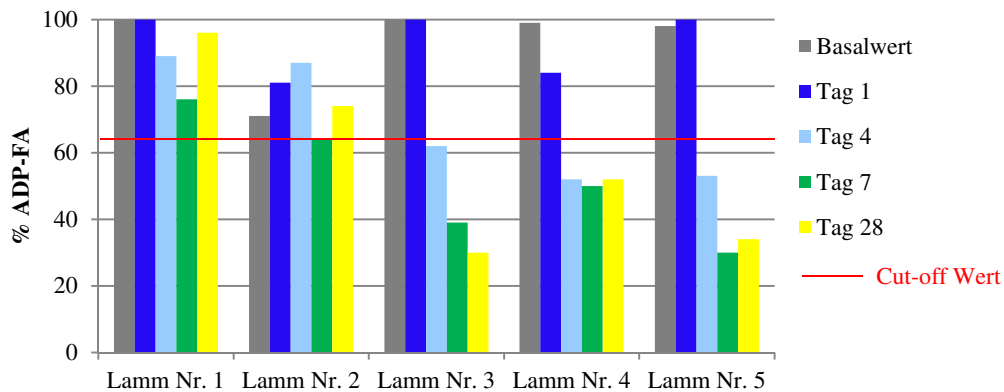


Abbildung 23: In der Lichttransmissionsaggregometrie gemessene Adenosindiphosphat-induzierte Thrombozytenaggregation von Lamm Nr. 1–5 in Gruppe 2d (150 mg Clopidogrel bid)

An den Tagen 4, 7 und 28 konnte in Lamm Nr. 3, 4 und 5 eine Thrombozytenaggregationshemmung unterhalb des Cut-off Wertes erreicht werden. (ADP = Adenosindiphosphat, bid = bis in die [lat.: zweimal täglich], FA = final aggregation [Endaggregation])

#### 4.1.5 Blutplasmakonzentration von Clopidogrel und Clopidogrelcarbonsäure

Sowohl in der Schafgruppe (Gruppe 2c) als auch in der Lammgruppe (Gruppe 2d) wurden Plasmakonzentrationsbestimmungen von Clopidogrel und seinem inaktiven Metaboliten Clopidogrelcarbonsäure durchgeführt.

Der Kalibrationsbereich für Clopidogrel lag zwischen 0,2 und 3,6 ng/ml und für Clopidogrelcarbonsäure zwischen 100 und 3 600 ng/ml. Die Variationskoeffizienten (Intraday) für Clopidogrel lagen zwischen 2,1 und 7,5 %, die für Clopidogrelcarbonsäure zwischen 2,3 und 3,7 %. Für die Messgenauigkeit (Intraday) wurden Werte in einem Bereich von 94,6–99,1 % für Clopidogrel und 100,0–107,9 % für Clopidogrelcarbonsäure festgestellt.

In jeder Probe an den Messzeitpunkten Tag 1, 4, 7 und 28 wurden sowohl Clopidogrel als auch sein Metabolit detektiert. In beiden Versuchsgruppen konnten jeweils hochsignifikante Erhöhungen der Clopidogrelcarbonsäurekonzentration gemessen werden (Schafe:  $F(1,969, 7,875) = 115,069$ ,  $p \leq 0,001$ ; Lämmer:  $F(1,829, 7,316) = 12,267$ ,  $p = 0,005$ ). Die Schafe wiesen zwischen Basalwert und Tag 1 ( $p = 0,001$ ), Tag 4 ( $p < 0,001$ ), Tag 7 ( $p = 0,001$ ) sowie zwischen Tag 1 und 4 ( $p = 0,006$ ) und Tag 1 und 7 ( $p = 0,009$ ) jeweils hochsignifikante Erhöhungen des Metaboliten auf. Zwischen Tag 4 und 7 ergaben sich keine signifikanten Änderungen ( $p = 1,0$ ). In der Gruppe der Lämmer wurden signifikante Erhöhungen des Metaboliten zwischen Basalwert und Tag 1 ( $p = 0,011$ ), Tag 7 ( $p = 0,017$ ) sowie Tag 28 ( $p = 0,024$ ) festgestellt. Alle anderen Vergleiche waren nicht signifikant (Basalwert–Tag 4:  $p = 0,116$ , Tag 1–Tag 4:  $p = 0,923$ , Tag 1–Tag 7:  $p = 0,319$ , Tag 1–Tag 28:  $p = 1,0$ , Tag 4–Tag 7:  $p = 1,0$ , Tag 7–Tag 28:  $p = 1,0$ ) (Abbildung 24). In drei Basalwertproben wurde Clopidogrel gefunden

(Probe 1: 1,31 ng/ml, Probe 2: 0,73 ng/ml, Probe 3: 3,70 ng/ml). In der Gruppe der Schafe und der Lämmer kam es zu keiner signifikanten Veränderung zwischen den einzelnen Messzeitpunkten (Schafe:  $p = 0,073$ ; Lämmer:  $p = 0,034$ , Vergleiche zwischen den einzelnen Messzeitpunkten mit dem Wilcoxon-Test ergaben keine signifikanten Veränderungen auf einem nach Bonferroni für Mehrfachvergleiche angepassten Signifikanzniveau von  $p \leq 0,0125$ : Basalwert–Tag 1:  $p = 0,043$ , Basalwert–Tag 4:  $p = 0,043$ , Basalwert–Tag 7:  $p = 0,043$  und Basalwert–Tag 28:  $p = 0,043$ ). Auffällig waren hohe Standardabweichungen sowohl in der Gruppe der Schafe als auch der Lämmer (Abbildung 24).

Mittels einer zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholung wurde ein hochsignifikanter Einfluss des Alters auf die Höhe der Clopidogrelcarbonsäurekonzentration im Plasma festgestellt ( $F(1, 8) = 16,34, p = 0,004$ ). Es wurde ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Messzeitpunkten ermittelt ( $F(1,944, 15,550) = 31,224, p < 0,001$ ) sowie eine signifikante Interaktion zwischen dem Faktor Alter und Behandlungsdauer ( $F(1,944, 15,550) = 4,708, p = 0,026$ ). Das heißt, bei Lämmern und Schafen zeigte sich über die Behandlungsdauer hinweg eine unterschiedliche Entwicklung in der Metabolitkonzentration – bei Schafen kam es zu einem schnelleren und höheren Anstieg

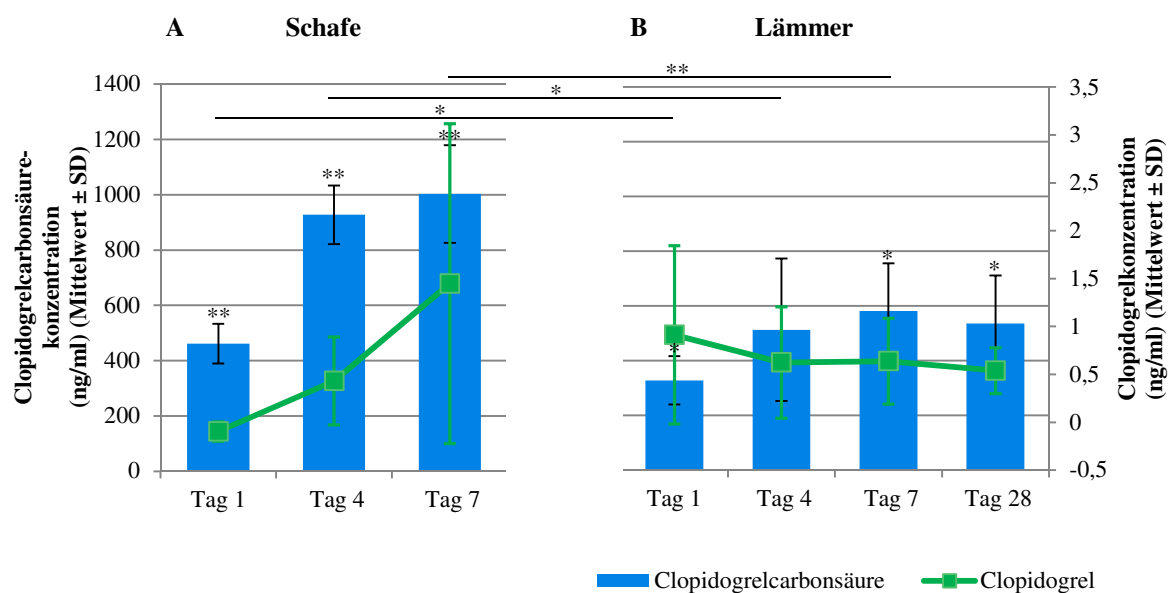


Abbildung 24: Clopidogrelcarbonsäure- und Clopidogrelplasmakonzentration der verschiedenen Altersgruppen im Vergleich

Die Schafe (A) erhielten 5,36–6,25 mg/kg, die Lämmer (B) 5,0–6,0 mg/kg Clopidogrel bid. In der Gruppe der Schafe kam es zwischen Basalwert und Tag 1, 4, 7 zu einer hochsignifikanten, in der Gruppe der Lämmer zwischen Basalwert und Tag 1, 7, 28 zu einer signifikanten Zunahme der Clopidogrelcarbonsäurekonzentration im Plasma. Zwischen den Altersgruppen wurden signifikante bzw. hochsignifikante Unterschiede in der Clopidogrelcarbonsäurekonzentration am Tag 1, 4 und 7 festgestellt. Bezüglich der Clopidogrelkonzentration wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten sowie zwischen den Altersgruppen festgestellt. (einfaktorielle ANOVA mit Messwiederholung / Friedman-Test, t-Test für unabhängige Stichproben / Mann-Whitney U-Test, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ) (SD = Standardabweichung, bid = bis in die [lat.: zweimal täglich])



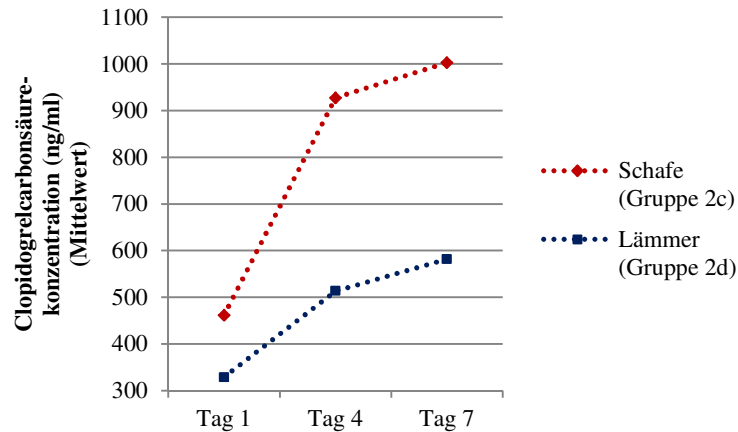


Abbildung 25: **Clopidogrelcarbonsäureplasmakonzentration der verschiedenen Altersgruppen im Vergleich**

Die Schafe und Lämmer erhielten auf das Körpergewicht bezogen vergleichbare Dosierungen des Thrombozytenaggregationshemmers Clopidogrel (Schafe: 5,36–6,25 mg/kg, Lämmer: 5,0–6,0 mg/kg, je bid). Es zeigten sich ein signifikanter Einfluss des Alters auf die Höhe der Clopidogrelcarbonsäurekonzentration im Plasma, ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Messzeitpunkten und eine signifikante Interaktion zwischen dem Faktor Alter und Behandlungsdauer. Das heißt, bei Lämmern und Schafen zeigte sich über die Behandlungsdauer hinweg eine unterschiedliche Entwicklung in der Metabolitkonzentration – bei Schafen kam es zu einem schnelleren und höheren Anstieg der Konzentration als bei Lämmern. (zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung)

der Konzentration als bei Lämmern. Zwischen den Altersgruppen konnten signifikante (Tag 1 und 4) bis hochsignifikante (Tag 7) Unterschiede in der Clopidogrelcarbonsäurekonzentration im Plasma beobachtet werden (Tag 1:  $t(8) = 2,622$ ,  $p = 0,031$ ; Tag 4:  $t(8) = 3,301$ ,  $p = 0,011$ ; Tag 7:  $t(8) = 3,799$ ,  $p = 0,005$ ) (Abbildung 25).

Es wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Altersgruppen hinsichtlich der Clopidogrelkonzentration im Plasma festgestellt (Tag 1:  $p = 0,222$ , Tag 4:  $p = 0,175$ , Tag 7:  $p = 0,157$ ) (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 21, S. 209).

#### 4.1.6 Wirkung von Ticagrelor auf die ovine Thrombozytenaggregation

In Gruppe 3 wurden die Schafe mit unterschiedlichen Dosierungen des Thrombozytenaggregationshemmers Ticagrelor behandelt (Gruppe 3a: 90 mg bid, Aufsättigungsdosis 180 mg; Gruppe 3b: 180 mg bid, Aufsättigungsdosis 360 mg; Gruppe 3c: 360 mg bid, Aufsättigungsdosis 540 mg; Gruppe 3d: 540 mg bid, Aufsättigungsdosis 720 mg). In keiner Gruppe konnte eine signifikante Veränderung der Thrombozytenaggregation gemessen werden (Gruppe 3a:  $p = 0,603$ ; Gruppe 3b:  $p = 0,198$ ; Gruppe 3c:  $p = 0,041$  [im post-hoc-Test zeigten sich keine signifikanten Unterschiede nach Anpassung an Mehrfachvergleiche mit Bonferroni Korrektur zwischen Basalwert und Tag 1:  $p = 0,121$ , Tag 4:  $p = 0,124$ , Tag 7:  $p = 0,614$ ]; Gruppe 3d:  $p = 0,239$ ). Zu keinem Zeitpunkt konnte eine Hemmung der Thrombozytenaggregation unterhalb des Cut-off Wertes erreicht werden (Abbildung 26A). Nur in einem Schaf (Schaf Nr. 3) wurde eine

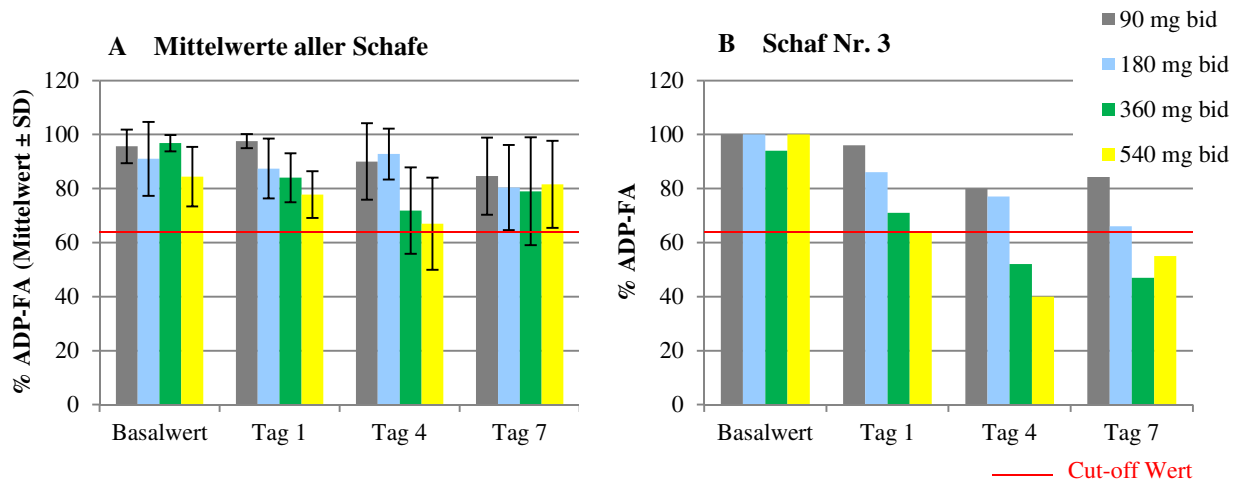


Abbildung 26: In der Lichttransmissionsaggregometrie gemessene Adenosindiphosphat-induzierte Thrombozytenaggregation der Gruppen 3a–d (Ticagrelor)

(A): Die Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen, die mit unterschiedlichen Dosierungen von Ticagrelor behandelt wurden (Gruppe 3a: 90 mg, Gruppe 3b: 180 mg, Gruppe 3c: 360 mg, Gruppe 3d: 540 mg, je bid) lagen zu keinem Zeitpunkt unterhalb des Cut-off Wertes. Während der Behandlungsdauer von 7 Tagen konnten keine signifikanten Veränderungen der Thrombozytenaggregation gemessen werden (einfaktorielle ANOVA mit Messwiederholung / Friedman-Test,  $p > 0,05$ ). (B): In Schaf Nr. 3 wurde in den zwei höchsten Dosierungen eine Thrombozytenaggregationshemmung unterhalb des Cut-off Wertes erreicht. (ADP = Adenosindiphosphat, bid = bis in die [lat.: zweimal täglich], FA = final aggregation [Endaggregation], SD = Standardabweichung)

aggregationshemmende Wirkung mit Messwerten unterhalb des Cut-off Niveaus in den zwei höchsten Dosierungen erzielt (360 mg, Tag 7: 47 %; 540 mg, Tag 7: 55 %) (Abbildung 26B).

In Abbildung 27 ist der Ausdruck der Lichttransmissionsaggregometrie am Tag 7 von Gruppe 3d (Ticagrelor, 540 mg bid) abgebildet. Die Schafe Nr. 1, 2, 4 und 5 zeigten keine Reaktion auf den Thrombozytenaggregationshemmer, nur in Schaf Nr. 3 konnten Werte unterhalb des Cut-off Niveaus erreicht werden.

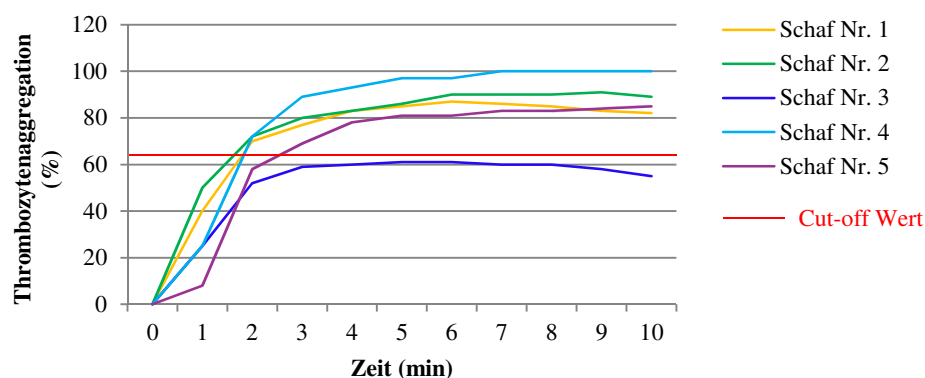


Abbildung 27: Darstellung der Aggregationskurven der Lichttransmissionsaggregometrie der einzelnen Schaf PRP Proben nach Zugabe des Agonisten Adenosindiphosphat am Messzeitpunkt Tag 7 in Gruppe 3d (540 mg Ticagrelor zweimal täglich)

Während die Aggregationskurven von Schaf Nr. 1, 2, 4 und 5 oberhalb des Cut-off Wertes verlaufen, befindet sich die Kurve von Schaf Nr. 3 unterhalb des Cut-off Wertes, d. h. die Applikation von Ticagrelor führte in diesem Schaf zu einer effektiven Hemmung der Thrombozytenaggregation.

Die Messung der Blutungszeit ergab keine signifikante Veränderung im Zeitverlauf (Gruppe 3a:  $p = 0,509$ , Gruppe 3b:  $p = 0,056$ , Gruppe 3c:  $p = 0,360$ , Gruppe 3d:  $p = 0,066$ ) (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 22, S. 210).

#### 4.1.7 Anti-Faktor Xa Spiegel nach Enoxaparin-Natrium Gabe

##### Schafe, adult (Gruppe 4a, b):

Die Wirkung des niedermolekularen Heparins Enoxaparin-Natrium auf die Anti-FXa Aktivität wurde in der Gruppe der Schafe über 7 Tage in zwei unterschiedlichen Dosierungen untersucht.

In Gruppe 4a (Enoxaparin-Natrium, 1 mg/kg s. c. bid, Aufsättigungsdosis 2 mg/kg) zeigten sich hochsignifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Messzeitpunkten ( $F(1,108, 4,434) = 27,625$ ,  $p = 0,004$ ). Zwischen Basalwert ( $0,07 \pm 0,05$  IU/ml) und Tag 1 ( $0,30 \pm 0,05$  IU/ml,  $p = 0,027$ ) sowie Tag 7 ( $0,24 \pm 0,03$  IU/ml,  $p = 0,028$ ) wurden jeweils signifikante Zunahmen der Anti-FXa Aktivität festgestellt. Zwischen Basalwert und Tag 4 ( $0,20 \pm 0,04$  IU/ml,  $p = 0,132$ ) ergab sich keine signifikante Veränderung. Die Anti-FXa Spiegel entsprachen zu keiner Zeit den für die Humanmedizin laborintern angegebenen Zielbereichen für eine prophylaktische ( $0,40$ – $0,60$  IU/ml) oder therapeutische Wirkung ( $0,60$ – $1,00$  IU/ml) (Abbildung 28A).

Im Gegensatz dazu konnten in Gruppe 4b (Enoxaparin-Natrium, 3 mg/kg s. c. bid) an den Tagen 4 und 7 Werte im therapeutischen Range gemessen werden. Es wurden hochsignifikante Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten festgestellt ( $F(1,650, 6,601) = 68,449$ ,  $p \leq 0,001$ ). Zwischen Basalwert und Tag 1 ( $0,52 \pm 0,10$  IU/ml,  $p = 0,007$ ), Tag 4 ( $0,77 \pm 0,13$  IU/ml,  $p = 0,005$ ) sowie Tag 7 ( $0,73 \pm 0,12$  IU/ml,  $p = 0,003$ ) konnten hochsignifikante Erhöhungen der Anti-FXa Aktivität erzielt werden. Die Änderung von Tag 4 auf Tag 7 erwies sich als nicht signifikant ( $p = 1,00$ ) (Abbildung 28A) (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 23, S. 210).

In der Verlaufskontrolle über 24 Stunden zweier Schafe aus Gruppe 4b am Tag 7 der Behandlung wurde 2 Stunden nach der Applikation von Enoxaparin-Natrium der Tagesspitzenpiegel ( $0,94 \pm 0,01$  IU/ml) erreicht. In den nächsten Stunden fiel die Anti-FXa Aktivität rasch ab und lag 24 Stunden nach Applikation bei  $0,08 \pm 0,01$  IU/ml (Abbildung 28B) (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 24, S. 210).

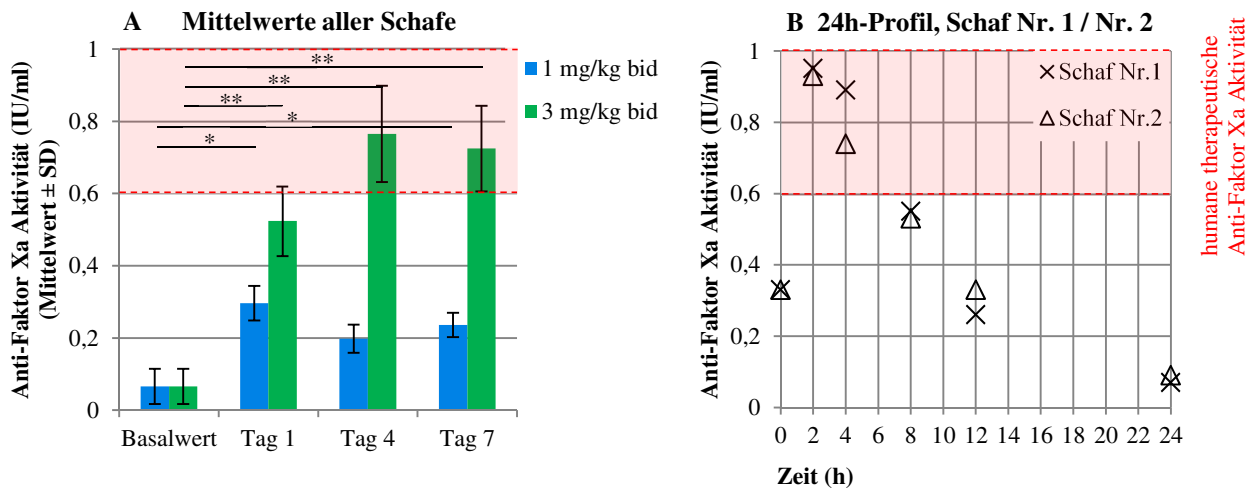


Abbildung 28: Anti-Faktor Xa Aktivität in Gruppe 4a und b (Enoxaparin-Natrium)

(A): Anti-Faktor Xa Aktivität nach Gabe von 1 mg/kg (Gruppe 4a) bzw. 3 mg/kg (Gruppe 4b) Enoxaparin-Natrium s. c. bid. Eine signifikante Erhöhung der Anti-Faktor Xa Aktivität wurde in der Dosierung 1 mg/kg zwischen Basalwert und Tag 1 bzw. Tag 7 beobachtet. In der Gruppe mit 3 mg/kg wurden zwischen Basalwert und Tag 1, 4 bzw. 7 jeweils hochsignifikante Erhöhungen der Anti-Faktor Xa Aktivität festgestellt. Der humane therapeutische Anti-Faktor Xa Bereich konnte am Tag 4 und 7 mit einer Dosierung von 3 mg/kg bid (Gruppe 4b) erreicht werden. (einfaktorielle ANOVA mit Messwiederholung, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ )

(B): Anti-Faktor Xa Aktivität im Tagesverlauf exemplarisch an Schaf Nr. 1 und Nr. 2 in Gruppe 4b (Enoxaparin-Natrium 3 mg/kg bid). Der Tagesspitzenpiegel wurde nach 2 Stunden erreicht. 24 Stunden nach der letzten Applikation wurden Werte nahe des Basalniveaus gemessen.

(bid = bis in die [lat.: zweimal täglich], SD = Standardabweichung)

### Lämmer (Gruppe 4c, d):

Zur Untersuchung einer möglichen alters- und zeitabhängigen Wirkung wurde eine Gruppe von Lämmern über 7 bzw. 28 Tage mit Enoxaparin-Natrium in zwei unterschiedlichen Dosierungen behandelt.

In Gruppe 4c (Enoxaparin-Natrium, 3 mg/kg s. c. bid, 28 Tage) konnten zwischen dem Basalwert ( $0,09 \pm 0,02$  IU/ml) und Tag 1 ( $0,36 \pm 0,04$  IU/ml,  $p = 0,043$ ), Tag 4 ( $0,52 \pm 0,09$  IU/ml,  $p = 0,043$ ), Tag 7 ( $0,48 \pm 0,07$  IU/ml,  $p = 0,043$ ) und Tag 28 ( $0,43 \pm 0,06$  IU/ml,  $p = 0,043$ ) jeweils keine signifikanten Erhöhungen der Anti-FXa Aktivität gemessen werden (Signifikanzlevel wurde nach Bonferroni aufgrund Mehrfachvergleiche auf  $p \leq 0,0125$  korrigiert). Die Werte lagen zu keinem Messzeitpunkt innerhalb des humanen therapeutischen Bereiches (Abbildung 29).

Die Erhöhung der Dosierung auf 5 mg/kg bid führte zu hochsignifikanten Unterschieden zwischen den Messzeitpunkten ( $F(1,912, 7,646) = 102,454$ ,  $p \leq 0,001$ ). Anti-FXa Aktivitäten im humanen therapeutischen Bereich wurden an Tag 4 und 7 erreicht. Zwischen Basalwert und Tag 1 ( $0,53 \pm 0,11$  IU/ml,  $p = 0,004$ ), Tag 4 ( $0,77 \pm 0,04$  IU/ml,  $p < 0,001$ ) und Tag 7 ( $0,77 \pm 0,10$  IU/ml,  $p = 0,001$ ) konnten jeweils hochsignifikante Erhöhungen der Anti-FXa Aktivität festgestellt werden. Die Werte von Tag 1 und 7 ( $p = 0,105$ ) sowie Tag 4 und 7 ( $p = 1,0$ ) unterschieden sich nicht signifikant voneinander (Abbildung 29) (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 23, S. 210).

### Vergleich der Enoxaparin-Natrium Wirkung: Schafe versus Lämmer

Die Applikation von 3 mg/kg Enoxaparin-Natrium s. c. bid induzierte in der Gruppe der Lämmer verglichen mit der Gruppe der Schafe signifikant bzw. hochsignifikant niedrigere Anti-FXa Aktivitäten an den einzelnen Messzeitpunkten (Tag 1:  $t(8) = 3,539$ ,  $p = 0,008$ ; Tag 4:  $t(8) = 3,497$ ,  $p = 0,008$ ; Tag 7:  $U = 1,0$ ,  $p = 0,016$ ) (Abbildung 29).

Anti-FXa Aktivitäten im humanen therapeutischen Range konnten am Tag 4 und 7 mittels Applikation von 3 mg/kg Enoxaparin-Natrium s. c. bid in der Schafgruppe und von 5 mg/kg s. c. bid in der Lammgruppe erreicht werden. Mittels einer zweifaktoriellen ANOVA mit Messwiederholung wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Anti-Faktor Xa Werten von Schafen und Lämmern festgestellt, die mit 3 mg/kg bzw. 5 mg/kg s. c. bid behandelt wurden ( $p = 0,625$ ) (Abbildung 29). Weiterhin zeigte sich keine signifikante Interaktion zwischen dem Faktor „altersabhängige therapeutische Dosis“ (d. h. Schafe mit 3 mg/kg und Lämmer mit 5 mg/kg Enoxaparin-Natrium s. c. bid) und der Behandlungsdauer ( $p = 0,888$ ), das bedeutet der Verlauf der Anti-Faktor Xa Aktivität in der Gruppe der Schafe mit einer Dosierung von 3 mg/kg unterscheidet sich über den Behandlungszeitraum hinweg nicht signifikant von dem Verlauf der Gruppe der Lämmer mit einer Dosierung von 5 mg/kg.

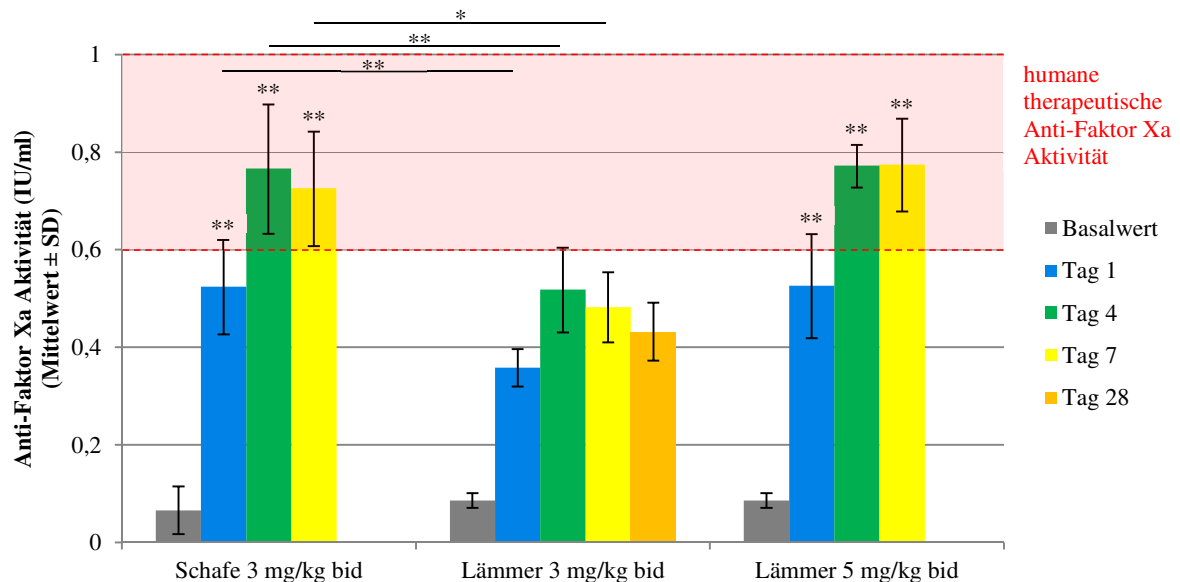


Abbildung 29: Vergleich der Anti-Faktor Xa Aktivitäten nach Applikation von Enoxaparin-Natrium in den unterschiedlichen Altersgruppen

Die Applikation von 3 mg/kg bid Enoxaparin-Natrium an Schafe sowie an Lämmer induzierte signifikant bzw. hochsignifikant unterschiedliche Anti-Faktor Xa Aktivitäten. Die Behandlung der Lämmer mit 5 mg/kg und der Schafe mit 3 mg/kg je bid erzielte am Tag 4 und 7 Werte im humanen therapeutischen Anti-Faktor Xa Bereich, die sich in den unterschiedlichen Altersklassen nicht signifikant voneinander unterscheiden. (einfaktorielle ANOVA mit Messwiederholung / Friedman-Test / zweifaktorielle ANOVA mit Messwiederholung / t-Test für unabhängige Stichproben / Mann-Whitney U-Test, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ) (bid = bis in die [lat.: zweimal täglich], SD = Standardabweichung)

### 4.1.8 Thrombininhibitor Dabigatranetexilat im Schaf

Zur Überprüfung der Wirkung des oralen Thrombininhibitors Dabigatranetexilat wurde die Schafgruppe über 7 Tage mit 600 mg Dabigatranetexilat bid behandelt.

Am Tag 1 konnte ca. 4–8 Stunden nach oraler Applikation Dabigatran im Plasma nachgewiesen werden (Abbildung 30A). Am Tag 4 sowie Tag 7 (Abbildung 30B) wurde der im Tagesverlauf höchste Plasmaspiegel nach 6 Stunden gemessen (Tag 4:  $0,084 \pm 0,056 \mu\text{g/ml}$ , Tag 7:  $0,096 \pm 0,045 \mu\text{g/ml}$ ). 24 Stunden nach der letzten Gabe lag die Plasmakonzentration bei  $0,034 \pm 0,027 \mu\text{g/ml}$ . Zwischen den Maximalspiegeln und den Basalwerten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (Tag 1:  $p = 0,616$ , Tag 4:  $p = 0,245$ , Tag 7:  $p = 0,078$ ). An den einzelnen Messzeitpunkten am Tag 1, 4 und 7 wurden hohe Standardabweichungen festgestellt. Es bestanden interindividuelle Unterschiede im Ansprechen der Schafe auf Dabigatranetexilat sowohl bezüglich des Anflutens als auch des Ausmaßes der Antikoagulation. Die für den Menschen im Steady State 2 Stunden nach Einnahme von 150 mg Dabigatranetexilat angegebene mittlere maximale Dabigatranplasmakonzentration von  $0,175 \mu\text{g/ml}$  (Range  $0,117\text{--}0,275 \mu\text{g/ml}$  im Bereich der 25. bis 75. Perzentile) wurde am Tag 7 nur von Schaf Nr. 4 erreicht. Nur die Werte von Schaf Nr. 4 und ein Wert von Schaf Nr. 5 lagen im angegebenen humanen Referenzbereich (Abbildung 31) (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 25, S. 211).

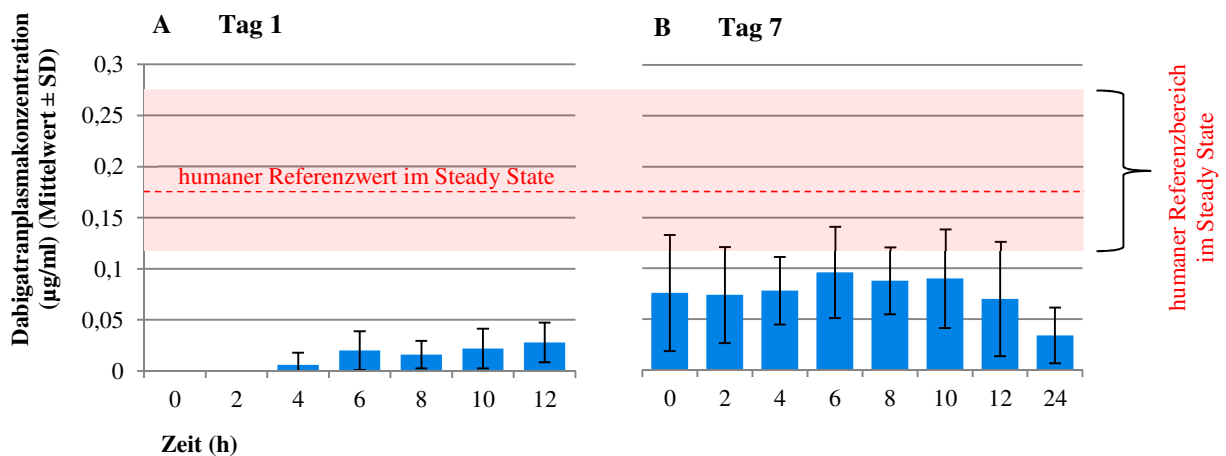


Abbildung 30: Verlauf der Dabigatranplasmakonzentration am Tag 1 (A) und Tag 7 (B) nach Gabe von 600 mg Dabigatranetexilat bid (Gruppe 5)

(A): Am Tag 1 konnte Dabigatran erstmals 4–8 Stunden nach Applikation im Plasma gemessen werden. (B): Am Tag 7 wurde der Tagesspitzenpiegel nach 6 Stunden erreicht. Zu allen Messzeitpunkten wurden hohe Standardabweichungen beobachtet. Es kam zu keiner signifikanten Erhöhung der Dabigatranplasmakonzentration zwischen Basalwert und Tagesspitzenpiegel. (einfaktorielle ANOVA mit Messwiederholung,  $p > 0,05$ ) (SD = Standardabweichung, bid = bis in die [lat.: zweimal täglich])

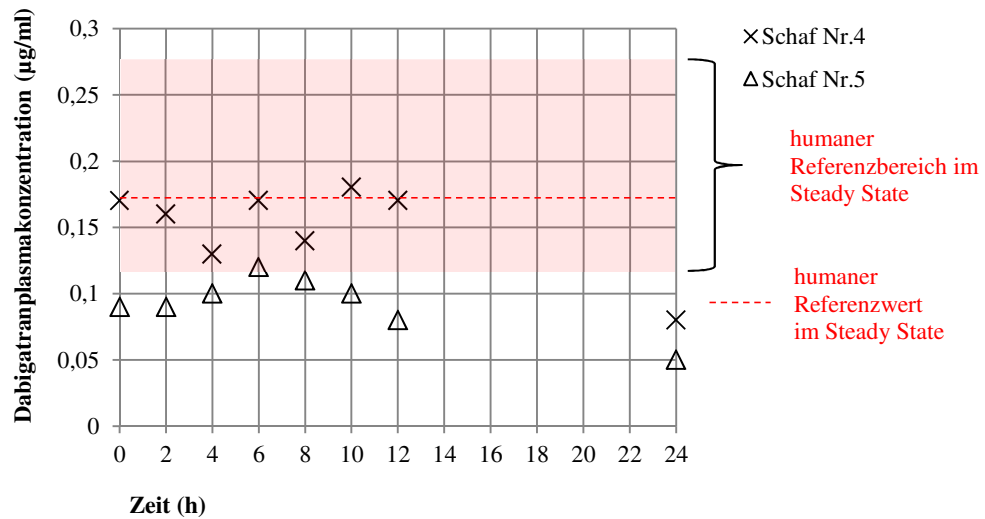


Abbildung 31: Exemplarische Darstellung der Dabigatranplasmakonzentration von Schaf Nr. 4 und Nr. 5 am Tag 7 der Behandlung mit Dabigatranetexilat (Gruppe 5)

Die Werte im humanen Referenzbereich im Steady State wurden an den Zeitpunkten 0–12 Stunden von Schaf Nr. 4 und am Zeitpunkt 6 Stunden von Schaf Nr. 5 erreicht. Nur in Schaf Nr. 4 konnten Konzentrationen ähnlich der humanen Referenzwerte im Steady State nachgewiesen werden.

## 4.2 Knochen Tissue Engineering

### 4.2.1 Ergebnisse der subkutanen Versuchsgruppen

#### 4.2.1.1 Operativer und postoperativer Verlauf

Die operative Phase verlief bei allen Tieren komplikationslos. Postoperativ erfolgte zweimal täglich eine Kontrolle des Allgemeinbefindens sowie der Operationswunden. Bei einem Schaf wurde eine Entzündungsreaktion der Implantate beobachtet, die mit Fibrin getränkt worden waren. In einer wiederholten Operation kam es zu einem identischen Verlauf. Das Schaf wurde wegen einer anzunehmenden Fremdkörperreaktion auf Fibrin aus der Studie ausgeschlossen. Aufgrund der geringen Gruppengröße wurden die Implantationen an einem anderen Schaf vorgenommen, so dass pro Versuchsgruppe je 5 Konstrukte ausgewertet werden konnten.

Die Wunden der anderen Tiere verheilten reizlos und der Fadenzug erfolgte 10–14 Tage nach der Operation.

#### 4.2.1.2 Makroskopische Beurteilung der Explantate

Für die Evaluierung optimaler Zell- bzw. Wachstumsfaktorzusätze zu NanoBone<sup>®</sup> wurden die Blöcke mit unterschiedlichen Zusätzen subkutan implantiert und nach einer Dauer von 12 Wochen entnommen.

Alle Explantate waren von einer dünnen Gewebeschicht umgeben und ließen sich gut aus dem umliegenden Gewebe freipräparieren. Die Konstrukte wurden nach der Entnahme hinsichtlich Formänderung und Festigkeit beurteilt (Abbildung 32). Die NanoBone<sup>®</sup> Explantate mit Blut und Knochenmark zeigten eine deutliche Formänderung verglichen zur ursprünglichen Blockform. Es kam zu einer Abflachung und Volumenverringering des Blockes. Makroskopisch konnte die NanoBone<sup>®</sup> Struktur nicht mehr erkannt werden. Die Konstrukte dieser Gruppe wiesen eine weiche Struktur auf und konnten mit Hilfe eines Skalpell zerteilt werden. In der Gruppe mit direkt reimplantierten MSC sowie in der Kontrollgruppe mit Fibrin war die Blockform weitestgehend erhalten. Eine Abrundung, bzw. Formänderung ohne deutlich erkennbaren Volumenverlust wurde in den Gruppen mit 60 µg/ml des Wachstumsfaktors rhBMP-2 sowie mit kultivierten MSC und in den Kombinationsgruppen mit kultivierten MSC und 60 µg/ml rhBMP-2 in Fibrin bzw. Serum beobachtet.

Die Quantifizierung der Volumenabnahme erfolgte mittels Bestimmung der Konstruktschnittflächen an histologischen Schnitten wie unter 3.3.7.5 (Auswertung der Färbungen/Histomorphometrie) beschrieben.



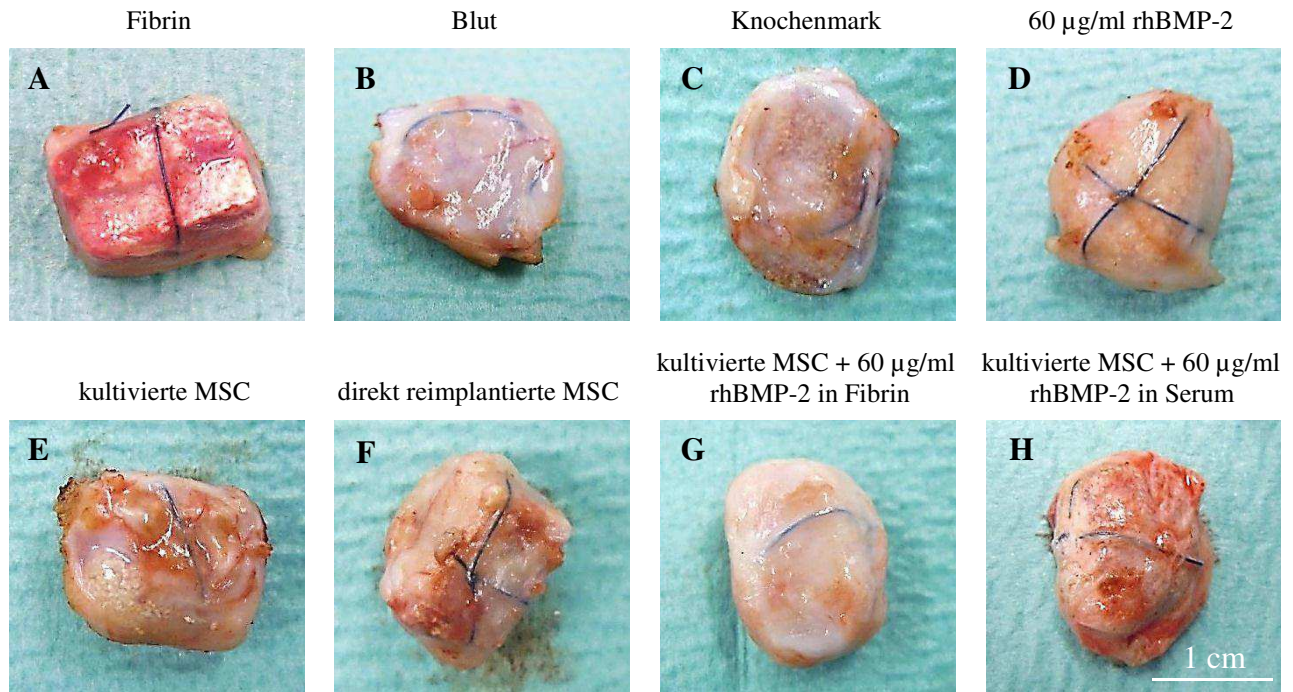


Abbildung 32: *Explantate der subkutanen Versuchsgruppen im makroskopischen Vergleich*

In der Kontrollgruppe mit Fibrin (A) sowie in der Gruppe mit direkt reimplantierten MSC (F) blieb die Blockstruktur weitestgehend erhalten. Die Gruppen mit Blut (B) und Knochenmark (C) zeigten eine deutliche Abflachung und Volumenverringerung der Blockstruktur. In den Gruppen mit 60 µg/ml rhBMP-2 (D), kultivierten MSC (E) sowie in den Kombinationsgruppen mit kultivierten MSC und 60 µg/ml rhBMP-2 in Fibrin (G) bzw. Serum (H) kam es zu einer Formänderung des Blockes ohne deutlichen Volumenverlust. (MSC = mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2)

#### 4.2.1.3 Histologische Analyse der Explantate

##### Übersicht

Für die mikroskopische morphologisch deskriptive Auswertung wurden die Explantate in den Übersichtsfärbungen Hämatoxylin Eosin (HE) und Masson-Goldner Trichrom (MG) (Abbildung 33) beurteilt. Es wurden mehrere Ebenen betrachtet und diese hinsichtlich des Einwachsens von Gewebe, nicht vaskularisierten NanoBone<sup>®</sup> Strukturen sowie neugebildetem Knochen untersucht.

Alle Konstrukte waren von einer Bindegewebskapsel umschlossen, von der ausgehend Gewebestrukturen zwischen die NanoBone<sup>®</sup> Partikel einwuchsen. In den Randbereichen aller Gruppen waren die NanoBone<sup>®</sup> Partikel von einwachsendem Bindegewebe sowie Blutgefäßen und teilweise Knochengewebe vollständig umschlossen. Im Zentrum einiger Konstrukte, wie z. B. in der Fibrin-, den MSC-, der rhBMP-2- sowie der Kombinationsgruppe mit kultivierten MSC und 60 µg/ml rhBMP-2 in Fibrin, waren vereinzelt nicht vaskularisierte Bereiche mit nebeneinander liegenden NanoBone<sup>®</sup> Partikeln ohne umgebendes Gewebe erkennbar. In den Konstrukten mit Blut, Knochenmark sowie mit kultivierten MSC und 60 µg/ml rhBMP-2 kombiniert in Serum war der NanoBone<sup>®</sup> Block vollständig mit Gewebe durchzogen. Neugebildete Knochenstrukturen, insbesondere im Randbereich der Gewebeschnitte, waren in vielen



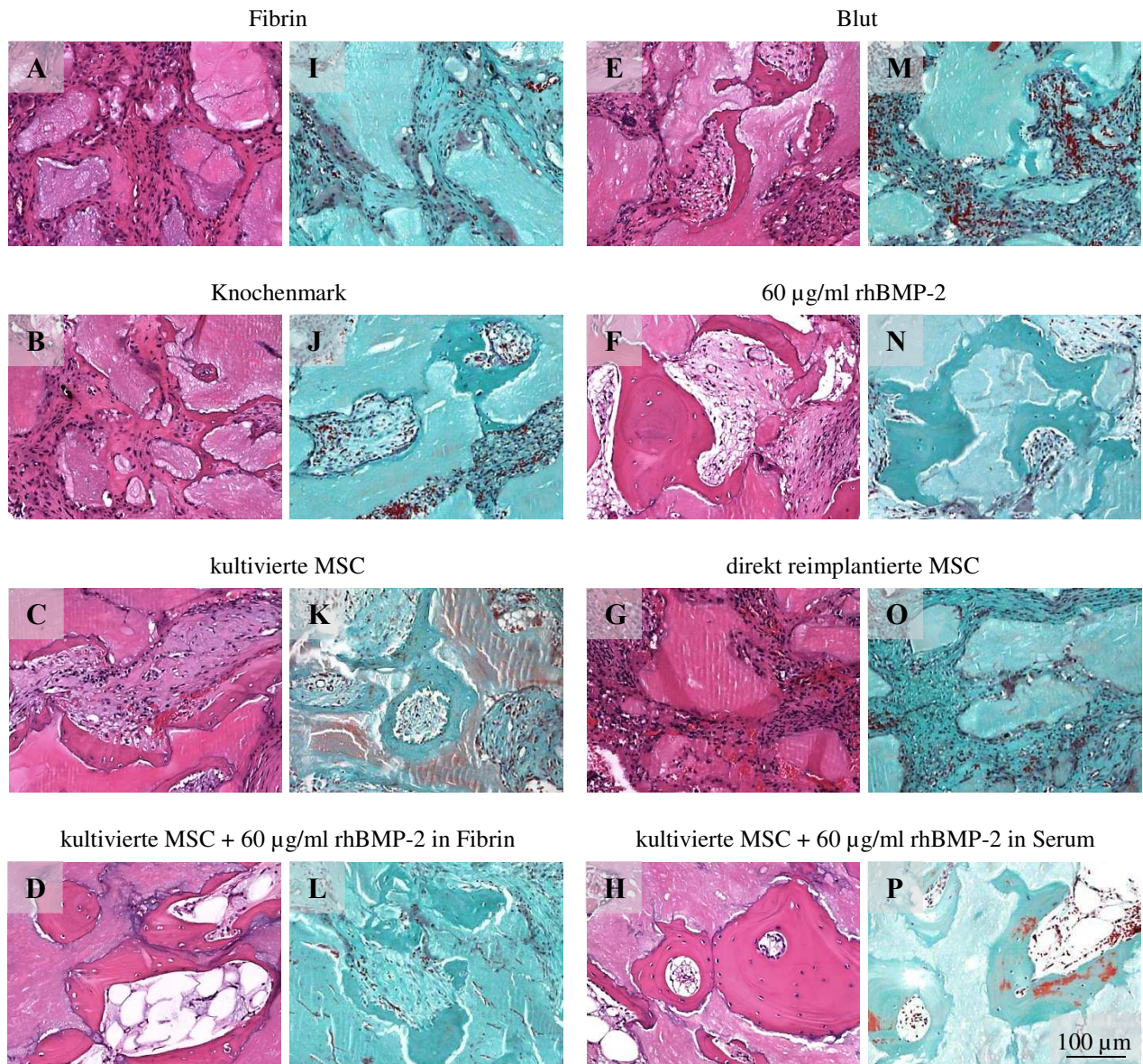
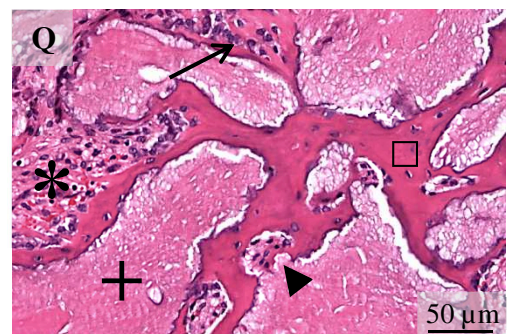


Abbildung 33: Repräsentative Ausschnitte der subkutanen Versuchsgruppen aus Bereichen mit eingewachsenen Gewebestrukturen in der Hämatoxylin Eosin (A–H, Q) und Masson-Goldner Trichrom (I–P) Färbung

**Q:** Übersicht eines Hämatoxylin Eosin gefärbten Schnittes aus der Knochenmarkgruppe. In Resorptionslakunen sind osteoklasten-ähnliche Riesenzellen zu erkennen (▲). Vom einwachsenden Bindegewebe (\*) ausgehend hat sich eine homogene Struktur um die Oberfläche der NanoBone® Partikel gebildet, die auf Knochenvorstufen mit Osteoblasten und Osteoidbildung hinweist (→). Zwischen den NanoBone® Partikeln (+) ist es zur Formierung von Knochengewebe (□) mit eingelagerten Osteozyten gekommen.

(MSC = mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2)



Explantaten, jedoch nicht in allen zu beobachten. Die Knochenstrukturen zeichneten sich durch eine homogene rosa bis pinke (HE) bzw. türkise (MG) Färbung vom umliegenden Gewebe ab und konnten vor allem angrenzend an die NanoBone® Partikel identifiziert werden. An der Oberfläche der Knochenstrukturen liegende Zellen wurden als Osteoblasten oder Knochenoberflächenzellen, in der Knochenmatrix eingemauerte Zellen

als Osteozyten identifiziert. In allen Konstrukten waren Zellansammlungen um die NanoBone<sup>®</sup> Partikel auffällig, die in einer homogenen Struktur lagen und auf Knochenvorstufen, bzw. Osteoidbildung hinweisen. In allen Explantaten konnte an der Oberfläche des Knochenersatzstoffes eine hohe Zahl von osteoklastenartigen mehrkernigen großen Zellen in Resorptionslakunen festgestellt werden. In den Kombinationsgruppen mit MSC und 60 µg/ml rhBMP-2 in Fibrin bzw. Serum waren z. T. Fettzellen zwischen den Knochenspannen zu erkennen (z. B. Abbildung 33D). Anzeichen einer Entzündungsreaktion zeigten sich in keinem Explantat.

#### 4.2.1.4 Knochenneubildungsrate

##### Quantifizierung der neugebildeten Knochenfläche

Die Quantifizierung der neugebildeten Knochenfläche erfolgte unter Anwendung einer Binärmaske. Mittels der Auswertungssoftware konnten alle Bereiche mit einer vorgegebenen Farbnuance automatisch markiert und ausgemessen werden. In Abbildung 34 ist ein HE-gefärbter Gewebeschnitt der Gruppe mit 60 µg/ml rhBMP-2 vor (A) und nach (B) Markierung dargestellt. Die berechnete neugebildete Knochenfläche wurde in Bezug zur Gesamtfläche des Gewebeschnittes gesetzt. Somit konnte die Knochenbildung unabhängig von der Konstruktgröße evaluiert werden. Um die Auswirkungen des unterschiedlichen Knochenbildungspotenzials der Schafe auf die Studie zu reduzieren, wurde innerhalb jeden Schafes die gemessene prozentuale Knochenfläche der einzelnen Implantate auf die gebildete prozentuale Knochenfläche in der Kontrollgruppe in diesem Schaf zurückgerechnet.

Im ersten Teilabschnitt wurde der NanoBone<sup>®</sup> Block je nach Versuchsgruppe mit Fibrin, Knochenmark, Blut, 60 µg/ml rhBMP-2, direkt reimplantierten oder kultivierten MSC implantiert. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Knochenbildung ( $p = 0,641$ ) (Abbildung 34C). Auch in der molekuarbiologischen Untersuchung wurden keine signifikant unterschiedlichen Genexpressionsprofile beobachtet (Osteocalcin  $p = 0,192$ , Osteonectin  $p = 0,434$ , Osteopontin  $p = 0,161$ , Kollagen Typ I  $p = 0,215$ , RUNX2  $p = 0,442$ ) (Abbildung 38) (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 27, S. 211; Tabelle 29, S.212).

Im zweiten Teilabschnitt wurde die beste Zellgruppe in Kombination mit 60 µg/ml rhBMP-2 implantiert. Aufgrund der Ergebnisse der makroskopischen Untersuchung wurden die Blut- und die Knochenmarkgruppen als weniger geeignet eingestuft, da es zu einer hochgradigen Resorption des Implantates gekommen ist. Zwischen den kultivierten und direkt reimplantierten MSC zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Infolge der vermuteten Tendenz einer ausgeprägteren Knochenneubildungsrate in der Gruppe der kultivierten MSC, bzw. aufgrund der Ergebnisse bezüglich der Vitalität der MSC (4.2.2.6 Zellproliferation und Apoptoseverhalten), wurden die kultivierten MSC als Zellquelle für



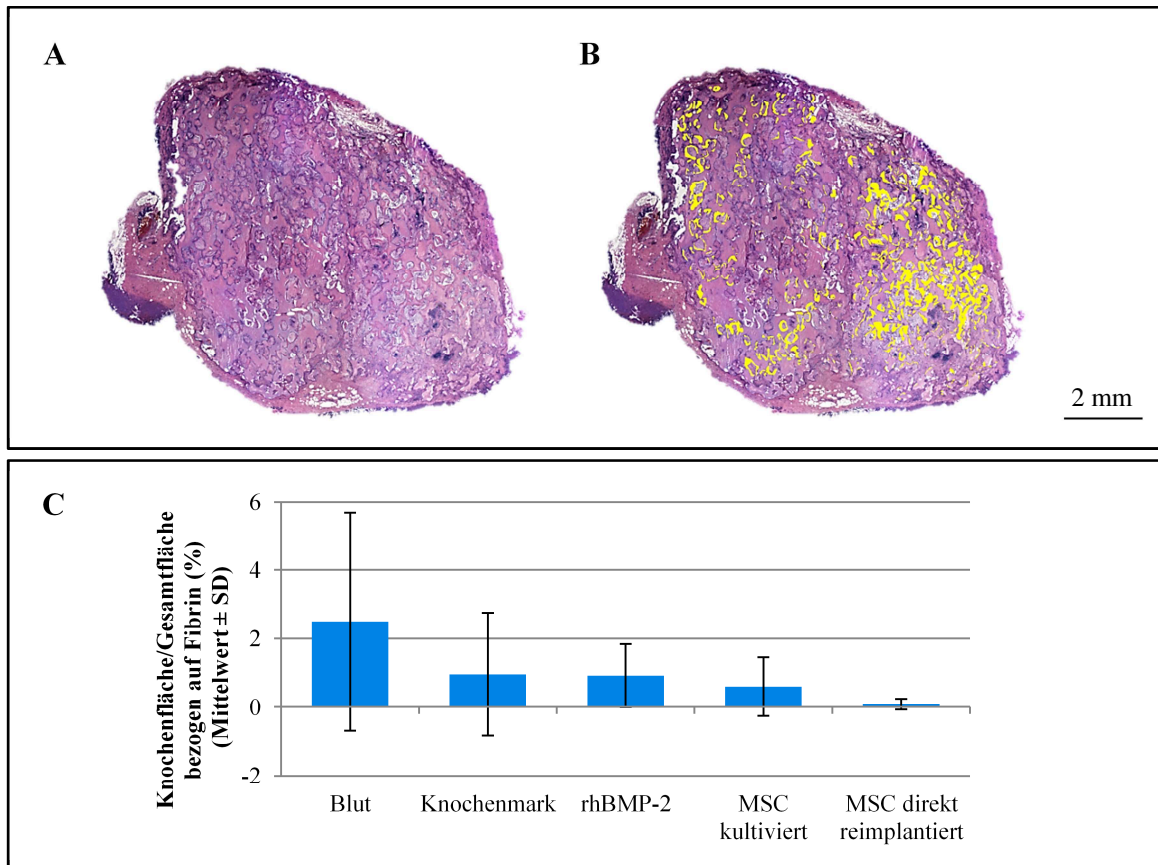


Abbildung 34: **Darstellung der Knochenflächenauswertung in den subkutanen Versuchsgruppen**

(A, B): Für die Knochenflächenauswertung wurde auf Hämatoxylin Eosin gefärbten Schnitten (A) die neugebildete Knochenfläche unter Anwendung einer Binärmaske markiert (B) und ausgemessen (beispielhafte Darstellung eines Konstrukt mit 60 $\mu$ g/ml rhBMP-2, Knochenfläche gelb kodiert). (C): Prozentuale Knochenneubildung in den subkutanen Versuchsgruppen bezogen auf die Gesamtfläche sowie auf die Fibrinkontrolle innerhalb von jedem Schaf. Zwischen den Versuchsgruppen wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der prozentualen Knochenneubildung beobachtet. (Kruskal-Wallis-Test,  $p > 0,05$ ) (MSC = mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2, SD = Standardabweichung)

die weiteren Versuche gewählt. Die Implantation der Kombinationsgruppe mit kultivierten MSC und 60  $\mu$ g/ml rhBMP-2 erfolgte in Fibrin sowie in autologem Serum. Serum wurde als alternatives Vergleichsmedium gewählt, da Ergebnisse einer vorausgegangenen Untersuchung in diesem Projekt gezeigt hatten, dass in Kombination mit kultivierten MSC sowohl autologes Serum als auch Zellkulturmedium eine signifikant höhere Knochenbildung im NanoBone<sup>®</sup> Block induzieren als Fibrin (Abbildung 35). Im zweiten Versuchsabschnitt wurde Serum eingesetzt infolge seiner körpereigenen Herkunft und der vermutlich optimalen Zusammensetzung für das Überleben der implantierten MSC.

