

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische
Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Bernhard Frerich

*„Vergleichende Analyse konventioneller und automatisierter
Knochenmarkaspirationsnadeln hinsichtlich der prozeduralen Effektivität,
der Gewinnung mesenchymaler Stammzellen und des postinterventionellen
Knochentraumas“*

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock

vorgelegt von

Laura Schroer
aus Berlin

Rostock, 2015

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger, MBA

Dekan: Prof. Dr. med. univ. Emil Christian Reisinger, MBA

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Bernhard Frerich,
Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische
Gesichtschirurgie, Universitätsmedizin Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. vet. Walter Brehm, Veterinärmedizinische Fakultät,
Chirurgische Tierklinik, Universität Leipzig
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Dipl. Ing. Rainer Bader,
Orthopädische Klinik und Poliklinik, Universitätsmedizin Rostock

Datum der Einreichung: 14.12.2015

Datum der Verteidigung: 22.02.2017

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Knochenmark.....	3
1.2 Stammzellen	4
<i>1.2.1 Embryonale Stammzellen</i>	4
<i>1.2.2 Adulte Stammzellen.....</i>	4
<i>1.2.3 Stammzellnischen.....</i>	6
1.3 Knochenmarkgewinnung und -diagnostik	7
<i>1.3.1 Techniken der Knochenmarkaspiration/ -biopsie beim Menschen</i>	7
1.4 Therapeutische Anwendung von Knochenmarkstammzellen	10
1.5 Tissue Engineering.....	11
1.6 Heilung von Knochendefekten	12
<i>1.6.1 Korrelate der Knochenheilung in der Bildgebung</i>	13
1.7 Zielsetzung und Fragestellung.....	14
2 Material und Methoden	16
2.1 Versuchstiere.....	16
2.2 Vorbereitung und Intubationsnarkose.....	16
2.3 Knochenmarkpunktion.....	19
2.4 Postoperative Überwachung.....	20
2.5 Knochenmarkausstriche	20
2.6 Anzucht und Analyse mesenchymaler Stammzellen in der Zellkultur	22
2.7 Computertomographie	24
2.8 Statistische Auswertung.....	28
2.9 Literaturverwaltung	29
3 Ergebnisse	30
3.1 Versuchstiere.....	30
3.2 Knochenmarkaspiration.....	31

3.2.1 Dauer des Prozedere bis zur Aspiration (Nadelinsertion)	31
3.2.2 Dauer der Aspiration	32
3.2.3 Erreichte Aspirationsvolumina.....	35
3.3 Postinterventionelle Beobachtungen	36
3.3.1 Postoperative Wundverhältnisse	36
3.3.2 Postoperative Analgesie.....	38
3.4 Knochenmarkausstriche.....	39
3.4.1 Mikroskopische Auswertung	39
3.4.2 Anzahl der Knochenmarkkonglomerate pro Ausstrich.....	41
3.5 Zellkultur	42
3.5.1 Vergleich der Primärkulturdichten, Vergleich beider Methoden	43
3.5.2 Korrelation zwischen der Anzahl an Knochenmarkkonglomeraten und der Ausbeute an Zellen in der Primärkultur	45
3.6 Computertomographie	46
3.6.1 Volumetrische Vermessung der postoperativen Knochendefekte.....	46
3.6.2 Kollateraldefekte	49
3.6.3 Korrelation zwischen der Anzahl an Knochenmarkkonglomeraten und den Stichkanalvolumina	50
3.6.4 Computertomographische Auswertung der Knochendefektheilung im späteren postoperativen Verlauf	51
3.7 Vergleich der Entnahmestorte	55
4 Diskussion.....	58
4.1 Tiermodell	58
4.2 Knochenmarkaspiration, Dauer des Prozedere bis zur Aspiration und Aspirationsdauer	59
4.3 Häufigkeit unterschiedlicher Aspirationsvolumina.....	63
4.4 Follow up	64
4.5 Knochenmarkausstriche, mikroskopische Auswertung	65

4.6 Zellkultur und Zellzählung.....	66
4.7 Computertomographische Vermessung von postoperativen Knochendefekten.	70
5. Zusammenfassung.....	76
6 Abkürzungsverzeichnis.....	78
7 Tabellenverzeichnis.....	79
8 Abbildungsverzeichnis	80
9 Literaturverzeichnis.....	82
I Anhang.....	96
Wertetabelle	96
Thesen	98
Selbstständigkeitserklärung zur Dissertation.....	100
Danksagung	101

1 Einleitung

Seit vielen Jahrzehnten werden Knochenmarkpunktionstechniken in der Medizin eingesetzt und dienen unter anderem der Diagnostik hämatologischer, hämatoonkologischer und lymphoproliferativer Krankheitsbilder (Islam et al. 1989). Zunehmend gewinnen die Techniken zur Gewinnung von Knochenmark auch im Bereich des Tissue Engineerings (TE) an Bedeutung. Zur künstlichen Herstellung biologischer Ersatzgewebe können beispielsweise mesenchymale Stammzellen (MSC) aus Knochenmark, welches über eine einfache Knochenmarkpunktion gewonnen wird, isoliert, transplantiert und *in vitro* expandiert werden. Ziel der Bemühungen ist, auch große Defekte mit einer minimalen Menge an autologem Material rekonstruieren zu können (Riedel et al. 2008).

In den letzten Jahren hat der Bedarf an Ersatzgeweben im Kopf-Hals-Bereich stetig zugenommen, ursächlich ist unter anderem der wachsende Altersdurchschnitt der Bevölkerung und die damit verbundene erhöhte Prävalenz für Erkrankungen, die einer Augmentationstherapie bedürfen (Kieferaugmentation oder Sinuslift-Operation vor Insertion enossaler Zahnnimplantate, parodontale Defekte), bei gleichzeitig hohem Anspruch der Patienten an die kaufunktionelle Rehabilitation nach Implantatversorgung (Riedel et al. 2008, Olbrich und Felder 2003). Kurz- und mittelfristig ist aufgrund der demographischen Entwicklung mit einem Anstieg von Augmentationsleistungen zu rechnen (Olbrich und Felder 2003). Generell wird bei ca. 15% der operativen Eingriffe am Skelettsystem ein Knochenersatz notwendig (Riedel et al. 2008, Engelhardt et al. 2014). Klassische plastisch-chirurgische Verfahren zur Rekonstruktion von Gewebedefekten im Kopf-Hals-Bereich, wie die Transplantation autologer und allogener Gewebe oder Ersatz durch alloplastische Materialien, können mit spezifischen Risiken verbunden sein. Beispielsweise stellt die Transplantation von autologen Knochentransplantaten nach wie vor den Goldstandard unter den rekonstruktiven Verfahren zur Versorgung großer Knochendefekte dar (Horch und Pautke 2006). An der Entnahmestelle des Knochentransplantats kann es jedoch in bis zu 30% der Fälle zu Komplikationen wie Blutungen, Hämatomen, Infektionen, chronischen Schmerzen, Schädigung von Nerven oder Gefäßen kommen. Allogene Transplantate können immunogen wirken (Riedel et al. 2008, Kessler et al. 2005, Kneser et al. 2006, Rentsch et al. 2012). Limitierende Faktoren der autologen Knochentransplantation sind zudem die natürliche Begrenzung körpereigener Donorareale und schlussendlich auch eine Frage der Zumutbarkeit zusätzlicher Entnahmeeingriffe (Engelhardt et al. 2014).

Das Tissue Engineering vom Knochen stellt einen neuen Therapieansatz für die Rekonstruktion von Hartgewebedefekten als Alternative zu autologen Knochentransplantaten dar (Riedel et al. 2008). Die Fertigung artifizieller Knochengewebe kann dazu beitragen, die genannte Hebedefektmorbidität zu vermeiden (Kneser et al. 2006). Zur Herstellung dieser vitalen biologischen Ersatzgewebe können autologe MSC verwendet werden, die aus einem Knochenmarkaspirat isoliert werden. Alternativ können MSC beispielsweise aus dem Fettgewebe oder Periost isoliert werden (Zuk et al. 2001, 2002, Yoo und Johnstone 1998). Es ist noch unklar, welche Zellen für das Tissue Engineering besonders geeignet sind (Hattori et al. 2006, Hayashi et al. 2008).

Die Gewinnung von MSC aus dem Knochenmark für Zwecke des Tissue Engineering sollte bei einer möglichst geringen Belastung für die Patienten eine möglichst hohe Effizienz aufweisen. Dabei stellen die technisch einfache, risikoarme und schnelle Entnahme von Knochenmark und die gleichzeitig möglichst hohe Ausbeute an MSC, bei Minimierung des entstehenden Knochentraumas, die entscheidenden Parameter dar. Die Stammzellausbeute aus Knochenmarkaspiraten ist mit den derzeit etablierten Isolations- und Expansionstechniken sehr variabel und hängt unter anderem von der Menge des entnommenen Knochenmarks und der Anzahl der Punktionsstellen, sowie vom Alter und von Komorbiditäten des Patienten ab (Hernigou et al. 2013, Muschler et al. 1997, Riley et al. 2004, Mendes et al. 2002, Li et al. 2014). Diese große Variabilität der Stammzellausbeute ist ein Risiko für die Sicherheit der Methode und führt zwangsläufig zur Entnahme größerer Mengen aus mehreren Punktionsstellen (Richter 2005). Die Knochenmarkentnahme für Zwecke der Stammzellisolation ist insofern in Dauer und Umfang ein ausgedehnter Eingriff im Vergleich zur Entnahme von Knochenmark zu diagnostischen Zwecken. Eine Reduktion der Belastung des Patienten sowie eine Verbesserung der Entnahmoeffizienz ist daher wünschenswert (Hernigou et al. 2013). Gerade bei älteren Patienten mit osteoporotisch reduzierter Knochenstabilität bzw. multimorbiden Patienten ist besondere Vorsicht geboten. Dazu gehört neben der Reduktion möglicher Komplikationen ausgehend vom Weichteilschaden (Infektion, Hämatom, Blutung, Nervenschäden) auch die möglichst geringe Knochendestruktion.

1.1 Knochenmark

Das Knochenmark (Medulla ossium) befindet sich im Knocheninneren, eingelagert in die von Spongiosabälkchen durchzogenen Markräume. Zum Zeitpunkt der Geburt ist im menschlichen Körper nur rotes, blutbildendes Knochenmark (Medulla ossium rubra) vorhanden, welches im Laufe des Lebens immer mehr durch gelbes Fettmark (Medulla ossium flava) ersetzt wird und nur in wenigen Knochen erhalten bleibt (z.B. Sternum, Wirbelkörper, Hand- und Fußwurzelknochen, Darmbeinkamm).

Rotes Knochenmark

Nur das rote Knochenmark ist hämatopoetisch aktiv, seine rote Farbe beruht auf dem hohen Anteil an Erythrozyten und deren Vorstufen. Beim Erwachsenen hat es ein Gesamtgewicht von 2-3 kg. Es beherbergt multipotente hämatopoetische Stammzellen, Zellen der myeloischen Reihe (Vorläufer von Monozyten, Erythrozyten, Granulozyten und Thrombozyten verschiedener Reifungsstufen) und MSC, die nur 1 von 10^4 der kernhaltigen Zellen im Knochenmark ausmachen (Caplan 2009). Ein geeignetes Mikromilieu für die Hämatopoese wird durch Zellen des Knochenmarkstromas gebildet (fibroblastische Retikulumzellen, lipid-beladene Retikulumzellen und Makrophagen). Fibroblastische Retikulumzellen produzieren ein Gerüst aus retikulären Fasern, über das sie in engem Kontakt mit unreifen Blutzellen stehen. Sie können Fett einlagern und als eine Art Platzhalter fungieren, bei gesteigerter Hämatopoese nehmen sie durch schnelle Fettfreisetzung ihre ursprüngliche Gestalt an (Zilles und Tillmann 2010). Damit ist der Gehalt an „Fettzellen“ umgekehrt proportional zur hämatopoetischen Aktivität. Makrophagen sind zahlreich im Knochenmark, mit langen Fortsätzen reichen sie bis ins Sinuslumen und selektieren alte Erythrozyten aus der Zirkulation. Des Weiteren phagozytieren sie apoptotische, unreife Blutzellen, bilden Zentren erythropoetischer Inseln und phagozytieren die ausgestoßenen Kerne der Normoblasten. Zahlreiche Knochenmarksinus durchziehen das Knochenmark. Ihr spezieller Wandaufbau aus flachem Sinusendothel, diskontinuierlicher Basallamina und einer lückenhaften Schicht von Retikulumzellausläufern ermöglicht den Übertritt reifer Blutzellen in die Zirkulation, verhindert aber den Übertritt unreifer Vorstufen.

