

Aus der Klinik für Orthopädie und Unfallchirurgie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.- Prof. Dr. med. Joachim Windolf

Heilung von Knochendefekten im Kaninchenmodell unter Verwen-
dung von autologen Wachstumsfaktoren

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
David Kirchesch
2021

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.: David Kirchesch

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Johannes Schneppendahl

Zweitgutachter: PD Dr. med. Amin Polzin

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern, die immer an mich geglaubt haben.

Zusammenfassung

Die hier vorliegende Studie sollte am Kaninchenmodell testen, ob der Zusatz von plättchenreichem Plasma (PRP) zu einer Mischung aus Calciumphosphatgranulat (CPG) und Knochenmarkkonzentrat (BMC) die Knochenneubildung stärker fördert, als CPG und BMC allein.

Zusätzlich wurden die Ergebnisse mit denen einer Positivkontrolle verglichen, die ein autologes Knochenransplantat und damit den Goldstandard in der Behandlung von chronischen Knochendefekten in der klinischen Praxis erhielt. Die Knochenneubildung wurde dabei mittels digitaler Volumentomographie (DVT) und histomorphometrisch nach drei und sechs Wochen gemessen. Immunhistochemisch wurde die Mikrogefäßdichte im Knochendefekt ebenfalls nach drei und sechs Wochen gemessen.

Die PRP-Gruppe zeigte sowohl in der DVT als auch histomorphometrisch nach jeweils drei und sechs Wochen eine stärkere Knochenneubildung als die BMC-Gruppe. Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Positivkontrolle und der PRP-Gruppe nachgewiesen werden. Die Knochenneubildung in der BMC-Gruppe war auch gegenüber der Positivkontrolle signifikant geringer.

Damit stellt sich die Kombination aus BMC/CPG plus PRP der reinen BMC/CPG-Mischung als Implantatmaterial überlegen dar. Da kein Unterschied zwischen PRP und der Positivkontrolle bestand, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass PRP möglicherweise eine tragfähige Alternative zum autologen Knochenransplantat ist, das mit Morbidität an der Entnahmestelle einhergeht und nur begrenztes Spendermaterial zu Verfügung stellen kann.

Angiogenese ist eine notwendige Voraussetzung für die vollständige Ausheilung eines Knochendefektes und kann über die Bestimmung der Mikrogefäßdichte zu verschiedenen Zeitpunkten quantifiziert werden. Die Messung der Mikrogefäßdichte zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen der BMC und der PRP-Gruppe.

Beide Gruppen zeigten eine höhere Mikrogefäßdichte nach sechs Wochen als nach drei Wochen, was für eine gute Angiogenese spricht. Die Mikrogefäßdichte in der Positivkontrolle wurde nicht gemessen.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ihh-Signalweg: Ihh bindet an Ptch, wodurch seine inhibierende Wirkung auf Smo aufgehoben wird (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009).....	6
Abbildung 2: Smad-abhängiger BMP-Signalweg: Autocrin oder paracrin produzierte BMP binden an den BMP-Rezeptor und aktivieren Smad-Transkriptionsfaktoren. Noggin wirkt als Inhibitor (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009).....	7
Abbildung 3: wnt/ β -catenin-Signalweg. Bindung von Wnt and seinen Rezeptor Fzd befreit β -catenin von seinen Inhibitoren APC, Axin und GSK, wodurch es in den Nukleus transloziert und die Transkription der Wnt-Targetgene auslöst (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009)	9
Abbildung 4: MAPK-Signalweg. MAPK kann sowohl inhibierend (GSK β 3 und Smad-Proteine) als auch aktivierend (Runx2 und Dlx5) wirken und nimmt damit Einfluss sowohl auf den BMP als auch den Wnt-Signalweg (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009).....	11
Abbildung 5: Differenzierungswege der MSZ. Die Expression von Runx2 ist ein früher Schritt in Richtung Osteoblasten/Chondroblasten und den Weg von der Differenzierung in Richtung Fettzellen. Der Einfluss von Ihh-, PTHrP-, BMP- und Wnt-Signalen festigt die Differenzierung der Osteoblastenchondroblastenprogenitorzellen in Richtung Osteoblasten (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009).....	12
Abbildung 6: Signaltransduktion in der TGF- β -Ligandenfamilie. TGF- β (Ligand) bindet an den Typ-II Rezeptor, der den Typ-I Rezeptor rekrutiert und phosphoryliert. Dies führt zur Phosphorylierung von R-Smads, die zusammen mit Smad4 (Co-Smad) in den Nukleus translozieren und an ihre Targetgene binden (Padgett, 1999).	14
Abbildung 7: Signaltransduktion von PDGF. PDGF hat seinen eigenen Rezeptor, kann aber auch mit niedriger Affinität mit dem EGFR und einigen GPCR interagieren. Die Signaltransduktion erfolgt über PI3K und Src (Sino Biological Inc., 2017).....	15
Abbildung 8: VEGF und VEGF-Rezeptorinteraktionen (Shibuya, 2011).....	17
Abbildung 9: Thrombozytenkonzentration im Vollblut und im PRP.	34
Abbildung 10: TGF- β 1-Konzentration im Plasma und im PRP.....	34
Abbildung 11: PDGF- β β -Konzentration im Plasma und im PRP.....	35
Abbildung 12: VEGF-Konzentration im Plasma und im PRP.....	35
Abbildung 13: Knochenregeneration nach drei und sechs Wochen in der Kontroll-, PRP- und BMC-Gruppe gemessen mit DVT.....	36
Abbildung 14: Knochenregeneration im kortikalen Defektbereich nach drei und sechs Wochen in der Kontroll-, PRP- und BMC-Gruppe gemessen mit Histomorphometrie. ..	38
Abbildung 15: Knochenregeneration im Spongiosabereich nach drei und sechs Wochen in der Kontroll-, PRP- und BMC-Gruppe gemessen mit Histomorphometrie.	38
Abbildung 16: Mikrogefäßdichte in den immunohistochemischen Schnitten der PRP- und BMC-Gruppen nach jeweils drei und sechs Wochen.	39

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich von Plättchenkonzentration und Konzentrationen verschiedener Wachstumsfaktoren in nativem Blut und PRP	33
---	----

Abkürzungsverzeichnis

ACD-A	Citrat-Antikoagulans (Anticoagulant-citrate-dextrose)
ALK	Activin-Receptor-like Kinase
BMA	Knochenmarkspirat (bone marrow aspirate)
BMC	Knochenmarkkonzentrat (bone marrow concentrate)
BMP	Bone Morphogenetic Proteins
CDHA	Calcium-defiziente Hydroxyapatitblöcke
CPG	Kalziumsphosphatgranulat
DVT	Digitale Volumetomographie
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EGF	Epithelial growth factor
ESWL	Extrakorporale Stoßwellentherapie
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fötales Kälberserum
Flt	Fms-like tyrosine kinase
GliA	aktivierende Gli-Transkriptionsfaktoren
GliR	Gli-Repressor
GPCR	G-protein coupled receptor
GSK3 β	Glycogensynthetase Kinase 3 β
HU	Hounsfield Unit
Id	Inhibitor of DNA binding
Ihh	Indian hedgehog
IL	Interleukin
LiCl	Lithiumchlorid
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein
MAPK	MAP-Kinasen

MGD	Mikrogefäßdichtezahl
MSZ	Mesenchymale Stammzellen
NF κ B	Nuclear factor κ B
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGF	Placental Growth Factor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PK	Proteinkinase
PRP	Plättchenreiches Plasma
PRPG	Plättchenreiches Plasma-Gruppe
Ptch	Patched
PTHrP	Parathormon-verwandtes Protein (parathyroid hormone-related protein)
SARA	SMAD anchor for receptor activation
SCID	severe combined immuno deficient
SD	Standardabweichung (standard deviation)
TNF	Tumornecrosis factor
TGF- β	Transforming growth factor beta
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	VEGF-Rezeptor
Wnt	Wingless-related integration site

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	V
Abbildungsverzeichnis.....	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
Inhaltsverzeichnis.....	XI
1 Einleitung	1
1.1 Knochendefekte	1
1.2 Mesenchymale Stammzellen	3
1.3 Knochendifferenzierung in der Embryonalentwicklung	5
1.4 Regulation des Knochenauf- und -abbaus bei Knochendefekten und Frakturen 18	
1.4.1 Primäre Knochenheilung.....	18
1.4.2 Sekundäre Knochenheilung.....	19
1.4.3 Übertragbarkeit des Tiermodells auf den Menschen	23
1.5 Plättchenreiches Plasma (PRP).....	23
1.6 Calciumphosphatgranulat (CPG) und andere Knochenersatzmaterialien	24
1.7 Fragestellung und Hypothesen	26
2 Material und Methoden	26
2.1 Versuchstiere	27
2.2 Operationstechnik	27
2.3 Knochenmarkkonzentrat (BMC).....	28
2.4 Plättchenreiches Plasma (PRP).....	29
2.5 Digitale Volumentomographie (DVT)	29
2.6 Histologische Aufbereitung	30
2.7 Histomorphometrische Analyse	30
2.8 Immunhistochemie.....	30
2.9 Statistische Analyse.....	31
3 Ergebnisse	32
3.1 Plättchen- und Wachstumsfaktorkonzentration im PRP.....	32
3.2 Digitale Volumentomographie (DVT)	36
3.3 Histomorphometrische Analyse	37

3.4	Immunohistochemische Analyse.....	39
4	Diskussion.....	40
5	Schlussfolgerung.....	50
6	Referenzen	51

1 Einleitung

1.1 Knochendefekte

Knochenbrüche sind eine häufige Folge von Unfällen. Da das Regenerationspotential des menschlichen Knochens hoch ist, heilen die meisten Frakturen ohne Probleme oder Spätfolgen. Doch in einigen Fällen können Frakturen zu bleibenden Knochendefekten und zur Nicht-Vereinigung des Bruchs führen. Erkrankungen wie Tumore, Fehlbildungen des Skelettsystems und Pseudarthrosen stellen weitere Ursachen von Knochendefekten dar.

Die derzeitige medizinische Praxis verwendet autologe Knochen transplantation als Standardtherapie von Knochendefekten, wie sie durch die Nicht-Vereinigung von Frakturen entstehen können (Mahendra und Maclean, 2007). Trotz der Fortschritte in der Implantations- und chirurgischen Technik und bei der Pflege der Patienten können verschiedene Faktoren wie Komorbiditäten, die die Wundheilung negativ beeinflussen, schlechte chirurgische Technik oder biomechanischer Instabilität zu Defektsituationen führen, die dauerhaft bestehen bleiben (Phieffer und Goulet, 2006). Solche Defekte verringern die Lebensqualität der betroffenen Patienten gravierend. Daneben sind sie mit erheblichen volkswirtschaftliche Kosten verbunden und stellen eine andauernde chirurgische und wissenschaftliche Herausforderung dar (DeCoster et al., 2004). Eine Literaturübersicht aus dem Jahr 2007 fand eine Rate von 0 - 7 % von Nicht-Vereinigungen nach einer Fraktur des Femurschafts, die operativ behandelt wurde, und von 0 - 13 % wenn Femurschaftfrakturen nicht-operativ behandelt wurden (Froelke und Patka, 2007). Nicht-Vereinigungsraten von Femurschaftfrakturen, die mit einem intermedullären Nagel behandelt wurden, lagen zwischen 0 und 33 %. Die Inzidenz solcher Frakturen steigt mit zunehmendem Alter an (Requena et al., 2014).

Das Durchschnittsalter der Bevölkerung steigt und damit wächst die Inzidenz von Frakturen in den Industrienationen stetig (WHO, 2014). Damit steigt auch die Prävalenz von Frakturen mit Nicht-Vereinigung. Besonders gefährdet sind Knochendefekte in Regionen mit geringer Weichteildeckung (WHO, 2014). Weitere Risikofaktoren für chronische Knochendefekte sind neben dem Alter der Patienten, Rauchen, geringer O_2 -Partialdruck im

Blut und Diabetes mellitus (Mannaioni, Di Bello und Masini, 1997; Lawrence, 1998; Hernigou et al., 2006; Veillette und McKee, 2007).

In der Vergangenheit wurden solche chronischen Knochendefekte mit Amputation behandelt. Heutzutage existieren viele verschiedene Behandlungsmethoden (Giannoudis und Pountos, 2005). Am häufigsten wird dabei die autologe Knochentransplantation eingesetzt, die deswegen auch als Goldstandard der Behandlungsansätze von Knochendefekten bezeichnet wird (Le Blanc et al., 2003; Markopoulou et al., 2009). Durch zusätzliche Therapieformen, wie zum Beispiel die Verbesserung der Stabilität oder Dynamisierung der intermedullären Nägel und der Einsatz von Wachstumsfaktoren, kann zusätzlich die Biomechanik des betroffenen Bereiches verbessert werden (Markopoulou et al., 2009). Die Behandlung von Pseudarthrosen kann hiermit nach Angaben verschiedener Publikationen Heilungsraten zwischen 87 und 100 % erzielen (Bellabarba, Ricci und Bolhofner, 2001; Finkemeier und Chapman, 2002; Babhulkar, Pande und Babhulkar, 2005; Plachokova et al., 2007).

Zusätzliche Behandlungsmöglichkeiten, die beim Therapieversagen dieser Methoden eingesetzt werden können sind die extrakorporale Stoßwellentherapie (ESWL), der Einsatz von osteokonduktiven und osteoinduktiven Knochenersatzmaterialien und Ultraschalltherapie (Lynch et al., 1989; Jiang, Dziak und Lynch, 1999; Johnsson et al., 1999; Mehrara et al., 1999; Giannoudis, Dinopoulos und Tsiridis, 2005; Calori et al., 2008; Sammartino et al., 2009; Jungbluth et al., 2010). Trotz aller Bemühungen ist die Heilungsrate hierbei nicht 100 %, d. h. bei einem Teil der Patienten entwickelt sich eine therapie-refraktäre Pseudarthrose.

Ein entscheidender Nachteil der autologen Knochentransplantation ist die Morbidität an der Entnahmestelle. Zusätzlich steht autologe Spongiosa nur begrenzt zur Verfügung (Arrington et al., 1996). Um diese Limitationen zu vermeiden, werden natürliche oder synthetische Knochensubstitute verwendet, die in den letzten Jahren mit dem Ziel entwickelt wurden, den Einsatz von autologen Knochen zu verringern und letztendlich ganz zu ersetzen (Pierce et al., 1992; Cornell, 1999). Wegen ihrer chemischen und kristallinen Ähnlichkeit mit natürlichen Knochen eignen sich hier Kalziumphosphatgranulate (CPG)

besonders als osteokonduktive Knochenersatzmaterialien. Der Zusatz von osteoinduktiven Wachstumsfaktoren kann hierbei die Knochenneubildung zusätzlich verbessern und die Resorption des Knochensubstituts in der Defektzone beschleunigen (Lind, 1998; Kerwin et al., 2000; Wang et al., 2005).

1.2 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSZ), auch als mesenchymale Stromazellen bezeichnet, wurden in den 1960er Jahren von Friedenstein und Mitarbeitern erstmals beschrieben (Friedenstein et al., 1968; Friedenstein, Chailakhjan und Lalykina, 1970). Es handelt sich bei diesen Zellen um die pluripotenten Vorläuferzellen unter anderem von Knochen-, Knorpel- und Fettzellen (Caplan, 1991). Diese Zellen kommen im Knochenmark vor und können sich auch in andere Zelltypen, wie z. B. Muskelzellen, verschiedene epitheliale Zelltypen, sowie Neuronen differenzieren, wobei unklar ist, ob dies unter physiologischen Bedingungen eine Rolle spielt (Pittenger et al., 1999; Jiang et al., 2002). Sie können auch aus Nabelschnurblut isoliert werden (Erices, Conget und Minguell, 2000; Wang et al., 2004). MSZ sind nicht zu verwechseln mit hämatopoetischen Stammzellen, die ebenfalls im Knochenmark vorkommen.

Die Tatsache, dass MSZ mittlerweile in einer Reihe anderer adulter Gewebetypen, wie Synoviamembran, Zahnpulpa, peripheres Blut, und Fettgewebe gefunden wurden (Gronthos et al., 2000; Zvaifler et al., 2000; De Bari et al., 2001; Zuk et al., 2002), spricht dafür, dass diese Zellen in allen mesenchymalen Geweben residieren und dort für die Heilung von Verletzungen benötigt werden. Es ist allerdings möglich, dass diese MSZ, die aus den verschiedenen Gewebetypen isoliert wurden, trotz aller Ähnlichkeiten tatsächlich unterschiedliche Zellen sind, was die Charakterisierung dieser Zellen und Einordnung der Ergebnisse verschiedener Publikationen, die mit unterschiedlichen Isolaten und Versuchsbedingungen arbeiten, erschwert (Sarukhan, Zanotti und Viola, 2015).

Für die hier vorliegende Arbeit sollen deswegen nur Ergebnisse von Versuchen mit MSZ aus dem Knochenmark diskutiert werden. Diese prototypischen MSZ haben die Fähigkeit

an Plastik zu adhären, sich *in vitro* in Adipozyten, Chondrozyten oder Osteoblasten zu differenzieren und exprimieren die Oberflächenmarker CD73, CD90 und CD105 (Dominici et al., 2006; Sarukhan, Zanotti und Viola, 2015). Welche Faktoren bei der Entscheidung eine Rolle spielen, in welche dieser drei möglichen Richtungen sich MSZ ausdifferenzieren, soll im nächsten Abschnitt erklärt werden.

In der Praxis werden MSZ inzwischen häufig zur Verbesserung der Knochenheilung sowohl bei Frakturen, chronischen Knochendefekten also auch bei der Augmentierung der knöchernen Einsatzstelle von Dentalimplantaten in der Kieferchirurgie eingesetzt (Kraus und Kirker-Head, 2006; Wu et al., 2007; Khosla, Westendorf und Mödder, 2010; Jones und Yang, 2011; Wang et al., 2013, 2014; Crane und Cao, 2014; Rosset, Deschaseaux und Layrolle, 2014; Sponer et al., 2014). MSZ sind immunprivilegiert und scheinen keine Abstoßungsreaktion hervorzurufen, wenn allogene MSZ zur Knochenheilung mit einem geeigneten Substrat in die Defektstelle implantiert werden (Kraus und Kirker-Head, 2006). MSZ werden häufig in Kombination mit Knochenmatrixmaterialien wie entmineralisierte Knochenchips oder verschiedenen Calciumphosphatmaterialien verwendet und können dann auch zur Behandlung größerer Knochendefekte verwendet werden (Jones und Yang, 2011; Wang et al., 2013, 2014; Rosset, Deschaseaux und Layrolle, 2014), können aber auch subkutan injiziert oder ohne Knochenmatrix direkt in den Knochendefekt eingebracht werden (Rosset, Deschaseaux und Layrolle, 2014). Da Knochenmark aus dem Beckenkamm nur in begrenzter Menge zur Verfügung steht, wurden Behandlungsprotokolle entwickelt, bei denen MSZ aus dem Knochenmark vor der Verwendung in einem Knochenmatriximplantat *in vitro* expandiert wurden. Sie lassen sich dabei bis zu mehreren Wochen *in vitro* kultivieren. Andere Protokolle verwenden natives autologes Knochenmark oder wie in der hier vorliegenden Studie Knochenmarkkonzentrat als Quelle von MSZ (Rosset, Deschaseaux und Layrolle, 2014). Da Angiogenese ein limitierender Faktor bei der Knochenheilung ist, wurden Versuche unternommen, in denen das Transplantatkonstrukt bestehend aus Hydroxylapatitmatrix und MSZ vor der Implantierung in den Knochendefekt für einige Wochen in einen Muskel im Patienten implantiert wurde. Ein Teil des Muskels zusammen mit dem entstandenen Gefäßstiel wurde dann ebenso wie das Knochenersatzmaterial erfolgreich in den Knochendefekt implantiert (Warnke et al., 2006). In vielen klinischen Studien mit Patienten mit chronischen

Knochendefekten haben sich MSZ als überlegen gegenüber einer Knochenmatrix ohne Stammzellen gezeigt (Kraus und Kirker-Head, 2006; Jones und Yang, 2011; Rosset, Deschaseaux und Layrolle, 2014; Wang et al., 2014)

1.3 Knochendifferenzierung in der Embryonalentwicklung

Die Entwicklung von Knochen in der Embryogenese und Heilung von Knochenverletzungen im erwachsenen Wirbeltier weisen viele Ähnlichkeiten auf, weswegen die Knochenentwicklung im Embryo als Modell der Frakturheilung angesehen werden kann (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009).

Bei der Knochenentwicklung und Differenzierung von pluripotenten MSZ in ausgereifte Osteoblasten spielen verschiedene Signalwege eine entscheidende Rolle, die untereinander kommunizieren und sich komplementieren. Die wichtigsten Signalwege und ihre Rolle bei der Osteoblastendifferenzierung werden im Folgenden kurz vorgestellt. Dazu gehören die Signalwege der Mitglieder der Hedgehog-Familie, des Parathormon-verwandten Proteins (PTHrP- parathyroid hormone-related protein), der *Wingless-related integration site* (Wnt), der *bone morphogenetic proteins* (BMP) und der Mitogen-aktivierten Protein(MAP)-Kinasen (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009).

Der Indian Hedgehog (Ihh)-Signalweg

Die meisten Knochen im Wirbeltierskelett werden über eine enchondrale Knochenbildung genannten Prozess gebildet. Dabei formt sich erst ein Knorpelskelett, das anschliessend in Knochen umgebildet wird, wobei die Knorpelmatrix als Gerüst für den neugebildeten Knochen dient (Hall und Miyake, 2000).

Einer der wichtigsten Regulatoren den enchondralen Knorpelkondensation ist Indian Hedghog (Ihh), ein Signalmolekül der Hedghog-Familie. Ihh-Signale aktivieren unter anderem die Chondrozytenproliferation und die Synthese des Parathormon-verwandten Proteins (PTHrP) und des Transkriptionsfaktors Runx2. PTHrP und Runx2 sind zwei wichtige Faktoren, die die Differenzierung von Osteoblasten einleiten und regulieren (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009). Der in Abbildung 1 dargestellte Ihh-

Signalweg beginnt mit dem Binden von Ihh an das Membranprotein Patched (Ptch). In Abwesenheit von Ihh, wirkt Ptch inhibierend auf das Sieben-Transmembrandomänenprotein Smothered (Smo). Durch die Bindung von Ihh an Ptch wird Smo aktiviert, was über eine längere Signalkette die aktivierenden Gli-Transkriptionsfaktoren (GliA) aktiviert und den Gli-Repressor (GliR) inhibiert. An der Inhibierung der Signalübertragung in Abwesenheit von Ihh beteiligt ist unter anderem die Glycogensynthetase Kinase 3 β , (GSK3 β), die auch ein wichtiges Signalübertragungs-element im Wnt/ β -catenin-Signalweg ist. Damit spielt GSK3 β eine wichtigen Rolle in diesen beiden für die Knochendifferenzierung entscheidenden Signalwegen (Lum und Beachy, 2004).