In der Kombinationsgruppe in Serum kam es zu einer signifikant höheren Knochenneubildungsrate ( $3,19 \pm 1,28$  %) als in der Kombinationsgruppe in Fibrin ( $0,25 \pm 2,01$  %) ( $t(8) = -2,760$ ,  $p = 0,025$ ) (Abbildung 36A). Die Genexpression spezifischer Knochenmarker unterschied sich nicht signifikant (Osteocalcin  $p = 0,754$ , Osteonectin  $p = 0,917$ , Osteopontin  $p = 0,746$ , Kollagen Typ I  $p = 0,251$ , RUNX2

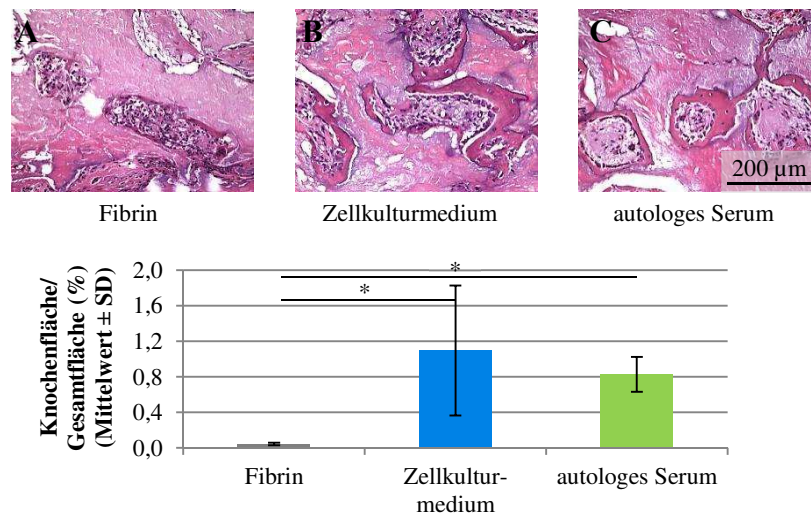


Abbildung 35: Vorausgegangene Untersuchung zur Evaluierung eines geeigneten Trägermediums für das Aufnehmen von Zellen und Wachstumsfaktoren

Die NanoBone® Blöcke wurden mit Fibrin, Zellkulturmedium und autologem Serum in Kombination mit 6 Millionen kultivierten MSC implantiert. Gegenüber Fibrin (A) konnte mit Zellkulturmedium (B) und autologem Serum (C) eine signifikant höhere Knochenneubildung induziert werden.

$p = 0,754$ ) (Abbildung 38) (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 27, S. 211; Tabelle 29, S. 212).

Der Vergleich zwischen der Kombinationsgruppe in Serum und der Gruppe mit kultivierten MSC bzw. mit  $60 \mu\text{g/ml}$  rhBMP-2 ergab einen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Knochenneubildungsrate ( $H(2) = 7,940$ ,  $p = 0,019$ ). In der Kombinationsgruppe in Serum bildete sich signifikant mehr Knochen als in den Gruppen mit ausschließlich kultivierten MSC ( $U = 1,0$ ,  $p = 0,016$ ) oder  $60 \mu\text{g/ml}$  rhBMP-2 ( $U = 1,0$ ,  $p = 0,016$ ). Zwischen kultivierten MSC und  $60 \mu\text{g/ml}$  rhBMP-2 ergab sich kein signifikanter Unterschied ( $p = 0,917$ ) (nach Bonferroni angepasstes Signifikanzniveau  $p \leq 0,017$ ) (Abbildung 36B).

Die Genexpression knochenspezifischer Marker zeigte zwischen diesen Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede (Osteocalcin  $p = 0,852$ , Osteonectin  $p = 0,326$ , Osteopontin  $p = 0,566$ , Kollagen Typ I  $p = 0,779$ , RUNX2  $p = 0,763$ ) (Abbildung 38) (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 29, S. 212).

Für Übersichtszwecke sind in Abbildung 37 die absolut gemessenen Knochenflächen in  $\text{mm}^2$  der verschiedenen Versuchsgruppen aufgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Konstruktgrößen sowie des unterschiedlichen Knochenbildungspotenzials der Schafe wurden diese Werte, wie oben beschrieben, nicht statistisch ausgewertet (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 28, S. 211).

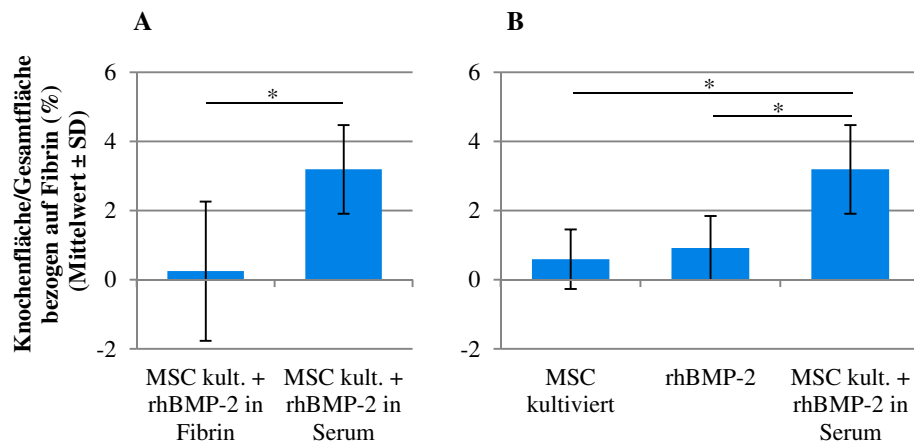


Abbildung 36: **Prozentuale Knochenneubildung in den subkutanen Versuchsgruppen bezogen auf die Gesamtfläche sowie auf die Fibrinkontrolle innerhalb von jedem Schaf**

(A): In der Kombinationsgruppe mit kultivierten MSC und 60 µg/ml rhBMP-2 bildete sich in Serum signifikant mehr Knochen als in Fibrin. (B): In der Kombinationsgruppe mit kultivierten MSC und 60 µg/ml rhBMP-2 in Serum bildete sich signifikant mehr Knochen als in der Gruppe mit ausschließlich kultivierten MSC oder 60 µg/ml rhBMP-2. (t-Test für unabhängige Stichproben / Kruskal-Wallis-Test / Mann-Whitney U-Test, \*  $p \leq 0,05$ ) (kult. MSC = kultivierte mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2, SD = Standardabweichung)

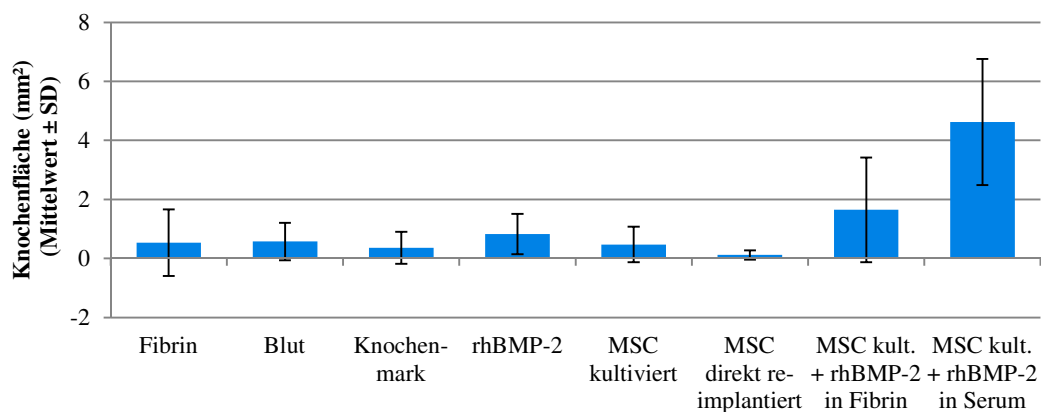


Abbildung 37: **Absolute Knochenneubildung in mm² in den subkutanen Versuchsgruppen**

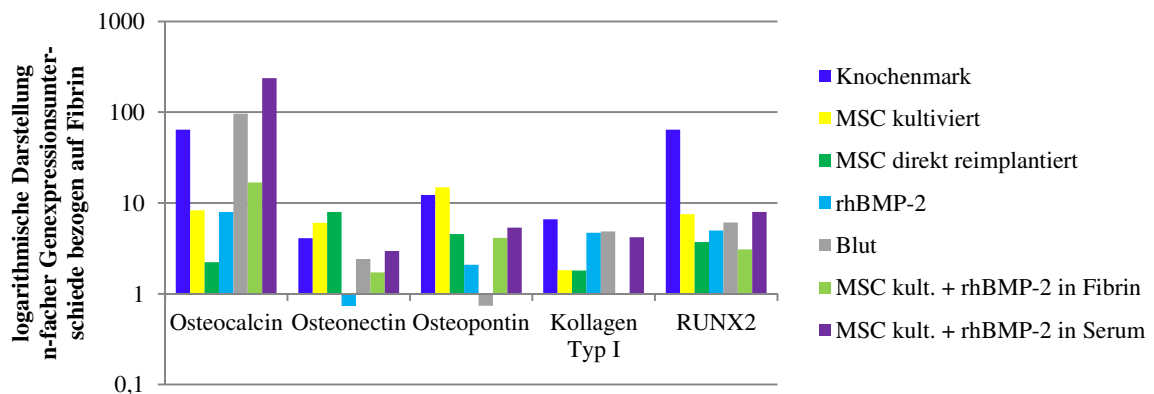
(kult. MSC = kultivierte mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2, SD = Standardabweichung)

## Molekularbiologische Analyse

Für die Untersuchung der Expression der Knochenmarker auf Genebene wurde die RNA von allen Explantaten isoliert und nachfolgend die DNA-Menge mittels quantitativer real-time PCR quantifiziert.

Für nahezu alle getesteten Gene konnte in den einzelnen Gruppen eine Hochregulation gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden (Abbildung 38). Wie bereits oben beschrieben konnte zwischen den getesteten Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied in der Expression der einzelnen Knochenmarker festgestellt werden. Vergleichbar zu der histologischen Knochenflächenauswertung waren hohe Standardabweichungen auffällig. Die anschließende Gelelektrophorese konnte die Ergebnisse der quantitativen real-time PCR bestätigen, auch hier zeigten sich Unterschiede zwischen den einzelnen Schafen. In Abbildung 38B sind exemplarisch die Resultate der Gelelektrophorese der Kombinationsgruppe mit kultivierten MSC und 60 µg/ml rhBMP-2 in Serum und der Kontrollgruppe mit Fibrin dargestellt (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 29, S. 212).

A



B

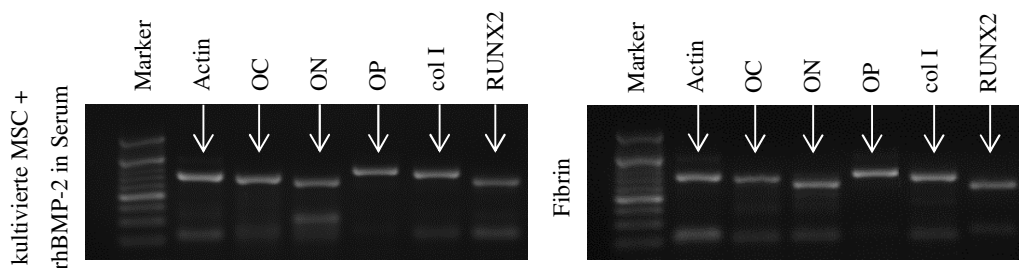


Abbildung 38: **Ergebnisse der molekularbiologischen Analyse der subkutanen Versuchsgruppen**

(A): *n*-fache Genexpression spezifischer Knochenmarker in den einzelnen Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (NanoBone® mit Fibrin) und normalisiert zum Referenzgen (Actin). Die Analyse mittels quantitativer real-time PCR ergab, dass nahezu alle getesteten Marker in allen Gruppen in unterschiedlichem Maße hochreguliert waren. (B): Die Ergebnisse der Gelelektrophorese spiegeln die Resultate der quantitativen real-time PCR wider. Dargestellt sind die Ergebnisse der Kombinationsgruppe mit kultivierten MSC und 60 µg/ml rhBMP-2 in Serum und der Kontrollgruppe mit Fibrin. Es konnten keine deutlichen Unterschiede zwischen den Gruppen erkannt werden. (col I = Kollagen Typ I, kult. MSC = kultivierte mesenchymale Stammzellen, OC = Osteocalcin, ON = Osteonectin, OP = Osteopontin, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2, RUNX2 = runt-related transcription factor 2, PCR = Polymerasekettenreaktion)



### Immunhistologischer Nachweis von neugebildetem Knochengewebe

Die immunhistologische Detektion des neugebildeten Knochengewebes in den Gewebeschnitten der subkutanen Versuchsgruppen erfolgte durch die Anwendung spezifischer Antikörper gegen Kollagen Typ I (Abbildung 39) und Alkalische Phosphatase (Abbildung 40).

Der Nachweis von Kollagen Typ I, Hauptbestandteil der Knochengrundsubstanz, diente dem immunhistologischen Nachweis von neugebildeten Knochenstrukturen. Der braun angefärbte Knochen konnte vor allem in den Kombinationsgruppen mit kultivierten MSC und 60 µg/ml rhBMP-2 in Fibrin bzw. Serum sowie in der Gruppe mit 60 µg/ml rhBMP-2 detektiert werden. Auch in den Gruppen mit Blut, Knochenmark und kultivierten MSC sowie zum Teil in der Gruppe mit direkt reimplantierten MSC und Fibrin wurden Knochenstrukturen identifiziert. Die Knochenbildung fand fast ausschließlich in den Bereichen um die NanoBone® Partikel statt.

Die immunhistochemische Anfärbung der Alkalischen Phosphatase dient der Detektion von Osteoblasten, die dieses Enzym synthetisieren und in ihre Umgebung abgeben. An den neugebildeten Knochenstrukturen kam es an der charakteristischen Lokalisation der Osteoblasten, der Oberfläche zwischen neugebildetem Knochen und eingewachsenem Bindegewebe, zu einer saumartigen Anfärbung der Knochenstrukturen. Mit dieser Färbung war es möglich, Bereiche mit Knochenstufen zu detektieren, die sich möglicherweise noch nicht mittels des Kollagen Typ I Antikörper anfärben ließen (z. B. Abbildung 40B).

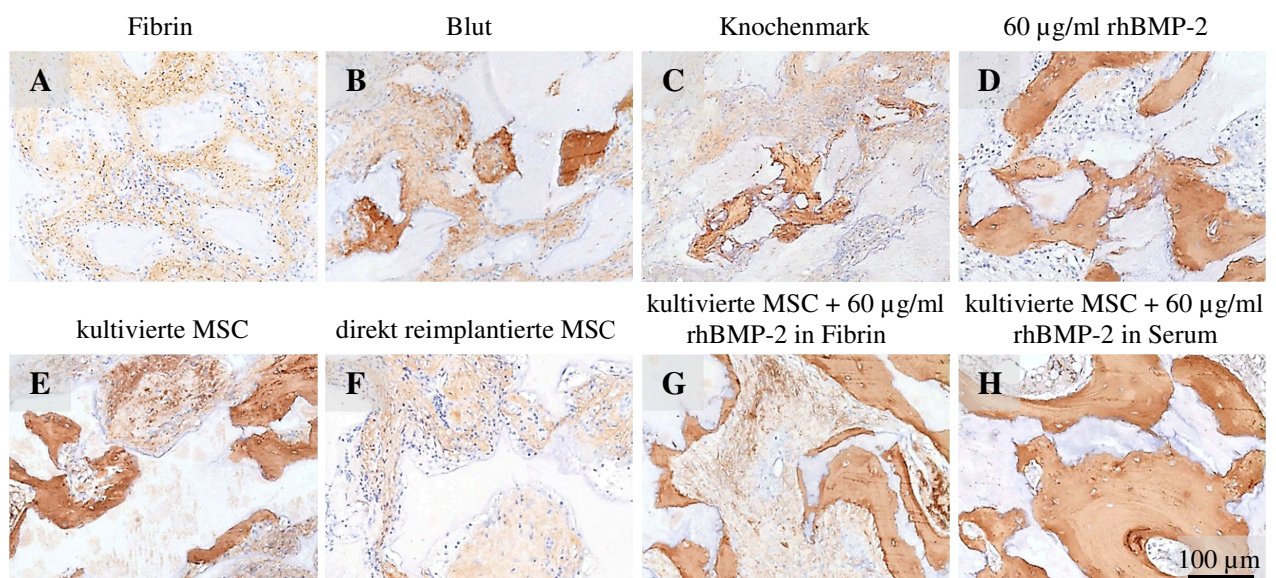


Abbildung 39: **Kollagen Typ I immunhistologische Färbung (subkutane Versuchsgruppen)**

Dargestellt sind Bereiche mit Knochenbildung in der Kollagen Typ I Färbung, in denen der neugebildete Knochen als braune Struktur vor allem an der Oberfläche der NanoBone® Partikel zu erkennen ist. In den Gruppen mit Fibrin (A) und direkt reimplantierten MSC (F) konnte nur sehr vereinzelt oder kein Knochengewebe detektiert werden. (MSC = mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2)



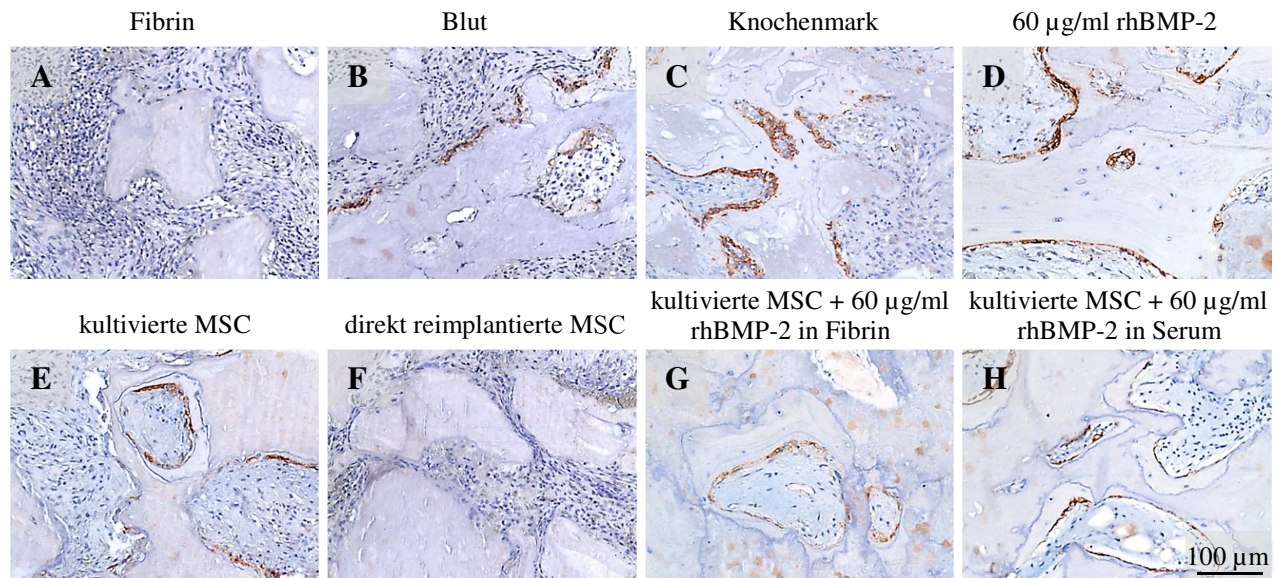


Abbildung 40: Alkalische Phosphatase immunhistologische Färbung (subkutane Versuchsgruppen)

Die Alkalische Phosphatase wird von Osteoblasten gebildet, die an der Oberfläche der Knochenstrukturen lokalisiert sind (braune Anfärbung). Vor allem in den Gruppen mit Blut, Knochenmark, rhBMP-2, kultivierten MSC und in den Kombinationsgruppen kam es zu einer deutlichen Anfärbung. (MSC = mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2)

#### 4.2.1.5 Quantifizierung der Querschnittsfläche

Die Explantataufarbeitung sowie die Anfertigung der histologischen Schnitte zur Quantifizierung der Querschnittsfläche der subkutanen Konstrukte erfolgten für alle Versuchsgruppen nach identischem Protokoll. Die ausgemessene Querschnittsfläche, bezogen auf die ursprüngliche Querschnittsfläche eines NanoBone<sup>®</sup> Blockes vor Implantation (NanoBone<sup>®</sup> nativ), konnte somit als Maß für die Resorption der NanoBone<sup>®</sup> Blöcke herangezogen werden. Für die Bestimmung der ursprünglichen Querschnittsfläche wurde ein nativer NanoBone<sup>®</sup> Block wie die Explantate aus den Versuchsgruppen für die Histologie vorbereitet, um den Einfluss einer durch die Entwässerung bedingten Schrumpfung auf die Ergebnisse auszuschließen. Die Auswertung zweier Ebenen ergab eine Querschnittsfläche von  $91,2 \pm 5,6 \text{ mm}^2$ , die als Bezug für die Flächen der Versuchsgruppen gewählt wurde. Im Gruppenvergleich zeigte sich ein hochsignifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ( $F(8, 39) = 10,900$ ,  $p < 0,001$ ) (Abbildung 41). In der Blutgruppe kam es zu einer signifikanten bzw. hochsignifikanten Abnahme der Fläche auf  $35,0 \pm 16,1 \%$  im Gegensatz zu Fibrin ( $64,7 \pm 11,2 \%$ ,  $p = 0,011$ ), kultivierten MSC ( $67,2 \pm 8,3 \%$ ,  $p = 0,014$ ) und der Kombinationsgruppe aus kultivierten MSC und  $60 \mu\text{g/ml}$  rhBMP-2 in Serum ( $68,2 \pm 14,6 \%$ ,  $p = 0,01$ ). In der Knochenmarkgruppe verringerte sich die Querschnittsfläche auf  $31,9 \pm 13,2 \%$ , die damit signifikant bzw. hochsignifikant kleiner war als die der Gruppe mit Fibrin ( $p = 0,004$ ),  $60 \mu\text{g/ml}$  rhBMP-2 ( $61,1 \pm 19,2 \%$ ,  $p = 0,036$ ), kultivierten MSC ( $p = 0,005$ ) und kultivierten MSC mit  $60 \mu\text{g/ml}$  rhBMP-2 in Serum ( $p = 0,004$ ). Im Vergleich zur ursprünglichen Fläche eines nativen NanoBone<sup>®</sup>

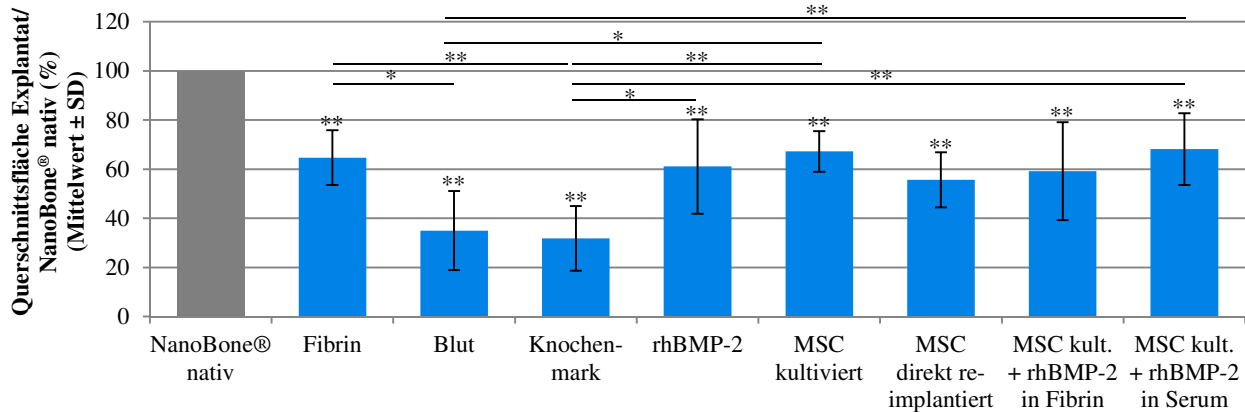


Abbildung 41: Vergleich der Konstruktquerschnittsflächen der subkutanen Versuchsgruppen

Verglichen zur Querschnittsfläche vor Implantation (NanoBone® nativ) kam es in allen Gruppen zu einer hochsignifikanten Verringerung der Fläche. Die Gruppen mit Fibrin, kultivierten MSC sowie die Kombinationsgruppe mit kultivierten MSC und 60 µg/ml rhBMP-2 in Serum wiesen hochsignifikant höhere Werte auf als die Knochenmarkgruppe. Die Kombinationsgruppe mit kultivierten MSC und 60 µg/ml rhBMP-2 in Serum wies einen hochsignifikant höheren Wert auf als die Blutgruppe. Zwischen der Blut- und Fibringruppe bzw. der Gruppe mit kultivierten MSC sowie der Knochenmarkgruppe und 60 µg/ml rhBMP-2 Gruppe kam es zu signifikanten Veränderungen. (einfaktorielle ANOVA, Tukey HSD post-hoc-Test, \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ ) (kult. MSC = kultivierte mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2, SD = Standardabweichung)

Blockes wurde in allen Versuchsgruppen eine hochsignifikant kleinere Fläche gemessen (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 30, S. 212; Tabelle 31, S. 212).

#### 4.2.1.6 Quantifizierung der NanoBone® Fläche

Um eine Aussage bezüglich der Resorption von NanoBone® zu erhalten, wurde die Fläche der NanoBone® Partikel im Gewebe gemessen und in Bezug zur Gesamtfläche gesetzt. Als Referenzwert diente die ausgemessene Fläche der NanoBone® Partikel in einem NanoBone® Block vor Implantation (NanoBone® nativ) (NanoBone® Fläche:  $64,1 \pm 0,6$  %, Poren:  $35,9 \pm 0,6$  %). Bezogen auf den Referenzwert wurde die Degradierungsrate der einzelnen Versuchsgruppen berechnet.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden ( $p = 0,565$ ) (Abbildung 42A). Die Degradierungsraten der einzelnen Gruppen ergaben nach der Implantationsdauer von 12 Wochen zusammengefasst eine Degradierungsrate von  $44,2 \pm 13,3$  % (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 32, S. 213). Abbildung 42B veranschaulicht die Gewebezusammensetzung der Konstrukte. Die Werte aller subkutanen Versuchsgruppen zusammengefasst wurde eine Bindegewebe-/Porenfläche von  $62,1 \pm 8,4$  %, eine NanoBone® Fläche von  $35,8 \pm 8,5$  % sowie eine Knochenfläche von  $2,1 \pm 2,9$  % gemessen (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 33, S. 213). Im Vergleich zum Referenzwert (NanoBone® nativ) ergab sich eine hochsignifikante Abnahme der NanoBone® Fläche nach Implantation ( $t(43) = 4,663$ ,  $p \leq 0,001$ ). Das Einwachsen von Bindegewebe wurde durch die hochsignifikante Zunahme der Bindegewebe-/Porenfläche in den subkutanen Versuchsgruppen verdeutlicht ( $t(43) = -4,385$ ,  $p \leq 0,001$ ) (Abbildung 42C).

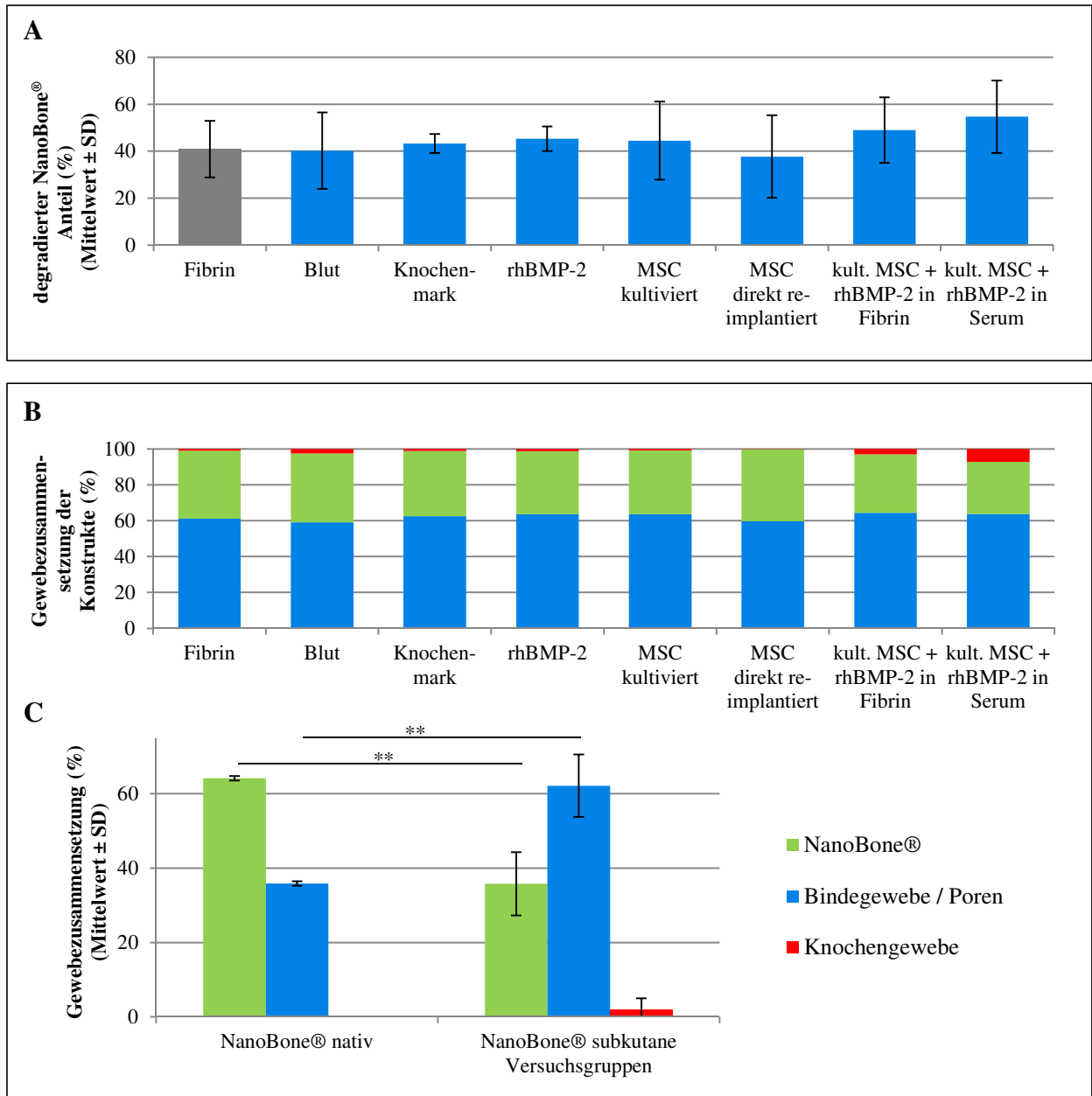


Abbildung 42: **Quantifizierung der NanoBone® Degradierungsraten und Gewebezusammensetzung der subkutanen Versuchsgruppen**

(A): NanoBone® Degradierungsraten im Gruppenvergleich. Zwischen den Versuchsgruppen wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt (einfaktorielle ANOVA,  $p > 0,05$ ). (B): Gewebezusammensetzung der Explantate im Gruppenvergleich. Der größte Anteil der Konstrukte besteht aus Bindegewebe und Poren, bzw. Bereichen mit nicht eingewachsenem Gewebe. NanoBone® macht über ein Drittel der Konstrukte aus, während die neugebildeten Knochenstrukturen den geringsten Anteil einnehmen. (C): Der Vergleich der NanoBone® Fläche eines NanoBone® Blockes vor Implantation (NanoBone® nativ) mit dem Mittelwert aller subkutanen Versuchsgruppen ergab eine hochsignifikante Reduktion der NanoBone® Fläche nach Implantation der Blöcke. Im Gegensatz dazu kam es zu einer hochsignifikanten Zunahme der Bindegewebe-/Porenfläche bedingt durch das Einwachsen von Bindegewebe in den Knochenersatzstoff (t-Test für unabhängige Stichproben,  $** p \leq 0,001$ ). (kult. MSC = kultivierte mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2, SD = Standardabweichung)



#### 4.2.1.7 Matrixwechsel und Vitalfläche von NanoBone®

Der Matrixwechsel von NanoBone® wurde mit der Perjodsäure Schiff- (periodic acid Schiff, PAS) Färbung untersucht. Unsubstituierte Polysaccharide, neutrale Mukopolysaccharide, Muko- und Glykoproteine sowie Glyko- und Phospholipide werden durch eine rosa bis violette Färbung der Glykolgruppen nachgewiesen.

Der Wechsel von einer rein anorganischen NanoBone® Matrix zu einer organischen konnte in allen Bereichen, in denen Gewebe eingewachsen war, demonstriert werden. Vor allem an den Oberflächen färbten sich die Knochenersatzpartikel violett an, zentral waren sie meist schwächer angefärbt (Abbildung 43). In den Konstrukten, die einen zentralen nicht vaskularisierten Bereich ohne eingewachsene Gewebestrukturen aufwiesen, konnte deutlich der Unterschied zwischen Bereichen mit Matrixwechsel und NanoBone® Strukturen ohne Matrixwechsel demonstriert werden (Abbildung 43I).

Zur Quantifizierung des Ausmaßes des vaskularisierten Anteils im Knochenersatzstoff wurden die von Gewebe durchwachsenen Bereiche (Vitalfläche) der NanoBone® Blöcke ausgemessen und in Bezug zur Gesamtfläche gesetzt. Die Gruppen mit Blut, Knochenmark sowie kultivierten MSC in Kombination mit 60 µg/ml rhBMP-2 in Serum wiesen

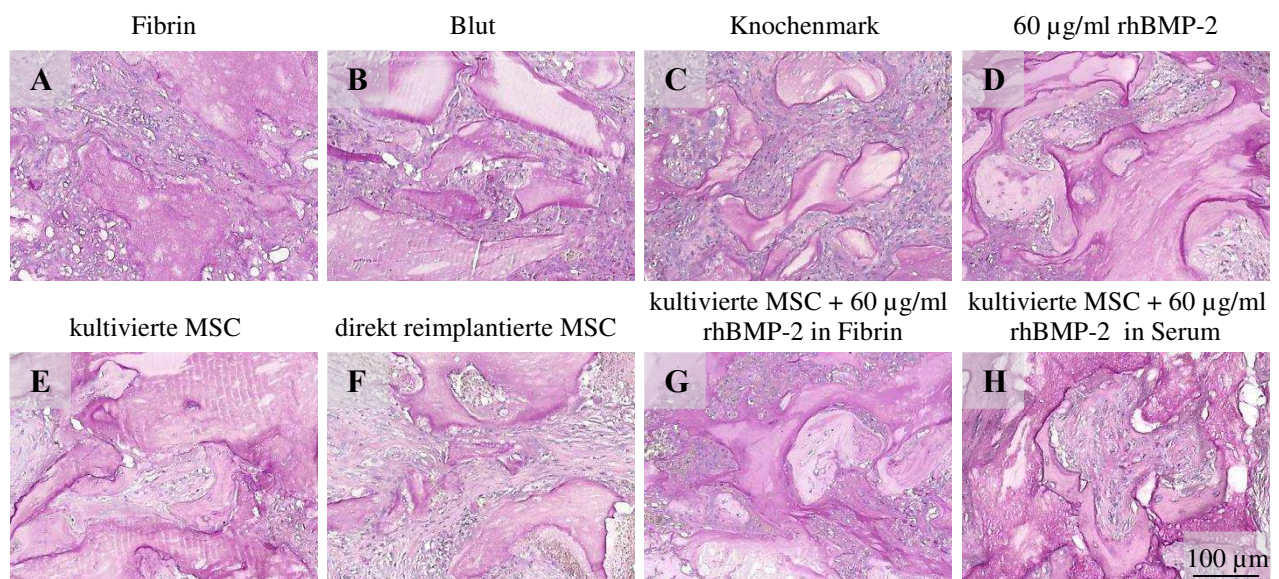
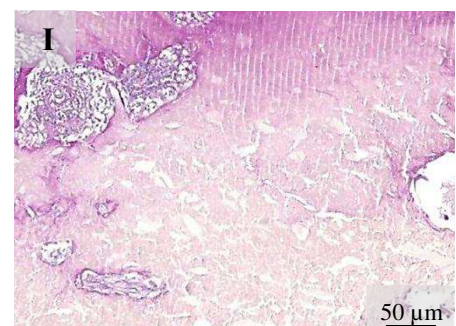


Abbildung 43: (A–H): Repräsentative Ausschnitte der subkutanen Versuchsgruppen aus Bereichen mit eingewachsenen Gewebestrukturen in der Perjodsäure Schiff-Färbung

Vor allem die Oberfläche der NanoBone® Partikel färbte sich in den gewebedurchwachsenen Bereichen violett an und gibt Hinweise auf einen Matrixwechsel von einer anorganischen zu einer organischen Matrix. Im Zentrum der Partikel konnte meist noch die hellrosa angefärbte ursprüngliche anorganische Matrix detektiert werden (z. B. [B]). (I): Übergang von einem violett angefärbten Bereich mit eingewachsenem Gewebe (oben) zu einem Bereich ohne eingewachsene Gewebestrukturen mit heller Färbung (unten) des Knochenersatzmaterials.

(MSC = mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2)



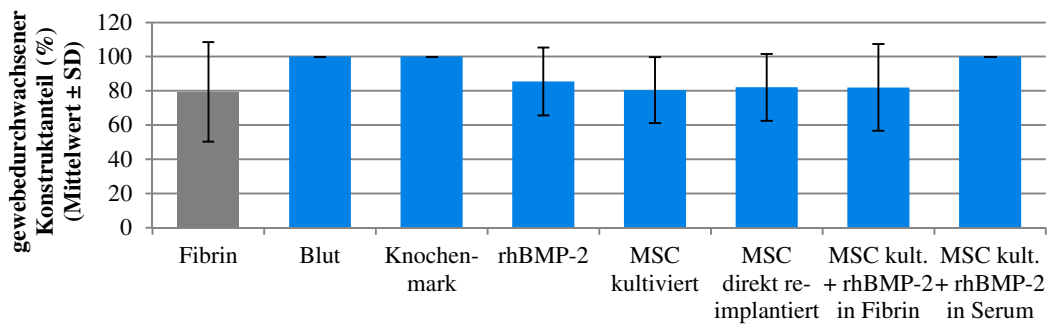


Abbildung 44: **Quantifizierung der gewebedurchwachsenen bzw. vitalen Konstruktanteile der subkutanen Versuchsgruppen**

In der Blut-, Knochenmark- und Kombinationsgruppe mit kultivierten MSC und rhBMP-2 in Serum waren die Explantate vollständig mit Gewebe durchwachsen. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen konnten hinsichtlich der vitalen Konstruktanteile keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. (Kruskal-Wallis-Test,  $p > 0,05$ ) (kult. MSC = kultivierte mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2, SD = Standardabweichung)

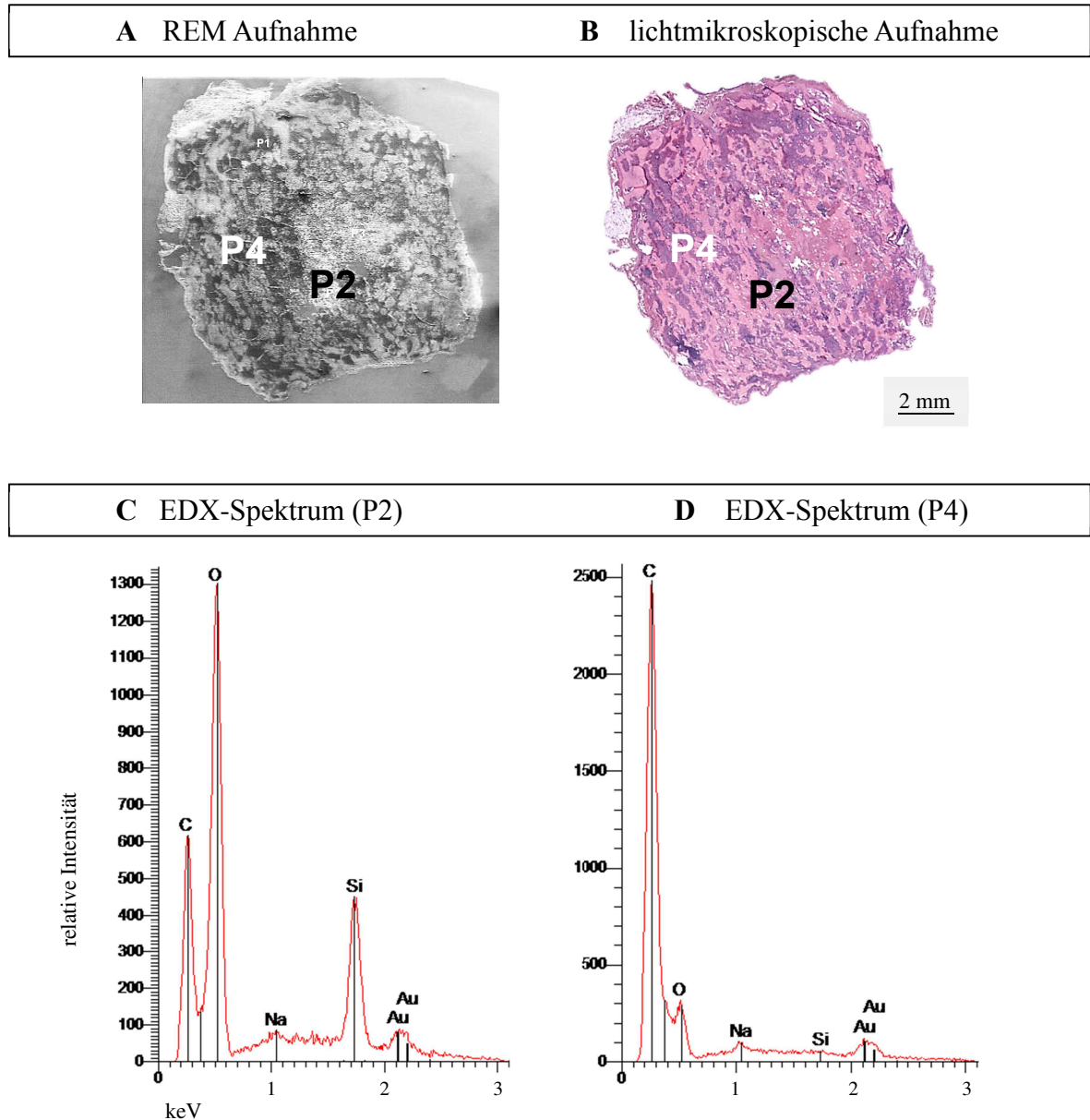
vollständig gewebedurchwachsene NanoBone<sup>®</sup> Blöcke auf (100 %). Zwischen den Gruppen wurde ein signifikanter Unterschied festgestellt ( $p = 0,043$ ). In den Mehrfachvergleichen (Kontrollgruppe Fibrin versus Versuchsgruppen) mit einem nach Bonferroni korrigierten Signifikanzniveau von  $p \leq 0,007$  konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Blut  $p = 0,037$ , Knochenmark  $p = 0,037$ , 60  $\mu\text{g/ml}$  rhBMP-2  $p = 0,651$ , direkt reimplantierte MSC  $p = 0,711$ , kultivierte MSC  $p = 1,0$ , kultivierte MSC mit 60  $\mu\text{g/ml}$  rhBMP-2 in Fibrin  $p = 0,590$  und in Serum  $p = 0,037$ ) (Abbildung 44). Alle Mittelwerte zusammengefasst ergab sich eine vitale Fläche von  $88,0 \pm 19,8 \%$  (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 34, S. 213).

### Rasterelektronenmikroskopie/energiedispersive Röntgenspektroskopie

Von jedem Explantat wurden exemplarisch rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen gemacht. In Kombination erfolgte die Analyse der spezifischen Elementzusammensetzung der Proben mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie (energy dispersive x-ray spectroscopy, EDX). In jedem Gewebeschnitt wurden zwischen zwei bis acht Positionen für die Messung bestimmt, ausgewählt hinsichtlich Strukturierung und Schattierung unterschiedlicher Bereiche (z. B. Abbildung 45A, Position 2 und 4 hervorgehoben).

In einigen Arealen, die noch nicht oder nur wenig mit Gewebe durchwachsen waren, konnten relativ hohe Konzentrationen an Silizium sowie Sauerstoff gefunden werden (Abbildung 45C), während in gewebedurchwachsenen Bereichen hohe Kohlenstoff- und nur geringe Siliziumanteile nachgewiesen werden konnten (Abbildung 45D). Der kontinuierliche Hintergrund bzw. die Basallinie ist Folge der Röntgenbremsstrahlung. Der Gold (Au) Peak ist auf eine für die Analyse notwendige Beschichtung der Probe zurückzuführen. In Abbildung 46 sind Ausschnitte der Gewebeschnitte in unterschiedlicher Vergrößerung dargestellt. Vor allem in den Randbereichen waren die NanoBone<sup>®</sup> Partikel vollständig mit eingewachsenem Bindegewebe und Blutgefäßen umgeben (Abbildung

46A–C). Wie bereits in der HE-, MG- sowie in der PAS-Färbung wurden auch in der REM bzw. EDX-Analyse Bereiche identifiziert, die nicht vaskularisiert waren und keinem Remodelling unterlagen (Abbildung 46D).



**Abbildung 45: Exemplarische Darstellung der Analyse der Elementzusammensetzung in den subkutanen Versuchsgruppen mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie**

Dargestellt sind eine rasterelektronenmikroskopische (A) und die dazugehörige lichtmikroskopische (HE-Färbung) (B) Aufnahme eines Gewebeschnitts aus der Gruppe mit direkt reimplantierten mesenchymalen Stammzellen. Im Gewebeschnitt wurden hinsichtlich Schattierung und Strukturierung unterschiedliche Positionen bestimmt, in denen die Elementzusammensetzung mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie analysiert wurde (C, D). In Position 2 (helle Schattierung) aus einem nicht oder nur sehr geringgradig gewebedurchwachsenen Bereich (C) wurde ein sehr hoher Anteil an Silizium gemessen, im Gegensatz zur Position 4 (dunkle Schattierung) aus einem gewebedurchwachsenen Bereich (D), in dem bereits niedrige Silizium- sowie hohe Kohlenstoffanteile zu finden waren. (Au = Gold, C = Kohlenstoff, Na = Natrium, O = Sauerstoff, P = Position, REM = Rasterelektronenmikroskopie, Si = Silizium)



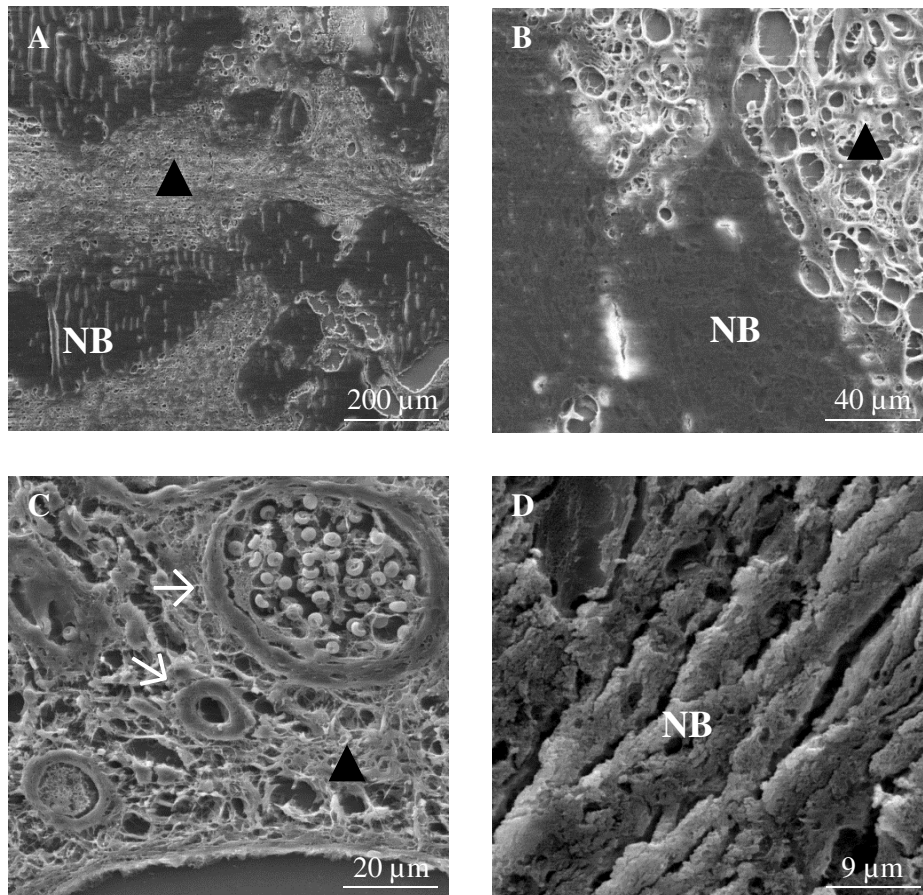


Abbildung 46: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen aus verschiedenen Bereichen der Gewebeschnitte der subkutanen Versuchsgruppen

Zwischen den NanoBone® (NB) Partikeln konnte eingewachsenes Bindegewebe (▲) visualisiert werden (A, B). In den vaskularisierten Bereichen wurde eine hohe Zahl von Blutgefäßen (→) festgestellt (C). Im Gegensatz dazu wurden auch Bereiche beobachtet, in denen es zu keiner Vaskularisierung und keinem Einwachsen von Bindegewebe gekommen ist und die ursprüngliche NanoBone® Architektur noch vollständig erhalten war (D).

#### 4.2.1.8 Osteoklastische Aktivität im Gruppenvergleich

Zur Detektion TRAP-positiver Zellen, bzw. der osteoklastischen Aktivität im Gewebe, wurde an zwei Schnitten aus verschiedenen Ebenen aller Explantate eine TRAP-Färbung (tartrat-resistente saure Phosphatase, Tartrat-resistente saure Phosphatase) durchgeführt. In allen Konstrukten konnten mehrkernige TRAP-positive Zellen identifiziert werden, die hauptsächlich an der Oberfläche der NanoBone® Partikel lokalisiert waren und in Resorptionslakunen lagen (Abbildung 47). Zum Teil war das Knochenersatzmaterial vollständig von TRAP-positiven Zellen umlagert. An neugebildeten Knochenstrukturen konnten nur an vereinzelt Stellen TRAP-positive Zellen gefunden werden. In einigen Gewebeschnitten wurden TRAP-positive Zellen detektiert, die weder an Knochenersatzmaterial noch an Knochen angrenzten und somit als inaktiv gewertet und nicht mit in die Auswertung einbezogen wurden.

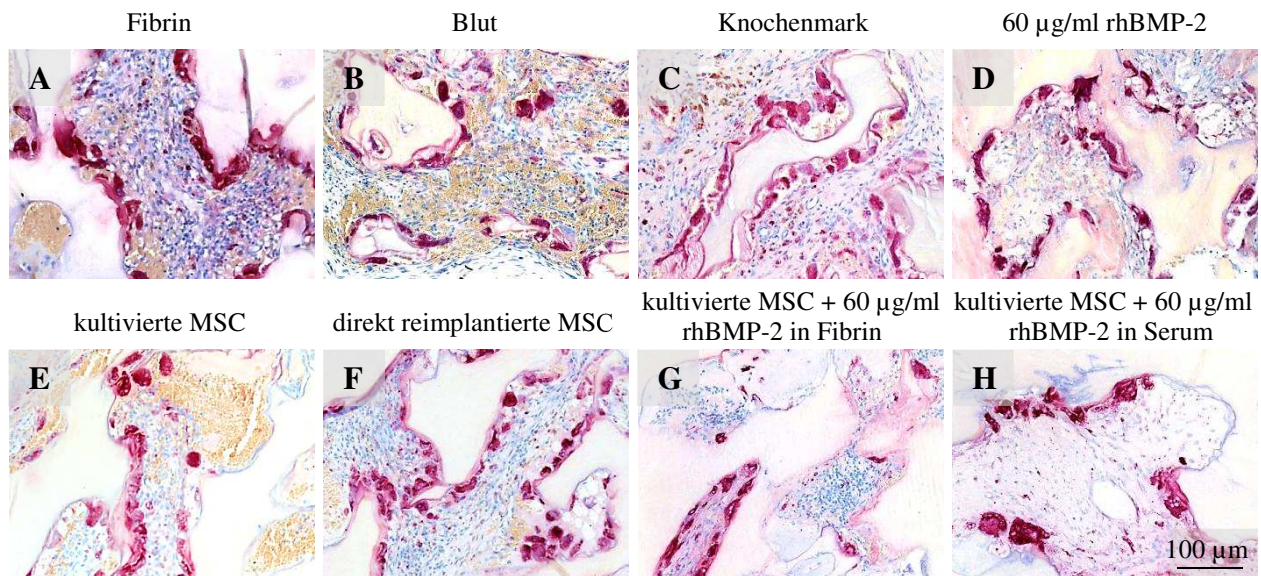


Abbildung 47: *Tartrat-resistente saure Phosphatase-Färbung (subkutane Versuchsgruppen)*

Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte der subkutanen Gruppen aus Bereichen mit eingewachsenen Gewebestrukturen. Die Oberfläche der NanoBone® Partikel wurde zum Teil vollständig von rot angefärbten TRAP-positiven mehrkernigen Zellen eingenommen. (MSC = mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2)

In vier ROIs (regions of interest) erfolgte die Auszählung der TRAP-positiven Zellen pro  $100 \mu\text{m}$  NanoBone® Rand. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Zelldichte festgestellt werden ( $p = 0,412$ ) (Abbildung 48). Die Zusammenfassung der Daten aller Gruppen ergab eine Osteoklastenzahl von  $0,6 \pm 0,3$  pro  $100 \mu\text{m}$  NanoBone®. In der Kombinationsgruppe mit kultivierten MSC und  $60 \mu\text{g/ml}$  rhBMP-2 in Serum wurden die niedrigsten Mittelwerte beobachtet ( $0,4 \pm 0,3$  Osteoklasten pro  $100 \mu\text{m}$  NanoBone® Rand) (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 35, S. 214).

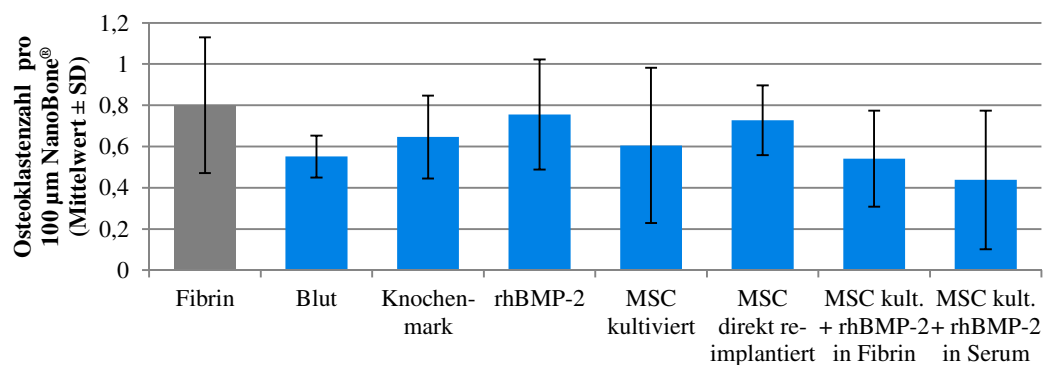


Abbildung 48: *Osteoklastenzahl pro  $100 \mu\text{m}$  NanoBone® Rand in den subkutanen Versuchsgruppen*

Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied in der Osteoklastenzahl festgestellt werden. (Kruskal-Wallis-Test,  $p > 0,05$ ) (kult. MSC = kultivierte mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2, SD = Standardabweichung)



#### **4.2.1.9 Mesenchymale Stammzellen – direkt reimplantiert versus kultiviert**

##### **Zellproliferation**

Um die Zellproliferation in den einzelnen Gruppen zu bewerten, wurde in mehreren Schnitten pro Gruppe der Proliferationsmarker Ki67 mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein immunhistologisch detektiert. Eine Mehrfachmarkierung sowie das Betrachten der Schnitte durch verschiedene Anregungsfilter machte die Beurteilung der proliferierenden Zellen in Zusammenhang mit den implantierten MSC möglich. Das Fluorochrom Fluoreszein wurde bei einer Anregungswellenlänge von 470–490 nm als grüner Farbstoff (Blauanregung), die DiI-gelabelten Zellen bei 530–550 nm (Grünanregung) als roter Farbstoff sichtbar. Die Zellkerne wurden mit dem Fluorochrom DAPI gegengefärbt und konnten bei einem Anregungslicht von 360–370 nm (UV-Anregung) als blaue Markierung wahrgenommen werden. In allen Gruppen konnte in den vaskularisierten Randbereichen eine hohe Zahl gleichmäßig verteilter, grün-blau doppeltmarkierter Zellen detektiert werden (Abbildung 49). In den MSC Gruppen war es möglich, den für die MSC Färbung verwendeten rot leuchtenden Farbstoff DiI nachzuweisen. Im Randgewebe konnte in den Konstrukten mit kultivierten MSC neben vielen grün-blau auch rot-blau doppeltmarkierte Zellen gefunden werden. Zum Teil wurden grün-rot-blau dreifachmarkierte Zellen detektiert (Abbildung 49L). In den Gruppen mit direkt reimplantierten MSC waren in den vaskularisierten Randbereichen nur vereinzelt rot-blaue Doppelmarkierungen sichtbar. In allen Zellgruppen waren in den zentralen nicht vaskularisierten NanoBone<sup>®</sup> Bereichen viele einfach markierte rot fluoreszierende Zellen auffällig.