Gelbes Knochenmark

Gelbes Knochenmark ist nicht an der Blutbildung beteiligt, da es keine pluripotenten Stammzellen mehr enthält. Seine gelbe Farbe entsteht durch den hohen Anteil an lipid-

beladenen Retikulumzellen. Es befindet sich hauptsächlich in den Diaphysen der Röhrenknochen.

1.2 Stammzellen

Stammzellen sind definiert als Zellen mit unbegrenzter Vermehrungsfähigkeit, die in vielen Geweben und Organen nachgewiesen werden konnten (Richter 2005). Die wichtigsten Charakteristika von Stammzellen sind:

- asymmetrische Teilung: Beinhaltet die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und somit einen lebenslangen Vorrat an Stammzellen
- geringe Teilungsrate: Langsam laufender Zellzyklus
- niedriger Differenzierungsgrad

Unterschieden werden embryonale und adulte Stammzellen (Lüllmann-Rauch 2006).

1.2.1 Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen (ESC) sind pluripotent, sie können also sämtliche Zellen und Gewebe eines Individuums bilden (Differenzierung zu Zellen aller drei Keimblätter: Endo-, Meso- Ektoderm), mit Ausnahme des embryonalen Teils der Plazenta (Unterschied zu totipotenten Zellen). Die Existenz von pluripotenten Stammzellen in Embryonen wurde deutlich durch Untersuchungen an Mäusen, bei denen Teratokarzinomzellen isoliert, genetisch markiert und durch ektopische Injektion in Blastozysten eingebracht wurden (Blau et al. 2001). ESC können auf drei Arten gewonnen werden: 1.) Gewinnung der inneren Zellmasse eines Embryos im Blastozystenstadium vor der Implantation, 2.) Gewinnung primordialer Keimzellen aus abgetriebenen Föten, 3.) Einbringen eines Eizellkerns in eine somatische Zelle mittels Kerentransfers (Evans und Kaufman 1981, Shambott et al. 1998, Wobus et al. 1984). Das deutsche Embryonenschutzgesetz (EschG, Ausfertigungsdatum: 13.12.1990) verbietet aus ethischen Gründen die Isolation humaner embryonaler Stammzellen.

1.2.2 Adulte Stammzellen

Adulte Stammzellen können aus Geweben des postnatalen Organismus gewonnen und in Zellkultur vermehrt werden. Ihre Anwendung ist daher ethisch weniger bedenklich. Gewebespezifische adulte Stammzellen, zum Beispiel mesenchymale (MSC), hämatopoetische (HSC) und Nabelschnurstammzellen (NSC), sind verantwortlich für die

Regeneration geschädigten Gewebes und die Aufrechterhaltung der Gewebehomöostase, unter anderem die physiologische Erneuerung von Haut und Blutzellen (Blau et al. 2001). Adulte Stammzellen weisen eine größere Flexibilität auf, ihr Differenzierungspotential wird als Plastizität bezeichnet, wobei sich die Zelle nicht nur in Zellen des Gewebetyps entwickeln kann, in dem sie sich befindet, sondern auch in Zellen eines anderen Gewebes (Kasper et al. 2001, Schöler 2004). Dieses Phänomen bietet der regenerativen Medizin neue Möglichkeiten (Tögel et al. 2007, Prockop 1997, Ferrari et al. 1998, Bjornson et al. 1999, Petersen et al. 1999). Im Knochenmark findet man HSC und MSC. In Bezug zur Fragestellung in dieser Studie soll im Folgenden nur auf die MSC näher eingegangen werden.

Mesenchymale Stammzellen (MSC)

Die Isolation von MSC gelang erstmals durch Friedenstein in den sechziger Jahren (Friedenstein et al. 1968). Spätere Versuche von Friedenstein et al. (1974) konnten ein mit bestimmten Knochenmarkzellen assoziiertes osteogenes Differenzierungspotential nachweisen. Durch ihre Morphologie und das adhärente Wachstum in der Zellkultur unterschieden sich diese Zellen deutlich von den bereits bekannten HSC (Friedenstein et al. 1974). Caplan et al. (1991) entdeckte die Fähigkeit dieser Zellen sich in Knochen und Knorpelgewebe zu differenzieren und erkannte die Möglichkeit der Verwendung von patienteneigenen MSC als Ausgangsmaterial für Gewebereparaturverfahren/Zellersatzstrategien (Caplan 1991). MSC verfügen über eine extensive Proliferationskapazität, werden am häufigsten aus Knochenmark gewonnen und mittels Dichte-Gradienten-Zentrifugation analog der Isolation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut isoliert und kultiviert (Richter 2005, Tögel et al. 2007, Zuk et al. 2001, Bieback und Klüter 2007). MSC sind in der Lage sich in vitro unter Einfluss von verschiedenen Differenzierungs- bzw. Wachstumsfaktoren in Knochen, Knorpel, Fettgewebe, Sehnen, Muskel- und Nervengewebe zu differenzieren. MSC können auch aus Fettgewebe isoliert werden, die Zahl der gewinnbaren Fettgewebsstammzellen (ASC) übersteigt die des Knochenmarks, allerdings sind sie für das knöcherne TE eher noch von nachrangiger Bedeutung (Zuk et al. 2001). MSC konnten auch aus dem peripheren Blut isoliert werden, jedoch ist der Anteil an peripheren Stammzellen in umgebenden Geweben und Organen sehr gering und damit ein limitierender Faktor (Kuznetsov et al 2001, Chan et al. 2014). Zu Forschungszwecken und in der klinischen Anwendung müssen sie daher in vitro expandiert werden. Durch das erhebliche therapeutische Potenzial der MSC ist das biologische und klinische Interesse in den letzten zwei Jahrzehnten drastisch gestiegen und stetig beschäftigen sich neue Forschungsgruppen

mit diesem Thema. Die Verwendung verschiedener Isolations- und Vermehrungsmethoden, sowie die unterschiedlichen Ansätze zur Charakterisierung der MSC veranlasste das „Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee“ der „International Society for Cellular Therapy“ zur Festlegung minimaler Kriterien zur Definition humaner Mesenchymaler Stammzellen (hMSC). Vorgeschlagen werden drei Kriterien zur Definition der MSC in Kultur:

- plastikadhärentes Wachstum (unter Standardkulturbedingungen in Gewebekulturflaschen)
- Expression spezifischer Oberflächenantigene ($\geq 95\%$ der Zellpopulation müssen CD105, CD73 und CD90 exprimieren, $\leq 2\%$ dürfen positiv sein für CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79α oder CD19 und HLAII)
- multipotentes Differenzierungspotenzial (in vitro unter Standardbedingungen zu Osteoblasten, Adipozyten und Chondroblasten) (Dominici et al. 2006)

In der Literatur erscheint häufiger die Bezeichnung der mesenchymalen Stromazelle anstelle von Stammzelle. Entsprechend der internationalen Gesellschaft für Zelltherapie können beide Termini gleichermaßen verwendet werden (Leisten 2014).

1.2.3 Stammzellnischen

Stammzellnischen sind Regionen im Organismus mit einem speziellen Mikromilieu, welche Stammzellen beherbergen und ihre stammzelltypischen Eigenschaften erhalten. Ohne diese speziellen Umgebungsbedingungen beginnen Stammzellen mit der Differenzierung (Lüllmann-Rauch 2006, von Holst und Faissner 2009, Ehninger und Trumpp 2011, Fuchs et al. 2004). Das spezielle Mikromilieu der Nische wird durch akzessorische Zellen, Stromazellen (Fibroblasten, Makrophagen, Endothelzellen, Adipozyten) und ihre Produkte (Zytokine) sowie extrazelluläre Bestandteile (extrazelluläre Matrix) gebildet (Kasper et al. 2001, Fuchs et al. 2004). Zwischen Zellen der Nische und Stammzellen ermöglichen Zellkontakte bidirektionale Wechselwirkungen (Lane et al. 2014). Durch Zellen der Stammzellnische werden die Stammzellen z. B. vor differenzierenden und apoptoseinduzierenden Stimuli abgeschirmt und gleichzeitig vor unkontrollierter Proliferation geschützt, welche zur Krebsentstehung beitragen könnte (Moore und Lemischka 2006). Sezernierte oder membrangebundene Botenstoffe, wie chemotaktische Zytokine, binden an Oberflächenrezeptoren der Stammzellen und regulieren so z. B. die Selbsterneuerung (Lane et al. 2014). Immunologische Zellen regulieren die Stammzellproliferation bei Entzündungen oder Gewebedefekten, so können nach schweren Verbrennungen, Hypoxie oder Muskelverletzungen erhöhte Spiegel MSC im peripheren Blut nachgewiesen werden (Jaiswal

et al. 2009, Drukała et al. 2012, Rochefort et al. 2006, Ramirez et al. 2006). Studien weisen auf eine Knochenmark- und eine perivaskuläre Nische der MSC sowie Nischen in Haarfollikeln, Krypten des Intestinums, Ovarien, Hoden und der subventrikulären Zone des Gehirns hin (Fuchs et al. 2004, Crisan et al. 2008, Beyer et al. 2006).

1.3 Knochenmarkgewinnung und -diagnostik

Die Entnahme von Knochenmark ist oft unerlässlich im Rahmen der Diagnostik hämatologischer, hämatoonkologischer und lymphoproliferativer Erkrankungen, aber auch zur Erfolgsbeurteilung einer Therapie hämatologischer Erkrankungen und zur Verlaufskontrolle nach Knochenmarktransplantation oder knochenmark-ablativer Chemotherapie (Islam et al. 1989, Islam und Henderson 1988, Snover 1989). Das Ausmaß einer Knochenmarkschädigung durch Chemikalien, Strahlung, Medikamente etc. kann mittels einer Knochenmarkprobe interpretiert werden. In therapeutischer Hinsicht spielt die Entnahme von HSC zur autologen oder allogenen Transplantation eine Rolle. Diese Methode wurde jedoch überwiegend durch die Gewinnung von HSC aus dem peripheren Blut mittels Stammzellapherese abgelöst. In zunehmendem Maße gewinnt die Entnahme MSC aus dem Knochenmark im Rahmen regenerativer Therapien an Relevanz. Üblicherweise wird dazu der Beckenkamm als leicht zugängliche Punktionsstelle verwendet und es können aus relativ kleinen Volumina ausreichende Ausgangszellzahlen gewonnen werden (Niemeyer et al. 2003).

1.3.1 Techniken der Knochenmarkaspiration/-biopsie beim Menschen

Das wohl bekannteste Gerät zur Knochenmarkentnahme ist die Jamshidi Hohlnadel. Sie wurde bereits 1971 zum Patent durch K. Jamshidi angemeldet und stellte gegenüber den vorherigen Biopsieinstrumenten eine Verbesserung dar, da sie durch ihre spezielle Konstruktion verhindern sollte, dass das Knochenmarkbioptat zerdrückt, beschädigt und damit unbrauchbar wurde (Jamshidi und Swaim 1971). Es handelt sich hierbei um eine Hohlnadel, in die ein entnehmbarer Mandrin eingepasst ist. Eine modifizierte Form der Punktionsnadel wurde 1981 veröffentlicht, sie beinhaltet eine verbesserte Verbindung zwischen Hohlnadel und Mandrin. Die Nadel wird mit dem Mandrin unter Rotation manuell in den Knochen eingebracht. Nach Entfernung des Mandrins kann die Hohlnadel weiter unter Rotation eingeführt werden um eine Knochenmarkstanze zu erzeugen oder durch Aufsetzen einer Nadel zur Aspiration von Knochenmark verwendet werden (Jamshidi 1981) (Abb.1).