Das von Ihh-induzierte PTHrP wiederum aktiviert die Adenylatzyklase. Dies führt zur Produktion von cAMP, was stromabwärts die Synthese der Proteinkinasen (PK) A und C induziert. PKA und PKC sind wichtige Signaltransduktoren in einer Reihe von zellulären Prozessen, die mit vielen Singalketten überlappen (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009). Sowohl Ihh- als auch PTHrP-Signale sind notwendig, um MSZ in Richtung Osteoblasten zu differenzieren.

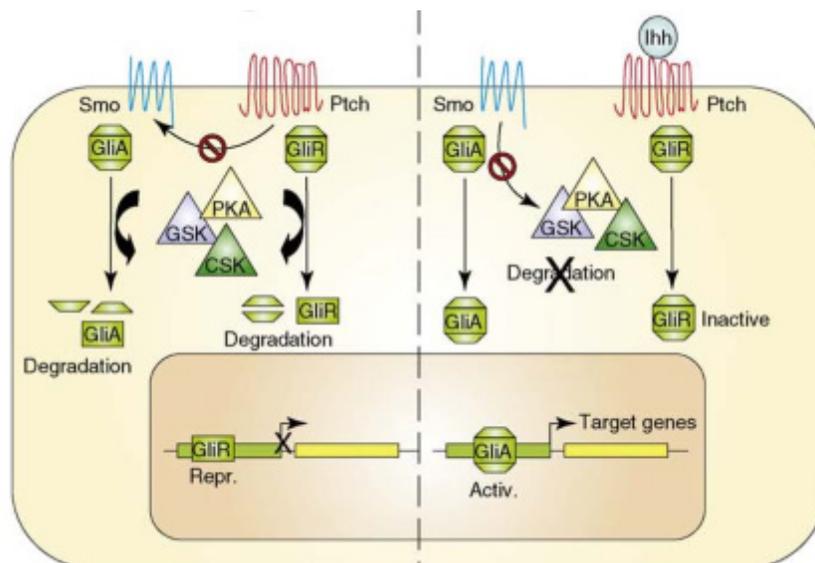


Abbildung 1: Ihh-Signalweg: Ihh bindet an Ptch, wodurch seine inhibierende Wirkung auf Smo aufgehoben wird (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009)

Bone Morphogenic Proteins (BMP)

BMP sind autokrin oder parakrin ausgeschüttete Wachstumsfaktoren der TGF β -Familie (Grimaud, Heymann und R dini, 2002). Es gibt zwei verschiedenen BMP-Rezeptortypen, die durch BMP-Bindung aktivierten Typ I Rezeptoren, die wegen ihre Kinasenaktivit t auch Activin Receptor-like Kinase (ALK) 1-7 genannt werden und die konstitutiv aktiven Typ-II-Rezeptoren (Abbildung 2). Durch BMP-Bindung an den Typ I-Rezeptor kann dieser die aktivierenden Smad-Proteine 1, 5 und 8 phosphorylieren, weswegen die inhibierenden Proteine Smad 6 und 7 nicht mehr an diese binden können (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009). Smad 1, 5 oder 8 kann mit Smad 4 einen als Transkriptionsfaktor fungierenden Komplex bilden, der die Transkription der entsprechenden BMP-downstream Targetproteine aktiviert. Eines der so induzierten Proteine ist Runx2, ein Masterregulator der Osteoblastendifferenzierung.

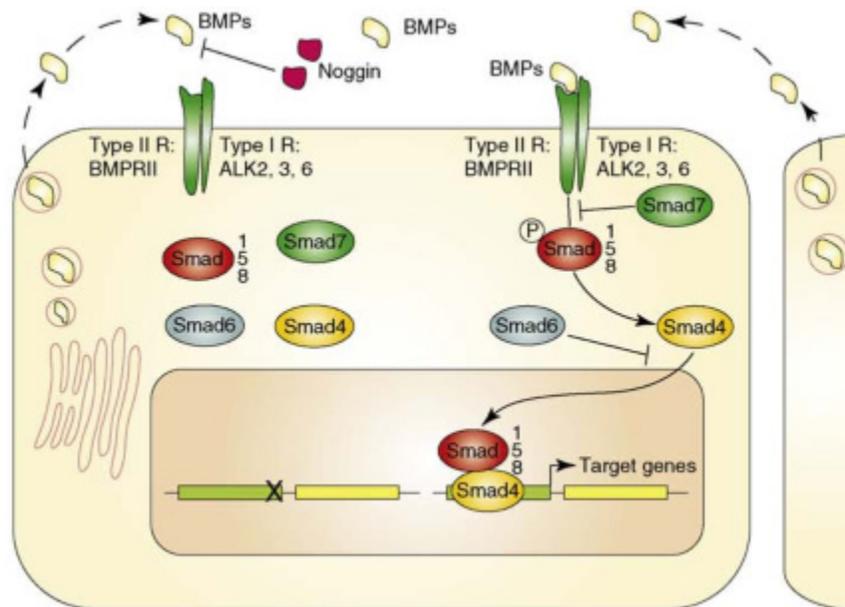


Abbildung 2: Smad-abhängiger BMP-Signalweg: Autocrin oder paracrin produzierte BMP binden an den BMP-Rezeptor und aktivieren Smad-Transkriptionsfaktoren. Noggin wirkt als Inhibitor (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009)

In der Embryogenese sind BMP notwendig, um die Kondensation der MSZ in Knorpelanlagen zu erlauben und die Differenzierung von Chondrozyten zu ermöglichen (Bandyopadhyay et al., 2006). Der Übergang zu hypertrophen Chondrozyten scheint keine BMP-Signale zu benötigen, jedoch formt sich in BMP2 oder BMP4 KO-Mäusen keine Spongiosa, Röhrenknochen oder kortikaler Knochen (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009). Ähnliche Ergebnisse zur Rolle von BMP bei der Differenzierung von MSZ in ausgereifte Osteoblasten wurden auch in muriner und humaner Zellkultur gewonnen (Maeda et al., 2004).

BMP-Signaltransduktion kann auch Smad-unabhängig über die Aktivierung der in inflammatorischen Prozessen wichtigen MAP-Kinasen (MAPK) geschehen (Viñals et al., 2002). Dieser Signalweg ist eine wichtige Schnittstelle zwischen den verschiedenen Signalwegen der Knochenentwicklung und Frakturheilung und wird weiter unten genauer beschrieben.

Wnt/ β -catenin

Der kanonische Wnt/ β -catenin Signalweg (Abbildung 3) ist einer der wichtigsten Signalwege bei der Differenzierung von Osteoblasten (Wang, Zhang und Bikle, 2017). Wnt/ β -catenin Signale inhibieren die Differenzierung von multipotenten mesenchymalen Vorläuferzellen in Adipozyten und fixieren sie stattdessen auf die Differenzierung in Osteoblasten (Ross et al., 2000; Gaur et al., 2005). Besonders die Wnt-Proteine Wnt 1, 3a, 4, 5, 10b und 13 sind für die Konchenentwicklung unerlässlich (Liu, Kohlmeier und Wang, 2008). Die Bindung von Wnt an seinen Rezeptor löst eine Signalkaskade aus, die zur Freisetzung von β -catenin aus einem Komplex mit APC, Axin und GSK3 β führt, die sich an den Wnt-Rezeptor Frizzeld (Fzd) anlagern (Abbildung 3). Das freie β -catenin wird in den Nukleus transloziert, wo es mit cAMP-response element binding protein (CBP)/p300 einen als Transkriptionsfaktor wirkenden Komplex bildet. In Abwesenheit von Wnt-Signalen, führt die Bindung von APC, Axin und GSK3 β an β -catenin zu dessen Ubiquitinierung und damit zu seinem Abbau (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009).

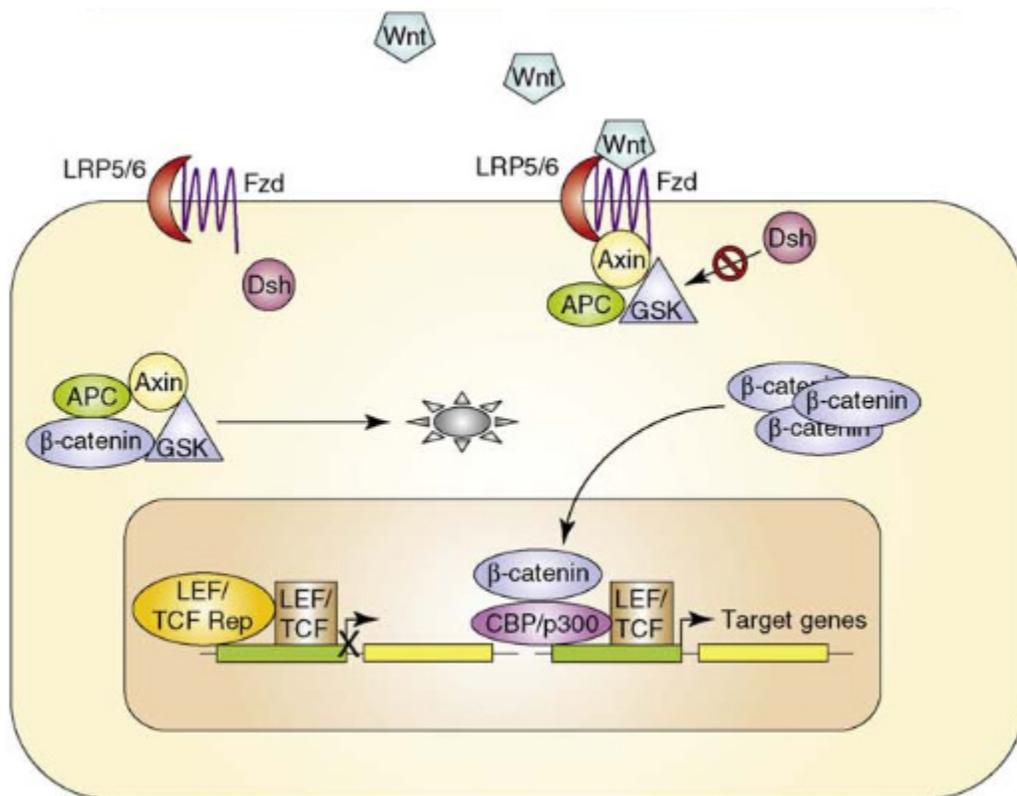


Abbildung 3: wnt/β-catenin-Signalweg. Bindung von Wnt and seinen Rezeptor Fzd befreit β-catenin von seinen Inhibitoren APC, Axin und GSK, wodurch es in den Nucleus transloziert und die Transkription der Wnt-Targetgene auslöst (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009)

Low density lipoprotein-related protein 5 (Lrp5) ist ein Co-Rezeptor für Fzd und sowohl Lrp5 als auch Wnt10b KO-Mäuse haben Knochendefekte (Bennett et al., 2005). Dickkopf (DKK) 1 ist ein negativer Wnt-Regulator, KO-Mäuse, die nur ein funktionelles DKK 1- Allel besitzen (DKK^{-/+}), haben eine höhere Knochendichte als Wildtypmäuse (Morvan et al., 2006). Lithiumchlorid (LiCl), das ursprünglich bei Depressionen eingesetzt wurde, inhibiert die GSK3β, was ebenfalls zur Inhibition der Wnt-Signalübertragung führt. Orale Gabe von LiCl erhöht sowohl in Mäusen als auch beim Menschen die Knochendichte und stimuliert die Differenzierung von MSZ in Osteoblasten *in vivo* und *in vitro* (Bennett et al., 2005; Clément-Lacroix et al., 2005).

Der Wnt/ β -catenin-Signalweg stimuliert jedoch nicht nur die Osteoblastendifferenzierung, sondern inhibiert auch die Differenzierung von Fettzellen und Chondrozyten, die sich ebenfalls aus pluripotenten MSZ entwickeln können (Rodda und McMahon, 2006). Der BMP-Signalweg überlappt mit dem Wnt/ β -catenin Signalweg an mehreren Stellen. Zum einen kann BMP2 Wnt3a und aktiviertes β -catenin hochregulieren, zum anderen reguliert Wnt3a die Expression von inhibitor of DNA binding (Id)-1, einem für die Transkription von BMPs wichtigen Transkriptionsfaktor (Nakashima, Katagiri und Tamura, 2005). Weitere Überlappungen zwischen diesen beiden für die Knochenentwicklung und -heilung wichtigen Signalwegen konnten ebenfalls experimentell nachgewiesen werden (Rawadi et al., 2003; Nakashima, Katagiri und Tamura, 2005).

Der MAPK-Signalweg

Die Programmierung von frühen MSZ in Richtung einer Differenzierung in Osteoblasten anstatt Fettzellen oder Chondrozyten zeigt sich durch die Expression des Transkriptionsfaktors Runx2 (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009). In diesen frühen Differenzierungsstadien wird die Runx2-Expression nacheinander von Ihh, PTHrP und verschiedenen BMP stimuliert. Die Expression von Runx2 ist notwendig, jedoch nicht ausreichend für dessen Funktion, da Runx2 nur phosphoryliert aktiv ist. Diese Phosphorylierung wird von MAPK durchgeführt (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009). MAPK wiederum werden durch verschiedene extrazelluläre Faktoren wie z. B. Bindung der Zellen an Integrine in der extrazellulären Matrix oder Wachstumsfaktoren wie TGF β , EGF oder FGF aktiviert (Xiao et al., 2000).

Diese Funktion unterstreicht die Wichtigkeit der initialen MPAK-aktivierenden Entzündungsreaktion in der Knochenheilung, in der die proinflammatorischen Faktoren Tumornekrosefaktor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 und IL-6 eine entscheidende Rolle spielen. Diese Faktoren können früh in der Heilungsphase einer Fraktur nachgewiesen werden (Herman, Krönke und Schett, 2008).

Das proinflammatorische Protein Nuclear Factor - κ B (NF- κ B) ist wesentlich bei der Aktivierung von MAPK durch TNF α , IL-1 und IL-6 beteiligt, da seine experimentelle

Inhibierung im Kallus einer heilenden Fraktur MAPK-Aktivierung unterbindet und damit die korrekte Knochenheilung stört (Zhou et al., 2006). MAPK aktivieren zusätzlich Dlx5 durch Phosphorylierung, das selbst dann den für die Osteoblastendifferenzierung wichtigen Transkriptionsfaktor Osterix aktiviert (Ulsamer et al., 2008). Diese Osterix-Aktivierung ist unabhängig von Runx2, was ebenfalls Osterix aktivieren kann, und stellt damit einen komplementierenden Signalweg dar, der auch bei Expression von dominant-negativem Runx2 noch funktioniert (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009). MAPK-Signale können sich jedoch unter bestimmten experimentellen Bedingungen und wohl auch in bestimmten Krankheitsbildern mit übermäßiger Entzündungsreaktion durch Inhibierung des BMP-Signalwegen über die Inhibierung von Smad-Proteinen auch negativ auf die Osteoblastendifferenzierung auswirken (Fuentealba et al., 2007).

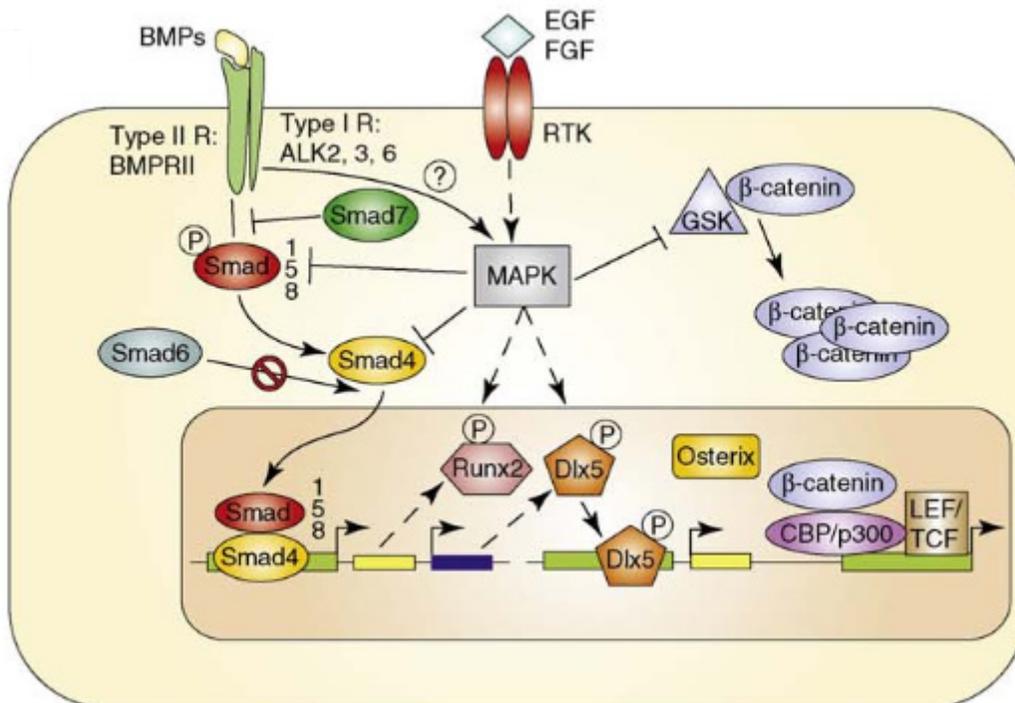


Abbildung 4: MAPK-Signalweg. MAPK kann sowohl inhibierend (GSK β 3 und Smad-Proteine) als auch aktivierend (Runx2 und Dlx5) wirken und nimmt damit Einfluss sowohl auf den BMP als auch den Wnt-Signalweg (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009)

TGF- β

TGF- β , BMPs und PDGF gehören zur selben Proteinfamilie und benutzen strukturell ähnliche Signalwege, da TGF- β und PDGF jedoch wichtige Wachstumsfaktoren sind, die im PRP in hoher Konzentration vorkommen, soll ihnen hier jeweils ein eigener Abschnitt gewidmet werden.

TGF- β ist ein wichtiger Wachstumsfaktor, der Zelldifferenzierung, Proliferation und in bestimmten Fällen Apoptose sowohl während der Embryonalentwicklung als auch im adulten Organismus induzieren kann (Whitman, 1998). Wie bei den BMPs beginnt die Signaltransduktion mit der Bindung von TGF- β an zwei Typ II-TGF- β Rezeptormoleküle. Der Type-II Rezeptor rekrutiert anschließend zwei Typ-I-Rezeptormoleküle. In diesem heterotetrameren Rezeptorkomplex phosphoryliert der Typ-II-Rezeptor durch seine Serin/Threonin-Kinase-Aktivität die beiden Ketten des Typ-I Rezeptors (Wrana et al., 1992).

Auf der intrazellulären Seite sind rezeptorgebundene Smad-Proteine (R-Smad) über ein Ankerprotein (SARA - Smad anchor for receptor activation) an den Typ I-Rezeptor gebunden. TGF- β transduziert sein Signal über Smad2 und Smad3; BMP verwenden dagegen Smad1, Smad5 und Smad9. Die Phosphorylierung des Typ I - Rezeptors seinerseits führt zur Phosphorylierung der R-Smad, wodurch sie sich von SARA und der Typ I Rezeptor lösen (Abbildung 6). Im Zytosol binden die R-Smad an ein manchmal Co-Smad genanntes Smad-Protein (Smad4). Dieser Komplex transloziert in den Nukleus und bindet an TGF- β Targetgene, wodurch deren Transkription aktiviert wird (Whitman, 1998; Padgett, 1999; Moustakas, 2002).

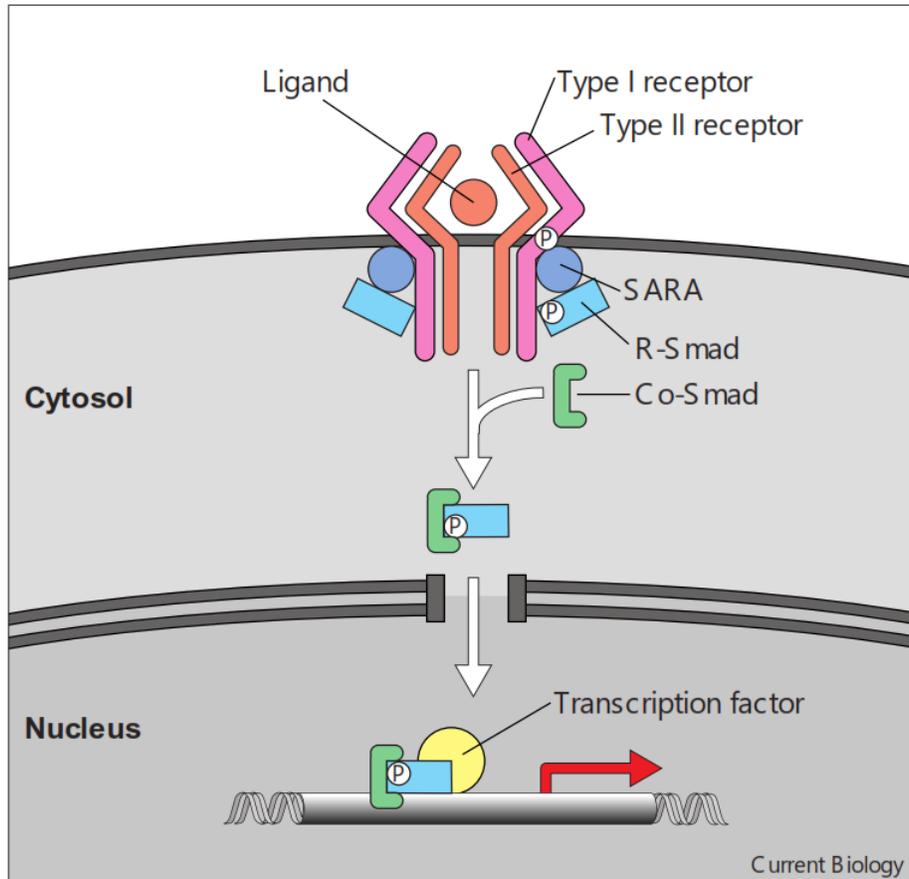


Abbildung 6: Signaltransduktion in der TGF- β -Ligandenfamilie. TGF- β (Ligand) bindet an den Typ-II Rezeptor, der den Typ-I Rezeptor rekrutiert und phosphoryliert. Dies führt zur Phosphorylierung von R-Smads, die zusammen mit Smad4 (Co-Smad) in den Nucleus translozieren und an ihre Targetgene binden (Padgett, 1999).