##### **Apoptose**

Um die Zellvitalität in den einzelnen Gruppen zu überprüfen, wurde in mehreren Schnitten pro Versuchsgruppe die immunhistologische Detektion von apoptotischen Zellen mittels TUNEL-Färbung vorgenommen. Wie bereits für die Ki67-Färbung beschrieben, waren die DiI-gelabelten MSC als rot fluoreszierende Zellen sichtbar, die Zellkerne wurden mittels eines blau fluoreszierenden Farbstoffes (DAPI) markiert, während die apoptotischen Zellen mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszein angefärbt wurden. In allen Gruppen der subkutanen Konstrukte konnten in 200facher Vergrößerung gleichmäßig verteilt ca. 1–2 grün-blau doppeltmarkierte apoptotischen Zellen pro Gesichtsfeld visualisiert werden (Abbildung 50). In den Versuchsgruppen mit MSC wurden keine grün-rot-blau dreifachmarkierte Zellen gefunden. Wie bereits für die Proliferationsfärbung beschrieben, wurden auch in dieser Färbung nur wenige rot-blaue Doppelmarkierungen in den Gruppen mit direkt reimplantierten MSC detektiert und zentral vergleichbar viele einfach markierte rot fluoreszierende Zellen beobachtet.

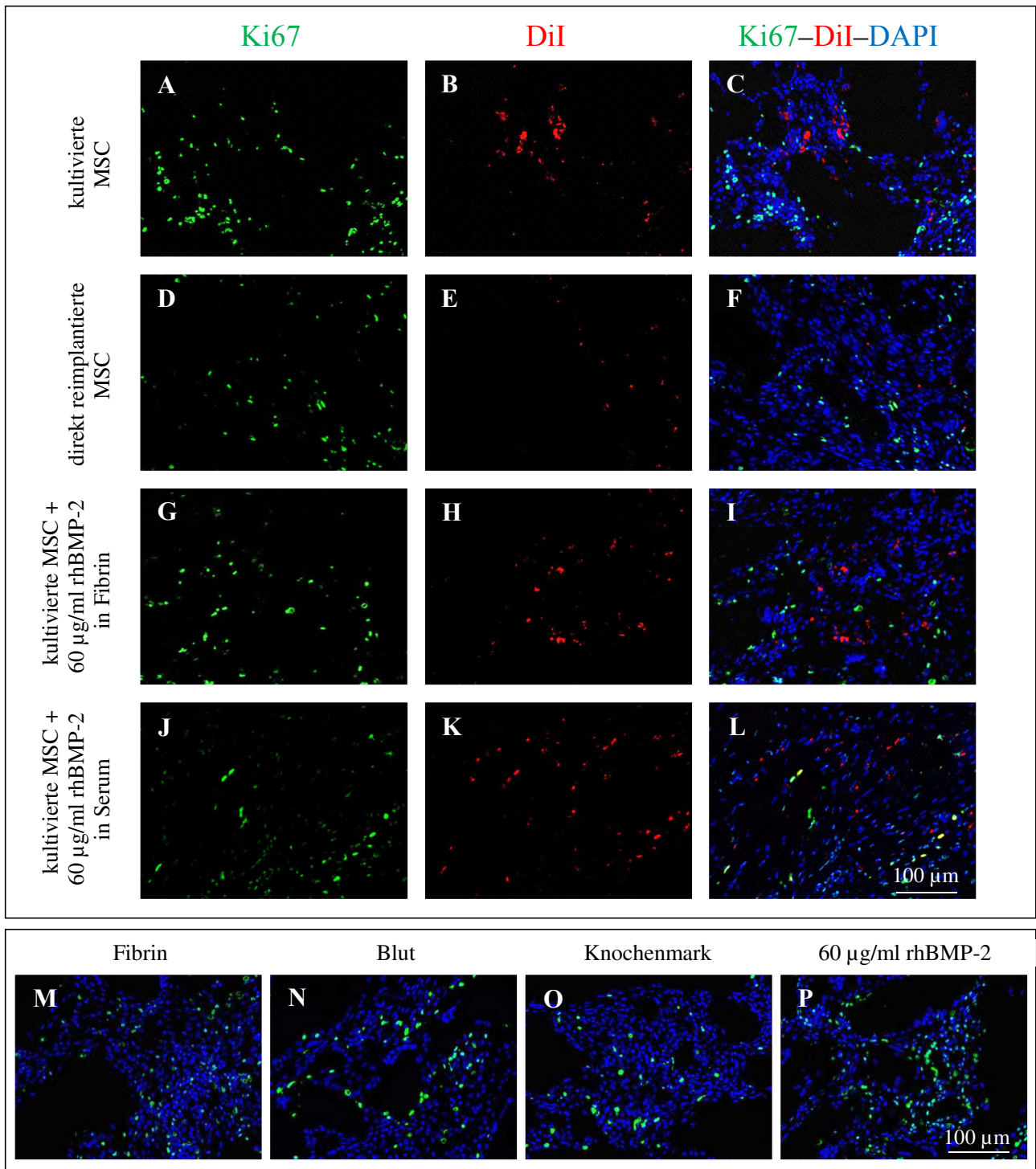


Abbildung 49: Ki67-Färbung zur Detektion von proliferierenden Zellen in den subkutanen Versuchsgruppen

Die Darstellung der Ki67-positiven, d. h. der proliferierenden Zellen im Gewebe, erfolgte mittels eines grün fluoreszierenden Farbstoffes (Fluoreszein) (A, D, G, J). Der für die Markierung der mesenchymalen Stammzellen vor Implantation verwendete rot fluoreszierende Farbstoff DiI (B, E, H, K) konnte vor allem in den Gruppen mit kultivierten MSC (A–C/G–I/J–L) in großer Zahl nachgewiesen werden. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI (blau fluoreszierend). Sowohl grün-blau doppeltmarkierte als auch grün-rot-blau dreifachmarkierte Zellen (z. B. L) konnten detektiert werden. In der Gruppe mit direkt reimplantierten MSC (D–F) waren rot-blau fluoreszierende Zellen nur vereinzelt zu finden. In den Bereichen der Konstrukte mit eingewachsenem Gewebe konnten sowohl in den Gruppen mit (A–L) als auch ohne (M–P) implantierte MSC gleichmäßig verteilte Ki67-positive Zellen detektiert werden.

(DAPI = 4',6-Diamidin-2'-Phenylindol Dihydrochlorid, DiI = 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-perchlorat, MSC = mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2)

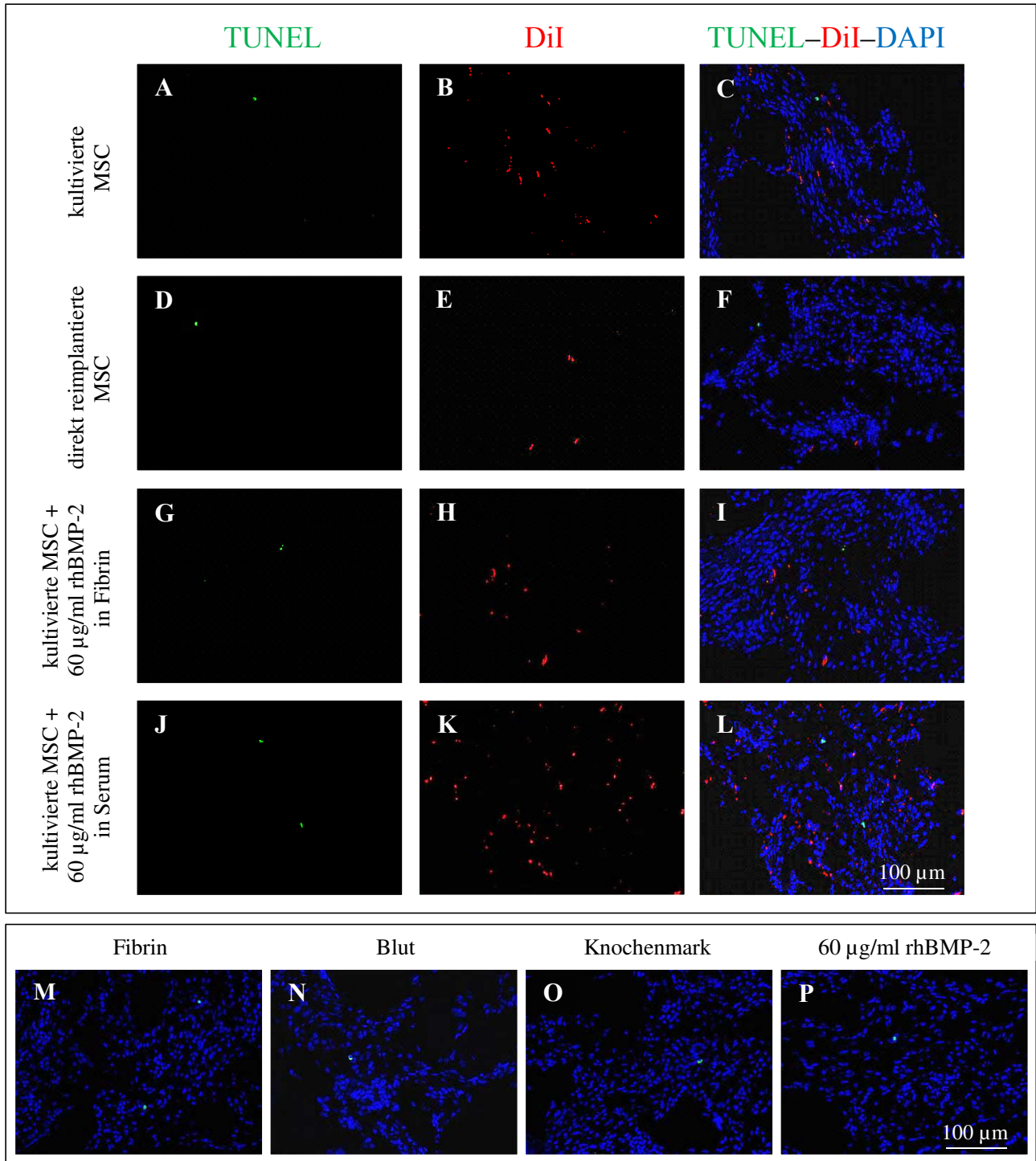


Abbildung 50: TUNEL-Färbung zur Detektion von apoptotischen Zellen in den subkutanen Versuchsgruppen

Die Darstellung der TUNEL-positiven, d. h. der sich in Apoptose befindlichen Zellen, erfolgte mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff (Fluoreszein) (A, D, G, J). Der für die Markierung der MSC vor Implantation verwendete rot fluoreszierende Farbstoff DiI (B, E, H, K) konnte vor allem in den Gruppen mit kultivierten MSC (A–C/G–I/J–L) in großer Zahl nachgewiesen werden. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI (blau fluoreszierend). In den Bereichen der Konstrukte mit eingewachsenem Gewebe konnten sowohl in den Gruppen mit (A–L) als auch ohne (M–P) implantierte MSC ca. 1–2 apoptotische Zellen pro Gesichtsfeld detektiert werden.

(DAPI = 4',6-Diamidin-2'-Phenylindol Dihydrochlorid, DiI = 1,1'-Diocetyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-perchlorat, MSC = mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2, TUNEL = terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling)



#### 4.2.1.10 Vaskularisierung nach 12 Wochen Implantationsdauer

Für den Nachweis von neugebildeten Gefäßen erfolgte die immunhistologische Detektion von vWF (von-Willebrand-Faktor) (Abbildung 51) und CD31 (cluster of differentiation) (Abbildung 52), die u. a. auf Blutgefäßendothelzellen exprimiert werden. In allen Schnitten wurden in den Randbereichen in beiden Färbungen viele neugebildete Gefäßstrukturen und damit eine gute Vaskularisierung beobachtet. Im von außen einwachsenden Bindegewebe konnte eine Vielzahl groß- und kleinkalibriger Gefäße detektiert werden. Eine gleichmäßige Verteilung der Gefäße im gesamten Gewebeschnitt wurde in den Gruppen mit Blut sowie Knochenmark und in den Kombinationsgruppen mit MSC und 60 µg/ml rhBMP-2 in Fibrin bzw. Serum festgestellt. In den anderen Versuchsgruppen wurden regelmäßig nicht angefärbte und damit nicht vaskularisierte zentrale Bereiche beobachtet. Wie bereits für die Fluoreszenzfärbungen Ki67 und TUNEL beschrieben, erfolgte auch in der CD31-Färbung die Darstellung der DiI-gelabelten MSC rot, die der Zellkerne blau fluoreszierend, während CD31-positive Zellen mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff markiert wurden. Vor allem in den Randbereichen waren viele grün-blau doppeltmarkierte Zellen (Abbildung 52) erkennbar. In den Gruppen mit implantierten, DiI-gelabelten Zellen war es möglich, einige grün-rot-blau dreifachmarkierte Zellen zu detektieren (Abbildung 52L). Vergleichsweise zur Ki67- und TUNEL-Färbung, konnte in der Gruppe mit direkt reimplantierten MSC nur eine geringe Anzahl rot-blau doppeltmarkierter Zellen gefunden werden.

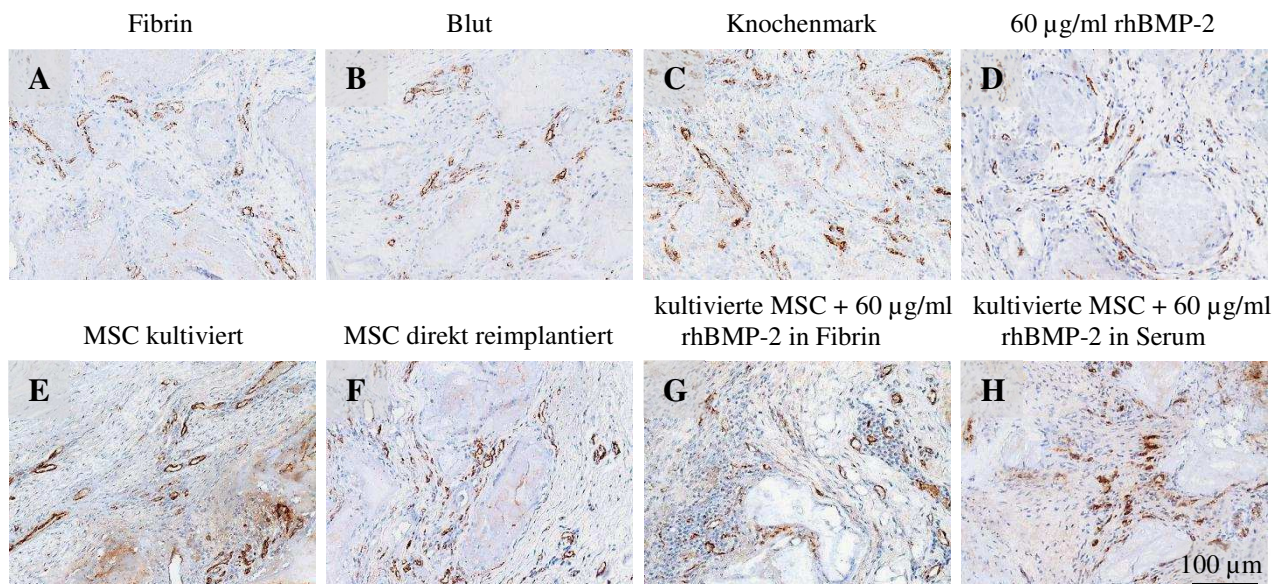


Abbildung 51: Von-Willebrand-Faktor immunhistologische Färbung (subkutane Versuchsgruppen)

Dargestellt sind repräsentative Ausschnitte aus Bereichen mit eingewachsenen Gewebestrukturen in der von-Willebrand-Faktor-Färbung zur Darstellung von Blutgefäßen. In dem zwischen die NanoBone® Partikel eingewachsenen Bindegewebe konnte eine Vielzahl von Gefäßstrukturen (braune Anfärbung) unterschiedlicher Dimensionen detektiert werden. (MSC = mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2)

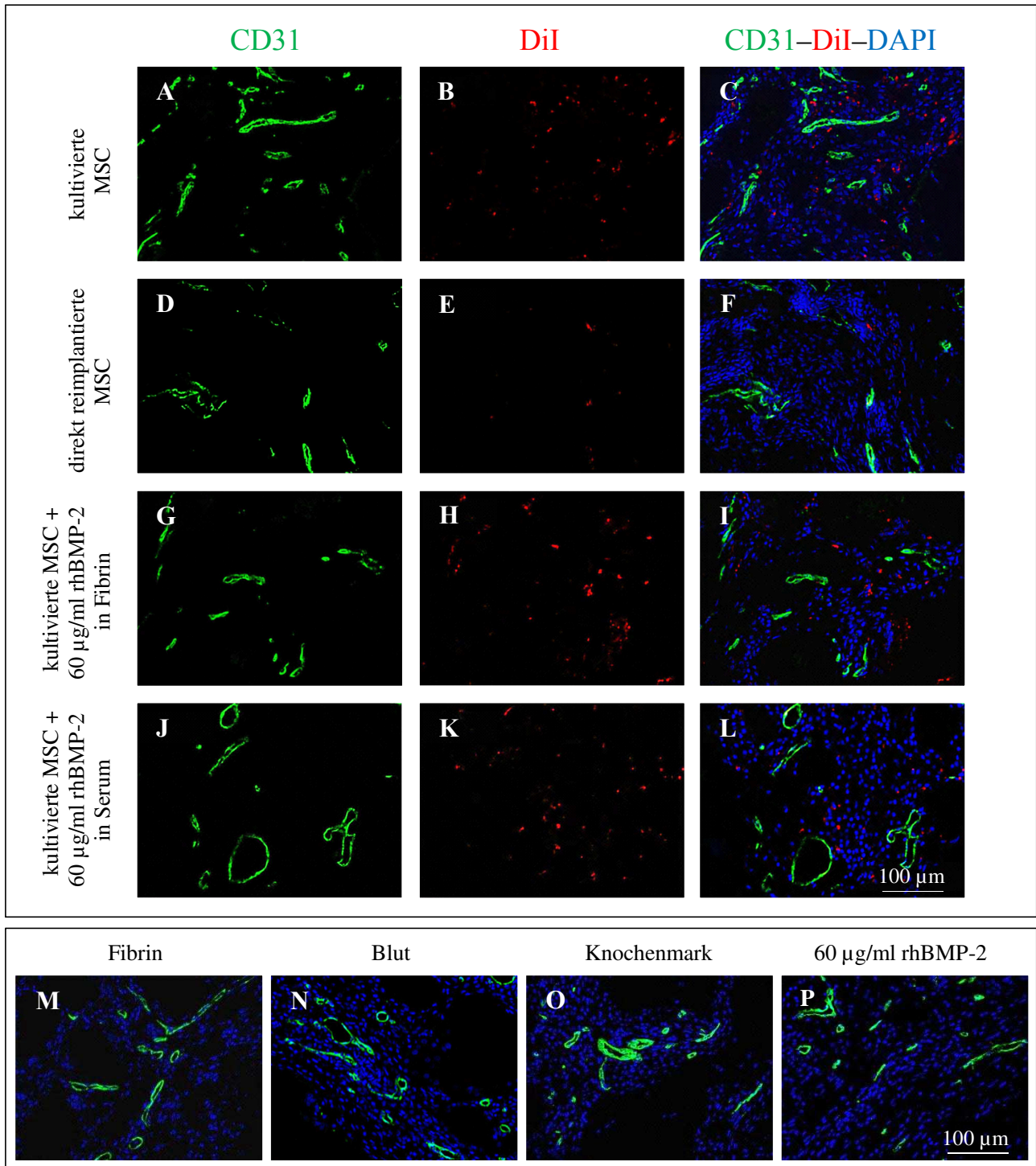


Abbildung 52: **CD31-Färbung zur Detektion von Endothelzellen in den subkutanen Versuchsgruppen**

Die CD31-positiven Zellen, d. h. die Endothelzellen, werden in dieser Färbung grün fluoreszierend dargestellt (A, D, G, J). In den Bereichen der Konstrukte mit eingewachsenem Gewebe wurden in allen Gruppen gleichmäßig verteilte CD31-positive Zellen detektiert. Der für die Markierung der mesenchymalen Stammzellen vor Implantation verwendete rot fluoreszierende Farbstoff DiI (B, E, H, K) konnte vor allem in den Gruppen mit kultivierten MSC in großer Zahl nachgewiesen werden. Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI (blau fluoreszierend). Sowohl grün-blau doppeltmarkierte als auch vereinzelte grün-rot-blau dreifachmarkierte (vor allem L) Zellen konnten detektiert werden. In der Gruppe mit direkt reimplantierten MSC waren rot-blau fluoreszierende Zellen nur vereinzelt zu finden.

(CD31 = cluster of differentiation 31, DAPI = 4',6-Diamidin-2'-Phenylindol Dihydrochlorid, DiI = 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanin-perchlorat, MSC = mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2)

## 4.2.2 Ergebnisse der AV-loop Versuchsgruppe

### 4.2.2.1 Operativer und postoperativer Verlauf

In keinem Schaf kam es zu operativen oder postoperativen Komplikationen. Zweimal täglich erfolgte eine Kontrolle des Allgemeinbefindens und der Operationswunden sowie die Entleerung der Drainage. Mittels einer Dopplersonographie, die zweimal wöchentlich durchgeführt wurde, konnte die Durchgängigkeit der Loop-Gefäße aller Schafe über den Implantationszeitraum hinweg bestätigt werden (Abbildung 53). Es konnten alle implantierten Konstrukte (n = 6) ausgewertet werden. Die Medikamente zur Gerinnungshemmung wurden nach Anpassung des Behandlungsprotokolls über die gesamte Dauer des Versuches gut vertragen. Anzeichen auf Nebenwirkungen, wie z. B. Hämorrhagien oder gastrointestinale Symptome, wurden nicht beobachtet.

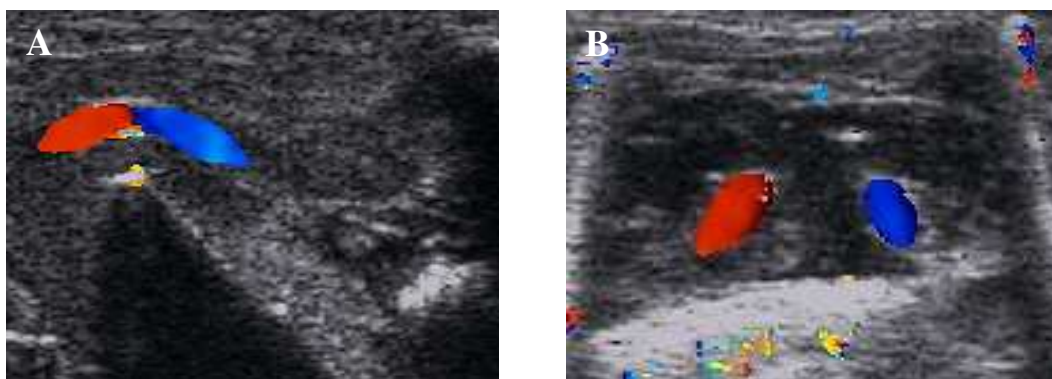


Abbildung 53: *Überprüfung der Durchgängigkeit der Loop-Gefäße mittels Dopplersonographie*

*Sowohl im Längs- (A) als auch im Querschnitt (B) der Gefäße kann die Durchgängigkeit der Gefäßschleife visualisiert werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Gefäßachse in die Kammer zieht (A). Die Schallauslöschung (A) wurde durch den Kammerboden hervorgerufen.*

### 4.2.2.2 Histologische Analyse der Explantate

Analog zu den subkutanen Versuchsgruppen wurden für die morphologisch deskriptive Auswertung von jedem Explantat der AV-loop Versuchsgruppe mehrere Schnitte der drei Loop Anteile HE (Abbildung 54A) sowie MG Trichrom (Abbildung 54B) gefärbt.

Die NanoBone<sup>®</sup> Partikel waren größtenteils vom eingewachsenen gut vaskularisierten Bindegewebe umgeben. Teilweise waren Bereiche identifizierbar, in denen die NanoBone<sup>®</sup> Strukturen weitestgehend durch Bindegewebe ersetzt wurden. Zentral im Block konnten vereinzelt in 2 von 6 Konstrukten Bereiche erkannt werden, in denen kein Gewebe eingewachsen war. In diesen Konstrukten wurde vor allem lokal um die Loop-Gefäße wie auch in den Makroporen Bindegewebe wahrgenommen, von welchem sich nach zentral, bzw. in die nicht gewebedurchwachsenen Areale, ziehende Ausläufer bildeten. In einigen umgeschriebenen Bereichen wurden Knochenspannen lokalisiert, die sich, vergleichbar der subkutanen Gruppen, hauptsächlich auf der Oberfläche der NanoBone<sup>®</sup> Partikel gebildet



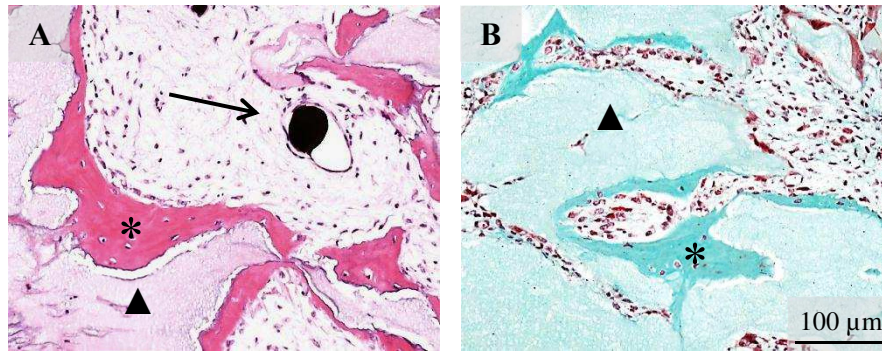


Abbildung 54: Hämatoxylin Eosin- (A) und Masson Goldner Trichrom- (B) Färbung der AV-loop Versuchsgruppe

Dargestellt sind Bereiche mit Knochenneubildung (\*), die vor allem angrenzend an die NanoBone® Strukturen (▲) beobachtet wurden. Es konnten mehrere, mit dem Kontrastmittel Mikrofil® gefüllte Gefäße detektiert werden (schwarze Färbung/Pfeil).

hatten (Abbildung 54). Die NanoBone® Ränder ohne anliegende Knochenstrukturen waren meist von einer hohen Zahl mehrkerniger, osteoklastenähnlicher Zellen bedeckt. Anzeichen auf Entzündungsreaktionen waren nicht vorhanden.

#### 4.2.2.3 Zusammensetzung des Gewebes in den AV-loop Konstrukten

Für die Untersuchung der prozentualen Anteile an neugebildeter Knochenfläche, NanoBone® und Bindegewebe wurden die jeweiligen Flächen in den einzelnen Loop Anteilen 1–3 nach standardisiertem Schema bestimmt.

Zur quantitativen Analyse der neugebildeten Knochenfläche wurde diese ausgemessen und in Bezug zur Gesamtfläche des Gewebeschnittes gesetzt. Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil der noch vorhandenen NanoBone® Partikel bestimmt und nachfolgend die Fläche des eingewachsenen Bindegewebes berechnet. Bezogen auf den Referenzwert (NanoBone® Block vor Implantation, NanoBone® nativ) erfolgte die Berechnung der Degradierungsrate wie auch für die subkutanen Gruppen vorgenommen.

Im Loop Anteil 1 ( $47,5 \pm 7,0 \%$ ), Anteil 2 ( $46,7 \pm 3,5 \%$ ) und Anteil 3 ( $44,1 \pm 8,4 \%$ ) waren die Degradierungsraten vergleichbar hoch ( $p = 0,529$ ) (Abbildung 55A). Zusammengefasst wurde eine NanoBone® Fläche von  $46,1 \pm 6,4 \%$  degradiert. Die Gewebzusammensetzung der einzelnen Loop Anteile ist in Abbildung 55B illustriert. Insgesamt wurde eine Knochenfläche von  $1,1 \pm 1,0 \%$  gemessen, die zwischen den Loop Anteilen keine signifikanten Unterschiede zeigte ( $p = 0,834$ ). Die größte Fläche nahm eingewachsenes Bindegewebe sowie noch einzelne nicht von Gewebe durchdrungene Poren ein ( $64,3 \pm 3,4 \%$ ), der NanoBone® Anteil betrug  $34,6 \pm 3,2 \%$ .

Der Vergleich eines Blockes vor Implantation (Abbildung 55D) mit den Explantaten nach einer Vaskularisierungsphase von 18 Wochen im AV-loop (Abbildung 55E) ergab eine hochsignifikante Abnahme des Gehaltes an NanoBone® Partikeln im Gewebe ( $t(6) = 11,173, p \leq 0,001$ ) (Abbildung 55C).

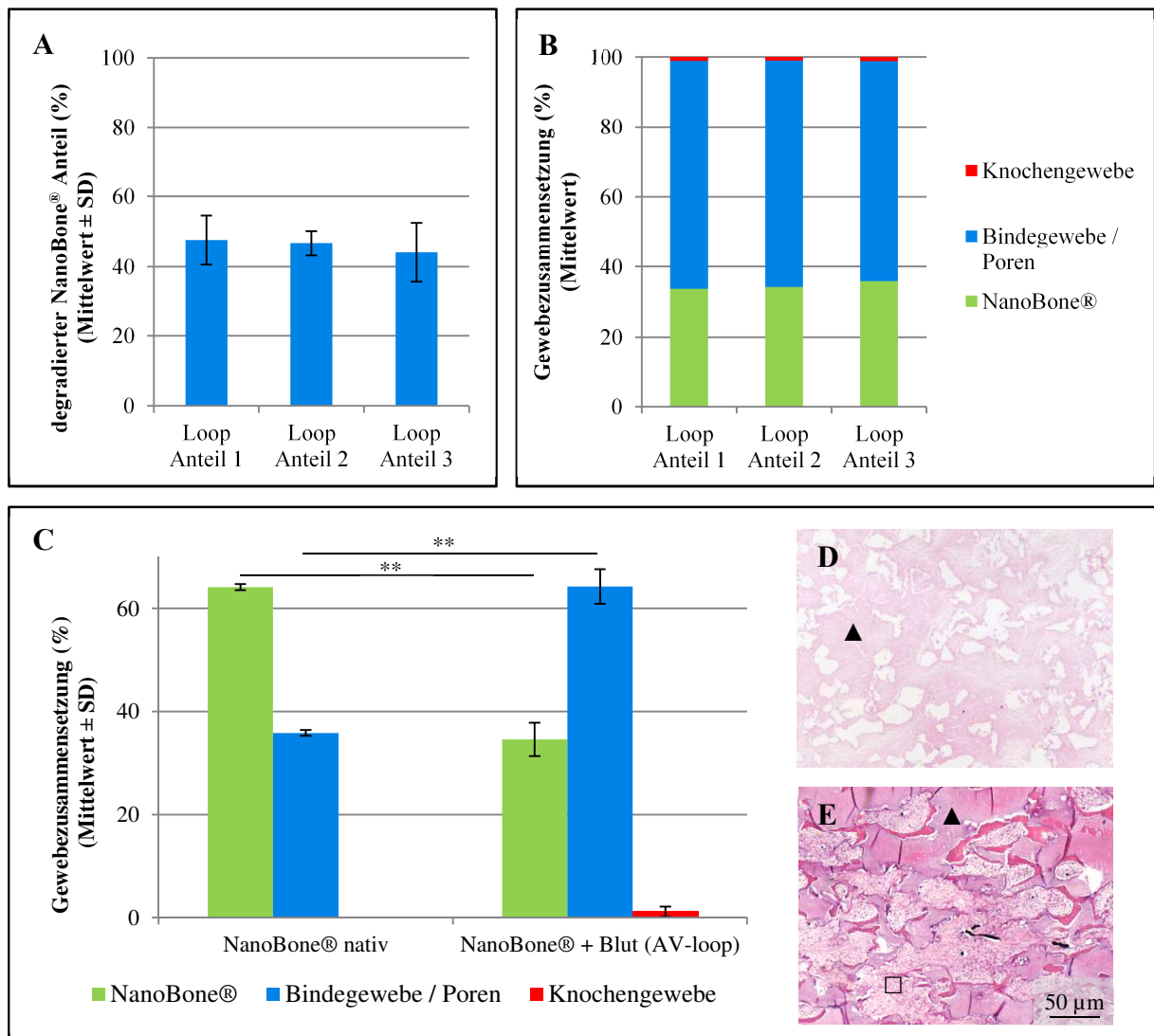


Abbildung 55: **Degradierungsraten von NanoBone® und Darstellung der Gewebezusammensetzung der AV-loop Versuchsgruppe**

(A): In den einzelnen Loop Anteilen kam es zu einer vergleichbar hohen Degradierungsrate ohne signifikante Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test,  $p > 0,05$ ). (B): Die Konstrukte bestanden zu einem Großteil aus eingewachsenem Bindegewebe sowie wenigen noch freien Poren. Die Knochenfläche machte nur einen geringen Anteil des Gewebes aus und unterschied sich zwischen den einzelnen Loop Anteilen nicht signifikant voneinander (Kruskal-Wallis-Test,  $p > 0,05$ ). (C): Der Vergleich eines nativen NanoBone® Blockes (NanoBone® vor Implantation) (D) mit den Konstrukten nach der 18wöchigen Vaskularisationsphase im AV-loop (E) ergab eine hochsignifikante Verringerung der NanoBone® Fläche (▲). Das eingewachsene Bindegewebe (□) sowie wenige noch freie Poren nahmen einen hochsignifikant größeren Anteil ein als die Porenfläche vor Implantation des Knochenersatzstoffes (t-Test für unabhängige Stichproben,  $** p \leq 0,001$ ). (SD = Standardabweichung)



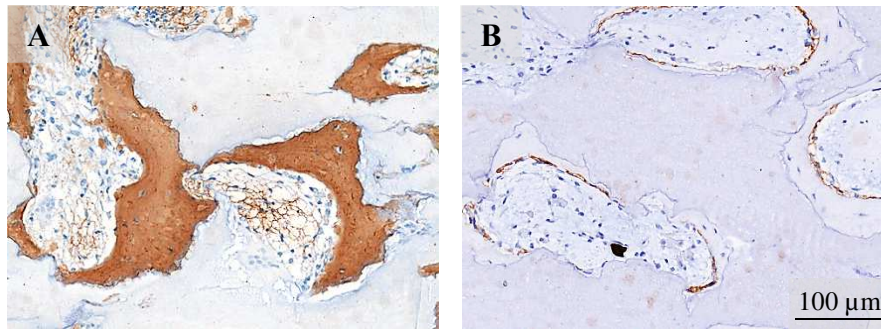


Abbildung 56: **Immunhistologische Detektion von Knochengewebe in der AV-loop Versuchsgruppe**

Die vereinzelt neugebildeten Knochensträngen ließen sich mit dem Antikörper gegen Kollagen Typ I, dem Hauptbestandteil der Knochengrundsubstanz, homogen braun anfärben (A). In der Alkalischen Phosphatase-Färbung wurde vor allem an der Oberfläche der Knochenstrukturen ein brauner Farbumschlag beobachtet, der als Indikator für das Vorhandensein von Osteoblasten betrachtet werden kann (B). Teilweise konnten von Mikrofil<sup>®</sup> perfundierte Gefäße detektiert werden (schwarze Färbung (B)).

Die ausgemessene Porenfläche eines nativen NanoBone<sup>®</sup> Blockes ( $35,9 \pm 0,6 \%$ ) wurde mit dem Anteil an Bindegewebe/Poren ( $64,3 \pm 3,4 \%$ ) der AV-loop Konstrukte verglichen. Das hochgradige Einwachsen von Bindegewebe in den Knochenersatzstoff war in dieser Messung deutlich erkennbar, so wurde verglichen zur ursprünglichen Porenfläche ein nahezu doppelt so hoher Anteil an Bindegewebe festgestellt ( $t(5,624) = -18,258$ ,  $p \leq 0,001$ ) (Abbildung 55C) (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 36, S. 214).

Die immunhistologischen Färbungen mit einem Kollagen Typ I- und Alkalische Phosphatase-Antikörper dienten der qualitativen Analyse der neugebildeten Knochenstrukturen. In der Kollagen Typ I-Färbung kam es, analog zu den Ergebnissen der subkutanen Studie, zu einer homogenen braunen Anfärbung der Knochensträngen (Abbildung 56A). Das von Osteoblasten synthetisierte Enzym Alkalische Phosphatase konnte, wie auch in den subkutanen Konstrukten, an der äußeren an das Bindegewebe angrenzenden Knochenoberfläche detektiert werden. Dies diente als Hinweis auf die Lokalisation und Aktivität der für den Knochenaufbau zuständigen Osteoblasten (Abbildung 56B). Die Knochensträngen waren nicht homogen im Gewebe verteilt. Vor allem im Bereich um die AV-loop Gefäße wurde vermehrt Knochenbildung beobachtet sowie lokal um die in den NanoBone<sup>®</sup> Block eingefrästen Makroporen, die im Gewebe dadurch zu erkennen waren, dass diese Arealen vorwiegend körpereigenes Gewebe und keine NanoBone<sup>®</sup> Partikel enthielten.

#### 4.2.2.4 Matrixwechsel und Vitalfläche von NanoBone®

Zur Überprüfung des Matrixwechsels von NanoBone®, der wie beschrieben (4.2.1.7 Matrixwechsel und Vitalfläche von NanoBone®) als Umwandlung der ursprünglichen anorganischen in eine organische Matrix definiert ist, wurden ausgewählte Gewebeschnitte aus allen Loop Anteilen der AV-loop Versuchsgruppe PAS gefärbt.

Im Gegensatz zu den homogen violett angefärbten NanoBone® Strukturen in gewebeumschlossenen Bereichen zeigte sich NanoBone® in nicht vaskularisierten Arealen als hellrosa gefärbte Struktur (Abbildung 57). Für die Quantifizierung der gewebedurchwachsenen bzw. vaskularisierten NanoBone® Fläche (Vitalfläche) wurde dieser Anteil der Konstrukte ausgemessen und in Bezug zur Gesamtfläche gesetzt.

Nach der 18wöchigen Vaskularisationsdauer im AV-loop wurden in 4 von 6 Konstrukten keine Bereiche ohne eingewachsene Gewebestrukturen beobachtet (Abbildung 58A1). Insgesamt betrug die Vitalfläche  $93,0 \pm 11,0 \%$ . Zwischen Loop Anteil 1, 2 und 3 wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der gewebedurchwachsenen Fläche festgestellt ( $p = 0,769$ ) (Abbildung 58A) (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 37, S. 214). In 2 von 6 Konstrukten kam es zu nicht gewebedurchwachsenen Bereichen, so konnte beispielsweise in einem Konstrukt ein relativ umfangreiches, jedoch lokal begrenztes Areal nicht vaskularisierten Knochenersatzmaterials detektiert werden (Abbildung 58A2). Im Gegensatz dazu wurden in einer Pilotstudie nach einer 12wöchigen Implantationsdauer eines NanoBone® Blockes im AV-loop große nicht vaskularisierte Bereiche beobachtet, die sich weitläufig über den gesamten Block ausdehnten (Abbildung 58B).

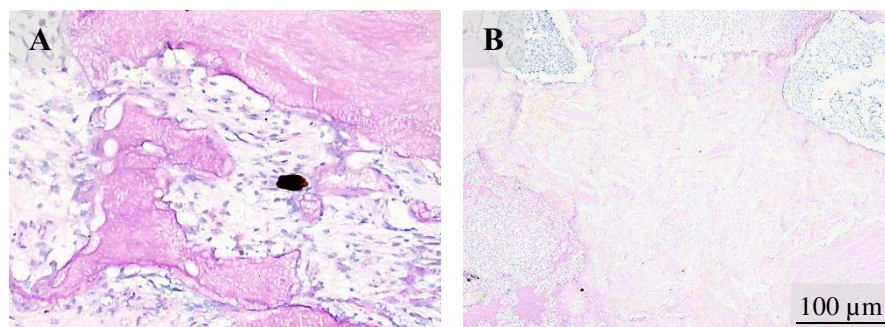


Abbildung 57: *Perjodsäure Schiff gefärbte Gewebeschnitte aus der AV-loop Versuchsgruppe*

(A): Die NanoBone® Strukturen im gewebedurchwachsenen Bereich sind deutlich violett angefärbt und weisen auf einen stattgefundenen Matrixwechsel hin. (B): Im Gegensatz dazu sind die nicht von Gewebe umschlossenen NanoBone® Partikel nur schwach rosa angefärbt.

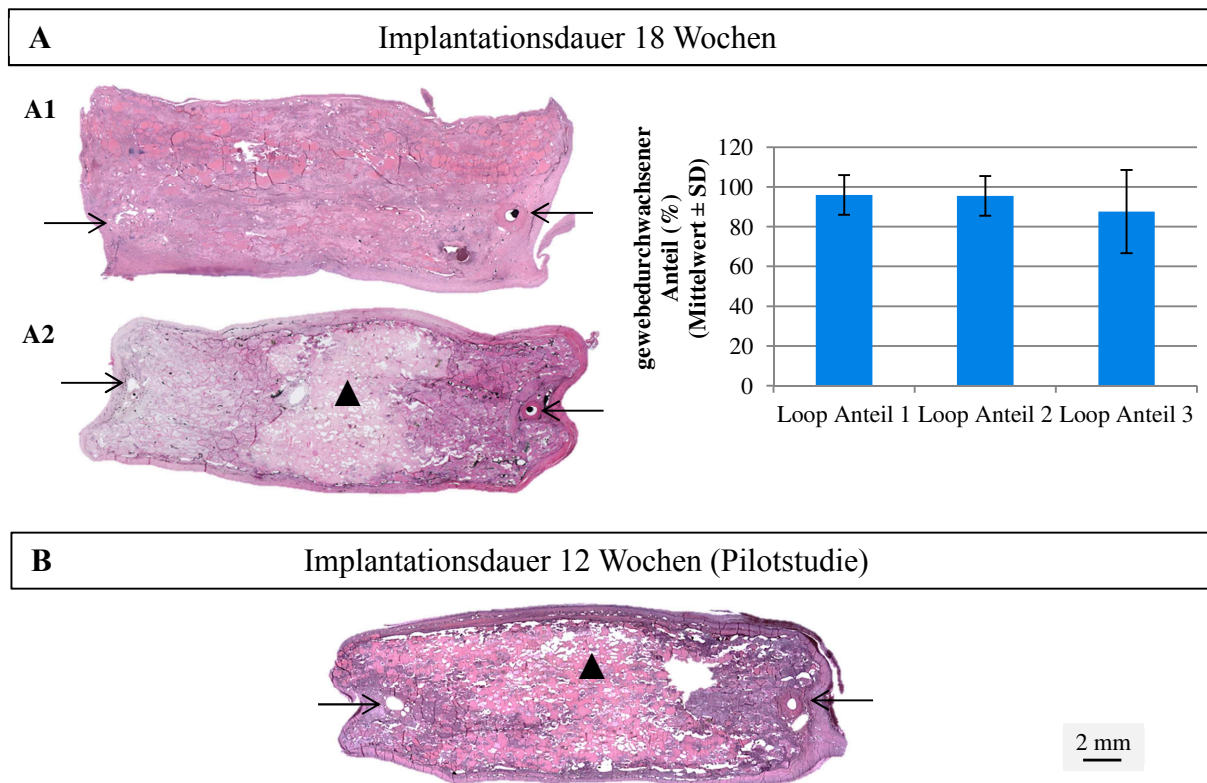


Abbildung 58: **Hämatoxylin Eosin gefärbte Gewebeschnitte aus der AV-loop Versuchsgruppe**

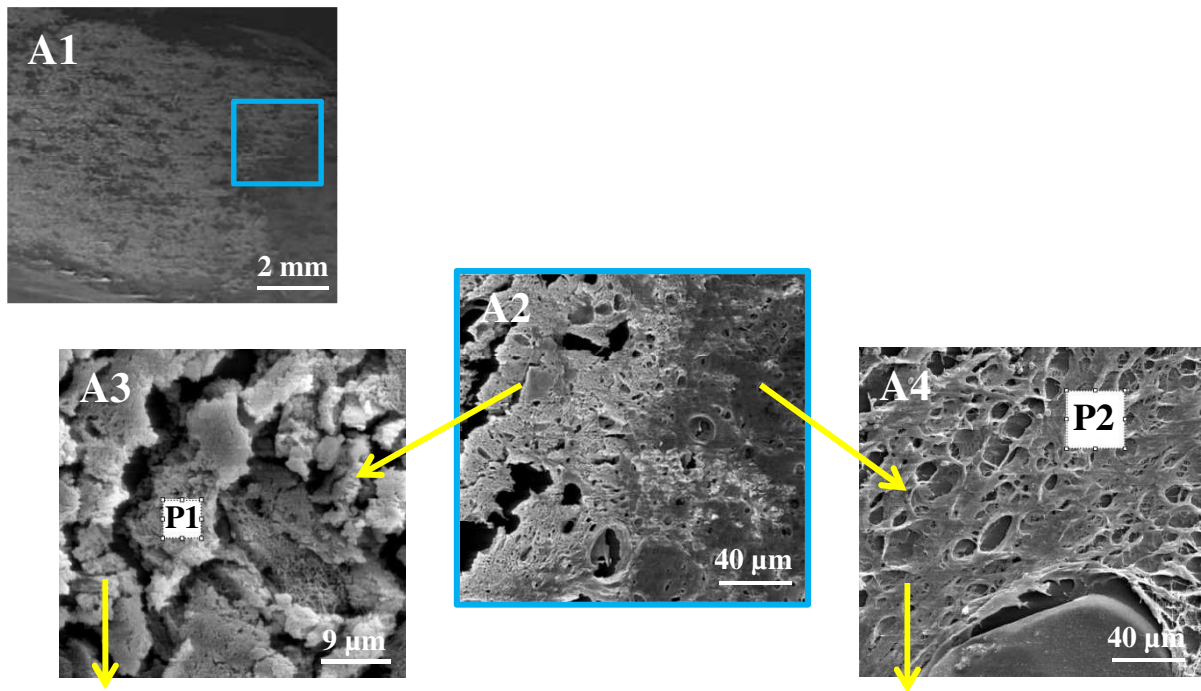
(A): Nach einer Implantationsdauer von 18 Wochen konnten in den meisten Konstrukten keine (A1) oder nur sehr kleine nicht gewebedurchwachsene NanoBone<sup>®</sup> Bereiche festgestellt werden. Zwischen Loop Anteil 1, 2 und 3 wurden keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der gewebedurchwachsenen Fläche festgestellt (Kruskal-Wallis-Test,  $p > 0,05$ ). 4 von 6 Konstrukte waren vollständig mit Gewebe durchzogen. In einem Konstrukt (A2) wurde ein relativ großer nicht vaskularisierter Bereich ( $\blacktriangle$ ) beobachtet, der jedoch lokal begrenzt war. Es ist deutlich erkennbar, dass es vor allem ausgehend von den Loop-Gefäßen zum Einwachsen von Gewebe gekommen ist. (B): Zum Vergleich ist ein Gewebeschnitt eines NanoBone<sup>®</sup> Blockes aus einer Pilotstudie abgebildet, in dem nach einer Implantationsdauer von 12 Wochen großflächige Areale nicht durchbauten Knochenersatzmaterials ( $\blacktriangle$ ) beobachtet werden konnten, die sich über den gesamten Block ausdehnten. Auf der rechten Seite der Konstrukte ist jeweils der arterielle Anteil der Gefäßschleife erkennbar, auf der linken der venöse Anteil (Pfeile). (SD = Standardabweichung)

### Rasterelektronenmikroskopie/energiedispersive Röntgenspektroskopie

Wie bereits für die subkutanen Versuchsgruppen beschrieben, wurden auch in der AV-loop Gruppe REM-Aufnahmen sowie EDX-Spektren erstellt (Abbildung 59). Mittels dieser Methoden erfolgte eine Analyse der Elementzusammensetzung in den Explantaten. In einigen Gewebeschnitten konnte das im Knochenersatzmaterial ursprünglich vorhandene Silizium nicht mehr detektiert werden, nur in den nicht von Bindegewebe durchwachsenen Bereichen wurden Anteile des nicht vollständig degradierten Siliziums beobachtet. Analog zu den subkutanen Explantaten ging eine Abnahme des Siliziumanteils mit einer Zunahme von Kohlenstoff und einer Abnahme von Sauerstoff einher.

Abbildung 59A bildet den Übergangsbereich von körpereigenem Gewebe zu nativer NanoBone<sup>®</sup> Struktur ab. Der rechts zu erkennende gewebedurchwachsene Bereich weist einen hohen Kohlenstoffanteil auf, während im nicht vaskularisierten Bereich ein sehr hoher Siliziumanteil messbar war (Abbildung 59B). Die Gold- (Au) sowie Palladium- (Pd) Peaks sind auf eine für die Analyse notwendige Beschichtung der Probe zurückzuführen.

### A REM-Aufnahmen eines AV-loop Konstruktes



### B EDX-Spektren

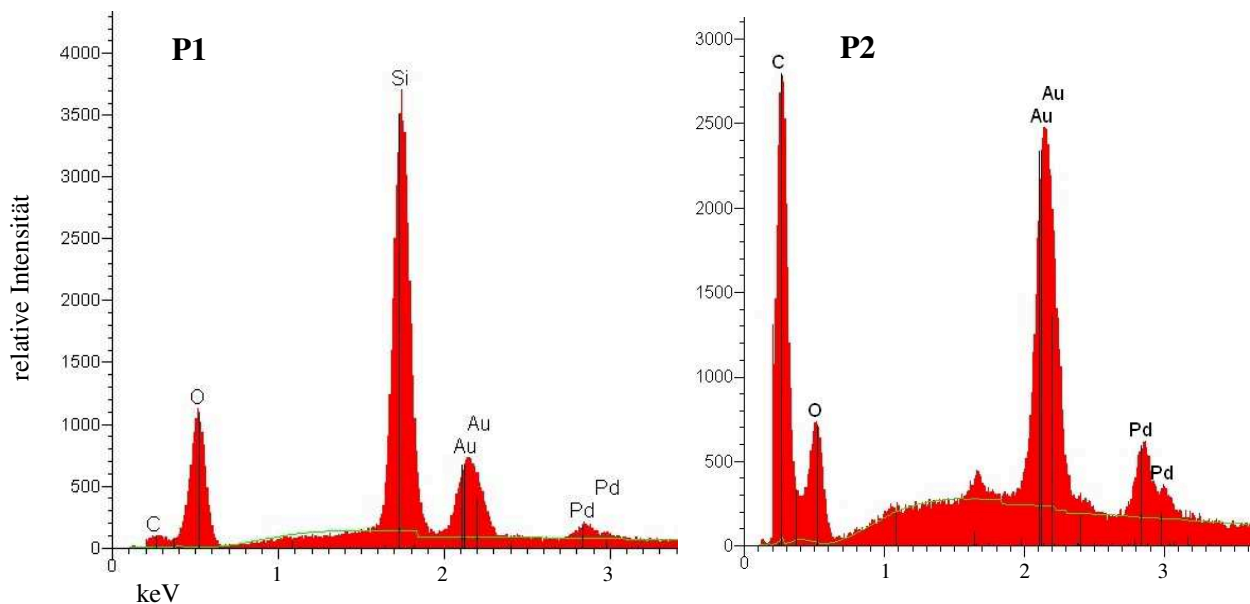


Abbildung 59: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (A) und Ergebnisse der energiedispersiven Röntgenspektroskopie (B) eines Übergangsbereiches von gewebedurchwachsenen zu nicht gewebedurchwachsenen NanoBone® Bereichen eines AV-loop Konstruktes

(A): Bereits in der geringsten Vergrößerung (A1) ist in der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme ein deutlicher Unterschied in der NanoBone® Architektur zu erkennen (Übergangsbereich s. blauer Kasten, vergrößerte Darstellung in A2). Der helle nicht vaskularisierte NanoBone® Bereich (links bzw. A3, Analyse in P1) weist einen hohen Siliziumanteil auf, in den dunklen körpereigenem Gewebe durchdrungenen Strukturen (rechts bzw. A4, Analyse in P2) ist ein hoher Kohlenstoffanteil, aber kein Silizium sowie ein geringerer Sauerstoffanteil detektierbar (B). (Au = Gold, C = Kohlenstoff, EDX = energiedispersive Röntgenspektroskopie, O = Sauerstoff, P = Position, Pd = Palladium, REM = Rasterelektronenmikroskopie, Si = Silizium)



#### 4.2.2.5 Osteoklastische Aktivität

Um das Ausmaß der osteoklastischen Aktivität zu evaluieren, wurde die Osteoklastendichte pro  $\mu\text{m}$  NanoBone<sup>®</sup> Rand in unterschiedlichen ROIs (arteriell, venös, peripher, zentral) der AV-loop Konstrukte ermittelt (Abbildung 60A). Dies erfolgte mit einer TRAP-Färbung, in der Osteoklasten durch eine rote Anfärbung sichtbar werden.

Vergleichbar zu den subkutanen Gruppen wurde eine Vielzahl TRAP-positiver Zellen, vor allem an der NanoBone<sup>®</sup> Oberfläche und in Resorptionslakunen liegend, detektiert. Die TRAP-positiven Zellen waren nicht homogen über den gesamten Gewebeschnitt verteilt. In einzelnen Arealen war das Knochenersatzmaterial vollständig mit TRAP-positiven Zellen umgeben (Abbildung 60B), während andere Stellen weniger dicht besiedelte Bereiche aufwiesen (Abbildung 60A).

Bezüglich der Osteoklastenzahl pro  $\mu\text{m}$  NanoBone<sup>®</sup> Rand konnte zwischen den einzelnen ROIs kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p = 0,282$ ) (Abbildung 60C) (Messwerte s. 9A.1 Daten, Tabelle 38, S. 214).

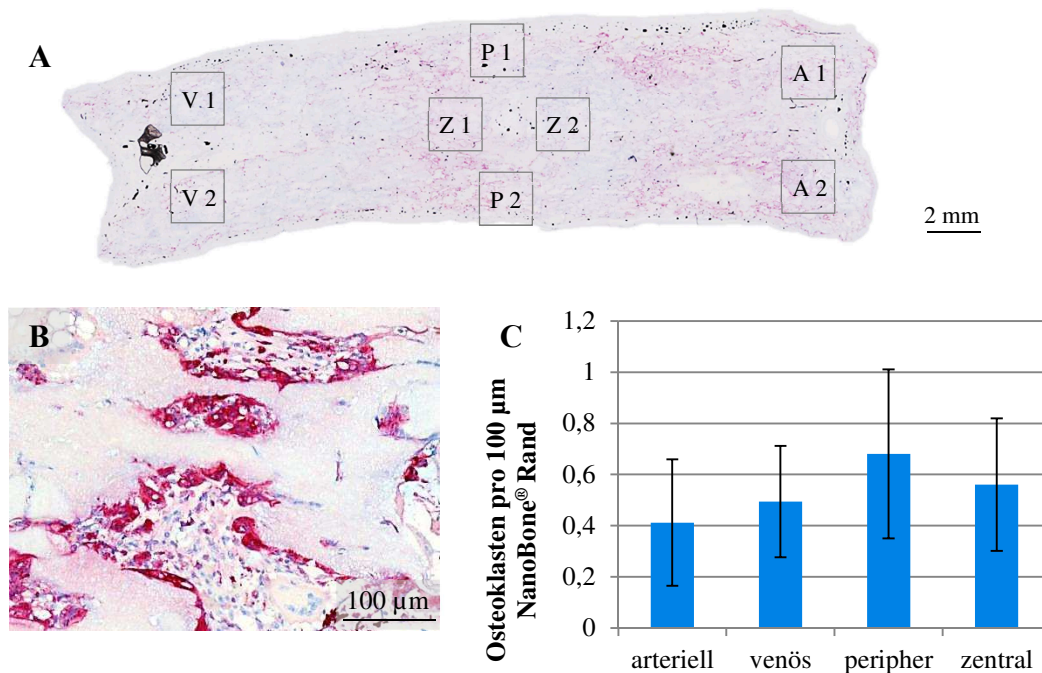
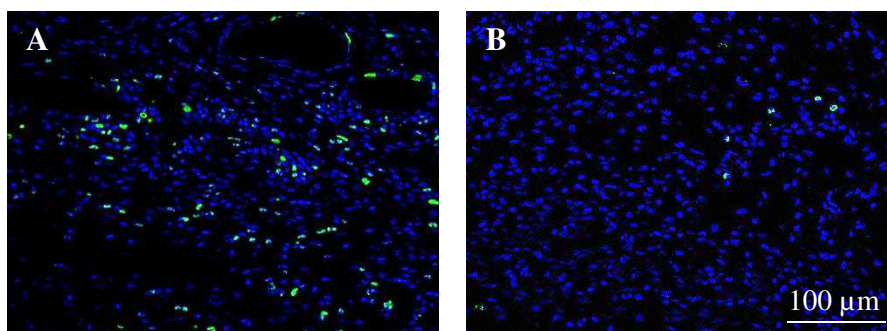


Abbildung 60: TRAP-Färbung zur Detektion und Quantifizierung von Osteoklasten in der AV-loop Versuchsgruppe

(A): TRAP gefärbter Schnitt mit Darstellung der ausgewerteten ROIs auf dem erkennbar ist, dass einzelne Areale sehr dicht mit TRAP-positiven Zellen besiedelt sind (rosa Anfärbung). (B): Teilweise wurden Bereiche detektiert, in denen das Knochenersatzmaterial vollständig von TRAP-positiven Zellen umlagert war. (C): Zwischen den einzelnen ROIs konnten keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Osteoklastenzahl pro  $\mu\text{m}$  NanoBone<sup>®</sup> Rand festgestellt werden. (einfaktorielle ANOVA,  $p > 0,05$ ) (A = arteriell, P = peripher, ROI = region of interest, TRAP = tartrat-resistente saure Phosphatase [Tartrat-resistente saure Phosphatase], V = venös, Z = zentral)

#### 4.2.2.6 Zellproliferation und Apoptoseverhalten

Vergleichend zu den subkutanen Konstrukten wurde das Vorkommen von Zellproliferation und -apoptose in den AV-loop Explantaten mittels immunhistologischer Färbungen evaluiert (4.2.1.9 Mesenchymale Stammzellen – direkt reimplantiert versus kultiviert). Der Proliferationsmarker Ki67 konnte durch die Anfärbung mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff (Fluoreszein) in den gewebedurchwachsenen Bereichen der Konstrukte in großer Zahl detektiert werden (Abbildung 61A). Im Gegensatz dazu wurden nur sehr vereinzelt apoptotische Zellen gefunden, die mittels einer TUNEL-Färbung ebenfalls als grün fluoreszierende Zellen visualisiert werden konnten (Abbildung 61B). Die Zellkernfärbung erfolgte mit DAPI (blau fluoreszierend).



**Abbildung 61: Immunhistologische Detektion von proliferierenden und apoptotischen Zellen in der AV-loop Versuchsgruppe**

*(A): In der Ki67-Färbung konnte eine hohe Zahl proliferierender Zellen detektiert werden, die durch die Anfärbung mit einem grünen Fluoreszenzfarbstoff (Fluoreszein) sichtbar wurden. (B): Die Visualisierung von apoptotischen Zellen gelang mittels TUNEL-Färbung. Die Anfärbung dieser Zellen erfolgte ebenfalls mit Fluoreszein. In allen gefärbten Schnitten konnten nur wenige vereinzelt im Gewebe verteilte TUNEL-positive Zellen festgestellt werden. Die Zellkerne wurden mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff DAPI gegengefärbt. (DAPI = 4',6-Diamidin-2'-phenylindol Dihydrochlorid, TUNEL = terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling)*

#### 4.2.2.7 Vaskularisierung nach 18 Wochen Implantationsdauer

Die Evaluierung der Vaskularisierung der AV-loop Konstrukte wurde mittels immunhistologischer Färbungen (vWF, CD31) sowie MRT- und  $\mu$ CT-Untersuchung durchgeführt.