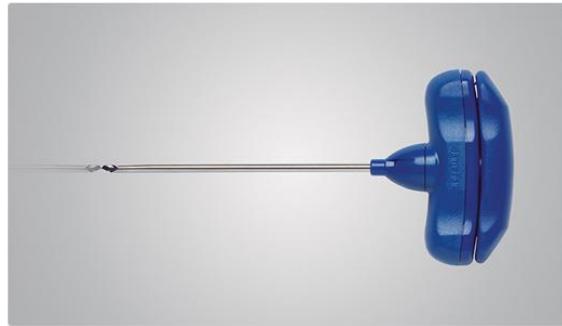


Abb. 1: Jamshidi Nadel mit T-Griff

Seit der Einführung der Jamshidi-Nadel im Jahr 1971 hat es keine wesentlichen Fortschritte in der Entnahmetechnik von Knochenmarkproben gegeben. In den letzten Jahren wurde ein batteriebetriebenes System zur Knochenmarkaspiration entwickelt und über die ‚US Food and Drug Administration‘ zugelassen, um für medizinische Anwender den Zugang zum Knochenmarkraum schnell und effizient zu gestalten. 2007 wurde von der Vidacare Corporation (San Antonio, Texas) das OnControl® Bone Marrow System eingeführt, (Vidacare Corporation wurde 2013 von Teleflex® Incorporated übernommen). Es besteht aus einem Handstück mit integriertem batteriebetriebenem Antrieb und einem Nadelset (Abb.2). 2009 wurde das Gerät mit integriertem Sterilbehälter für Stanzbiopsien eingeführt (Abb.3) und im Jahr 2010 für den kommerziellen Vertrieb zur Verfügung gestellt (Cohen und Gore 2008, Berenson et al. 2011).



Abb. 2

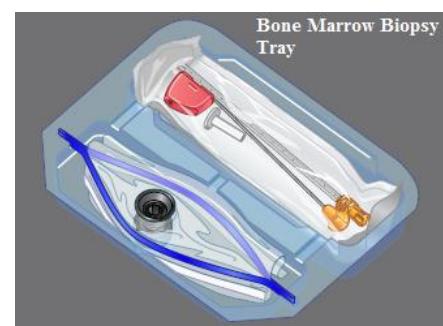


Abb. 3

Abb.2 und 3: OnControl Bone Marrow System bestehend aus einem batteriebetriebenen Handstück (OnControl Power Driver) und einem Adapter (Connector) für die Aspirationsnadel (linkes Bild); Zugehöriges Nadelset mit Aspirationsnadel und Sterilbehälter mit integriertem Connector für den OnControl Power Driver (rechtes Bild).

Knochenmarkaspiration/-zytologie

Bei Verdacht auf eine maligne, das Knochenmark infiltrierende Erkrankung, wie Leukämie, malignes Lymphom, Neuroblastom, Ewing-Tumor, Rhabdomyosarkom sowie zur Abklärung bestimmter Anämieformen, Thrombozytopenien, Granulozytopenien und Panzytopenien

gehört die zytomorphologische Beurteilung von Knochenmark- und Blutausstrichen zur Basisdiagnostik und stellt die Weichen für einen sinnvollen Einsatz von speziellen Zusatzuntersuchungen wie Immunphänotypisierung, Zytogenetik und Molekulargenetik (Kosch et al. 2005, Spiekermann 2011). Die mikroskopische Betrachtung von Blut- oder Knochenmarkaspiratausstrichen ist das wichtigste diagnostische Hilfsmittel des Hämatologen, das wichtige Informationen über den Zellgehalt des Marks sowie die Zusammensetzung und Ausreifung hämatopoetischer Zellen gibt (Gadner et al. 2006). Bei der Ausstrichtechnik wird ein Tropfen Blut oder Knochenmark auf einen Objektträger getropft und mit Hilfe eines zweiten Objektträgers im 45° Winkel 3–4 cm lang ausgestrichen. Am Ende des Ausstrichs entsteht eine sogenannte Fahne, in der die Zellen einzeln gut beurteilbar sind. Knochenmarkaspirationen beim Menschen werden in der Regel durch Punktion im Bereich der Spina iliaca posterior superior durchgeführt, hier liegt der Großteil des Knochens entfernt von wichtigen Strukturen und Komplikationen sind selten (Islam 1983).

Markbröckelausstrich

Markbröckel aus dem Knochenmarkaspirat können ohne Entkalkung direkt zur histologischen Untersuchung aufgearbeitet werden (Hagmann und Kroschinsky 2014). Dazu werden sie panoptisch nach May-Grünwald-Giemsa und mit enzymzytochemischen Reaktionen gefärbt. Ausstrichpräparate sind auch zu immunhistochemischen Färbereaktionen und der FISH-Analyse geeignet (Schmitt-Graeff et al 2000). Knochenmarkbröckel werden mäanderförmig ausgestrichen oder als Quetschpräparat (quantitative Schätzung des Zellgehalts) zur diagnostischen Auswertung verarbeitet, da an den Spongiosafragmenten besonders viele für das Knochenmark typische Zellen haften (Kühn et al 1989, Heilmeyer und Begemann 1955, Löffler und Rastetter 1999).

Knochenmarkbiopsie/-histologie

Eine Knochenmarkbiopsie bildet die unversehrte Struktur des Knochenmarks in seiner natürlichen Umgebung ab und ermöglicht eine Aussage über den Zellgehalt im Knochenmark. Durch die histologische und immunhistologische Untersuchung des gewonnenen Knochenmarkzylinders können Art und Ausmaß blastomatöser und granulomatöser Knochenmarkinfiltrate, die Knochenmarkreserve oder das Ausmaß einer fibrösen Knochenmarkumwandlung dargestellt werden (Manegold und Krempien 1983). Für eine artefaktfreie Schneidbarkeit ist die Entkalkung und Paraffineinbettung der Probe notwendig, so dass in der Regel erst nach 48 Stunden die fertigen Schnittpräparate vorliegen.

Histochemische Verfahren (Hämatoxylin-Eosin-Färbung, Giemsa-Färbung und weitere Sonderfärbungen) ermöglichen eine besonders gute Differenzierung der verschiedenen Zellen der Hämatopoese oder Darstellung der Eisenspeicher in histiozytären Zellen. Immunhistochemische Verfahren (Anfärbung von Zell- oder Gewebestrukturen mit an Antikörper gekoppelten Farbstoffen), Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung und molekulare Diagnostik erweitern das diagnostische Spektrum (Quintanilla-Martinez et al. 2012).

1.4 Therapeutische Anwendung von Knochenmarkstammzellen

Eine vielversprechende Quelle für therapeutische Ansätze sind Stammzellen aus dem Knochenmark, die seit langem in der Onkologie als Knochenmarkspende eingesetzt werden und aufgrund ihres regenerativen Potenzials für zelltherapeutische Ansätze geeignet sind (Tögel et al. 2007). Viele Millionen Menschen leiden an unheilbar degenerativen Erkrankungen, daher liegen große Hoffnungen auf der Erforschung und Nutzung von Stammzellen für Geweberegeneration oder -ersatz. Bevor man adulte Stammzellen für diese therapeutischen Zwecke einsetzen kann, gilt es jedoch einige Hürden zu überwinden. Das erste Problem liegt darin, dass Stammzellen in den Organen nur in geringer Zahl vorhanden sind, was eine effektive Kultur und Differenzierung *in vitro* erforderlich macht (Chan et al. 2014). Diese ist erschwert, da man über die zelluläre Umgebung von Stammzellen im Organ (Stammzellnischen) und deren Wachstumsfaktoren noch wenig weiß, ebenso über das Verhalten adulter Stammzellen in einem geschädigten Gewebe und die zur Vermehrung und Differenzierung benötigten Faktoren. Ein weiteres Problem stellt die mögliche Abstoßung der Zellen durch das Immunsystem dar, wobei Transplantate humaner Nabelschnurblutzstammzellen keine starke Abwehrreaktion hervorrufen und daher in Zukunft neben Stammzellen aus dem Knochenmark vermutlich sehr wichtig für die Therapie von Krankheiten sein werden (Schöler 2004, Laughlin et al. 2001, Sanchez-Ramos 2002). Bislang ist die Knochenmarktransplantation bei Leukämiepatienten die einzige weltweit klinisch etablierte Stammzelltherapie. Die benötigten Stammzellen können mithilfe von Blutstammzell-Wachstumsfaktoren (GM-CSF, G-CSF) inzwischen auch aus dem peripheren Blut gewonnen und vermehrt werden (Bracht 2008). Mittlerweile existieren auch klinische Anwendungen von MSC zur Therapie der akuten Graft versus host disease (Amorin et al. 2014). Es gibt viele Bemühungen zur weiteren therapeutischen Nutzung von MSC, wobei sich drei Felder abgrenzen lassen: Geweberegeneration, Immunmodulation bei HSC-Transplantation und Gentherapie (Wulf et al. 2006). Diverse Forschungsgruppen beschäftigen sich mit der Therapie des Hirninfarktes mit MSC oder dem therapeutischen Potenzial von

Stammzellen zur Reparation der diabetischen Nephropathie (Boltze et al. 2014, Pan et al. 2014). Auf dem Gebiet der Kardiologie gelten MSC aus dem Knochenmark als vielversprechende Zellen zur Regeneration von Herzgewebe, es gibt klinische Erfahrungen mit intravaskulär, transepikardial sowie transendokardial applizierten Knochenmarkstammzellen (Tögel et al. 2007, Gaebel et al. 2011, Hare et al. 2009). Versuche an Mäusen zeigen eine reduzierte Inzidenz von Graft versus host Reaktionen nach Knochenmarktransplantation bei systemischem Lupus erythematoses durch Ergänzung von MSC (Liu et al. 2014). Ein vielversprechendes Forschungsgebiet stellt die Anwendung von MSC im TE osteochondraler Gewebe dar. Ein derzeit favorisierter Ansatz im Knochen-TE ist die Herstellung von pro-osteogenetisch wirksamen Implantaten, bestehend aus einem degradierbaren Trägergerüst (Scaffold), welches *in vitro* mit osteogenen Zellen besiedelt werden kann (Rentsch et al. 2012).

1.5 Tissue Engineering

Es ist nicht eindeutig hinterlegt, wer als erstes den Begriff „Tissue Engineering“ im heutigen Sinne verwendete. Die zutreffendste, bis heute gültige Definition des Begriffes wurde bereits 1987/88 auf Sitzungen der National Science Foundation (NSF) verfasst. Die NSF definiert den Begriff TE wie folgt: "*Tissue Engineering* ist die Anwendung von Prinzipien und Methoden der Ingenieur- und Lebenswissenschaften zum fundamentalen Verständnis der Wechselwirkungen von Struktur und Funktion normaler und kranker Säugetiergebe, sowie zur Entwicklung von biologischem Gewebeersatz für Rekonstruktion, Erhalt oder Verbesserung der Gewebefunktionen.“ (Viola et al. 2003) Die Generierung von künstlichen Geweben und Organteilen ist eine der großen künftigen Herausforderungen in der Biomedizin. Dabei soll verloren gegangene Regenerationsfähigkeit mit Hilfe von Gewebeimplantaten wieder gewonnen werden. Vorzugsweise werden dazu autologe Zellen aus intakten Gewebebereichen isoliert, um unter Kulturbedingungen regenerationsfähiges Gewebe herzustellen. Die Therapieformen des TE sind vielfältig. Die Zelltherapie verwendet isoliert vorliegende Zellen, die nach Vermehrung in einem geeigneten Umgebungsmilieu mit Pipette, Sprayer oder Spritze appliziert werden. Bei der Gewebeimplantation werden die jeweiligen Zellen auf einer extrazellulären Matrix (Scaffold) angesiedelt und nach erfolgreicher Kultur als Gewebekonstrukt in einen Defekt eingesetzt. Die Herstellung von Organoiden (Kompositkonstrukte aus mehreren Geweben) oder die Generierung von künstlichen Organstrukturen gestaltet sich komplexer (Minuth und Schumacher 2004). TE hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht, diverse Trägermaterialien (synthetische

Polymere, Polymere natürlichen Ursprungs, anorganische Materialien und Verbundwerkstoffe) werden in Studien getestet (Bessa et al. 2008, Zhao et al. 2011, Nguyen et al. 2015). Osteoinduktive Wachstumsfaktoren (Bone Morphogenetic Proteins (BMP)) wurden in den letzten Jahrzehnten ausgiebig erforscht und werden heute als humane rekombinante BMPs in diversen TE-Produkten verwendet (Janicki und Richter 2012). MSC können aus verschiedenen Geweben gewonnen und ex vivo nach standardisierten Protokollen expandiert werden. Ihr knochenbildendes Potential kann sowohl in vitro durch spezielle Induktionsmedien, als auch in vivo in Kombination mit Knochenersatzmaterialien in ektopen Tiermodellen gezeigt werden (Janicki und Richter 2012). In Folge von Atrophie, Unfällen, Tumoren, Osteitis oder degenerativen Erkrankungen kommt es häufig zu größeren Knochendefekten, die eine Knochentransplantation erforderlich machen. So ist bei ca. 15% aller Operationen am Skelettsystem ein Knochenersatz notwendig, was das große Interesse an dem Forschungsbereich des TE im Bereich der Knochenregeneration begründet (Engelhardt et al. 2014).