Platelet-derived Growth Factor (PDGF)

Der PDGF ist eigentlich eine Familie mit vier verschiedenen Mitgliedern (PDGF-A bis PDGF-D), die Homodimere bilden und in ihrer monomeren Form inaktiv sind. PDGF-A und -B können einen funktionalen Heterodimer bilden, sodass insgesamt 5 verschiedene funktionale PDGF-Isoformen existieren (Hannink und Donoghue, 1989; Heldin, 1992). Der PDGF spielt eine wichtige Rolle in der Angiogenese und somit bei der Homöostase und Heilungsprozessen verschiedenster Art (Hannink und Donoghue, 1989; Heldin, 1992; Chen et al., 2013; Su et al., 2013).

Es existieren zwei verschiedene PDGF-Rezeptoren, PDGFRA und PDGFRB (Matsui et al., 1989). Diese Rezeptoren dimerisieren, wenn ein PDGF-Dimer an sie bindet und aktiviert sie damit. Da PDGFRA und PDGFRB sowohl untereinander heterodimerisieren, als auch homodimerisieren können, existieren insgesamt drei aktive Rezeptoriso-formen (Hannink und Donoghue, 1989; Heldin, 1992). Die durch die PDGF-Bindung induzierte Dimerisierung des Rezeptors aktiviert dessen Kinasefunktion, was zur Phosphorylierung von stromabwärts gelegene Signaltransducern wie Src und der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) führt (Abbildung 7). Diese aktivieren dann entsprechende PDGF-Tar-getgene, die Zellproliferation und andere PDGF-Funktionen vermitteln.

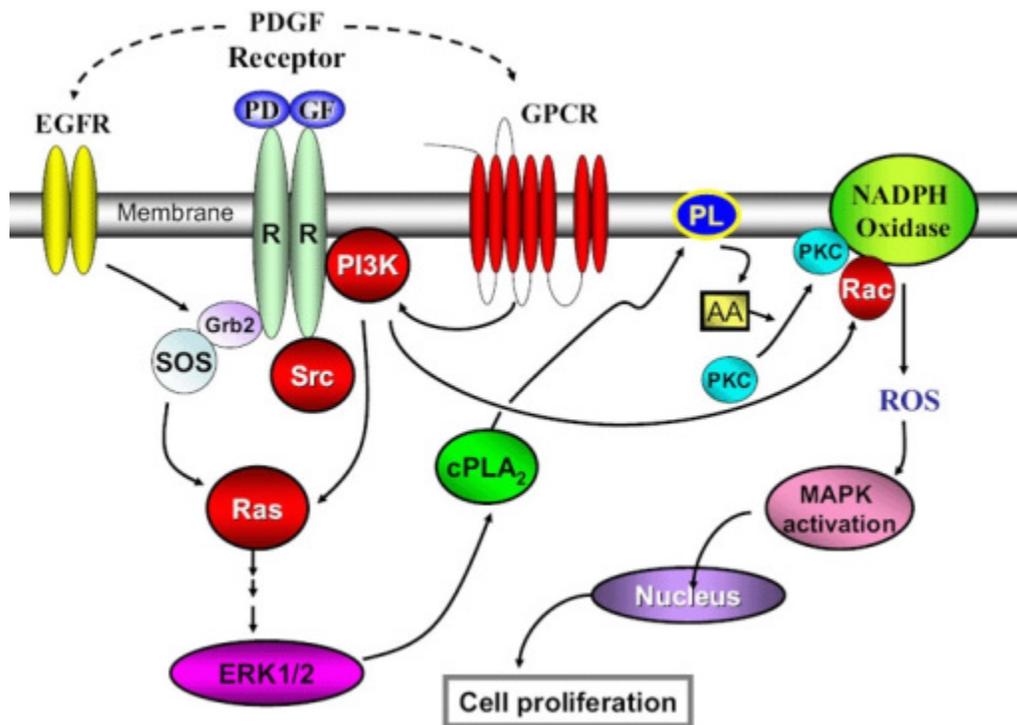


Abbildung 7: Signaltransduktion von PDGF. PDGF hat seinen eigenen Rezeptor, kann aber auch mit niedriger Affinität mit dem EGFR und einigen GPCR interagieren. Die Signaltransduktion erfolgt über PI3K und Src (Sino Biological Inc., 2017).

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Die in Säugetieren vier Mitglieder enthaltende VEGF-Familie (VEGFA-VEGFD) hat strukturelle Ähnlichkeit mit PEGF und verwendet ähnliche Signalwege (Tischer et al., 1991). Placental Growth Factor (PGF) wird oft als fünftes Mitglied der VEGF-Familie gezählt (Maglione et al., 1993). Es existiert eine Anzahl verschiedener Splicevarianten von VEGFA, die hauptsächlich VEGFAs Affinität für Heparansulfatproteoglykan- und Neuropilin-Korezeptoren und damit indirekt die Affinität zum VEGFR beeinflussen (Houck et al., 1991; Tischer et al., 1991; Cébe Suarez et al., 2006). VEGF-ähnliche Proteine konnten in Viren und Schlangengift nachgewiesen werden. Die Hauptfunktion von VEGFA ist Angiogenese. Weitere Funktionen sind Vasodilatation und Chemotaxis von Granulozyten und Makrophagen (Karkkainen und Petrova, 2000; Claesson-Welsh, 2008; Shibuya, 2011). Es wird unter hypoxischen Bedingungen produziert und ist damit sehr wichtig für Heilungsprozesse. VEGFC und VEGFD stimulieren hauptsächlich die Lymphangiogenese (Karkkainen und Petrova, 2000; Ali et al., 2014)

Es existieren drei verschiedene VEGF-Rezeptoren (VEGFR): VEGFR-1, der auch unter dem Namen Flt-1 (Fms-like tyrosine kinase-1) bekannt ist, VEGFR-2 (KDR/Flk-1) und VEGFR-3 (Flt-4). Der Hauptrezeptor für VEGFA ist der VEGFR-2, wobei VEGFA-Bindung an VEGFR-1 modulierend oder inhibierend wirkt, da VEGFR-1 die Fähigkeit hat VEGFA zu binden, ohne eine entsprechende Signalkaskade auszulösen und damit zu sequestrieren (Shibuya, 2011). VEGFB kann nur an VEGFR-2, nicht aber an VEGFR-1 binden. VEGFR-3 interagiert nur mit VEGFC und VEGFD, die ihrerseits nicht an VEGFR-1 oder -2 binden können (Abbildung 8).

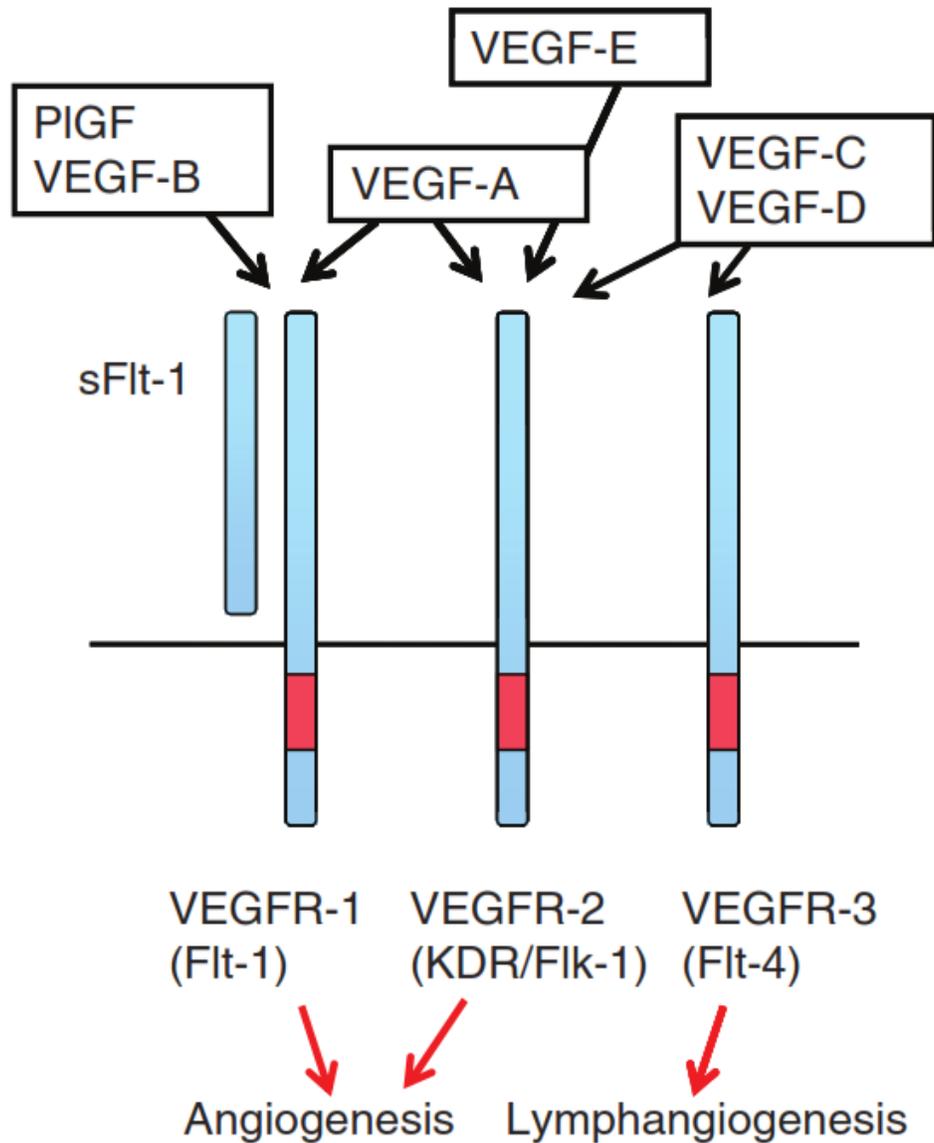


Abbildung 8: VEGF und VEGF-Rezeptorinteraktionen (Shibuya, 2011).

Ähnlich wie PDGF sind die VEGFR Tyrosin-Kinasen, die durch Bindung eines VEGF-Dimers dimerisieren und sich dadurch transphosphorylieren. Jetzt ist die Kinaseaktivität der VEGFR vollständige und kann stromabwärts liegende Targetproteine phosphorylieren und damit ebenfalls aktivieren. Dies führt letztendlich zur Transkriptionsaktivierung der VEGF-Targetgene, die für die Angiogenese und Lymphangiogenesefunktion der VEGF-Proteine wichtig sind (Shibuya, 2011).

1.4 Regulation des Knochenauf- und -abbaus bei Knochendefekten und Frakturen

Knochen haben die einzigartige Fähigkeit zur narbenlosen Regeneration (Ellinghaus et al., 2011). Bei der Heilung von Frakturen wird zwischen einer primären Knochenheilung, die ohne den Umweg der Bildung eines Kallus abläuft, und der sekundären Heilung unterschieden.

Man könnte die Terminologie (primär, sekundär) diskutieren. Während in der Medizin diese Begriffe gewählt wurden, weil bei der sekundären Knochenheilung die Bildung des neuen Knochengewebes über den Umweg der Kallusbildung erfolgt, so ist sie historisch gesehen eher die ursprüngliche Form der Knochenheilung, da die primäre Knochenheilung eine Fixation der Knochenfragmente voraussetzt, die unter natürlichen Bedingungen – also ohne den Eingriff von Chirurgen – kaum vorkommen wird.

So kann man auch von einer direkten (= primären) und einer indirekten (= sekundären) Frakturheilung sprechen. (Scharf et al., 2011).

1.4.1 Primäre Knochenheilung

Die primäre Knochenheilung ist selten und nur möglich, wenn die Frakturrenden optimal osteosynthetisch mit einem Abstand von weniger als 1 mm zueinander adaptiert sind und die intrafragmentären Scherkräfte auf ein Minimum reduziert sind. (Einhorn, 1998) (Lüllmann-Rauch 2006).

Wichtig ist, dass der Knochen absolut ruhiggestellt wird, um die die Überbrückung des Frakturspalts durch einsprießende Blutgefäße nicht zu stören.

Unter diesen Umständen kommt es ohne den Umweg über eine Kallusbildung direkt zur Bildung von Lamellenknochen. Dieser ist zu Anfang noch parallel zum Frakturspalt angeordnet, senkrecht zu den übrigen Lamellen. Im Rahmen des Remodelling werden diese Lamellen schließlich von neuen, orthograden Osteonen durchzogen und schrittweise ersetzt. (Lüllmann-Rauch, 2006)

Bei der primären Knochenheilung ist der Knochen im Anschluss sehr belastbar, doch bleibt festzuhalten, dass der Heilungsverlauf sehr viel langsamer verläuft und auch der Fortschritt der Heilung auch radiologisch nicht immer sicher zu beurteilen ist. So kann man von einer Remodelingphase von 1 – 1,5 Jahren ausgehen (Scharf et al., 2011)

1.4.2 Sekundäre Knochenheilung

Die vier Phasen, in die man allgemein die sekundäre Knochenheilung einteilt:

- Inflammatorische Phase
- Phase der weichen Kallusbildung
- Phase der harten Kallusbildung
- Remodelingphase

(Brighton, 1984, Crues an Dumont, 1975, Einhorn, 1998, Probst and Spiegel, 1997, Rieger, 2012), werden von Runyan und Gabrick in ihrer adaptierten Tabelle von Ai-Aql et al. (2017) zusammengefasst:

TABLE 1. Molecular Pathway Activation During Endochondral Bone Fracture Healing (Adapted From ⁵⁹)

Stage of Fracture Repair	Biologic Process	Signaling Molecule Activation and Proposed Functions
Inflammation	Hematoma	IL-1, IL-6, and TNF- α release by circulating granulocytes and lymphocytes recruits inflammatory cells, enhances extracellular matrix synthesis, and stimulates angiogenesis. ⁶³
	Inflammation and recruitment of progenitor cells	TGF- β , PDGF, and BMP-2 expression promote extracellular matrix formation and initial callus formation. ^{64,65} MMP-9 regulates the distribution of inflammatory cells. ⁶⁶
Cartilage formation	Collagen deposition	Collagen type-II and type-III accumulate shortly after inflammation, produced by chondrocytes in the cartilaginous callus, and periosteal osteoblasts.
	Chondrogenesis and endochondral ossification	TGF- β 2 and TGF- β 3 stimulate chondrogenesis, corresponding with Collagen type-II synthesis. ⁶⁷ BMP-2 promotes chondrocyte differentiation. ⁶⁸ PTH also promotes cartilaginous and bony callus formation, ⁶⁹ whereas Opg prevents chondroclastogenesis by inhibiting RANKL. ⁷⁰
	Vascular in-growth	MMP-9 promotes vascular invasion of hypertrophic cartilage, by promoting VEGF bioavailability. ⁷¹ VEGF directly stimulates angiogenesis, and is maximally expressed when resorption is initiated. ⁵⁹
Primary bone formation	Chondrocyte apoptosis and cartilage resorption	TNF- α stimulates mineralized chondrocyte apoptosis and cartilage resorption, and helps recruit osteoprogenitor cells. ^{72,73} RANKL activity increases while Opg decreases, stimulating chondroclastogenesis. ⁷⁰
	Changes in collagen expression	Collagen type-II and type-III are removed as cartilage callus resorbs. Collagen type-I accumulates as bony trabeculae develop. Collagen type-X expression by hypertrophic chondrocytes provides a template for bone formation.
	Mesenchymal cell differentiation to osteoblasts	Stimulated by BMP-2, -6, and -9. ⁷⁴
	Osteoblast recruitment and maturation	Stimulated by BMP-3, -4, -7, and -8. ^{67,74}
Secondary bone Formation	Neo-angiogenesis	VEGF and PDGF expression continue to promote angiogenesis.
	Bone remodeling	TNF- α , IL-1 and RANKL activity promote bone remodeling by osteoclast remodeling of woven bone for lamellar bone formation.

BMP, bone morphogenetic proteins; FGF, fibroblast growth factor; HIF, hypoxia-inducible factor; IGF, insulin-derived growth factor; IL, interleukin; MMP, matrix metalloproteinases; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Bei diesem Prozess zur Herstellung der knöchernen Integrität über den Umweg eines narbigen Binde- und Knorpelgewebes, welches durch Geflechtknochen ersetzt und letzten Endes im Rahmen des Remodelling wieder zu einer Wiederherstellung der knöchernen Lamellenarchitektur führt. (Einhorn 1998, Lüllmann-Rauch 2006, Ai-Aqi 2008).

Hier werden im Folgenden wie häufig in der Literatur die vier Phasen kurz skizziert, in der o. g. Tabelle sind in der letzten Spalte die wichtigsten Signalwege aufgeführt.

Inflammatorische Phase

Bei einer Fraktur bricht nicht nur das Knochengewebe, sondern natürlich werden auch die Weichteilanteile und die Blutgefäße, die den Knochen versorgen, geschädigt. Im geschädigten Gewebe kommt es zu einer Unterversorgung und bedingt dadurch zu einer Entzündungsreaktion. Die in erster Linie von den Thrombozyten ausgeschütteten Faktoren sowie auch die Plättchenaggregation mindern die weitere Einblutung. Das entstandene Hämatom ist auch gleichzeitig Beginn und Grundlage des Heilungsprozesses.

Leukozyten und die für den Neuaufbau erforderlichen Zellen, wie Fibroblasten, Osteoblasten und Endothelzellen, werden an den Ort der Schädigung geführt. So findet man auch hier die fünf klassischen Entzündungszeichen (rubor, calor, tumor, dolor, functio laesa) (Cohen and Diegelmann, 2002, Bettinger et al., 1994, Roeger, 2012).

In dieser ersten Phase werden mittels Chemotaxis inflammatorische und Progenitorzellen, also Vorläufer für Knochen und Blutgefäße herbeigerufen, um den Heilungsprozess einzuleiten (Wang, Zhang und Bikle, 2017). Diese ersten Ankömmlinge, deren Herkunft sowohl lokal (angrenzende Muskeln, Fettgewebe, Knochenmark), als auch systemisch sein kann (hämatopoetische Zellen, die über den Blutstrom in die Verletzung einwandern), sind hauptsächlich inflammatorische Zellen, die zusätzlich Osteoklasten aktivieren (Wang, Zhang und Bikle, 2017). Das Periost enthält dagegen Osteoblastenchondroblastenprogenitoren, die neuen Knochen aufbauen können (Colnot, 2009).

Phase der weichen Kallusbildung

Man darf sich diese Phasen nicht als einen Prozess von hintereinander geschalteten Arbeitsschritten vorstellen, sondern die Phasen laufen ineinander, es ist ein fließender Prozess. So kommt es im bestehenden Hämatom zu einem Einsprießen neuer Blutgefäße, schon nach wenigen Tagen lässt sich im Hämatom ein Netz von Fibrin und Kollagenfibrillen nachweisen, welches rasch durch Granulationsgewebe mit Fibroblasten, neu gebildeten Kollagen und zahlreichen Kapillaren ersetzt wird. (Scharf et al., 2011)

Es entsteht ein weicher Kallus als erste Verbindung zwischen den auseinandergebrochenen Knochenteilen. In diesem Granulationsgewebe werden nun einerseits die abgesplitterten, nicht mehr benötigten Knochenfragmente durch Osteoklasten abgebaut, gleichzeitig beginnt die Neubildung des Knochengewebes durch die Osteoblasten.

Transforming growth factor beta (TGF- β) und die *Bone Morphogenetic Proteins* (BMP) gehören zur selben Proteinfamilie der TGF- β -Superfamilie von Wachstumsfaktoren. Sowohl BMP als auch TGF- β wirken osteoinduktiv (Ross et al., 2000; Gaur et al., 2005). Sie kooperieren mit wnt/ β -catenin und BMP in der Osteoblastendifferenzierung, indem sie über mehrere Zwischenschritte wnt/ β -catenin-Signale und MAPK aktivieren (Zhou, 2011). Andere Mitglieder der TGF- β -Superfamilie wie *platelet-derived growth factor* (PDGF), *epithelial growth factor* (EGF) *vascular endothelial growth factor* (VEGF) können ähnliche Signale für den wnt/ β -catenin-Signalweg in der Osteoblastendifferenzierung liefern (Wang et al., 2011; Caverzasio, Biver und Thouverey, 2013; Biver et al., 2014; Duan et al., 2015; Liu et al., 2016). Zudem wirken diese Wachstumsfaktoren chemotaktisch auf osteogene Zellen und induzieren und komplementieren sich teilweise. VEGF und PDGF induzieren zusätzlich Angiogenese, die ebenfalls bei der Heilung von Knochendefekten wichtig ist, während TGF- β die Mitose von Fibroblasten und Präosteoblasten induziert (McCauley et al., 1995).

Während der Heilungsphase können Wnt/ β -catenin Signale in einer Fraktur verstärkt nachgewiesen werden (Wang, Zhang und Bikle, 2017).

Nach etwa drei bis vier Wochen sind die voneinander getrennten Knochenteile durch Bindegewebe und Knorpel weich miteinander verbunden (Scharf et al., 2011)

Phase der harten Kallusbildung

In dieser Phase des Heilungsprozesses kommt es zur Bildung von Geflechtknochen, die Bildung dieses Gewebes folgt der Ausbreitung der Kapillaren, während Lamellenknochen seine Struktur durch die Beanspruchung erhält, daher ist das erste knöcherne Verbindungsgewebe der durch die Fraktur getrennten Knochenteile einerseits zwar fest, aber nicht so belastbar wie das ursprüngliche Gewebe. Scharf (2011) spricht hier von einem Fixationskallus und einem unreifen Faserknochen. Kommt es in dieser Phase zu Instabilität aufgrund einer nicht ausreichenden Fixation des betroffenen Knochens, so verzögert sich diese Phase, da das Knorpelgewebe Störungen durch Bewegungen besser verkräften kann als Knochengewebe. Die Knochenbildung erfolgt von proximal nach distal.

Remodelling-Phase

Klinisch spricht man nach etwa sechs Wochen von einer Heilung der Fraktur, da der Knochen nun wieder die ursprüngliche Festigkeit erhalten hat und wieder normal belastbar ist.

Doch der vollständige Umbau der betroffenen Region in einen der üblichen Belastung angepassten Lamellenknochen dauert wesentlich länger, dies können auch mehrere Jahre sein. In einem ständigen Prozess des Knochenabbaus durch Osteoklasten an den Stellen, die keiner oder nur einer geringen Belastung ausgesetzt sind, und des gezielten Aufbaus von Knochengewebe durch Osteoblasten an den Stellen starker Belastung, wird die Bruchstelle optimiert und die Größe des Kallus nimmt ab.