##### Immunhistologie

In den Färbungen zeigte sich im gesamten NanoBone<sup>®</sup> Block, ausgenommen der nicht von Gewebe durchwachsenen Areale, eine gute Vaskularisierung. Sowohl klein- als auch großkalibrige Gefäße waren detektierbar (Abbildung 62). Vor allem im Bereich um die Loop-Gefäße wurde eine Vielzahl sehr großer Gefäße beobachtet. Abgesehen von den nicht gewebedurchwachsenen Arealen konnte eine homogene Vaskularisierung der AV-loop Konstrukte nachgewiesen werden. Vor allem im Randbereich waren einige Gefäße von dem CT-Kontrastmittel perfundiert und als schwarz ausgefüllte Strukturen zu erkennen, während dies insbesondere bei kleinen und zentral liegenden Gefäßen oftmals nicht beobachtet werden konnte.

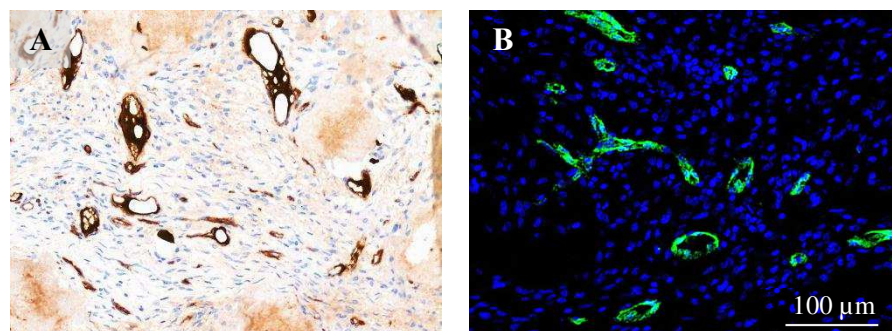


Abbildung 62: **Immunhistologische Detektion von Gefäßstrukturen in der AV-loop Versuchsgruppe**

(A): Die Darstellung der Gefäßstrukturen erfolgte zum einen mit einem von-Willebrand-Faktor-Antikörper. In den gewebedurchwachsenen Bereichen konnte eine hohe Zahl von groß- und kleinkalibrigen, braun angefärbten Gefäßen detektiert werden. (B): Zum anderen erfolgte eine fluoreszenzimmunhistologische Färbung mittels CD31-Antikörper, in der sich die CD31-positiven Zellen grün fluoreszierend (Fluoreszein) anfärbten, während die Zellkerne mit dem blauen Fluoreszenzfarbstoff DAPI markiert wurden. Vergleichbar zu (A) konnte auch in dieser Färbung eine Vielzahl von Gefäßstrukturen in gewebedurchwachsenen Bereichen dargestellt werden. (CD31 = cluster of differentiation 31, DAPI = 4',6-Diamidin-2'-phenylindol Dihydrochlorid)

##### Magnetresonanztomographie

Für die intravitale Überprüfung der Vaskularisierungsrate wurden von 2 Schafen zu den Zeitpunkten 16 und 18 Wochen MRT-Untersuchungen vorgenommen.

Mittels MRT war es möglich, das sich neugebildete Gefäßnetzwerk intravital zu visualisieren und spezifische Messungen vorzunehmen. Mit Hilfe der Software erfolgte über Maximum Intensity Projections (MIP) die Umrechnung der dreidimensionalen Datensätze in zweidimensionale Projektionsbilder (Abbildung 63). Nach 16 Wochen

konnten in beiden Tieren von der Gefäßschleife ausgehend neugebildete Gefäßbereiche identifiziert werden, die in das Innere des NanoBone<sup>®</sup> Blockes zogen (Abbildung 63A, B). Vor allem im Konstrukt 1 war die Vaskularisierung insbesondere im Bereich der in den Block eingefrästen Makroporen zu beobachten. Zum Messzeitpunkt 18 Wochen zeigte sich in beiden Konstrukten eine Zunahme der Vaskularisation, die jedoch im Konstrukt 2 stärker ausgebildet war (Abbildung 63C, D). Im Konstrukt 1 wurden zudem einzelne Bereiche detektiert, die nicht perfundiert waren.

Auf Grundlage der MIPs wurden das perfundierte Volumen sowie die perfundierte Oberfläche der Konstrukte berechnet. In beiden gescannten NanoBone<sup>®</sup> Blöcken konnte im Zeitverlauf eine Zunahme des Volumens und der Oberfläche festgestellt werden, die im Konstrukt 2 deutlich größer war als im Konstrukt 1, wie bereits schon in der Isosurface Darstellung ermittelt werden konnte. So wurden im Konstrukt 1 eine Volumen- bzw. Oberflächenzunahme von 14,1 % bzw. 17,4 % festgestellt. In Konstrukt 2 änderte sich das Volumen um 66,3 %, während sich die Oberfläche um 82,6 % vergrößerte (Tabelle 14).

Tabelle 14: Ergebnisse der MRT-Messungen

		Volumen (mm <sup>3</sup> )	Oberfläche (mm <sup>2</sup> )
AV-loop Konstrukt 1	16 Wochen	2319,13	9517,11
	18 Wochen	2646,79	11171,6
AV-loop Konstrukt 2	16 Wochen	2037,88	9052,64
	18 Wochen	3388,44	16531,1

Zusätzlich zu diesen Messungen erfolgte zum Zeitpunkt 18 Wochen die Bestimmung der Sauerstoffsättigung im NanoBone<sup>®</sup> Block, die nachfolgend farbkodiert dargestellt werden konnte (Abbildung 63E, F). In beiden Konstrukten wurden vornehmlich blaukodierte Bereiche festgestellt, die auf eine sehr hohe Sauerstoffsättigung hinweisen. Im Konstrukt 1 war erneut deutlich zu erkennen, dass es vor allem in den Bereichen der Makroporen zur Bildung von Gefäßstrukturen gekommen ist, was durch eine dunkelblaue und damit sehr hohe Sauerstoffsättigung visualisiert werden konnte. Auch im Konstrukt 2 waren viele dunkelblaue Bereiche detektierbar. Um die Konstrukte herum, jedoch noch in der Kammer liegend, kam es zu einer gelben Anfärbung, die einen sehr niedrigen bzw. 0%igen Sauerstoffgehalt anzeigt. Weiterhin konnten um die blau eingefärbten Bereiche liegende rot angefärbte Strukturen beobachtet werden, die einen Sauerstoffgehalt aufweisen, der zwischen denen der blau- und gelbkodierten Bereiche liegt.



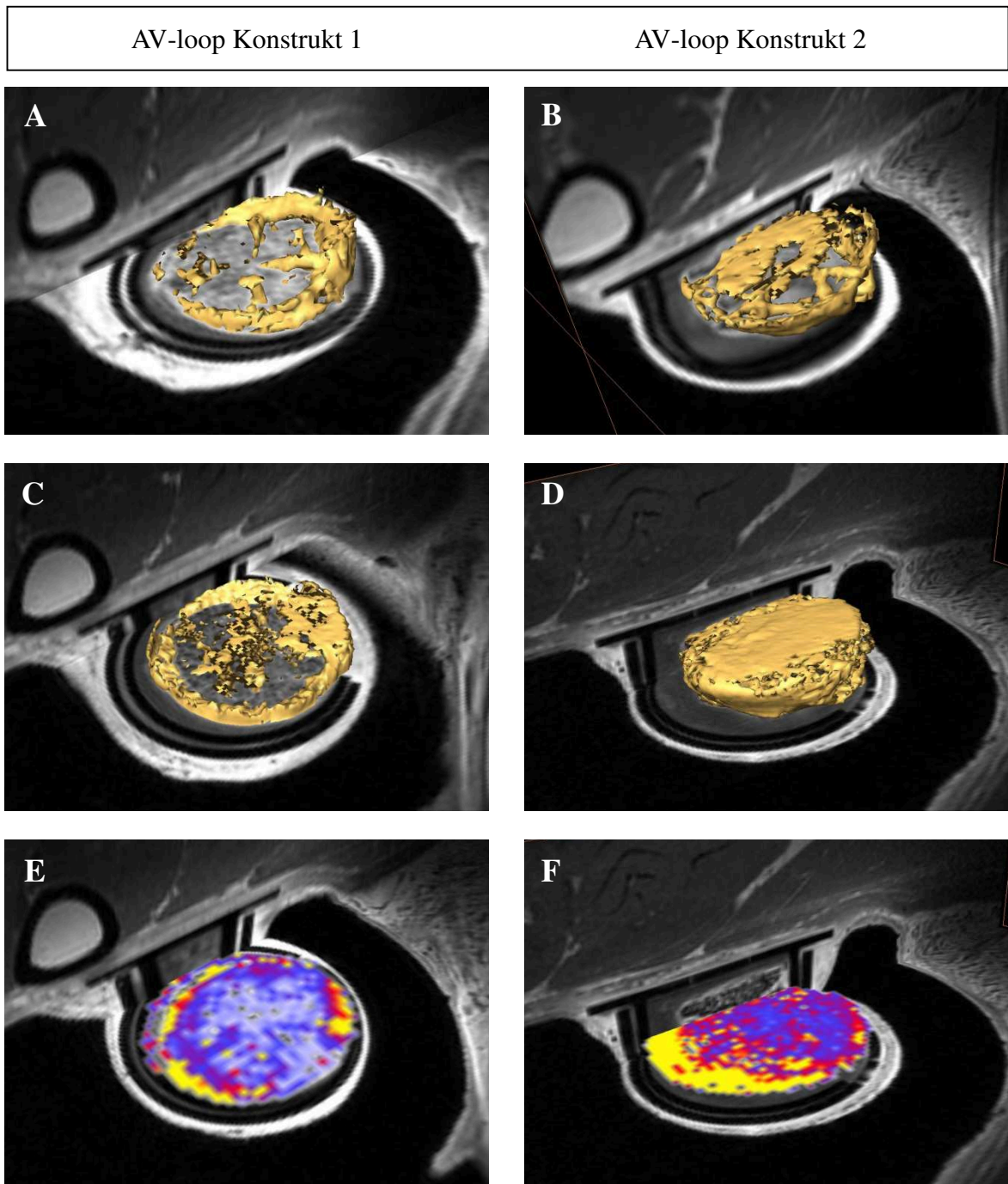


Abbildung 63: Darstellung der Ergebnisse der MRT-Untersuchungen

(A–D): Isosurface der zu zwei Zeitpunkten gemessenen AV-loop Konstrukte. Es ist deutlich erkennbar, dass es zu einer Zunahme der Vaskularisierung zwischen dem frühen (16 Wochen) (A, B) und dem späten Messzeitpunkt (18 Wochen) (C, D) gekommen ist. Vor allem im Bereich der in den NanoBone® Block eingefrästen Makroporen hat sich ein dichtes Gefäßnetzwerk entwickelt (v. a. A, C). (E, F): Visualisierung der Sauerstoffsättigung in den Konstrukten zum Messzeitpunkt 18 Wochen. Dunkelblaue Bereiche weisen auf eine hohe Sauerstoffsättigung hin, während gelbkodierte Areale ein Indikator für einen sehr geringen, bzw. 0%igen Sauerstoffgehalt im Gewebe sind. Rotkodierte Strukturen weisen auf eine Sauerstoffsättigung hin, die zwischen der der blau- und gelbkodierten Bereiche liegt. Vor allem in den Makroporen lag eine hohe Sauerstoffsättigung, d. h. eine gute Vaskularisierung, vor (E), wie bereits in der Isosurface Darstellung festgestellt werden konnte.

### **Mikro-Computertomographie**

Um eine weitere Möglichkeit der dreidimensionalen Gefäßdarstellung auszunutzen, wurde der AV-loop nach Explantation mit einem silikonhaltigen Kontrastmittel (Mikrofil<sup>®</sup>) perfundiert und nach Entkalkung der Konstrukte  $\mu$ CT-Aufnahmen angefertigt. Nachfolgend wurden aus diesen Daten Maximum Intensity Projections der von Kontrastmittel gefüllten Gefäße berechnet und als Isosurface-Extraktionen dargestellt. Dadurch war es möglich, das neugebildete Gefäßnetzwerk im NanoBone<sup>®</sup> Block räumlich zu visualisieren und die Länge sowie den Radius und das Volumen der Gefäße auszumessen.

Exemplarisch wurden die bereits mittels MRT untersuchten Konstrukte (AV-loop Konstrukt 1 und 2) der mikrocomputertomographischen Analyse unterzogen. In beiden Konstrukten konnten die Gefäßschleife sowie von ihr abzweigende neugebildete Gefäßstrukturen dargestellt werden, die in das Zentrum des Blockes ziehen. Teilweise ist das Loop-Gefäß nicht vollständig perfundiert, so dass Unterbrechungen des mit Mikrofil<sup>®</sup> visualisierten Gefäßverlaufes wahrgenommen werden können (Abbildung 64C, D). Es sind viele Bereiche erkennbar, in denen es zu einer relativ großflächigen Ausbreitung von Mikrofil<sup>®</sup>, bzw. zu einem deutlichen Hintergrund, gekommen ist und dadurch viele kleine Gefäßstrukturen nicht optimal abgrenzbar sind (Abbildung 64A, B). Die Isosurface-Extraktionen wurden nachfolgend von dem paravasal liegenden Mikrofil<sup>®</sup> sowie von deutlich nicht als Gefäßstrukturen identifizierbaren Bereichen manuell digital bereinigt, so dass das Gefäßnetzwerk sich ausreichend vom Hintergrund abzeichnete (Abbildung 64C, D).

Im AV-loop Konstrukt 2 kam es insbesondere am Kammereingang zu einer hochgradigen Neubildung von Gefäßstrukturen, die in das Innere der Kammer ziehen (Abbildung 64D). Zum Teil konnten in der Nut des Blockes neben dem Loop-Gefäß weitere Gefäße dargestellt werden (Abbildung 64C).

Zur Visualisierung der unterschiedlichen Gefäßdurchmesser erfolgte die Berechnung von farbkodierten Isosurface-Extraktionen (schwarz-blau-grün-gelb-rot, wobei rote Gefäße einen Durchmesser von mindestens 0,5 mm aufweisen) (Abbildung 64E, F). Vor allem im AV-loop Konstrukt 1 konnten nur sehr kleinkalibrige Gefäße dargestellt werden (blaue Kodierung). Im AV-loop Konstrukt 2 ist die Gefäßschleife als z. T. grüne bzw. gelbe und rote Struktur erkennbar, die auf einen größeren Gefäßdurchmesser schließen lässt als eine blaukodierte Struktur. Beide Konstrukte weisen von den Loop-Gefäßen abzweigende neugebildete und nach zentral ziehende blaukodierte Gefäße auf.

Nach deskriptiver Beurteilung wurden Länge, Radius sowie Volumen der Gefäßstrukturen in den Konstrukten ausgemessen. Berechnet wurden die Mittelwerte der einzelnen

Gefäßstrukturen sowie die Summe aller Gefäßstrukturen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 15 dargestellt.

*Tabelle 15: Ergebnisse der  $\mu$ CT-Messungen*

		Länge (mm)	Radius (mm)	Volumen (mm <sup>3</sup> )
AV-loop Konstrukt 1	Mittelwert	1,87	0,06	0,03
	Summe	499,85	16,25	8,5
AV-loop Konstrukt 2	Mittelwert	1,57	0,07	0,04
	Summe	965,94	42,86	25,96

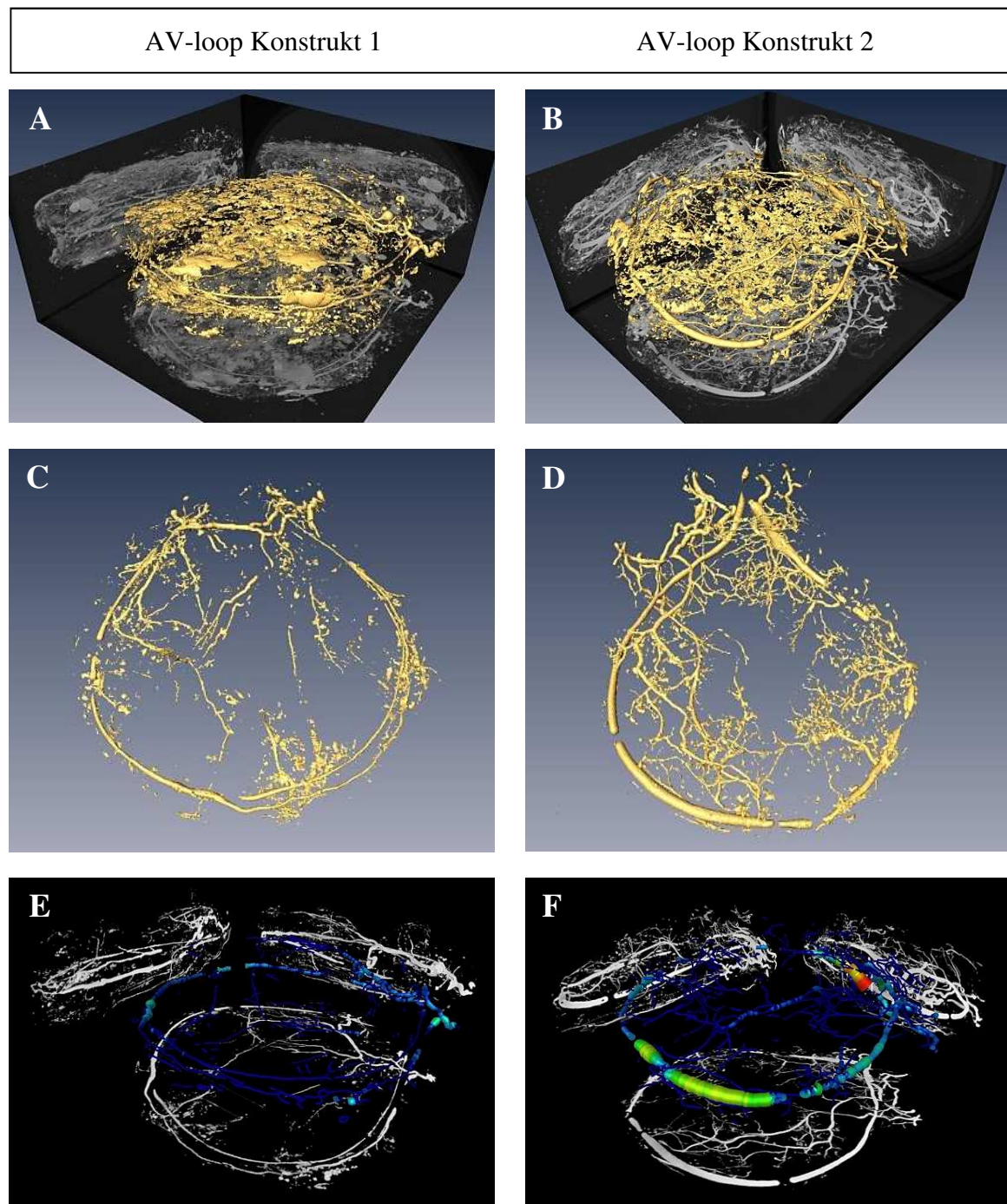


Abbildung 64: *Isosurface-Extraktionen und farbkodierte Isosurface-Extraktionen der mikrocomputertomographischen Messungen der AV-loop Konstrukte*

(A, B): Dargestellt sind die Isosurface-Extraktionen von zwei AV-loop Konstrukten. Das mit dem CT-Kontrastmittel Mikrofil® perfundierte Gefäßnetzwerk ist nur undeutlich zu erkennen. An einigen Stellen ist es zu einer großflächigen Ausbreitung des Kontrastmittels, bzw. zu einem deutlichen Hintergrund gekommen, wodurch die Sicht auf kleine Gefäßstrukturen eingeschränkt wurde. (C, D): Mittels manueller Bearbeitung der Bilder wurden das aus einigen Gefäßen ausgetretene Mikrofil® bzw. der Hintergrund, entfernt, so dass die von den Loop-Gefäßen ausgehenden neugebildeten Gefäßstrukturen deutlich abzugrenzen waren. (E, F): Farbkodierte Isosurface-Extraktionen zur Visualisierung unterschiedlicher Gefäßhierarchien. Während kleinkalibrige Gefäße blau dargestellt werden, erscheinen Gefäße mit größerem Durchmesser als grüne bzw. gelbe und rote Strukturen.

## 5 Diskussion

### 5.1 Etablierung einer optimalen Gerinnungshemmung im Schaf

Aufgrund des Mangels an Daten in der Literatur bezüglich eines optimalen Therapieschemas zur Gerinnungshemmung im Schaf wurde im Rahmen des ersten Studienabschnittes dieser Arbeit erstmalig die Wirkung verschiedener thrombozytenaggregationshemmender und antikoagulatorischer Medikamente getestet. Die Altersunabhängigkeit der Effektivität des wirksamsten Aggregationshemmers sowie Antikoagulans wurde zudem an einer Gruppe von Lämmern überprüft. Fehlende verlässliche Angaben bezüglich eines Systems zur Messung der Thrombozytenaggregation im Schaf machten zu Beginn der Studie die Etablierung eines Testsystems notwendig. Die Ergebnisse der Versuche waren grundlegend für die Gewährleistung optimaler Versuchsbedingungen für den zweiten Studienabschnitt.

#### 5.1.1 Methoden zur Messung der Thrombozytenaggregation im Schaf

##### **Multiplate<sup>®</sup> Analyzer**

Als Testsystem für die Evaluierung der Thrombozytenaggregation im Schaf wurde die Impedanzaggregometrie gewählt. Gegenüber der Lichttransmissionsaggregometrie (LTA) sind einige Aspekte beschrieben, die auf die Überlegenheit der Impedanzaggregometrie hinweisen. Bei diesem System findet die Messung im Vollblut statt, d. h. der für die LTA zur Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP, platelet rich plasma) notwendige und zeitaufwendige Zentrifugationsschritt wird überflüssig. Dadurch verbleiben die Thrombozyten in ihrem physiologischen Milieu und die Gefahr des Verlustes von großvolumigen Thrombozyten, die eine höhere Reaktivität als Thrombozyten mit einem geringeren Volumen aufweisen (BATH & BUTTERWORTH, 1996), wird vermieden. Die bei der Impedanzaggregometrie gegebenen physiologischeren Bedingungen führten zu der Annahme, dass eine verlässlichere Aussage als bei Messung mittels LTA erhalten werden kann. Unseren Ergebnissen zufolge ist dieses System jedoch nur eingeschränkt kompatibel mit Schafblut. Bereits Baumgarten et. al. stellten fest, dass sich die Impedanzaggregometrie nicht ohne Modifizierung auf das Schaf anwenden lässt. Ristocetin, Arachidonsäure (arachidonic acid, AA) und thrombin receptor-activating peptide 6 (TRAP-6) konnten in beschriebener Studie keine ausreichende ovine Thrombozytenaggregation induzieren (BAUMGARTEN et al., 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde auch nach Erhöhung der Endkonzentrationen von AA und TRAP um mehr als das Dreifache, bzw. Doppelte (AA:

6,56 mmol/l, TRAP: 320  $\mu$ mol/l) keine messbare Thrombozytenaggregation induziert. Es kann hypothetisiert werden, dass die Aggregation von ovinen Blutplättchen unabhängig von AA und TRAP abläuft. Weiterhin besteht die Möglichkeit eines speziesspezifischen Thrombinrezeptors, wie bereits von Baumgarten et al. vermutet (BAUMGARTEN et al., 2010).

### **Lichttransmissionsaggregometrie**

Als weitere Methode wurde die LTA bzw. Born Aggregometrie getestet (BORN, 1962), die auch als Goldstandard für die Evaluierung von Thrombozytenfunktionen bezeichnet wird (CATTANEO, 2009). In vorliegender Studie erwies sie sich nach Anpassung als geeignetes Testverfahren zur Bestimmung der ovinen Thrombozytenaggregation. Für die Gewinnung von PRP bedarf es eines Zentrifugationsschrittes, der für humanes Blut bei 190 x g für 10 min durchgeführt wird. Um eine ausreichend hohe Anzahl an ovinen Blutplättchen zu gewinnen, stellte sich die Zentrifugation bei 60 x g für 70 min als optimal heraus. Eine höhere Drehzahl hatte eine geringe Thrombozytendichte im PRP zur Folge, eine kürzere Zentrifugationsdauer führte zu einer zu geringen Volumenausbeute an PRP. Ein Grund für die uneinheitlichen Zentrifugationsbedingungen kann in der unterschiedlichen Größe der Erythrozyten von Mensch und Schaf vermutet werden. Die im Vergleich zu humanen sehr kleinen ovinen Erythrozyten (Durchmesser humane Erythrozyten: 7,5  $\mu$ m (SINOWATZ, 2000); ovine Erythrozyten: 5,1  $\mu$ m (KASPERS et al., 2004)) ähneln in ihrer Größe den Thrombozyten (2-4  $\mu$ m (KASPERS et al., 2004)) und machen eine Auftrennung über Zentrifugationsschritte dementsprechend schwierig.

Um die Wirkung von Clopidogrel und Ticagrelor mittels LTA zu evaluieren, wurde der aggregationsinduzierende Agonist Adenosindiphosphat (ADP) gewählt, für Acetylsalicylsäure (ASS) die Agonisten AA und Kollagen. Die in Anlehnung an laborinterne humanmedizinische Vorgaben gewählten Konzentrationen waren nur für ADP und Kollagen auf ovines PRP anwendbar. Vergleichbar zur Impedanzaggregometrie kam es auch in diesem System zu keiner oder einer nur sehr geringen Aggregationsinduktion durch AA. Die Konzentration musste von 1,64 mmol/l auf 10,93 mmol/l erhöht werden, um eine Endaggregation (final aggregation, FA) von  $81,9 \pm 10,7 \%$  zu erzielen.

Die infolge der Ergebnisse im Multiplate<sup>®</sup> Analyzer anfänglich aufgestellte Hypothese der Wirkungslosigkeit von AA auf ovine Thrombozyten konnte damit widerlegt werden, jedoch scheint dieser Agonist aufgrund der hohen für die Aggregationsinduktion notwendigen Konzentration einen eher geringeren Stellenwert in der ovinen Thrombozytenaggregation einzunehmen. Auch in der Literatur ist die nur moderate Aggregation von Schafthrombozyten durch eine Stimulierung von 0,5–2 mmol/l AA beschrieben (BURKE et al., 1983; GENTRY et al., 1987). Im Gegensatz zur vorliegenden Studie konnte eine nahezu 100%ige Aggregation bei Verwendung von 7,5 mmol/l AA induziert werden (PELAGALLI et al., 2002). Dieser Unterschied kann an einer interindividuellen Variabilität liegen, die bereits in anderen Studien festgestellt wurde



(BAUMGARTEN et al., 2010) und vor allem bei einer relativ geringen Fallzahl zum Ausdruck kommen kann. Weiterhin können diese Unterschiede durch die Verwendung verschiedener Rassen der Tierspezies Schaf bedingt sein. Auch Reagenzien unterschiedlicher Hersteller und eine damit verbundene Schwankung in der Reaktivität der Agonisten kann zu differierenden Ergebnissen führen (BAUMGARTEN et al., 2010). Zur Verringerung des Einflusses der interindividuellen Variabilität wurden die Referenzwerte für die LTA an 20 gesunden, unbehandelten, weiblichen Schafen derselben Rasse (Merinolandschaf) erhoben. Es zeigten sich nur geringe interindividuelle Unterschiede bezüglich der ADP-, AA- und Kollagen-induzierten Aggregation.

### **Blutungszeit**

Als Testsystem für die Evaluierung der Thrombozytenaggregation wurde neben der LTA die Blutungszeit (BZ) bestimmt. Die Einfachheit dieser Methode offeriert die Möglichkeit der raschen *in vivo* Überprüfung der Wirkung von Medikamenten, die in die primäre Hämostase eingreifen. Schwartz et al. berichten hohe Schwankungen in der BZ, die durch interindividuelle Unterschiede sowie durch verschiedene Untersucher bedingt werden. Die individuelle Überprüfung der Wirkung eines Thrombozytenaggregationshemmers (der Patient stellt seine eigene Kontrolle dar) wird jedoch als sinnvolle klinische Untersuchungsmethode angegeben (SCHWARTZ et al., 1998). Um in vorliegender Studie eine gute Verlässlichkeit zu garantieren, wurde eine standardisierte Methode etabliert und aufgrund einer individuell unterschiedlichen BZ vor jedem Beginn der Medikamentengabe die Basalwerte von jedem Schaf und Lamm bestimmt. Dennoch war es nicht möglich, die in der LTA beobachtete Wirkung der Medikamente mittels der BZ zu demonstrieren. Sowohl in der Human- als auch in der Veterinärmedizin wird dieser Test aufgrund der hohen Fehlerhäufigkeit resultierend aus der interindividuellen unterschiedlichen BZ und der reduzierten Reproduzierbarkeit kritisiert (SEGURA & MONREAL, 2008). Trotz standardisierter Durchführung erwies sich diese Methode in vorliegender Studie als ungeeignet für die Evaluierung der Thrombozytenfunktion im Schaf.

## **5.1.2 Thrombozytenaggregationshemmung mit Acetylsalicylsäure, Clopidogrel und Ticagrelor**

### **Acetylsalicylsäure – Wirkungslosigkeit *in vivo* und *in vitro***

Aus der Reihe der Thrombozytenaggregationshemmer wurde die Wirkung von ASS auf Schafthrombozyten evaluiert, zum einen nach Applikation (*in vivo*), zum anderen nach Zugabe von ASS zu PRP (*in vitro*). Um eine mögliche reduzierte Resorptionsrate nach oraler Gabe auszuschließen, wurde ASS auch intravenös verabreicht. Weder *in vivo* noch *in vitro* konnte ein Effekt auf ovine Thrombozyten festgestellt werden.

Bislang gibt es nur wenige Studien, die sich mit der Wirkung von ASS im Schaf auseinandersetzen. Eine vergleichbare *in vivo* Studie zur Überprüfung der

Aggregationshemmung ist nicht bekannt, dennoch gibt es Untersuchungen bezüglich der Pharmakokinetik im Wiederkäuer. In der Literatur ist die orale Gabe als ineffizient beschrieben, möglicherweise jedoch bedingt durch die Darreichungsform als Gelatinekapsel (DAVIS & WESTFALL, 1972). Die hochdosierte (100 mg/kg bid) Applikation führte zu einer für therapeutische Zwecke vermutlich ausreichend hohen Salicylsäure-Plasmakonzentration in Rindern. Es wird auf die relativ langsame Resorption von ASS im Wiederkäuer hingewiesen, die wahrscheinlich durch den Pansen pH von 5,0–7,0 bedingt wird, der das Vorliegen von ASS in der ionisierten und nicht diffusionsfähigen Form begünstigt. Im Gegensatz dazu dominiert bei Monogastriern aufgrund des niedrigen pH-Wertes im Magen die nicht-ionisierte und diffusionsfähige Form. Trotz der langsamen Resorption wurde im Rind eine Bioverfügbarkeit von 70 % nachgewiesen (GINGERICH et al., 1975). Die prinzipielle Resorption von ASS im Wiederkäuer konnte bewiesen werden und erscheint damit als Grund für die Wirkungslosigkeit in dieser Studie von geringer Relevanz. Aufgrund der verwendeten weitaus niedrigeren Dosierung (7,14–8,33 mg/kg bid) verglichen zur genannten Publikation sollte dieser Aspekt jedoch vorerst nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Mit einer Dosierung von 20 mg/kg intravenös konnte in Schafen eine anzunehmende antipyretische, antiinflammatorische sowie analgetische Wirkung induziert werden. Der Effekt auf Thrombozyten wurde nicht untersucht (ALI, 2003). Die intravenöse Gabe von ASS ist mit einer raschen Eliminierung aus dem Plasma verbunden, wahrscheinlich begründet durch eine hohe renale Ausscheidungsrate (DAVIS & WESTFALL, 1972; GINGERICH et al., 1975; ALI, 2003). Der alkalische pH-Wert im Urin von Herbivoren begünstigt die Clearance von Salicylaten (GINGERICH et al., 1975). Dennoch kann auch die rasche Eliminierung von intravenös verabreichter ASS nicht als primärer Grund für die Wirkungslosigkeit im Schaf gewertet werden, da ASS eine irreversible Hemmung der COX-1 in den Thrombozyten induziert und bereits in sehr geringen Konzentrationen über mehrere Tage hinweg wirkt (PATRONO et al., 1985).

Die Ergebnisse der *in vivo* Versuche zusammengefasst lassen vermuten, dass die Ineffizienz nach unterschiedlichen Darreichungsformen in der generellen Wirkungslosigkeit von ASS auf ovine Blutplättchen begründet ist.

Um die Möglichkeit einer Wirkung in sehr hohen Dosen auszuschließen, wurden *in vitro* sehr hohe Konzentrationen von ASS (1–10 mg/ml) zu ovinem PRP gegeben. Der Versuchsaufbau erfolgte in Anlehnung an eine Studie von Spanos et al. (SPANOS, 1993). Jedoch verwendeten wir die von uns etablierten Agonistenkonzentrationen sowie eine höher konzentrierte ASS-Lösung, die in Anlehnung an die ASS-Kontrolle des Multiplate<sup>®</sup> Systems gewählt wurde (1 mg/ml). Auch mit einer, im Vergleich zu der von Spanos et al. verwendeten Konzentration, mehr als hundertfach höher konzentrierten ASS-Lösung (10 mg/ml) konnte keine Hemmung der Thrombozytenaggregation induziert werden. Die Verlässlichkeit des Testsystems wurde mittels einer humanen Blutprobe überprüft, in der



eine hochgradige Hemmung der AA-induzierten Aggregation nach Zugabe von 1 mg/ml ASS gezeigt werden konnte. Somit kann davon ausgegangen werden, dass auch eine ASS Dosierung über 500 mg bid hinaus keine Wirkung auf die Thrombozytenaggregation im Schaf hat. In zwei *in vitro* Studien wurde die ASS-induzierte Hemmung der Prostaglandin (PG) Synthetase aus humanen Thrombozyten und der ovinen Samenblase verglichen. Die humane PG Synthetase konnte 37- bzw. 31-fach potenter gehemmt werden als die ovine, jedoch bleibt der Einfluss der unterschiedlichen Gewebeherkunft der Enzyme unklar (MAJERUS & STANFORD, 1977; BURCH et al., 1978).

Die in der Humanmedizin im Regelfall verwendeten ASS Dosierungen zur Thromboseprophylaxe schwanken, liegen meist aber im niedrigen Bereich, aufgrund der guten Wirkung bei anzunehmenden geringeren Nebenwirkungsraten. Es fehlen randomisierte Studien zur konzentrationsabhängigen Wirksamkeit von ASS auf die Thrombozytenaggregation, jedoch ist die Effektivität sowohl von niedrig- als auch von hochdosierter ASS beschrieben. Bei Gabe hoher Dosen könnte eine zusätzliche Wirkung auf die COX-2 bestehen und damit eine verminderte Produktion des aggregationshemmenden PGI<sub>2</sub> ausgelöst werden (PATRONO et al., 2008). Allerdings zeigte der durchgeführte *in vitro* Versuch mit humanem Blut eine optimale Hemmung der AA-induzierten Thrombozytenaggregation durch ASS in einer Konzentration, die weit über die therapeutische Dosierung hinausgeht. Auch die Erhöhung der ASS Gabe an Non-Responder führte zu einer besseren Hemmung der Thrombozytenaggregation (SAMBU et al., 2012). Die *in vitro* auffällige nur unvollständige Hemmung der Kollagen-induzierten Thrombozytenaggregation in der humanen mit ASS versetzten Probe lässt sich darauf zurückführen, dass die Kollagen-induzierte Aggregation nur in geringem Maße von der Thromboxanproduktion abhängt. Aufgrund dessen ist Kollagen als ein nicht optimal geeigneter Agonist für die Evaluierung der ASS-Wirkung beschrieben (HANKEY & EIKELBOOM, 2006).

Trotz der genannten Publikationen, die auf eine Unwirksamkeit von ASS im Schaf hinweisen (MAJERUS & STANFORD, 1977; BURCH et al., 1978; SPANOS, 1993), wird dieser Thrombozytenaggregationshemmer aktuell wie in den letzten Jahren regelmäßig im Schaf eingesetzt (WESTABY et al., 1997; TOZZI et al., 2001; PENG et al., 2012). In einer Studie zur Untersuchung einer neuen Stenttechnologie wurde die Thromboseprophylaxe mit einer Langzeitgabe von ASS durchgeführt (TOZZI et al., 2001). Ob die Abwesenheit der Thrombenbildung auf die Wirkung des Medikaments zurückzuführen ist, erscheint in Anbetracht der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit fraglich, vielmehr ist nicht auszuschließen, dass es auch ohne ASS zu identischem Verlauf gekommen wäre. Aufgrund der Behandlung aller Schafe mit ASS kann letztendlich nur vermutet werden, dass auch ohne ASS eine 100%ige Durchgängigkeitsrate erzielt werden könnte.

Andererseits werden in der Humanmedizin mögliche gerinnungshemmende Wirkungen von ASS diskutiert, die unabhängig von der COX-1 ablaufen, wie z. B. eine Steigerung der Fibrinolyse und eine Hemmung der plasmatischen Gerinnung (PATRONO et al., 2008), die aber weiteren Untersuchungen bedürfen.

Zusammenfassend ist anzunehmen, dass die ovine Plättchenaggregation weitestgehend unabhängig von AA bzw. Thromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) abläuft (SPANOS, 1993), bestätigt durch die relativ schwache Wirkung von AA als Aggregationsagonist im Multiplate<sup>®</sup> sowie in der LTA. Andererseits ist es möglich, dass es trotz ASS-Gabe zu einer Generierung von TXA<sub>2</sub> kommt, entweder durch die unzureichende Hemmung der COX-1 oder eine COX-1 unabhängige Produktion von TXA<sub>2</sub>. Mittels Bestimmung von TXB<sub>2</sub> im Serum könnte indirekt auf den Gehalt von TXA<sub>2</sub> geschlossen werden (HARRISON et al., 2007). Die zugrunde liegenden Mechanismen der ASS-Resistenz im Schaf wurden in vorliegender Studie nicht evaluiert, dies könnte jedoch Gegenstand zukünftiger Studien sein.

### **Optimale Wirksamkeit von Clopidogrel in 2 von 5 Schafen und 3 von 5 Lämmern**

Die Wirkung des ADP-Rezeptorantagonisten Clopidogrel wurde in unterschiedlichen Dosierungen evaluiert und konnte in 2 von 5 Schafen und in 3 von 5 Lämmern eine Hemmung der Thrombozytenaggregation unterhalb des Cut-off Wertes (64,2 %) auslösen. Die Langzeitwirkung (28 Tage) wurde in der Lammgruppe evaluiert, aufgrund einer Wirkung in 3 Tieren, im Gegensatz zu nur 2 Tieren in der Schafgruppe. Sowohl am Tag 7 als auch am Tag 28 konnte eine Thrombozytenaggregationshemmung unterhalb des Cut-off Wertes erreicht werden. Zwischen diesen beiden Zeitpunkten stellte sich kein signifikanter Unterschied heraus, so dass eine mögliche Akkumulation oder Adaptierung an das Medikament ausgeschlossen werden kann. Aufgrund der Behandlung der Schafe und Lämmer mit einer vergleichbaren Clopidogreldosierung (Schafe: 5,36–6,25 mg/kg, Lämmer: 5,0–6,0 mg/kg, je bid) und der nicht signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen ist eine Altersunabhängigkeit von Clopidogrel bezüglich der Wirkung auf die Thrombozytenaggregation wahrscheinlich.

In einem Schaf (Schaf Nr. 3) kam es bereits in der geringsten Clopidogreldosierung (150 mg bid) zu einer effektiven Wirkung. In Abweichung dazu wurde in einem anderen Schaf (Schaf Nr. 1) erst nach Erhöhung der Dosis eine ausreichende Aggregationshemmung bewirkt. Auch Connell et al. bemerkten eine nur moderate Effizienz von Clopidogrel nach Verabreichung von 75–150 mg täglich an je 2 Schafe und Ziegen (CONNELL et al., 2007). Im Gegensatz dazu konnte die Applikation von bereits 75 mg täglich an Kälber (n = 4) die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation erfolgreich hemmen (COOMBER et al., 2006). Trotz der relativ nahen Verwandtschaft von Schaf und Rind kann jedoch nicht davon ausgegangen werden, dass diese Ergebnisse auch im Schaf

zu erwarten sind. Dennoch wurde dadurch die prinzipiell mögliche Wirkung von Clopidogrel im Wiederkäuer nachgewiesen.

Die Beobachtung einer besseren Wirkung von Clopidogrel in Non-Respondern nach Dosiserhöhung wurde bereits in der Humanmedizin gemacht, jedoch konnte nur in knapp der Hälfte der Patienten eine Effizienzsteigerung erreicht werden (CUISSET et al., 2011). Es gibt keine eindeutigen Angaben über das Vorkommen der Clopidogrelresistenz unter Menschen, je nach Untersuchung werden Werte von 5 bis 44 % genannt (GURBEL & TANTRY, 2007). Auch in dieser Studie ist es aufgrund der limitierten Fallzahl nicht möglich, eine exakte Aussage über die Häufigkeit von Non-Respondern zu treffen, dennoch kann mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, dass unter Schafen das Phänomen der Clopidogrelresistenz gleichermaßen existiert. Die Gründe für eine Wirkungslosigkeit von Clopidogrel sind vielfältig, am häufigsten werden jedoch genetische Polymorphismen im Cytochrom P450 System diskutiert. Verschiedene Isoenzyme bedingen die Umwandlung des Prodrugs Clopidogrel in seinen aktiven Metaboliten. Vor allem CYP2C19 wird eine große Beteiligung zugeschrieben. Es handelt sich um ein hochpolymorphes Enzym mit mehr als 25 verschiedenen Allelen, wobei das CYP2C19\*1 Allel mit einem funktionellen CYP2C19 vermittelten Metabolismus assoziiert ist. Das häufigste CYP2C19 loss of function Allel ist das Allel \*2 (SCOTT et al., 2011). Während homozygote Träger (\*2/\*2) einen sehr schwachen Metabolismus aufweisen, ist dieser bei heterozygoten Trägern (\*1/\*2) nur reduziert. Bezüglich des Schafes gibt es in der Literatur keine Angaben über das Vorkommen dieser Genvarianten, hingegen ist jedoch bekannt, dass hohe interspezifische Varianten des Medikamentenmetabolismus über das Cytochrom P450 System bestehen (ZUBER et al., 2002).

Die Wirkung von Clopidogrel setzte nicht wie beim Mensch beobachtet (SAVCIC et al., 1999) wenige Stunden nach Applikation der Aufsättigungsdosis (loading dose) ein, sondern konnte erst am nächsten Messzeitpunkt (Tag 4) festgestellt werden. Das verzögerte Einsetzen der Wirkung könnte die Folge einer verlangsamten Resorption der Tabletten im Vormagensystem der Schafe sein.

Zur Überprüfung der Resorption von Clopidogrel wurde daher sowohl Clopidogrel als auch sein inaktiver Metabolit Clopidogrelcarbonsäure, der für Studien bezüglich Resorption und Elimination geeignet ist (CAPLAIN et al., 1999), im Plasma der Schafe und Lämmer gemessen. Die Messungen wurden in Anlehnung an eine humanmedizinische Methode durchgeführt und wiesen hohe Messgenauigkeiten sowie nur geringe Variationskoeffizienten auf (SILVESTRO et al., 2011). Jedoch konnte in 3 von 10 Proben, die am Tag 0 zur Bestimmung des Basalwertes dienten, Clopidogrel nachgewiesen werden. Dies ist einer vermutlichen laborinternen Kontamination zuzuschreiben, da die Tiere zum Zeitpunkt der Blutabnahme, einschließlich in den zwei vorangegangenen Wochen, keine Medikamente erhielten. Dementsprechend müssen die Clopidogrelwerte mit Vorbehalt interpretiert werden. Für die statistischen Analysen wurde die basale

Clopidogrelkonzentration im Blut vor Beginn der Behandlung auf den Wert 0 ng/ml gesetzt. Es stellten sich relativ hohe interindividuelle Unterschiede heraus, die eventuell durch eine hohe Umwandlungsrate von einem Clopidogrelmetaboliten (Glucuronid) in Clopidogrel bedingt sein können (SILVESTRO et al., 2011). Aufgrund dessen sowie der vermutlichen Probenkontamination ist es schwierig, eine definitive Aussage bezüglich der Clopidogrelkonzentration im Blut zu machen, dennoch konnte insgesamt nachgewiesen werden, dass es zu einer erfolgreichen Resorption von Clopidogrel nach oraler Gabe gekommen ist.

Auch der inaktive Clopidogrelmetabolit konnte in allen Proben (ausgenommen der Basalwertproben) bestimmt werden. Verglichen mit humanmedizinischen Angaben nach Einnahme von 75 mg täglich, wurden im Schafplasma geringere Konzentrationen von Clopidogrelcarbonsäure gemessen (SILVESTRO et al., 2011). Dabei ist zu bedenken, dass die Schafe ebenso wie die Lämmer im Vergleich zu der empfohlenen humanen Dosierung (75 mg täglich) eine weitaus höhere Menge an Clopidogrel erhielten (Schafe: 375 mg bzw. 5,36–6,25 mg/kg, Lämmer: 150 mg bzw. 5,0–6,0 mg/kg, je bid). In Anbetracht der niedrigen Clopidogrelmetabolitkonzentrationen im Plasma erscheint eine ineffizientere Resorption im Verdauungskanal von Schafen im Vergleich zum Menschen sehr wahrscheinlich. Weitere Gründe für die geringen Metabolitkonzentrationen könnten jedoch auch in einer geringeren Umwandlung von Clopidogrel in seinen inaktiven Metaboliten Clopidogrelcarbonsäure oder in einer höheren Clearancerate des Metaboliten bestehen.

Ein Vergleich zwischen Schafen und Lämmern ergab bei nahezu identischer Dosierung (Schafe: 5,36–6,25 mg/kg, Lämmer: 5,0–6,0 mg/kg, je bid) eine signifikant, bzw. hochsignifikant geringere Clopidogrelcarbonsäurekonzentration in Lämmern. Das Alter stellte sich als signifikanter Einflussfaktor auf die Höhe der Metabolitkonzentration heraus, eventuell resultierend aus einer beschleunigten Clearance des Metaboliten in jüngeren Tieren.

Weiterhin wurde eine signifikante Interaktion zwischen dem Faktor Alter der Tiere und dem Faktor Behandlungsdauer festgestellt. Das bedeutet, dass sich die Konzentration des Metaboliten in Schafen und Lämmern in unterschiedlichem Ausmaß über den Testzeitraum hinweg verändert hat. Bei Schafen stieg die Konzentration rascher an und erlangte ein höheres Niveau als bei Lämmern. Auch diese Beobachtung lässt sich durch eine mögliche beschleunigte Clearance in jüngeren Tieren erklären. Trotz der unterschiedlichen Metabolitkonzentrationen wurde jedoch eine vergleichbare Wirkung von Clopidogrel auf die Thrombozytenaggregation festgestellt. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass die Resorption von Clopidogrel in Schafen und Lämmern in gleichem Maße erfolgt, der aktive Metabolit höchstwahrscheinlich in ähnlichen Konzentrationen gebildet wird, an die Thrombozyten bindet und diese nachfolgend irreversibel hemmt. Diese Vermutung wird gestützt durch einen in den unterschiedlichen Altersgruppen statistisch nicht signifikanten Unterschied in der Clopidogrelkonzentration im Plasma. Wie jedoch bereits oben

beschrieben, müssen die Ergebnisse der Clopidogrelkonzentrationen unter Vorbehalt interpretiert werden, so dass diesbezüglich keine definitive Aussage getroffen werden kann.

Die Konzentration der Clopidogrelcarbonsäure blieb in der Gruppe der Schafe und der Lämmer zwischen Tag 4 und 7 bzw. Tag 4 und 28 auf demselben Niveau, so dass von der Ausbildung eines Steady States auszugehen ist. Die auch nach 28 Tagen nicht signifikante Veränderung der Konzentration im Plasma unterstreicht die Aussage, dass eine Akkumulation oder Gewöhnung an das Medikament mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden kann.

Die individuellen Werte der Schafe und Lämmer betrachtend, scheint es keinen Zusammenhang zwischen Wirkung von Clopidogrel und Höhe des inaktiven Metaboliten zu geben.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass der geringen Wirksamkeit von Clopidogrel in einigen Schafen eine reduzierte Resorption, ein möglicher Abbau oder eine Inaktivierung im Vormagensystem, eine beschleunigte Clearance des aktiven Metaboliten, eine genetische Variation im Cytochrom P450 System oder eine Kombination dieser Ursachen zugrunde liegen können. Möglich wären auch eine höhere Anzahl an oder ein speziesspezifischer P2Y<sub>12</sub> Rezeptor, andere wichtigere Initiatoren der Thrombozytenaggregation, die erhöhte Plättchenanzahl der Schafe oder eine beschleunigte Neubildung von Thrombozyten. Letztendlich kann eine Hemmung der Thrombozytenaggregation mittels Clopidogrel im Schaf nicht garantiert werden, zudem muss beachtet werden, dass es zu einem verzögerten Einsetzen der Wirkung kommt. Studien mit einer größeren Tierzahl könnten für die Bestimmung der Prävalenz an Clopidogrel Non-Respondern unter Schafen hilfreich sein. Mit diesen Werten wäre es möglich, die Wahrscheinlichkeit der Wirkung von Clopidogrel in Schafen zu berechnen. Prinzipiell ist es jedoch sinnvoll, eine individuelle Effektivitätsmessung mittels LTA durchzuführen, damit eine eventuell notwendige Dosisanpassung vorgenommen werden könnte.

### **Ticagrelor – unzureichender Thrombozytenaggregationshemmer in Schafen**

Ticagrelor, ein neu entwickelter ADP P2Y<sub>12</sub> Inhibitor, wurde nachfolgend auf seine Effektivität im Schaf getestet. Es handelt sich im Gegensatz zu Clopidogrel nicht um ein Prodrug, so dass von einem raschen Wirkungseintritt sowie einer verbesserten Wirkung auch bei genetischen Variationen im Cytochrom P450 System ausgegangen werden kann. In 4 von 5 Schafen konnte dennoch keine Wirkung von Ticagrelor festgestellt werden. In den zwei höchsten Dosierungen (360 mg und 540 mg, je bid) wurde in einem Schaf (Schaf Nr. 3) jeweils ab Tag 4 eine Thrombozytenaggregationshemmung unterhalb des Cut-off Wertes erzielt. Auffällig war die Wirkungslosigkeit in Schaf Nr. 1, welches zuvor analog zu Schaf Nr. 3 eine gute Reaktion auf die Behandlung mit Clopidogrel zeigte. Bislang gibt es keinerlei Studien bezüglich der Wirkungsweise von Ticagrelor im Schaf, jedoch wurden

in der Humanmedizin gute Ergebnisse erzielt. Die Therapieumstellung von Clopidogrel auf Ticagrelor in Patienten mit nur mangelhaftem Ansprechen auf Clopidogrel wird als effektive und sichere Option beschrieben (AZMOON & ANGIOLILLO, 2012).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen dennoch Zweifel daran aufkommen, dass diese Empfehlung auch auf Schafe anzuwenden ist. Der unzureichende Effekt von Ticagrelor auf Schafthrombozyten führt zu der Vermutung, dass das zugrundeliegende Problem der Unwirksamkeit von Clopidogrel nicht in der mangelhaften Funktion des Cytochrom P450 Systems liegt. Vielmehr scheinen die Gründe für die insuffiziente Wirkung der ADP-Rezeptorantagonisten, aufgrund des analogen Wirkmechanismus und einer ähnlichen Reaktion der Schafe, einen gemeinsamen Ursprung zu haben. Verantwortlich für die geringere Hemmung der Plättchenaggregation im Vergleich zu Clopidogrel könnte die nur reversible Bindung von Ticagrelor und eine damit verbundene raschere Abtrennung vom P2Y<sub>12</sub> Rezeptor sein (Schaf Nr. 3, Tag 7: höchste Dosierung Clopidogrel [375 mg], ADP-FA: 24 % versus höchste Dosierung Ticagrelor [540 mg]: ADP-FA: 55 %). Seine plasmakonzentrationsabhängige Hemmung der Thrombozytenaggregation (HUSTED & VAN GIEZEN, 2009) führt zu der Annahme, dass eine eventuell beschleunigte Clearance von Ticagrelor im Schaf die mangelhafte Wirkung bedingt. In weiterführenden Studien mit einer größeren Tiergruppe könnten die in der relativ kleinen Versuchsgruppe von n = 5 gewonnenen Erkenntnisse bezüglich Ticagrelor überprüft werden. Aufgrund der erwähnten plasmakonzentrationsabhängigen Wirkung könnte eine weitere Dosissteigerung zu besseren Resultaten führen, jedoch gilt zu bedenken, dass die in der vorliegenden Arbeit höchste applizierte Dosis ein Sechsfaches der humanen entspricht und mit einer weiteren Dosiserhöhung auch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Nebenwirkungen zunehmend ansteigt.

### **5.1.3 Antikoagulation mit Enoxaparin-Natrium und Dabigatranetexilat**

#### **Enoxaparin-Natrium: Effektivität und Notwendigkeit der altersabhängigen Dosisanpassung**

Aus der Reihe der Antikoagulanzen wurde die Effektivität des niedermolekularen Heparins (NMH) Enoxaparin-Natrium im Schaf evaluiert. Bislang ist kein Testverfahren zur Überprüfung der Anti-Faktor Xa (Anti-FXa) Aktivität im Schaf etabliert, aufgrund dessen wurden ein humanmedizinischer Test sowie laborinterne humane Zielwerte für eine prophylaktische (Anti-FXa Aktivität: 0,4–0,6 IU/ml) und therapeutische (Anti-FXa Aktivität: 0,6–1,0 IU/ml) Wirkung herangezogen. Bei Auswertung der Ergebnisse muss berücksichtigt werden, dass prinzipiell keine Sicherheit besteht, dass für Schafe dieselben Referenzwerte gelten. In vorliegender Studie wurden als Zielwerte Anti-FXa Aktivitäten

im therapeutischen Bereich gewählt, um die Verhinderung von thromboembolischen Verschlüssen nach einem mikrovaskulären Eingriff bestmöglich sicherzustellen.

Die Gabe von 1 mg/kg bid Enoxaparin-Natrium an Schafe resultierte in einer nur sehr geringen Anti-FXa Aktivität unterhalb des prophylaktischen Bereiches. Mit 3 mg/kg bid konnten therapeutische Werte ab dem zweiten Messzeitpunkt (Tag 4) erreicht werden, die Gabe einer Aufsättigungsdosis (loading dose) kann demzufolge als gute Möglichkeit angesehen werden, bereits am ersten Tag eine ausreichende Wirkung zu erzielen. Zwischen Tag 4 und 7 konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, was auf die Ausbildung eines Steady States hinweist. Aufgrund einer geringen interindividuellen Variabilität wurde exemplarisch ein 24-Stunden-Messprofil von 2 Schafen angefertigt. Dem Messergebnis war eine nur sehr geringe Anti-FXa Aktivität nach 24 Stunden zu entnehmen, wodurch die Notwendigkeit der zweimal täglichen Applikation alle 12 Stunden verdeutlicht wird.

Es sind wenige Studien über die Wirkung von Enoxaparin-Natrium im Schaf bekannt, insgesamt ist allerdings anzunehmen, dass sich dieses Antikoagulans zur Verhinderung der Thrombenbildung bzw. der Intimahyperplasie im Schaf eignet (MATTHIASSEN et al., 1995; TAYLOR et al., 1996; AO et al., 1999). Bislang bleibt die optimale Dosierung für eine verlässliche antikoagulatorische Wirkung jedoch unklar. Das Hauptaugenmerk vieler Untersuchungen liegt auf der Intimahyperplasie (TAYLOR et al., 1996; AO et al., 1999; FLETCHER et al., 2004), zudem fehlen teilweise genaue Angaben der Anti-FXa Aktivitäten (FLETCHER et al., 2004). Bedingt durch Variationen bezüglich des Versuchsaufbaus sowie der Versuchsbedingungen in den einzelnen Studien wird ein Vergleich erschwert, so wurden z. B. neben der subkutanen auch die intravenöse Applikation angewendet (MATTHIASSEN et al., 1995). Daneben können unterschiedliche Anti-FXa Assays, Messzeitpunkte und ein unterschiedliches Gewicht der Schafe die Ergebnisse signifikant beeinflussen. Insgesamt lässt sich aus den Studien schließen, dass eine vermutlich ausreichende Wirkung von Enoxaparin-Natrium mittels Applikation in einer Dosierung, die zwischen 1 mg/kg und 5 mg/kg einmal täglich liegt, erzielt werden kann. Ao et al. untersuchten in Schafen die Wirkung von NMH auf die Intimahyperplasie. Die Gaben von 1 mg/kg bzw. 2 mg/kg führten zu keinen signifikant unterschiedlichen Auswirkungen auf die Intimahyperplasie. Aufgrund einer anzunehmenden Risikosteigerung von potenziellen Nebenwirkungen mit Erhöhung der Dosis wurde 1 mg/kg einmal täglich als ausreichende Dosierung festgelegt (AO et al., 1999). In vorliegender Studie wurden auch bei einer Dosierung von 3 mg/kg bid keine Blutungskomplikationen beobachtet. Die Gabe dieser Dosis erscheint demzufolge, bei erhöhter Wahrscheinlichkeit der Verhinderung von thromboembolischen Ereignissen und einem gleichzeitig geringen Risiko von Nebenwirkungen, eine verlässliche Möglichkeit auch in kleinkalibrigen Gefäßen die Bildung von Thromben zu verhindern. Die Notwendigkeit der zweimal täglichen Applikation ergab sich aus dem oben erwähnten

24-Stunden-Messprofil und entspricht dem klinisch etablierten Vorgehen beim Menschen, falls eine therapeutische Antikoagulation angestrebt wird (FACHINFORMATION CLEXANE® MULTIDOSE 100 MG/ML, 2010).

Die im Vergleich zum Menschen (1 mg/kg bid (FACHINFORMATION CLEXANE® MULTIDOSE 100 MG/ML, 2010)) notwendige höhere Dosierung von Enoxaparin-Natrium im Schaf (3 mg/kg bid), um eine humane therapeutische Anti-FXa Aktivität zu erreichen, ist nicht vollständig zu klären. In der Literatur sind vergleichbare AT III Werte sowie eine niedrigere FX Aktivität im Schaf angegeben (HOEHLE, 2000). Diesbezüglich kann nicht gefolgert werden, dass Schafe eine höhere Dosis Enoxaparin-Natrium als Menschen benötigen. Vielmehr könnten ein rascheres An- und Abfluten bzw. eine höhere Clearance des Antikoagulans ausschlaggebend sein. Gestützt wird diese Aussage durch die Ergebnisse des 24-Stunden-Messprofils, hier wurden im Schaf bereits nach 2 Stunden Plasmaspitzenpiegel erreicht, demgegenüber werden beim Menschen erst 3–5 Stunden nach Einnahme die höchsten Anti-FXa Aktivitäten festgestellt (FACHINFORMATION CLEXANE® MULTIDOSE 100 MG/ML, 2010). Möglich wäre auch eine schwächere Bindung zwischen Enoxaparin-Natrium und ovinem AT III, so dass keine optimale Hemmung von FXa erzielt werden kann. Erneut muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass bislang unklar bleibt, ob Schafe für einen therapeutischen Effekt dieselbe Anti-FXa Aktivität benötigen wie für den Menschen angegeben. Dafür bedarf es Untersuchungen in Versuchsmodellen mit höheren Tierzahlen als in vorliegender Studie, in denen eine optimale Antikoagulation erforderlich ist (vergleichbar zum AV-loop Modell).