1.6 Heilung von Knochendefekten

Die komplette oder inkomplette Kontinuitätsunterbrechung von Knochengewebe definiert im Allgemeinen eine Fraktur. In dieser Studie wird ein Knochendefekt künstlich durch das Einbringen von Aspirationsnadeln herbeigeführt. Wir sprechen daher in diesem Fall von Knochen- und nicht von Frakturheilung. Die Heilung von Knochendefekten ist ausreichend erforscht und verläuft bekanntermaßen in mehreren Phasen. Man unterscheidet zwischen primärer/direkter und sekundärer/indirekter Knochenheilung. Im Folgenden sollen diese noch einmal kurz dargestellt werden.

Primäre Knochenheilung

Unter primärer Knochenheilung versteht man die direkte Frakturüberbrückung ohne Bildung von Kallus, sie setzt mechanische Stabilität, ausreichende Vaskularisation und anatomische exakte Reposition, bei Spaltbreiten bis 0,5 mm, voraus (Schenk und Willenegger 1977, Rössler et al. 2005, Bohndorf 2006). Klassisch werden Spaltheilung, Defektauffüllung zunächst mit Geflechtknochen, und Kontakttheilung, direkte Überbrückung durch Lamellenknochen, unterschieden (Schenk und Willenegger 1977, Stürmer 1987).

Sekundäre Knochenheilung

Sie entspricht den spontanen Vorgängen, die auftreten, wenn die Voraussetzungen für eine primäre Knochenheilung nicht gegeben sind und stellt die natürliche Knochenheilung dar. Sie wird in drei Stadien aufgeteilt:

1. Inflammation: Sie beginnt unmittelbar als Folge der Verletzung von Periost, Kortikalis und Knochenmark. Es entsteht ein Hämatom im Knochendefekt. Angelockt durch Interleukine aus geschädigten Zellen, wandern Mastzellen, Granulozyten und Makrophagen in das Hämatom ein und setzen vasoaktive Zytokine, Histamin und Heparin frei. Damit wird die Permeabilität lokaler Gefäße verbessert und neue sprossen ein. Das Hämatom wird phagozytiert und in fibrinöses Granulationsgewebe umgeformt (Bolander 1992),
2. Granulationsphase: Pluripotente MSC dringen in das Gebiet ein und differenzieren sich in Fibroblasten, Chondroblasten und Osteoblasten. Diese Zellen sind für die Bildung eines weichen Kallus und die anschließende Bildung des Geflechtknochens verantwortlich (Siska et al. 2009)
3. Modeling und Remodeling: Schrittweise wird der unreife Geflechtknochen des Kallus durch differenzierten Lamellenknochen ersetzt. Ziel ist die Restitutio ad integrum.

Ungestörte Knochenheilung

Eine ungestörte Knochenheilung hat mechanische und biologische Voraussetzungen. Mechanisch: 1.) ausreichende Ruhigstellung der Fragmentenden, 2.) Ausreichender Kontakt der Knochenflächen

Biologisch: 1.) ausreichende Gefäßfunktion, 2.) Vitalität und Regenerationspotenz des Knochengewebes (Rössler et al. 2005)

Aus Veränderungen dieser Faktoren ergeben sich Störungen der Knochenheilung (Rössler et al. 2005, Stürmer 1987). Defekte spongiöser Knochen heilen schneller als Kortikalis.

1.6.1 Korrelate der Knochenheilung in der Bildgebung

Die direkte oder primäre Knochenbruchheilung kann man im Röntgenbild nach idealer Reposition und vollständig stabiler Osteosynthese einzig am Verschwinden des Frakturspaltes erkennen (Wieser 1964). Bei Defekten nach Knochenmarkaspiration mit Nadeln der Größe 15 Gauge, dies entspricht einem Durchmesser von ca. 1,8 mm, ist von einer indirekten Knochendefektheilung mit Reparation des Defektes über Remodeling auszugehen. Im Bereich spongiöser Knochen, wird der Überschuss an Knochengewebe während der Heilung im

Röntgen durch Verdichtungszenen erkennbar. Im Bereich der Kortikalis weisen ausgeprägte Kallusformationen im Röntgenbild auf eine mechanische Störung hin (Reiz-, Unruhekallus) (Rössler et al. 2005). Ein bekanntes Problem des konventionellen Röntgens stellt die gegenseitige Überlagerung von Strukturen im Röntgenbild und die damit verbundene erschwerte Interpretation dar. Die Computertomographie kann dieses Problem eliminieren und erlaubt somit die direkte, überlagerungsfreie Darstellung von Strukturen und Knochendefekten (André und Resnick 1988, Schnarkowski et al. 1995). Mittels CT kann auch die Kalluszunahme während der Frakturheilung gut beurteilt und damit Rückschlüsse auf den ungestörten Heilungsverlauf gemacht werden (Schnarkowski et al. 1995). Tabelle 1 zeigt die Veränderungen des Defektkallus bezüglich Calciumgehalt und prozentuellem Anteil an neu gebildetem Knochen.

	Calciumgehalt (mg Ca ²⁺ /g Trockengewicht)	Formation von neuem Knochen (%)
„Kallushärtung“ Ab 3. – 4. Woche	229 ± 14,5	58,1 ± 3,1
„Modeling/ Remodeling“ Ab 12. – 16. Woche	232,0 ± 7,9	62,0 ± 1,6

Tab. 1: Calciumgehalt und Knochenformation im Defektkallus, modifiziert nach Markel et al. 1990

1.7 Zielsetzung und Fragestellung

Die Knochenmarkaspiration stellt eine etablierte Entnahmemethode von rotem Knochenmark dar, die mit relativ geringem technischem Aufwand und hoher Sicherheit in lokaler Betäubung durchgeführt werden kann. Dabei besteht sowohl eine Indikation zu diagnostischen Zwecken als auch zur Isolation von MSC.

Zielsetzung dieser Arbeit ist die vergleichende Analyse der Knochenmarkaspirationsmethoden „OnControl-Aspiration- System“ und „A-MAX-Aspirationsnadel (Jamshidi)“. Insbesondere sollen dabei folgende Fragen beantwortet werden:

- Wie verhält sich die prozedurale Effektivität der beiden Methoden in Bezug auf Geschwindigkeit und Aspirationsvolumen?
- Bestehen quantitative Unterschiede bezüglich der kultivierbaren MSC aus dem gewonnenen Knochenmark?
- Unterscheiden sich die beiden Methoden in der CT-morphologischen und -volumetrischen Analyse bezüglich des primären Knochendefekts und des postoperativen Heilungsverlaufs?

- Hat die Lokalisation der Knochenmarkentnahmestelle Einfluss auf Aspirationsdauer oder auf die Anzahl der kultivierbaren Zellen?

Eine weitere Zielsetzung dieser Studie ist die Beantwortung der Frage, ob durch eine Änderung der Entnahmetechnik eine Reduktion der Belastung des Patienten, auch mit Zukunftsausblick auf ihre Anwendung im Rahmen des TE, erreicht werden kann, da diese Interventionen häufig an Patienten mit reduziertem Allgemeinzustand durchgeführt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen wurden an fünfzehn Göttinger Minischweinen aus einer dänischen Zucht für Versuchstiere durchgeführt (Ellegaard Göttingen Minipigs A/S, Soroe Landevej 302, DK-4261 Dalmose, Denmark). Die Genehmigung des Tierversuchsvorhabens erteilte das Landesamt für Landwirtschaft, Lebensmittelsicherheit und Fleischerei Mecklenburg-Vorpommern, 18003 Rostock. Registrationsnummer: 1.1-057/10.

Sowohl die Knochenmarkentnahme als auch die Computertomographien erfolgten zur Beantwortung einer Fragestellung zur stammzellbasierten knöchernen Geweberegeneration am Unterkiefer („vascularized mandibular regeneration“). Die vergleichende Untersuchung der Knochenmarkaspirationssysteme stellte somit keine wesentliche Mehrbelastung der Versuchstiere dar, sondern erlaubte die Beantwortung einer zusätzlichen Fragestellung am gleichen Versuch und erhöhte somit den wissenschaftlichen Nutzen des Großtierversuches. Aus einem weiteren Tierversuch, Genehmigungs-Nr.: 1.1-075/11, wurde im Rahmen der Tötung der Tiere an insgesamt 3 Tieren Knochenmark entnommen. Bei diesen Tieren erfolgte keine Auswertung der Defektzonen mittels Computertomographie.

Alle Versuchstiere waren weiblichen Geschlechts und zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung zwischen 22 und 26 Monate alt. Sie hatten ein Körpergewicht von $38,1 \pm 6,2$ kg und einen implantierten Port. Zum Zeitpunkt der Behandlung und zur Nachbeobachtung wurden die Tiere in Einzelhaltung im Tierstall des Instituts für Experimentelle Chirurgie und Zentrale Versuchstierhaltung der Universitätsmedizin Rostock gehalten und durch speziell geschultes Personal versorgt. Zwischen den versuchsbedingten Interventionen erfolgte die Haltung der Göttinger Minischweine in der Versuchsstation „Friedrich-Harms“- Professur für Ernährungsphysiologie und Tierernährung (Dummerstorf). Der Behandlungszeitraum der Tiere betrug jeweils ca. 13 Wochen.

2.2 Vorbereitung und Intubationsnarkose

Die Minischweine wurden 2-5 Tage vor der Intervention in das Zentrum für experimentelle Chirurgie transportiert und für mindestens 48 Stunden bezüglich Verhaltensauffälligkeiten insbesondere bei der Fütterung überwacht. Am Tag vor dem Eingriff wurden die Tiere nicht gefüttert und am Morgen des Eingriffs gewogen. Die Sedierung erfolgte im Stall mittels

intramuskulärer Injektion einer Kombination aus Azaperon 40 mg/ml (Stresnil®, Janssen Pharmaceutica NV, Beerse, Belgien) (Dosierung: 4 mg/kgKG) und Midazolam 15 mg/3 ml (Midazolam-ratiopharm®, Ratiopharm GmbH, Ulm) (Dosierung: 1 mg/kgKG) in die laterale Halsmuskulatur, ca. 3 cm hinter dem Ohr. Die verwendeten Injektionskanülen waren mindestens 30 mm lang, um eine versehentliche subkutane Injektion zu vermeiden. Nach ca. 20 Minuten Ruhe und bei ausreichender Sedierung, erfolgte die Rasur von Becken und beiden Hinterläufen. Nach dem Transfer in den Operationssaal wurden die Minischweine in Bauchlage mit einer Vakuummatratze auf den Operationstisch gelagert und anschließend wurde ein peripherer Venenkatheter (Größe in Gauge: 22) in die Ohrvene gelegt. Es folgte die Anlage des intraoperativen Monitorings: EKG-Kontrollelektroden, Sauerstoffsättigung, Temperatursonde (rektal). Zur Narkoseeinleitung wurde Propofol 1%ige Lösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) (Dosierung: 1,5-5 mg/kgKG, individuell nach Wirkung) intravenös appliziert. Die endotracheale Intubation (Laryngoskopspatel gerade, 200-250 mm Länge), mit einem Tubus (+ Cuff) der Größe sechs oder sieben, erfolgte in Rückenlage. Folgende Atemparameter wurden am Narkosegerät (Siemens-Kion Narkosegeräte mit Monitor Siemens SC 9000, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen) eingestellt: Tidalvolumen: Körpergewicht in kg x 10, Atemfrequenz: 8-10 /Minute, 1 l /min Sauerstoff, maximaler Inspirationsdruck 20-25 cm H₂O. Zur Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte die intravenöse Injektion von Propofol in 1%iger Lösung mit einer Rate von 4-120 mg/kg/Stunde (Dosierung nach Wirkung). Die intraoperative Analgesie wurde mit der intravenösen Gabe von Sufentanil 50 µg/ml (Sufenta®, Janssen-Cilag GmbH, Neuss) (Dosierung: 15-30 µg/kgKG/Stunde) realisiert. Zum Ausgleich des präoperativen Flüssigkeitsdefizits erfolgte die Infusion einer kristallinen Lösung (Rate: 5–10 ml/kgKG/Stunde). Die Tiere wurden unter Sicherung der installierten Zugänge in Bauchlage auf einer Vakuummatratze gelagert. Die Hinterläufe wurden gestreckt nach hinten ausgelagert. Es folgte eine zusätzlich Schlingenfixierung der Vorder- und Hinterläufe. (Abb. 4 und 5) Zur Vermeidung einer Hypothermie wurde das sedierte Tier bis zur Mitte des Rückens mit einer Wärmedecke zugedeckt. Referenzwerte während des intraoperativen Monitorings waren: Herzfrequenz: 83 ± 15 /min., mittlerer Blutdruck: 97 ± 14 mmHg, O₂-Sättigung: 95–100 %, etCO₂: 40 ± 3 mmHg, PaCO₂: 40 ± 3 mmHg, PaO₂: 109 ± 17 mmHg, Atemfrequenz: 20 ± 9 /min., Körpertemperatur: 37–38 °C.