Die erhöhte Stoffwechselaktivität im betroffenen Gewebe lässt sich szintigraphisch nachweisen. Nach Scharf (2011) kann man erst nach Abschluss dieser Phase von einer biologischen Heilung sprechen.

1.4.3 Übertragbarkeit des Tiermodells auf den Menschen

Der hier skizzierte Heilungsprozess ist der des Menschen, er ist mit den meistgenutzten Tiermodellen vergleichbar, doch gibt es gravierende Unterschiede in den zeitlichen Abläufen und auch beim Knochengewebe.

Es ist aber andererseits offenbar, dass man allein im Tiermodell vergleichbare Ergebnisse aufgrund einer standardisierten Vorgehensweise erreichen kann, nur hier kann man die erforderlichen histologischen Untersuchungen vornehmen.

Doch es ist daher folgerichtig, dass man im Tiermodell gewonnene Erkenntnisse nicht einfach auf die Humanmedizin übertragen kann, sondern sie sind als Hinweise zur Verbesserung der Therapie zu verstehen.

1.5 Plättchenreiches Plasma (PRP)

PRP enthält im Vergleich zum autologen Plasma erhöhte Konzentrationen an PDGF, TGF- β , VEGF und EGF (Marx, 2001). Es wird durch Anreicherung von Thrombozyten aus dem autologen Plasma gewonnen. Die Thrombozytenkonzentration im Plasma liegt durchschnittlich um 200.000 pro Mikroliter und reicht zwischen 150.000 pro Mikroliter und 350.000 pro Mikroliter. PRP-Präparationen, die bei der Wund- und Knochenheilung zum Einsatz kommen, enthalten oft um die 1 Million Plättchen pro Mikroliter und sind damit gegenüber dem autologen Plasma etwa um das Fünffache konzentriert (Marx, 2001). Es existieren aber auch Protokolle, die eine Erhöhung der Plättchen- und Wachstumsfaktorkonzentrationen um das bis zu 17-fache gegenüber den entsprechenden Konzentrationen im Vollblut ermöglichen (Dugrillon et al., 2002).

In der Literatur finden sich einige Berichte, die zeigen, dass PRP die Knochenheilung signifikant verbessern kann. So untersuchten Dallari und Mitarbeiter Patienten, bei denen ein Tibiadefekt im Rahmen einer Genu varum-Behandlung angelegt wurde (Dallari et al., 2007). In dieser Studie wurden insgesamt 33 Patienten behandelt. Elf fungierten als Kontrollgruppe, deren Tibiadefekt mit autologen lyophilisierten Knochenchips gefüllt wurde. Zusätzlich zu den Knochenchips wurde in einer Behandlungsgruppe mit elf Patienten PRP-Gel verwendet und in der anderen Behandlungsgruppe mit ebenfalls elf Patienten

PRP-Gel und BMC-Gel. Bereits nach sechs Wochen Heilungsdauer zeigte sich in beiden Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrolle radiologisch eine signifikant verbesserte Knochenheilung. Auch nach einem Jahr bestand noch ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen und den Kontrollen in Bezug auf Osseointegration (Dallari et al., 2007).

Eine Studie mit Minischweinen zeigte ähnliche Ergebnisse. Hier erhielten die Tiere mit einem experimentellen Tibiadeфект ein autologes spongiöses Knochentransplantat. In der Behandlungsgruppe wurde dieses Knochentransplantat mit 4,9-fach konzentriertem PRP kombiniert. Nach sechs Wochen zeigte sich auch hier eine signifikant verbesserte Knochenheilung in der PRP-Gruppe (Hakimi et al., 2010).

1.6 Calciumphosphatgranulat (CPG) und andere Knochenersatzmaterialien

MSZ können die Heilung von Knochendefekten fördern, wenn sie allein subkutane oder direkt in den Knochendefekt injiziert werden (Kraus und Kirker-Head, 2006; Khosla, Westendorf und Mödder, 2010; Rosset, Deschaseaux und Layrolle, 2014). Bei größeren Knochendefekten werden jedoch häufig anorganische Knochenersatzmaterialien als Gerüstmaterial in den Knochendefekt implantiert, um zum einen den Defekt zu füllen und zum anderen ein Substrat zu bieten, an das sich MSZ und andere am Heilungsprozess beteiligte Zellen anlagern können und so schneller natürlichen neuen Knochen zu bilden, der ein Kompositmaterial aus anorganischen Hydroxapatit und lebendem Gewebe ist.

In der Kieferchirurgie wird häufig entmineralisierter und/oder entproteinisierter Rinderknochen sowohl im experimentellen Setting im Tiermodell als auch in Patienten als Knochenersatz eingesetzt (Sadeghi et al., 2016; Artzi und Nemcovsky, 1998; Jiang, Dziak und Lynch, 1999; Froum et al., 2006; Galindo-Moreno et al., 2010; Mardas, Chadha und Donos, 2010; Mardas et al., 2011; Caneva et al., 2012; Park, 2012; Schmitt et al., 2013; Pang et al., 2014; Mahesh et al., 2015; Taschieri et al., 2016). Je nach Behandlungsprotokoll kann der Rinderknochen dabei mit einer Kollagenmembran, mit Wachstumsfaktoren oder im Falle einer Infektion in der Implantateinsatzstelle auch mit Antibiotika

kombiniert werden (Jiang, Dziak und Lynch, 1999; Park, 2012; Pang et al., 2014). Es wurde auch die Verwendung von entmineralisiertem, entproteinisiertem Rinderknochen in Kombination mit PRP zur Sinusbodenaugmentation in der Kieferchirurgie beschrieben (Taschieri et al., 2016). Verschiedene klinische Studien vergleichen die Ergebnisse einer chirurgischen Alveolarkampreservierung unter Verwendung von Rinderkochen im Vergleich zu anderen Knochenersatzmaterialien (Mardas, Chadha und Donos, 2010; Mardas et al., 2011; Mahesh et al., 2015; Scheyer et al., 2016). Mardas und Mitarbeiter verglichen Rinderknochen mit Strauman Bone Ceramic®, ein keramischer Werkstoff, der auf Hydroxyapatit basiert und speziell für die Kieferchirurgie entwickelt wurde, in 27 Patienten, die randomisiert auf die Behandlungsgruppen verteilt wurden. Sie fanden acht Monate nach der Operation keinen Unterschied zwischen den beiden Behandlungsgruppen (Mardas, Chadha und Donos, 2010; Mardas et al., 2011). Scheyer und Mitarbeiter verglichen einen entmineralisierten allogenen Knochen kombiniert mit einer rekonstituierten Kollagenmembran mit einem Rinderknochenxenotransplantat zusammen mit einer nativen Kollagenmembran bei insgesamt 40 Patienten, die eine Zahnextraktion durchgemacht hatten und bei denen ein Dentalimplantat gesetzt wurde. Der Alveolarkammerhalt war in der Rinderknochengruppe signifikant besser als in der Gruppe, die das allogene Knochen- transplantat erhalten hatte (Scheyer et al., 2016). Dagegen zeigte ein Vergleich zwischen einem alloplastischen Knochenkitt (Calcium Phosphosilikat Kitt) mit entmineralisiertem Rinderknochen in einer Alveolarkampreservationsstudie nach vier bis sechs Monaten bessere Assimilation des Knochenkittmaterials sowie stärkere Knochenneubildung (Mahesh et al., 2015).

Calciumphosphatgranulat (CPG) wird in der Knochentransplantation schon seit den 1970er Jahren verwendet, wobei erste Versuche zeigten, dass CPG gleichwertig mit autologer Spongiosa in Bezug auf Verträglichkeit und Assimilationsfähigkeit waren. Sowohl autologe Spongiosa als auch CPG waren in Bezug auf diese Parameter allogener Spongiosa überlegen (Köster et al., 1979). Ein direkter Vergleich von CPG mit Rinderknochen zur Sinusbodenaugmentierung erbrachte nach einem Jahr ähnliche Werte für die Knochenneubildung, jedoch war in der CPG-Gruppe die Kollagen-Typ I Menge deutlich höher (Taschieri et al., 2016). Ein direkter Vergleich von CPG mit einem autologem Knochen- transplantat zur Behandlung eines experimentellen Knochendefekt in der Tibia von

Minischweinen zeigte, dass das autologe Knochentransplantat schnellere und stärkere Knochenneubildung induziert (Jungbluth et al., 2010). Die Fähigkeit von CPG, Knochenneubildung zu induzieren, kann durch die Kombination von CPG mit PRP verbessert werden (Vogel et al., 2006). Entsprechend wird CPG heutzutage mit einer Vielfalt von die Knochenbildung induzierenden Behandlungen vorbehandelt, wie die Besiedlung mit verschiedenen Stammzellen (z. B. BMC, Nabelschnurblutzellen, humane embryonale Stammzellen etc.) oder Kokultivierung mit Osteoblasten und/oder Endothelzellen, um eine Prävascularisierung zu gewährleisten,

Ob sich die Knochenneubildung mit solchen Kombinationsbehandlungen so sehr steigern lässt, dass eine Kombination von BMC, PRP und CPG ähnliche Ergebnisse liefert, wie ein autologes Knochentransplantat, war eines der Ziele der hier vorliegenden Arbeit.

1.7 Fragestellung und Hypothesen

Das Ziel dieser Studie war die folgende Frage zu klären: Welchen Einfluss auf die Knochenheilung hat der Zusatz von PRP zu einem alloplastischem Knochentransplantat? Die folgenden Hypothesen sollten im Rahmen dieser Studie überprüft werden:

1. Im Vergleich zu einem alleinigen alloplastischen Knochentransplantat verbessert die Kombination von PRP und Knochentransplantat die Knochenneubildung signifikant.
2. Die Vaskularisierung der Defektstelle wird durch PRP ebenfalls verbessert.

Die Nullhypothesen ergeben sich damit folgendermaßen:

1. In Bezug auf die Knochenneubildung besteht zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied.
2. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Vaskularisierung zwischen der Behandlungs- und der Kontrollgruppe.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

In dieser Studie wurden 24 New Zealand White Kaninchen ($2,1 \pm 0,4$ kg; Alter 9-16 Monate) verwendet. Die Kaninchen wurden randomisiert auf zwei Studiengruppen verteilt, die Kontrollgruppe und die Plättchen-Reiches Plasma (PRP)-Gruppe, die zum Zeitpunkt der Operation PRP erhielt. Eine historische autologe Knochentransplantatgruppe mit einer Stichprobengröße von 12 wurde als zusätzliche Kontrolle verwendet (Schneppendahl et al., 2015).

Sechs Tiere in jeder Gruppe des Versuchs wurden jeweils drei und sechs Wochen nach der Operation getötet. Alle Tierversuche wurden zuvor von der lokalen Tierversuchskommission genehmigt (Az.: 87-51.04.2010.A179). Eine a priori Poweranalyse mit einer Signifikanzschwelle von $p=0,05$ ergab eine Power von 80 %, um statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten.

2.2 Operationstechnik

Die in dieser Studie verwendete Operationstechnik wurde zuvor von Grassmann und Mitarbeitern beschrieben und später veröffentlicht (Grassmann et al., 2015). Dabei wurde ein einseitiger kritischer Knochendefekt mit einem Durchmesser von 15 mm in der Nähe der Diaphyse des rechten distalen Radius erzeugt. Alle chirurgischen Eingriffe wurden unter Vollnarkose durchgeführt. Die Narkose erfolgte durch Isofluran-Inhalation.

Die Tiere wurde perioperativ mit Enrofloxacin zur antibiotischen Prophylaxe und Carprofen zur Schmerzkontrolle behandelt. Knochenmarkspirat (BMA) wurde durch perkutane Interpunktion mit Jamshidi-Vakuum-Aspiration aus dem Beckenkamm gewonnen. Die mononukleären Zellen wurden durch Zentrifugation unter Verwendung eines handelsüblichen Knochenmarkskonzentrationssystems (MarrowStim-Minikonzentrationssystem, Biomet Biologics, Inc., Warschau, Indiana, USA) in ein Knochenmarkkonzentrat (BMC) konzentriert.

Die Knochendefekte wurde folgendermaßen erzeugt. Bei der Diaphyse des rechten Radius wurde ein radio-palmarer Zugang durchgeführt. Nach der subkutanen Präparierung wurde ein 15x5x4 mm großer monokortikaler Defekt am Radius im diaphysären Bereich mit einem Bohrer angelegt. Das Periost wurde proximal und distal vom Defekt mit einer Raspel auf einer Länge von jeweils 5 mm entfernt. Nach Spülung wurde der Defekt je nach Gruppenzuteilung mit 300 mm³ eines Kompositmaterials gefüllt, das aus porösem Calciumphosphatgranulat (CPG) und BMC mit oder autologem PRP bestand. Die Wunde wurde in Schichten geschlossen und die Tiere konnten sich uneingeschränkt bewegen. In der Positivkontrolle wurde als „Goldstandard“ ein autologes Spongiosa-transplantat verwendet

2.3 Knochenmarkkonzentrat (BMC)

Autologes Knochenmarkspirat (BMA) wurde aus dem Beckenkamm der narkotisierten Kaninchen gewonnen. 6 ml Citrat-Antikoagulans (ACD-A, Antikoagulans Citrat-Dextrose-Lösung) wurden nach Angaben des Herstellers zu zweimal 12 ml Knochenmarkspirat gegeben. Diese Mischung wurde dann bei 600 g für 15 min zentrifugiert. Das resultierende Pellet bestand aus BMC und hatte ein Volumen von 3,5 ml ± 0,5 ml. Für die In-vitro-Analyse wurden 0,5 ml des BMC verwendet. Der Anteil an mononukleären Zellen im BMA und BMC wurde jeweils mit einem automatischen Zellenzähler, der mit Veterinärsoftware (ADVIA 120, Bayer Diagnostics GmbH, Leverkusen, Deutschland) ausgestattet war, analysiert. Durch die Berechnung des Quotienten der mononukleären Zellen im BMA geteilt durch den Anteil der mononukleären Zellen im BMC wurde der Konzentrationsfaktor ermittelt (Herten et al., 2013).

Das zur Füllung von Defekten verwendete CPG wurde vor der Implantation in den Defekt mit 1,2 ml BMC befeuchtet.

2.4 Plättchenreiches Plasma (PRP)

Je nach Gruppenzuteilung wurde bei zwölf Tieren vor der Implantation das CPG/BMC mit autologem PRP angereichert. Dazu wurde bei allen Tieren aus der PRP-Gruppe (PRPG) 27 ml Blut aus einer Ohrvene entnommen und in einen Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Vacutainer gegeben. PRP wurde mit dem "GPS® III Platelet Separation System" (Biomet Biologics, Warschau, IN USA) nach Angaben des Herstellers gewonnen. Native Blutproben und das so gewonnene PRP jedes Tieres der PRP-Gruppe wurden unter Verwendung des oben erwähnten automatischen Zählers analysiert und der Konzentrationsfaktor wurde als Quotient des Plättchenanteils im nativen Blut geteilt durch den Plättchenanteil im PRP berechnet. Serum-, Plasma- und PRP-Konzentrationen von PDGF, VEGF und TGFβ1 wurden in allen Tieren mittels ELISA (Enzyme linked immuno sorbent assay-Quantikine® ELISA-Kits, R & D Systems, MN, USA) quantifiziert.

2.5 Digitale Volumentomographie (DVT)

Die radiologische Analyse erfolgte mit einem DVT-Scanner mit Flachbildschirm (PaX-Duo3D, Vatech, Korea). Dieses Verfahren wurde in der beschriebenen Anwendung bereits von Grassmann und Mitarbeitern in der Literatur beschrieben (Grassmann et al., 2015). Dazu wurde jeweils mit Hilfe einer DICOM-Viewer-Software (Osirix Imaging Software, 64 Bit erweiterte Version, Pixmeo, Genf, Schweiz) das Volumen der Knochenneubildung im Defektbereich sowie das Volumen des verbleibenden Knochendefekts gemessen. Diese volumetrischen Messungen wurden von zwei verschiedenen, erfahrenen Untersuchern durchgeführt. Zusätzlich skizzierten sie die gesamte Defektzone manuell. Ein Schwellenwert von 2350 Hounsfield Units (HU) wurde definiert, um Knochenneubildung von anderem Gewebe (Narbenbildung etc.) abzugrenzen. Dieser Schwellenwert basierte auf den mittleren Dichtewerten von kortikalen und trabekulären Knochen (Kröpil et al., 2012). Das Volumen des Defekts, einschließlich der Gesamtgröße des Defekts, der Konsolidierungsbereiche und des nicht-mineralisierten Gebieten, wurde dreimal gemessen.

2.6 Histologische Aufbereitung

Jeweils die Hälfte der Tiere der beiden Gruppen wurden nach drei und sechs Wochen euthanasiert und ihr Gewebe zur histologischen Analyse aufbereitet. Dazu wurden nach sorgfältiger Sezierung die Weichgewebeproben in 10 % neutral gepufferter Formalinlösung für vierzehn Tage fixiert, in einer aufsteigenden Alkoholreihe einschließlich 100 % Xylol entwässert. Die Knochenproben wurden für nicht-entkalkte Schnitte danach durch Infiltration und Einbettung in Methylmethacrylat (Technovit 9100 NEU, Heraeus Kulzer, Wehrheim, Deutschland) präpariert. Die Polymerisierung wurde für 20 h bei -4° C durchgeführt, um Schäden durch Polymerisationswärme zu vermeiden. Diese Proben wurden in axialer Richtung mit einer Diamantdrahtsäge (Exakt® Apparatebau, Norderstedt, Deutschland) geschnitten. Serielle Schnitte wurden von dem zentralen und kortikalen Defektgebiet hergestellt. Diese wurden auf Plastikobjektträger aufgeklebt und vor der Färbung mit Toluidinblau auf eine Dicke von 60 µm abgeschliffen (Donath, 1985; Schwarz et al., 2007; Grassmann et al., 2015).

2.7 Histomorphometrische Analyse

Die Objektträger mit den histologischen Proben wurden unter Verwendung eines binokularen Lichtmikroskops (Olympus SZ 61, Olympus) mit einer Farb-CCD-Kamera (Farb View III, Olympus, Hamburg, Deutschland) analysiert. Zwei geblindete Prüfer führten die histomorphometrischen und mikroskopischen Analysen aller so gewonnenen digitalen Bilder durch. Die Knochenneubildung wurde absolut (μm^2) und in Prozent bezogen auf das Defektvolumen gemessen. Für jeden Knochendefekt wurden drei Abschnitte aus dem kortikalen und zentralen Defektbereich analysiert (Grassmann et al., 2015).

2.8 Immunhistochemie

Die histologischen Präparate wurden wie zuvor beschrieben hergestellt (Vermeulen et al., 2002). Dabei wurden sie mit einem murinen CD34-Antikörper (Biogenex, clone QBEND/10) in einer 1:5-Verdünnung in Phosphatpuffer mit 1 % bovinem Serumalbumin

über Nacht bei Raumtemperatur markiert. Die Detektion erfolgte mit einem Ziege-anti-Mouse-Biotin-Konjugat (Dako E0433), in einer 1:400-Verdünnung für 30 Minuten bei Raumtemperatur und anschließender Inkubation mit einem Streptavidin-Peroxidase-Komplex (Dako K0377) in Gegenwart des Chromogens DAB (Liquid DAB Concentrated Substrate Pack, Biogenex HK-153–5K). Die Detektion des CD34-Antikörpers im Gewebe zeigt Mikrogefäße an (Vermeulen et al., 2002).

In den Proben wurden vaskuläre Hotspots (Bereiche mit der höchsten Dichte von Mikrogefäßen) bei geringer Vergrößerung identifiziert und unter hoher Vergrößerung analysiert. Dies geschah für jeweils drei Bereiche innerhalb dieser Hot-Spots. Dabei wurden die Mikrogefäße unter 400-facher Vergrößerung unter Verwendung eines quadratischen Gitters gezählt. Die Felder dieses Gitters hatten jeweils eine Fläche von 0,0625 mm². Die Mikrogefäßdichtezahl (MGD) wurde als die mittlere Anzahl von Mikrogefäßen in allen drei ausgezählten Bereiche Feldern pro mm² definiert (Lörincz et al., 2005; Grassmann et al., 2015)

2.9 Statistische Analyse

Die statistische Analyse wurde mit SPSS 22.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Für jede Gruppe wurden mittlere Werte und Standardabweichungen berechnet. Die radiologischen und histomorphometrischen Auswertungen wurden einer Zwei-Wege-ANOVA unterworfen. Unterschiede zwischen den unabhängigen Variablen wurden mit einem Post-hoc-Test getestet [Tuckey's studentized range (HSD) Tests für Variablen]. Signifikanz wurde als p-Wert <0,05 definiert.

3 Ergebnisse

Alle Tiere vertrugen die Behandlung ohne negative Nebenwirkungen und es gab keine ungeplanten Vorkommnisse. Somit standen jeweils 6 Tiere zu den Zeitpunkten drei und sechs Wochen sowohl in der Kontroll- als auch in den Behandlungsgruppen zur Analyse zur Verfügung.

3.1 Plättchen- und Wachstumsfaktorkonzentration im PRP

Vor der Operation wurde in der PRP-Gruppe Blut zur PRP-Gewinnung abgenommen. Die Plättchenkonzentration in diesem nativen Blut war durchschnittlich $240.000/\text{mm}^3$ ($175.000\text{-}347.000/\text{mm}^3$, Standardabweichung (SD) $51.000/\text{mm}^3$). In den PRP-Proben wurde eine durchschnittliche Anreicherung von 5,2-fach erreicht (Tabelle 1 und Abbildung 9). Damit war die durchschnittliche Plättchenkonzentration in den PRP-Proben $1249,4 \times 10^3/\text{mm}^3$ (SD $340 \times 10^3/\text{mm}^3$, Minimum (mini) $837 \times 10^3/\text{mm}^3$, Maximum (max) $1854 \times 10^3/\text{mm}^3$). Diese Erhöhung der Plättchenkonzentration im PRP gegenüber nativem Blut war statistisch signifikant ($p < 0,01$).

Um zu klären, ob sich eine erhöhte Plättchenkonzentration im PRP auch auf die Konzentration verschiedener Wachstumsfaktoren auswirkt, wurden PDGF- $\beta\beta$, TGF- $\beta 1$ und VEGF im nativen Blut und im PRP bestimmt (Tabelle 1). Die durchschnittliche PDGF- $\beta\beta$ im nativen Blut war wie in Abbildung 11 dargestellt $684,9 \text{ pg/ml} \pm 824,6 \text{ pg/ml}$ (mini: 42 pg/ml ; max: 2829 pg/ml). Im PRP waren diese Werte $5696,2 \text{ pg/ml} \pm 6317,2 \text{ pg/ml}$ (mini: 283 pg/ml ; max: 9583 pg/ml). Diese entspricht einer Erhöhung der Konzentration von ca. 8,3-fach. Der P-Wert von $p < 0,01$ zeigte, dass dieser Unterschied signifikant war.