Bislang gibt es keine Studien, die die Effektivität von NMH in Schafen unterschiedlicher Altersklassen evaluieren, obwohl in der Humanmedizin eine uneinheitliche Wirkung von NMH in Erwachsenen und Kindern bekannt ist (BAUMAN et al., 2009). In vorliegender Studie stellte sich heraus, dass die für Schafe evaluierte optimale Enoxaparin-Natrium Dosierung (3 mg/kg bid) für das Erreichen einer therapeutischen Anti-FXa Aktivität nicht auf Lämmer übertragbar ist. Die Behandlung mit derselben Dosis resultierte in Werten, die zu den Messzeitpunkten Tag 4, 7 und 28 im prophylaktischen Anti-FXa Bereich lagen. Damit konnte zum einen eine altersabhängige Wirkung des Antikoagulans nachgewiesen werden. Zum anderen wurde weder eine Wirkungssteigerung noch eine Wirkungsabnahme über den Behandlungszeitraum von 28 Tagen festgestellt, so dass eine Akkumulation des Medikaments sowie eine Toleranzentwicklung nicht anzunehmen sind. Mit der Erhöhung auf 5 mg/kg bid konnten therapeutische Anti-FXa Aktivitäten erreicht werden, die denen der Schafen bei Applikation von 3 mg/kg bid entsprachen. Die Gründe für die geringere Wirkung von NMH in jüngeren Tieren oder Kindern sind nicht vollständig aufgeklärt. Möglich sind unterschiedliche Verteilungsvolumina von Neugeborenen und Kindern, die zu einer altersabhängigen Clearance von NMH führen (NOHE & KURNIK, 2001).



Ergänzend zu einem erhöhten Verteilungsvolumen und einer gesteigerte Clearance in Kindern wird die niedrigere Antithrombinkonzentration als Ursache diskutiert (BAUMAN et al., 2009). Einige Autoren zweifeln jedoch daran, dass die unterschiedlichen Antithrombinkonzentrationen einen abhängigen Faktor darstellen (ANDREW et al., 1989; IGNJATOVIC et al., 2010). Vielmehr scheinen eine kompetitive Bindung an das Endothel wie auch eine andere Resorptions- und Clearancerate in jungen Patienten eine Rolle zu spielen. Weiterhin könnte es auch zu einer altersabhängig unterschiedlichen Bindung an Plasmaproteine kommen (IGNJATOVIC et al., 2010).

### **Dabigatranetexilat: verzögerter Wirkungseintritt und interindividuell variable Ansprechbarkeit**

Dabigatranetexilat gehört zu den sogenannten neuen oralen Antikoagulanzen, die sich aufgrund ihrer Sicherheit durch eine festgelegte Dosierung ohne notwendige Laborkontrolle sowie Dosisanpassung auszeichnen (SCHELLONG & HAAS, 2012). In der Humanmedizin wird es beispielsweise zur Prävention von Schlaganfällen und systemischen Embolien bei Patienten mit nicht valvulärem Vorhofflimmern mit Risikofaktoren in einer Dosierung von 150 mg bid eingesetzt (FACHINFORMATION PRADAXA® 150 MG HARTKAPSELN, 2012).

Dabigatranetexilat wurde in vorliegender Studie aufgrund eines Pilotexperiments, in dem sich geringere Dosierungen als ineffizient herausgestellt hatten, in einer im Vergleich zum Menschen vierfach höheren Dosierung (600 mg bid = 8,57–10,0 mg/kg) appliziert. Trotz dieser hochkonzentrierten Gabe konnte nur in 2 von 5 Schafen eine dem humanen Bereich ähnliche Dabigatrankonzentration gemessen werden. Möglicherweise bedarf es einer höheren Dosierung. In anderen Tierexperimenten wurden im Schwein (SCHOMBURG et al., 2012) und im Kaninchen (WIENEN et al., 2007b) bis zu 20 mg/kg bid eingesetzt, jedoch war die Gabe z. T. mit Blutungskomplikationen verbunden (SCHOMBURG et al., 2012). Allgemein ist bekannt, dass hohe Dosen in Tieren gut vertragen werden (EISERT et al., 2010), dennoch wurde in dieser Studie die Dosierung aufgrund der Wirksamkeit in 2 von 5 Schafen und des angesprochenen zunehmenden Blutungsrisikos nicht weiter erhöht.

Es kann angenommen werden, dass die Gründe für die relativ schwache Wirksamkeit in einer verminderten Resorption des Wirkstoffes liegen. Für eine erfolgreiche Resorption bedarf es eines sauren Milieus. Um die Wirkungsvariabilität zu verringern, wurde der Wirkstoff in Kapseln aus Weinsäure eingebracht, die zur Ausbildung eines lokalen sauren Milieus beitragen und eine erfolgreiche Aufnahme des Medikaments garantieren sollen (HANKEY & EIKELBOOM, 2011). Im Schaf kann die Kapsel bereits in den Vormägen oder infolge eines Wiederkauzyklus beschädigt werden, so dass es nachfolgend zu einer Einschränkung der Resorption kommen kann.

Auch das verspätete Einsetzen der Wirkung (Maximalspiegel ca. 6 Stunden nach Gabe) sowie die hohen interindividuellen Unterschiede könnten im Vormagensystem der Schafe begründet sein. Die im Versuch stehenden Tiere werden mit Heu ad libitum gefüttert, so

dass von einem permanent gefüllten Pansen auszugehen ist, der möglicherweise eine Resorptionsverzögerung des Wirkstoffes bedingen könnte. Beim Menschen kommt es im Vergleich nach 0,5–2 Stunden zum Erreichen von Maximalspiegeln, bei Einnahme gemeinsam mit einer Mahlzeit verlängert sich diese Zeitspanne jedoch auf ca. 4 Stunden (STANGIER et al., 2005). Die Beobachtung des verzögerten Einsetzens des Medikamenteneffektes wurde bereits in der Clopidogrel und Ticagrelor Gruppe gemacht, in denen eine Wirkung erst am zweiten Messzeitpunkt (Tag 4) festgestellt wurde. Die zugrunde liegenden Ursachen sind höchstwahrscheinlich denen von Dabigatranetexilat vergleichbar.

Durch die hohe Variabilität sowie das verspätete Einsetzen der Wirkung von Dabigatranetexilat erscheint Enoxaparin-Natrium im direkten Vergleich das für den Einsatz im Schaf besser geeignete Antikoagulans zu sein. Wie jedoch schon für den Anti-FXa Test angemerkt, handelt es sich auch bei der Testmethode zur Evaluierung der Effektivität von direkten Thrombininhibitoren um ein humanmedizinisches Verfahren. Bislang ist nicht bekannt, ob Schafe dieselben Dabigatranplasmakonzentrationen wie Menschen für eine effektive Verhinderung von thromboembolischen Gefäßverschlüssen benötigen. Wie bereits für die anderen getesteten Medikamente angegeben, wäre die Durchführung einer Studie mit erhöhten Tierzahlen auch bezüglich Dabigatranetexilat interessant, um interindividuelle Wirkungsunterschiede evaluieren und eine verlässlichere Aussage bezüglich einer optimalen Dosierung gewinnen zu können. Weiterhin würden sich für die Verifizierung der Wirkung dieses Antikoagulans Studien anbieten, in denen die Prophylaxe von thromboembolischen Gefäßverschlüssen *in vivo* getestet werden kann, wie z. B. im AV-loop Modell.

#### 5.1.4 Verifizierung der Ergebnisse im AV-loop Modell

Anlass der Versuche zur Gerinnungshemmung im Schaf war die Etablierung eines optimalen Therapieschemas für die Verhinderung von Gefäßverschlüssen im AV-loop Modell des Schafes. Aus der Reihe der getesteten Thrombozytenaggregationshemmer konnten mit Clopidogrel die besten Ergebnisse erzielt werden. Als Antikoagulans erwies sich Enoxaparin-Natrium als effektiv. Die Kombination dieser Medikamente kam in den folgenden AV-loop Versuchen, die an Lämmern durchgeführt wurden, zum Einsatz. Die Clopidogrelgabe wurde mit einer Aufsättigungsdosis (loading dose) von 300 mg begonnen und mit 150 mg bid über die Dauer des Versuches fortgeführt. Enoxaparin-Natrium wurde zur sicheren Verhinderung der Thrombenbildung in der hohen Dosierung von 5 mg/kg bid eingesetzt. Das Auftreten von geringen Nachblutungen am zweiten postoperativen Tag führte zu einer Umstellung des Dosierungsschemas von Enoxaparin-Natrium auf 5 mg/kg am ersten postoperativen Tag und einer Fortführung mit 3 mg/kg bid über die Dauer des Versuches. Die Blutungskomplikationen lassen sich durch die kombinierte Gabe von

einem Thrombozytenaggregationshemmer und einem Antikoagulans bei zeitgleichem Bestehen einer Operationswunde erklären. Die Anwendung des Therapieschemas in der AV-loop Versuchsgruppe (n = 6) führte zu einer 100%igen Durchgängigkeitsrate der Loop-Gefäße. Im Vergleich zu vorangegangenen Studien konnte durch die Optimierung der medikamentösen Prophylaxe von thromboembolischen Gefäßverschlüssen eine Verbesserung der Versuchsbedingungen geschaffen werden (BOOS et al., 2012).

Durch die Anwendung im AV-loop Modell wurden erste Erfahrungen bezüglich der Sicherheit sowie der Effektivität des erstellten Behandlungsprotokolls gemacht. Um die Verlässlichkeit des Therapieschemas zu überprüfen, sollten dennoch fortführende Untersuchungen mit einer höheren Fallzahl Gegenstand zukünftiger Studien sein. Abschließend ist anzumerken, dass diese Studie einen entscheidenden Beitrag zur Verbesserung der gerinnungshemmenden Therapie im Schaf leisten konnte. Trotz der begrenzten Tierzahl und Verwendung von z. T. nur in der Humanmedizin etablierten Testsystemen konnten erstmalig Hinweise auf die Wirkung verschiedener gerinnungshemmender Medikamente im Schaf gewonnen werden.

## 5.2 Knochen Tissue Engineering

Das Spektrum an therapeutischen Möglichkeiten zur Rekonstruktion von Knochendefekten in ausgedehnten Dimensionen hat in der Vergangenheit deutlich an Umfang gewonnen. War bis vor wenigen Jahrzehnten die Amputation (KEATING et al., 2005) oft die einzige Therapieoption bei Vorliegen großer Defekte und ungünstigen lokalen Verhältnissen, so wurden in der Vergangenheit eine Vielzahl von Optimierungsstrategien entwickelt, die von nicht-vaskularisierten (AGRAWAL et al., 2010) sowie vaskularisierten (PEDERSON & PERSON, 2007) autologen über allogene sowie xenogene Transplantationen bis hin zu synthetischen Knochenersatzstoffen und verschiedenen Tissue Engineering Konzepten reichen (CALORI et al., 2011; DIMITRIOU et al., 2011). Mit der Wahl eines geeigneten Knochensubstitutes, oft in Kombination mit Zell- oder Wachstumsfaktorzusätzen, werden die Grundvoraussetzungen für ein erfolgreiches klinisches Resultat geschaffen. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde der vollsynthetische primär stabile NanoBone<sup>®</sup> Block hinsichtlich seiner Eignung als Knochenersatzmaterial evaluiert. Um die spätere Übertragbarkeit der Ergebnisse und damit eine optimale Vorbereitung auf die klinische Anwendbarkeit zu gewährleisten, wurde diese Studie in klinisch relevanter Dimension im Großtiermodell Schaf durchgeführt. Im extrinsischen Vaskularisationsmodell (subkutane Versuche) wurde NanoBone<sup>®</sup> in Kombination mit unterschiedlichen Zell- und/oder Wachstumsfaktorzusätzen (rhBMP-2) bewertet und nachfolgend für das elementare Ziel, die Generierung von axial vaskularisiertem Knochengewebe, seine Vaskularisierbarkeit im intrinsischen Vaskularisationsmodell (AV-loop Versuche) überprüft. In letzterem

Versuchsmodell flossen wiederum die im Abschnitt 4.1 (Etablierung einer optimalen Gerinnungshemmung im Schaf) dargestellten Ergebnisse ein.

### 5.2.1 Verhalten implantierter NanoBone<sup>®</sup> Blöcke

NanoBone<sup>®</sup> erwies sich als biokompatibles und biodegradierbares Material, in welchem nach einer Implantationszeitspanne von 12 Wochen (subkutane Versuche) bzw. 18 Wochen (AV-loop Versuche) eine zunehmende Umstrukturierung von einer anorganischen in eine organische Matrix beobachtet werden konnte (Matrixwechsel). Diese positiven Eigenschaften werden u. a., wie in den folgenden Abschnitten erläutert, auf die Zusammensetzung des Knochenersatzmaterials aus 76 % Hydroxylapatit (HA) und 24 % Kieselgel sowie auf den innovativen Herstellungsprozess und die dadurch bedingte Nanostruktur zurückgeführt.

#### 5.2.1.1 NanoBone<sup>®</sup> – ein biokompatibles Knochenersatzmaterial

In der histologischen Analyse der Explantate konnten in keinem Schaf Anzeichen einer Fremdkörperreaktion auf das synthetische Knochenersatzmaterial festgestellt werden. Die gute Biokompatibilität, die durch die Abwesenheit von toxischen sowie teratogenen und karzinogenen Stoffen charakterisiert ist (KOLK et al., 2012), bestätigte sich ebenfalls in der histologischen Auswertung. Mittels einer TUNEL-Färbung konnten zwar vereinzelt apoptotische Zellen in allen Gruppen der subkutanen und AV-loop Konstrukte festgestellt werden, jedoch kam es in keiner Gruppe zu einer gehäuften Ansammlung von doppeltmarkierten (TUNEL-DAPI) Zellen, dreifachmarkierte (TUNEL-DiI-DAPI) Zellen wurden nicht detektiert. Es kann daher angenommen werden, dass NanoBone<sup>®</sup> sowohl auf die implantierten Zellen als auch auf von außen eingewachsene ortsständige Gewebestrukturen keinen toxischen Einfluss ausübt, da es im Falle einer Fremdkörperreaktion und einer damit verbundenen inflammatorischen Reaktion zu einem vermehrten Vorkommen von apoptotischen Zellen kommen würde (BARTSCH et al., 2012). Die sporadisch beobachteten apoptotischen Zellen können im Rahmen des Zellstoffwechsels als physiologisch betrachtet werden. Die optimale Gewebeverträglichkeit von NanoBone<sup>®</sup>, eine Grundanforderung an Knochenersatzmaterialien (HELM et al., 2001), wurde bereits *in vitro* (LIU et al., 2009) und *in vivo* (ABSHAGEN et al., 2009) sowie in der klinischen Anwendung demonstriert (BIENENGRABER et al., 2006). Abshagen et al. stellten eine zum spongiösem Knochen vergleichbare Biokompatibilität fest und führen diese auf den die kristalline Phase des natürlichen Knochens imitierenden HA-Gehalt zurück (ABSHAGEN et al., 2009).

### 5.2.1.2 Unterschiede in Resorption und Biodegradierbarkeit

#### Resorptionsverhalten der subkutanen Implantate

Ein wesentlicher Aspekt ist das Resorptionsverhalten von Implantaten. Idealerweise laufen Resorption des Knochenersatzes und Generierung von neuem Knochengewebe zeitgleich ab (KOLK et al., 2012). In vorliegender Studie konnten nach Explantation makroskopisch bereits deutliche Unterschiede in der Form und Größe der subkutanen Konstrukte erkannt werden. Für eine Spezifizierung wurden die Querschnittsflächen ausgemessen und in Bezug zu einem NanoBone<sup>®</sup> Block vor Implantation gesetzt. Abhängig von den implantierten Zusätzen wurden signifikante Unterschiede festgestellt. Die Messung der Querschnittsflächen aller explantierten Konstrukte ergab eine hochsignifikante Verringerung bezogen auf die Fläche vor der Implantation.

Zu einer maximalen Reduktion kam es in der Blut- ( $35,0 \pm 16,1 \%$ ) und Knochenmarkgruppe ( $31,9 \pm 13,2 \%$ ). Hintergrund des hochgradigen Schwundes im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen könnte die implantierte Zellfraktion sein. Die im Blut zu einem Anteil von ca. 2–6 % zirkulierenden Monozyten und die im Knochenmark gebildeten Promonozyten und Monozyten (SINOWATZ, 2000) können sich in Osteoklasten transformieren und den progressiven Abbau des Knochenersatzmaterials unmittelbar einleiten. Bei Betrachtung der Ergebnisse muss allerdings berücksichtigt werden, dass es sich bei diesen zwei Gruppen um vollständig vaskularisierte Explantate handelt und dadurch eine größere Fläche für den Abbau vorlag.

Die Erhaltung der im Blut vorhandenen Wachstumsfaktoren und Proteine bei gleichzeitiger Eliminierung der Zellen wurde durch die Gewinnung von Blutserum erreicht. Die erfolgreichen Ergebnisse der Kombinationsgruppe kultivierte MSC mit 60 µg/ml rhBMP-2 in Serum mit einer moderaten Resorptionsrate (Querschnittsfläche  $68,2 \pm 14,6 \%$ ) und einer vollständigen Vaskularisierung unterstreichen den Verdacht der möglichen erhöhten Resorptionsrate durch eine höhere Zahl an geweberesorbierenden Zellen im Blut und Knochenmark. Zusätzlich könnten die MSC und die durch sie sezernierten bioaktiven Faktoren (ZOMORODIAN & BAGHABAN ESLAMINEJAD, 2012) sowie der Wachstumsfaktor einen Einfluss auf die verringerte Resorptionsrate ausüben, indem sie zum Knochenaufbau beitragen und den Abbau regulieren.

Kirchhoff et al. implantierten blutgetränkte NanoBone<sup>®</sup> Blöcke mittels Schrauben auf die Unterkieferknochen von Minipigs und stellten nach 10 Wochen postoperativer Beobachtungsdauer eine deutliche Oberflächenresorption ohne Ersatz durch neugebildetes Gewebe fest. Die Autoren führen dies auf erhöhte Zugkräfte an den Rändern der Blöcke zurück, da das Gewebe um die Schrauben keiner Resorption unterlag (KIRCHHOFF et al., 2011). Im Gegensatz dazu wurde in einer Studie bezüglich der Sinusbodenelevation mit NanoBone<sup>®</sup> (implantiert in Kombination mit Blut) nach einem Jahr nur ein moderater durchschnittlicher Implantatschwund von 8,8 % festgestellt (EL HAGE et al., 2012). Der

in diesem Operationsfeld anzunehmende geringe Wirkungseinfluss von Zugkräften sowie die beschriebene niedrige Resorptionsrate von NanoBone<sup>®</sup> untermauern die Aussage von Kirchhoff et al. bezüglich der zugkräftebedingten Resorption von NanoBone<sup>®</sup>. Auch Xu et al. beobachteten eine Volumenabnahme der in das Fettgewebe von Ratten implantierten NanoBone<sup>®</sup> Granula, die sie auf eine mögliche Kontraktion durch eingewachsene Fibroblasten zurückführen (XU et al., 2009). Zusätzlich könnte die Kontaktlosigkeit der Implantate zu Knochengewebe sowie die Lage im gut vaskularisierten subkutanen Gewebe eine raschere Resorption bedingen als die Umgebung in einem Knochendefekt.

### **Osteoklastenaktivität in den subkutanen und AV-loop Versuchsgruppen**

Die histologische Auswertung bezüglich der Osteoklastenaktivität in den subkutanen Versuchsgruppen erfolgte nach standardisiertem Schema mittels TRAP-Färbung unter ausschließlicher Berücksichtigung der von Gewebe penetrierten NanoBone<sup>®</sup> Bereiche, um eine vom Ausmaß des vitalisierten Bereiches unabhängige Aussage zu erzielen. Alle ROIs (regions of interest) lagen somit im vitalisierten und vaskularisierten Randbereich der Konstrukte, so dass in diese Bereiche über von außen einsprossende Gefäße u. a. Zellen oder Wachstumsfaktoren eindringen konnten.

In allen Gruppen konnten unterschiedlich dicht besiedelte Stellen mit TRAP-positiven Zellen detektiert werden. Zwischen den Gruppen wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt, die Mittelwerte aller subkutanen Versuchsgruppen zusammengefasst ergab sich eine Osteoklastenzahl von  $0,6 \pm 0,3$  pro  $100 \mu\text{m}$  NanoBone<sup>®</sup> Rand. Die mit dem Block implantierten Zusätze hatten somit keine Auswirkungen auf die Rekrutierung von TRAP-positiven Zellen in die Randbereiche der Konstrukte.

Die Ergebnisse bezüglich der Osteoklastenaktivität bestätigen Angaben aus der Literatur. So konnten Xu et al. ebenfalls vor allem an den NanoBone<sup>®</sup> Rändern TRAP-positive, mehrkernige Riesenzellen beobachten. Die Autoren betonen jedoch, dass es weiterer Forschung bedarf, um zu evaluieren, ob das Vorkommen dieser Zellen ein Indikator für eine beginnende Knochenbildung ist oder als Anzeichen einer Entzündungsreaktion gewertet werden soll (XU et al., 2009). Die Koexistenz von TRAP-positiven Zellen sowie knochenbildenden Osteoblasten in den subkutanen sowie den AV-loop Konstrukten und die Abwesenheit von anderen Entzündungsindikatoren weisen dennoch vielmehr auf den Beginn eines Umbauprozesses der Blöcke als auf das Vorliegen einer Fremdkörperreaktion hin. Götz et al. erklären die gehäufte Ansammlung von TRAP-positiven Zellen an der NanoBone<sup>®</sup> Oberfläche durch das Vorhandensein von Osteocalcin und Osteopontin in der Matrix, die die Adhäsion und Differenzierung von Osteoklasten positiv beeinflussen (GÖTZ et al., 2008). Weiterhin kann die nanostrukturierte Oberflächentopographie zu einer Steigerung der Osteoklastenaktivität führen (WEBSTER et al., 2001). Auffällig war die relativ niedrige Osteoklastendichte sowie die hohe Standardabweichung in der Kombinationsgruppe mit MSC und  $60 \mu\text{g/ml}$  rhBMP-2 in Serum ( $0,4 \pm 0,3$  Osteoklasten

pro 100  $\mu\text{m}$  NanoBone<sup>®</sup> Rand). Diese Werte sind vermutlich auf das gehäufte Vorkommen von Knochenspangen im Gewebe zurückzuführen, die angrenzend an die NanoBone<sup>®</sup> Partikel lokalisiert werden konnten. Die sonst mit Osteoklasten besiedelten NanoBone<sup>®</sup> Strukturen waren überwiegend mit knochenbildenden Zellen sowie Knochenvorstufen und Knochengewebe bedeckt. Die Entstehung dieser Art von osteoblastischen und osteoklastischen Kompartimenten um die NanoBone<sup>®</sup> Strukturen in einem fortgeschrittenen Stadium des Umbaus ist in der Literatur bereits beschrieben (GOTZ et al., 2008).

Nicht für alle Knochenersatzmaterialien ist eine hohe Aktivität von Osteoklasten, wie in NanoBone<sup>®</sup> beobachtet, typisch. Der Abbau konventioneller gesinterter und damit weniger poröser Knochenersatzmaterialien, wie z. B. von  $\beta$ -Tricalciumphosphat ( $\beta$ -TCP) Keramiken, erfolgt oftmals sehr langsam und mitunter hauptsächlich durch chemische Prozesse, weniger durch osteoklastische Aktivitäten (ZERBO et al., 2005).

In der AV-loop Versuchsgruppe wurde die Osteoklastenzahl in arteriellen, venösen, peripheren und zentralen ROIs bestimmt. Nahezu alle Konstrukte waren vollständig mit Gewebe durchzogen, so dass auch hier, analog zu den subkutanen Versuchsgruppen, eine vom Ausmaß des vitalisierten Bereiches weitestgehend unabhängige Aussage erzielt werden konnte. Zwischen den einzelnen ROIs konnten keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl der Osteoklasten festgestellt werden. Daraus kann gefolgert werden, dass kein Zusammenhang zwischen der Lokalisation im Konstrukt und der Osteoklastenaktivität besteht. Jedoch war in einigen Arealen ein gehäuftes Vorkommen von TRAP-positiven Zellen auffällig. Wie bereits für die subkutanen Versuchsgruppen geschildert, wird auch hier eine Abhängigkeit zwischen neugebildeten Knochenspangen und Vorkommen der Osteoklasten vermutet. Einige Bereiche der AV-loops waren mit nicht homogen über das Präparat verteilten Knochenspangen bedeckt, in denen folglich eine geringe Dichte von Osteoklasten beobachtet wurde. Dadurch kam es zur Entwicklung von osteoklastischen und osteoblastischen Kompartimenten, deren Verteilungsschema keinen Bezug zu den gewählten ROIs erkennen ließ.

### **Biodegradierbarkeit in den subkutanen und AV-loop Versuchsgruppen**

Um die Biodegradierbarkeit des HA-Anteils von NanoBone<sup>®</sup> zu evaluieren, wurde der in den Konstrukten noch nicht abgebaute NanoBone<sup>®</sup> Anteil ausgemessen und in Bezug zur Gesamtfläche gesetzt. Aufgrund der besseren Interpretierbarkeit wurde ein Referenzwert erstellt, indem in einem NanoBone<sup>®</sup> Block vor Implantation (NanoBone<sup>®</sup> nativ) die Fläche des Knochenersatzmaterials sowie der Poren bestimmt wurde. Dadurch konnte die Degradierungsrate in den einzelnen Versuchsgruppen bestimmt werden. Vergleichbar den nicht signifikanten Unterschieden in der Osteoklastenaktivität zwischen den Versuchsgruppen wurden auch bezüglich der Degradierungsrate keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Die Degradierungsrate von insgesamt  $44,2 \pm 13,3 \%$  kann diesen

Ergebnissen zufolge als unabhängig von den zugegebenen Zellen bzw. Wachstumsfaktoren betrachtet werden. Der höchste Wert (54,7 %) wurde in der Kombinationsgruppe mit MSC und 60 µg/ml rhBMP-2 in Serum gemessen. Aufgrund der nicht signifikanten Unterschiede kann jedoch nur vermutet werden, dass die bereits erwähnten Proteine und Wachstumsfaktoren im Serum für eine raschere Degradierungsrate förderlich sein könnten. Analog zu diesen nicht signifikanten Unterschieden konnten auch hinsichtlich der NanoBone<sup>®</sup> Fläche sowie der Bindegewebe-/Porenfläche keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen subkutanen Versuchsgruppen festgestellt werden. Das Verhältnis von NanoBone<sup>®</sup> Fläche zur Bindegewebe-/Porenfläche drehte sich nach Implantation (NanoBone<sup>®</sup> Fläche: 35,8 ± 8,5 %, Bindegewebe/Poren: 62,1 ± 8,4 %) im Vergleich zu den Flächen vor Implantation (NanoBone<sup>®</sup> Fläche: 64,1 ± 0,6 %, Poren: 35,9 ± 0,6 %) nahezu exakt um. Es konnte eine hochsignifikante Abnahme der NanoBone<sup>®</sup> Fläche nach einer 12wöchigen Implantationsdauer nachgewiesen werden. Weiterhin wurde im Vergleich zum Referenzwert eine hochsignifikante Zunahme der Bindegewebe-/Porenfläche beobachtet. Aufgrund der auszuschließenden Zunahme der Porenfläche ist dieser Zuwachs auf die Degradierung und Ersatz der NanoBone<sup>®</sup> Partikel durch Einwachsen von Gewebestrukturen in die Poren zurückzuführen. Für eine exaktere Quantifizierung könnten Bindegewebsanteil und noch freie Porenfläche in den Explantaten bestimmt werden. In dieser Auswertung wurde jedoch das Hauptaugenmerk auf die Degradierungsrate der NanoBone<sup>®</sup> Fläche gelegt. Die von Gewebe durchwachsene bzw. vitalisierte Fläche wurde in einer separaten Auswertung (5.2.3 Vaskularisierung von NanoBone<sup>®</sup> Block) bestimmt.

Analog zu den subkutanen Versuchsgruppen wurden nach demselben Schema in den AV-loop Konstrukten die Degradierungsraten sowie die Gewebezusammensetzung der Loop Anteile 1–3 ermittelt. Die nicht signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Loop Anteilen deuten auf gleichmäßige über das Konstrukt verteilte Um- und Abbauvorgänge hin. Insgesamt wurde eine NanoBone<sup>®</sup> Fläche von 46,1 ± 6,4 % degradiert. Vergleichbar zu der Auswertung in den subkutanen Versuchsgruppen kam es auch hier zu einer hochsignifikanten Abnahme der Knochenersatzmaterialfläche und zu einer hochsignifikanten Zunahme des Anteils an der Bindegewebe-/Porenfläche.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl nach einer Implantationsdauer von 12 Wochen im subkutanen als auch von 18 Wochen im AV-loop Modell knapp die Hälfte des Knochenersatzstoffes degradiert wurde. In der Literatur ist eine Reihe von Studien beschrieben, die von einem raschen und nahezu vollständigen NanoBone<sup>®</sup> Abbau berichten, der möglicherweise durch den hohen Porositätsgrad sowie die lockere HA-Struktur bedingt sein kann (RUMPEL et al., 2006). Nach einer Implantationsdauer von 8 Monaten in einem Knochendefekt kritischer Größe im Minipig konnte eine annähernd vollständige Degradierung von NanoBone<sup>®</sup> beobachtet werden (GERIKE et al., 2006). Es wird auf das Vorkommen von interkonnektierenden Poren unterschiedlicher Dimensionen



hingewiesen, die das Resorptionsverhalten unterstützen (Porosität 61 % (GERBER, 2006)). Poren im Nanometerbereich (2–10 nm) begünstigen das Eindringen und die Anhaftung von Blut- sowie Serumproteinen, wie z. B. auch Wachstumsfaktoren, die dem Knochenersatzstoff knochenbildungsfördernde Eigenschaften verleihen. Mikrometerporen (5–100 µm) gewährleisten die Migration von Osteoblasten sowie Bindegewebsfasern während Makroporen (0,1–1 mm) das Eindringen von Gefäßstrukturen ermöglichen (HENKEL et al., 2006). Die günstige Abbaukinetik führte zu der Bezeichnung als Knochenaufbaumaterial, das im Gegensatz zu konventionellen Knochenersatzstoffen nicht mehr die Gefahr von nicht-resorbierbaren Residuen und nachfolgender Inflammation birgt (BIENENGRABER et al., 2006). Biopsien von humanen Proben im Rahmen einer Sinusbodenelevation mit NanoBone<sup>®</sup> ergaben vergleichbar zu unseren Ergebnissen nach 2–3monatiger Implantationsdauer eine 50%ige Degradierung des Knochensubstitutes. Nach 9 Monaten ist mit einer vollständigen Resorption von NanoBone<sup>®</sup> zu rechnen (MEIER et al., 2008). Auch Liu et al. beschäftigen sich in einer Vergleichsstudie von einem xenogenen Transplantat (BioOss<sup>®</sup>) und NanoBone<sup>®</sup> mit der Degradierungsrate und empfehlen den Einsatz von NanoBone<sup>®</sup> in Defekten, in denen eine vollständige Resorption erzielt werden soll, während BioOss<sup>®</sup> als Substitut für Defekte geeignet erscheint, in denen nach Augmentation die rasche Resorption verhindert werden soll. Im Tibiadefekt des Schafes blieb der NanoBone<sup>®</sup> Anteil zwischen 12 und 26 Wochen annähernd konstant bei ca. 35 % der Gesamtfläche (HARMS et al., 2012). Interessanterweise wurde in vorliegender Arbeit ein vergleichbarer Wert sowohl in den subkutanen Gruppen (12 Wochen) als auch in der AV-loop (18 Wochen) Gruppe erreicht. Laut den Autoren führte die rasche Osseointegration des nanokristallinen HAs zu einer Verhinderung des Abbaus. Aufgrund der unwahrscheinlichen Degradierung nach der Implantationszeitspanne von insgesamt 26 Wochen, dem engen Verband zwischen NanoBone<sup>®</sup> und Knochen sowie keinerlei Anzeichen auf eine Fremdkörperreaktion, erscheint der Einsatz von NanoBone<sup>®</sup> als Knochenaufbaumaterial sinnvoll (HARMS et al., 2012).

Somit ist unklar, ob letztendlich eine vollständige Resorption der NanoBone<sup>®</sup> Partikel erreicht werden kann. Dies könnte im Rahmen von weiterführenden Langzeitversuchen untersucht werden. In zukünftigen Studien könnte der im AV-loop prävascularisierte NanoBone<sup>®</sup> Block in einen Knochendefekt transplantiert werden und u. a. das Resorptionsverhalten nach einer mehrmonatigen postoperativen Implantationsdauer evaluiert werden. Weiterhin wäre es möglich, Auswirkungen auf die Biomechanik durch nicht degradierte NanoBone<sup>®</sup> Anteile oder mögliche Spätfolgen im Sinne von Fremdkörperreaktionen anhand dieser Studien festzustellen.

### 5.2.1.3 Erfolgreicher Matrixwechsel

Kennzeichnend für den Degradierungsprozess ist der für NanoBone<sup>®</sup> charakteristische frühe Matrixwechsel, in der das anorganische Kieselgel (Siliziumdioxid) einen Umbau zu einer unstrukturierten organischen Matrix erfährt (GERBER, 2006). In vorliegender Studie wurde dieser Prozess exemplarisch an einer Reihe von Gewebeschnitten histologisch mit der Perjodsäure Schiff- (periodic acid Schiff, PAS) Färbung sowie mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) und energiedispersiver Röntgenspektroskopie (energy dispersive x-ray, EDX) verfolgt. Die PAS-Färbung erlaubt die Detektion von organischen Bestandteilen wie z. B. von Mukopolysacchariden oder Glykoproteinen.

Der Nachweis des Matrixwechsels gelang in allen Konstruktbereichen, die von Gewebe durchwachsen waren, im Gegensatz dazu lag in nicht vitalisierten Arealen die ursprüngliche anorganische Matrix vor. Wie in anderen Publikationen beschrieben, war der Matrixwechsel von NanoBone<sup>®</sup> vornehmlich an der Oberfläche des Knochenersatzmaterials zu beobachten (GERBER, 2006). Die EDX-Spektren, über die von der emittierten Röntgenstrahlung einer Probe auf die Elementarzusammensetzung geschlossen werden kann, bestätigen die Ergebnisse der histologischen Analyse. In den gewebedurchwachsenen Bereichen der subkutanen und AV-loop Konstrukte wurden regelmäßig sehr niedrige Silizium- und Sauerstoff- sowie hohe Kohlenstoffkonzentrationen gemessen, zu einem gegenteiligen Ergebnis führten die Erhebungen in nicht durchwachsenen Arealen, die bei den subkutanen Gruppen vornehmlich zentral zu finden waren. Die hohe Kohlenstoffkonzentration kann als Indikator für das Vorliegen von organischen Strukturen gewertet werden und liefert damit einen Hinweis auf das Eindringen von körpereigenen Proteinen, Zellen und Gewebestrukturen in das Knochenersatzmaterial. Nach Kontakt der Matrix mit Proteinen aus dem Blut kommt es bereits nach wenigen Tagen bis Wochen (GERBER, 2006) zu einem raschen Absinken der Kieselgelkonzentration. Damit ist auch eine Abnahme des Sauerstoffanteils in NanoBone<sup>®</sup> verbunden, da Kieselgel bzw. Siliziumdioxid sowohl aus Silizium als auch Sauerstoff aufgebaut ist. Der Prozess des Abbaus ist bislang ungeklärt, jedoch wird, bedingt durch die geringe Löslichkeit von Silizium unter physiologischen Bedingungen, die Möglichkeit einer enzymatischen Reaktion angeführt (XU et al., 2009). Gerber et al. stellten fest, dass der Umbau des Kieselgels zu einer organischen Matrix die Grundvoraussetzung für den Abbau durch Osteoklasten darstellt. Die ursprünglich hochporöse Kieselgelmatrix würde eine Diffusion der von den Osteoklasten sezernierten Protonen zur Folge haben und dadurch dem Aufbau des für die osteoklastischen Aktivitäten benötigten sauren Milieus entgegenwirken. Erst die Ausbildung der organischen Matrix, die zudem durch ihre geringe mechanische Festigkeit die osteoklastische Aktivität fördert, leitet den effektiven Abbau von NanoBone<sup>®</sup> ein (GERBER, 2006).

Aufgrund der exemplarischen Untersuchung mehrerer Gewebeschnitte aus allen Versuchsgruppen kann vermutet werden, dass die jeweiligen unterschiedlichen Zell- bzw.

Wachstumsfaktorzusätze zu den Implantaten keinen Einfluss auf den Matrixwechsel in den gewebedurchwachsenen Bereichen ausüben. Das bedeutet, dass in den Bereichen des Blockes, die mit Bindegewebe durchzogen sind, automatisch und unabhängig von den Implantationszusätzen ein Matrixwechsel induziert wird. Die Quantität der Umstrukturierung ist jedoch durch das Ausmaß des Gewebewachstums bestimmt, das sich zwischen den Gruppen, wie weiter unten beschrieben (5.2.3 Vaskularisierung von NanoBone<sup>®</sup> Block), unterscheidet.

Zusammenfassend hat sich NanoBone<sup>®</sup> als ein biokompatibles und biodegradierbares Knochenaufbaumaterial im subkutanen sowie im AV-loop Modell des Schafes bewiesen. Unabhängig von den Zell- bzw. Wachstumsfaktorzusätzen konnten in den vaskularisierten Bereichen eine vergleichbare Osteoklastenaktivität und Umstrukturierung der Matrix (Matrixwechsel) beobachtet werden.

### 5.2.2 NanoBone<sup>®</sup> Block als Knochenaufbaumaterial

Grundlage eines erfolgreichen Tissue Engineering Ansatzes ist neben der Auswahl von geeigneten Knochenersatzmaterialien der Einsatz von Wachstumsfaktoren sowie osteogenen Zellen, die maßgeblich zur Generierung von Knochengewebe beitragen. Für die Evaluierung von optimal geeigneten Zusätzen wurden im ersten Teilabschnitt subkutane Implantationen mit NanoBone<sup>®</sup> Block in Kombination mit Knochenmark, Blut, 60 µg/ml rhBMP-2, kultivierten oder direkt reimplantierten MSC sowie als Kontrolle mit Fibrin vorgenommen. Nachfolgend wurde im zweiten Teilabschnitt die Kombination aus der besten Zellgruppe mit 60 µg/ml rhBMP-2 in Fibrin und autologem Serum im subkutanen Modell implantiert. Die Auswertung erfolgte mittels immunhistologischer und molekularbiologischer Methoden.

Das subkutane Modell eignet sich gut, um das grundlegende Verhalten der NanoBone<sup>®</sup> Blöcke mit Zell- sowie Wachstumsfaktorzusätzen hinsichtlich Biokompatibilität, Biodegradierbarkeit und Knochenbildung zu evaluieren. Im Vergleich zum AV-loop Modell zeichnet es sich durch seine einfache Durchführung sowie die geringere Anfälligkeit gegenüber Komplikationen aus. Von Bedeutung war weiterhin die Möglichkeit, in einem Schaf mehrere Blöcke zu implantieren und so eine Vielzahl an Implantatzusätzen austesten zu können.

Bezüglich der Knochenbildung waren hohe Standardabweichungen auffällig, die durch ausgeprägte interindividuelle Unterschiede entstanden. Aufgrund dessen wurde festgelegt, dass die Knochenbildung in der Fibrin-Gruppe innerhalb von jedem Schaf einen Basalwert darstellt und die Knochenbildung der anderen in diesem Schaf implantierten Versuchsgruppen auf diesen Wert zurückgerechnet werden. Trotz der Eliminierung des Einflussfaktors des schaf-spezifischen endogenen Knochenbildungspotenzials wurden

hohe Standardabweichungen festgestellt, deren Ursachen im Folgenden diskutiert werden. Hinsichtlich der prozentualen Knochenneubildungsrate (Knochenfläche/Gewebefläche) ergaben sich in der histologischen Auswertung zwischen den Gruppen im ersten Teilabschnitt (Blut, Knochenmark, direkt reimplantierte und kultivierte MSC, 60 µg/ml rhBMP-2) keine signifikanten Unterschiede. In allen Konstrukten waren Knochenvorstufen detektierbar. Neugebildetes Knochengewebe konnte ebenfalls in unterschiedlichem Ausmaß in vielen Konstrukten beobachtet werden. In der Immunhistologie wurde der Nachweis von knochenspezifischen Bestandteilen wie Kollagen Typ I und Alkalische Phosphatase erbracht.

Die molekularbiologische Untersuchung spiegelte die Ergebnisse der histologischen Knochenflächenauswertung wider. Es waren keine signifikanten Unterschiede messbar, jedoch konnte in nahezu allen Gruppen die Hochregulierung der getesteten Knochenmarker im Vergleich zur Fibrinkontrolle gezeigt werden. Dies kann als Hinweis auf die osteoinduktiven sowie osteokonduktiven Eigenschaften von NanoBone<sup>®</sup> gewertet werden, wie bereits in vorangegangenen Studien demonstriert (GOTZ et al., 2008). Auffällig waren die teilweise sehr hohen Standardabweichungen in der molekularbiologischen Analyse. Eine Erklärung besteht in der nicht homogenen Verteilung der neugebildeten Knochenstrukturen im Konstrukt. Es konnten einzelne Bereiche mit einem hohen Anteil, andere mit einem geringeren oder keinen Anteil an Knochengewebe gefunden werden. Für diese Untersuchungen wurde jeweils nur eine Gewebescheibe des Blockes verwendet, so dass in anderen Bereichen liegende Knochenstrukturen nicht erfasst werden konnten. Zur Optimierung könnten in folgenden Studien mehrere kleinere sowie auch zentrale Anteile der Konstrukte für die RNA-Isolation verwendet werden, um eine verlässlichere Aussage bezüglich der Genexpression im gezüchteten Knochenersatz zu erhalten.

#### **5.2.2.1 Optimale Zellpopulation: Überlegenheit der kultivierten mesenchymalen Stammzellen**

Bislang ist ungeklärt welche Zellpopulation sich für das Knochen Tissue Engineering am besten eignet. Zu erfüllende Voraussetzungen umfassen eine einfache Isolation sowie Expansion in Kombination mit einer hohen Proliferationsrate, nicht immunisierenden Eigenschaften, das Aufweisen von osteoblastenspezifischen Funktionen und die Kompatibilität mit dem zu implantierenden Knochenersatzstoff (SHANG et al., 2001).

#### **Blut**

Nach Herstellerangaben wurde der NanoBone<sup>®</sup> Block vor Implantation mit autologem venösem Blut getränkt. Wie bereits beschrieben, soll damit der Transfer löslicher autologer Proteine und Wachstumsfaktoren in das Knochensubstitut induziert werden (GOTZ et al., 2008). Neben der einfachen Durchführung der Blutentnahme lassen eine Vielzahl publizierter klinischer Studien (BIENENGRABER et al., 2006; GOTZ et al., 2008) sowie

*in vivo* Versuche in Tiermodellen (GERBER, 2006; RUMPEL et al., 2006; KIRCHHOFF et al., 2011; HARMS et al., 2012) diese Methode als optimal geeignet erscheinen. Bezüglich der Knochenbildungsrate in den subkutanen blutgetränkten Konstrukten waren hohe individuelle Unterschiede zwischen den Schafen erkennbar (neugebildete Knochenfläche  $2,5 \pm 3,2$  %). Ursächlich könnten individuelle Schwankungen der Protein- bzw. Wachstumsfaktorkonzentrationen im Blut in Frage kommen. Die zu anderen Studien (KIRCHHOFF et al., 2011; HARMS et al., 2012) vergleichsweise relativ niedrige Knochenbildungsrate in der Blut- sowie weiterhin in allen anderen Versuchsgruppen muss im Hinblick auf die Implantatlokalisierung evaluiert werden. Im vorliegenden Versuch handelt es sich um die Induktion einer ektopen, d. h. einer nicht am physiologischen Ort stattfindenden Knochenbildung, in den genannten Studien wurde NanoBone<sup>®</sup> jedoch direkt in Knochendefekte implantiert. Dietze et al. betonen, dass der Kontakt zu einer vitalen, gut durchbluteten Knochenfläche von grundlegender Relevanz für ein erfolgreiches Therapieresultat mit NanoBone<sup>®</sup> ist (DIETZE et al., 2006). Das bedeutet für die vorliegende Studie, dass mittels ausschließlichen Zusatzes von Blut vermutlich keine ausreichende Knochenbildung induzierbar ist, da es sich sowohl bei den subkutanen als auch den AV-loop Versuche um eine ektope Knochenbildung handelt. Die kombinierte Implantation von NanoBone<sup>®</sup> mit osteogenen Zellen und Wachstumsfaktoren scheint demzufolge eine wichtige Voraussetzung zu sein, um ein transplantierbares Knochenkonstrukt züchten zu können.

### **Knochenmark**

Die älteste und eine sehr unkomplizierte Methode stellt die Verwendung von autologem Knochenmark dar, dessen osteogenes Potenzial bereits vor 150 Jahren erkannt wurde (HERNIGOU & HOMMA, 2012). In der Knochenmarkgruppe konnte z. T. relativ viel neugebildetes Knochengewebe beobachtet werden, einzelne Schafe wiesen allerdings nur Knochenvorstufen auf (neugebildete Knochenfläche  $0,96 \pm 1,79$  %). Diese interindividuelle Variabilität lässt sich auf eine unterschiedlich hohe sowie sehr geringe Zahl an Knochenvorläuferzellen im Knochenmark zurückführen, die auch in der Humanmedizin die Verwendung von Knochenmark als Zellquelle in Frage stellt (MEYER et al., 2006). Mit der Aspiration ist eine durch das periphere Blut verursachte Verdünnung verbunden, so dass die Zellzahl bezogen auf autogene Spongiosa um den Faktor 20–40 abnimmt. Durch Reduktion des Entnahmevolumens auf 2 ml pro Punktionsstelle lässt sich der Einfluss der Verdünnung verringern, jedoch nicht vollständig eliminieren (HERNIGOU & HOMMA, 2012). Der erhebliche Vorteil der Verwendung von unfraktioniertem Knochenmark besteht in der relativ einfachen Gewinnung, die unmittelbar vor der Implantation des Knochenersatzstoffes in derselben Operation durchgeführt werden kann, da nachfolgende Isolierungs- oder Expansionsschritte entfallen. Die Zellen liegen bereits als Suspension vor, ein Medium zur Aufnahme der Zellen ist nicht erforderlich (HERNIGOU & HOMMA, 2012). Ein weiterer positiver Aspekt liegt in der Bereitstellung

von Endothelvorläuferzellen sowie von angiogenen Faktoren und Zytokinen, die eine rasche Vaskularisierung fördern können (TATEISHI-YUYAMA et al., 2002). Eine Möglichkeit die Zellfraktion im Knochenmarkspirat zu erhöhen, stellt die Verwendung von Knochenmarkkonzentrat dar, welches über Zentrifugationsschritte gewonnen werden kann, wie im folgenden Abschnitt „Mesenchymale Stammzellen“ beschrieben. Jedoch zeigen sich auch in der Verwendung von Konzentrat interindividuelle Unterschiede in der Zellzahl sowie im Knochenbildungspotenzial (ZHONG et al., 2012). Connolly et al. stellten in einer Vergleichsstudie bei Verwendung von konzentriertem im Gegensatz zu unfractioniertem Knochenmark eine höhere Knochenneubildungsrate fest (CONNOLLY et al., 1989). Trotz der einfachen Gewinnung von Knochenmark ist das Ergebnis bzw. der Erfolg der Implantation von hohen interindividuellen Unterschieden in der Zellzahl geprägt und dementsprechend als Zellquelle für die Implantation der NanoBone<sup>®</sup> Blöcke als nur bedingt geeignet zu bewerten.

### **Mesenchymale Stammzellen**

Als weitere Zellquelle in den subkutanen Versuchsgruppen dienten MSC, die in einer Vielzahl von Studien zu einer Optimierung der Knochenheilung beigetragen haben (KON et al., 2000; PETITE et al., 2000; SHANG et al., 2001). Der Einsatz von MSC reduziert sich nicht nur auf das Gebiet des Knochen Tissue Engineerings, sondern erstreckt sich auch auf andere Bereiche der Regenerativen Medizin, wie z. B. die Anwendung in Therapiestrategien bezüglich Leber-, Herz-, Nieren- oder Darmdefekten (OTTO & WRIGHT, 2011).

In vorliegender Studie wurden autologe MSC durch eine Dichtezentrifugation von 20 ml aspiriertem Knochenmark gewonnen und zum einen direkt reimplantiert (sogenanntes Knochenmarkkonzentrat), zum anderen expandiert und nachfolgend reimplantiert. Für die Implantation der direkt reimplantierten MSC wurden alle aus 20 ml Knochenmark isolierten Zellen verwendet. Im Gegensatz dazu erfolgte im Falle der expandierten MSC die Implantation von 6 Millionen Zellen. Hinsichtlich der Knochenneubildung in Kombination mit einem NanoBone<sup>®</sup> Block wurde in einem Vorversuch kein signifikanter Unterschied bei Implantation von 6 Millionen gegenüber der Implantation von 3 Millionen kultivierten MSC festgestellt. Kruyt et al. untersuchten die optimale Zelldichte von mit MSC besiedelten Scaffolds und erzielten mit 8 Millionen/cm<sup>3</sup> die besten Resultate. Die nächstgeringere bzw. -höhere Zelldichte betrug 800 000 bzw. 16 Millionen MSC pro cm<sup>3</sup> (KRUYT et al., 2008). Somit liegt die in der vorliegenden Studie verwendete Menge mit 4 Millionen/cm<sup>3</sup> in einem anzunehmenden idealen Bereich. Ob eine Erhöhung der Zellzahl mit einer verbesserten Knochenbildung einhergeht, bedarf jedoch einer weiteren Evaluierung.

Die Charakterisierung der direkt reimplantierten sowie expandierten MSC erfolgte bereits in vorausgegangenen Studien (BOOS et al., 2011). Expandierte MSC waren CD29+, CD44+ und CD166+, während direkt nach der Isolation neben der Expression von CD44

eine geringere von CD29 und CD166 sowie die zusätzliche Expression von CD45 festgestellt werden konnten. Somit war davon auszugehen, dass im frischen konzentrierten Knochenmark neben MSC noch weitere mononukleäre Zellen, wie z. B. hämatopoetische Stammzellen, vorhanden waren. Die Plastikadhärenz der MSC ermöglichte während der Expansionsphase die Trennung von MSC und nicht-adhärennten hämatopoetischen Stammzellen (BRUDER & CAPLAN, 2000).

Innerhalb des ersten Teilabschnittes kam es zwischen den beiden MSC-Versuchsgruppen zu keinen signifikant unterschiedlichen Knochenneubildungsraten, jedoch kann für die kultivierten (neugebildete Knochenfläche  $0,60 \pm 0,86 \%$ ) ein höheres osteogenes Potenzial vermutet werden als für die direkt reimplantierten (neugebildete Knochenfläche  $0,08 \pm 0,16 \%$ ) MSC. Die hohen Standardabweichungen in der Gruppe der direkt reimplantierten MSC kann erneut auf eine individuell unterschiedliche Zellzahl im Knochenmark der einzelnen Schafe zurückgeführt werden. Es wurden alle Zellen aus 20 ml Knochenmark implantiert, so dass die Implantation von unterschiedlich hohen Zellzahlen in den einzelnen Schafen nicht auszuschließen ist. Aufgrund der bereits berücksichtigten endogenen Knochenbildungsunterschiede in den einzelnen Schafen kann weiterhin vermutet werden, dass die Tränkung der NanoBone<sup>®</sup> Blöcke durch Aufpipettieren der relativ viskösen Fibrin-Zell-Matrix zu einer unterschiedlich effektiven Durchdringung der Blöcke geführt haben könnte. In Annahme nicht gleichmäßig verteilter Zellkonzentrationen im Block könnte es lokal zu einer unterschiedlich intensiven Knochenneubildung kommen. Obwohl die Verwendung von Fibrin als Trägermedium für MSC und somit zur Unterstützung der Knochenregeneration vor allem aufgrund positiver Einflüsse auf die Angiogenese durch proliferations- und migrationsfördernde Wirkungen von Lee et. al als geeignet beschrieben wird (LEE, 2008), bedarf es im subkutanen NanoBone<sup>®</sup> Modell einer Optimierung des Tränkungsmediums.

Um das Proliferationsverhalten der implantierten und zuvor DiI-gelabelten MSC zu analysieren, erfolgte die immunhistologische Detektion mittels des Proliferationsmarkers Ki67. In allen Versuchsgruppen konnte dieser in den gewebedurchwachsenen Bereichen in hoher Zahl beobachtet werden. In den Konstrukten mit kultivierten MSC konnten viele doppelt- (Ki67-DAPI) und zum Teil dreifachmarkierte (Ki67-DiI-DAPI) Zellen wahrgenommen werden, die auf eine Proliferation der Zellen im Knochenersatzstoff sowie der implantierten Zellen hinweisen. Im Gegensatz dazu war die Anzahl der DiI-gelabelten Zellen in den Gruppen mit direkt reimplantierten MSC sehr gering und Dreifachmarkierungen in reduzierter Anzahl vorhanden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass in der Gruppe der direkt reimplantierten MSC eine geringere Anzahl an Zellen vorhanden war, dementsprechend weniger implantiert wurden und nachfolgend im Explantat auch seltener gesehen werden konnten.

Auffällig war die Detektion einer großen Zahl von DiI Einfachmarkierungen im Zentrum der Konstrukte sowohl im Falle der kultivierten als auch der direkt reimplantierten MSC. Es ist anzunehmen, dass diese zentral liegenden MSC ihre Stoffwechselaktivitäten nur eine begrenzte Zeit durch Diffusion aufrechterhalten konnten und nachfolgend aufgrund von Nährstoffmangel oder Akkumulation von Stoffwechselendprodukten abgestorben sind.

Mittels TUNEL-Färbung waren diese Zellen nicht detektierbar, da in dieser Färbung nur die sich in Apoptose befindlichen Zellen angefärbt werden. Wie bereits beschrieben (5.2.1.1 NanoBone<sup>®</sup> – ein biokompatibles Knochenersatzmaterial), wurden in allen Konstrukten nur vereinzelt apoptotische Zellen detektiert. Dreifachmarkierte (TUNEL-DiI-DAPI) Zellen wurden nicht beobachtet, was auf ein äußerst geringes bzw. kein Absterben der kultivierten sowie der direkt reimplantierten MSC nach 12 Wochen schließen lässt. Einschränkend muss jedoch hinzugefügt werden, dass eine exakte Quantifizierung der nach Explantation detektierbaren Zellzahlen nicht durchgeführt wurde.

Adulte MSC werden nicht nur aufgrund ihres Differenzierungspotenzials in verschiedene gewebespezifische Zellen als attraktive Zellpopulation für das Knochen Tissue Engineering vorgeschlagen, sondern auch im Hinblick auf ihre positive Beeinflussung der endogenen Geweberegeneration durch Sekretion löslicher Faktoren sowie der Regulierung von Entzündungsreaktionen aufgrund immunsuppressiver und antiinflammatorischer Eigenschaften (PORADA & ALMEIDA-PORADA, 2010). Eine relativ einfache Isolierungsprozedur aus dem Knochenmark sowie die Vermeidung einer möglichen Krankheitsübertragung und das Ausbleiben einer immunogenen Abstoßungsreaktion im Falle autologer MSC sind weitere Faktoren, die zur Favorisierung ihrer Verwendung führen (DROSSE et al., 2008). Der Einsatz von konzentriertem Knochenmarkspirat bzw. direkt reimplantierten MSC hat den Vorteil der Vermeidung einer langen Expansionsphase und einer zusätzlichen Operation, jedoch bedarf es für die Reparatur großer Knochendefekte einer sehr hohen Zahl an MSC, die nur über mehrere Kulturpassagen erzielt werden kann.

Die Expansion erfolgt meist in Kulturmedien, die mit tierischen Seren supplementiert wurden und dadurch das Risiko der Übertragung von Zoonosen mit sich bringen (JONES & YANG, 2011). Eine optimale Alternative stellt der Ersatz mit autologem Serum dar, welches gegenwärtig als ideale Nährquelle und Stimulans für Zellkulturen gilt (MEYER et al., 2006). Trotz des weitverbreiteten Einsatzes von expandierten MSC muss bedacht werden, dass die Möglichkeit einer Entartung nach einer Vielzahl von Passagen gegeben ist und damit eine kanzerogene Wirkung nach häufigen Subkulturen nicht ausgeschlossen werden kann (EHNERT et al., 2009). In der aktuellen Literatur wird von einer indirekten Rolle der MSC durch Ausüben von tumormodulatorischen Effekten sowie von einer direkten Rolle durch die maligne Transformation der MSC selber ausgegangen. Es besteht Bedarf an der Durchführung von Langzeitstudien, an strengeren Kontrollen bzw.



Sicherheitsvorgaben aufgrund der möglichen Entartung nach vielen Passagen sowie an Forschungen bezüglich der Wirkungen von MSC in Krebspatienten (WONG, 2011). Die Expansion der MSC macht eine *in vitro* Differenzierung in z. B. osteogene Vorläuferzellen möglich, indem dem Kulturmedium Dexamethason, Ascorbinsäure und  $\beta$ -Glycerol-Phosphat zugesetzt wird (PORTER et al., 2009). Die durch Dexamethason induzierte osteoinduktive Differenzierung hat den Nebeneffekt der Abnahme der Zellproliferationsrate (MEYER et al., 2006). Der Großteil publizierter Studien zum Thema MSC-basierter Therapien von Knochendefekten verwendet in die osteogene Linie differenzierte MSC, obwohl bislang nicht eindeutig geklärt ist, ob damit eine Optimierung der Knochenbildung verbunden ist. Zudem bedeutet eine osteogene Differenzierung einen zusätzlichen Kosten- und Zeitaufwand. In der Literatur sind Studien zur Überlegenheit von osteogen differenzierten MSC (YE et al., 2012) zu finden als auch Studien, in denen keine Überlegenheit von differenzierten MSC festgestellt wurde und die Anwendung von undifferenzierten MSC empfohlen wird (NIEMEYER et al., 2006). Die Implantation von undifferenzierten humanen MSC in Kombination mit rhBMP-2 führte zu einem besseren Knochenbildungspotenzial als die Implantation von osteogen differenzierten MSC und beweist damit die *in vivo* Differenzierung durch exogen zugegebenes rhBMP-2 (KANG et al., 2008). Vor diesem Hintergrund sowie um das Selbsterneuerungspotenzial und die hohe Proliferationsrate der undifferenzierten MSC auszuschöpfen, wurden in der vorliegenden Studie undifferenzierte MSC verwendet. Eine mögliche Optimierung durch die Verwendung eines osteoinduktiven Wachstumsmediums in der Expansionsphase bedarf einer weiteren Untersuchung.