Im Anschluss an die Narkoseeinleitung wurden die Aspirationsstellen auf beiden Seiten nach dem folgenden Schema angezeichnet: Markierung der Tuber coxae, des Trochanter major femoris und einer Geraden im Verlauf des Os femoris. Auf einer Verbindungsline zwischen

Tuber coxae und Caput femoris wurden die ersten drei Aspirationsstellen angezeichnet, die erste Aspirationsstelle im Abstand von zwei Zentimetern von dem Tuber coxae und zwei weitere jeweils im Abstand von zwei Zentimetern zueinander nach kaudal. Die vierte Aspirationsstelle wurde im Abstand von fünf Zentimetern zum Trochanter major femoris im angezeichneten Verlauf des Os femoris markiert (Abb. 6). Für die präoperative Antiseptik erfolgte die dreimalige Hautdesinfektion von Becken und Hinterläufen mit alkoholfreier Povidon-Jod-Lösung (Betaisodona Lösung, Mundipharma GmbH, Limburg) und Abdeckung mit sterilen Tüchern unter Aussparung des Operationsareals.



Abb. 4



Abb. 5

Abb.4 und 5: Intraoperative Lagerung der Versuchstiere auf einer Vakuummatratze



Abb. 6: Präoperative Markierung der geplanten Aspirationsstellen (Punktionsstellen mit *markiert)

2.3 Knochenmarkpunktion

Verglichen wurden zwei Techniken der Knochenmarkpunktion. Intraoperativ wurde an jedem Versuchstier an der rechten Körperhälfte eine rotierende, mittels Elektromotor angetriebene Nadel, das OnControl Bone Marrow Aspiration System, bestehend aus OnControl Aspiration System Needle Set 15 G x 90 mm und OnControl Power Driver (OnControl®, Teleflex Medical GmbH, Kernen) und an der linken Körperhälfte eine manuelle Methode, die A-MAX Biopsie-Nadel 15 G x 10 cm (Typ Jamshidi-Aspirationsnadel) (HVM Medical Products GmbH, Rotenburg an der Fulda), verwendet (Abb. 7 und 8). Die Knochenmarkpunktion erfolgte pro Körperhälfte an den vier zuvor markierten Punktionsstellen, drei im Bereich des Beckenknochens und eine im Bereich des Femurknochens (siehe Kapitel 2.2). Alle Aspirationen wurden von demselben Operateur durchgeführt. Das benötigte Punktionsmaterial wurde unter sterilen Kautelen auf einer zuvor desinfizierten und steril abgedeckten Ablage vorbereitet. Der unsterile OnControl Power Driver inklusive Connector wurde von einer zweiten Person angereicht und konnektiert. Die sterile Kunststoffhülle musste über den OnControl Power Driver gezogen und verschlossen werden. So konnte das unsterile Handstück mehrfach unter sterilen Bedingungen verwendet werden. Mit dem Skalpell (Klingenform 11) (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) erfolgte eine Stichinzision der Haut an den zuvor markierten vier Lokalisationen.



Abb. 7



Abb. 8

Abb. 7 und 8: A-MAX Aspirationsnadel (Jamshidi- Knochenmarkaspirationsnadel) (linkes Bild); OnControl Power Driver mit OnControl Aspiration System Needle und Connector (Sterilfolie entfernt)(rechtes Bild)

Die jeweilige Nadel wurde senkrecht zur Hautoberfläche über die Hautinzision bis zum Knochen eingeführt. Unter Druck und Drehbewegungen konnte die konventionelle Hohlnadel bis zur Überwindung des ersten Widerstands durch den Knochen eingeführt werden, sodass die Nadel im Markraum zu liegen kam. Der Mandrin wurde entfernt und eine mit 10.000 IE Heparin (Heparin-Natrium 5000 I.E./0,2 ml ratiopharm, Ratiopharm GmbH, Ulm)

vorbereitete 20 ml Spritze angesetzt. Zur Vermeidung einer Koagelbildung im Knochenmarkaspirat, wurden durch leichtes Schwenken der Spritze während der Aspiration Knochenmark und Heparin gut vermischt. Gemessen wurde die Zeit in Sekunden vom Aufsetzen der Nadel am Knochen bis zum Erreichen des Markraums (bzw. bis der Operateur der Meinung war, den Markraum erreicht zu haben). Nach vollendeter Aspiration, wenn sich kein Knochenmark mehr aspirieren ließ, wurde der Mandrin wieder eingeführt und an den zwei weiteren Aspirationsstellen analog verfahren, bis insgesamt mindestens 10 ml Knochenmark aspiriert waren. Die Zeit der Aspiration bis zum Erreichen des Gesamtaspersionsvolumens aus drei Punktionsn wurde gemessen und zur statistischen Auswertung im Bereich des Beckens die Summe aus den einzelnen Aspirationszeiten gebildet und auf die Zeit bis zum Erreichen von insgesamt 10 ml umgerechnet. Am Femurknochen wurde an einer Stelle bis zum Erreichen von mindestens zehn Millilitern aspiriert. Alle Spritzen wurden mit einem sterilen Verschluss versehen, beschriftet und zum Transport in einer eisgefüllten Styroporbox gelagert. Die Wundversorgung erfolgte durch Kompression der Gewebeläsion, ein Wundverschluss mit chirurgischem Nahtmaterial erfolgte nicht.

2.4 Postoperative Überwachung

Die postoperative Kontrolle der Tiere und Wundverhältnisse erfolgte am Tag des Eingriffs und jeweils einmal täglich bis zum sechsten postoperativen Tag. Beurteilt wurde das motorische Verhalten der Schweine, wobei Bewegungseinschränkungen in Form von Hinken oder das Unvermögen aufzustehen berücksichtigt wurden. Postoperative Schmerzen wurden anhand des zusätzlichen Schmerzmittelbedarfs in 50 mg Stufen beurteilt, wobei jedes Tier aus ethischen Gründen eine Basisanalgesie von 300 mg Tilidin/d (Tilidin Tabletten 50 + 100 mg, Ratiopharm GmbH, Ulm) erhielt. Relevante Schmerzen wurden durch Nahrungsverweigerung oder Verhaltensänderungen (vermindertes Interesse an der Umgebung, verringerte Aktivität) gemessen. Als dritter Parameter wurden die Wundverhältnisse beurteilt. Kriterien waren Schorfbildung, Wunddehiszenz, Rötung, Infektion mit Eiter- oder Fistelbildung, reizlose oder spezielle Beobachtungen.

2.5 Knochenmarkausstriche

Intraoperativ wurden von jedem gewonnenen Knochenmarkspirat (pro 10 ml) mehrere Knochenmarkausstriche angefertigt, nach Pappenheim gefärbt und bezüglich der Anzahl an

Knochenmarkbröckeln ausgewertet. Als Bröckel wurden alle Aggregate aus Fragmenten von Spongiosabälkchen und mehr als fünf knochenmarktypischen Zellen definiert.

Anfertigung eines Knochenmarkausstichs

Jeweils ein Tropfen Knochenmarkaspirat wurde ohne Kontakt auf einen beschrifteten, sauberen Objektträger gegeben, ein Deckgläschen in den Aspirattropfen eingetaucht und im 45° Winkel ausgestrichen. Dabei durfte nur so viel Druck ausgeübt werden, dass ein gleichmäßiger Film entstand. Die fertigen Ausstriche wurden an der Luft angetrocknet und in einer geeigneten Transportbox verstaut. Insgesamt betrug die Trocknungszeit mindestens acht Stunden.

Färbung nach Pappenheim und mikroskopische Auswertung

Die luftgetrockneten Präparate wurden zunächst für 6 Minuten in einer Küvette mit unverdünnter May-Grünwald-Lösung (Merck KgaA, Darmstadt) angefärbt, nach Ablauf der Zeit mit einer Pinzette aus der Färbelösung entnommen und in eine leere Küvette überführt. Nun wurden die Präparate durch mehrmaliges Spülen mit Leitungswasser unter leichtem Schwenken von den losen Farbrückständen befreit. Zur weiteren Färbung wurden die Präparate 20 Minuten in einer Küvette mit einem Gemisch aus Giemsa-Lösung (Siema-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf) und Puffer nach WEISE (Merck KgaA, Darmstadt) (3,6 ml Giemsa + 80 ml Pufferlösung, pH 7,3) belassen (Pufferlösung: Aqua dest., pH 7,3; Puffertabletten: pH 7,2; Na₂HPO₄·2H₂O 0,63 g/l, KH₂PO₄ 0,31 g/l). Nach 20 Minuten waren die Ausstriche fertig angefärbt und konnten mit Hilfe einer Pinzette in eine saubere Küvette überführt werden. Erneutes Spülen mit Leitungswasser, wie oben beschrieben. Die gespülten Präparate wurden zum Trocknen an der Luft mit der Beschichtung nach oben aufgestellt. Zur mikroskopischen Auswertung wurden die Objektträger mit dem Matrand nach rechts in den Kreuztisch eines Mikroskops eingespannt. Beginnend am oberen rechten Objektträgerrand wurden alle gefärbten Präparate unter Verwendung eines Objektivs mit zehnfacher Vergrößerung in horizontaler Richtung mäanderförmig mikroskopiert und vollständig betrachtet. Zur genauen Untersuchung der Knochenmarkbröckel wurde zu einem Objektiv mit 100facher Vergrößerung und Immersionsöl (Merck KgaA, Darmstadt) gewechselt. Alle Knochenmarkbröckel pro Ausstrich wurden gezählt und dokumentiert.

2.6 Anzucht und Analyse mesenchymaler Stammzellen in der Zellkultur

Das verwendete Knochenmark stammte ausschließlich von Göttinger-Minischweinen dieser Versuchsreihe (erstes und zweites Versuchsvorhaben, insgesamt 15 Tiere, keine Kultur von Tier-Versuchs-Nr.: Tier 7). Zur weiteren Verarbeitung des Knochenmarks wurden mindestens 10 ml Knochenmarkaspirat benötigt. Die Aufbereitung mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation, Kultivierung und Zählung der MSC erfolgte an einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank Typ HERA safe H12/2 (Heraeus Instruments GmbH, Hanau).

Herstellung eines autologen Nährmediums

Zur Kultur der MSC wurde, in Betracht der weiteren geplanten Verwendung der Zellen, der Besiedelung und Reimplantation von Scaffolds, ein Nährmedium mit autologem Serum hergestellt. So sollte eine mögliche Immunreaktion der Zellen nach Reimplantation vermieden werden. Zur Herstellung eines Nährmediums mit autologem Serum wurde die Vena jugularis externa des jeweiligen Spendertieres punktiert und Blut in ca. 30 Serum-Röhrchen je 7,5 ml (SARSTEDT Monovette®, Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) abgenommen. Anschließend wurde das Blut mit 2500 rpm bei Raumtemperatur zentrifugiert (Zentrifuge 5804R, Eppendorf AG, Hamburg). Das nun vom Koagulum getrennte Serum wurde abpipettiert und in 50 ml Falcon-Röhrchen (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) überführt. Zur Herstellung des Nährmediums für MSC wurde eine Lösung aus 20% autologem Serum und 80% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)(1x) + GlutaMax + 4,5 g/l D-Glucose + Pyruvat (Gibco® Life Technologies GmbH, Darmstadt) hergestellt und zur Prophylaxe einer Kulturkontamination ein Antibiotikum (Pen/Strep-PreMix, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe) beigefügt.