Die absolute Konzentration von TGF- $\beta 1$ war sowohl im nativen Blut als auch im PRP deutlich höher, während die von VEGF in beiden Medien deutlich niedriger lag (Abbildung 12). Im nativen Blut wurde eine durchschnittliche TGF- $\beta 1$ -Konzentration von $2703,9$

pg/ml \pm 1142,8 pg/ml (min: 953 pg/ml; max: 5329 pg/ml) gemessen (Abbildung 10). Die TGF- β 1-Konzentration im PRP war 42389.7 ± 23055.9 (mini: 13745pg/ml; max: 96432 pg/ml). Damit ergab sich eine Erhöhung der TGF- β 1-Konzentration im PRP gegenüber dem nativen Blut um 15,7-fach. Auch hier ergab sich im t-Test eine Signifikanz mit einem p-Wert von $p < 0,01$. Somit war auch dieser Unterschied zwischen Kontrolle und PRP-Gruppe statistisch signifikant. Bei VEGF wurden in der Kontrollgruppe eine Durchschnittskonzentration von $12,1 \text{ pg/ml} \pm 4,3 \text{ pg/ml}$ mit einem Bereich von 9 pg/ml bis 22 pg/ml gemessen. In der PRP-Gruppe wurde eine durchschnittliche VEGF-Konzentration von $37,8 \text{ pg/ml} \pm 12,6 \text{ pg/ml}$ (mini: 19 pg/ml; max: 61 pg/ml) festgestellt, was einer 3.1-fachen Anreicherung gegenüber dem nativen Blut entsprach. Auch hier war der Unterschied mit einem P-Wert von $p < 0,001$ signifikant.

Tabelle 1: Vergleich von Plättchenkonzentration und Konzentrationen verschiedener Wachstumsfaktoren in nativem Blut und PRP

	PRP	Natives Blut	P-Wert (T-test)
Plättchenkonzentration [$10^3/\text{mm}^3$]	$1249,4 \pm 340$, mini: 837; max: 1854	240 ± 51 ; mini: 175; max: 347	$p < 0,01$
PDGF- $\beta\beta$ [pg/ml]	$5696,2 \pm 6317,2$; mini: 283; max: 9583	$684,9 \pm 824,6$; mini: 42; max: 2829	$p < 0,01$
TGF-β1 [pg/ml]	42389.7 ± 23055.9 ; mini: 13745; max: 96432	$2703,9 \pm 1142,8$; mini: 953; max: 5329	$p < 0,01$
VEGF [pg/ml]	$37,8 \pm 12,6$; mini: 19; max: 61	$12,1 \pm 4,3$; mini: 9; max: 22	$p < 0,01$

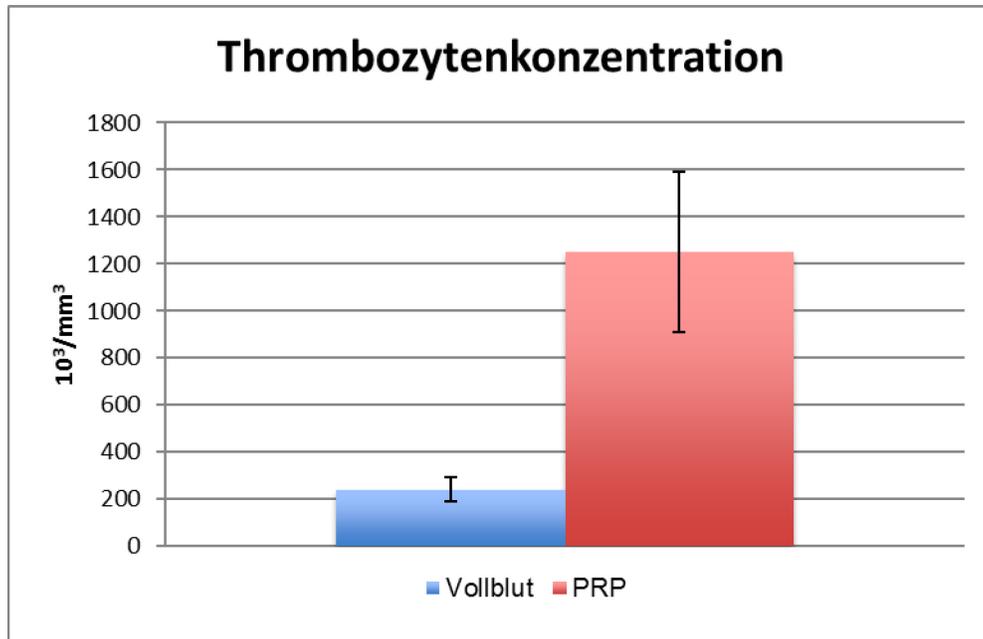


Abbildung 9: Thrombozytenkonzentration im Vollblut und im PRP.

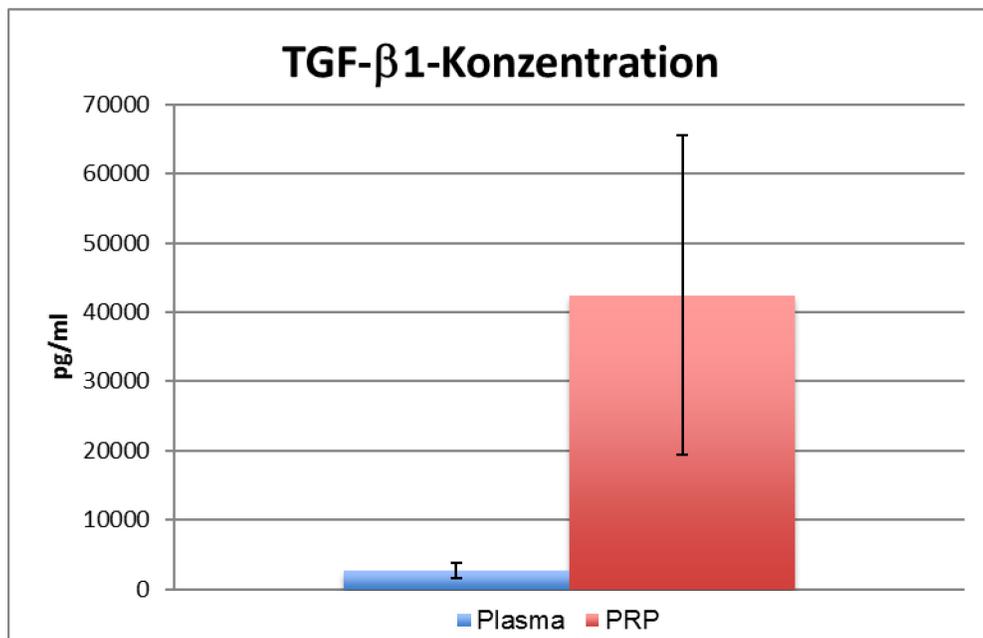


Abbildung 10: TGF-β1-Konzentration im Plasma und im PRP.

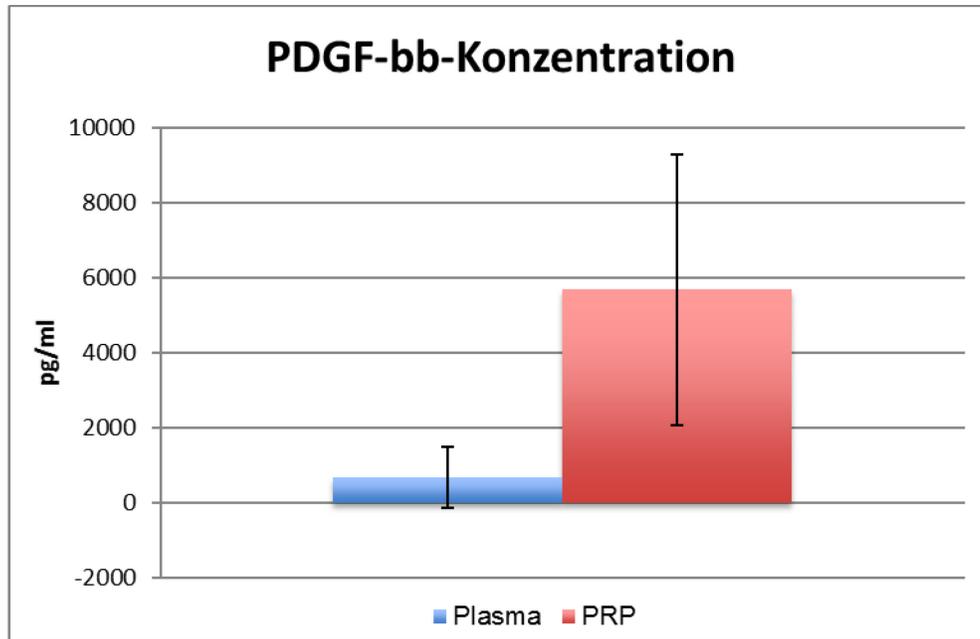


Abbildung 11: PDGF- $\beta\beta$ -Konzentration im Plasma und im PRP.

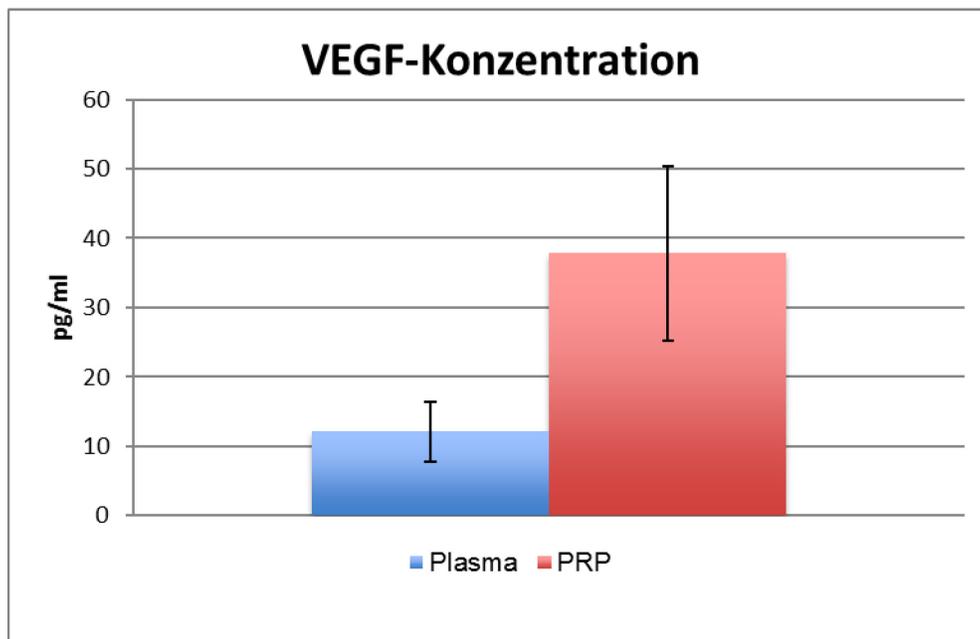


Abbildung 12: VEGF-Konzentration im Plasma und im PRP.

3.2 Digitale Volumentomographie (DVT)

Mittels DVT wurde analysiert, inwieweit sich der Knochen an der Defektstelle der verschiedenen Gruppen regeneriert hatte. Die Messung wurde an jeweils sechs Tieren in jeder Gruppe jeweils drei und sechs Wochen nach der Operation durchgeführt. Nach drei Wochen zeigten alle drei Untersuchungsgruppen (PRP-Gruppe, Spongiosa-Positivkontrolle und BMC-Gruppe) eine signifikante Knochenneubildung gegenüber dem Ausgangswert ($p < 0,01$). So betrug die durchschnittliche Knochenneubildung in der PRP-Gruppe $26,9 \% \pm 7,7 \%$ des ursprünglichen Defektvolumen. Dies war signifikant höher als in der BMC-Gruppe ($18,7 \%$, $p < 0,01$). Es war kein Unterschied zur Positivkontrolle mit $27,2 \%$ ($p > 0,05$) nachzuweisen (Abbildung 13).

Die Knochenneubildung nach sechs Wochen war wiederum in allen drei Gruppen höher als zum drei Wochen-Zeitpunkt ($p < 0,01$). Auch hier war die Heilungsrate in der PRP-Gruppe derjenigen in der BMC-Gruppe überlegen ($p < 0,01$). Der Unterschied zwischen der PRP-Gruppe und der Positivkontrolle war nicht statistisch signifikant ($p > 0,01$).

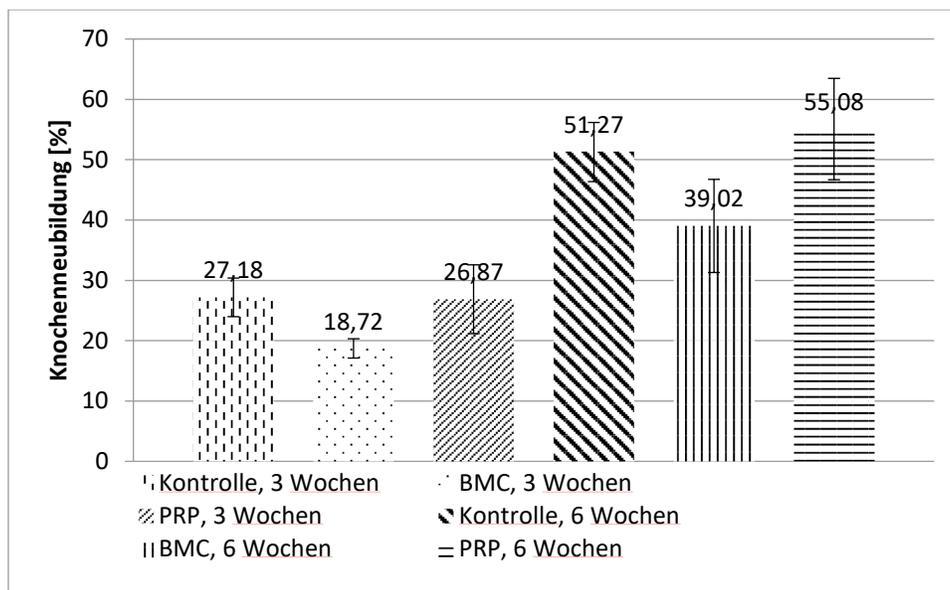


Abbildung 13: Knochenregeneration nach drei und sechs Wochen in der Kontroll-, PRP- und BMC-Gruppe gemessen mit DVT.

3.3 Histomorphometrische Analyse

Die Ergebnisse der histomorphometrischen Analyse waren denen der DVT sehr ähnlich (Abbildung 14 und Abbildung 15). Alle drei Gruppen zeigten nach drei Wochen signifikante Knochenneubildung, die sich nach sechs Wochen noch verstärkt hatte. Die Spongiosa-Positivkontrollgruppe zeigte nach 3 Wochen eine Knochenneubildung von 17,45 % \pm 2,90 % im kortikalen Defektbereich und im Spongiosabereich von 14,14 % \pm 3,28 %. Die PRP-Gruppe hatte nach drei Wochen 16,83 % \pm 8,98 % neuen kortikalen Knochen und 12,87 % \pm 5,83 % neuen trabekulären Knochen produziert. Dieser Unterschied zwischen der Positivkontrolle und der PRP-Gruppe war weder für den kortikalen noch den Spongiosabereich statistisch signifikant ($p > 0,05$). Die BMC-Gruppe hatte dagegen nach drei Wochen mit 7,95 % \pm 2,23 % Knochenneubildung im kortikalen Defektbereich und 5,23 % \pm 1,76 % im Spongiosabereich nach drei Wochen signifikant weniger Knochen neugebildet ($p < 0,01$).

Nach sechs Wochen konnte mittels Histomorphometrie in der PRP-Gruppe im kortikalen Defektbereich 42,95 % \pm 6,62 % und im Spongiosabereich 39,42 % \pm 7,37 % Knochenneubildung nachgewiesen werden. Die Positivkontrollgruppe zeigte nach sechs Wochen eine Neubildung von 43,05 % \pm 2,70 % kortikalem Knochen und 34,27 % \pm 6,92 % trabekulären Knochen. Diese Unterschiede waren nicht signifikant ($p > 0,05$). Die Knochenneubildung in der BMC-Gruppe war auch nach sechs Wochen mit 29,22 % \pm 5,86 % im kortikalen Defektbereich und 22,68 % \pm 4,41% im zentralen Defektbereich signifikant geringer als sowohl bei der PRP als auch bei der Positiv-Kontrollgruppe ($p < 0,01$).

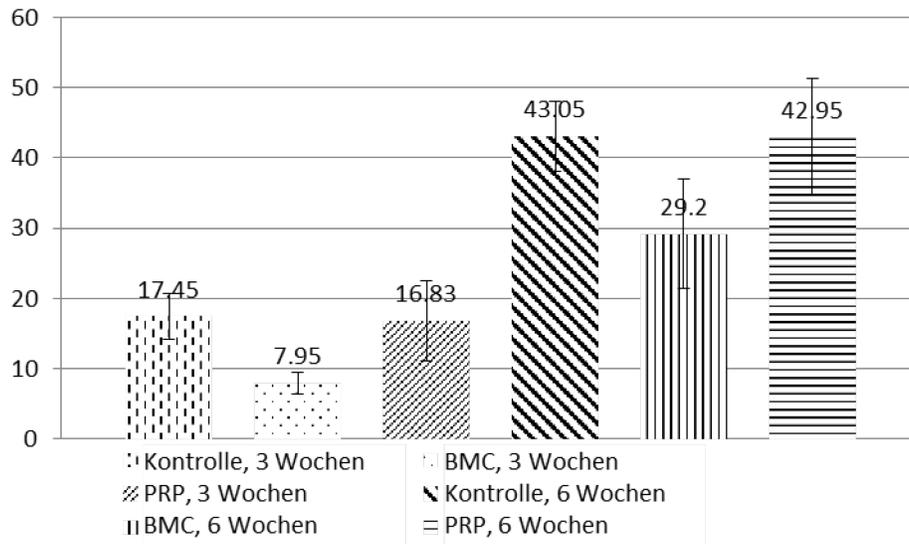


Abbildung 14: Knochenregeneration im kortikalen Defektbereich nach drei und sechs Wochen in der Kontroll-, PRP- und BMC-Gruppe gemessen mit Histomorphometrie.

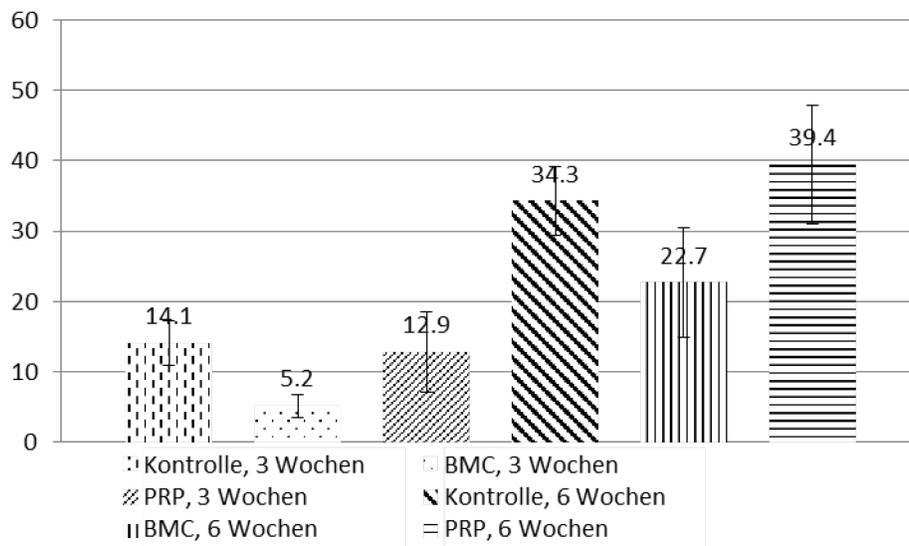


Abbildung 15: Knochenregeneration im Spongiosabereich nach drei und sechs Wochen in der Kontroll-, PRP- und BMC-Gruppe gemessen mit Histomorphometrie.

3.4 Immunohistochemische Analyse

Die Mikrogefäßdichte in der BMC-Gruppe war nach drei Wochen 55,65 Mikrogefäße/mm² mit einer Standardabweichung von 8,21 Mikrogefäßdichte und nach sechs Wochen 69,07 ± 6,55 Mikrogefäße/mm². Damit war die Mikrogefäßdichte in der BMC-Gruppe nach sechs Wochen signifikant höher als nach drei Wochen ($p < 0,01$). Auch in der PRP-Gruppe wurden mittels Immunohistochemie nach sechs Wochen eine signifikant höhere Mikrogefäßdichte in der BMC-Gruppe festgestellt ($p < 0,01$). Dort war die Mikrogefäßdichte nach drei Wochen $60,48 \pm 18,57$ Mikrogefäße/mm² und nach sechs Wochen $78,00 \pm 16,55$ Mikrogefäße/mm². Der Unterschied in der Mikrogefäßdichte zwischen BMC und PRP-Gruppe war statistisch weder nach drei Wochen noch nach sechs Wochen signifikant ($p > 0,05$).

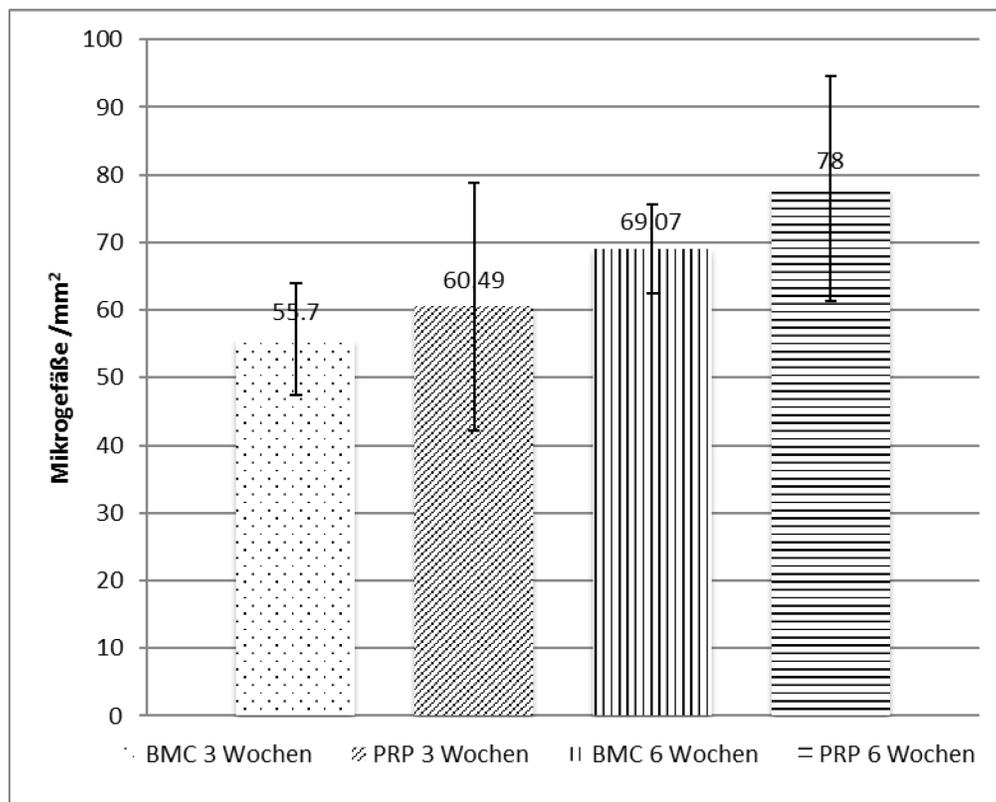


Abbildung 16: Mikrogefäßdichte in den immunohistochemischen Schnitten der PRP- und BMC-Gruppen nach jeweils drei und sechs Wochen.