Ein neues Verfahren besteht in der Gewinnung von MSC aus Geweben, in denen sie in einer höheren Zahl vorkommen wie z. B. im Fettgewebe. Bislang gibt es noch keine endgültige Einigkeit über eine eventuell vorteilhafte Verwendung der aus dem Fettgewebe isolierten Stammzellen (adipose derived stem cells, ADSC) (DIMITRIOU et al., 2011). So wurde das osteogene Potenzial der ADSC verglichen zu MSC aus dem Knochenmark als geringer eingestuft (NIEMEYER et al., 2010). Eine andere Studie bezüglich MSC aus dem Knochenmark, Fettgewebe sowie aus der Nabelschnur kam zu dem Schluss, dass sich neben MSC aus dem Knochenmark auch ADSC für das Knochen Tissue Engineering eignen, während MSC aus dem Nabelschnur eine gute Alternative darstellen (WEN et al., 2012).

Neben der Verwendung von adulten MSC wurde in vielen Studien der Einsatz von embryonalen Stammzellen (emryonic stem cell, ESC) diskutiert. Im Gegensatz zu adulten, multipotenten MSC, die sich in eine Vielzahl mesenchymaler Gewebe differenzieren können, wie z. B. Knochen-, Knorpel-, Sehnen-, Muskel-, Mark-, Haut- oder Fettgewebe (BRUDER & CAPLAN, 2000), handelt es sich bei ESC um pluripotente Zellen, die sich in alle Zellen der drei Keimblätter differenzieren können (EHNERT et al.,

2009). Ihre Applikation gilt es kritisch zu hinterfragen, aufgrund von ethischen Bedenken sowie ihres eventuell onkogenen Potenzials (SCHMITT et al., 2012). Ein neuer Ansatz ist die Entwicklung von induzierten pluripotenten Stammzellen, vor deren Einsatz es jedoch noch weiterer intensiver Forschung bedarf (EHNERT et al., 2009).

Mit dem naheliegenden Einsatz von bereits zu Osteoblasten differenzierten Zellen ist eine Reihe von Limitierungen verbunden, wie z. B. die aufwendigere Isolierungsprozedur aus dem Knochengewebe und die geringere Zellausbeute. Die Züchtung einer ausreichend hohen Zellzahl wird durch eine geringere Proliferationsrate der Osteoblasten erschwert (SALGADO et al., 2004). Zudem handelt es sich um enddifferenzierte Zellen, die nur noch über eine begrenzte Teilungskapazität verfügen, im Gegensatz dazu behalten MSC auch nach über 30 Populationsverdopplungen ihr osteogenes Potenzial bei (BRUDER & CAPLAN, 2000). Die guten knochenbildungsfördernden Eigenschaften der Osteoblasten sowohl *in vitro* (STROBEL et al., 2012) als auch *in vivo* (GHANAATI et al., 2011) müssen dementsprechend gegen die genannten Nachteile abgewogen werden.

Die Zellgruppen zusammengefasst erwiesen sich die Blut- und Knochenmarkgruppen im subkutanen Versuchsmodell als ungeeignet bedingt durch die hochgradige Resorption der Implantate. Aufgrund einer anzunehmenden höheren Zellüberlebensrate sowie eines möglichen höheren Knochenbildungspotenzials stellte sich die Verwendung von kultivierten als erfolgreicher heraus als die von direkt reimplantierten MSC. Die Aussagen müssen aufgrund der relativ geringen Fallzahl ( $n = 5$ ) mit Vorbehalt interpretiert werden, liefern jedoch als Vorarbeiten auf dem Weg zur Generierung von primär stabilem axial vaskularisiertem Knochengewebe unter Anwendung von NanoBone<sup>®</sup> Block grundlegende Informationen.

#### **5.2.2.2 Optimierung der Knochenbildung durch Zugabe von rhBMP-2**

Die Kombination aus osteogenen Zellen, osteoinduktiven Faktoren und einer osteokonduktiven Matrix stellt die Grundlage eines erfolgreichen Tissue Engineering Ansatzes dar. Als osteoinduktiver Faktor kam rhBMP-2 zur Anwendung, welches neben rhBMP-7 seit einigen Jahren für die klinische Anwendung zugelassen ist (LO et al., 2012). BMPs haben bereits vielfach ihren Nutzen in der Unterstützung der regenerativen Prozesse im Knochengewebe bewiesen, so konnten sowohl BMP-2 als auch BMP-7 in einer Reihe von Knochendefektmodellen die Knochenheilung signifikant erhöhen (HELM et al., 2001). Hinsichtlich der Knochenneubildung in Kombination mit einem NanoBone<sup>®</sup> Block wurde in einem Vorversuch die Überlegenheit der höheren Konzentration von 60  $\mu\text{g/ml}$  rhBMP-2 gegenüber der niedrigeren von 12,5  $\mu\text{g/ml}$  festgestellt. Bisher gibt es keine allgemeingültigen Vorgaben über die benötigte BMP-Konzentration für die Heilung eines Knochendefektes (SALGADO et al., 2004). Weiterhin wird die erforderliche Konzentration als speziesabhängig beschrieben, so benötigt der Mensch eine höhere

Konzentration als der Hund oder die Ratte (CANCEDDA et al., 2007). Die hohen Freisetzungsraten aus dem häufig verwendeten Kollagenschwamm als Transportmedium machen den Einsatz von oft beträchtlichen BMP-2 Mengen notwendig. In Tiermodellen wurden 0,01 mg/ml (Nager) bis 1,5 mg/ml (nicht-humane Primaten) des Wachstumsfaktors benötigt, in der klinischen Anwendung dagegen bedarf es mitunter einer weiteren Steigerung der Dosierungen für die Optimierung der Knochenheilung (LO et al., 2012). Die Erhöhung der Konzentration von rhBMP-2 im vorliegenden Versuch könnte dementsprechend eine Zunahme der Knochenneubildung induzieren, jedoch bedarf es einer kritischen Betrachtung der möglichen Nebenwirkungen und nicht zuletzt der Kosten, vor allem im Rahmen einer späteren klinischen Anwendung. Nebenwirkungen, wie eine ektopische Knochenbildung oder eine Erhöhung der osteoklastischen Aktivität, sind vor allem bei hohen Dosen möglich. Teratogene und kanzerogene Effekte werden diskutiert, gelten jedoch als unwahrscheinlich (BENGLIS et al., 2008).

Die Knochenbildungsrate von  $0,92 \pm 0,92 \%$  in der 60  $\mu\text{g/ml}$  rhBMP-2 Gruppe weist erneut auf interindividuelle Unterschiede hin. Wie bereits für die MSC beschrieben, kann die Ursache in einer möglichen ungleichmäßigen Durchtränkung der NanoBone<sup>®</sup> Blöcke mit der Fibrin-rhBMP-2 Matrix liegen. Die Frage des optimalen Transportmediums für BMP ist noch nicht endgültig geklärt (CALORI et al., 2009). Die sehr kurze Halbwertszeit von 6,7 Minuten in nicht-humanen Primaten erfordert ein Medium, welches die rasche Degradierung verhindert und eine langsame Freisetzung von BMP gewährleistet. Es sollte u. a. biodegradierbar und sterilisierbar sein, die Infiltration mit Zellen und das Einwachsen von Blutgefäßen erlauben (LO et al., 2012). In der Literatur wird Fibrin als geeignetes Trägermedium für rhBMP-2 beschrieben (SCHUTZENBERGER et al., 2012) und konnte im AV-loop Modell der Ratte gute Vaskularisationsergebnisse erzielen (ARKUDAS et al., 2012b). Problematisch beim Einsatz von Fibrin sind mögliche Infektionsübertragungen sowie Hypersensibilitätsreaktionen. Durch den Ersatz von potenziellen sensibilisierend auslösenden Agenzien (z. B. Aprotinin) oder durch die Verwendung von autologem Fibrinkleber kann eine bessere Verträglichkeit erreicht werden (MONTANA et al., 2012). Im Gegensatz zu den berichteten positiven Ergebnissen bezüglich Fibrin als Transportmedium für Zellen und Wachstumsfaktoren erwies es sich in den subkutanen Versuchsgruppen dieser Studie als ungünstiges Medium für die Tränkung der NanoBone<sup>®</sup> Blöcke. Zusätzlich wurde in einem Schaf eine wiederholte Entzündungsreaktion in den mit Fibrin getränkten Implantaten beobachtet.

Die Kombinationsgruppe mit kultivierten MSC und rhBMP-2 in Serum konnte verglichen zur Kombinationsgruppe in Fibrin eine signifikant höhere Knochenbildungsrate induzieren und führte zu einer vollständigen Gewebedurchbauung der NanoBone<sup>®</sup> Blöcke. Durch die Tränkung mit Serum werden autologe Wachstumsfaktoren und lösliche Proteine in den Block transferiert, die eine bessere Knochenneubildung bedingen können. Ein weiterer

Erklärungsansatz stellt die geringe Viskosität von Serum im Vergleich zu Fibrin dar. Das relativ dünnflüssige Serum führt zu einer Durchtränkung des gesamten Blockes, inklusive der Nanoporen, so dass gute Voraussetzungen für eine gleichmäßige Verteilung der Zellen und Wachstumsfaktoren im Knochenersatzmaterial gegeben sind.

Im Vergleich zur Implantation von ausschließlich kultivierten MSC bzw. rhBMP-2 konnte ebenfalls in der Kombinationsgruppe in Serum eine signifikant höhere Knochenneubildungsrate induziert werden. Neben der positiven Wirkung des autologen Serums kann auch die kombinierte Implantation von rhBMP-2 und MSC und die dadurch effizientere Wirkung von rhBMP-2 zu einer Optimierung der Knochenneubildung beitragen (CALORI et al., 2009).

### 5.2.2.3 Moderate Knochenneubildungsrate im AV-loop Modell

Wie nach Herstellerangaben empfohlen, wurde der NanoBone<sup>®</sup> Block vor Implantation in autologem Blut getränkt. Für eine optimale Durchdringung des großvolumigen Blockes erfolgte die Tränkung mittels Vakuumeinwirkung.

Insgesamt konnte eine Knochenfläche von  $1,2 \pm 1,0$  % bezogen auf die Gesamtfläche gemessen werden. Analog zu den subkutanen Gruppen wurden eine nur geringe Knochenneubildung sowie hohe Standardabweichungen beobachtet. Mögliche Gründe entsprechen denen der subkutanen Versuchsgruppen. Dadurch konnte gezeigt werden, dass eine reine Tränkung mit Blut keine umfassende Knochenbildung im NanoBone<sup>®</sup> Block im AV-loop Modell induzieren konnte. Wie bereits oben angemerkt, ist die Diskrepanz der Knochenbildungsrate zwischen dieser und anderer Studien am ehesten darauf zurückzuführen, dass im vorliegenden Modell kein Kontakt zu einer Knochenfläche bestand und die Knochenneubildung möglicherweise durch fehlende induktive Faktoren verzögert ablief. Im Hinblick auf weiterführende Studien, in denen der prävaskularisierte NanoBone<sup>®</sup> Block in einen Knochendefekt transplantiert werden soll, ist jedoch zu beachten, dass ab dem Zeitpunkt der Transplantation der direkte Kontakt zu einer Knochenfläche hergestellt wird und eine weitere Knochenbildung im Transplantat dementsprechend stimuliert werden würde. Zukünftige Studien könnten untersuchen, ob die vaskularisierte Transplantation eines vollständig prävaskularisierten NanoBone<sup>®</sup> Blockes mit nur mäßiger Knochenbildung ausreichend ist, um den Defektschluss und die Ausheilung eines Knochendefektes zu erzielen.

Die neugebildeten Knochenspannen waren nicht homogen in den Konstrukten verteilt. Es ist anzunehmen, dass vor allem in frühzeitig vaskularisierten Bereichen der Umbau am weitesten fortgeschritten ist und hier vornehmlich erste Ansätze der Knochenneubildung detektierbar sind. Diese Areale wurden in den AV-loop Konstrukten vor allem in Nähe des Loop-Gefäßes sowie der Makroporen beobachtet. Ausgehend von den Loop-Gefäßen kommt es zur Neubildung von Gefäßstrukturen, die in das Knochenersatzmaterial ziehen.

Voraussetzung dafür ist der zeitgleiche Abbau von NanoBone<sup>®</sup>, damit die Gefäße wachsen und sich ausbreiten können. Dieser Prozess schreitet ausgehend von der Gefäßschleife nach zentral voran, dementsprechend sind periphere NanoBone<sup>®</sup> Bereiche einer längeren Zeitspanne dem sich neubildenden Bindegewebe bzw. Gefäßstrukturen ausgesetzt. Die Knochenneubildung kann sich in diesen Arealen in einem weiter fortgeschrittenen Stadium befinden als in zentralen Bereichen, die erst eine weitaus kürzere Zeitspanne vaskularisiert sind. Makroporen begünstigen das Einwachsen von Bindegewebe und Gefäßen, da hier der Widerstand des Knochenersatzmaterials nicht gegeben ist. Auch in diesen Bereichen ist demzufolge eine frühe Vaskularisierung und damit einhergehende raschere Generierung von Knochengewebe möglich, da das Eindringen von Gewebestrukturen umgehend und nicht erst nach Degradierung von NanoBone<sup>®</sup> stattfinden kann.

Neben den erwähnten Gründen für die geringe Knochenbildungsrate muss weiterhin der mögliche negative Einfluss des niedermolekularen Heparins (NMH) Enoxaparin-Natrium auf die Knochenbildung erwähnt werden. So wurde *in vitro* die Hemmung des Osteoblastenwachstums nach Zugabe von NMH beschrieben (OSIP et al., 2004). *In vivo* führte die Applikation von Enoxaparin an Ratten zu einer Beeinträchtigung der mechanischen Eigenschaften des Femurs (FOLWARCZNA et al., 2004). Im Vergleich zu unfraktioniertem Heparin konnten diese Nebenwirkungen in den weiterentwickelten NMH jedoch erheblich reduziert werden (RAJGOPAL et al., 2008). Eine aktuelle Studie untersuchte die Konzentration von osteogenen Wachstumsfaktoren im Blut von Patienten mit Frakturen der langen Röhrenknochen, die postoperativ mit NMH behandelt wurden. Zwischen dieser und der Vergleichsgruppe, die keine Antikoagulanzen erhielt, konnten erst ab Woche 48 signifikante Unterschiede bezüglich M-CSF und TGF- $\beta$ 1 festgestellt werden. Die Konzentration von VEGF im Blut war vergleichbar hoch (SARAHRUDI et al., 2012). Aufgrund dieser Studie sowie der ebenfalls sehr geringen Knochenneubildungsrate im subkutanen Versuchsabschnitt, in dem die Schafe kein NMH bekamen, scheint der Einfluss von NMH auf die Knochenbildung im AV-loop gering zu sein. Eine Änderung des Antikoagulationsschemas sollte aufgrund der sehr guten Wirkung nicht zwangsläufig erfolgen. Vielmehr könnten in einer Vergleichsgruppe ohne Antikoagulation Unterschiede hinsichtlich der Knochenneubildungsraten sowie zusätzlich der Durchgängigkeitsraten evaluiert werden.

Im nächsten Schritt sollen die Ergebnisse der subkutanen Versuchsgruppen im AV-loop Modell umgesetzt werden. Zur Optimierung des Überlebens der implantierten kultivierten MSC könnte eine Option darin bestehen, den Block in autologem Serum unter Zusatz von 60  $\mu$ g/ml rhBMP-2 zu tränken und nachfolgend die kultivierten MSC vor allem im Bereich um die Gefäßschleife einzubringen. Weiterhin könnte es von Vorteil sein, einen Teil der Zellen in dem Fibrinanteil aufzunehmen, welches der Fixierung der Gefäßschleife in der Nut dient. Eine weitaus invasivere Möglichkeit umfasst die Durchführung eines

zweizeitigen Eingriffes, in dem nach Prävaskularisierung des NanoBone<sup>®</sup> Blockes in einer zweiten Operation die Implantation der MSC vorgenommen werden könnte. Im AV-loop Modell der Ratte konnte die Prävaskularisierung einer bovinen Hartmatrix das Überleben von zu einem späteren Zeitpunkt implantierten Osteoblasten signifikant verbessern (ARKUDAS et al., 2007a). Jedoch müssen bei dieser Variante die Nachteile, wie die Durchführung des mit einer Narkose verbundenen Eingriffes selber, die potenzielle Infektionsgefahr und eine mögliche Schädigung des sich bereits gebildeten Gefäßnetzwerkes, bedacht werden.

### 5.2.3 Vaskularisierung von NanoBone<sup>®</sup> Block

Nur basierend auf einer suffizienten Vaskularisierung kann das Einwachsen von Gewebe, das Überleben von transplantierten Zellen und der Umbau eines Ersatzstoffes bis hin zur Züchtung eines transplantierbaren Knochenkonstruktes gewährleistet werden. Die Neovaskularisierung konnte mittels immunhistologischer Detektion der Endothelzellmarker CD31 und von-Willebrand-Faktor (vWF) in allen gewebedurchwachsenen Bereichen bewiesen werden. Die Darstellung von großkalibrigen Gefäßen gelang in den subkutanen Implantaten insbesondere in den marginalen Bereichen, in den AV-loop Implantaten vor allem im Bereich der Loop-Gefäße sowie z. T. in den Makroporen, während kleinere Gefäße vermehrt im Zentrum der Konstrukte detektiert wurden. Die Immunhistologie konnte damit erste Hinweise auf die Ausbildung einer Gefäßhierarchie und Reifung des neugebildeten Gefäßbaumes liefern. Das Vorkommen zahlreicher kleinster Kapillaren u. a. an der Grenze zwischen Gewebe und noch nicht vitalen NanoBone<sup>®</sup> Strukturen deutet auf eine kontinuierlich stattfindende Gefäßneubildung hin. Das Ausmaß der von Gefäßen durchzogenen bzw. der von Gewebe durchbauten NanoBone<sup>®</sup> Bereiche wurde sowohl für die subkutanen Gruppen als auch für die AV-loop Gruppe ausgemessen.

#### **Versuchsgruppenabhängige Unterschiede im extrinsischen Vaskularisationsmodell**

In den subkutanen Versuchsgruppen wiesen alle Explantate der Blut-, Knochenmark- und Kombinationsgruppe mit kultivierten MSC und 60 µg/ml rhBMP-2 in Serum vollständig mit Gewebe durchbaute Blöcke auf. Die Mittelwerte aller subkutanen Gruppen zusammengefasst wurde nach einer Implantationsdauer von 12 Wochen eine vitale Fläche von  $88,0 \pm 19,8 \%$  festgestellt.

Die vollständige Vaskularisierung in nur 3 von 8 Versuchsgruppen lässt sich durch die Tränkung der implantierten Blöcke mit unterschiedlichen Medien erklären. Die Implantation in Kombination mit autologem venösen Blut, wie nach Herstellerangaben empfohlen, sowie Serum impliziert den Transfer löslicher Proteine und Wachstumsfaktoren in das Knochensubstitut (GOTZ et al., 2008). Vor allem positiv geladenen Molekülen ist es möglich, im Nanometerbereich an die durch SiO<sup>-</sup>-Gruppen

negativ geladene Oberfläche der NanoBone<sup>®</sup> Partikel zu haften und so den Um- und Abbau des Knochenersatzmaterials zu fördern (GERBER, 2006). Gerber et al. implantierten blutgetränkte NanoBone<sup>®</sup> Granula in die Mandibula von Minipigs und konnten in ihren Explantaten die Knochenmarker Osteopontin sowie Osteocalcin immunhistologisch detektieren, deren Ursprung sie auf das Serum zurückführen (GERBER, 2006). Wie in den Blut- und Serumgruppen wurde auch in der Knochenmarkgruppe ein vollständiges Einwachsen von Gewebe in den Block beobachtet. Auch das Knochenmark weist einen hohen Anteil an Wachstumsfaktoren sowie Zytokinen und Chemokinen auf (NAIR et al., 2010), wodurch eine rasche Vitalisierung sowie Resorption der NanoBone<sup>®</sup> Partikel induziert werden könnte.

Fibrin, ein Medium ohne Zellen und Wachstumsfaktoren, diene als Transportvehikel für MSC sowie rhBMP-2. In diesen Gruppen kam es regelmäßig zu zentralen nicht durchbauten NanoBone<sup>®</sup> Bereichen, eventuell bedingt durch die fehlende Tränkung des Knochenaufbaumaterials mit autologen Proteinen und Wachstumsfaktoren. Zudem könnte die Fibrintränkung eine Maskierung der Oberfläche bewirken und die nachfolgende Anlagerung von Proteinen erschweren. Es wird vermutet, dass durch die relativ hohe Viskosität des Fibrins die Blöcke nur unzureichend mit Fibrin und den jeweiligen Zusätzen penetriert werden konnten. Das in den Kombinationsgruppen induzierte Vakuum nach Tränken des Blockes führte in der Gruppe mit Fibrin jedoch zu keiner vollständigen Vaskularisierung des Implantates. Ferner kann hypothetisiert werden, dass das Fehlen von zusätzlichen Wachstumsfaktoren in den Zellgruppen sowie das Vorhandensein von rein knochenspezifischen Wachstumsfaktoren in der rhBMP-2 Gruppe eine unzureichende Induktion für das Einwachsen von Gewebestrukturen darstellt.

### **Generierung eines intrinsisch vaskularisierten Tissue Engineering Konstruktes im AV-loop im Großtiermodell Schaf**

Die Züchtung von intrinsisch vaskularisiertem Knochengewebe stellt eine erfolgsversprechende Therapieoption für die Heilung von Knochendefekten ausgedehnter Dimensionen dar. Durch die Blutgefäßversorgung über eine künstlich generierte Gefäßschleife, die um einen Knochenersatzstoff gelegt wird, kann das Konstrukt prävasikularisiert werden und nachfolgend an dieser Gefäßachse in die Defektstelle transplantiert und mikrochirurgisch mit lokalen Gefäßen anastomosiert werden. Dadurch kommt es zu einer rascheren Einheilung und Defektüberbrückung als bei Verwendung eines nicht-vaskularisierten Knochenersatzstoffes. Das Prinzip wurde vielfach in der Ratte demonstriert (EROL & SPIRA, 1979; KNESER et al., 2006b) und vor einigen Jahren als Vorbereitung auf die klinische Anwendung erfolgreich auf das Großtier Schaf übertragen (BEIER et al., 2009; BEIER et al., 2010; BEIER et al., 2011; BOOS et al., 2012). Nach einer anfänglichen Modifizierung von einer rechteckigen (BEIER et al., 2009; BEIER et al., 2010; BEIER et al., 2011) hin zu der aktuell verwendeten runden Isolationskammer (BOOS et al., 2012) konnten Versuchstierausfälle reduziert werden, die wahrscheinlich auf

einen relativ ausgeprägten gebogenen Verlauf der Loop-Gefäße und dadurch begünstigte thromboembolische Verschlüsse zurückzuführen sind. Eine weitere Optimierung der Versuchsbedingungen wurde durch das in dieser Studie etablierte Behandlungsprotokoll zur Gerinnungshemmung erreicht. Im Vergleich zu vorangegangenen Studien (BOOS et al., 2012) wurde unter Anwendung des Therapieschemas in keinem operierten Tier ( $n = 6$ ) ein thromboembolischer Gefäßverschluss festgestellt.

Im vorliegenden Versuch sollte die grundlegende Vaskularisierbarkeit eines primär stabilen Knochenersatzstoffes in klinisch relevanter Dimension ausgetestet werden. Zwar war der Versuch der Vaskularisierung eines xenogenen primär stabilen Knochenersatzstoffes im AV-loop Modell des Schafes nach einer Implantationsdauer von 12 Wochen erfolgreich, jedoch wurde dieser Knochenersatzstoff aufgrund einer anzunehmenden immunogenen Reaktion als ungeeignet für weiterführende Versuche eingestuft (BEIER et al., 2011). Innerhalb von 12 Wochen war es möglich, eine granuläre Matrix im AV-loop Modell des Schafes vollständig zu vaskularisieren und nach Zugabe von Zellen und Wachstumsfaktoren die *de novo* Knochenbildung zu induzieren, die jedoch für die Transplantation in einen Knochendefekt vorteilhafte Primärstabilität war nicht gegeben (BEIER et al., 2010; BOOS et al., 2012).

Die Implantationsdauer des primär stabilen NanoBone<sup>®</sup> Blockes im AV-loop wurde auf 18 Wochen festgesetzt, begründet durch die Ergebnisse der MRT-Untersuchung sowie durch die Auswertung eines Pilot-Tieres, in welchem nach einer 12wöchigen postoperativen Standzeit keine vollständige Vaskularisierung ausgedehnter Bereiche des NanoBone<sup>®</sup> Blockes im AV-loop Modell induziert werden konnte. In allen Loop Anteilen 1–3 kam es zentral zu umfangreichen nicht gewebedurchwachsenen Bereichen. Im Vergleich zu vorangegangenen Studien mit einer granulären Matrix, in der sich eine Vaskularisationsdauer von 12 Wochen als ausreichend herausgestellt hat, kann die bei Verwendung des NanoBone<sup>®</sup> Blockes benötigte verlängerte Implantationszeitspanne möglicherweise auf die Primärstabilität des Scaffolds zurückgeführt werden. Trotz der hohen Porosität könnte die kompaktere Anordnung der Knochenersatzpartikel in NanoBone<sup>®</sup> eine erschwerte bzw. langsamere Vaskularisierung bedingen. Zur Optimierung der Neovaskularisation wurden in den NanoBone<sup>®</sup> Block zusätzlich Makroporen eingefräst, die ein rascheres Einwachsen bei erhaltener Primärstabilität garantieren sollten.

### **Histologie**

In der histologischen Auswertung zeigte sich ein nahezu vollständiges Einwachsen von Gewebe in den Block, insgesamt konnte eine Fläche von  $93,0 \pm 11,0$  % vaskularisiert werden. Zwischen den einzelnen Loop Anteilen wurden, wie bereits auch für die TRAP-Auswertung, die Degradierungsrate sowie die Knochenbildung beschrieben, keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Somit kann davon ausgegangen werden, dass der



NanoBone<sup>®</sup> Block gleichmäßig um- und abgebaut wird. In 4 von 6 Schafen wurde der Knochenersatz vollständig von Bindegewebe durchzogen. Zwei Konstrukte wurden nicht vollständig vaskularisiert, so war beispielsweise in einem Konstrukt lokal ein relativ großer Bereich auffällig, in dem die unveränderte ursprüngliche NanoBone<sup>®</sup> Struktur beobachtet werden konnte. Im Gegensatz zum Pilot-Tier, bei dem im gesamten Explantat weitläufige Bereiche ohne Bindegewebe detektiert wurden, kam es im beschriebenen Konstrukt jedoch nur zu einer ausbleibenden Vaskularisierung einer lokal begrenzten Stelle. Es besteht die Möglichkeit, dass dieser Block nicht vollständig mit Blut durchtränkt wurde und es in diesem Bereich zu Luft einschließen gekommen ist. Somit war die NanoBone<sup>®</sup> Oberfläche in diesem Areal möglicherweise nicht mit autologen Proteinen bedeckt, so dass der Ab- und Umbau der Matrix vermutlich hierdurch bedingt nicht erfolgen konnte. Eine Optimierung der Durchtränkung wäre eventuell möglich, indem die zweiminütige Vakuumdauer während der Bluttränkung verlängert wird oder der Block vor Vakuumeinwirkung für mehrere Minuten in Blut gelegt wird.

### **Bildgebende Verfahren**

Neben der immunhistologischen Detektion wurde die Neovaskularisierung des NanoBone<sup>®</sup> Blockes zusätzlich *in vivo* mittels Magnetresonanztomographie (MRT) sowie post mortem mittels Mikro-Computertomographie ( $\mu$ CT) dargestellt. Im Rahmen von vorangegangenen Studien wurden diese Verfahren inklusive der Auswertung der erhobenen Daten bereits etabliert und erwiesen sich als geeignete Visualisierungsmethoden der vom AV-loop ausgehenden Gefäßneubildung (BEIER et al., 2010; BEIER et al., 2011; BOOS et al., 2012).

Mittels der intravitalen MRT-Untersuchung konnten die nach intravasaler Gabe von Kontrastmittel perfundierten Gefäße dargestellt werden.

Dieses bildgebende Verfahren erlaubt die Evaluierung der Vaskularisierung des Konstruktes und kann damit die Terminierung des optimalen Transplantationszeitpunktes des prävaskularisierten gezüchteten Knochenersatzes in einen Knochendefekt erleichtern. Im Hinblick auf eine spätere Anwendung ist die MRT-Untersuchung damit als wichtiges diagnostisches Verfahren anzusehen, um den bestmöglichen Therapieverlauf zu garantieren. Im Gegensatz zum  $\mu$ CT, das die Gabe von häufig nephrotoxischen Kontrastmitteln erfordert sowie mit einer unter Umständen erheblichen Röntgenstrahlenbelastung einhergeht, handelt es sich beim MRT um eine strahlungsfreie Methode (BEIER et al., 2010).

In 2 der 6 Tiere wurden zum Zeitpunkt 16 Wochen nach Implantation exemplarisch MRT-Messungen durchgeführt, in denen sich eine noch nicht optimale Gefäßneubildung abzeichnete. Aus diesem Grund wurde die Implantationsdauer über weitere 2 Wochen fortgeführt. Die MRT-Untersuchungen nach 18 Wochen zeigten verglichen zum früheren

Messzeitpunkt eine zunehmende Vaskularisierung. Aufgrund der langen Implantationszeitspanne, die im Hinblick auf eine spätere klinische Anwendung nur einen möglichst begrenzten Zeitraum einnehmen sollte, wie auch der anzunehmenden ausreichenden Gefäßneubildung zu diesem Zeitpunkt, wurden die Konstrukte nach 18 Wochen explantiert. Die durchgeführten Messungen können in weiteren Versuchen, z. B. nach ergänzender Zugabe von osteogenen oder angiogenen Wachstumsfaktoren und Zellen oder einer grundlegenden Modifizierung des Modells (s. u.), als wichtige Datenquelle für notwendige Vergleiche herangezogen werden.

Vor allem im Konstrukt 1 konnte insbesondere in den Makroporen, die in den NanoBone<sup>®</sup> Block eingefräst wurden, eine gute Vaskularisierung beobachtet werden. Ausgehend von diesen Bereichen bildeten sich weitere Gefäßstrukturen, die in den Block ziehen. Der bereits in der Histologie vermutete positive Einfluss der Makroporen (5.2.2.3 Moderate Knochenneubildungsrate im AV-loop Modell) auf das Einwachsen von Gewebe und somit den Um- und Abbau von NanoBone<sup>®</sup> konnte dadurch bestätigt werden.

Auch die im Rahmen der funktionellen MRT-Untersuchung durchgeführte Sauerstoffsättigungsmessung zeigte einen hohen Sauerstoffanteil und eine damit verbundene gute Vaskularisation vor allem in den Makroporen des Blockes an. In dieser Messung wurden Bereiche mit oxygeniertem Hämoglobin von Bereichen mit desoxygeniertem Hämoglobin unterschieden und farblich kodiert dargestellt (BOLD-Effekt, blood oxxygenation level deependent). Somit konnte durch diese Untersuchung auf das Ausmaß der Vaskularisierung im Konstrukt geschlossen werden. Dieses Messverfahren stellt eine neuentwickelte Methode im Rahmen der AV-loop Studie dar, welches in diesen Tieren vorerst auf seine Praktikabilität geprüft werden sollte. Aufgrund dessen wurde diese Messung nur an einer begrenzten Anzahl von Schnitten vorgenommen. Es stellte sich heraus, dass sich dieses Verfahren sehr gut für die Darstellung der Sauerstoffsättigung und damit indirekt des Vaskularisierungsgrades in den Konstrukten eignet, so konnten die Ergebnisse der Isosurface Darstellung bestätigt werden. In Messungen beider Tiere wurden im Randbereich des Kammerinneren Strukturen mit einer sehr geringen bzw. 0%igen Sauerstoffsättigung dargestellt. Ein Vergleich mit den Maximum Intensity Projections zeigt, dass in diesen Arealen kein perfundiertes Volumen lag und somit daraus geschlossen werden kann, dass es sich um einen leeren Kammerbereich handelt, der aufgrund der Resorption von NanoBone<sup>®</sup> entstanden ist.

Weiterhin wurde jedoch demonstriert, dass ein in der Isosurface Darstellung nicht perfundierter Bereich eine gute Sauerstoffsättigung aufwies (Konstrukt 1). Diese Diskrepanz kann dadurch erklärt werden, dass die Visualisierung mittels Isosurface auf einem für alle Messungen identisch gesetzten Schwellenwert beruht. Dieser wurde so ausgewählt, dass in allen Konstrukten eindeutig nicht perfundierte Bereiche nicht markiert wurden. Jedoch ist es möglich, dass kleinere unreife Gefäßstrukturen, im Sinne eines sich erst entwickelnden Gefäßnetzwerkes, aufgrund dieses Schwellenwertes nicht markiert

wurden. In der funktionellen MRT hingegen konnten diese Strukturen jedoch als ein Bereich mit einer guten Sauerstoffsättigung identifiziert werden. Folglich lieferte diese Messung zusätzliche Informationen bezüglich der Vaskularisierung der NanoBone<sup>®</sup> Blöcke im AV-loop Modell und gab Hinweise auf die Ausbildung einer Gefäßhierarchie des sich entwickelnden Gefäßbaumes.

In weiterführenden Studien wäre es sinnvoll, diese Messung an einer höheren Anzahl von Schichten durchzuführen, um dementsprechend mehr Daten zu erheben, die Einblicke auf die Sauerstoffsättigung im dreidimensionalen Konstrukt erlauben. Zur Quantifizierung der Sauerstoffsättigung und Evaluierung des Vaskularisierungsgrades im generierten AV-loop soll im Rahmen zukünftiger Messungen ein gut vaskularisiertes Referenzgewebe, wie z. B. die Muskulatur, gemessen werden. Damit wäre es möglich, den relativen Unterschied zwischen den beiden Messdaten zu bestimmen, wodurch weitere Anhaltspunkte zur Bewertung der Vaskularisierung und somit zur Terminierung des optimalen Transplantationszeitpunktes des NanoBone<sup>®</sup> Blockes erhalten werden könnten.

Zwischen den beiden Messzeitpunkten kam es in Konstrukt 2 zu einer hochgradigen Zunahme des perfundierten Volumens (+ 66,3 %) sowie der perfundierten Oberfläche (+ 82,6 %). Im Gegensatz dazu wurde in Konstrukt 1 nur eine relativ geringe Änderung der Messdaten beobachtet (Volumen + 14,1 %, Oberfläche + 17,4 %). Die Werte zwischen Konstrukt 1 und 2 am Messzeitpunkt 18 Wochen differieren jedoch nur in geringem Maße (z. B. Volumen Konstrukt 1: 2646,79 mm<sup>3</sup> versus Konstrukt 2: 3388,44 mm<sup>3</sup>). Es kann angenommen werden, dass im Konstrukt 2 zum ersten Messzeitpunkt vielzählige kleinste Gefäßstrukturen, bzw. Gefäßvorläufer vorhanden waren, die mittels MRT-Untersuchung noch nicht erfasst werden konnten. Im Zeitverlauf kam es im Sinne der Reifung des Gefäßbaumes zu einer Größenzunahme und damit zur Detektierbarkeit der Gefäßstrukturen. Mit der Untersuchung der Vaskularisierung an zwei Messzeitpunkten konnte die Notwendigkeit der relativ langen Prävaskularisierungszeitspanne des NanoBone<sup>®</sup> Blockes bestätigt werden.

Die Frage inwieweit die AV-loop Konstrukte vaskularisiert sein müssen, um erfolgreich in einen Knochendefekt transplantiert werden zu können, kann jedoch noch nicht beantwortet werden. Letztendlich wird sich erst in folgenden Studien, in denen ein prävaskularisierter NanoBone<sup>®</sup> Block in einen Knochendefekt kritischer Größe eingesetzt werden soll, zeigen welcher Vaskularisierungsgrad für eine erfolgreiche Einheilung sowie Defektüberbrückung notwendig ist.

Als weitere Bildgebungsmodalität dienen  $\mu$ CT-Aufnahmen des mit einem CT-Kontrastmittel (Mikrofil<sup>®</sup>) perfundierten Gefäßnetzwerkes. Gegenüber der zweidimensionalen histologischen Auswertung kann hier, vergleichbar zum MRT, eine dreidimensionale Rekonstruktion der neugebildeten Gefäße vorgenommen und so eine exaktere Analyse durchgeführt werden. Es besteht die Möglichkeit, die genaue Länge, den

Radius sowie das Volumen der Gefäßstrukturen im Konstrukt auszumessen und dadurch Aussagen bezüglich des Aufbaus wie auch der Reifung des Gefäßnetzwerkes treffen zu können.

Von Nachteil stellte sich bereits in der histologischen Auswertung heraus, dass vor allem kleine Kapillargefäße nicht perfundiert waren. Trotz Spülung des Gefäßnetzwerkes mit vorgewärmter und heparinversetzter Natriumchloridlösung sowie zusätzlich mit Papaverinhydrochlorid zur Spasmolyse konnte das Kontrastmittel nicht alle Gefäße erreichen. Ein Grund hierfür wird in der relativ hohen Viskosität von Mikrofil<sup>®</sup> gesehen. Eine Optimierung könnte durch die Verringerung der Viskosität erreicht werden, die jedoch nur über eine Verdünnung möglich ist und eine damit verbundene Kontrastabnahme zur Folge hätte.

Zudem waren auf den Isosurface-Extraktionen weitläufige Bereiche erkennbar, in denen sich nicht nur die kontrastmittelgefüllten Gefäße darstellten, sondern auch zwischen den Gefäßstrukturen kontrastreiches Material zu finden war. Einerseits handelte es sich bei diesen Bereichen um aus den Gefäßen ausgetretenes Mikrofil<sup>®</sup>, andererseits könnten einige Hintergrundstrukturen auf noch einen vorhandenen unentkalkten Anteil an NanoBone<sup>®</sup> zurückzuführen sein, der sich dementsprechend als kontrastreiche Struktur abzeichnet. Mittels manueller digitaler Bildbearbeitung konnte zwar der Hintergrund bereinigt werden, jedoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass in diesen Strukturen perfundierte Gefäße zu liegen kamen. Es ist anzunehmen, dass das ausgetretene Mikrofil<sup>®</sup> durch das Platzen der kleinen Gefäße infolge eines zu hohen Perfusionsdruckes bedingt wurde. Aufgrund dessen waren diese Gefäße nicht mehr kontrastmittelgefüllt und konnten somit nicht in die Messungen aufgenommen werden.

Für weiterführende Studien bedarf es einer Optimierung der Entkalkung sowie des Perfusionsvorganges, wie z. B. der Verringerung der Viskosität von Mikrofil<sup>®</sup> und der Reduktion der Perfusionsgeschwindigkeit, so dass auch kleinste Kapillargefäße ohne Schädigung der Gefäßwände perfundiert werden können.

### **Optimierungsmöglichkeiten**

Für die Unterstützung der Neovaskularisierung ist eine grundlegende Modifikation des Modells, im Sinne einer ergänzenden extrinsischen Gefäßeinsprossung, denkbar. Damit könnte vermutlich die vollständige Vaskularisierung aller Konstrukte erreicht werden und darüber hinaus möglicherweise die ausgedehnte Prävaskularisierungszeitspanne von 18 Wochen reduziert werden. Dies erscheint in Anbetracht der zukünftigen klinischen Anwendung von grundlegender Relevanz. Auch die Optimierung des Überlebens der implantierten Zellen durch eine raschere Ausbildung eines funktionellen Gefäßnetzwerkes und eine damit einhergehende Verkürzung der Zeitspanne, in der die Versorgung der Zellen nur über eine Diffusion ablaufen kann, könnte durch diesen Ansatz erreicht werden. Im Kleintiermodell der Ratte wurde unter Verwendung einer perforierten Titankammer die

intrinsische Vaskularisation ausgehend von den AV-loop Gefäßen durch die extrinsische, von außen einsprossende, Vaskularisierung ergänzt. Die verbesserte Gefäßeinsprossung durch die zusätzliche extrinsische Vaskularisierung sowie die Anastomosierung der beiden Gefäßsysteme nach 2 Wochen konnten im AV-loop Modell der Ratte bereits erfolgreich nachgewiesen werden (ARKUDAS et al., 2012a). Bei der Verwendung von Knochenwachstumsfaktoren, wie z. B. BMP, muss jedoch beachtet werden, dass auch außerhalb der perforierten Kammer durch Diffusion von BMP eine ektope Knochenbildung induziert werden könnte, die nachfolgend zur Schädigung des umliegenden Gewebes führen könnte (WARNKE et al., 2006).

Ein weiterer Ansatz zur Beschleunigung der Vaskularisation stellt die Verwendung von angiogenen Wachstumsfaktoren da. Durch Stimulation der Neovaskularisierung könnte eine frühere Gefäßnetzwerkausbildung stattfinden, die zu einer rascheren Prävaskularisierung führt und damit die Transplantation des Konstruktes zu einem früheren Zeitpunkt erlaubt. Im AV-loop Modell der Ratte konnte für bFGF und VEGF gezeigt werden, dass es zu einer Förderung der Gefäßeinsprossung kommt und eine höhere Gefäßdichte erreicht wird als in der Kontrollgruppe ohne Wachstumsfaktoren (ARKUDAS et al., 2007b). Dieser vielversprechende Ansatz könnte auch in Zukunft im Schafmodell angewendet und evaluiert werden.

#### **5.2.4 Das AV-loop Modell und alternative Strategien zur Generierung von axial vaskularisiertem Knochengewebe**

Die derzeit klinisch angewandten Methoden zur Generierung von axial vaskularisiertem Knochengewebe umfassen die Lappenpräfabrikation und -prälamination, jedoch muss bei diesen Methoden eine ausgeprägte Hebemorbidität in Form des Verlustes von Muskel- (WARNKE et al., 2006) oder Knochenanteilen in Kauf genommen werden.

Im Gegensatz dazu geht die axiale Vaskularisierung eines Knochenersatzstoffes mittels einer zentralen Gefäßachse mit nur einer geringen Hebemorbidität einher. Eweida et al. etablierten im Modell der Ziege die Konstruktion einer Gefäßschleife im Bereich des Unterkiefers, um so das in einen Knochendefekt des Unterkiefers implantierte Knochenersatzmaterial direkt vaskularisieren zu können (EWEIDA et al., 2011). Für die Therapie von Defekten in dieser Lokalisation erscheint diese Methode bei Unversehrtheit der für die Gefäßschleife benötigten Gefäße als vielversprechend. Limitierungen des Modells bestehen jedoch in der oft mangelhaften Verfügbarkeit vaskulärer geeigneter Achsen in Defektnähe, zum einen anatomisch bedingt, zum anderen aufgrund einer nur insuffizienten Durchblutung bei Vorliegen umfangreicher Knochendefekte durch Traumata des umgebenden Gewebes, Bestrahlungen oder Infektionen.

Eine Lösungsstrategie besteht in der axialen Vaskularisierung eines Knochenersatzstoffes mittels einer zentralen Gefäßachse an einer unbeschädigten Stelle im Körper. Nachfolgend

kann der Knochenersatz mikrochirurgisch an seinem Gefäßstiel in einen Knochendefekt transplantiert und an lokale Gefäße angeschlossen werden. Durch die sofortige Durchblutung im Empfängerlager werden optimale Voraussetzungen für eine rasche Einheilung des Transplantates und eine dementsprechend schnelle Heilung des Knochendefektes geschaffen. Dieses vielversprechende Therapiemodell hat bislang jedoch noch keinen Einzug in den klinischen Alltag gefunden, mitunter aufgrund fehlender umfangreicher Studien.

Axial vaskularisiertes Gewebe kann beispielsweise über den sogenannten AV-bundle generiert werden. Ein arteriovenöses Gefäßbündel, ligiert oder nicht-ligiert, dient hierbei der Aussprossung von Gefäßstrukturen in das umgebende Gebiet (z. B. in einen Knochenersatzstoff). Im Gegensatz zum AV-loop, bei dem eine Arterie und Vene mikrochirurgisch anastomosiert werden, handelt es sich um eine einfacher durchzuführende Methode. Vorteil des Modells ist seine relativ große Unabhängigkeit von der Lokalisation. Im Menschen stehen eine Reihe vaskulärer Achsen zur Verfügung, die sich für die mikrochirurgische Anlage axial vaskularisierten Gewebes eignen. Die Einschränkungen bezüglich Gefäßlänge und anatomischer Lokalisation lassen sich im Falle des AV-loops durch die Verwendung eines Veneninterponates weitestgehend aufheben (KNESER et al., 2006b). Der AV-bundle ist hingegen auf das Vorhandensein einer ausreichend langen arteriovenösen Gefäßachse angewiesen. Das oft angesprochene Problem der Opferung einer Arterie und Vene (LOKMIC & MITCHELL, 2008) stellte sich im Modell des Schafes und der Ratte als komplikationslos dar. Es wurden in dieser sowie in den vorangegangenen Studien keinerlei Durchblutungsstörungen der operierten Gliedmaße festgestellt.

Zur Reduzierung des Gefäßverlustes für die Generierung eines axial vaskularisierten Konstruktes wurde eine Methode entwickelt, in der mittels einer oberflächlichen Vene eine Gefäßschleife generiert wird, die nachfolgend End-zu-Seit an eine Arterie bzw. Vene angeschlossen wird. Die ubiquitär vorhandenen oberflächlichen Venen machen es möglich, unabhängig von der anatomischen Lage im Körper ein axial vaskularisiertes Gewebestück herzustellen (DING et al., 2012).

Es wurden bereits Studien zum Vergleich der Effektivität von AV-loop versus AV-bundle durchgeführt (TANAKA et al., 2003; DOLDERER et al., 2010), bezüglich der Überlegenheit gibt es allerdings keine endgültige Einigkeit. Die Arbeitsgruppe um Kneser et al. beobachteten im AV-loop Modell eine Durchgängigkeitsrate von 90 % (ARKUDAS et al., 2007a) entgegen 75 % im AV-bundle (POLYKANDRIOTIS et al., 2007). Im direkten Vergleich der beiden Methoden wurde im Modell der Ratte nur im AV-loop eine vollständige Vaskularisierung der Matrix nach 8 Wochen festgestellt. Die Gefäßaussprossung war analog zu diesen Beobachtungen in dieser Gruppe ausgeprägter und es wurde ein höherer Differenzierungsgrad des Gefäßnetzwerkes festgestellt. Die Inzidenz von Versuchstierausfällen, bedingt durch eine Abszessbildung in der Kammer,

war in der AV-loop Gruppe geringer (POLYKANDRIOTIS et al., 2006). Durch die Ligierung im AV-bundle kann es teilweise zu einem reduzierten Blutfluss oder einer Stauung kommen, wodurch die Gefährdung des präfabrizierten Lappens oder Tissue Engineering Konstruktes nicht auszuschließen ist (DING et al., 2012).

In der vorliegenden Studie wurde der AV-loop dem AV-bundle vorgezogen, aufgrund der sehr guten Etablierung im Großtiermodell des Schafes, seiner hohen Sicherheit, Verlässlichkeit und der guten Erfahrungen, die in den letzten Jahren mit diesem Modell gemacht wurden. Durch die Möglichkeit Gewebe in ausgedehnten Dimensionen züchten zu können, nimmt dieses Modell einen hohen Stellenwert in der Erforschung der axialen Vaskularisierung von Knochenersatzstoffen ein und stellt den notwendigen Zwischenschritt zwischen den Versuchen in der Ratte und der klinischen Anwendung am Menschen oder Tier dar. Dennoch ist letztendlich keine Garantie gegeben, dass sich die im Schaf etablierten Methoden ohne eine weitere Modifikation auf den Menschen oder eine andere Tierspezies übertragen lassen. Es besteht beispielsweise die Möglichkeit, dass andere Zell- oder Wachstumsfaktorkonzentrationen für die Generierung eines ausreichend stabilen Knochenblockes notwendig sind. Trotz dieser Bedenken konnte die vorliegende Studie erneut das große Potenzial dieses Modells demonstrieren und stellt mit den gewonnenen Erkenntnissen einen weiteren wichtigen Schritt in Richtung klinischer Anwendbarkeit dar.

### **5.2.5 Relevanz für die Tiermedizin**

Ziel der vorliegenden Studie besteht in der Optimierung von Therapiestrategien zur Heilung von ausgedehnten Knochendefekten. Wie in der Humanmedizin so sind auch in der Tiermedizin die Therapieoptionen bezüglich großer Knochendefekte meist mit einer Reihe von Nachteilen verbunden oder führen zu nicht zufriedenstellenden Resultaten. So konnten die durch Entfernung primärer Knochentumore entstandenen Knochendefekte zwar in 7 von 9 Hunden mittels Distractionsosteogenese sowie z. T. Zusätzen wie autogenem Knochenmaterial und Knochenmark erfolgreich behandelt werden, jedoch waren Komplikationen häufig und die Behandlungsdauer nahm mehrere Monate bis nahezu ein Jahr in Anspruch (EHRHART, 2005). Weitere in der Veterinärmedizin angewandte Strategien zur Therapie von ausgedehnten Knochendefekten umfassen die Implantation von synthetischen Knochenersatzmaterialien (FRANCH et al., 2006), z. T. unter Zusatz von Knochenwachstumsfaktoren, wie z. B. BMP-2 (LEWIS et al., 2008; ARNAULT et al., 2011) oder von aus dem Knochenmark isolierten Zellen, wie mononukleären Zellen oder kultivierten Stromazellen (CROVACE et al., 2008). Auch die Kombination mit autogener Spongiosa wurde erfolgreich angewandt (SEGAL & SHANI, 2010). Neben den nicht-vaskularisierten Transplantaten wird der vaskularisierte autologe Knochentransfer im Tier beschrieben. So konnten mittels vaskularisierten

Ulnatransplantates distale Radiusfrakturen im Hund erfolgreich geheilt werden (SEGUIN et al., 2003; HODGE et al., 2011). Weitere mögliche Spenderstellen für vaskularisierte Autotransplantate sind die mediale Tibia (BEBCHUK et al., 2000) sowie die Schwanzwirbel (YEH & HOU, 1994).

Ein Großteil der beschriebenen Studien führte zu erfolgreichen Ergebnissen, jedoch sind vergleichsweise zur Humanmedizin die nicht unerheblichen Hebmorbiditäten bei Verwendung autologer Transplantate zu beachten. Im Falle von Allografts oder synthetischen Knochenersatzmaterialien wurden Komplikationen, wie z. B. eine Implantatluxation, bei jedoch gleichzeitig vorliegendem Tumorleiden (LIPTAK et al., 2005), beschrieben oder die Defektüberbrückung konnte vereinzelt nicht erzielt werden (FRANCH et al., 2006). Im Tierversuch führte die Implantation einer Calciumphosphat Keramik ohne Zusätze sowie in Kombination mit PRP in einen Ulnadefekt im Hund zu keiner ausreichenden Knochenneubildung (RABILLARD et al., 2009).

In der Human- wie in der Tiermedizin besteht der Bedarf an optimierten Therapiestrategien bezüglich der Knochendefektheilung. Das AV-loop Modell ist eine geeignete und nur mit geringgradigen Hebmorbiditäten verbundene Möglichkeit, vaskularisiertes Knochengewebe im Patienten selbst zu züchten. Vergleichbar zum Schaf oder zur Ratte könnte beispielsweise im Hund in analoger Lokalisation, medial an der Hintergliedmaße, ein geeigneter Knochenersatzstoff, wie z. B. NanoBone<sup>®</sup>, mittels AV-loop prävaskularisiert werden und nachfolgend mikrochirurgisch in einen Knochendefekt transplantiert werden. Während der mehrwöchigen Vaskularisationsphase müsste der Knochendefekt zwar ausreichend stabilisiert werden, hätte jedoch mit der nachfolgenden Implantation des vaskularisierten gezüchteten Knochengewebes eine möglicherweise bessere Erfolgsrate als mit herkömmlich verwendeten Therapiestrategien. Trotz des noch notwendigen Nachweises der Praktikabilität und Anwendbarkeit des hier beschriebenen Modells in z. B. Hund oder Katze, kann der AV-loop als eine mögliche zukunftssträchtige Alternative für die Therapie von ausgedehnten Knochendefekten in der Tiermedizin angesehen werden.



## 6 Zusammenfassung

Das therapeutische Vorgehen bei Vorliegen großer Knochendefekte, z. B. nach Trauma, Tumorentfernung oder in Verbindung mit ungünstigen lokalen Bedingungen nach Infektion oder Bestrahlung, ist gegenwärtig auf wenige Therapiestrategien begrenzt, die oft mit erheblichen Nachteilen und Leiden für die Patienten verbunden sind. Derzeitiger Goldstandard umfasst die Transplantation von autologem Gewebe in die Defektstelle, die jedoch oft mit signifikanten Hebemorbiditäten an der Spenderstelle einhergeht.

Ein neuer Lösungsansatz stellt das Knochen Tissue Engineering dar, in welchem eine Vielzahl von Strategien zur Züchtung von Knochenersatz entwickelt wurden, die sich insbesondere auf die Kombination von einem Knochenersatzmaterial, osteogenen Zellen sowie Wachstumsfaktoren stützen. Eine mangelhafte Vaskularisierung stellte sich vor allem in großvolumigen Konstrukten als limitierender Faktor für die Einheilung bzw. das Überleben des gezüchteten Knochenersatzes heraus, da insbesondere zentral liegende Anteile nicht ausreichend versorgt werden konnten. Eine Optimierung kann über die Generierung von axial vaskularisiertem Gewebe erreicht werden. Die Umsetzung erfolgte im arteriovenösen Gefäßschleifenmodell (AV-loop), bei dem durch mikrochirurgische Gefäßanastomosierung an unversehrter Stelle im Körper eine arteriovenöse Gefäßschleife angelegt wird, die anschließend der intrinsischen Vaskularisierung einer Knochenersatzmatrix dient. Nach Prävaskularisierung kann das Knochensubstitut an der Gefäßachse in den Knochendefekt transferiert und an lokale Gefäße angeschlossen werden, so dass die sofortige Durchblutung und rasche Einheilung nach Transplantation gewährleistet sind. Um eine optimale Vorbereitung auf die klinische Anwendbarkeit zu ermöglichen, wurde diese Studie in klinisch relevanter Dimension im etablierten AV-loop Modell des Schafes durchgeführt.

Im ersten Studienabschnitt erfolgte die Entwicklung einer effektiven gerinnungshemmenden Strategie, um Tieraufälle durch thromboembolische Verschlüsse der Gefäßschleife zu verhindern. Nach Etablierung eines Testsystems zur Überprüfung der ovinen Thrombozytenfunktion (Lichttransmissionsaggregometrie) wurde die Wirkung unterschiedlicher Thrombozytenaggregationshemmer und Antikoagulanzen im Schaf evaluiert. Acetylsalicylsäure *in vitro* und *in vivo* sowie Ticagrelor zeigten keine ausreichende Wirkung auf die Thrombozytenaggregation im Schaf. Die Resorption von Clopidogrel konnte in allen Schafen nachgewiesen werden, jedoch wurde nur in einem Teil der Gruppe eine ausreichende Thrombozytenaggregationshemmung beobachtet. Das niedermolekulare Heparin Enoxaparin-Natrium erzielte in altersabhängigen Dosierungen

Anti-Faktor Xa Werte im humanen therapeutischen Bereich und war der antikoagulatorischen Wirkung des Thrombininhibitors Dabigatranetexilat überlegen.

Im zweiten Studienabschnitt erfolgte die Evaluierung des primär stabilen und nanokristallinen Knochenaufbaumaterials NanoBone<sup>®</sup> Block hinsichtlich seiner Eignung als Knochenersatz in ausgedehnten Knochendefekten. Im extrinsischen Vaskularisationsmodell (subkutane Implantationen) wurden optimale Zellzusätze (Blut, Knochenmark, direkt reimplantierte und kultivierte mesenchymale Stammzellen) sowie Wachstumsfaktorzusätze (rhBMP-2) für eine rasche Integration des Knochenaufbaumaterials ermittelt. Als Kontrollgruppe diente die Implantation von NanoBone<sup>®</sup> mit Fibrin. Die Auswertung erfolgte nach einer Implantationsdauer von 12 Wochen mittels histologischer und molekularbiologischer Methoden. Die Kombinationsgruppe aus 6 Millionen kultivierten mesenchymalen Stammzellen und 60 µg/ml rhBMP-2 in autologem Serum erzielte die besten Ergebnisse hinsichtlich Knochenbildung sowie Resorption und Vaskularisation des Knochensubstitutes. Für die Überprüfung der Vaskularisierung des NanoBone<sup>®</sup> Blockes im AV-loop Modell wurde der Block mit Blut getränkt, gemeinsam mit der arteriovenösen Gefäßschleife in eine Isolationskammer gelegt und nach 18 Wochen mit histologischen und bildgebenden Methoden (Mikro-Computertomographie, Magnetresonanztomographie) ausgewertet. Es wurde eine nahezu vollständige Vaskularisation der NanoBone<sup>®</sup> Blöcke im AV-loop Modell erreicht. Die Anwendung des im ersten Studienabschnitt etablierten gerinnungshemmenden Therapieschemas (Clopidogrel in Kombination mit Enoxaparin-Natrium) resultierte in einer 100%igen Durchgängigkeitsrate der Loop-Gefäße.

NanoBone<sup>®</sup> erwies sich im Rahmen dieser Studie als vielversprechendes Knochenersatzmaterial, das gute Eigenschaften hinsichtlich Biokompatibilität, Um- und Abbau sowie Knochenneubildung aufweist. Im Zuge weiterführender Studien soll NanoBone<sup>®</sup> in Kombination mit mesenchymalen Stammzellen und rhBMP-2 in autologem Serum im AV-loop implantiert und nachfolgend in einen Knochendefekt kritischer Größe transferiert werden. Bei erfolgreichem Abschluss ist die Übertragung dieser Strategie in die klinische Anwendung denkbar und könnte so einen entscheidenden Beitrag zur Optimierung der derzeitigen Therapieoptionen von ausgedehnten Knochendefekten leisten.

## 7 Summary

In case of large bone defects, resulting from trauma, tumor resection or in combination with insufficient local conditions after infection or radiation therapy, therapeutic approaches are currently limited to a few strategies, which are often associated with significant drawbacks for patients. So far the transplantation of autologous tissue is regarded as gold standard, however, often leading to relevant donor site morbidities.

Bone Tissue Engineering aims to overcome these disadvantages developing strategies for bone replacement, based on the combination of scaffolds, osteogenic cells and growth factors. Insufficient vascularization particularly in large volume constructs is considered as limiting factor for survival and integration of the bone substitute into the defect. Especially centrally located areas could not be supplied adequately. To improve vascularization pattern and to reduce vascularization time, strategies for fabrication of axially vascularized tissue were developed. A microsurgically created arteriovenous loop (AV-loop) in an unharmed area of the body can be used to achieve intrinsic vascularization of a bone replacement material. After prevascularization, the bone substitute can be transplanted into the defect and connected to local vessels, ensuring an immediate circulation and creating optimal conditions for rapid bone defect healing. To work in an ideal model for later transfer to clinical application, this study was performed in the sheep AV-loop model in clinically relevant dimension.

The small diameter vessel loop is accompanied by a high risk of thromboembolic events. In order to prevent animal drop outs due to vascular occlusion, an effective thrombosis prophylaxis regime was designed in the first part of this study. After establishment of a testing system for ovine platelet function (light transmission aggregometry) the efficacy of different antiplatelet and anticoagulant agents was studied in sheep. Acetylsalicylic acid *in vitro* and *in vivo* as well as ticagrelor could not serve as reliable antiplatelet drugs in sheep. Clopidogrel inhibited platelet aggregation in some sheep, while successful absorption could be demonstrated in all animals. The low-molecular-weight heparin enoxaparin sodium achieved human therapeutic anti-factor Xa levels in age-dependent dosages and was considered to be superior to the thrombin inhibitor dabigatran etexilate.