Dichtegradientenzentrifugation und Zellkultur

Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation kann die mononukleäre Zellfraktion aus einer Blut- oder Knochenmarksuspension angereichert und anschließend selektiv entnommen werden. Als Separationsmedium wurde Ficoll® Paque Plus mit einer Dichte von 1,077 g/ml (GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg) verwendet, dieses unter Lichtschutz auf Raumtemperatur erwärmt und für das weitere Prozedere eine Zentrifuge ohne Bremse reserviert. Sterile Leucosep®-Röhrchen mit Trennscheibe (poröse Trennscheibe mit definierter Porengröße) (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) wurden mit 15,5 ml Ficoll-

Separationsmedium befüllt und für ca. 30 Sekunden mit 1000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach der Zentrifugation befand sich das Separationsmedium in und unter der Trennscheibe des Leucosep®-Röhrchens. Das Knochenmark wurde aus der Aspirations-Spritze in sterile 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Die so vorbereiteten Falcon-Röhrchen wurden jeweils mit PBS-Lösung (Dulbecco's PBS, Biochrom GmbH, Berlin) im Verhältnis 1:3 (Knochenmark:PBS) aufgefüllt und der Inhalt vorsichtig durch Schwenken vermischt. Die Mischung wurde anschließend zum Entfernen von Koageln durch ein 100 µm-Nylonsieb (DB, Franklin Lakes, USA) in Falcon-Röhrchen überführt und danach in die vorbereiteten Leucosep®-Röhrchen mit Separationsmedium vorsichtig aufpipettiert, mindestens 25 ml PBS-KM-Mischung pro Leucosep®-Röhrchen, und gegebenenfalls mit PBS-Lösung zu einer Füllmenge von 50 ml aufgefüllt. Eine Durchmischung mit dem Separationsmedium wurde durch die Trennscheibe verhindert. Im Anschluss erfolgte die Dichtegradientenzentrifugation mit 500 x g für 30 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremse. Während der Zentrifugation wurden mononukleäre Zellen aufgrund ihrer Dichte separiert. Nach der Zentrifugation konnten die über dem Separationsmedium angereicherten Zellen (Interphase) abpipettiert, in ein Falcon-Röhrchen überführt, mit ca. 20 ml PBS-Lösung gewaschen und mit 400 x g für 5 Minuten zentrifugiert werden. Anschließend wurde die PBS-Lösung abgesaugt und der Vorgang einmal wiederholt. Die gewaschenen Zellpellets wurden in Kulturmedium mit autologem Serum (80 % DMEM, 20 % autologes Serum) resuspendiert und in CELLSTAR® Zellkulturflaschen (75 cm^2 , 250 ml) (Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen) ausplattiert. Pro Entnahmestelle wurde eine 75 cm^2 Flasche beimpft, sodass der gesamte Flaschenboden mit Lösung benetzt war. Im Brutschrank (CO₂-Inkubator, BINDER GmbH, Tuttlingen) erfolgte die Kultur der Zellen bei 36,5°C, 95 % Luftfeuchtigkeit, 4,5 % CO₂ und 21 % O₂. Der erste Mediumwechsel fand nach 24 Stunden mit 20% serumhaltigem Kulturmedium statt, um die sich später absetzenden HSC zu entfernen. Danach wurde das Medium alle drei bis vier Tage gewechselt. Die durchschnittliche Kulturdauer bis zur 80-90 % igen Konfluenz der Zellen betrug $12,91 \pm 2,39$ Tage. Da die Zellen in einem weiteren Versuch Verwendung fanden, konnte für die Primärkultur keine einheitliche Kultivierungsdauer verwendet werden. Vielmehr wurden die Zellen bei einer mindestens 33 %igen Konfluenz in die erste Passage überführt.

Bestimmung der Anzahl adhärenter Zellen in der Zellkultur

Zur Bestimmung der Zellausbeute der Primärkulturen wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Dazu wurden die adhärenten Zellen zunächst nach 5 minütiger Inkubation mit

Trypsin EDTA (Gibco® Life Technologies GmbH, Darmstadt) abgelöst, in 5 ml des Nährmediums resuspendiert und nach Färbung mit Trypanblau (Gibco® Life Technologies GmbH, Darmstadt) in die Zählkammer überführt. Unter dem Mikroskop wurden die Zellen in allen neun 1 mm^2 Quadranten ausgezählt, der Mittelwert der Zellzahl pro 1 mm^2 berechnet und nach folgendem Rechenschema hochgerechnet: gemittelte Zellzahl $\times 10.000 \times$ Verdünnung (ergab die Zellzahl pro ml) $\times 5$.

2.7 Computertomographie

Die postoperativen Knochendefekte und Heilungsfortschritte wurden am narkotisierten Schwein mittels nativen CT-Aufnahmen des Beckens und des Femurknochens in der ersten postoperativen Woche, nach 8 und 12 Wochen untersucht. Die Bildgebung erfolgte mit einem Spiral-CT, 64-Zeilen, 0,5 mm axiale Schichtdicke, Pitchfaktor: 1,2.

Computertomographische Untersuchungen

Das wache Minischwein wurde im Stall in einer speziellen Hängevorrichtung gelagert (Abb. 9). Für die intravenöse Narkose wurde die Stelle der Portkammer palpirt und desinfiziert. Unter sterilen Kautelen wurde aus Portnadel und Schlauchsystem mit NaCl 0,9 %iger Lösung die Luft evakuiert und die Nadel durch die Haut in der Portkammer platziert. Eine mit NaCl 0,9 %iger Lösung gefüllte 10 ml Spritze wurde konnektiert und der Port durch Einspritzen der Lösung auf Durchlässigkeit geprüft. Der bereits vorbereitete Perfusor mit Propofol (10 mg/ml) wurde angeschlossen: Flussrate ca. 13 ml/Stunde (Dosierung: 4-12 mg/kgKG/Stunde).



Abb. 9



Abb. 10

Abb. 9 und 10: Spezielle Hängevorrichtung, verwendet zur Narkoseeinleitung und zum Transport der Tiere in die Radiologie (linkes Bild); Lagerung der Versuchstiere während der CT-Untersuchung, unter ständiger Kontrolle der Sauerstoffsättigung bei Propofol-Narkose (rechtes Bild).

Während der Narkose wurden Sauerstoffsättigung und Herzfrequenz über ein Pulsoxymetrie-Gerät ständig kontrolliert. Im Spiral-CT wurden die Tiere mit nach hinten ausgelagerten Hinterläufen gelagert (Abb. 10).

Computertomographische Auswertungen der postoperativen Knochendefekte

Die Bewertung der postoperativen Knochendefekte erfolgte durch volumetrische Vermessung der Stichkanäle und qualitative Analyse der entstandenen Kollateraldefekte. Als Arbeitsgrundlage dienten die in der ersten postoperativen Woche angefertigten Nativ-CT-Aufnahmen. Zur Analyse der Stichkanäle wurden die axialen Bildsequenzen des jeweiligen Stichkanals sagittal rekonstruiert, manuell die Region of Interest (ROI) definiert und über eine eigens erstellte Abfolge von Bearbeitungsschritten das Volumen der Stichkanäle in Voxeln berechnet. Verwendet wurde dazu ein Programm zur Mikro-CT-Auswertung: SkyScan CT-Analyser Version 1.13 (Bruker GmbH, Billerica, USA). Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Datenverarbeitung aufgeführt, kursiv geschriebene Wörter in Klammern entsprechen den verwendeten Befehlen im Programm.

Zur Volumenmessung der Defekte in Voxeln mussten die Daten in Form von annähernd isotropen Voxeln vorliegen, dazu wurden die Bildsequenzen zunächst als Dicom Dateien (Digital Imaging and Communications in Medicine, NEMA, Rosslyn, USA) (raw-Datei) in das Programm Fiji (ImageJ, Schindelin J. et al. (Developers)) eingelesen und zu isotropen Voxeln umgerechnet.

(*File → Import → Image Sequence... → raw-Datei auswählen → Sequence options nicht abhaken → Bild wird angezeigt*)

Danach wurden die Eigenschaften (*Properties*) der Bildsequenzen verändert. Breite, Höhe und Tiefe der Voxel wurden durch Umrechnung der z-Achse von 0,5 mm auf 0,656 mm Kantenlänge vereinheitlicht.

(*Image → Properties... → Pixel: width, height, depth → Global*)

Für die weitere Bildverarbeitung und Darstellung der Knochendefekte wurde manuell die Fensterung der Hounsfield-Einheiten (HE) vorgenommen

(*Image → Adjust → Window/Level → Window: 40 und Level: 2145*)

und die Bildsequenzen als Bitmap-Datei gespeichert.

(*File → Save as → Image Sequence → .bmp*)

Die Vermessung der Stichkanalvolumina in Voxeln wurde mit dem Programm SkyScan CT Analyser durchgeführt. Dazu mussten die gefensterten und umgerechneten Dateien zunächst in das Programm importiert werden.

(*File→Open→ Datei mit isotrophen Voxeln auswählen*)

Die Bilder wurden in axialen Schnitten (transversale Ebene) angezeigt (Abb. 11). Um den Stichkanal in sagittaler Ebene anzuzeigen, wurde ein Schnitt im 90° Winkel zum Stichkanal (Abb. 12) definiert und der Datensatz in dieser Ebene rekonstruiert.

(*View→Profile→ rote Linie senkrecht auf und mittig durch den betrachteten Stichkanal legen*)

Die Anzahl der Schnitte wurde in Relation zur Auflösung der zu berücksichtigenden Schnitte auf 25 festgelegt.

(*Profile→Resample model...→Number of slices (25)→Save resliced images→ Speichern des Stichkanals als Bitmap-Datei(.bmp)*)

Die produzierten Bildsequenzen enthielten nun jeweils einen Stichkanal mit Schnitten in sagittaler Ebene (Abb. 13). Durchgeführt wurde das Prozedere für jeden einzelnen Stichkanal links und rechts an Becken- und Femurknochen.

Zur späteren Bildanalyse der Region of Interest (ROI) und schnelleren Datenverarbeitung wurde die Datenmenge erneut reduziert. Dazu wurde die Anzahl der Bildsequenzen in sagittaler Richtung noch einmal auf die Schnitte, in denen der Stichkanal zu sehen war, reduziert.

(*File→ Open→ bmp-Datei (des Stichkanals in sagittaler Richtung)→ Set Bottom und Top of Selection*)

Die Region of Interest (ROI) wurde manuell durch Umfahren des Stichkanals in jedem Schnitt festgelegt (Abb. 14).

(*ROI→Roi manuell festlegen durch umfahren der ROI in jedem Schnittbild.*)

Danach wurde ein benutzerdefinierter Algorithmus (*Task list*) zur weiteren Bearbeitung der ROI aus folgenden Befehlen erstellt und angewendet. Ziel war die Extraktion des Stichkanalvolumens in Voxeln. Im Folgenden werden die zusammengestellten Befehle der Task list aufgeführt und beschrieben. Kursiv geschriebene Wörter entsprechen den verwendeten Befehlen, in Klammern stehen die definierten Feineinstellungen.

- *Custom processing*

Benutzerdefinierte Bearbeitung der ROI

- *Filtering (Unsharp mask, 3D Space, Radius 2, Amount 200%, Threshold: 5)*

Bildfilter erzeugen ein neues Bild von einer Vorlage durch Verarbeitung der Pixelwerte. Zunächst wird ein verschwommenes Bild erzeugt, dann die Unterschiede zwischen verschwommenem und dem originalen Bild festgestellt und diese Unterschiede zum Originalbild addiert. So wird die Kantenschärfe im Bild verbessert. Die Verbesserung der Kantenschärfe wurde auf das VOI angewendet, in einem Radius von 2, mit einer Verstärkung der Kantenkontraste um 200 %. Unterschiede wurden ab einer Differenz von fünf Graustufen erkannt.

- *Thresholding (Multilevel (Otsu Method), 3D Space, Number of threshold levels: 5, Inside VOI)*

Schwellenwertbildung ist ein Verfahren zur Bildsegmentierung. Aus einem Graustufenbild wird schrittweise ein binäres Bild erzeugt. Mit Schwellenwertverfahren kann entschieden werden, welche Bildpunkte zum gesuchten Objekt und welche zur Umgebung gehören. Wichtig ist dabei die Wahl des richtigen Schwellenwertes, hier wurde ein automatisiertes Verfahren zur Bestimmung der Schwellenwerte auf das VOI angewendet. Die Otsu Methode aus dem Jahr 1979 verwendet statistische Hilfsmittel, um einen möglichst guten Schwellenwert zu erhalten (Otsu 1979). Hier wurden zunächst fünf Schwellenwerte errechnet und das Bild erneut in fünf Graustufen segmentiert.