4 Diskussion

Das Ziel dieser Studie war zu untersuchen, ob die Kombination von CPG mit BMC und PRP die Heilung eines Knochendefekts im Vergleich zu einer CPG und BMC Kombination verbessern kann. Zusätzlich wurden die Ergebnisse der PRP-Gruppe eine „Goldstandard-Positivkontrolle“ verglichen, die ein autologes Knochen transplantat erhielt.

Die Behandlung wurde von allen Tieren ohne ungeplante Ereignisse gut vertragen, was zeigt, dass eine erhöhte Konzentration von Wachstumsfaktoren im PRP in diesem Versuchsaufbau keine schädlichen Nebenwirkungen verursacht.

Dabei sollte auch untersucht werden, ob die Kombination von CPG mit BMC und PRP dem Spongiosatransplantat vergleichbare Ergebnisse liefern kann. Spongiosatransplantate sind noch immer der Goldstandard für die chirurgische Behandlung von chronischen Knochendefekten (Le Blanc et al., 2003; Markopoulou et al., 2009), da sie eine gute Erfolgsrate für diese schwierigen Eingriffe haben (Bellabarba, Ricci und Bolhofner, 2001; Finkemeier und Chapman, 2002; Babhulkar, Pande und Babhulkar, 2005; Plachokova et al., 2007).

Da autologe Knochen transplantationen einen zweiten Eingriff für den Patienten bedeuten, der mit Morbidität an der Entnahmestelle einhergeht und eine zusätzliche Belastung für die oft älteren Patienten darstellt, und zusätzlich autologe Spongiosa nur begrenzt zur Verfügung steht (Arrington et al., 1996), wird heutzutage intensiv nach Alternativen gesucht. Diese Studie will hierzu einen Beitrag leisten.

Vor der eigentlichen Operation zur Behandlung des Knochendefekts im Kaninchenmodell wurde autologes PRP präpariert. Die Plättchenpräparation erreichte dabei eine Anreicherung von autologen Plättchen, die die Konzentration der Plättchen um 5,2-fach erhöhte. Wie in der Literatur berichtet liegt dieser Wert im Rahmen der Konzentration von 4,9- und 5-fach (Marx, 2001; Schneppendahl et al., 2015).

Da durch die Plättchenanreicherung die für die Funktion des PRP wichtigen Wachstumsfaktoren zerstört werden können (Dugrillon et al., 2002), wurden die Konzentrationen der

Wachstumsfaktoren PDGF- $\beta\beta$, TGF- β 1 und VEGF jeweils im nativen Blut bestimmt und mit den jeweiligen im PRP gemessenen Konzentrationen verglichen. Die durchschnittlichen Konzentrationen von PDGF- $\beta\beta$ und TGF- β 1 waren dabei mit jeweils 8,3- und 15,7-facher Anreicherung gegenüber dem nativen Blut deutlich stärker als fünffach erhöht. Verglichen mit der fünffachen Anreicherung der Plättchenkonzentration, war eine ebenfalls ungefähr fünffache Erhöhung der Wachstumsfaktorkonzentration zu erwarten. Dass die gemessene Konzentration von PDGF- $\beta\beta$ und TGF- β 1 unverkennbar über dieser Erwartung lagen, ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass der Plättchenanreicherungsprozess die Speichergranula im Inneren der Plättchen nach außen freisetzt und dadurch im Überstand des PRP eine höhere Konzentration dieser Wachstumsfaktoren erreicht wird (Lubkowska, Dolegowska und Banfi, 2012; Dugrillon et al., 2002).

Die durchschnittliche VEGF-Konzentration im PRP war im Gegensatz zu den Ergebnissen mit PDGF- $\beta\beta$ und TGF- β 1 nur 3,1-fach höher als im nativen Blut und damit niedriger als die durch die fünffache Konzentrierung der Plättchen im PRP zu erwartende Konzentration. Hier zeigte sich also, dass ein Teil des im nativen Blut vorhandenen VEGF durch den Anreicherungsprozess verloren ging oder zerstört wurde (Dugrillon et al., 2002). VEGF im Körper bindet an die extrazelluläre Matrix (EZM) und wird von dort bei Bedarf, z.B. unter hypoxischen Bedingungen freigesetzt (Belair et al., 2014). Dieser Mechanismus sorgt für eine Sequestrierung von im Blut nachweisbarem VEGF im intakten Organismus. Da isoliertes natives Blut oder Plasma keine EZM enthält, kann dieser Mechanismus nicht für die hier beobachtete relative Reduktion der VEGF-Konzentration im PRP verantwortlich sein. Es ist vielmehr möglich, dass ein Teil des VEGF im Plasma denaturiert und daher nicht mehr messbar und wohl auch nicht biologisch aktiv war. Alternativ kann ein Teil des VEGF an seinen Rezeptor auf den Plättchen gebunden und daher nicht mehr im Überstand nachweisbar sein. Für diese Ansicht spricht, dass nachgewiesen werden konnte, dass ein VEGFR auf Plättchen exprimiert wird (Katoh et al., 1995).

Knochenneubildung wurde in dieser Studie mittels CBTCT und Histomorphometrie gemessen. Die DVT ergibt dabei einen Überblick über das gesamte Defektgebiet, während die Histomorphometrie einen detaillierten Ausschnitt aus dem Defekt bewertet. Beide Methoden gemeinsam zu verwenden, ist wichtig, da DVT keine mikroskopischen

Unterschiede in der Knochenneubildung, d. h. in der Qualität des neugebildeten Knochens messen kann. Es ist so z. B. vorstellbar, dass bei gleichbleibendem mittels DVT gemessenen Knochenzuwachs möglicherweise morphologische Unterschiede in der Knochenneubildung mittels Histomorphometrie nachweisbar sind.

In der hier vorgestellten Studie waren jedoch die Ergebnisse der beiden Methoden nahezu identisch, was dafürspricht, dass die Qualität der Knochenneubildung bei den verschiedenen Gruppen vergleichbar war und sich nur beim Knochenzuwachs Unterschiede zeigten.

Eine mittels DVT und Histomorphometrie nachweisbare Knochenneubildung an einem Knochendefekt ist in gesunden Tieren in jedem Fall nach drei und sechs Wochen Beobachtungszeit zu erwarten (Kröpil et al., 2012). Die Ergebnisse dieser Studie, die eine signifikante Neubildung sowohl in der röntgenologischen als auch in der histologischen Untersuchung nach drei und stärker noch sechs Wochen in der Goldstandard-Positivkontrollgruppe zeigten, die ein autologes Spongiosatransplantat erhielt, bestätigten diese Erwartung und zeigten, dass der Versuchsaufbau nicht mit der normalen Knochenheilung interferierte. Diese Gruppe legte damit die Erwartungswerte für die Ergebnisse der anderen Gruppen fest, sollten diese sich als ebenbürtig herausstellen und damit andeuten, dass sie eine tragfähige Alternative für Spongiosatransplantate sein könnten.

Sowohl die PRP- als auch die BMC-Gruppe verwendeten anorganisches CPG als Matrix, um den Knochendefekt aufzufüllen. Der Vergleich der BMC-Gruppe mit der Positivkontrolle zeigte hierbei, dass die Kombination von CPG mit BMC einem autologen Spongiosatransplantat sowohl nach drei als auch nach sechs Heilungswochen unterlegen ist. Diese Studie war nicht darauf ausgelegt zu testen, ob dieser Unterscheid auch nach einer längeren Beobachtungsphase wie z. B. nach einem Jahr noch feststellbar ist. Es ist allerdings denkbar, dass CPG zwar eine längere Heilungsdauer benötigt, im Endeffekt aber ähnliche Ergebnisse wie autologe Spongiosa liefert. Die Tatsache, dass die BMC-Gruppe statistisch signifikanten Knochenzuwachs zu beiden Zeitpunkten zeigte, spricht für diese Hypothese.

Eine Literatursuche in Bezug auf Langzeitergebnisse von CPG im Vergleich zu autologem Spongiosatransplantat zeigte, dass nur wenige Publikationen existieren, die CPG direkt mit einem autologen Spongiosatransplantat zur Behandlung eines experimentellen Knochendefekts verglichen und es gibt keine Publikation, die eine lange Beobachtungszeit verwendet.

In einer Arbeit von Köster und Mitarbeitern bestand nach sechs Wochen kein Unterschied im Zuwachs von Knochen- und Knochenmarkmaterial um ein CPG- oder um ein autologes Spongiosatransplantat, das im fetthaltigen Knochenmark der Tibia implantiert wurde (Köster et al., 1979). Der Unterschied zu der hier vorliegenden Studie bestand jedoch darin, dass das Transplantat im Knochenmark und nicht in einem offenen Knochendefekt implantiert wurde. Zusätzlich verwendete die hier vorliegende Studie CPG in Kombination mit BMC, während Köster und Mitarbeiter CPG allein verwendeten. Möglicherweise erklärt dies die unterschiedlichen Ergebnisse im Vergleich zu der hier vorliegenden Studie. Wie hier war jedoch das CPG-Material gleichwertig biokompatibel wie das autologe Spongiosatransplantat und verursachte keinerlei Abstoßungsreaktion, was im Gegensatz zu einem allogenen Knochentransplantat stand, das in der Studie von Köster und Mitarbeitern ebenfalls getestet wurde (Köster et al., 1979).

Der Vergleich der BMC mit der PRP-Gruppe zeigte, dass der Zusatz von PRP zur Kombination von BMC und CPG die Heilungsrate verbessert und diese Kombination dem BMC/CPG in der Fähigkeit, Knochenneubildung in einem Knochendefekt zu stimulieren, überlegen ist. Dieses Ergebnis ist wahrscheinlich auf die verschiedenen Wachstumsfaktoren zurückzuführen, die in PRP enthalten sind.

Ein Vergleich mit der Literatur zeigt jedoch, dass die Fähigkeit von PRP, Knochenneubildung zu stimulieren, sowohl von den Versuchsbedingungen als auch vom verwendeten Substrat abhängt. So verglichen Kasten et al. die osteogene Aktivität von MSZ und entweder Calcium-defizienten Hydroxyapatitblöcken (CDHA), die eine große spezifische Oberfläche besitzen ($48 \text{ m}^2/\text{g}$) mit MSZ und beta-Tricalciumphosphat mit einer kleineren spezifischen Oberfläche ($<0,5 \text{ m}^2/\text{g}$). Zusätzlich wurden diese Gruppen mit oder ohne PRP verwendet. Die Proben wurden subkutan in *severe combined immuno deficient*

(SCID) Mäuse implantiert und ektope Knochenbildung auf den Implantaten gemessen. Es zeigte sich, dass CDHA die Knochenneubildung stärker stimuliert als beta-Tricalciumphosphat. Zusatz von PRP hatte keinen Einfluss auf die Knochenneubildung, jedoch zeigte eine stärkere Aktivität der spezifischen alkalischen Phosphatase in den PRP/MSZ/CDHA Proben ein größeres osteogenes Potential in dieser Gruppe an (Kasten et al., 2006).

CDHA war auch in einer Studie von Vogel und Mitarbeitern beta-Tricalciumphosphat-Blöcken als Matrix für ektope Knochenneubildung in SCID-Mäusen überlegen. In dieser Studie, in der die Matrices vor der Implantation in den Tieren in vitro mit PRP oder fötalem Kälberserum (FCS) behandelt wurden, zeigte sich, dass PRP die Knochenneubildung von MSZ und deren Proliferation stärker fördert als ein Zellkulturmedium mit FCS (Vogel et al., 2006). Bei dieser Studie wurde allerdings ein sehr artifizierlicher Versuchsaufbau verwendet, der wenig gemeinsam hat mit den Bedingungen, unter denen Implantate bei Patienten mit chronischen Knochendefekten eingesetzt werden.

Ko und Mitarbeiter kombinierten PRP mit Calciumphosphatknochenzement um ein autologes Spongiosaimplantat in der Tibia von Kaninchen zu fixieren (Ko et al., 2013). Sie kultivierten zusätzlich MSZ mit Calciumphosphatknochenzement und verschiedenen Konzentrationen von PRP in vitro. Es zeigte sich, dass 10 % und 15 % PRP zu signifikant besserem Wachstum von Osteoprogenitorzellen führt als CPC/MSZ ohne oder mit 5 % PRP. In vivo konnte für alle PRP-Gruppen stärkere Knochenneubildung und Knochenremodellierung nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse bestätigen zwar die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie, dass MSZ in der Gegenwart von PRP mehr Knochenmaterial neu bilden als ohne PRP, jedoch lassen sich die Ergebnisse nicht ohne weiteres vergleichen, da in der Studie von Ko und Mitarbeitern ein autologes Knochenimplantat verwendet wurde, das lediglich mit PRP angereichertem Knochenzement fixiert wurde. Das autologe Knochenimplantat an sich enthält schon MSZ und Wachstumsfaktoren, weswegen es auch als Goldstandard gilt.

Die hier vorliegende Studie hatte dagegen zum Ziel zu testen, ob eine entsprechend behandelte CPG-Präparation mit MSZ in der Form von BMC und PRP einer CPG/BMC

Präparation allein überlegen ist. Die Studie von Ko und Mitarbeitern zeigt zwar, das PRP das Wachstum von Osteoprogenitorzellen in vitro und in vivo fördern kann, die Frage, ob autologe Knochentransplantation durch eine weniger invasive Methode ersetzt werden kann, lässt sich damit allerdings nicht klären.

Eine weitere Studie testete PRP in Kombination mit BMC und CPG in vivo an Knochendefekten von 2,5 mm mal 5 mm Größe (Qi et al., 2015). In den Gruppen, die PRP erhielten, war die Expression von Kollagen Type I und Osteocalcin signifikant höher als in den Gruppen, die ohne PRP behandelt wurden. Zusätzlich induzierte PRP mit der Expression von Kollagen Type II und Tenomodulin zwei weitere Knochenproteine. Auch die Aktivität der spezifischen Alkalischen Phosphatase war in den PRP/BMC/CPG Proben höher als in den Kontrollgruppen. Vier Wochen nach der Implantation war in der PRP/BMC/CPG-Gruppe eine signifikant stärkere Knochenneubildung nachweisbar als in den Kontrollgruppen, was die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie bestätigt, dass der Zusatz von PRP zu einem BMC/CPG Implantat einem reinen BMC/CPG Implantat in der Fähigkeit Knochenneubildung in einem Knochendefekt zu induzieren, überlegen ist. Das die Studie von Qi et al ihre Ergebnisse zu anderen Zeitpunkten als in der hier vorliegenden Studie gemessen hat und dennoch zu ähnlichen Ergebnissen kommt, unterstreicht die Robustheit des Versuchsaufbaus.

Studien am Menschen gibt es zu diesem Thema bisher sehr wenige, was zum Teil auf ein ethisches Dilemma zurückzuführen ist, da mit dem autologen Knochentransplantat eine Behandlungsmöglichkeit existiert, die zwar invasiv und mit deutlicher Morbidität an der Entnahmestelle verbunden ist, jedoch eine hohe Erfolgsrate erzielt (Bellabarba, Ricci und Bolhofner, 2001; Finkemeier und Chapman, 2002; Babhulkar, Pande und Babhulkar, 2005; Plachokova et al., 2007). Eine Vergleichsstudie am Menschen ist nur ethisch vertretbar, wenn eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass die Vergleichsbehandlung dem derzeitigen Behandlungsstand gegenüber zumindest nicht deutlich unterlegen erscheint. Diese Bedingung ist für Studien mit CPG zu Behandlung von Skelettknochendefekten derzeit nicht gegeben.

PRP und /oder CPG wird jedoch in der Implantologie der Zahnmedizin schon seit längerer Zeit erforscht. Da in der Kieferchirurgie autologe Transplantate nur in Ausnahmefällen (z.B. für Gesichtsrekonstruktionen nach einem schweren Unfall) nicht im Kieferraum entnommen werden und im Kieferraum nur begrenztes Transplantatmaterial zur Entnahme zur Verfügung steht, wird dort schon seit langem standardmäßig CPG oder andere Knochenersatzmaterialien wie entproteinierter und/oder entmineralisierter Rinderknochen verwendet (Esposito et al., 2009).

PRP wird inzwischen auch in der Kieferchirurgie eingesetzt, um Knochenneubildung zu stimulieren. Eine solche Studie testete PRP in Kombination mit CPG im Vergleich zur PRP in Kombination mit demineralisierter boviner Knochenmatrix an jeweils 20 Patienten, die eine Sinusbodenerhöhung erhielten, um später eine Dentalimplantat einsetzen zu können (Taschieri et al., 2016). Eine histomorphometrische Analyse, die Biopsiematerial verwendete, das sechs Monate nach dem Eingriff gesammelt wurde, ergab, dass sich in beiden Gruppen eine signifikante Menge neuer Knochen gebildet hatte. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen und in beiden Gruppen traten keinerlei negative Nebenwirkungen oder Implantatsausfälle auf. Zwar zeigt diese Studie nicht, ob der Zusatz von PRP zum Knochenersatzmaterial, die Erfolgsrate und Heilungsgeschwindigkeit verbessert, jedoch kann daraus, dass keinerlei Nebenwirkungen auftraten und die Erfolgsrate in dieser Studie zudem 100 % betrug, geschlossen werden, dass der Zusatz von PRP zu Knochenersatzmaterial im Menschen sehr gut vertragen wird und keine Sicherheitsbedenken für zukünftige humane Studien bestehen.

Zusätzlich zur Klärung der Frage, ob PRP/BMC einem BMC-Implantat in der Fähigkeit, Knochenneubildung in einem experimentellen Knochendefekt zu stimulieren, überlegen ist, sollte die hier vorliegende Studie auch untersuchen, inwieweit PRP/BMC mit den Ergebnissen eines autologen Knochentransplantats vergleichbar ist.

Es zeigte sich hier weder zum Zeitpunkt nach drei Wochen noch nach sechs Wochen ein signifikanter Unterschied in der Knochenneubildung in der PRP-Gruppe im Vergleich zur autologen Knochentransplantatkontrolle. Damit sprechen die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie dafür, dass PRP/BMC sich möglicherweise eignet, um autologe

Knochen transplantate zur Behandlung von chronischen Knochendefekten beim Menschen zu ersetzen oder zumindest den Menschen eine alternative Behandlungsmethode zu bieten, die entweder aufgrund von Komorbiditäten wie z.B. Osteoporose kein qualitativ oder quantitative ausreichendes Spendermaterial besitzen oder bei denen das zusätzliche Trauma der Transplantatentnahme ein zu hohes Risiko darstellen würde.

Die Kombination von BMC mit CPG stellt eine gute Ausgangsbasis für einen Ersatz eines autologen Knochen transplantats dar, da es mit dem CPG eine Gerüstmatrix enthält und BMC MSZ enthalten. Dies konnten Herten und Mitarbeiter in einer Studie zur Zusammensetzung von BMC nachweisen (Herten et al., 2013). Diese Zellen sind wichtige Vorläuferzellen, die je nach dem Milieu, in dem sie sich befinden, in Adipozyten, Chondrozyten oder Osteoblasten differenzieren können (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009). In einer Knochenfraktur liegen proinflammatorische Proteine wie $TNF\alpha$ und IL-1 und IL-6 vor, die eine Differenzierung von MSZ in Richtung Osteoblasten provozieren (Deschaseaux, Sensébé und Heymann, 2009).

Der Zusatz von PRP fördert zusätzlich die Knochenneubildung, da PRP für die Osteogenese wichtige Wachstumsfaktoren wie PDGF, $TGF\beta$, VEGF und EGF enthält (Marx, 2001).

Es existieren sogar Studien, die zeigen, dass ein anorganisches Knochensubstrat in Kombination mit PRP ohne BMC einem Implantat bestehend aus BMC und Knochensubstrat überlegen ist. So erhielten in einer Studie aus dem Jahr 2007 von 33 Patienten, bei denen ein Genu varum mit einer Tibiaosteotomie behandelt wurden, elf Knochenchips allein zur Behandlung des Tibiadefekts, elf Knochenchips und PRP und elf Knochenchips und BMC. Die Knochenneubildung und die Assimilierung der Knochenchips sowohl in der BMC- als auch der PRP-Gruppe waren höher als die in der Kontrollgruppe gemessenen Werte, jedoch zeigte die PRP-Gruppe statistisch bessere Ergebnisse, als die BMC-Gruppe (Dallari et al., 2007). Leider fehlte in dieser Studie die Positivkontrollgruppe, die ein autologes Knochen transplantat erhielt, sodass die Ergebnisse dieser Studie nicht direkt mit der hier vorliegenden Studie vergleichbar sind. Dass PRP auch ohne BMC einer BMC-Gruppe überlegen ist, liegt wahrscheinlich daran, dass viele der Wachstums-

faktoren im PRP chemotaktisch wirken und so entsprechende MSZ an die Defektstelle rekrutieren (Lubkowska, Dolegowska und Banfi, 2012; Szczesny, 2002; Calori et al., 2008).

Der Erfolg einer chirurgischen Behandlung eines chronischen Knochendefekts hängt auch der Angiogenese in der Defektstelle und dem Implantat ab, da eine unvollständige Angiogenese zu Folgefrakturen und Nichtvereinigungen führen kann (Willems et al., 2012). Die Mikrogefäßdichte ist ein wichtiger Indikator für Angiogenese (Lörincz et al., 2005) Angiogenese wiederum ist eine notwendige Komponente bei der Heilung von Frakturen (Szczesny, 2002; Mahendra und Maclean, 2007; Wang et al., 2011; Grassmann et al., 2015; Liu et al., 2016; Hu und Olsen, 2017).