In the second part of the study, the primary stable and nanocrystalline NanoBone<sup>®</sup> block was evaluated as bone substitute for therapy of large bone defects. Optimal cell sources (blood, bone marrow, mesenchymal stem cells directly reimplanted or cultured) and growth factor supplements (rhBMP-2) for the rapid integration of the bone substitute were analyzed in an extrinsic vascularization model (subcutaneous implants). NanoBone<sup>®</sup> block in combination with fibrin served as control. After an implantation period of 12 weeks,

histological and molecular biological analyses were performed. Regarding bone formation, resorption and vascularization of the scaffold, best results could be achieved when implanting NanoBone<sup>®</sup> in combination with 6 million cultured mesenchymal stem cells and 60 µg/ml rhBMP-2 in autologous serum.

To study the vascularization pattern of NanoBone<sup>®</sup> block in the AV-loop model, the block was soaked with blood and implanted together with the AV-loop in an isolation chamber. After an implantation period of 18 weeks constructs were evaluated by histological analyses and imaging methods (micro-computed tomography, magnetic resonance imaging). NanoBone<sup>®</sup> could be vascularized almost completely in the AV-loop model. Application of the thrombosis prophylaxis regimen (clopidogrel in combination with enoxaparin sodium), developed in the first part of the study, resulted in an AV-loop patency rate of 100 %.

In this study NanoBone<sup>®</sup> proved to be a promising bone substitute material with good properties in terms of biocompatibility, remodeling and bone formation. In further studies NanoBone<sup>®</sup> should be implanted in the AV-loop with mesenchymal stem cells and rhBMP-2 in autologous serum and subsequently transplanted in a critical sized bone defect to prove sufficient healing. Possibly this new therapeutic strategy can be transferred into clinical application to optimize current treatment options of extensive bone defects.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abshagen K, Schrodi I, Gerber T, Vollmar B. In vivo analysis of biocompatibility and vascularization of the synthetic bone grafting substitute NanoBone. *J Biomed Mater Res A* 2009; 91: 557-66.
- Addonizio VP, Jr., Edmunds LH, Jr., Colman RW. The function of monkey (*M. mulatta*) platelets compared to platelets of pig, sheep, and man. *J Lab Clin Med* 1978; 91: 989-97.
- Agrawal A, Baisakhiya N, Bhola N. Split calvarial graft to repair the large frontal bone defect. *J Maxillofac Oral Surg* 2010; 9: 166-9.
- Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res* 2008; 87: 107-18.
- Ali BH. Comparative pharmacokinetics of salicylate in camels, sheep and goats. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2003; 28: 125-8.
- Allori AC, Sailon AM, Warren SM. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part II: extracellular matrix. *Tissue Eng Part B Rev* 2008a; 14: 275-83.
- Allori AC, Sailon AM, Warren SM. Biological basis of bone formation, remodeling, and repair-part I: biochemical signaling molecules. *Tissue Eng Part B Rev* 2008b; 14: 259-73.
- Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Differential analysis of peripheral blood- and bone marrow-derived endothelial progenitor cells for enhanced vascularization in bone tissue engineering. *J Orthop Res* 2012; 30: 1507-15.
- Andrew M, Ofosu F, Brooker L, Buchanan MR. The comparison of the pharmacokinetics of a low molecular weight heparin in the newborn and adult pig. *Thromb Res* 1989; 56: 529-39.
- Angiolillo DJ, Bernardo E, Palazuelos J, Desai B, Weisberg I, Alfonso F, Guzman LA, Hernandez-Antolin R, Zenni MZ, Macaya C, Fernandez-Ortiz A, Bass TA. Functional impact of high clopidogrel maintenance dosing in patients undergoing elective percutaneous coronary interventions. Results of a randomized study. *Thromb Haemost* 2008; 99: 161-8.
- Ansell J, Hirsh J, Poller L, Bussey H, Jacobson A, Hylek E. The pharmacology and management of the vitamin K antagonists: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004; 126: 204S-33S.
- Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324: 71-86.
- Ao PY, Hawthorne WJ, Coombs R, Fletcher JP. Suppression of intimal hyperplasia with low molecular weight heparin in a sheep model. *Int Angiol* 1999; 18: 131-9.
- Arkudas A, Beier JP, Heidner K, Tjiawi J, Polykandriotis E, Srouf S, Sturzl M, Horch RE, Kneser U. Axial prevascularization of porous matrices using an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts. *Tissue Eng* 2007a; 13: 1549-60.
- Arkudas A, Tjiawi J, Bleiziffer O, Grabinger L, Polykandriotis E, Beier JP, Sturzl M, Horch RE, Kneser U. Fibrin gel-immobilized VEGF and bFGF efficiently stimulate angiogenesis in the AV loop model. *Mol Med* 2007b; 13: 480-7.
- Arkudas A, Pryymachuk G, Beier JP, Weigel L, Korner C, Singer RF, Bleiziffer O, Polykandriotis E, Horch RE, Kneser U. Combination of extrinsic and intrinsic pathways significantly accelerates axial vascularization of bioartificial tissues. *Plast Reconstr Surg* 2012a; 129: 55e-65e.
- Arkudas A, Pryymachuk G, Hoereth T, Beier JP, Polykandriotis E, Bleiziffer O, Gulle H, Horch RE, Kneser U. Composition of fibrin glues significantly influences axial vascularization and degradation in isolation chamber model. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2012b; 23: 419-27.

- Arnault F, Maitre P, Cachon T, Carozzo C, Fau D, Genevois JP, Viguier E. Treatment of a nonunion, secondary to gunshot fracture, of the distal radius with circular external fixation and rhBMP-2 in a cat. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2011; 24: 289-93.
- Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets: 2. Histochemical observations at 9 months. *J Periodontol* 2001; 72: 152-9.
- Azmoon S, Angiolillo DJ. Switching antiplatelet regimens: alternatives to clopidogrel in patients with acute coronary syndrome undergoing PCI: A Review of the literature and practical considerations for the interventional cardiologist. *Catheter Cardiovasc Interv* 2012;
- Bartsch I, Willbold E, Yarmolenko S, Witte F. In vivo fluorescence imaging of apoptosis during foreign body response. *Biomaterials* 2012; 33: 6926-32.
- Bath PM, Butterworth RJ. Platelet size: measurement, physiology and vascular disease. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1996; 7: 157-61.
- Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 2000: 10-27.
- Bauman ME, Belletrutti MJ, Bajzar L, Black KL, Kuhle S, Bauman ML, Patricia Massicotte M. Evaluation of enoxaparin dosing requirements in infants and children. Better dosing to achieve therapeutic levels. *Thromb Haemost* 2009; 101: 86-92.
- Baumgarten A, Wilhelmi M, Kalbantner K, Ganter M, Mischke R. Measurement of platelet aggregation in ovine blood using a new impedance aggregometer. *Vet Clin Pathol* 2010; 39: 149-56.
- Bebchuk TN, Degner DA, Walshaw R, Brouman JD, Arnoczky SP, Stickle RL, Probst CW. Evaluation of a free vascularized medial tibial bone graft in dogs. *Vet Surg* 2000; 29: 128-44.
- Beier JP, Horch RE, Arkudas A, Polykandriotis E, Bleiziffer O, Adamek E, Hess A, Kneser U. De novo generation of axially vascularized tissue in a large animal model. *Microsurgery* 2009; 29: 42-51.
- Beier JP, Horch RE, Hess A, Arkudas A, Heinrich J, Loew J, Gulle H, Polykandriotis E, Bleiziffer O, Kneser U. Axial vascularization of a large volume calcium phosphate ceramic bone substitute in the sheep AV loop model. *J Tissue Eng Regen Med* 2010; 4: 216-23.
- Beier JP, Hess A, Loew J, Heinrich J, Boos AM, Arkudas A, Polykandriotis E, Bleiziffer O, Horch RE, Kneser U. De novo Generation of an Axially Vascularized Processed Bovine Cancellous-Bone Substitute in the Sheep Arteriovenous-Loop Model. *Eur Surg Res* 2011; 46: 148-55.
- Benglis D, Wang MY, Levi AD. A comprehensive review of the safety profile of bone morphogenetic protein in spine surgery. *Neurosurgery* 2008; 62: ONS423-31; discussion ONS31.
- Bienengraber V, Gerber T, Henkel KO, Bayerlein T, Proff P, Gedrange T. The clinical application of a new synthetic bone grafting material in oral and maxillofacial surgery. *Folia Morphol (Warsz)* 2006; 65: 84-8.
- Bland E, Dreau D, Burg KJ. Overcoming hypoxia to improve tissue-engineering approaches to regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med* 2012;
- Blech S, Ebner T, Ludwig-Schwellinger E, Stangier J, Roth W. The metabolism and disposition of the oral direct thrombin inhibitor, dabigatran, in humans. *Drug Metab Dispos* 2008; 36: 386-99.
- Bliden KP, Tantry US, Storey RF, Jeong YH, Gesheff M, Wei C, Gurbel PA. The effect of ticagrelor versus clopidogrel on high on-treatment platelet reactivity: combined analysis of the ONSET/OFFSET and RESPOND studies. *Am Heart J* 2011; 162: 160-5.
- Bonewald LF, Dallas SL. Role of active and latent transforming growth factor beta in bone formation. *J Cell Biochem* 1994; 55: 350-7.
- Bonewald LF. Mechanosensation and Transduction in Osteocytes. *Bonekey Osteovision* 2006; 3: 7-15.
- Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1116: 281-90.

- Boni L, Sasaki T, Ferrier WT, Yeung JT, Reichenbach SH, Riemer RK, Reinhartz O. Challenges in longer-term mechanical support of fontan circulation in sheep. *ASAIO J* 2012; 58: 60-4.
- Boos AM, Loew JS, Deschler G, Arkudas A, Bleiziffer O, Gulle H, Dragu A, Kneser U, Horch RE, Beier JP. Directly auto-transplanted mesenchymal stem cells induce bone formation in a ceramic bone substitute in an ectopic sheep model. *J Cell Mol Med* 2011; 15: 1364-78.
- Boos AM, Loew JS, Weigand A, Deschler G, Klumpp D, Arkudas A, Bleiziffer O, Gulle H, Kneser U, Horch RE, Beier JP. Engineering axially vascularized bone in the sheep arteriovenous-loop model. *J Tissue Eng Regen Med* 2012;
- Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194: 927-9.
- Bourque WT, Gross M, Hall BK. Expression of four growth factors during fracture repair. *Int J Dev Biol* 1993; 37: 573-9.
- Brass L. Understanding and evaluating platelet function. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010; 2010: 387-96.
- Breen A, O'Brien T, Pandit A. Fibrin as a delivery system for therapeutic drugs and biomolecules. *Tissue Eng Part B Rev* 2009; 15: 201-14.
- Broze GJ, Jr. Tissue factor pathway inhibitor and the revised hypothesis of blood coagulation. *Trends Cardiovasc Med* 1992; 2: 72-7.
- Bruder SP, Jaiswal N, Haynesworth SE. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J Cell Biochem* 1997; 64: 278-94.
- Bruder SP, Caplan AI. Bone Regeneration through Cellular Engineering. In: *Principles of Tissue Engineering*. Lanza RP, Langer R, Vacanti JP, eds.: Academic Press 2000: 683-94.
- Brunnee T, La Porta C, Reddigari SR, Salerno VM, Kaplan AP, Silverberg M. Activation of factor XI in plasma is dependent on factor XII. *Blood* 1993; 81: 580-6.
- Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR, Recker R. Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instr Course Lect* 1996; 45: 387-99.
- Burch JW, Stanford N, Majerus PW. Inhibition of platelet prostaglandin synthetase by oral aspirin. *J Clin Invest* 1978; 61: 314-9.
- Burke SE, Lefter AM, Nicolaou KC, Smith GM, Smith JB. Responsiveness of platelets and coronary arteries from different species to synthetic thromboxane and prostaglandin endoperoxide analogues. *Br J Pharmacol* 1983; 78: 287-92.
- Byrom MJ, Bannon PG, White GH, Ng MK. Animal models for the assessment of novel vascular conduits. *J Vasc Surg* 2010; 52: 176-95.
- Calori GM, Donati D, Di Bella C, Tagliabue L. Bone morphogenetic proteins and tissue engineering: future directions. *Injury* 2009; 40 Suppl 3: S67-76.
- Calori GM, Mazza E, Colombo M, Ripamonti C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: any specific needs? *Injury* 2011; 42 Suppl 2: S56-63.
- Canalis E, Rydziel S, Delany AM, Varghese S, Jeffrey JJ. Insulin-like growth factors inhibit interstitial collagenase synthesis in bone cell cultures. *Endocrinology* 1995; 136: 1348-54.
- Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M. A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. *Biomaterials* 2007; 28: 4240-50.
- Cannon CP, Husted S, Harrington RA, Scirica BM, Emanuelsson H, Peters G, Storey RF. Safety, tolerability, and initial efficacy of AZD6140, the first reversible oral adenosine diphosphate receptor antagonist, compared with clopidogrel, in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome: primary results of the DISPERSE-2 trial. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50: 1844-51.
- Caplain H, Donat F, Gaud C, Necciari J. Pharmacokinetics of clopidogrel. *Semin Thromb Hemost* 1999; 25 Suppl 2: 25-8.
- CAPRIE Steering Committee. A randomised, blinded, trial of clopidogrel versus aspirin in patients at risk of ischaemic events (CAPRIE). *Lancet* 1996; 348: 1329-39.
- Cardinal DC, Flower RJ. The 'electronic platelet aggregometer' [proceedings]. *Br J Pharmacol* 1979; 66: 138P.

- Cassell OC, Hofer SO, Morrison WA, Knight KR. Vascularisation of tissue-engineered grafts: the regulation of angiogenesis in reconstructive surgery and in disease states. *Br J Plast Surg* 2002; 55: 603-10.
- Castrogiovanni P, Imbesi R, Fisichella M, Mazzone V. Osteonic organization of limb bones in mammals, including humans, and birds: a preliminary study. *Ital J Anat Embryol* 2011; 116: 30-7.
- Cattaneo M. Light transmission aggregometry and ATP release for the diagnostic assessment of platelet function. *Semin Thromb Hemost* 2009; 35: 158-67.
- Cho TJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 513-20.
- Choonara IA, Malia RG, Haynes BP, Hay CR, Cholerton S, Breckenridge AM, Preston FE, Park BK. The relationship between inhibition of vitamin K1 2,3-epoxide reductase and reduction of clotting factor activity with warfarin. *Br J Clin Pharmacol* 1988; 25: 1-7.
- Clarke TA, Waskell LA. The metabolism of clopidogrel is catalyzed by human cytochrome P450 3A and is inhibited by atorvastatin. *Drug Metab Dispos* 2003; 31: 53-9.
- Clemens A, van Ryn J, Sennewald R, Yamamura N, Stangier J, Feuring M, Hartter S. Switching from enoxaparin to dabigatran etexilate: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety profile. *Eur J Clin Pharmacol* 2012; 68: 607-16.
- Cole AA, Walters LM. Tartrate-resistant acid phosphatase in bone and cartilage following decalcification and cold-embedding in plastic. *J Histochem Cytochem* 1987; 35: 203-6.
- Colley H, McArthur SL, Stolzing A, Scutt A. Culture on fibrin matrices maintains the colony-forming capacity and osteoblastic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomed Mater* 2012; 7: 045015.
- Conn KM, Termine JD. Matrix protein profiles in calf bone development. *Bone* 1985; 6: 33-6.
- Connell JM, Khalapyan T, Al-Mondhiry HA, Wilson RP, Rosenberg G, Weiss WJ. Anticoagulation of juvenile sheep and goats with heparin, warfarin, and clopidogrel. *ASAIO J* 2007; 53: 229-37.
- Connolly J, Guse R, Lippiello L, Dehne R. Development of an osteogenic bone-marrow preparation. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 1989; 71: 684-91.
- Coomber BL, Mitchell GB, Starr AE, Minhas K, Tamblyn A, Shewen PE, Gentry PA. Clopidogrel induced suppression of bovine platelet activation in vitro and a preliminary study of its effect on the development of *Mannheimia haemolytica* induced pneumonia. *Vet J* 2006; 171: 126-34.
- Critchlow MA, Bland YS, Ashhurst DE. The effect of exogenous transforming growth factor-beta 2 on healing fractures in the rabbit. *Bone* 1995; 16: 521-7.
- Crovace A, Favia A, Lacitignola L, Di Comite MS, Staffieri F, Francioso E. Use of autologous bone marrow mononuclear cells and cultured bone marrow stromal cells in dogs with orthopaedic lesions. *Vet Res Commun* 2008; 32 Suppl 1: S39-44.
- Crowther D, Sporn MB, Roberts AB, Durie BG. Workshop on growth factors. *Ann Oncol* 1991; 2 Suppl 2: 207-11.
- Cuisset T, Quilici J, Cohen W, Fourcade L, Saut N, Pankert M, Gaborit B, Carrieri P, Morange PE, Bonnet JL, Alessi MC. Usefulness of high clopidogrel maintenance dose according to CYP2C19 genotypes in clopidogrel low responders undergoing coronary stenting for non ST elevation acute coronary syndrome. *Am J Cardiol* 2011; 108: 760-5.
- Currey JD. The structure of bone tissue. In: *Bones: Structure and Mechanics* Princeton: Princeton University Press 2002: 3-26.
- Dai J, Louedec L, Philippe M, Michel JB, Houard X. Effect of blocking platelet activation with AZD6140 on development of abdominal aortic aneurysm in a rat aneurysmal model. *J Vasc Surg* 2009; 49: 719-27.
- Davis LE, Westfall BA. Species differences in biotransformation and excretion of salicylate. *Am J Vet Res* 1972; 33: 1253-62.
- Dazzi F, Ramasamy R, Glennie S, Jones SP, Roberts I. The role of mesenchymal stem cells in haemopoiesis. *Blood Rev* 2006; 20: 161-71.



- Del Fattore A, Teti A, Rucci N. Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. *Front Biosci (Elite Ed)* 2012; 4: 2302-21.
- Delgado JJ, Sanchez E, Baro M, Reyes R, Evora C, Delgado A. A platelet derived growth factor delivery system for bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med* 2012; 23: 1903-12.
- Delloye C, Cornu O, Druetz V, Barbier O. Bone allografts: What they can offer and what they cannot. *J Bone Joint Surg Br* 2007; 89: 574-9.
- Diener HC, Weimar C, Weber R. Antiplatelet therapy in secondary stroke prevention--state of the art. *J Cell Mol Med* 2010; 14: 2552-60.
- Dietze S, Bayerlein T, Proff P, Hoffmann A, Gedrange T. The ultrastructure and processing properties of Straumann Bone Ceramic and NanoBone. *Folia Morphol (Warsz)* 2006; 65: 63-5.
- Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med* 2011; 9: 66.
- Ding Z, Wan W, Zheng J, Deng C, Mao G, Yang S. Flap prefabrication using arterialized vein ring as implanted vascular pedicle. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2012;
- Dolderer JH, Kehrer A, Schiller SM, Schroder UH, Kohler K, Schaller HE, Siegel-Axel D. [De-novo generation of vascularized tissue using different configurations of vascular pedicles in perforated and closed chambers]. *Wien Med Wochenschr* 2010; 160: 139-46.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8: 315-7.
- Dorshkind K. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cells and their products. *Annu Rev Immunol* 1990; 8: 111-37.
- Drosse I, Volkmer E, Capanna R, De Biase P, Mutschler W, Schieker M. Tissue engineering for bone defect healing: an update on a multi-component approach. *Injury* 2008; 39 Suppl 2: S9-20.
- Du X, Xie Y, Xian CJ, Chen L. Role of FGFs/FGFRs in skeletal development and bone regeneration. *J Cell Physiol* 2012;
- Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 1997; 89: 747-54.
- Dudley HR, Spiro D. The Fine Structure of Bone Cells. *J Biophys Biochem Cytol* 1961; 11: 627-49.
- Ehnert S, Glanemann M, Schmitt A, Vogt S, Shanny N, Nussler NC, Stockle U, Nussler A. The possible use of stem cells in regenerative medicine: dream or reality? *Langenbecks Arch Surg* 2009; 394: 985-97.
- Ehrhart N. Longitudinal bone transport for treatment of primary bone tumors in dogs: technique description and outcome in 9 dogs. *Vet Surg* 2005; 34: 24-34.
- Eikelboom JW, Hirsh J, Spencer FA, Baglin TP, Weitz JI. Antiplatelet drugs: Antithrombotic Therapy and Prevention of Thrombosis, 9th ed: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines. *Chest* 2012; 141: e89S-119S.
- Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 1998; S7-21.
- Eisert WG, Huel N, Stangier J, Wiene W, Clemens A, van Ryn J. Dabigatran: an oral novel potent reversible nonpeptide inhibitor of thrombin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 1885-9.
- El Hage M, Najm SA, Bischof M, Nedir R, Carrel JP, Bernard JP. Graft shrinkage and survival rate of implants after sinus floor elevation using a nanocrystalline hydroxyapatite embedded in silica gel matrix: a 1-year prospective study. *Implant Dent* 2012; 21: 213-9.
- Erol OO, Spira M. New capillary bed formation with a surgically constructed arteriovenous fistula. *Surg Forum* 1979; 30: 530-1.
- Fachinformation Clexane® multidose 100 mg/ml (2010) Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
- Fachinformation Pradaxa® 150 mg Hartkapseln (2012) Boehringer Ingelheim International GmbH

- Fazzalari NL. Bone fracture and bone fracture repair. *Osteoporos Int* 2011; 22: 2003-6.
- Felix R, Cecchini MG, Fleisch H. Macrophage colony stimulating factor restores in vivo bone resorption in the op/op osteopetrotic mouse. *Endocrinology* 1990; 127: 2592-4.
- Fellah BH, Gauthier O, Weiss P, Chappard D, Layrolle P. Osteogenicity of biphasic calcium phosphate ceramics and bone autograft in a goat model. *Biomaterials* 2008; 29: 1177-88.
- Feng X. Chemical and Biochemical Basis of Cell-Bone Matrix Interaction in Health and Disease. *Curr Chem Biol* 2009; 3: 189-96.
- Finkemeier CG. Bone-grafting and bone-graft substitutes. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 2002; 84-A: 454-64.
- Fletcher JP, Ao PY, Hawthorne WJ. Antiproliferative effects of low molecular weight heparin. *ANZ J Surg* 2004; 74: 793-6.
- Folwarczna J, Janiec W, Sliwinski L. Effects of heparin and low-molecular-weight heparins on bone mechanical properties in rats. *Thromb Haemost* 2004; 92: 940-6.
- Foster CJ, Prosser DM, Agans JM, Zhai Y, Smith MD, Lachowicz JE, Zhang FL, Gustafson E, Monsma FJ, Jr., Wiekowski MT, Abbondanzo SJ, Cook DN, Bayne ML, Lira SA, Chintala MS. Molecular identification and characterization of the platelet ADP receptor targeted by thienopyridine antithrombotic drugs. *J Clin Invest* 2001; 107: 1591-8.
- Fox JE. The platelet cytoskeleton. *Thromb Haemost* 1993; 70: 884-93.
- Franch J, Diaz-Bertrana C, Lafuente P, Fontecha P, Durall I. Beta-tricalcium phosphate as a synthetic cancellous bone graft in veterinary orthopaedics: a retrospective study of 13 clinical cases. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2006; 19: 196-204.
- Franz-Odendaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn* 2006; 235: 176-90.
- Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation* 1968; 6: 230-47.
- Gachet C. ADP receptors of platelets and their inhibition. *Thromb Haemost* 2001; 86: 222-32.
- Gentry PA, Socha AS, Ross ML. Ovine platelet function and its inhibition by T-2 toxin. *Vet Res Commun* 1987; 11: 457-66.
- Gerber T. Nanostructuring of Biomaterials - A Pathway to Bone Grafting Substitute. *European Journal of Trauma* 2006;
- Gerike W, Bienengraber V, Henkel KO, Bayerlein T, Proff P, Gedrange T, Gerber T. The manufacture of synthetic non-sintered and degradable bone grafting substitutes. *Folia Morphol (Warsz)* 2006; 65: 54-5.
- Ghanaati S, Unger RE, Webber MJ, Barbeck M, Orth C, Kirkpatrick JA, Booms P, Motta A, Migliaresi C, Sader RA, Kirkpatrick CJ. Scaffold vascularization in vivo driven by primary human osteoblasts in concert with host inflammatory cells. *Biomaterials* 2011; 32: 8150-60.
- Giannoudis PV, Tzioupis C, Green J. Surgical techniques: how I do it? The Reamer/Irrigator/Aspirator (RIA) system. *Injury* 2009; 40: 1231-6.
- Gingerich DA, Baggot JD, Yearly RA. Pharmacokinetics and dosage of aspirin in cattle. *J Am Vet Med Assoc* 1975; 167: 945-8.
- Goodman SL. Sheep, pig, and human platelet-material interactions with model cardiovascular biomaterials. *J Biomed Mater Res* 1999; 45: 240-50.
- Gotz W, Gerber T, Michel B, Lossdorfer S, Henkel KO, Heinemann F. Immunohistochemical characterization of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel (NanoBone(r)) osteogenesis: a study on biopsies from human jaws. *Clin Oral Implants Res* 2008; 19: 1016-26.
- Govinden R, Bhoola KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta. *Pharmacol Ther* 2003; 98: 257-65.
- Grabowski EF, Didisheim P, Lewis JC, Franta JT, Stropp JQ. Platelet adhesion to foreign surfaces under controlled conditions of whole blood flow: human vs rabbit, dog, calf, sheep, pig, macaque, and baboon. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1977; 23: 141-51.
- Gurbel PA, Tantry US. Clopidogrel resistance? *Thromb Res* 2007; 120: 311-21.

- Gurbel PA, Bliden KP, Butler K, Tantry US, Gesheff T, Wei C, Teng R, Antonino MJ, Patil SB, Karunakaran A, Kereiakes DJ, Parris C, Purdy D, Wilson V, Ledley GS, Storey RF. Randomized double-blind assessment of the ONSET and OFFSET of the antiplatelet effects of ticagrelor versus clopidogrel in patients with stable coronary artery disease: the ONSET/OFFSET study. *Circulation* 2009; 120: 2577-85.
- Hankey GJ, Eikelboom JW. Aspirin resistance. *Lancet* 2006; 367: 606-17.
- Hankey GJ, Eikelboom JW. Dabigatran etexilate: a new oral thrombin inhibitor. *Circulation* 2011; 123: 1436-50.
- Hanley CA, Johnston MG, Nelson W. Coagulation of sheep intestinal and prefemoral lymph. *Lymphology* 1988; 21: 110-5.
- Harms C, Helms K, Taschner T, Stratos I, Ignatius A, Gerber T, Lenz S, Rammelt S, Vollmar B, Mittlmeier T. Osteogenic capacity of nanocrystalline bone cement in a weight-bearing defect at the ovine tibial metaphysis. *Int J Nanomedicine* 2012; 7: 2883-9.
- Harrison P, Frelinger AL, 3rd, Furman MI, Michelson AD. Measuring antiplatelet drug effects in the laboratory. *Thromb Res* 2007; 120: 323-36.
- Hees H. Binde- und Stützgewebe. In: *Histologie Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. Hees H, Sinowatz F, eds. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag Köln 2000: 113-50.
- Heinegard D, Oldberg A. Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *FASEB J* 1989; 3: 2042-51.
- Heldin CH, Westermark B. Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev* 1999; 79: 1283-316.
- Helm GA, Dayoub H, Jane JA, Jr. Bone graft substitutes for the promotion of spinal arthrodesis. *Neurosurg Focus* 2001; 10: E4.
- Henkel KO, Gerber T, Lenz S, Gundlach KK, Bienengraber V. Macroscopical, histological, and morphometric studies of porous bone-replacement materials in minipigs 8 months after implantation. *Oral Surg Oral Med Oral Radiol Endod* 2006; 102: 606-13.
- Hernigou P, Homma Y. Tissue bioengineering in orthopedics. *Clin Cases Miner Bone Metab* 2012; 9: 21-3.
- Hirner R, Tager G, Nast-Kolb D. [Vascularized bone transfer]. *Unfallchirurg* 2009; 112: 405-16; quiz 17-8.
- Hirsh J, Levine MN. Low molecular weight heparin. *Blood* 1992; 79: 1-17.
- Hirsh J, Siragusa S, Cosmi B, Ginsberg JS. Low molecular weight heparins (LMWH) in the treatment of patients with acute venous thromboembolism. *Thromb Haemost* 1995; 74: 360-3.
- Hirsh J, Warkentin TE, Shaughnessy SG, Anand SS, Halperin JL, Raschke R, Granger C, Ohman EM, Dalen JE. Heparin and low-molecular-weight heparin: mechanisms of action, pharmacokinetics, dosing, monitoring, efficacy, and safety. *Chest* 2001; 119: 64S-94S.
- Hodge SC, Degner D, Walshaw R, Teunissen B. Vascularized ulnar bone grafts for limb-sparing surgery for the treatment of distal radial osteosarcoma. *J Am Anim Hosp Assoc* 2011; 47: 98-111.
- Hoehle P (2000) Zur Übertragbarkeit tierexperimenteller endovaskulärer Studien: Unterschiede der Gerinnungs- und Fibrinolyse-Systeme bei häufig verwendeten Tierspezies im Vergleich zum Menschen. RWTH Aachen University, Aachen Germany
- Hussar DA, Schartel AF. Rivaroxaban, ticagrelor, and fidaxomicin. *J Am Pharm Assoc* (2003) 2011; 51: 778-82.
- Husted S, van Giezen JJ. Ticagrelor: the first reversibly binding oral P2Y12 receptor antagonist. *Cardiovasc Ther* 2009; 27: 259-74.
- Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110: 673-87.
- Ignjatovic V, Summerhayes R, Newall F, Monagle P. The in vitro response to low-molecular-weight heparin is not age-dependent in children. *Thromb Haemost* 2010; 103: 855-6.
- Ilizarov GA. The principles of the Ilizarov method. *Bull Hosp Jt Dis Orthop Inst* 1988; 48: 1-11.

- Innocenti M, Abed YY, Beltrami G, Delcroix L, Manfrini M, Capanna R. Biological reconstruction after resection of bone tumors of the proximal tibia using allograft shell and intramedullary free vascularized fibular graft: long-term results. *Microsurgery* 2009; 29: 361-72.
- Italiano JE, Jr., Shivdasani RA. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost* 2003; 1: 1174-82.
- Jadlowiec JA, Celil AB, Hollinger JO. Bone tissue engineering: recent advances and promising therapeutic agents. *Expert Opin Biol Ther* 2003; 3: 409-23.
- JJ VANG, Nilsson L, Berntsson P, Wissing BM, Giordanetto F, Tomlinson W, Greasley PJ. Ticagrelor binds to human P2Y(12) independently from ADP but antagonizes ADP-induced receptor signaling and platelet aggregation. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 1556-65.
- Johnston MS, Thode HP, 3rd, Ehrhart NP. Bone transport osteogenesis for reconstruction of a bone defect in the tibiotarsus of a yellow-naped Amazon parrot (*Amazona ochrocephala auropalliata*). *J Avian Med Surg* 2008; 22: 47-56.
- Jokuszies A, Herold C, Niederbichler AD, Vogt PM. Anticoagulative strategies in reconstructive surgery--clinical significance and applicability. *Ger Med Sci* 2012; 10: Doc01.
- Jones E, Yang X. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: current status. *Injury* 2011; 42: 562-8.
- Jugdaohsingh R. Silicon and bone health. *J Nutr Health Aging* 2007; 11: 99-110.
- Kanczler JM, Oreffo RO. Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater* 2008; 15: 100-14.
- Kang SW, La WG, Kang JM, Park JH, Kim BS. Bone morphogenetic protein-2 enhances bone regeneration mediated by transplantation of osteogenically undifferentiated bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biotechnol Lett* 2008; 30: 1163-8.
- Kaplan ZS, Jackson SP. The role of platelets in atherothrombosis. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011; 2011: 51-61.
- Karcher H, Feichtinger M. Transformation of a vascularised iliac crest or scapula bone to a pedicled osteomuscular transplant for reconstruction of distant defects in the head and neck region: A new method of transforming two island flaps to one longer island flap. *J Craniomaxillofac Surg* 2011;
- Karges HE, Funk KA, Ronneberger H. Activity of coagulation and fibrinolysis parameters in animals. *Arzneimittelforschung* 1994; 44: 793-7.
- Kaspers B, Goebel T, Gassmann M, Lutz TA. Blut. In: *Physiologie der Haustiere*. Von Engelhardt W, Breves G, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2004: 193-229.
- Kaully T, Kaufman-Francis K, Lesman A, Levenberg S. Vascularization--the conduit to viable engineered tissues. *Tissue Eng Part B Rev* 2009; 15: 159-69.
- Kazui M, Nishiya Y, Ishizuka T, Hagihara K, Farid NA, Okazaki O, Ikeda T, Kurihara A. Identification of the human cytochrome P450 enzymes involved in the two oxidative steps in the bioactivation of clopidogrel to its pharmacologically active metabolite. *Drug Metab Dispos* 2010; 38: 92-9.
- Keating JF, Simpson AH, Robinson CM. The management of fractures with bone loss. *J Bone Joint Surg Br* 2005; 87: 142-50.
- Kehrel BE. [Blood platelets: biochemistry and physiology]. *Hamostaseologie* 2003; 23: 149-58.
- Kellner K, Liebsch G, Klimant I, Wolfbeis OS, Blunk T, Schulz MB, Gopferich A. Determination of oxygen gradients in engineered tissue using a fluorescent sensor. *Biotechnol Bioeng* 2002; 80: 73-83.
- Kemkes-Matthes B, Oehler G (2001) *Blutgerinnung und Thrombose*. Thieme Verlag, Stuttgart
- Kim Y, Nowzari H, Rich SK. Risk of Prion Disease Transmission through Bovine-Derived Bone Substitutes: A Systematic Review. *Clin Implant Dent Relat Res* 2011;
- Kirchhoff M, Lenz S, Henkel KO, Frerich B, Holzhueter G, Radefeldt S, Gerber T. Lateral augmentation of the mandible in minipigs with a synthetic nanostructured hydroxyapatite block. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2011; 96: 342-50.
- Kneser U, Schaefer DJ, Polykandriotis E, Horch RE. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. *J Cell Mol Med* 2006a; 10: 7-19.

- Kneser U, Polykandriotis E, Ohnolz J, Heidner K, Grabinger L, Euler S, Amann KU, Hess A, Brune K, Greil P, Sturzl M, Horch RE. Engineering of vascularized transplantable bone tissues: induction of axial vascularization in an osteoconductive matrix using an arteriovenous loop. *Tissue Eng* 2006b; 12: 1721-31.
- Koch S, Flanagan TC, Sachweh JS, Tanios F, Schnoering H, Deichmann T, Ella V, Kellomaki M, Gronloh N, Gries T, Tolba R, Schmitz-Rode T, Jockenhoevel S. Fibrin-poly(lactide)-based tissue-engineered vascular graft in the arterial circulation. *Biomaterials* 2010; 31: 4731-9.
- Kohri M, Miki K, Waite DE, Nakajima H, Okabe T. In vitro stability of biphasic calcium phosphate ceramics. *Biomaterials* 1993; 14: 299-304.
- Koike N, Fukumura D, Gralla O, Au P, Schechner JS, Jain RK. Tissue engineering: creation of long-lasting blood vessels. *Nature* 2004; 428: 138-9.
- Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, Heiland M, Wolff KD, Smeets R. Current trends and future perspectives of bone substitute materials - From space holders to innovative biomaterials. *J Craniomaxillofac Surg* 2012;
- Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, Boyde A, Ruspantini I, Chistolini P, Rocca M, Giardino R, Cancedda R, Quarto R. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res* 2000; 49: 328-37.
- Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, Morony S, Oliveira-dos-Santos AJ, Van G, Itie A, Khoo W, Wakeham A, Dunstan CR, Lacey DL, Mak TW, Boyle WJ, Penninger JM. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature* 1999; 397: 315-23.
- König HE, Liebich H-G. Einführung. In: *Anatomie der Haussäugetiere Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. König HE, Liebich H-G, eds. Stuttgart: Schattauer GmbH 2001: 1-28.
- Kornak U, Dellling G, Mundlos S. Molecular Mechanisms of Regulation of Bone Density by Osteoclasts. *Deutsches Ärzteblatt* 2003; 100: A1258-A68.
- Kruyt M, De Bruijn J, Rouwkema J, Van Blitterswijk C, Oner C, Verbout A, Dhert W. Analysis of the dynamics of bone formation, effect of cell seeding density, and potential of allogeneic cells in cell-based bone tissue engineering in goats. *Tissue Eng Part A* 2008; 14: 1081-8.
- Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920-6.
- Laurencin CT, El-Amin SF. Xenotransplantation in orthopaedic surgery. *J Am Acad Orthop Surg* 2008; 16: 4-8.
- Lecoq JP, Senard M, Hartstein GM, Lamy M, Heymans O. Thromboprophylaxis in microsurgery. *Acta Chir Belg* 2006; 106: 158-64.
- Lee HH, Haleem AM, Yao V, Li J, Xiao X, Chu CR. Release of bioactive adeno-associated virus from fibrin scaffolds: effects of fibrin glue concentrations. *Tissue Eng Part A* 2011; 17: 1969-78.
- Lee OK. Fibrin glue as a vehicle for mesenchymal stem cell delivery in bone regeneration. *J Chin Med Assoc* 2008; 71: 59-61.
- Lee PY, Chen WH, Ng W, Cheng X, Kwok JY, Tse HF, Lau CP. Low-dose aspirin increases aspirin resistance in patients with coronary artery disease. *Am J Med* 2005; 118: 723-7.
- Lefebvre V, Bhattaram P. Vertebrate skeletogenesis. *Curr Top Dev Biol* 2010; 90: 291-317.
- LeGeros RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates. *Clin Orthop Relat Res* 2002: 81-98.
- Leon C, Freund M, Ravanat C, Baurand A, Cazenave JP, Gachet C. Key role of the P2Y(1) receptor in tissue factor-induced thrombin-dependent acute thromboembolism: studies in P2Y(1)-knockout mice and mice treated with a P2Y(1) antagonist. *Circulation* 2001; 103: 718-23.
- Lewis JR, Boudrieau RJ, Reiter AM, Seeherman HJ, Gilley RS. Mandibular reconstruction after gunshot trauma in a dog by use of recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Am Vet Med Assoc* 2008; 233: 1598-604.

- Liebich H-G. Binde- und Stützgewebe (Textus connectivus). In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. Liebich H-G, ed. Stuttgart: Schattauer 2010: 67-96.
- Linden MD, Jackson DE. Platelets: pleiotropic roles in atherogenesis and atherothrombosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42: 1762-6.
- Liptak JM, Pluhar GE, Dernel WS, Withrow SJ. Limb-sparing surgery in a dog with osteosarcoma of the proximal femur. *Vet Surg* 2005; 34: 71-7.
- Liu Y, Wang G, Cai Y, Ji H, Zhou G, Zhao X, Tang R, Zhang M. In vitro effects of nanophase hydroxyapatite particles on proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A* 2009; 90: 1083-91.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-8.
- Lo KW, Ulery BD, Ashe KM, Laurencin CT. Studies of bone morphogenetic protein based surgical repair. *Adv Drug Deliv Rev* 2012;
- Loew J (2011) Die Generierung axial vaskularisierten Knochengewebes im arteriovenösen Gefäßschleifenmodell des Schafes. In: Chirurgische Tierklinik, veterinärmedizinische Fakultät. Universität Leipzig, Leipzig
- Lokmic Z, Stillaert F, Morrison WA, Thompson EW, Mitchell GM. An arteriovenous loop in a protected space generates a permanent, highly vascular, tissue-engineered construct. *FASEB J* 2007; 21: 511-22.
- Lokmic Z, Mitchell GM. Engineering the microcirculation. *Tissue Eng Part B Rev* 2008; 14: 87-103.
- Loll PJ, Picot D, Garavito RM. The structural basis of aspirin activity inferred from the crystal structure of inactivated prostaglandin H2 synthase. *Nat Struct Biol* 1995; 2: 637-43.
- Lorand L. New approaches to old problems in the clotting of fibrinogen. *Ann N Y Acad Sci* 1983; 408: 226-32.
- Mackie EJ, Ahmed YA, Tatarczuch L, Chen KS, Mirams M. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 46-62.
- Maheshwari S, Verma SK, Tariq M, Prabhat KC, Kumar S. Biomechanics and orthodontic treatment protocol in maxillofacial distraction osteogenesis. *Natl J Maxillofac Surg* 2011; 2: 120-8.
- Majerus PW, Stanford N. Comparative effects of aspirin and diflunisal on prostaglandin synthetase from human platelets and sheep seminal vesicles. *Br J Clin Pharmacol* 1977; 4 Suppl 1: 15S-8S.
- Malaval L, Fournier B, Delmas PD. Radioimmunoassay for osteonectin. Concentrations in bone, nonmineralized tissues, and blood. *J Bone Miner Res* 1987; 2: 457-65.
- Malm CJ, Risberg B, Bodin A, Backdahl H, Johansson BR, Gatenholm P, Jeppsson A. Small calibre biosynthetic bacterial cellulose blood vessels: 13-months patency in a sheep model. *Scand Cardiovasc J* 2012; 46: 57-62.
- Marastoni S, Ligresti G, Lorenzon E, Colombatti A, Mongiat M. Extracellular matrix: a matter of life and death. *Connect Tissue Res* 2008; 49: 203-6.
- Marotti G. The osteocyte as a wiring transmission system. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2000; 1: 133-6.
- Matthiasson SE, Bergqvist D, Lundell A, Lindblad B. Effect of dextran and enoxaparin on early ePTFE graft thrombogenicity in sheep. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1995; 9: 284-92.
- McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 272-7.
- McCarty RC, Gronthos S, Zannettino AC, Foster BK, Xian CJ. Characterisation and developmental potential of ovine bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2009; 219: 324-33.
- McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 1978; 60-B: 150-62.
- Meadows TA, Bhatt DL. Clinical aspects of platelet inhibitors and thrombus formation. *Circ Res* 2007; 100: 1261-75.

- Meier J, Wolf E, Bienengraber V. Application of the Synthetic Nanostructured Bone Grafting Material NanoBone in Sinus Floor Elevation. *Implantologie* 2008; 16: 301-14.
- Merkel N, Gunther G, Schobess R. Long-term treatment of thrombosis with enoxaparin in pediatric and adolescent patients. *Acta Haematol* 2006; 115: 230-6.
- Meurer DG, Wolf S. Zellersatz und Anpassungsreaktionen. In: *Allgemeine Pathologie*. Meurer DG, Wolf S, eds. Stuttgart: Schattauer 2007: 223-40.
- Meyer U, Wiesmann HP, Berr K, Kubler NR, Handschel J. Cell-based bone reconstruction therapies-principles of clinical approaches. *Int J Oral Maxillofac Implants* 2006; 21: 899-906.
- Mian R, Morrison WA, Hurley JV, Penington AJ, Romeo R, Tanaka Y, Knight KR. Formation of new tissue from an arteriovenous loop in the absence of added extracellular matrix. *Tissue Eng* 2000; 6: 595-603.
- Miller CS, Grandi SM, Shimony A, Filion KB, Eisenberg MJ. Meta-Analysis of Efficacy and Safety of New Oral Anticoagulants (Dabigatran, Rivaroxaban, Apixaban) Versus Warfarin in Patients With Atrial Fibrillation. *Am J Cardiol* 2012;
- Miller SC, Bowman BM, Smith JM, Jee WS. Characterization of endosteal bone-lining cells from fatty marrow bone sites in adult beagles. *Anat Rec* 1980; 198: 163-73.
- Moalic P, Gruel Y, Foloppe P, Delahousse B, Leclerc MH, Leroy J. Hemostasis development in the lamb fetus and neonate. *Am J Vet Res* 1989; 50: 59-63.
- Montana M, Tabele C, Curti C, Terme T, Rathelot P, Gensollen S, Vanelle P. Organic glues or fibrin glues from pooled plasma: efficacy, safety and potential as scaffold delivery systems. *J Pharm Pharm Sci* 2012; 15: 124-40.
- Moore WR, Graves SE, Bain GI. Synthetic bone graft substitutes. *ANZ J Surg* 2001; 71: 354-61.
- Morris DC, Masuhara K, Takaoka K, Ono K, Anderson HC. Immunolocalization of alkaline phosphatase in osteoblasts and matrix vesicles of human fetal bone. *Bone Miner* 1992; 19: 287-98.
- Nair RR, Tolentino J, Hazlehurst LA. The bone marrow microenvironment as a sanctuary for minimal residual disease in CML. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 602-12.
- Nickel R, Schummer A, Seiferle E (2004) *Lehrbuch der Anatomie der Haussäugetiere - Band I Bewegungsapparat*. Parey Verlag, Stuttgart
- Niemeyer P, Kasten P, Simank HG, Fellenberg J, Seckinger A, Kreuz PC, Mehlhorn A, Sudkamp NP, Krause U. Transplantation of mesenchymal stromal cells on mineralized collagen leads to ectopic matrix synthesis in vivo independently from prior in vitro differentiation. *Cytotherapy* 2006; 8: 354-66.
- Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT, Pearce S, Kasten P. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials* 2010; 31: 3572-9.
- Noble BS. The osteocyte lineage. *Arch Biochem Biophys* 2008; 473: 106-11.
- Noda M, Rodan GA. Type-beta transforming growth factor inhibits proliferation and expression of alkaline phosphatase in murine osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 140: 56-65.
- Nohe N, Kurnik K. Niedermolekulare Heparine in der Pädiatrie. *Hamostaseologie* 2001; 21: 118-24.
- Offermanns S. Pharmaka, die in die Hämostase eingreifen. In: *Pharmakologie & Toxikologie*. Freissmuth M, Offermanns S, Boehm S, eds. Heidelberg: Springer Medizin Verlag 2012: 409-35.
- Ofosu FA, Barrowcliffe TW. Mechanisms of action of low molecular weight heparins and heparinoids. *Baillieres Clin Haematol* 1990; 3: 505-29.
- Osip SL, Butcher M, Young E, Yang L, Shaughnessy SG. Differential effects of heparin and low molecular weight heparin on osteoblastogenesis and adipogenesis in vitro. *Thromb Haemost* 2004; 92: 803-10.
- Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, Stamp GW, Beddington RS, Mundlos S, Olsen BR, Selby PB, Owen MJ. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 1997; 89: 765-71.

- Otto WR, Wright NA. Mesenchymal stem cells: from experiment to clinic. *Fibrogenesis Tissue Repair* 2011; 4: 20.
- Parfitt AM. The cellular basis of bone remodeling: the quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone. *Calcif Tissue Int* 1984; 36 Suppl 1: S37-45.
- Park SG, Kim SC, Choi MJ, Lee HS, Min BG, Cheong J, Lee K. Heparin monitoring in sheep by activated partial thromboplastin time. *Artif Organs* 2003; 27: 576-80.
- Patil SB, Jackman LE, Francis SE, Judge HM, Nylander S, Storey RF. Ticagrelor Effectively and Reversibly Blocks Murine Platelet P2Y(12)-Mediated Thrombosis and Demonstrates a Requirement for Sustained P2Y(12) Inhibition to Prevent Subsequent Neointima. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2010; 30: 2385-91.
- Patrono C, Ciabattini G, Patrignani P, Pugliese F, Filabozzi P, Catella F, Davi G, Forni L. Clinical pharmacology of platelet cyclooxygenase inhibition. *Circulation* 1985; 72: 1177-84.
- Patrono C, Baigent C, Hirsh J, Roth G. Antiplatelet drugs: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines (8th Edition). *Chest* 2008; 133: 199S-233S.
- Pauling L, Coryell CD. The Magnetic Properties and Structure of Hemoglobin, Oxyhemoglobin and Carbonmonoxyhemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1936; 22: 210-6.
- Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 2007; 13: 1-10.
- Pederson WC, Person DW. Long bone reconstruction with vascularized bone grafts. *Orthop Clin North Am* 2007; 38: 23-35, v.
- Pelagalli A, Lombardi P, d'Angelo D, Della Morte R, Avallone L, Staiano N. Species variability in platelet aggregation response to different agonists. *J Comp Pathol* 2002; 127: 126-32.
- Pelagalli A, Belisario MA, Tafuri S, Lombardi P, d'Angelo D, Avallone L, Staiano N. Adhesive properties of platelets from different animal species. *J Comp Pathol* 2003; 128: 127-31.
- Peng H, Schlaich EM, Row S, Andreadis ST, Swartz DD. A novel ovine ex vivo arteriovenous shunt model to test vascular implantability. *Cells Tissues Organs* 2012; 195: 108-21.
- Peraramelli S, Suylen DP, Rosing J, Hackeng TM. The Kunitz 1 and Kunitz 3 domains of tissue factor pathway inhibitor are required for efficient inhibition of factor Xa. *Thromb Haemost* 2012; 108: 266-76.
- Perets A, Baruch Y, Weisbuch F, Shoshany G, Neufeld G, Cohen S. Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res A* 2003; 65: 489-97.
- Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemain G. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* 2000; 18: 959-63.
- Petrtyl M, Hert J, Fiala P. Spatial organization of the haversian bone in man. *J Biomech* 1996; 29: 161-9.
- Phillips JE, Gersbach CA, Garcia AJ. Virus-based gene therapy strategies for bone regeneration. *Biomaterials* 2007; 28: 211-29.
- Pichler L. Parameters of coagulation and fibrinolysis in different animal species - a literature based comparison. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 2008; 95: 282-95.
- Polykandriotis E, Arkudas A, Euler S, Beier JP, Horch RE, Kneser U. [Prevascularisation strategies in tissue engineering]. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2006; 38: 217-23.
- Polykandriotis E, Arkudas A, Beier JP, Hess A, Greil P, Papadopoulos T, Kopp J, Bach AD, Horch RE, Kneser U. Intrinsic axial vascularization of an osteoconductive bone matrix by means of an arteriovenous vascular bundle. *Plast Reconstr Surg* 2007; 120: 855-68.
- Porada CD, Almeida-Porada G. Mesenchymal stem cells as therapeutics and vehicles for gene and drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2010; 62: 1156-66.



- Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog* 2009; 25: 1539-60.
- Preissner KT. [Biochemistry and physiology of blood coagulation and fibrinolysis]. *Hamostaseologie* 2004; 24: 84-93.
- Pribaz JJ, Maitz PK, Fine NA. Flap prefabrication using the "vascular crane" principle: an experimental study and clinical application. *Br J Plast Surg* 1994; 47: 250-6.
- Rabillard M, Grand JG, Dalibert E, Fellah B, Gauthier O, Niebauer GW. Effects of autologous platelet rich plasma gel and calcium phosphate biomaterials on bone healing in an ulnar osteotomy model in dogs. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2009; 22: 460-6.
- Rajgopal R, Bear M, Butcher MK, Shaughnessy SG. The effects of heparin and low molecular weight heparins on bone. *Thromb Res* 2008; 122: 293-8.
- Reichert JC, Woodruff MA, Friis T, Quent VM, Gronthos S, Duda GN, Schutz MA, Hutmacher DW. Ovine bone- and marrow-derived progenitor cells and their potential for scaffold-based bone tissue engineering applications in vitro and in vivo. *J Tissue Eng Regen Med* 2010; 4: 565-76.
- Rentsch C, Hess R, Rentsch B, Hofmann A, Manthey S, Scharnweber D, Biewener A, Zwipp H. Ovine bone marrow mesenchymal stem cells: isolation and characterization of the cells and their osteogenic differentiation potential on embroidered and surface-modified polycaprolactone-co-lactide scaffolds. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2010; 46: 624-34.
- Rentsch C, Rentsch B, Scharnweber D, Zwipp H, Rammelt S. [Bone substitute : Transplants and replacement materials - an update.]. *Unfallchirurg* 2012;
- Rhineland FW. The normal microcirculation of diaphyseal cortex and its response to fracture. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 1968; 50: 784-800.
- Rocheffort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int* 2010; 21: 1457-69.
- Rodan GA. Introduction to bone biology. *Bone* 1992; 13 Suppl 1: S3-6.
- Roodman GD. Advances in bone biology: the osteoclast. *Endocr Rev* 1996; 17: 308-32.
- Rouwkema J, de Boer J, Van Blitterswijk CA. Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct. *Tissue Eng* 2006; 12: 2685-93.
- Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S. Biology of vascular endothelial growth factors. *FEBS Lett* 2006; 580: 2879-87.
- Rüedi TP, Buckley RE, Moran CG. AO philosophy and basic principles. In: *AO Principles of Fracture Management - Volume 1 - Principles*: Thieme 2007: 1-114.
- Rumpel E, Wolf E, Kauschke E, Bienengraber V, Bayerlein T, Gedrange T, Proff P. The biodegradation of hydroxyapatite bone graft substitutes in vivo. *Folia Morphol (Warsz)* 2006; 65: 43-8.
- Russell TA, Leighton RK. Comparison of autogenous bone graft and endothermic calcium phosphate cement for defect augmentation in tibial plateau fractures. A multicenter, prospective, randomized study. *Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume* 2008; 90: 2057-61.
- Sabtrasekh R, Tiainen H, Reseland JE, Will J, Ellingsen JE, Lyngstadaas SP, Haugen HJ. Impact of trace elements on biocompatibility of titanium scaffolds. *Biomed Mater* 2010; 5: 15003.
- Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci* 2004; 4: 743-65.
- Salomon F-V. Allgemeine Anatomie der Haussäugetiere. In: *Anatomie für die Tiermedizin*. Salomon F-V, Geyer H, Gille U, eds. Stuttgart: Enke 2008: 2-20.
- Sambu N, Radhakrishnan A, Dent H, Calver AL, Corbett S, Gray H, Simpson IA, Curzen N. Personalised antiplatelet therapy in stent thrombosis: observations from the Clopidogrel Resistance in Stent Thrombosis (CREST) registry. *Heart* 2012; 98: 706-11.
- Sarahrudi K, Kaiser G, Thomas A, Michel M, Wolf H, Mousavi M, Aharinejad S. The influence of low molecular weight heparin on the expression of osteogenic growth factors in human fracture healing. *Int Orthop* 2012; 36: 1095-8.
- Sato M, Harasaki H. Evaluation of platelet and coagulation function in different animal species using the xylum clot signature analyzer. *ASAIO J* 2002; 48: 360-4.

- Savcic M, Hauert J, Bachmann F, Wyld PJ, Geudelin B, Cariou R. Clopidogrel loading dose regimens: kinetic profile of pharmacodynamic response in healthy subjects. *Semin Thromb Hemost* 1999; 25 Suppl 2: 15-9.
- Savi P, Pereillo JM, Uzabiaga MF, Combalbert J, Picard C, Maffrand JP, Pascal M, Herbert JM. Identification and biological activity of the active metabolite of clopidogrel. *Thromb Haemost* 2000; 84: 891-6.
- Schellong SM, Haas S. [Novel oral anticoagulants and their use in the perioperative setting]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2012; 47: 266-72; quiz 73.
- Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 2008; 19: 459-66.
- Schmitt A, van Griensven M, Imhoff AB, Buchmann S. Application of stem cells in orthopedics. *Stem Cells Int* 2012; 2012: 394962.
- Schmitz M, Riss R, Kneser U, Jokuszies A, Harder Y, Beier JP, Schafer DJ, Vogt PM, Fansa H, Andree C, Pierer G, Horch RE. [Perioperative coagulation management in microsurgery: report of the consensus workshops in the course of the 31st and 32nd Annual Meeting of the German-language Working Group for microsurgery of the peripheral nerves and vessels (DAM) November 2009 in Erlangen and November 2010 in Basel]. *Handchir Mikrochir Plast Chir* 2011; 43: 376-83.
- Schneppenheim R, Zieger B. Physiologie und Pathophysiologie von plasmatischer Gerinnung und Fibrinolyse. In: *Pädiatrische Hämatologie und Onkologie*. Gadner H, Gaedicke G, Niemeyer C, Ritter J, eds. Heidelberg: Springer Medizin Verlag 2006: 373-85.
- Schnurer SM, Gopp U, Kuhn KD, Breusch SJ. [Bone substitutes]. *Orthopade* 2003; 32: 2-10.
- Schomburg JL, Medina EM, Lahti MT, Bianco RW. Dabigatran versus Warfarin after Mechanical Mitral Valve Replacement in the Swine Model. *J Invest Surg* 2012; 25: 150-5.
- Schorr K. [New antiplatelet agents and the question of dual antiplatelet therapy]. *Internist (Berl)* 2012; 53: 351-6.
- Schutzenberger S, Schultz A, Hausner T, Hopf R, Zanoni G, Morton T, Kropik K, van Griensven M, Redl H. The optimal carrier for BMP-2: a comparison of collagen versus fibrin matrix. *Arch Orthop Trauma Surg* 2012;
- Schwartz L, Brister SJ, Bourassa MG, Peniston C, Buchanan MR. Interobserver Reproducibility and Biological Variability of the Surgicutt II Bleeding Time. *J Thromb Thrombolysis* 1998; 6: 155-8.
- Scott SA, Sangkuhl K, Gardner EE, Stein CM, Hulot JS, Johnson JA, Roden DM, Klein TE, Shuldiner AR. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for cytochrome P450-2C19 (CYP2C19) genotype and clopidogrel therapy. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 90: 328-32.
- Segal U, Shani J. Surgical management of large segmental femoral and radial bone defects in a dog: through use of a cylindrical titanium mesh cage and a cancellous bone graft. *Vet Comp Orthop Traumatol* 2010; 23: 66-70.
- Seguin B, Walsh PJ, Mason DR, Wisner ER, Parmenter JL, Dernell WS. Use of an ipsilateral vascularized ulnar transposition autograft for limb-sparing surgery of the distal radius in dogs: an anatomic and clinical study. *Vet Surg* 2003; 32: 69-79.
- Segura D, Monreal L. Poor reproducibility of template bleeding time in horses. *J Vet Intern Med* 2008; 22: 238-41.
- Shang Q, Wang Z, Liu W, Shi Y, Cui L, Cao Y. Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *J Craniofac Surg* 2001; 12: 586-93; discussion 94-5.
- Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater* 2008; 15: 53-76.
- Sharma RK, Reddy HK, Singh VN, Sharma R, Voelker DJ, Bhatt G. Aspirin and clopidogrel hyporesponsiveness and nonresponsiveness in patients with coronary artery stenting. *Vasc Health Risk Manag* 2009; 5: 965-72.
- Shekaran A, Garcia AJ. Extracellular matrix-mimetic adhesive biomaterials for bone repair. *J Biomed Mater Res A* 2011; 96: 261-72.