- *Thresholding (Automatic (Otsu Method), 3D Space, Inside VOI, Background light)*

Im zweiten Schritt der Schwellenwertbildung wurde ein einzelner Schwellenwert nach der Otsu Methode bestimmt und die Bildinformation des VOI vollständig in ein binäres Bild umgewandelt. Das VOI entsprach dabei der dunklen (schwarzen) und der Hintergrund der hellen Bildinformation.

- *Bitwise operations (Image=Image AND Region of Interest)*

Bitweise Operationen ermöglichen eine Reihe logischer Operationen zwischen der aktuell geladenen Datenmenge (Image) und der aktuellen ROI. Die Funktion Image = Image AND ROI, entfernte alle Teile des Bildes außerhalb der ROI.

- *Despeckle (Remove broken objects, 2D Space, Detected by ROI borders)*

Der Flecken-Filter glättet Bereiche, in denen Rauschen detektiert wird (einzelne Pixel), während große Segmente unberührt bleiben (mehrere zusammenhängende Pixel). Diese Anwendung entfernte alle Objekte, die die Grenzen der ROI kreuzten.

- *Despeckle (Sweep 3D Space, Remove all except the largest Object, Apply to Image)*

Um die Bildinformation vollständig auf den zusammenhängenden Stichkanal zu reduzieren, wurde das größte Objekt als VOI definiert und alle restlichen Objekte entfernt.

- *Individual object analysis (3D Space)*

Morphometrische Parameter des erzeugten Volumens, unter anderem das Stichkanalvolumen in Voxeln, wurden gemessen und ausgegeben.



Abb. 11



Abb. 12



Abb. 13



Abb. 14

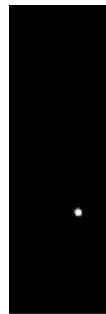


Abb. 15

Abb.11 bis 15: Exemplarische Darstellung eines Stichkanals im Bereich des Beckenknochens in axialer Schnitte (Abb. 11); Umwandlung der Darstellung in sagittale Schnitte (Abb.12 und 13); Manuelle Festlegung der ROI in jedem Schnitt (Abb. 14); zweidimensionale Darstellung des berechneten Stichkanalvolumens (Abb. 15)

Kollateraldefekte

Die CT-Aufnahmen der ersten postoperativen Woche wurden zusätzlich auf die Anzahl der entstandenen Kollateraldefekte untersucht. Als Kollateraldefekt wurden das Durchdringen der gegenüberliegenden Kompakta und das Durchdringen der gegenüberliegenden Kompakta mit angrenzenden Strukturen berücksichtigt.

Postoperative computertomographische Verlaufskontrollen

Zur Beurteilung des postoperativen Heilungsverlaufs der Knochendefekte wurden die nach 8 und 12 Wochen angefertigten CT-Aufnahmen bildmorphologisch untersucht. Bewertet wurden die Persistenz sichtbarer Knochendefekte sowie das Vorkommen sichtbarer hyperdenser Areale im Bereich des Stichkanals. Auf Grund der geringen Grauwertunterschiede war eine Berechnung der Defektvolumina in diesen Bildern nicht möglich.

2.8 Statistische Auswertung

Die Aufbereitung und Auswertung der Daten, Erstellung von Graphiken und Schaubildern erfolgte mit Hilfe der Programme IBM SPSS Statistics 20 und Microsoft Excel 2010. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte mit Standardabweichung (mean \pm SEM) angegeben. Die Normalverteilung der Werte wurde durch den Kolmogorov-Smirnov-Test, optische Kontrolle im Punktediagramm und den Shapiro-Wilk Test überprüft. Die statistische Auswertung erfolgte bei Normalverteilung mit dem t-Test für unverbundene bzw. verbundene

Stichproben. In Fällen, in denen keine Normalverteilung vorlag, erfolgte die Analyse mittels Mann-Whitney-U-Test für unabhängige und mit dem Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von weniger als 5 % ($p \leq 0,05$) definiert. Die Stärke und die Art und Weise eines Zusammenhangs zweier Merkmale wurden mittels des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman überprüft.

2.9 Literaturverwaltung

Literaturverwaltung und Erstellung des Literaturverzeichnisses erfolgte mit dem Programm Citavi® 4.

3 Ergebnisse

3.1 Versuchstiere

Es wurden insgesamt 15 Göttinger Minischweine aus zwei Versuchsvorhaben (12 + 3) in die Studie eingeschlossen, bei denen allen die Aspirationsparameter gemessen wurden. Nur die 12 Tiere aus dem ersten Versuchsvorhaben (Tier-Versuchs-Nr. 3 bis 15) waren für die postoperative Beobachtung, Anfertigung von Ausstrichen und die CT Untersuchung geplant. Hiervon musste das erste Versuchstier (Tier-Versuchs-Nr. 7) wegen eines Mandibularabszesses frühzeitig euthanasiert werden, weshalb nur bei 11 Tieren aus dem ersten Versuchsvorhaben Auswertungsdaten bezüglich der Knochenmarkkonglomerate und Primärkultur erhoben werden konnten. Zusätzlich wurden noch Primärkulturdaten von 3 Tieren aus dem zweiten Versuchsvorhaben (Tier-Versuchs-Nr. 211715, 211343, 211717) erhoben. Von diesen 11 Tieren aus dem ersten Versuchsvorhaben wiederum kamen die CT-Bilder von 7 Tieren zur Auswertung, da sich die bei den ersten 4 Tieren gewählte Schichtdicke im CT für eine aussagekräftige Auswertung als zu groß erwies, und sie deshalb nicht einbezogen werden konnten. Tabelle 3 zeigt eine Übersicht über die jeweilige Anzahl der Tiere, bei denen die jeweiligen Versuchspараметer erhoben wurden. Alle Versuchstiere waren weiblich, zum Zeitpunkt der Studie durchschnittlich $23,9 \pm 1,4$ Monate alt und hatten ein durchschnittliches Gewicht von $38,1 \pm 6,2$ kg (Tab. 2). Die Untersuchungen zur Knochenmarkaspirationstechnik und die CT-Untersuchungen wurden an narkotisierten Minischweinen durchgeführt.

Anzahl der Versuchstiere	Gewicht (kg)	Alter (Monate)	Geschlecht
15	29,5-50	23-26	weiblich

Tab. 2: Daten der Versuchstiere

In die Auswertung eingegangene Anzahl der Versuchstiere	
Dauer des Prozedere bis Aspiration	15
Aspirationsgeschwindigkeit	15
Zellausbeute in der Primärkultur	14
Knochenmarkausstriche	11
Wundverhältnisse	11
Bewegungseinschränkungen	10
Schmerzen	10
CT-Untersuchungen	7

Tab. 3: Anzahl der für die jeweiligen Versuchsparameter berücksichtigten Versuchstiere

3.2 Knochenmarkaspiration

3.2.1 Dauer des Prozedere bis zur Aspiration (Nadelinsertion)

Gemessen wurde die Dauer in Sekunden vom spürbaren Ansetzen der Aspirationsnadel am Knochen bis zum Erreichen des Markraumes (bzw. bis der Operateur meinte, den Markraum erreicht zu haben), am Femur mit einer Punktions, am Becken als Mittelwert der drei Punktionsen. Die Einzelmesswerte des Femur und die Mittelwerte der Messdaten des Beckens sind in Tab. 4 im Anhang aufgeführt. In der deskriptiven Statistik ergab sich für das OnControl Aspiration System bei 30 Werten (15 Becken (als 15 Mittelwerte aus 45 Einzelwerten) / 15 Femur) ein arithmetisches Mittel der gemessenen Zeiträume zur Nadelinsertion von $4,33 \pm 1,65$ Sekunden. Die Spannweite der Werte betrug 5 Sekunden, bei einem Minimum von 2 Sekunden und einem Maximum von 7 Sekunden.

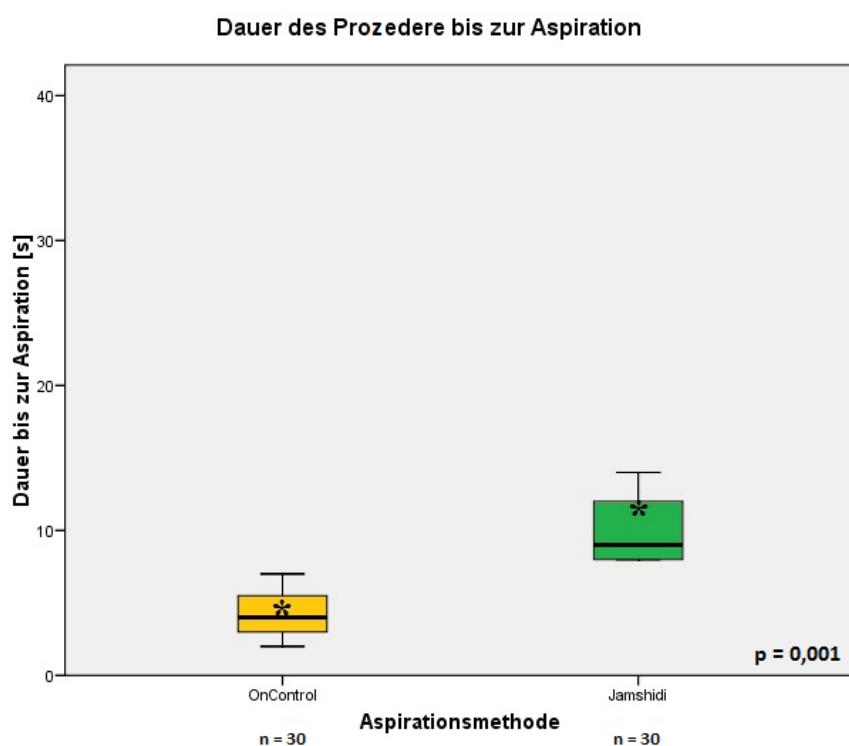


Abb. 16: Boxplot der Dauer des Prozedere vom Ansetzen der Nadel am Knochen bis zum Beginn der Aspiration in Sekunden, Vergleich beider Aspirationsmethoden. In der Abbildung entspricht die Bezeichnung Jamshidi der A-MAX Aspirationsnadel. (In der Graphik wurden Extremwerte zur besseren Darstellung der Ergebnisse zensiert). Mittelwerte mit * markiert.

OnControl Aspiration System $\bar{X} = 4,33 \pm 1,65$ Sekunden, Varianz = 2,71 ;A-MAX $\bar{X} = 11,73 \pm 7,70$ Sekunden, Varianz= 59,31.

Für die konventionelle, durch manuellen Druck und Rotation eingebrachte, Methode A-MAX (Jamshidi-Hohlnadel) ergab sich ein arithmetisches Mittel der Insertionszeit von $11,73 \pm 7,70$ Sekunden bei 30 Werten. Die Spannweite der Werte betrug 32 Sekunden, bei einem Minimum von 8 Sekunden und einem Maximum von 40 Sekunden. Der statistische Vergleich ergab für die Dauer des Prozedere vom Ansetzen der Nadel am Knochen bis zum Beginn der Aspiration einen signifikanten Unterschied mit $p = 0,001$ auf einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ der zeigt, dass der Eingriff mit dem OnControl Aspiration System um 7 Sekunden pro Aspirationsstelle schneller ist als mit der Vergleichsmethode A-MAX (Jamshidi-Hohlnadel) (Abb. 16).

3.2.2 Dauer der Aspiration

Es wurde die Dauer der Aspiration (Knochenmarkaspirat in der Spritze sichtbar, bis zum Erreichen von 10 ml Aspirationsvolumen) gemessen und verglichen. Als Cutoff wurde ein Aspirationsvolumen von 10 ml gewählt, da dies dem im Protokoll festgelegten Mindestaspirationsvolumen für die weitere Aufbereitung und Kultur der MSC entspricht. Die Ergebnisse von Becken- und Femurknochen wurden aufgrund von unterschiedlichen anatomischen Gegebenheiten und unterschiedlicher Anzahl der Entnahmestellen (drei Aspirationsstellen im Bereich des Beckenknochens und eine am Femurknochen) getrennt ausgewertet. Der Femurknochen repräsentiert die Aspirationsverhältnisse an großen Röhrenknochen mit dicker Kompakta und großkalibrigem Markraum. Der Beckenknochen ist bezüglich seiner Anatomie ein platter Knochen und besitzt nur einen schmalen Markraum.