Aus diesem Grund und da mit VEGF einer der wichtigsten angiogenetischen Wachstumsfaktoren im PRP in hoher Konzentration vorliegt, wurde in dieser Arbeit die Mikrogefäßdichte im Knochendefekt jeweils drei und sechs Wochen nach der Operation mittels immunhistochemischer Analyse gemessen. Die Mikrogefäßdichte nach drei Wochen diente dabei als interne Kontrolle für den sechs-Wochenwert innerhalb einer Gruppe. Die Mikrogefäßdichte wurde zusätzlich zwischen der BMC und der PRP-Gruppe zu beiden Zeitpunkten verglichen.

Dabei zeigte sich, dass sowohl in der BMC- als auch in der PRP-Gruppe nach sechs Wochen eine höhere Mikrogefäßdichte vorlag als nach drei Wochen. Dieses Ergebnis stimmt mit Berichten aus der Literatur überein, in denen gezeigt werden konnte, dass gesunde Knochentransplantate eine deutliche Angiogenese zeigen und die Mikrogefäßdichte im Transplantat für eine lange andauernde Heilungsphase höher ist, als in gesundem, adultem, nicht-verletztem Knochen (Galindo-Moreno et al., 2010)

Da die durch den Zusatz von PRP erhöhte VEGF-Konzentration einen stärkere Angiogenese in der PRP-Gruppe erwarten ließ, ist das Ergebnis, dass kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der PRP und der BMC-Gruppe nachweisbar war, unerwartet. Tendenziell hatte die PRP-Gruppe eine höhere Mikrogefäßdichte als die BMC-Gruppe, jedoch war die Standardabweichung zwischen den jeweils sechs gemessenen Tieren in

jeder Gruppe relativ hoch. Es ist jedoch denkbar, dass dadurch keine statistische Signifikanz für den Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen erreicht wurde.

Sowohl in der BMC- als auch in der PRP-Gruppe konnte nach drei und stärker nach sechs Wochen signifikante Knochenneubildung mittels radiologischer und histomorphometrischer Analyse nachgewiesen werden. Die höhere Mikrogefäßdichte nach sechs Wochen in beiden Gruppen bestätigt daher die für die Knochenneubildung gefundenen Ergebnisse und zeigt, dass in beiden Gruppen, die für die vollständige Ausheilung notwendige Angiogenese stattfand.

Angiogenese in einem Knochenimplantat kann in vivo von vielen Faktoren wie z.B. Entzündungen und besonders im Mundbereich auch von Tabak- und Alkoholkonsum beeinflusst werden (Galindo-Moreno et al., 2010). Autologe Knochentransplantate erlauben dabei bessere Angiogenese als xenogene (Artese et al., 2011), jedoch zeigen die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie, dass auch anorganische Materialien in Kombination mit BMC oder BMC/PRP angiogenetisch wirken können und so das Überleben und die Assimilation des Transplantats sichern können.

Ob die tendenziell höhere Mikrogefäßdichte in der PRP-Gruppe parallel zu den Ergebnissen der Knochenneubildung tatsächlich stärker war als in der BMC-Gruppe könnte mit einer zukünftigen Studie mit einer größeren Stichprobe geklärt werden. Da die PRP-Gruppe eine höhere Konzentration vieler angiogenetischen Wachstumsfaktoren wie $TGF\alpha$, PDGF und allen voran VEGF aufwies, ist es denkbar, dass hier tatsächlich ein Unterschied zwischen den Gruppen bestand, aber aufgrund einer zu kleinen Stichprobe bei hoher Variabilität der Ergebnisse die Signifikanz verfehlt wurde.

Dabei könnte auch getestet werden, ob BMC, wie die Knochenneubildungsergebnisse nahelegen, auch bei der Angiogenese einen inhibierenden Einfluss ausüben kann und ob PRP in Kombination mit lyophilisierten Knochenchips eine ebenso starke Angiogenese induzieren kann, wie PRP mit einem autologen Knochentransplantat oder einem autologen Knochentransplantat alleine.

5 Schlussfolgerung

Diese Studie sollte untersuchen, ob der Zusatz von PRP zu einem BMC/CPG-Gemisch als Knochenimplantatmaterial zu besseren Ergebnissen bei der Behandlung eines experimentellen Knochendefekts führt.

Es zeigte sich, dass der PRP-Zusatz zu besserer Knochenneubildung führt und damit diese Behandlungsmethode einem CPG/BMC-Gemisch überlegen ist. Die Untersuchung der Mikrogefäßdichte ergab, dass eine robuste Angiogenese mit beiden Materialien stattfindet, was eine wichtige Voraussetzung für eine korrekte und vollständige Ausheilung des Knochendefektes ist.

Der Vergleich von PRP mit der Positivkontrolle, die mit dem Goldstandard der klinischen Praxis, also einem autologen Knochentransplantat, behandelt wurde, ergab kein statistisch signifikanter Unterschied in der Knochenneubildung. Damit stellt sich eine PRP-anereicherte BMC/CPG-Mischung als mögliche Alternative zum autologen Knochentransplantat dar.

Da autologe Knochentransplantate durch das zusätzliche Trauma und Morbidität an der Entnahmestelle sehr belastend für den Patienten sind und zusätzlich nur eine begrenzte Menge von Knochenmaterial entnommen werden kann, wäre eine tragfähige Alternative hierzu ein wichtiger Fortschritt zum Wohle der Patienten mit Knochendefekten. Durch die geringere Belastung der Patienten, ist auch ein wirtschaftlicher Vorteil mit geringeren Kosten durch weniger chirurgische Eingriffe, kürzeren Krankenhausaufenthalten und kürzerem Krankenstand zu erwarten,

Ethische Bedenken beim Design zukünftiger Studien am Menschen müssen jedoch genau bedacht werden, da mit dem autologen Knochentransplantat eine Behandlungsmethode mit hoher Erfolgsrate existiert. Studien mit PRP, das bei verschiedenen Indikationen am Menschen eingesetzt wird, deuten jedoch auf gute Verträglichkeit zusammen mit hoher Wirksamkeit hin.

6 Referenzen

Ali, I., Chouhan, V. S., Dangi, S. S., Gupta, M., Tandiya, U., Hyder, I., Yadav, V. P., Panda, R. P., Babitha, V., Nagar, V., Sonwane, A., Khan, F. A., Das, B. C., Singh, G., Bag, S. und Sarkar, M. (2014) „Expression and localization of locally produced growth factors regulating lymphangiogenesis during different stages of the estrous cycle in corpus luteum of buffalo (*Bubalus bubalis*).“, *Theriogenology*, 81(3), S. 428–36. doi: 10.1016/j.theriogenology.2013.10.017.

Arrington, E., Smith, W., Chambers, H., Bucknell, A. und Davino, N. (1996) „Complications of iliac crest bone graft harvesting.“, *Clin Orthop Relat Res*, 329, S. 300–309.

Artese, L., Piattelli, A., Di Stefano, D. A., Piccirilli, M., Pagnutti, S., D’Alimonte, E. und Perrotti, V. (2011) „Sinus Lift With Autologous Bone Alone or in Addition to Equine Bone: An Immunohistochemical Study in Man“, *Implant Dentistry*, 20(5), S. 1. doi: 10.1097/ID.0b013e3182310b3d.

Artzi, Z. und Nemcovsky, C. E. (1998) „The application of deproteinized bovine bone mineral for ridge preservation prior to implantation. Clinical and histological observations in a case report.“, *Journal of periodontology*, 69(9), S. 1062–7. doi: 10.1902/jop.1998.69.9.1062.

Babhulkar, S., Pande, K. und Babhulkar, S. (2005) „Nonunion of the diaphysis of long bones.“, *Clin Orthop Relat Res*, 431, S. 50–56.

Bandyopadhyay, A., Tsuji, K., Cox, K., Harfe, B. D., Rosen, V. und Tabin, C. J. (2006) „Genetic Analysis of the Roles of BMP2, BMP4, and BMP7 in Limb Patterning and Skeletogenesis“, *PLoS Genetics*, 2(12), S. e216. doi: 10.1371/journal.pgen.0020216.

De Bari, C., Dell’Accio, F., Tylzanowski, P. und Luyten, F. P. (2001) „Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane“, *Arthritis & Rheumatism*, 44(8), S. 1928–1942. doi: 10.1002/1529-0131(200108)44:8<1928::AID-

ART331>3.0.CO;2-P.

Belair, D. G., Khalil, A. S., Miller, M. J. und Murphy, W. L. (2014) „Serum-Dependence of Affinity-Mediated VEGF Release from Biomimetic Microspheres“, *Biomacromolecules*, 15(6), S. 2038–2048. doi: 10.1021/bm500177c.

Bellabarba, C., Ricci, W. und Bolhofner, B. (2001) „Results of indirect reduction and plating of femoral shaft nonunions after intramedullary nailing“, *Journal of orthopaedic trauma*, 15(4), S. 254–63.

Bennett, C. N., Longo, K. A., Wright, W. S., Suva, L. J., Lane, T. F., Hankenson, K. D. und MacDougald, O. A. (2005) „Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b.“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(9), S. 3324–9. doi: 10.1073/pnas.0408742102.

Biver, E., Thouverey, C., Magne, D. und Caverzasio, J. (2014) „Crosstalk between tyrosine kinase receptors, GSK3 and BMP2 signaling during osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells.“, *Molecular and cellular endocrinology*, 382(1), S. 120–30. doi: 10.1016/j.mce.2013.09.018.

Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E. und Ringdén, O. (2003) „HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells.“, *Experimental hematology*, 31(10), S. 890–6.

Calori, G., Tagliabue, L., Gala, L. und D’Imporzano, M. (2008) „Application of rhBMP-7 and platelet-rich plasma in the treatment of long bone non-unions: a prospective randomised clinical study on 120 patients“, *Injury*.

Caneva, M., Botticelli, D., Pantani, F., Baffone, G. M., Rangel, I. G. und Lang, N. P. (2012) „Deproteinized bovine bone mineral in marginal defects at implants installed immediately into extraction sockets: an experimental study in dogs.“, *Clinical oral implants research*, 23(1), S. 106–112. doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02202.x.

Caplan, A. I. (1991) „Mesenchymal stem cells“, *Journal of Orthopaedic Research*, 9(5), S. 641–650. doi: 10.1002/jor.1100090504.

Caverzasio, J., Biver, E. und Thouverey, C. (2013) „Predominant role of PDGF receptor

transactivation in Wnt3a-induced osteoblastic cell proliferation.“, *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 28(2), S. 260–70. doi: 10.1002/jbmr.1748.

Cébe Suarez, S., Pieren, M., Cariolato, L., Arn, S., Hoffmann, U., Bogucki, A., Manlius, C., Wood, J. und Ballmer-Hofer, K. (2006) „A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2.“, *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 63(17), S. 2067–77. doi: 10.1007/s00018-006-6254-9.

Chen, L., Zhang, F., Kong, D., Zhu, X., Chen, W., Wang, A. und Zheng, S. (2013) „Saikosaponin D disrupts platelet-derived growth factor- β receptor/p38 pathway leading to mitochondrial apoptosis in human LO2 hepatocyte cells: a potential mechanism of hepatotoxicity.“, *Chemico-biological interactions*, 206(1), S. 76–82. doi: 10.1016/j.cbi.2013.08.006.

Claesson-Welsh, L. (2008) „VEGF-B taken to our hearts: specific effect of VEGF-B in myocardial ischemia.“, *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 28(9), S. 1575–6. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.170878.

Clément-Lacroix, P., Ai, M., Morvan, F., Roman-Roman, S., Vayssière, B., Belleville, C., Estrera, K., Warman, M., Baron, R. und Rawadi, G. (2005) „Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone formation and bone mass in mice.“, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102(48), S. 17406–17411.

Colnot, C. (2009) „Skeletal Cell Fate Decisions Within Periosteum and Bone Marrow During Bone Regeneration“, *Journal of Bone and Mineral Research*, 24(2), S. 274–282. doi: 10.1359/jbmr.081003.

Cornell, C. (1999) „Osteoconductive materials and their role as substitutes for autogenous bone grafts“, *Orthopedic Clinics North America*, 30(4), S. 591–598.

Crane, J. L. und Cao, X. (2014) „Bone marrow mesenchymal stem cells and TGF- β signaling in bone remodeling.“, *The Journal of clinical investigation*, 124(2), S. 466–72. doi: 10.1172/JCI70050.

Dallari, D., Savarino, L., Stagni, C., Cenni, E., Cenacchi, A., Fornasari, P. M., Albisinni, U., Rimondi, E., Baldini, N. und Giunti, A. (2007) „Enhanced Tibial Osteotomy Healing with Use of Bone Grafts Supplemented with Platelet Gel or Platelet Gel and Bone Marrow Stromal Cells“, *The Journal of Bone and Joint Surgery (American)*, 89(11), S. 2413. doi: 10.2106/JBJS.F.01026.

DeCoster, T. A., Gehlert, R. J., Mikola, E. A. und Pirela-Cruz, M. A. (2004) „Management of posttraumatic segmental bone defects.“, *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, 12(1), S. 28–38.

Deschaseaux, F., Sensébé, L. und Heymann, D. (2009) „Mechanisms of bone repair and regeneration“, *Trends in Molecular Medicine*. Elsevier Current Trends, 15(9), S. 417–429. doi: 10.1016/J.MOLMED.2009.07.002.

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. ., Krause, D. S., Deans, R. J., Keating, A., Prockop, D. J. und Horwitz, E. M. (2006) „Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement“, *Cytotherapy*, 8(4), S. 315–317. doi: 10.1080/14653240600855905.

Donath, K. (1985) „The diagnostic value of the new method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue (Säge-Schliff (sawing and grinding) technique).“, *Pathology, research and practice*, 179(6), S. 631–3. doi: 10.1016/S0344-0338(85)80209-0.

Duan, X., Murata, Y., Liu, Y., Nicolae, C., Olsen, B. R. und Berendsen, A. D. (2015) „Vegfa regulates perichondrial vascularity and osteoblast differentiation in bone development.“, *Development (Cambridge, England)*, 142(11), S. 1984–91. doi: 10.1242/dev.117952.

Dugrillon, A., Eichler, H., Kern, S. und Klüter, H. (2002) „Autologous concentrated platelet-rich plasma (cPRP) for local application in bone regeneration“, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 31(6), S. 615–619. doi: 10.1054/ijom.2002.0322.

Ellinghaus, A. et al. "Der physiologische Ablauf der Frakturheilung", *Osteologie* 01/2011, S.11

Erices, A., Conget, P. und Minguell, J. J. (2000) „Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood.“, *British journal of haematology*, 109(1), S. 235–42.

Esposito, M., Grusovin, M. G., Felice, P., Karatzopoulos, G., Worthington, H. V und Coulthard, P. (2009) „Interventions for replacing missing teeth: horizontal and vertical bone augmentation techniques for dental implant treatment.“, *The Cochrane database of systematic reviews*, (4), S. CD003607. doi: 10.1002/14651858.CD003607.pub4.

Finkemeier, C. und Chapman, M. (2002) „Treatment of femoral diaphyseal nonunions.“, *Clinical orthopaedics and related research*, S. 223–234.

Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K. und Lalykina, K. S. (1970) „The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells.“, *Cell and tissue kinetics*, 3(4), S. 393–403.

Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V, Kurolesova, A. I. und Frolova, G. P. (1968) „Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues.“, *Transplantation*, 6(2), S. 230–47.

Froelke, J. P. M. und Patka, P. (2007) „Definition and classification of fracture non-unions“, *Injury*, 38(Suppl.), S. 19–22.

Froum, S. J., Wallace, S. S., Elian, N., Cho, S. C. und Tarnow, D. P. (2006) „Comparison of mineralized cancellous bone allograft (Puros) and anorganic bovine bone matrix (Bio-Oss) for sinus augmentation: histomorphometry at 26 to 32 weeks after grafting“, *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2007/01/25, 26(6), S. 543–551.

Fuentealba, L. C., Eivers, E., Ikeda, A., Hurtado, C., dKuroda, H., Pera, E. M. und De Robertis, E. M. (2007) „Integrating Patterning Signals: Wnt/GSK3 Regulates the Duration of the BMP/Smad1 Signal“, *Cell*, 131(5), S. 980–993. doi: 10.1016/j.cell.2007.09.027.

Galindo-Moreno, P., Padial-Molina, M., Fernández-Barbero, J. E., Mesa, F., Rodríguez-Martenez, D. und O’Valle, F. (2010) „Optimal microvessel density from

composite graft of autogenous maxillary cortical bone and anorganic bovine bone in sinus augmentation: influence of clinical variables“, *Clinical Oral Implants Research*, 21(2), S. 221–227. doi: 10.1111/j.1600-0501.2009.01827.x.

Gaur, T., Lengner, C. J., Hovhannisyan, H., Bhat, R. A., Bodine, P. V. N., Komm, B. S., Javed, A., van Wijnen, A. J., Stein, J. L., Stein, G. S. und Lian, J. B. (2005) „Canonical WNT Signaling Promotes Osteogenesis by Directly Stimulating *Runx2* Gene Expression“, *Journal of Biological Chemistry*, 280(39), S. 33132–33140. doi: 10.1074/jbc.M500608200.

Giannoudis, P., Dinopoulos, H. und Tsiridis, E. (2005) „Bone substitutes: an update“, *Injury*, 36(3), S. 20–27.

Giannoudis, P. V und Pountos, I. (2005) „Tissue regeneration. The past, the present and the future.“, *Injury*, 36 Suppl 4(4), S. S2-5. doi: 10.1016/j.injury.2005.10.006.

Grassmann, J., Schneppendahl, J., Hakimi, A., Hertel, M., Betsch, M., Lögters, T., Thelen, S., Sager, M., Wild, M., Windolf, J., Jungbluth, P. und Hakimi, M. (2015) „Hyperbaric oxygen therapy improves angiogenesis and bone formation in critical sized diaphyseal defects“, *Journal of Orthopaedic Research*, 33(4), S. 513–520. doi: 10.1002/jor.22805.

Grimaud, E., Heymann, D. und Rédini, F. (2002) „Recent advances in TGF-beta effects on chondrocyte metabolism. Potential therapeutic roles of TGF-beta in cartilage disorders.“, *Cytokine & growth factor reviews*, 13(3), S. 241–57.

Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. G. und Shi, S. (2000) „Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo“, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), S. 13625–13630. doi: 10.1073/pnas.240309797.

Hakimi, M., Jungbluth, P., Sager, M., Betsch, M., Hertel, M., Becker, J., Windolf, J. und Wild, M. (2010) „Combined use of platelet-rich plasma and autologous bone grafts in the treatment of long bone defects in mini-pigs.“, *Injury*, 41(7), S. 717–23. doi: 10.1016/j.injury.2009.12.005.

Hall, B. K. und Miyake, T. (2000) „All for one and one for all: condensations and the

initiation of skeletal development“, *BioEssays*, 22(2), S. 138–147. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(200002)22:2<138::AID-BIES5>3.0.CO;2-4.

Hannink, M. und Donoghue, D. J. (1989) „Structure and function of platelet-derived growth factor (PDGF) and related proteins.“, *Biochimica et biophysica acta*, 989(1), S. 1–10.

Heldin, C. H. (1992) „Structural and functional studies on platelet-derived growth factor.“, *The EMBO journal*, 11(12), S. 4251–9.

Herman, S., Krönke, G. und Schett, G. (2008) „Molecular mechanisms of inflammatory bone damage: emerging targets for therapy.“, *Trends in molecular medicine*, 14(6), S. 245–53. doi: 10.1016/j.molmed.2008.04.001.

Hernigou, P., Mathieu, G., Poignard, A., Manicom, O., Beaujean, F. und Rouard, H. (2006) „Percutaneous Autologous Bone-Marrow Grafting for Nonunions: Surgical Technique“, *JBJS Essential Surgical Techniques*, os-88(1_suppl_2), S. 322–327. doi: 10.2106/JBJS.F.00203.

Herten, M., Grassmann, J. P., Sager, M., Benga, L., Fischer, J. C., Jäger, M., Betsch, M., Wild, M., Hakimi, M. und Jungbluth, P. (2013) „Bone marrow concentrate for autologous transplantation in minipigs. Characterization and osteogenic potential of mesenchymal stem cells.“, *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology : V.C.O.T.*, 26(1), S. 34–41. doi: 10.3415/VCOT-11-11-0165.

Houck, K. A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B. und Leung, D. W. (1991) „The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA.“, *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 5(12), S. 1806–14. doi: 10.1210/mend-5-12-1806.

Hu, K. und Olsen, B. R. (2017) „Vascular endothelial growth factor control mechanisms in skeletal growth and repair.“, *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, 246(4), S. 227–234. doi: 10.1002/dvdy.24463.

Jiang, D., Dziak, R. und Lynch, S. (1999) „Modification of an osteoconductive anorganic bovine bone mineral matrix with growth factors“, *Journal of periodontology*, 70(8), S.

834–839.

Jiang, Y., Jahagirdar, B. N., Reinhardt, R. L., Schwartz, R. E., Keene, C. D., Ortiz-Gonzalez, X. R., Reyes, M., Lenvik, T., Lund, T., Blackstad, M., Du, J., Aldrich, S., Lisberg, A., Low, W. C., Largaespada, D. A. und Verfaillie, C. M. (2002) „Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow“, *Nature*, 418(6893), S. 41–49. doi: 10.1038/nature00870.

Johnsson, A., Sawaii, T., Jacobsson, M., Granström, G. und Turesson, I. (1999) „A histomorphometric study of bone reactions to titanium implants in irradiated bone and the effect of hyperbaric oxygen treatment“, *The International journal of oral & maxillofacial implants*, 14(5), S. 699–706.

Jones, E. und Yang, X. (2011) „Mesenchymal stem cells and bone regeneration: current status.“, *Injury*, 42(6), S. 562–8. doi: 10.1016/j.injury.2011.03.030.

Jungbluth, P., Hakimi, M., Grassmann, J., Schneppendahl, J., Kessner, A., Sager, M., Hakimi, A., Becker, J., Windolf, J. und Wild, M. (2010) „The progress of early phase bone healing using porous granules produced from calcium phosphate cement“, *European journal of medical research*, 15(5), S. 196–203.

Karkkainen, M. J. und Petrova, T. V (2000) „Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis“, *Oncogene*, 19(49), S. 5598–5605. doi: 10.1038/sj.onc.1203855.

Kasten, P., Vogel, J., Luginbühl, R., Niemeyer, P., Weiss, S., Schneider, S., Kramer, M., Leo, A. und Richter, W. (2006) „Influence of Platelet-Rich Plasma on Osteogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells and Ectopic Bone Formation in Calcium Phosphate Ceramics“, *Cells Tissues Organs*, 183(2), S. 68–79. doi: 10.1159/000095511.