- Siller-Matula JM, Plasenzotti R, Spiel A, Quehenberger P, Jilma B. Interspecies differences in coagulation profile. *Thromb Haemost* 2008; 100: 397-404.
- Silvestro L, Gheorghe MC, Tarcomnicu I, Savu S, Savu SR, Iordachescu A, Dulea C. Development and validation of an HPLC-MS/MS method to determine clopidogrel in human plasma. Use of incurred samples to test back-conversion. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2010; 878: 3134-42.
- Silvestro L, Gheorghe M, Iordachescu A, Ciuca V, Tudoroni A, Rizea Savu S, Tarcomnicu I. Development and validation of an HPLC-MS/MS method to quantify clopidogrel acyl glucuronide, clopidogrel acid metabolite, and clopidogrel in plasma samples avoiding analyte back-conversion. *Anal Bioanal Chem* 2011; 401: 1023-34.
- Sinowatz F. Blut, Knochenmark und lymphatisches System. In: *Histologie Kurzlehrbuch der Zytologie und mikroskopischen Anatomie*. Hees H, Sinowatz F, eds. Köln: Deutscher Ärzte-Verlag 2000: 204-51.
- Skalak R, Fox CF (1988) *Tissue Engineering*. National Science Foundation, February 26-29. Granlibakken, Lake Tahoe, California
- Slattery CW, Beaumont DO. Sheep platelets as a model for human platelets: evidence for specific PAF (platelet activating factor) receptors. *Thromb Res* 1989; 55: 569-76.
- Smith JW. Collagen fibre patterns in mammalian bone. *J Anat* 1960; 94: 329-44.
- Spanos HG, Hecker JF. Effects of heparin, aspirin and dipyridamole on thrombus formation on venous catheters. *Anaesth Intensive Care* 1979; 7: 244-7.
- Spanos HG. Aspirin fails to inhibit platelet aggregation in sheep. *Thromb Res* 1993; 72: 175-82.
- Spector DI, Keating JH, Boudrieau RJ. Immediate mandibular reconstruction of a 5 cm defect using rhBMP-2 after partial mandibulectomy in a dog. *Vet Surg* 2007; 36: 752-9.
- Springthorpe B, Bailey A, Barton P, Birkinshaw TN, Bonnert RV, Brown RC, Chapman D, Dixon J, Guile SD, Humphries RG, Hunt SF, Ince F, Ingall AH, Kirk IP, Leeson PD, Leff P, Lewis RJ, Martin BP, McGinnity DF, Mortimore MP, Paine SW, Pairaudeau G, Patel A, Rigby AJ, Riley RJ, Teobald BJ, Tomlinson W, Webborn PJ, Willis PA. From ATP to AZD6140: the discovery of an orally active reversible P2Y<sub>12</sub> receptor antagonist for the prevention of thrombosis. *Bioorg Med Chem Lett* 2007; 17: 6013-8.
- St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev* 1999; 13: 2072-86.
- Stangier J, Eriksson BI, Dahl OE, Ahnfelt L, Nehmiz G, Stahle H, Rathgen K, Svard R. Pharmacokinetic profile of the oral direct thrombin inhibitor dabigatran etexilate in healthy volunteers and patients undergoing total hip replacement. *J Clin Pharmacol* 2005; 45: 555-63.
- Strobel L, Rath S, Maier A, Beier J, Arkudas A, Greil P, Horch R, Kneser U. Induction of bone formation in biphasic calcium phosphate scaffolds by bone morphogenetic protein-2 and primary osteoblasts. *J Tissue Eng Regen Med* 2012;
- Suda T, Takahashi N, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation. *Endocr Rev* 1992; 13: 66-80.
- Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 1999; 20: 345-57.
- Sugimoto M, Miyata S. Functional property of von Willebrand factor under flowing blood. *Int J Hematol* 2002; 75: 19-24.
- Sweeney TM, Opperman LA, Persing JA, Ogle RC. Repair of critical size rat calvarial defects using extracellular matrix protein gels. *J Neurosurg* 1995; 83: 710-5.
- Tachibana T, Matsubara T, Mizuno K, Hirohata K. Enhancement of new bone formation by hematoma at fracture site. *Nihon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1991; 65: 349-58.
- Takagi S, Chow LC. Formation of macropores in calcium phosphate cement implants. *J Mater Sci Mater Med* 2001; 12: 135-9.
- Tanaka Y, Sung KC, Tsutsumi A, Ohba S, Ueda K, Morrison WA. Tissue engineering skin flaps: which vascular carrier, arteriovenous shunt loop or arteriovenous bundle, has

- more potential for angiogenesis and tissue generation? *Plast Reconstr Surg* 2003; 112: 1636-44.
- Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet* 2002; 360: 427-35.
- Taylor A, Fletcher JP, Ao PY. Inhibition of fibro-intimal hyperplasia in a polytetrafluoroethylene vascular graft with standard heparin and low molecular weight heparin. *Aust N Z J Surg* 1996; 66: 764-7.
- Teng R, Butler K. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, tolerability and safety of single ascending doses of ticagrelor, a reversibly binding oral P2Y(12) receptor antagonist, in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 2010; 66: 487-96.
- Termine JD, Kleinman HK, Whitson SW, Conn KM, McGarvey ML, Martin GR. Osteonectin, a bone-specific protein linking mineral to collagen. *Cell* 1981; 26: 99-105.
- Teti A, Zallone A. Do osteocytes contribute to bone mineral homeostasis? Osteocytic osteolysis revisited. *Bone* 2009; 44: 11-6.
- Thebault JJ, Kieffer G, Cariou R. Single-dose pharmacodynamics of clopidogrel. *Semin Thromb Hemost* 1999; 25 Suppl 2: 3-8.
- Tiainen H, Lyngstadaas SP, Ellingsen JE, Haugen HJ. Ultra-porous titanium oxide scaffold with high compressive strength. *J Mater Sci Mater Med* 2010; 21: 2783-92.
- Tillman P, Carson SN, Talken L. Platelet function and coagulation parameters in sheep during experimental vascular surgery. *Lab Anim Sci* 1981; 31: 263-7.
- Tozzi P, Solem JO, Boumzebra D, Mucciolo A, Mueller X, von Segesser LK. The GraftConnector experience. Long-term patency and histological work up in an animal model. *Swiss Surg* 2001; 7: 209-12.
- Travlos GS. Normal structure, function, and histology of the bone marrow. *Toxicol Pathol* 2006; 34: 548-65.
- Unger RE, Ghanaati S, Orth C, Sartoris A, Barbeck M, Halstenberg S, Motta A, Migliaresi C, Kirkpatrick CJ. The rapid anastomosis between prevascularized networks on silk fibroin scaffolds generated in vitro with cocultures of human microvascular endothelial and osteoblast cells and the host vasculature. *Biomaterials* 2010; 31: 6959-67.
- Urist MR. Bone: formation by autoinduction. *Science* 1965; 150: 893-9.
- Valimaki VV, Aro HT. Molecular basis for action of bioactive glasses as bone graft substitute. *Scand J Surg* 2006; 95: 95-102.
- Van Ryn J, Huel N, Waldmann L, Wienen W. Dabigatran inhibits both clot-bound and fluid phase thrombin in vitro: Effects compared to heparin and hirudin. *Blood* 2007; 110: 68b-b.
- van Ryn J, Stangier J, Haertter S, Liesenfeld KH, Wienen W, Feuring M, Clemens A. Dabigatran etexilate--a novel, reversible, oral direct thrombin inhibitor: interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity. *Thromb Haemost* 2010; 103: 1116-27.
- Vaughan T, Pasco JA, Kotowicz MA, Nicholson GC, Morrison NA. Alleles of RUNX2/CBFA1 gene are associated with differences in bone mineral density and risk of fracture. *J Bone Miner Res* 2002; 17: 1527-34.
- Walker FJ, Fay PJ. Regulation of blood coagulation by the protein C system. *FASEB J* 1992; 6: 2561-7.
- Wallentin L. P2Y(12) inhibitors: differences in properties and mechanisms of action and potential consequences for clinical use. *Eur Heart J* 2009; 30: 1964-77.
- Wallentin L, Becker RC, Budaj A, Cannon CP, Emanuelsson H, Held C, Horrow J, Husted S, James S, Katus H, Mahaffey KW, Scirica BM, Skene A, Steg PG, Storey RF, Harrington RA, Freij A, Thorsen M. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 2009; 361: 1045-57.
- Wang K, Zhou X, Huang Y, Khalil M, Wiktor D, van Giezen JJ, Penn MS. Adjunctive treatment with ticagrelor, but not clopidogrel, added to tPA enables sustained coronary artery recanalisation with recovery of myocardium perfusion in a canine coronary thrombosis model. *Thromb Haemost* 2010; 104: 609-17.

- Warnke PH, Wiltfang J, Springer I, Acil Y, Bolte H, Kosmahl M, Russo PA, Sherry E, Lutzen U, Wolfart S, Terheyden H. Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible. *Biomaterials* 2006; 27: 3163-7.
- Watson SP, Gibbins J. Collagen receptor signalling in platelets: extending the role of the ITAM. *Immunol Today* 1998; 19: 260-4.
- Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Siegel RW, Bizios R. Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics. *Biomaterials* 2001; 22: 1327-33.
- Weiss L. The hematopoietic microenvironment of the bone marrow: an ultrastructural study of the stroma in rats. *Anat Rec* 1976; 186: 161-84.
- Weitz JI. New oral anticoagulants: a view from the laboratory. *Am J Hematol* 2012; 87 Suppl 1: S133-6.
- Wen Y, Jiang B, Cui J, Li G, Yu M, Wang F, Zhang G, Nan X, Yue W, Xu X, Pei X. Superior osteogenic capacity of different mesenchymal stem cells for bone tissue engineering. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2012;
- Wenz B, Oesch B, Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials* 2001; 22: 1599-606.
- Westaby S, Katsumata T, Evans R, Pigott D, Taggart DP, Jarvik RK. The Jarvik 2000 Oxford system: increasing the scope of mechanical circulatory support. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 114: 467-74.
- Wienen W, Stassen JM, Priepe H, Ries UJ, Huel N. Effects of the direct thrombin inhibitor dabigatran and its orally active prodrug, dabigatran etexilate, on thrombus formation and bleeding time in rats. *Thromb Haemost* 2007a; 98: 333-8.
- Wienen W, Stassen JM, Priepe H, Ries UJ, Huel N. Antithrombotic and anticoagulant effects of the direct thrombin inhibitor dabigatran, and its oral prodrug, dabigatran etexilate, in a rabbit model of venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 2007b; 5: 1237-42.
- Wong KS, Chen C, Fu J, Chang HM, Suwanwela NC, Huang YN, Han Z, Tan KS, Ratanakorn D, Chollate P, Zhao Y, Koh A, Hao Q, Markus HS. Clopidogrel plus aspirin versus aspirin alone for reducing embolisation in patients with acute symptomatic cerebral or carotid artery stenosis (CLAIR study): a randomised, open-label, blinded-endpoint trial. *Lancet Neurol* 2010; 9: 489-97.
- Wong RS. Mesenchymal stem cells: angels or demons? *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 459510.
- Xu W, Holzhtuter G, Sorg H, Wolter D, Lenz S, Gerber T, Vollmar B. Early matrix change of a nanostructured bone grafting substitute in the rat. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009; 91: 692-9.
- Yamamoto M, Nakagaki T, Kisiel W. Tissue factor-dependent autoactivation of human blood coagulation factor VII. *J Biol Chem* 1992; 267: 19089-94.
- Ye X, Yin X, Yang D, Tan J, Liu G. Ectopic bone regeneration by human bone marrow mononucleated cells, undifferentiated and osteogenically differentiated bone marrow mesenchymal stem cells in Beta-tricalcium phosphate scaffolds. *Tissue Eng Part C Methods* 2012; 18: 545-56.
- Yeh LS, Hou SM. Repair of a mandibular defect with a free vascularized coccygeal vertebra transfer in a dog. *Vet Surg* 1994; 23: 281-5.
- Younger EM, Chapman MW. Morbidity at bone graft donor sites. *J Orthop Trauma* 1989; 3: 192-5.
- Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, Schipani E, Olsen BR. VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development* 2004; 131: 2161-71.
- Zerbo IR, Bronckers AL, de Lange G, Burger EH. Localisation of osteogenic and osteoclastic cells in porous beta-tricalcium phosphate particles used for human maxillary sinus floor elevation. *Biomaterials* 2005; 26: 1445-51.
- Zhao GQ. Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse. *Genesis* 2003; 35: 43-56.
- Zhong W, Sumita Y, Ohba S, Kawasaki T, Nagai K, Ma G, Asahina I. In Vivo Comparison of the Bone Regeneration Capability of Human Bone Marrow Concentrates vs. Platelet-Rich Plasma. *PLoS One* 2012; 7: e40833.

- Zimmermann G, Moghaddam A. Allograft bone matrix versus synthetic bone graft substitutes. *Injury* 2011; 42 Suppl 2: S16-21.
- Zomorodian E, Baghaban Eslaminejad M. Mesenchymal stem cells as a potent cell source for bone regeneration. *Stem Cells Int* 2012; 2012: 980353.
- Zuber R, Anzenbacherova E, Anzenbacher P. Cytochromes P450 and experimental models of drug metabolism. *J Cell Mol Med* 2002; 6: 189-98.
- Zucker MB, Nachmias VT. Platelet activation. *Arteriosclerosis* 1985; 5: 2-18.

## 9 Anhang

### A.1 Daten

Tabelle 16: Arachidonsäure- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation (%) gemessen in der Lichttransmissionsaggregometrie nach 10 Minuten und Blutungszeit in Gruppe 1a (Acetylsalicylsäure, 500 mg zweimal täglich per os) und 1b (Acetylsalicylsäure, 500 mg zweimal täglich intravenös) (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

		Basalwert	Tag 1	Tag 4	Tag 7	
ASS per os	AA-FA (%)	89,4 $\pm$ 7,4	87,8 $\pm$ 13,6	87,4 $\pm$ 8,9	79,6 $\pm$ 7,1	
	Col-FA (%)	94,2 $\pm$ 8,1	91,4 $\pm$ 4,9	95,0 $\pm$ 4,5	79,2 $\pm$ 11,2	
	BZ (min)	01:36 $\pm$ 00:58	02:12 $\pm$ 01:09	02:18 $\pm$ 01:49	01:42 $\pm$ 01:18	
		Basalwert	Tag 1	Tag 4	Tag 7, 1/2h	Tag 7, 3h
ASS intra- venös	AA-FA (%)	90,4 $\pm$ 3,2	97,4 $\pm$ 3,1	91,2 $\pm$ 9,6	90,0 $\pm$ 8,2	97,2 $\pm$ 3,1
	Col-FA (%)	88,2 $\pm$ 14,8	100,0 $\pm$ 0	96,2 $\pm$ 4,4	93,4 $\pm$ 8,1	100 $\pm$ 0
	BZ (min)	01:54 $\pm$ 00:58	02:54 $\pm$ 00:39	02:12 $\pm$ 01:45	02:00 $\pm$ 1:00	01:24 $\pm$ 00:58

Anmerkungen. AA = arachidonic acid (Arachidonsäure), ASS = Acetylsalicylsäure, bid = bis in die (lat.: zweimal täglich), BZ = Blutungszeit, Col = collagen (Kollagen), FA = final aggregation (Endaggregation)

Tabelle 17: Arachidonsäure- und Kollagen-induzierte ovine Thrombozytenaggregation (%) gemessen in der Lichttransmissionsaggregometrie nach 10 Minuten in Gruppe 1c (Acetylsalicylsäure, in vitro) (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

	Basalwert	Kontrolle	ASS 1mg	ASS 10 mg
AA-FA (%)	86,7 $\pm$ 16,7	100 $\pm$ 0	96,7 $\pm$ 5,8	100 $\pm$ 0
Col-FA (%)	90,7 $\pm$ 16,2	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0	100 $\pm$ 0

Anmerkungen. AA = arachidonic acid (Arachidonsäure), ASS = Acetylsalicylsäure, bid = bis in die (lat.: zweimal täglich), BZ = Blutungszeit, Col = collagen (Kollagen), FA = final aggregation (Endaggregation)

Tabelle 18: Adenosindiphosphat-induzierte Thrombozytenaggregation (%) gemessen in der Lichttransmissionsaggregometrie nach 10 Minuten und Blutungszeit in Gruppe 2a–c (Schafe, Clopidogrel) (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

		Basalwert	Tag 1	Tag 4	Tag 7
Gruppe 2a, Clopidogrel, 150 mg bid	ADP-FA (%)	92,6 $\pm$ 9,3	78,8 $\pm$ 21,2	73,0 $\pm$ 27,4	73,8 $\pm$ 28,7
	BZ (min)	02:42 $\pm$ 02:13	02:18 $\pm$ 00:34	02:06 $\pm$ 01:31	02:06 $\pm$ 01:18
Gruppe 2b, Clopidogrel, 225 mg bid	ADP-FA (%)	85,2 $\pm$ 12,4	86,4 $\pm$ 12,5	77,0 $\pm$ 34,2	66,8 $\pm$ 29,4
	BZ (min)	02:12 $\pm$ 01:09	02:24 $\pm$ 01:28	01:48 $\pm$ 00:50	03:06 $\pm$ 02:48
Gruppe 2c, Clopidogrel, 375 mg bid	ADP-FA (%)	85,0 $\pm$ 11,4	94,4 $\pm$ 9,1	64,4 $\pm$ 26,9	59,6 $\pm$ 24,0
	BZ (min)	01:30 $\pm$ 00:56	01:54 $\pm$ 01:05	02:48 $\pm$ 01:45	02:18 $\pm$ 01:21

Anmerkungen. ADP = Adenosindiphosphat, bid = bis in die (lat.: zweimal täglich), BZ = Blutungszeit, Col = collagen (Kollagen), FA = final aggregation (Endaggregation)

Tabelle 19: Adenosindiphosphat-induzierte Thrombozytenaggregation (%) gemessen in der Lichttransmissionsaggregometrie nach 10 Minuten der einzelnen Schafe in Gruppe 2c (Schafe, Clopidogrel 375 mg zweimal täglich)

	Basalwert	Tag 1	Tag 4	Tag 7
Schaf Nr. 1	74	93	69	47
Schaf Nr. 2	74	100	81	83
Schaf Nr. 3	100	79	17	24
Schaf Nr. 4	92	100	77	75
Schaf Nr. 5	85	100	78	69

Tabelle 20: Adenosindiphosphat-induzierte Thrombozytenaggregation (%) gemessen in der Lichttransmissionsaggregometrie nach 10 Minuten und Blutungszeit in Gruppe 2d (Lämmer, Clopidogrel 150 mg zweimal täglich) (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

	Basalwert	Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 28	
ADP-FA (%)	Lamm Nr. 1	100	100	89	76	96
	Lamm Nr. 2	71	81	87	64	74
	Lamm Nr. 3	100	100	62	39	30
	Lamm Nr. 4	99	84	52	50	52
	Lamm Nr. 5	98	100	53	30	34
	Mittelwert $\pm$ SD	93,6 $\pm$ 12,7	93,0 $\pm$ 9,6	68,6 $\pm$ 18,2	51,8 $\pm$ 18,6	57,2 $\pm$ 27,8
BZ (min)						
Mittelwert $\pm$ SD	01:12 $\pm$ 00:34	02:12 $\pm$ 01:24	02:00 $\pm$ 01:00	02:48 $\pm$ 01:45	02:54 $\pm$ 01:31	

Anmerkungen. ADP = Adenosindiphosphat, BZ = Blutungszeit, FA = final aggregation (Endaggregation), SD = Standardabweichung

Tabelle 21: Clopidogrelcarbonsäure- und Clopidogrelkonzentration in Gruppe 2c (Schafe, Clopidogrel 375 mg zweimal täglich) und 2d (Lämmer, Clopidogrel 150 mg zweimal täglich) (ng/ml) (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

		Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 28
Clopidogrel-carbonsäure	Schafe	461,32 $\pm$ 71,5	927,4 $\pm$ 105,7	1002,7 $\pm$ 176,6	n. g.
	Lämmer	328,3 $\pm$ 88,1	513,2 $\pm$ 259,9	581,4 $\pm$ 174,0	535,9 $\pm$ 176,1
Clopidogrel	Schafe	0,36 $\pm$ 0,09	0,82 $\pm$ 0,40	1,70 $\pm$ 1,4	n. g.
	Lämmer	0,91 $\pm$ 0,93	0,62 $\pm$ 0,58	0,64 $\pm$ 0,45	0,54 $\pm$ 0,24

Anmerkungen. n. g. = nicht gemessen



Tabelle 22: Adenosindiphosphat-induzierte Thrombozytenaggregation (%) gemessen in der Lichttransmissionsaggregometrie nach 10 Minuten und Blutungszeit in Gruppe 3a–d (Ticagrelor) (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

		Basalwert	Tag 1	Tag 4	Tag 7
<b>Gruppe 3a, Ticagrelor, 90 mg bid</b>	<b>ADP-FA (%)</b>	95,6 $\pm$ 6,2	97,6 $\pm$ 2,6	90,0 $\pm$ 14,1	84,6 $\pm$ 14,3
	<b>BZ (min)</b>	01:54 $\pm$ 01:15	02:30 $\pm$ 01:07	02:30 $\pm$ 01:13	02:12 $\pm$ 00:45
<b>Gruppe 3b, Ticagrelor, 180 mg bid</b>	<b>ADP-FA (%)</b>	91,0 $\pm$ 13,7	87,4 $\pm$ 11,0	92,8 $\pm$ 9,4	80,4 $\pm$ 15,8
	<b>BZ (min)</b>	01:54 $\pm$ 01:18	03:30 $\pm$ 02:16	02:24 $\pm$ 01:20	02:30 $\pm$ 01:16
<b>Gruppe 3c, Ticagrelor, 360 mg bid</b>	<b>ADP-FA (%)</b>	96,8 $\pm$ 3,0	84,0 $\pm$ 9,1	71,8 $\pm$ 16,0	79,0 $\pm$ 19,9
	<b>BZ (min)</b>	01:54 $\pm$ 01:01	02:54 $\pm$ 01:01	02:12 $\pm$ 01:29	02:42 $\pm$ 00:34
<b>Gruppe 3d, Ticagrelor, 540 mg bid</b>	<b>ADP-FA (%)</b>	84,4 $\pm$ 11,0	77,8 $\pm$ 8,6	67,0 $\pm$ 17,1	81,6 $\pm$ 16,1
	<b>BZ (min)</b>	01:54 $\pm$ 01:15	02:30 $\pm$ 01:58	02:36 $\pm$ 01:12	03:24 $\pm$ 02:35

Anmerkungen. ADP = Adenosindiphosphat, bid = bis in die (lat.: zweimal täglich), BZ = Blutungszeit, FA = final aggregation (Endaggregation)

Tabelle 23: Anti-Faktor Xa Aktivität (IU/ml) in Gruppe 4a und b (Schafe, Enoxaparin-Natrium) sowie in Gruppe 4c und d (Lämmer, Enoxaparin-Natrium) (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

		Basalwert	Tag 1	Tag 4	Tag 7	Tag 28
<b>Schafe</b>	<b>Gruppe 4a, 1 mg/kg bid</b>	0,07 $\pm$ 0,05	0,30 $\pm$ 0,05	0,20 $\pm$ 0,04	0,24 $\pm$ 0,03	n. g.
	<b>Gruppe 4b, 3 mg/kg bid</b>	0,07 $\pm$ 0,05	0,52 $\pm$ 0,10	0,77 $\pm$ 0,13	0,73 $\pm$ 0,12	n. g.
<b>Lämmer</b>	<b>Gruppe 4c, 3 mg/kg bid</b>	0,09 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,04	0,52 $\pm$ 0,09	0,48 $\pm$ 0,07	0,43 $\pm$ 0,06
	<b>Gruppe 4d, 5 mg/kg bid</b>	0,09 $\pm$ 0,02	0,53 $\pm$ 0,11	0,77 $\pm$ 0,04	0,77 $\pm$ 0,10	n. g.

Anmerkungen. bid = bis in die (lat.: zweimal täglich), n. g. = nicht gemessen

Tabelle 24: Anti-Faktor Xa Aktivität (IU/ml) über 24 Stunden in Gruppe 4b von zwei Schafen am Tag 7 der Behandlung (Enoxaparin-Natrium, 3 mg/kg s. c. zweimal täglich)

	0 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
<b>Schaf Nr. 1</b>	0,33	0,95	0,89	0,55	0,26	0,07
<b>Schaf Nr. 2</b>	0,33	0,93	0,74	0,53	0,33	0,09

Tabelle 25: Dabigatranplasmakonzentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) in Gruppe 5 (Dabigatranetexilat, 600 mg zweimal täglich) (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h
<b>Tag 1</b>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,006 $\pm$ 0,012	0,02 $\pm$ 0,019	0,016 $\pm$ 0,014	0,022 $\pm$ 0,019	0,028 $\pm$ 0,019	n. g.
<b>Tag 4</b>	n. g.	n. g.	0,048 $\pm$ 0,040	0,084 $\pm$ 0,056	0,074 $\pm$ 0,070	0,074 $\pm$ 0,067	n. g.	n. g.
<b>Tag 7</b>	0,076 $\pm$ 0,057	0,074 $\pm$ 0,048	0,078 $\pm$ 0,033	0,096 $\pm$ 0,045	0,088 $\pm$ 0,033	0,090 $\pm$ 0,049	0,070 $\pm$ 0,057	0,034 $\pm$ 0,027

Anmerkungen. n. g. = nicht gemessen

Tabelle 26: Dabigatranplasmakonzentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) der einzelnen Schafe in Gruppe 5 am Tag 7 (Dabigatranetexilat, 600 mg zweimal täglich)

	0 h	2 h	4 h	6 h	8 h	10 h	12 h	24 h
<b>Schaf Nr. 1</b>	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05	0,05	0	0,01
<b>Schaf Nr. 2</b>	0,03	0,03	0,07	0,08	0,06	0,05	0,04	0,01
<b>Schaf Nr. 3</b>	0,05	0,05	0,05	0,07	0,08	0,07	0,06	0,02
<b>Schaf Nr. 4</b>	0,17	0,16	0,13	0,17	0,14	0,18	0,17	0,08
<b>Schaf Nr. 5</b>	0,09	0,09	0,1	0,12	0,11	0,1	0,08	0,05

Anmerkungen. ADP = Adenosindiphosphat, BZ = Blutungszeit, FA = final aggregation (Endaggregation), SD = Standardabweichung

Tabelle 27: Neugebildete Knochenfläche (%) pro Gesamtfläche bezogen auf die neugebildete Knochenfläche pro Gesamtfläche in der Kontrollgruppe (NanoBone<sup>®</sup> + Fibrin) innerhalb der einzelnen Schafe in den subkutanen NanoBone<sup>®</sup> Versuchsgruppen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

Blut	Knochenmark	60 $\mu\text{g/ml}$ rhBMP-2	kult. MSC	direkt reimplantierte MSC	kult. MSC + 60 $\mu\text{g/ml}$ rhBMP-2 in Fibrin	kult. MSC + 60 $\mu\text{g/ml}$ rhBMP-2 in Serum
2,50 $\pm$ 3,20	0,96 $\pm$ 1,79	0,92 $\pm$ 0,92	0,60 $\pm$ 0,86	0,08 $\pm$ 0,16	0,25 $\pm$ 2,01	3,19 $\pm$ 1,28

Anmerkungen. kult. MSC = kultivierte mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2

Tabelle 28: Neugebildete Knochenfläche ( $\text{mm}^2$ ) in den subkutanen NanoBone<sup>®</sup> Versuchsgruppen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

Fibrin	Blut	Knochenmark	60 $\mu\text{g/ml}$ rhBMP-2	kult. MSC	direkt reimplantierte MSC	kult. MSC + 60 $\mu\text{g/ml}$ rhBMP-2 in Fibrin	kult. MSC + 60 $\mu\text{g/ml}$ rhBMP-2 in Serum
0,53 $\pm$ 1,13	0,57 $\pm$ 0,63	0,36 $\pm$ 0,54	0,82 $\pm$ 0,68	0,47 $\pm$ 0,60	0,12 $\pm$ 0,16	1,65 $\pm$ 1,77	4,62 $\pm$ 2,14

Anmerkungen. kult. MSC = kultivierte mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2

Tabelle 29: Genexpression verschiedener Knochenmarker der subkutanen NanoBone® Versuchsgruppen (relativer Expressionsunterschied der Probe zwischen Behandlung und Kontrolle normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe) (Mittelwert ± Standardabweichung)

	Blut	Knochen- mark	60 µg/ml rhBMP-2	kult. MSC	direkt reimplantierte MSC	kult. MSC + 60µg/ml rhBMP-2 in Fibrin	kult. MSC + 60µg/ml rhBMP-2 in Serum
<b>Osteo- calcin</b>	95,9 ± 154,3	64,2 ± 61,9	16,0 ± 14,8	8,3 ± 16,0	2,2 ± 2,3	16,9 ± 28,9	236,7 ± 396,7
<b>Osteo- nectin</b>	2,4 ± 1,0	4,1 ± 5,3	3,2 ± 1,2	6,0 ± 11,3	8,0 ± 16,2	1,7 ± 1,0	3,0 ± 3,3
<b>Osteo- pontin</b>	0,7 ± 1,2	12,2 ± 26,	5,8 ± 6,3	14,9 ± 31,3	4,6 ± 8,2	4,1 ± 5,0	5,4 ± 6,4
<b>Kolla- gen I</b>	4,8 ± 5,3	6,6 ± 5,0	6,0 ± 6,5	1,8 ± 0,6	1,8 ± 1,2	1,0 ± 0,6	4,2 ± 6,7
<b>RUNX2</b>	6,1 ± 4,6	64,2 ± 6,6	5,1 ± 2,9	7,5 ± 13,8	3,7 ± 5,5	3,1 ± 2,1	8,0 ± 11,5

Anmerkungen. kult. MSC = kultivierte mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2, RUNX2 = runt-related transcription factor 2

Tabelle 30: Querschnittsfläche (mm<sup>2</sup>) der Konstrukte der subkutanen NanoBone® Versuchsgruppen (Mittelwert ± Standardabweichung)

Nano- Bone® nativ	Fibrin	Blut	Knochen- mark	60 µg/ml rhBMP-2	kult. MSC	direkt reim- plantierte MSC	kult. MSC + 60µg/ml rhBMP-2 in Fibrin	kult. MSC + 60µg/ml rhBMP-2 in Serum
91,2 ± 5,6	59,0 ± 10,2	31,9 ± 15,0	29,1 ± 12,0	55,7 ± 16,5	61,3 ± 7,6	50,7 ± 10,2	54,0 ± 18,2	62,2 ± 13,3

Anmerkungen. kult. MSC = kultivierte mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2

Tabelle 31: Querschnittsfläche (%) der Konstrukte der subkutanen NanoBone® Versuchsgruppen bezogen auf die Querschnittsfläche eines nativen NanoBone® Blockes vor Implantation (Mittelwert ± Standardabweichung)

Fibrin	Blut	Knochen- mark	60 µg/ml rhBMP-2	kult. MSC	direkt reim- plantierte MSC	kult. MSC + 60µg/ml rhBMP-2 in Fibrin	kult. MSC + 60µg/ml rhBMP-2 in Serum
64,7 ± 11,2	35,0 ± 16,1	31,9 ± 13,2	61,1 ± 19,2	67,2 ± 8,3	55,6 ± 11,2	59,2 ± 20,0	68,2 ± 14,6

Anmerkungen. kult. MSC = kultivierte mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2

Tabelle 32: Degradierter NanoBone® Anteil (%) der Konstrukte der subkutanen Versuchsgruppen bezogen auf einen nativen NanoBone® Block vor Implantation (Mittelwert ± Standardabweichung)

Fibrin	Blut	Knochenmark	60 µg/ml rhBMP-2	kult. MSC	direkt reimplantierte MSC	kult. MSC + 60µg/ml rhBMP-2 in Fibrin	kult. MSC + 60µg/ml rhBMP-2 in Serum
40,9 ± 12,1	40,2 ± 16,3	43,3 ± 4,0	45,3 ± 5,3	44,5 ± 16,6	37,7 ± 17,6	48,9 ± 14,0	55,0 ± 15,4

Anmerkungen. kult. MSC = kultivierte mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2

Tabelle 33: Gewebezusammensetzung (%) der Konstrukte der subkutanen NanoBone® Versuchsgruppen (Mittelwert ± Standardabweichung)

	Nano-Bone® nativ	Fibrin	Blut	Knochenmark	60 µg/ml rhBMP-2	kult. MSC	direkt reimplantierte MSC	kult. MSC + 60µg/ml rhBMP-2 in Fibrin	kult. MSC + 60µg/ml rhBMP-2 in Serum
NanoBone®	64,1 ± 0,6	38,0 ± 7,7	38,4 ± 10,4	36,4 ± 2,6	35,1 ± 3,4	35,6 ± 10,7	40,1 ± 11,3	32,8 ± 8,9	29,1 ± 9,9
Bindegewebe/ Poren	35,9 ± 0,6	61,0 ± 6,7	59,1 ± 9,1	62,5 ± 2,9	63,6 ± 2,9	63,6 ± 10,4	59,8 ± 11,1	64,3 ± 10,8	63,7 ± 13,3

Anmerkungen. kult. MSC = kultivierte mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2

Tabelle 34: Vitaler bzw. gewebedurchwachsender Konstruktanteil (%) der subkutanen NanoBone® Versuchsgruppen bezogen auf die Gesamtfläche des Gewebeschnittes (Mittelwert ± Standardabweichung)

Fibrin	Blut	Knochenmark	60 µg/ml rhBMP-2	kult. MSC	direkt reimplantierte MSC	kult. MSC + 60µg/ml rhBMP-2 in Fibrin	kult. MSC + 60µg/ml rhBMP-2 in Serum
79,4 ± 29,1	100 ± 0	100 ± 0	85,5 ± 19,9	80,5 ± 19,3	82,0 ± 19,6	82,0 ± 25,4	100 ± 0

Anmerkungen. kult. MSC = kultivierte mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2

Tabelle 35: Osteoklastenzahl pro 100  $\mu\text{m}$  NanoBone<sup>®</sup> Rand in den Konstrukten der subkutanen NanoBone<sup>®</sup> Versuchsgruppen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

Fibrin	Blut	Knochenmark	60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rhBMP-2	kult. MSC	direkt reimplantierte MSC	kult. MSC + 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rhBMP-2 in Fibrin	kult. MSC + 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ rhBMP-2 in Serum
0,8 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,4	0,7 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,3

Anmerkungen. kult. MSC = kultivierte mesenchymale Stammzellen, rhBMP-2 = rekombinantes menschliches Knochen-Morphogeneseprotein-2

Tabelle 36: Gewebezusammensetzung (%) der Loop Anteile 1–3 (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

	NanoBone <sup>®</sup> nativ	Loop Anteil 1	Loop Anteil 2	Loop Anteil 3
NanoBone <sup>®</sup>	64,1 $\pm$ 0,6	33,6 $\pm$ 4,5	34,2 $\pm$ 2,2	35,9 $\pm$ 5,4
Binde- gewebe/ Poren	35,9 $\pm$ 0,6	65,3 $\pm$ 4,5	64,7 $\pm$ 2,7	62,9 $\pm$ 5,3
Knochen- gewebe	-	1,1 $\pm$ 1,2	1,0 $\pm$ 1,0	1,2 $\pm$ 1,1
degradier- ter Nano- Bone <sup>®</sup> Anteil	-	47,5 $\pm$ 7,0	46,7 $\pm$ 3,5	44,1 $\pm$ 8,4

Tabelle 37: Vitaler bzw. gewebedurchwachsender Konstruktanteil (%) der Loop Anteile 1–3 bezogen auf die Gesamtfläche des Gewebeschnittes (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

Loop Anteil 1	Loop Anteil 2	Loop Anteil 3
96,0 $\pm$ 9,9	95,5 $\pm$ 10,0	87,6 $\pm$ 20,9

Tabelle 38: Osteoklastenzahl pro 100  $\mu\text{m}$  NanoBone<sup>®</sup> Rand der unterschiedlichen regions of interest der AV-loop NanoBone<sup>®</sup> Gruppe (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

arteriell	venös	peripher	zentral
0,3 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,2

## A.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Prinzip des Knochen Tissue Engineerings .....	14
Abbildung 2:	Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines NanoBone <sup>®</sup> Blockes in 5 000facher Vergrößerung.....	17
Abbildung 3:	Darstellung der extrinsischen und intrinsischen Blutgefäßversorgung .....	24
Abbildung 4:	Schematische und vereinfachte Darstellung der Bildung eines Thrombozytenaggregats .....	30
Abbildung 5:	Schematische Darstellung der sekundären Hämostase sowie ihrer Inhibitoren .....	32
Abbildung 6:	Clopidogrelmetabolismus (modifiziert nach (WALLENTIN, 2009; SILVESTRO et al., 2010)) .....	38
Abbildung 7:	Strukturformel von Ticagrelor im Vergleich zu Adenosintriphosphat (modifiziert nach (SPRINGTHORPE et al., 2007)).....	39
Abbildung 8:	Vereinfachtes Schema zur Wirkungsweise der in dieser Studie verwendeten Thrombozytenaggregationshemmer Acetylsalicylsäure, Clopidogrel und Ticagrelor .....	40
Abbildung 9:	Vereinfachtes Schema zur Wirkungsweise der in dieser Studie verwendeten Antikoagulanzen Enoxaparin-Natrium und Dabigatranetexilat.....	42
Abbildung 10:	NanoBone <sup>®</sup> Block für die subkutanen Implantationen.....	56
Abbildung 11:	NanoBone <sup>®</sup> Block für die AV-loop Versuchsgruppe.....	56
Abbildung 12:	Isolationskammer für die AV-loop Versuchsgruppe.....	57
Abbildung 13:	Vorbereitung für die subkutane Implantation der NanoBone <sup>®</sup> Blöcke .....	67
Abbildung 14:	Operationsfeld vor und nach Anastomosierung der Loop-Gefäße .....	68
Abbildung 15:	Tränkung des NanoBone <sup>®</sup> Blockes für die AV-loop Versuchsgruppe .....	69
Abbildung 16:	NanoBone <sup>®</sup> Block mit AV-loop und Isolationskammer.....	70
Abbildung 17:	Zuschnitt der AV-loop Explantate in drei Loop Anteile für die histologischen und immunhistologischen Analysen.....	74
Abbildung 18:	Schema für die histologische Auswertung der osteoklastischen Aktivität.....	82
Abbildung 19:	In der Lichttransmissionsaggregometrie gemessene Arachidonsäure- (A, B) und Kollagen-induzierte (C, D) Thrombozytenaggregation der Gruppe 1a und b (Acetylsalicylsäure in vivo).....	92
Abbildung 20:	In der Lichttransmissionsaggregometrie gemessene Arachidonsäure- (A) und Kollagen-induzierte (B) Thrombozytenaggregation der Gruppe 1c (Zugabe von Acetylsalicylsäure in vitro).....	93

Abbildung 21:	In der Lichttransmissionsaggregometrie gemessene Adenosindiphosphat-induzierte Thrombozytenaggregation der Gruppe 2a–c (150 mg, 225 mg, 375 mg Clopidogrel bid) .....	94
Abbildung 22:	In der Lichttransmissionsaggregometrie gemessene Adenosindiphosphat-induzierte Thrombozytenaggregation der Lämmer (Gruppe 2d) und Schafe (Gruppe 2c) im Vergleich.....	95
Abbildung 23:	In der Lichttransmissionsaggregometrie gemessene Adenosindiphosphat-induzierte Thrombozytenaggregation von Lamm Nr. 1–5 in Gruppe 2d (150 mg Clopidogrel bid) .....	96
Abbildung 24:	Clopidogrelcarbonsäure- und Clopidogrelplasmakonzentration der verschiedenen Altersgruppen im Vergleich .....	97
Abbildung 25:	Clopidogrelcarbonsäureplasmakonzentration der verschiedenen Altersgruppen im Vergleich .....	98
Abbildung 26:	In der Lichttransmissionsaggregometrie gemessene Adenosindiphosphat-induzierte Thrombozytenaggregation der Gruppen 3a–d (Ticagrelor) .....	99
Abbildung 27:	Darstellung der Aggregationskurven der Lichttransmissionsaggregometrie der einzelnen Schaf PRP Proben nach Zugabe des Agonisten Adenosindiphosphat am Messzeitpunkt Tag 7 in Gruppe 3d (540 mg Ticagrelor zweimal täglich).....	99
Abbildung 28:	Anti-Faktor Xa Aktivität in Gruppe 4a und b (Enoxaparin-Natrium).....	101
Abbildung 29:	Vergleich der Anti-Faktor Xa Aktivitäten nach Applikation von Enoxaparin-Natrium in den unterschiedlichen Altersgruppen .....	102
Abbildung 30:	Verlauf der Dabigatranplasmakonzentration am Tag 1 (A) und Tag 7 (B) nach Gabe von 600 mg Dabigatranetexilat bid (Gruppe 5) ....	103
Abbildung 31:	Exemplarische Darstellung der Dabigatranplasmakonzentration von Schaf Nr. 4 und Nr. 5 am Tag 7 der Behandlung mit Dabigatranetexilat (Gruppe 5).....	104
Abbildung 32:	Explantate der subkutanen Versuchsgruppen im makroskopischen Vergleich .....	106
Abbildung 33:	Repräsentative Ausschnitte der subkutanen Versuchsgruppen aus Bereichen mit eingewachsenen Gewebestrukturen in der Hämatoxylin Eosin (A–H, Q) und Masson-Goldner Trichrom (I–P) Färbung .....	107
Abbildung 34:	Darstellung der Knochenflächenauswertung in den subkutanen Versuchsgruppen .....	109
Abbildung 35:	Vorausgegangene Untersuchung zur Evaluierung eines geeigneten Trägermediums für das Aufnehmen von Zellen und Wachstumsfaktoren .....	110

Abbildung 36: Prozentuale Knochenneubildung in den subkutanen Versuchsgruppen bezogen auf die Gesamtfläche sowie auf die Fibrinkontrolle innerhalb von jedem Schaf .....	111
Abbildung 37: Absolute Knochenneubildung in mm <sup>2</sup> in den subkutanen Versuchsgruppen .....	111
Abbildung 38: Ergebnisse der molekularbiologischen Analyse der subkutanen Versuchsgruppen .....	112
Abbildung 39: Kollagen Typ I immunhistologische Färbung (subkutane Versuchsgruppen).....	113
Abbildung 40: Alkalische Phosphatase immunhistologische Färbung (subkutane Versuchsgruppen).....	114
Abbildung 41: Vergleich der Konstruktquerschnittsflächen der subkutanen Versuchsgruppen .....	115
Abbildung 42: Quantifizierung der NanoBone <sup>®</sup> Degradierungsraten und Gewebezusammensetzung der subkutanen Versuchsgruppen .....	116
Abbildung 43: (A–H): Repräsentative Ausschnitte der subkutanen Versuchsgruppen aus Bereichen mit eingewachsenen Gewebestrukturen in der Perjodsäure Schiff-Färbung.....	117
Abbildung 44: Quantifizierung der gewebedurchwachsenen bzw. vitalen Konstruktanteile der subkutanen Versuchsgruppen .....	118
Abbildung 45: Exemplarische Darstellung der Analyse der Elementzusammensetzung in den subkutanen Versuchsgruppen mittels energiedispersiver Röntgenspektroskopie .....	119
Abbildung 46: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen aus verschiedenen Bereichen der Gewebeschnitte der subkutanen Versuchsgruppen .....	120
Abbildung 47: Tartrat-resistente saure Phosphatase-Färbung (subkutane Versuchsgruppen).....	121
Abbildung 48: Osteoklastenzahl pro 100 µm NanoBone <sup>®</sup> Rand in den subkutanen Versuchsgruppen .....	121
Abbildung 49: Ki67-Färbung zur Detektion von proliferierenden Zellen in den subkutanen Versuchsgruppen .....	123
Abbildung 50: TUNEL-Färbung zur Detektion von apoptotischen Zellen in den subkutanen Versuchsgruppen .....	124
Abbildung 51: Von-Willebrand-Faktor immunhistologische Färbung (subkutane Versuchsgruppen).....	125
Abbildung 52: CD31-Färbung zur Detektion von Endothelzellen in den subkutanen Versuchsgruppen .....	126
Abbildung 53: Überprüfung der Durchgängigkeit der Loop-Gefäße mittels Dopplersonographie .....	127



Abbildung 54: Hämatoxylin Eosin- (A) und Masson Goldner Trichrom- (B) Färbung der AV-loop Versuchsgruppe.....	128
Abbildung 55: Degradierungsraten von NanoBone <sup>®</sup> und Darstellung der Gewebezusammensetzung der AV-loop Versuchsgruppe .....	129
Abbildung 56: Immunhistologische Detektion von Knochengewebe in der AV-loop Versuchsgruppe .....	130
Abbildung 57: Perjodsäure Schiff gefärbte Gewebeschnitte aus der AV-loop Versuchsgruppe .....	131
Abbildung 58: Hämatoxylin Eosin gefärbte Gewebeschnitte aus der AV-loop Versuchsgruppe .....	132
Abbildung 59: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen (A) und Ergebnisse der energiedispersiven Röntgenspektroskopie (B) eines Übergangsbereiches von gewebedurchwachsenen zu nicht gewebedurchwachsenen NanoBone <sup>®</sup> Bereichen eines AV-loop Konstruktes .....	133
Abbildung 60: TRAP-Färbung zur Detektion und Quantifizierung von Osteoklasten in der AV-loop Versuchsgruppe.....	134
Abbildung 61: Immunhistologische Detektion von proliferierenden und apoptotischen Zellen in der AV-loop Versuchsgruppe .....	135
Abbildung 62: Immunhistologische Detektion von Gefäßstrukturen in der AV-loop Versuchsgruppe .....	136
Abbildung 63: Darstellung der Ergebnisse der MRT-Untersuchungen.....	138
Abbildung 64: Isosurface-Extraktionen und farbkodierte Isosurface-Extraktionen der mikrocomputertomographischen Messungen der AV-loop Konstrukte..	141

### A.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Expression verschiedener ausgewählter Biomarker in Osteoblasten, unreifen und reifen Osteozyten (modifiziert nach (ROCHEFORT et al., 2010)) .....	6
Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Medikamente, Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Versuche zur Gerinnungshemmung.....	45
Tabelle 3: Übersicht über die Versuchsgruppen.....	54
Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Medikamente, Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Versuche mit mesenchymalen Stammzellen .....	58
Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Medikamente, Verbrauchsmaterialien und Geräte für die Durchführung der Operationen .....	63
Tabelle 6: Übersicht über die subkutanen Versuchsgruppen.....	66
Tabelle 7: Übersicht über die AV-loop Versuchsgruppe.....	68
Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte für die histologische Auswertung .....	71
Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten Antikörper.....	73
Tabelle 10: Entwässerungsprotokoll für die subkutanen und AV-loop Explantate .....	75
Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Geräte für die molekularbiologische Untersuchung.....	83
Tabelle 12: Übersicht der Sequenzen der verwendeten Primer.....	86
Tabelle 13: Programmierung des Bio-Rad iCycler iQ5 PCR Thermal Cycler.....	86
Tabelle 14: Ergebnisse der MRT-Messungen .....	137
Tabelle 15: Ergebnisse der $\mu$ CT-Messungen.....	140
Tabelle 16: Arachidonsäure- und Kollagen-induzierte Thrombozytenaggregation (%) gemessen in der Lichttransmissionsaggregometrie nach 10 Minuten und Blutungszeit in Gruppe 1a (Acetylsalicylsäure, 500 mg zweimal täglich per os) und 1b (Acetylsalicylsäure, 500 mg zweimal täglich intravenös) (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).....	208
Tabelle 17: Arachidonsäure- und Kollagen-induzierte ovine Thrombozytenaggregation (%) gemessen in der Lichttransmissionsaggregometrie nach 10 Minuten in Gruppe 1c (Acetylsalicylsäure, in vitro) (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).....	208
Tabelle 18: Adenosindiphosphat-induzierte Thrombozytenaggregation (%) gemessen in der Lichttransmissionsaggregometrie nach 10 Minuten und Blutungszeit in Gruppe 2a–c (Schafe, Clopidogrel) (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).....	208

Tabelle 19: Adenosindiphosphat-induzierte Thrombozytenaggregation (%) gemessen in der Lichttransmissionsaggregometrie nach 10 Minuten der einzelnen Schafe in Gruppe 2c (Schafe, Clopidogrel 375 mg zweimal täglich) .....	209
Tabelle 20: Adenosindiphosphat-induzierte Thrombozytenaggregation (%) gemessen in der Lichttransmissionsaggregometrie nach 10 Minuten und Blutungszeit in Gruppe 2d (Lämmer, Clopidogrel 150 mg zweimal täglich) (Mittelwert ± Standardabweichung) .....	209
Tabelle 21: Clopidogrelcarbonsäure- und Clopidogrelkonzentration in Gruppe 2c (Schafe, Clopidogrel 375 mg zweimal täglich) und 2d (Lämmer, Clopidogrel 150 mg zweimal täglich) (ng/ml) (Mittelwert ± Standardabweichung) .....	209
Tabelle 22: Adenosindiphosphat-induzierte Thrombozytenaggregation (%) gemessen in der Lichttransmissionsaggregometrie nach 10 Minuten und Blutungszeit in Gruppe 3a–d (Ticagrelor) (Mittelwert ± Standardabweichung) .....	210
Tabelle 23: Anti-Faktor Xa Aktivität (IU/ml) in Gruppe 4a und b (Schafe, Enoxaparin-Natrium) sowie in Gruppe 4c und d (Lämmer, Enoxaparin-Natrium) (Mittelwert ± Standardabweichung) .....	210
Tabelle 24: Anti-Faktor Xa Aktivität (IU/ml) über 24 Stunden in Gruppe 4b von zwei Schafen am Tag 7 der Behandlung (Enoxaparin-Natrium, 3 mg/kg s. c. zweimal täglich) .....	210
Tabelle 25: Dabigatranplasmakonzentration (µg/ml) in Gruppe 5 (Dabigatranetexilat, 600 mg zweimal täglich) (Mittelwert ± Standardabweichung) .....	211
Tabelle 26: Dabigatranplasmakonzentration (µg/ml) der einzelnen Schafe in Gruppe 5 am Tag 7 (Dabigatranetexilat, 600 mg zweimal täglich) .....	211
Tabelle 27: Neugebildete Knochenfläche (%) pro Gesamtfläche bezogen auf die neugebildete Knochenfläche pro Gesamtfläche in der Kontrollgruppe (NanoBone <sup>®</sup> + Fibrin) innerhalb der einzelnen Schafe in den subkutanen NanoBone <sup>®</sup> Versuchsgruppen (Mittelwert ± Standardabweichung) .....	211
Tabelle 28: Neugebildete Knochenfläche (mm <sup>2</sup> ) in den subkutanen NanoBone <sup>®</sup> Versuchsgruppen (Mittelwert ± Standardabweichung) .....	211
Tabelle 29: Genexpression verschiedener Knochenmarker der subkutanen NanoBone <sup>®</sup> Versuchsgruppen (relativer Expressionsunterschied der Probe zwischen Behandlung und Kontrolle normalisiert zum Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe) (Mittelwert ± Standardabweichung) .....	212
Tabelle 30: Querschnittsfläche (mm <sup>2</sup> ) der Konstrukte der subkutanen NanoBone <sup>®</sup> Versuchsgruppen (Mittelwert ± Standardabweichung) .....	212
Tabelle 31: Querschnittsfläche (%) der Konstrukte der subkutanen NanoBone <sup>®</sup> Versuchsgruppen bezogen auf die Querschnittsfläche eines nativen NanoBone <sup>®</sup> Blockes vor Implantation (Mittelwert ± Standardabweichung) .	212

Tabelle 32: Degradierter NanoBone <sup>®</sup> Anteil (%) der Konstrukte der subkutanen Versuchsgruppen bezogen auf einen nativen NanoBone <sup>®</sup> Block vor Implantation (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).....	213
Tabelle 33: Gewebezusammensetzung (%) der Konstrukte der subkutanen NanoBone <sup>®</sup> Versuchsgruppen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).....	213
Tabelle 34: Vitaler bzw. gewebedurchwachsender Konstruktanteil (%) der subkutanen NanoBone <sup>®</sup> Versuchsgruppen bezogen auf die Gesamtfläche des Gewebeschnittes (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).....	213
Tabelle 35: Osteoklastenzahl pro 100 $\mu$ m NanoBone <sup>®</sup> Rand in den Konstrukten der subkutanen NanoBone <sup>®</sup> Versuchsgruppen (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).....	214
Tabelle 36: Gewebezusammensetzung (%) der Loop Anteile 1–3 (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).....	214
Tabelle 37: Vitaler bzw. gewebedurchwachsender Konstruktanteil (%) der Loop Anteile 1–3 bezogen auf die Gesamtfläche des Gewebeschnittes (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).....	214
Tabelle 38: Osteoklastenzahl pro 100 $\mu$ m NanoBone <sup>®</sup> Rand der unterschiedlichen regions of interest der AV-loop NanoBone <sup>®</sup> Gruppe (Mittelwert $\pm$ Standardabweichung).....	214

## 10 Wissenschaftliche Publikationen

### 10.1 Originalarbeiten

Weigand A, Boos AM, Ringwald J, Mieth M, Kneser U, Arkudas A, Bleiziffer O, Klumpp D, Horch RE, Beier JP

New aspects on efficient anticoagulation and antiplatelet strategies in sheep submitted to BMC Veterinary Research

Boos AM, Loew JS, Weigand A, Deschler G, Klumpp D, Arkudas A, Bleiziffer O, Gulle H, Kneser U, Horch RE, Beier JP

Engineering axially vascularized bone in the sheep arteriovenous-loop model  
J Tissue Eng Regen Med. 2012 Mar 22. doi: 10.1002/term.1457. [Epub ahead of print]

### 10.2 Konferenzbeiträge

Boos AM, Weigand A, Kneser U, Horch RE, Beier JP

Tissue Engineering von primär stabilem Knochenersatz im Schafmodell mittels mesenchymalen Stammzellen und BMP-2 in einer nanokristallinen Knochenersatzmatrix (Vortrag)

Gemeinsame Jahrestagung DGPRÄC/VDÄPC Bremen, Deutschland, 13.09.–15.09.2012

Weigand A, Boos AM, Kneser U, Horch RE, Beier JP

Anticoagulation therapy in a sheep model for vascularized tissue engineering (Posterpräsentation)

TERMIS World Congress, Wien, Österreich, 05.09.–08.09.2012

Boos AM, Weigand A, Kneser U, Horch RE, Beier JP

Autologous serum improves matrix remodelling and bone formation in the sheep model (Posterpräsentation)

TERMIS World Congress, Wien, Österreich, 05.09.–08.09.2012

Thomas BF, Bräutigam R, Weigand A, Kneser U, Horch RE, Beier JP, Boos AM  
Establishing of an autonomous lymphatic vessel network in the AV-loop model using lymphatic endothelial cells and mesenchymal stem cells (Posterpräsentation)

12. IZKF-Doktoranden-Workshop, Erlangen, Deutschland, 25.07.2012

Boos AM, Graf K, Thomas BF, Weigand A, Kneser U, Horch RE, Beier JP  
Establishing of an autonomous lymphatic vessel network in the AV-loop model using  
lymphatic endothelial cells and mesenchymal stem cells (Posterpräsentation)  
International IZKF-Symposium, Bad Staffelstein, Deutschland, 19.04.–21.04.2012

Boos AM, Beier JP, Weigand A, Loew JS, Deschler G, Kneser U, Horch RE  
Axial vaskularisiertes Knochengewebe im Großtiermodell (Vortrag)  
Gemeinsame Jahrestagung ÖGPÄRC/DGPRÄC/VDÄPC Innsbruck, Österreich,  
29.09.–01.10.2011

Boos AM, Beier JP, Loew JS, Weigand A, Kneser U, Horch RE  
Vascularized tissue engineered bone using directly auto-transplanted mesenchymal stem  
cells and rhBMP-2 in the AV-loop sheep model (Vortrag)  
TERMIS EU Meeting, Granada, Spanien, 07.06.–10.06.2011

Boos AM, Beier JP, Loew JS, Weigand A, Kneser U, Horch RE  
Vascularized tissue engineered bone using directly auto-transplanted mesenchymal stem  
cells and rhBMP-2 in the AV-loop sheep model (Posterpräsentation)  
Gordon Research Seminar Bones & Teeth, Les Diablerets, Schweiz, 12.06–17.06.2011

## 11 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Köstlin für die Übernahme und Betreuung dieser externen Doktorarbeit, das mir entgegengebrachte Vertrauen und den großen Freiraum, den er mir bei der Gestaltung der Arbeit gewährte.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Professor Horch bedanken, der mir ermöglichte diese Arbeit in der Plastisch- und Handchirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Erlangen durchzuführen und mich im großen Team des Forschungslabors aufgenommen hat.

Herrn PD Dr. med. Justus P. Beier gilt mein allerbesten Dank. Ich danke ihm für die Überlassung des Themas, seine kontinuierliche Unterstützung und Förderung meiner Forschungstätigkeit. Seine wertvollen Ratschläge, Anregungen und konstruktive Kritik haben einen wichtigen Anteil am Gelingen der Arbeit genommen.

Bei Dr. med. Anja M. Boos möchte ich mich vielmals für die unermüdliche Unterstützung bedanken. Ihr engagierter Einsatz und ihre Mitarbeit machten es erst möglich, dieses Projekt durchzuführen. Ganz besonders weiß ich ihre überaus große Unterstützung über den gesamten Verlauf der Arbeit, ihre Diskussionsbereitschaft sowie die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit zu schätzen.

Außerdem bedanke ich mich bei den Kooperationspartnern, Herrn Professor Gerber für die Bereitstellung der vielen NanoBone<sup>®</sup> Blöcke und den großen Aufwand bei der Herstellung der passgenauen Blöcke; Herrn Professor Greil für die Anfertigung der Teflonkammern; Herrn Dr. Gerd Holzhüter für die Unterstützung bei der Durchführung der REM-Aufnahmen und EDX-Analysen sowie der Auswertung; bei Herrn PD Dr. Andreas Hess, Dr. Lubos Budinsky sowie Dr. Marek Karolczak für die Hilfestellung bei der Durchführung der MRT- und  $\mu$ CT-Messungen sowie bei der Auswertung.

Weiterhin möchte ich mich für die Kooperation bei Herrn Professor Ringwald bedanken, für die Möglichkeit der Nutzung des Gerinnungslabors und für seine vielzähligen konstruktiven Ratschläge. Vielen Dank an Frau Hahn und das ganze Team im Gerinnungslabor.

Mein Dank gilt Frau Dr. Maren Mieth und Herrn Auge für die Hilfestellungen und Unterstützungen bei der Durchführung und Auswertung der HPLC-MS/MS.

Vielen Dank an die Technischen Assistenten Marina Milde, Stefan Fleischer und Ilse Arnold-Herbeth für ihre vielfältige technische Unterstützung sowie die sehr angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor. Insbesondere möchte ich mich bei Stefan bedanken, seine Bereitschaft zu jeder Zeit im Labor und bei den Schafen mitzuarbeiten macht ihn zu einem unersetzlichen VMTA.

Einen großen Dank gilt allen Mitarbeitern aus der Klinik sowie dem Forschungslabor der Plastisch- und Handchirurgischen Klinik, die durch ihre fachliche Beratung sowie durch ihre menschliche Unterstützung viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank an alle Doktoranden, die mich während der letzten Jahre sehr unterstützt haben und durch die es im Labor niemals langweilig wurde.

Vielen Dank an Katharina, Johann, Alex, David und Jasmin für die gute Pflege und die intensive Beschäftigung mit den Schafen.

Bei meinen Eltern, Gisela und Norbert bedanke ich mich für den großen Rückhalt, die grenzenlose Bereitschaft mich in meiner Arbeit zu unterstützen und nicht zuletzt das große Verständnis, das ich in den letzten Jahren erfahren habe. Ein spezieller Dank sei an dieser Stelle meiner Schwester Sonja ausgesprochen, die für mich nicht nur eine menschlich sondern auch fachlich sehr wertvolle Hilfe war. Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinem langjährigen Freund Benjamin für seine emotionale Unterstützung, sein unendliches Verständnis für meine Arbeit in den letzten Jahren und den Hinweis, dass es auch außerhalb des Labors noch ein Leben gibt.