Katoh, O., Tauchi, H., Kawaishi, K., Kimura, A. und Satow, Y. (1995) „Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation.“, *Cancer research*, 55(23), S. 5687–92.

- Kerwin, S., Lewis, D., Elkins, A., Oliver, J., Hosgood, G., Pechman, R., Dial, S. und Strain, G. (2000) „Effect of hyperbaric oxygen treatment on incorporation of an autogenous cancellous bone graft in a nonunion diaphyseal ulnar defect in cats“, *American journal of of Veterinary Research*, 61(6), S. 691–698.
- Khosla, S., Westendorf, J. J. und Mödder, U. I. (2010) „Concise review: Insights from normal bone remodeling and stem cell-based therapies for bone repair.“, *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 28(12), S. 2124–8. doi: 10.1002/stem.546.
- Ko, C.-L., Chen, W.-C., Chen, J.-C., Wang, Y.-H., Shih, C.-J., Tyan, Y.-C., Hung, C.-C. und Wang, J.-C. (2013) „Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphate cement with different ratios of platelet-rich plasma as identifiers“, *Materials Science and Engineering: C*, 33(6), S. 3537–3544. doi: 10.1016/j.msec.2013.04.042.
- Köster, K., Ehard, H., Kubicek, J. und Heide, H. (1979) „[Experimental application of calcium phosphate granulate for the substitution of conventional bone transplants (author’s transl)].“, *Zeitschrift fur Orthopadie und ihre Grenzgebiete*, 117(3), S. 398–403.
- Kraus, K. H. und Kirker-Head, C. (2006) „Mesenchymal stem cells and bone regeneration.“, *Veterinary surgery : VS*, 35(3), S. 232–42. doi: 10.1111/j.1532-950X.2006.00142.x.
- Kröpil, P., Hakimi, A. R., Jungbluth, P., Riegger, C., Rubbert, C., Miese, F., Lanzman, R. S., Wild, M., Schek, A., Scherer, A., Windolf, J., Antoch, G., Becker, J. und Hakimi, M. (2012) „Cone beam CT in assessment of tibial bone defect healing: an animal study.“, *Academic radiology*, 19(3), S. 320–5. doi: 10.1016/j.acra.2011.10.022.
- Lawrence, W. T. (1998) „Physiology of the acute wound.“, *Clinics in plastic surgery*, 25(3), S. 321–40.
- Lind, M. (1998) „Growth factor stimulation of bone healing: effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation“, *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 69(Supplement 283), S. 2–37.
- Liu, F., Kohlmeier, S. und Wang, C.-Y. (2008) „Wnt signaling and skeletal development“, *Cellular Signalling*, 20(6), S. 999–1009. doi:

10.1016/j.cellsig.2007.11.011.

Liu, S., Jin, D., Wu, J., Xu, Z., Fu, S., Mei, G., Zou, Z.-L. und Ma, S. (2016)

„Neuropeptide Y stimulates osteoblastic differentiation and VEGF expression of bone marrow mesenchymal stem cells related to canonical Wnt signaling activating in vitro.“, *Neuropeptides*, 56, S. 105–13. doi: 10.1016/j.npep.2015.12.008.

Lörincz, T., Tóth, J., Szendrői, M. und Tímár, J. (2005) „Microvascular density of breast cancer in bone metastasis: influence of therapy.“, *Anticancer research*, 25(4), S. 3075–81.

Lubkowska, A., Dolegowska, B. und Banfi, G. (2012) „Growth factor content in PRP and their applicability in medicine.“, *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 26(2 Suppl 1), S. 3S–22S.

Lum, L. und Beachy, P. A. (2004) „The Hedgehog Response Network: Sensors, Switches, and Routers“, *Science*, 304(5678), S. 1755–1759. doi: 10.1126/science.1098020.

Lynch, S., Williams, R., Poison, A., Howell, T., Reddy, M., Zappa, U. und Antoniadis, H. (1989) „A combination of platelet-derived and insulin-like growth factors enhances periodontal regeneration“, *Journal of clinical Periodontology*, 16(8), S. 545–548.

Maeda, S., Hayashi, M., Komiya, S., Imamura, T. und Miyazono, K. (2004) „Endogenous TGF-beta signaling suppresses maturation of osteoblastic mesenchymal cells.“, *The EMBO journal*. European Molecular Biology Organization, 23(3), S. 552–63. doi: 10.1038/sj.emboj.7600067.

Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Ferraro, M. G., Aprelikova, O., Alitalo, K., Del Vecchio, S., Lei, K. J., Chou, J. Y. und Persico, M. G. (1993) „Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14.“, *Oncogene*, 8(4), S. 925–31.

Mahendra, A. und Maclean, A. (2007) „Available biological treatments for complex non-unions“, *Injury*, 38(4 SUPPL.). doi: 10.1016/S0020-1383(08)70004-4.

Mahesh, L., Venkataraman, N., Shukla, S., Prasad, H. und Kotsakis, G. A. (2015)

„Alveolar ridge preservation with the socket-plug technique utilizing an alloplastic putty bone substitute or a particulate xenograft: a histological pilot study.“, *The Journal of oral implantology*, 41(2), S. 178–183. doi: 10.1563/AAID-JOI-D-13-00025.

Mannaioni, P. F., Di Bello, M. G. und Masini, E. (1997) „Platelets and inflammation: Role of platelet-derived growth factor, adhesion molecules and histamine“, *Inflammation Research*, 46(1), S. 4–18. doi: 10.1007/PL00000158.

Mardas, N., Chadha, V. und Donos, N. (2010) „Alveolar ridge preservation with guided bone regeneration and a synthetic bone substitute or a bovine-derived xenograft: a randomized, controlled clinical trial.“, *Clinical oral implants research*, 21(7), S. 688–698. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.01918.x.

Mardas, N., D’Aiuto, F., Mezzomo, L., Arzoumanidi, M. und Donos, N. (2011) „Radiographic alveolar bone changes following ridge preservation with two different biomaterials“, *Clinical Oral Implants Research*, 22(4), S. 416–423. doi: 10.1111/j.1600-0501.2010.02154.x.

Markopoulou, C., Markopoulos, P., Dereka, X., Pepelassi, E. und Vrotsos, I. (2009) „Effect of homologous PRP on proliferation of human periodontally affected osteoblasts. In vitro preliminary study. Report of a case“, *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions*, 9(3), S. 167–172.

Marx, R. E. (2001) „Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP?“, *Implant dentistry*, 10(4), S. 225–8.

Matsui, T., Heidarani, M., Miki, T., Popescu, N., La Rochelle, W., Kraus, M., Pierce, J. und Aaronson, S. (1989) „Isolation of a novel receptor cDNA establishes the existence of two PDGF receptor genes.“, *Science (New York, N.Y.)*, 243(4892), S. 800–4.

McCauley, L. K., Koh, A. J., Beecher, C. A., Cui, Y., Decker, J. D. und Franceschi, R. T. (1995) „Effects of differentiation and transforming growth factor beta 1 on PTH/PTHrP receptor mRNA levels in MC3T3-E1 cells.“, *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 10(8), S. 1243–55. doi: 10.1002/jbmr.5650100815.

Mehrara, B., Most, D., Chang, J., Bresnick, S., Turk, A., Schendel, S., Gittes, G. und Longaker, M. (1999) „Basic Fibroblast Growth Factor and Transforming Growth Factor - 1 Expression in the Developing Dura Mater Correlates with Calvarial Bone Formation.“, *Plastic and Reconstr Surg*, 104(2), S. 435–444.

Morvan, F., Boulukos, K., Clément-Lacroix, P., Roman Roman, S., Suc-Royer, I., Vayssière, B., Ammann, P., Martin, P., Pinho, S., Pognonec, P., Mollat, P., Niehrs, C., Baron, R. und Rawadi, G. (2006) „Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass.“, *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 21(6), S. 934–45. doi: 10.1359/jbmr.060311.

Moustakas, A. (2002) „Smad signalling network“, *Journal of Cell Science*, 115(17).

Nakashima, A., Katagiri, T. und Tamura, M. (2005) „Cross-talk between Wnt and bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) signaling in differentiation pathway of C2C12 myoblasts.“, *The Journal of biological chemistry. American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, 280(45), S. 37660–8. doi: 10.1074/jbc.M504612200.

Padgett, R. W. (1999) „Intracellular signaling: Fleshing out the TGFbeta pathway.“, *Current biology : CB*, 9(11), S. R408-11.

Pang, C., Ding, Y., Zhou, H., Qin, R., Hou, R., Zhang, G. und Hu, K. (2014) „Alveolar ridge preservation with deproteinized bovine bone graft and collagen membrane and delayed implants.“, *The Journal of craniofacial surgery*, 25(5), S. 1698–1702. doi: 10.1097/SCS.0000000000000887.

Park, J. B. (2012) „Treatment of peri-implantitis with deproteinised bovine bone and tetracycline: a case report“, *Gerodontology*. 2011/04/05, 29(2), S. 145–149. doi: 10.1111/j.1741-2358.2011.00470.x.

Phieffer, L. S. und Goulet, J. A. (2006) „Delayed unions of the tibia.“, *Instructional course lectures*, 55, S. 389–401.

Pierce, G., Tarpley, J., Yanagihara, D., Mustoe, T., Fox, G. und Thomason, A. (1992) „Platelet-derived growth factor (BB homodimer), transforming growth factor-beta 1, and

basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix“, *American Journal of Pathology*, 140(6), S. 1375–1388.

Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. und Marshak, D. R. (1999) „Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.“, *Science (New York, N.Y.)*, 284(5411), S. 143–7.

Plachokova, A., Dolder, J. Van Den, Stoelinga, P. und Jansen, J. (2007) „Early effect of platelet-rich plasma on bone healing in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects“, *Clinical Oral Implants Research*, 18(2), S. 244–251.

Qi, Y., Niu, L., Zhao, T., Shi, Z., Di, T., Feng, G., Li, J. und Huang, Z. (2015) „Combining mesenchymal stem cell sheets with platelet-rich plasma gel/calcium phosphate particles: a novel strategy to promote bone regeneration“, *Stem Cell Research & Therapy*, 6(1), S. 256. doi: 10.1186/s13287-015-0256-1.

Rawadi, G., Vayssière, B., Dunn, F., Baron, R. und Roman-Roman, S. (2003) „BMP-2 Controls Alkaline Phosphatase Expression and Osteoblast Mineralization by a Wnt Autocrine Loop“, *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(10), S. 1842–1853. doi: 10.1359/jbmr.2003.18.10.1842.

Requena, G., Abbing-Karahagopian, V., Huerta, C., De Bruin, M. L., Alvarez, Y., Miret, M., Hesse, U., Gardarsdottir, H., Souverein, P. C., Slattery, J., Schneider, C., Rottenkolber, M., Schmiedl, S., Gil, M., De Groot, M. C. H., Bate, A., Ruigómez, A., García Rodríguez, L. A., Johansson, S., de Vries, F., Montero, D., Schlienger, R., Reynolds, R., Klungel, O. H. und de Abajo, F. J. (2014) „Incidence Rates and Trends of Hip/Femur Fractures in Five European Countries: Comparison Using E-Healthcare Records Databases“, *Calcified Tissue International*, 94(6), S. 580–589. doi: 10.1007/s00223-014-9850-y.

Rodda, S. J. und McMahon, A. P. (2006) „Distinct roles for Hedgehog and canonical Wnt signaling in specification, differentiation and maintenance of osteoblast progenitors“, *Development*, 133(16), S. 3231–3244. doi: 10.1242/dev.02480.

- Ross, S., Hemati, N., Longo, K. und Bennett, C. (2000) „Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling“, *Science*, 289(5481), S. 950–953.
- Rosset, P., Deschaseaux, F. und Layrolle, P. (2014) „Cell therapy for bone repair“, *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*, 100(1), S. S107–S112. doi: 10.1016/j.otsr.2013.11.010.
- Sadeghi, R., Babaei, M., Miremadi, S. A. und Abbas, F. M. (2016) „A randomized controlled evaluation of alveolar ridge preservation following tooth extraction using deproteinized bovine bone mineral and demineralized freeze-dried bone allograft.“, *Dental research journal*, 13(2), S. 151–9.
- Sammartino, G., Tia, M., Gentile, E. und Marenzi, G. (2009) „Platelet-rich plasma and resorbable membrane for prevention of periodontal defects after deeply impacted lower third molar extraction“, *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 67(11), S. 2369–2373.
- Sarukhan, A., Zanotti, L. und Viola, A. (2015) „Mesenchymal stem cells: myths and reality“, *Swiss Medical Weekly*, 145, S. w14229. doi: 10.4414/smw.2015.14229.
- Scharff, H.-P., Rüter, A. (2011) „Orthopädie und Unfallchirurgie“, S. 105-119
- Scheyer, E. T., Heard, R., Janakievski, J., Mandelaris, G., Nevins, M. L., Pickering, S. R., Richardson, C. R., Pope, B., Toback, G., Velásquez, D. und Nagursky, H. (2016) „A randomized, controlled, multicentre clinical trial of post-extraction alveolar ridge preservation.“, *Journal of clinical periodontology*, 43(12), S. 1188–1199. doi: 10.1111/jcpe.12623.
- Schmitt, C. M., Doering, H., Schmidt, T., Lutz, R., Neukam, F. W. und Schlegel, K. A. (2013) „Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann(R) BoneCeramic, Bio-Oss(R), Puros(R), and autologous bone. A randomized controlled clinical trial.“, *Clin Oral Implants Res. Denmark*, 24(5), S. 576–585.
- Schneppendahl, J., Jungbluth, P., Lögters, T. T., Sager, M., Wild, M., Hakimi, M., Windolf, J. und Grassmann, J. P. (2015) „Treatment of a diaphyseal long-bone defect with autologous bone grafts and platelet-rich plasma in a rabbit model.“, *Veterinary and comparative orthopaedics and traumatology : V.C.O.T.*, 28(3), S. 164–71. doi:

10.3415/VCOT-14-05-0079.

Schwarz, F., Hertel, M., Ferrari, D., Wieland, M., Schmitz, L., Engelhardt, E. und Becker, J. (2007) „Guided bone regeneration at dehiscence-type defects using biphasic hydroxyapatite+beta tricalcium phosphate (Bone Ceramic®) or a collagen-coated natural bone mineral (BioOss Collagen®): an immunohistochemical study in dogs“, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 36(12), S. 1198–1206. doi: 10.1016/j.ijom.2007.07.014.

Shibuya, M. (2011) „Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies.“, *Genes & cancer. Impact Journals, LLC*, 2(12), S. 1097–105. doi: 10.1177/1947601911423031.

Sino Biological Inc. (2017) *Platelet-derived Growth Factor (PDGF) Signaling Pathway*. Verfügbar unter: <http://www.sinobiological.com/Platelet-derived-Growth-Factor-PDGF-Signaling-Pathway-a-6630.html> (Zugegriffen: 14. November 2017).

Sponer, P., Kučera, T., Diaz-Garcia, D. und Filip, S. (2014) „The role of mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration.“, *European journal of orthopaedic surgery & traumatology : orthopedie traumatologie*, 24(3), S. 257–62. doi: 10.1007/s00590-013-1328-5.

Su, A., He, S., Tian, B., Hu, W. und Zhang, Z. (2013) „MicroRNA-221 mediates the effects of PDGF-BB on migration, proliferation, and the epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells.“, *PloS one*. Herausgegeben von T. Tokino, 8(8), S. e71309. doi: 10.1371/journal.pone.0071309.

Szczesny, G. (2002) „Molecular aspects of bone healing and remodeling.“, *Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists*, 53(3), S. 145–53.

Taschieri, S., Corbella, S., Weinstein, R., Di Giancamillo, A., Mortellaro, C. und Del Fabbro, M. (2016) „Maxillary Sinus Floor Elevation Using Platelet-Rich Plasma Combined With Either Biphasic Calcium Phosphate or Deproteinized Bovine Bone“,

Journal of Craniofacial Surgery, 27(3), S. 702–707. doi:
10.1097/SCS.0000000000002522.

Tischer, E., Mitchell, R., Hartman, T., Silva, M., Gospodarowicz, D., Fiddes, J. C. und Abraham, J. A. (1991) „The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing.“, *The Journal of biological chemistry*, 266(18), S. 11947–54.

Ulsamer, A., Ortuño, M. J., Ruiz, S., Susperregui, A. R. G., Osses, N., Rosa, J. L. und Ventura, F. (2008) „BMP-2 Induces Osterix Expression through Up-regulation of Dlx5 and Its Phosphorylation by p38“, *Journal of Biological Chemistry*, 283(7), S. 3816–3826. doi: 10.1074/jbc.M704724200.

Veillette, C. J. H. und McKee, M. D. (2007) „Growth factors — BMPs, DBMs, and buffy coat products: are there any proven differences amongst them?“, *Injury*, 38(1), S. S38–S48. doi: 10.1016/j.injury.2007.02.009.

Vermeulen, P. B., Gasparini, G., Fox, S. B., Colpaert, C., Marson, L. P., Gion, M., Beliën, J. A. M., de Waal, R. M. W., Van Marck, E., Magnani, E., Weidner, N., Harris, A. L. und Dirix, L. Y. (2002) „Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours.“, *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 38(12), S. 1564–79.

Viñals, F., López-Rovira, T., Rosa, J. L. und Ventura, F. (2002) „Inhibition of PI3K/p70 S6K and p38 MAPK cascades increases osteoblastic differentiation induced by BMP-2“, *FEBS Letters*. No longer published by Elsevier, 510(1–2), S. 99–104. doi: 10.1016/S0014-5793(01)03236-7.

Vogel, J. P., Szalay, K., Geiger, F., Kramer, M., Richter, W. und Kasten, P. (2006) „Platelet-rich plasma improves expansion of human mesenchymal stem cells and retains differentiation capacity and *in vivo* bone formation in calcium phosphate ceramics“, *Platelets*, 17(7), S. 462–469. doi: 10.1080/09537100600758867.

Wang, H.-S., Hung, S.-C., Peng, S.-T., Huang, C.-C., Wei, H.-M., Guo, Y.-J., Fu, Y.-S., Lai, M.-C. und Chen, C.-C. (2004) „Mesenchymal stem cells in the Wharton’s jelly of the

human umbilical cord.“, *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 22(7), S. 1330–7. doi: 10.1634/stemcells.2004-0013.

Wang, I., Ueng, S., Yuan, L., Tu, Y., Lin, S., Wang, C., Tai, C. und K, W. (2005) „Early administration of hyperbaric oxygen therapy in distraction osteogenesis: A quantitative study in New Zealand rabbits“, *Journal of Trauma*, 58(6), S. 1230–1235.

Wang, P., Zhao, L., Chen, W., Liu, X., Weir, M. D. und Xu, H. H. K. (2014) „Stem Cells and Calcium Phosphate Cement Scaffolds for Bone Regeneration.“, *Journal of dental research*, 93(7), S. 618–25. doi: 10.1177/0022034514534689.

Wang, T., Zhang, X. und Bikle, D. D. (2017) „Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells During Fracture Healing.“, *Journal of cellular physiology*. NIH Public Access, 232(5), S. 913–921. doi: 10.1002/jcp.25641.

Wang, X., Cui, F., Madhu, V., Dighe, A. S., Balian, G. und Cui, Q. (2011) „Combined VEGF and LMP-1 delivery enhances osteoprogenitor cell differentiation and ectopic bone formation.“, *Growth factors (Chur, Switzerland)*, 29(1), S. 36–48. doi: 10.3109/08977194.2010.544656.

Wang, X., Wang, Y., Gou, W., Lu, Q., Peng, J. und Lu, S. (2013) „Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review.“, *International orthopaedics*, 37(12), S. 2491–8. doi: 10.1007/s00264-013-2059-2.

Warnke, P. H., Wiltfang, J., Springer, I., Acil, Y., Bolte, H., Kosmahl, M., Russo, P. A. J., Sherry, E., Lützen, U., Wolfart, S. und Terheyden, H. (2006) „Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue-engineered mandible.“, *Biomaterials*, 27(17), S. 3163–7. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.01.050.

Whitman, M. (1998) „Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily.“, *Genes & development*, 12(16), S. 2445–62.

WHO (2014) „WHO - World Health Statistics 2014“, *Progress on the health-related Millennium Development Goals (MDGs)*. World Health Organization, Fact sheet, S. 290.

Willems, W. F., Larsen, M., Friedrich, P. F., Shogren, K. L. und Bishop, A. T. (2012) „Induction of angiogenesis and osteogenesis in surgically revascularized frozen bone

allografts by sustained delivery of FGF-2 and VEGF“, *Journal of Orthopaedic Research*, 30(10), S. 1556–1562. doi: 10.1002/jor.22112.

Wrana, J. L., Attisano, L., Cárcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X. F. und Massagué, J. (1992) „TGF beta signals through a heteromeric protein kinase receptor complex.“, *Cell*. Elsevier, 71(6), S. 1003–14. doi: 10.1016/0092-8674(92)90395-S.

Wu, Y., Wang, J., Scott, P. G. und Tredget, E. E. (2007) „Bone marrow-derived stem cells in wound healing: a review.“, *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*, 15 Suppl 1(s1), S. S18-26. doi: 10.1111/j.1524-475X.2007.00221.x.

Xiao, G., Jiang, D., Thomas, P., Benson, M. D., Guan, K., Karsenty, G. und Franceschi, R. T. (2000) „MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, Cbfa1.“, *The Journal of biological chemistry*, 275(6), S. 4453–9.

Zhou, F. H., Foster, B. K., Zhou, X.-F., Cowin, A. J. und Xian, C. J. (2006) „TNF- α Mediates p38 MAP Kinase Activation and Negatively Regulates Bone Formation at the Injured Growth Plate in Rats“, *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(7), S. 1075–1088. doi: 10.1359/jbmr.060410.

Zhou, S. (2011) „TGF- β regulates β -catenin signaling and osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells.“, *Journal of cellular biochemistry*, 112(6), S. 1651–60. doi: 10.1002/jcb.23079.

Zuk, P. A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, D. A., Huang, J. I., Mizuno, H., Alfonso, Z. C., Fraser, J. K., Benhaim, P. und Hedrick, M. H. (2002) „Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells“, *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), S. 4279–4295. doi: 10.1091/mbc.E02-02-0105.

Zvaifler, N. J., Marinova-Mutafchieva, L., Adams, G., Edwards, C. J., Moss, J., Burger, J. A. und Maini, R. N. (2000) „Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals.“, *Arthritis research*, 2(6), S. 477–88. doi: 10.1186/ar130.