Dauer der Aspiration im Bereich des Beckenknochens

Im Bereich des Beckenknochens wurden beide Aspirationsmethoden bezüglich eines statistisch signifikanten Unterschieds der Aspirationsdauer untersucht, die Zeitwerte der drei Aspirationstellen addiert und auf die Zeit bis zum Erreichen von 10 ml Aspirationsvolumen umgerechnet (es waren am Becken immer > 10 ml Aspirationsvolumen) (Tabelle 4 im Anhang). Rein deskriptiv liegen die arithmetischen Mittel beider Aspirationsmethoden nahe beieinander: OnControl Aspiration System $182,40 \pm 64,09$ Sekunden und A-MAX (Jamshidi-Hohlnadel) $183,32 \pm 43,03$ Sekunden. Für das OnControl Aspiration System ergab sich eine größere Spannbreite von 263,04 Sekunden (Minimum: 51,25 Sekunden, Maximum: 314,29 Sekunden) als für die A-MAX-Aspirationsnadel (Jamshidi-Hohlnadel) mit einer Spannbreite von 154,42 Sekunden (Minimum: 122,50 Sekunden, Maximum: 276,92 Sekunden).

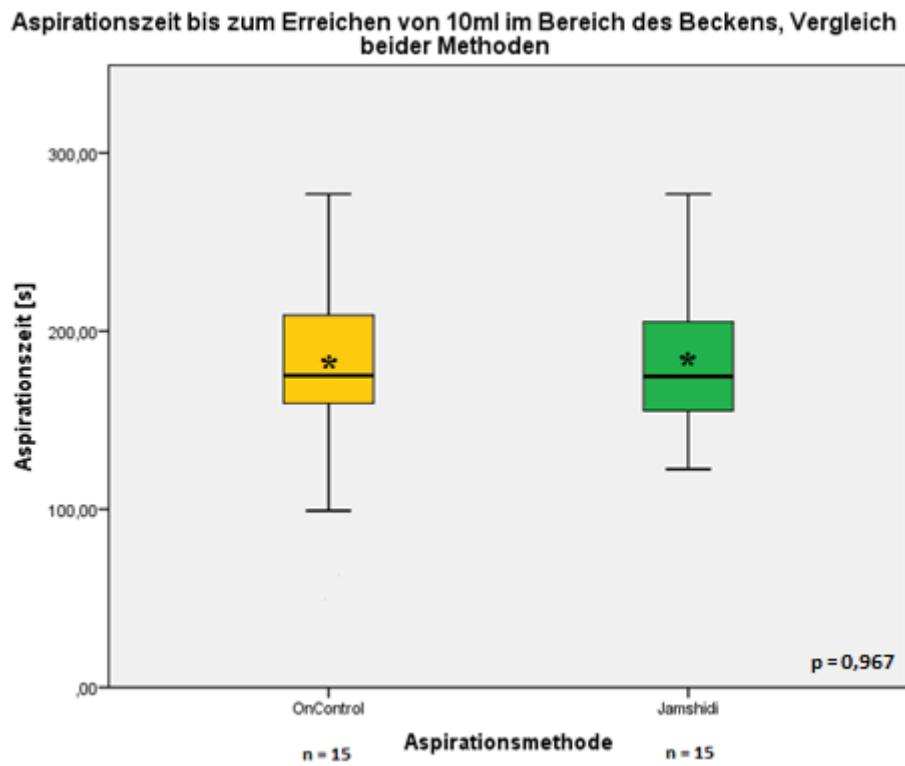


Abb. 17 : Boxplot der benötigten Aspirationszeit bis zum Erreichen eines Mindestaspirationsvolumens von 10 ml im Bereich des Beckens, Vergleich beider Aspirationsmethoden. In der Abbildung entspricht die Bezeichnung Jamshidi der A-MAX Aspirationsnadel. (In der Graphik wurden Extremwerte zur besseren Darstellung der Ergebnisse zensiert). Mittelwerte mit * markiert.

OnControl Aspiration System $\bar{X} = 182,40 \pm 64,09$ Sekunden, Varianz = 4106,92;

A-MAX $\bar{X} = 183,32 \pm 43,03$ Sekunden, Varianz = 1851,23.

Im statistischen Vergleich der arithmetischen Mittel lag bei einem p-Wert von 0,967 auf einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ kein signifikanter Unterschied der Aspirationsgeschwindigkeit vor. Beide Methoden zeigten sich hinsichtlich der Aspirationsgeschwindigkeit im Bereich des Beckens als gleichwertig (Abb. 17).

Dauer der Aspiration im Bereich des Femurknochens

Im Bereich des Femurknochens wurde das komplette Aspirationsvolumen aus einer Aspirationsstelle gewonnen und beide Aspirationsmethoden auf einen statistisch signifikanten Unterschied untersucht. Für die statistische Auswertung wurden nur Stichproben mit einem Aspirationsvolumen von ≥ 10 ml berücksichtigt und wie bei den Beckenaspirationen (s.o.) auf 10 ml normalisiert.

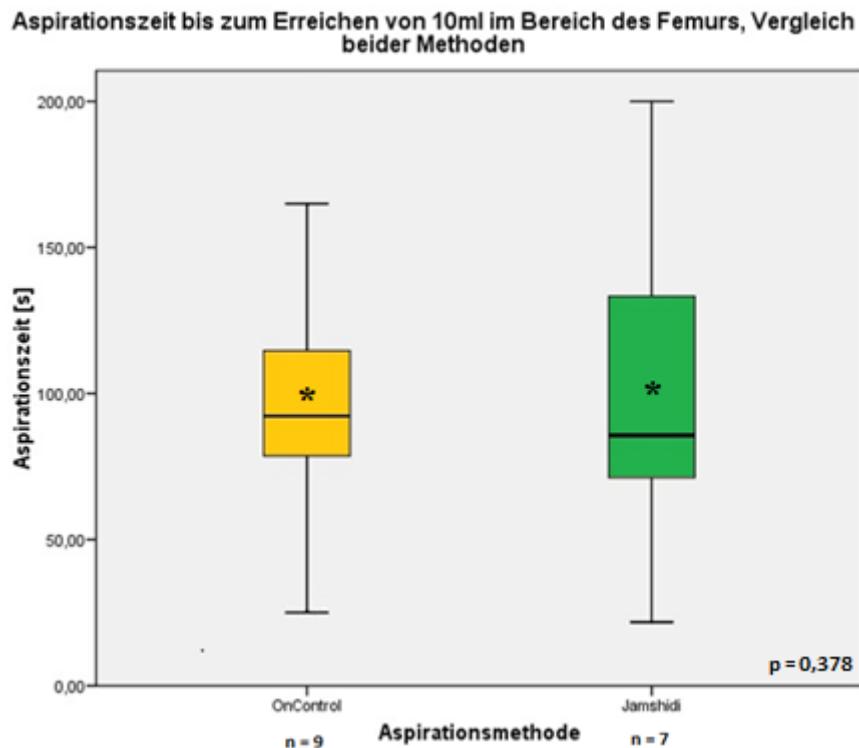


Abb. 18 : Boxplot der benötigten Aspirationszeit bis zum Erreichen eines Mindestaspirationsvolumens von 10 ml im Bereich des Femurknochens. In der Abbildung entspricht die Bezeichnung Jamshidi der A-MAX Aspirationsnadel. (In der Graphik wurden Extremwerte zur besseren Darstellung der Ergebnisse zensiert). Mittelwerte mit * markiert.

OnControl Aspiration System: $\bar{x} = 100,34 \pm 57,59$ Sekunden, Varianz = 3317,10;

A-MAX: $\bar{x} = 102,38 \pm 58,19$ Sekunden, Varianz = 3385,70

Daher ergeben sich für das OnControl Aspiration System neun und für die Jamshidi-Hohlnadel sieben berücksichtigte Werte. Wie im Bereich des Beckenknochens lagen auch hier die errechneten arithmetischen Mittel beider Methoden nah beieinander. OnControl Aspiration System: $\bar{x} = 100,34 \pm 57,59$ Sekunden, A-MAX (Jamshidi-Hohlnadel): $\bar{x} = 102,38 \pm 58,19$ Sekunden. Auch die Spannbreite ist hier nahezu identisch. OnControl Aspiration System: 176 Sekunden (Minimum: 24 Sekunden, Maximum: 200 Sekunden), A-MAX (Jamshidi-Hohlnadel): 178,24 Sekunden (Minimum: 21,76 Sekunden, Maximum: 200 Sekunden). Bei einer errechneten Signifikanz von $p = 0,378$ auf einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurde die Nullhypothese beibehalten (Abb. 18).

3.2.3 Erreichte Aspirationsvolumina

Zur Optimierung der Aspirationsmethode wurde untersucht, welcher Entnahmestandort und welches Aspirationsverfahren häufiger das Zielvolumen von ≥ 10 ml Aspirat hervorbringt. Alle fünfzehn Versuchstiere gingen in die Wertung ein.

Vergleich beider Aspirationsmethoden im Bereich des Beckenknochens

Im Bereich des Beckenknochens konnte mit der jeweiligen Aspirationsmethode in 100% (15 von 15) der Fälle eine ausreichende Menge Knochenmark von ≥ 10 ml erreicht werden. Hier zeigten sich die konventionelle und die automatisierte Methode als gleichwertig.

Vergleich beider Aspirationsmethoden im Bereich des Femurknochens

Anzahl der erreichten Aspirationsvolumina im Bereich des Femurknochens, Vergleich beider Aspirationsmethoden

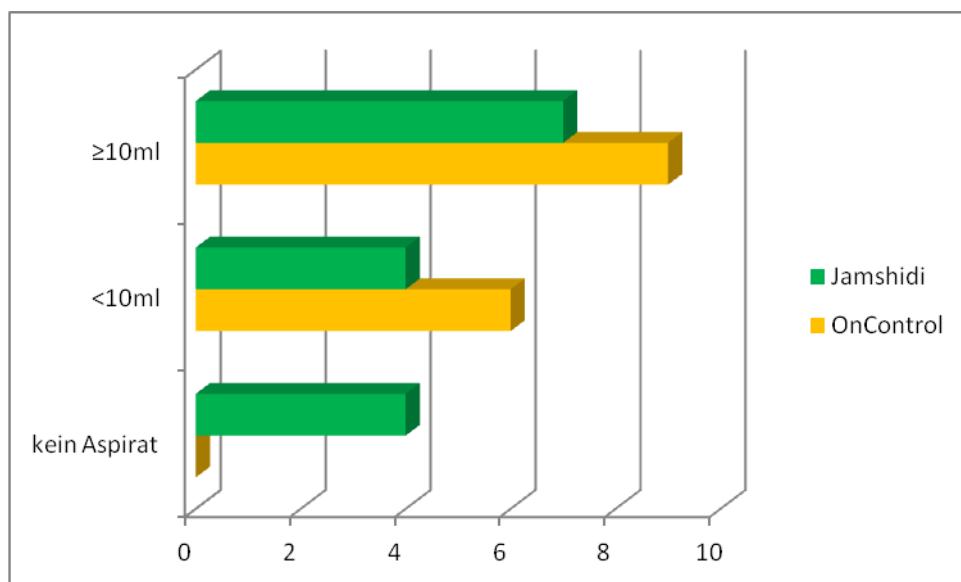


Abb. 19 : Graphische Darstellung der Anzahl an Aspirationsversuchen im Bereich des Femurknochens, bei denen das geforderte Mindestvolumen von 10ml erreicht wurde. In der Abbildung entspricht die Bezeichnung Jamshidi der A-MAX Aspirationsnadel.

Im Bereich des Femurknochens zeigte sich rein deskriptiv eine Tendenz zu besseren Aspirationserfolgen mit der automatisierten Aspirationstechnik. Mit der Methode OnControl Aspiration System konnte in neun von fünfzehn Fällen (60%) ein Aspirationsvolumen ≥ 10 ml erreicht werden. Für die Methode A-MAX (Jamshidi-Hohlnadel) in sieben von fünfzehn Fällen (46,67%). Ein größerer Unterschied bildete sich aber hinsichtlich der erfolglosen Aspirationen und der Volumina kleiner 10 ml ab. Als erfolglos wurden Punktionen gewertet, bei denen auch nach längerer Aspiration, nach Lagekorrektur der Nadel im Knochen und

drehen der Nadel um 90 Grad an der standardisierten Entnahmestelle keinerlei Knochenmark aspiriert werden konnte und ein erneuter Punktionsversuch nötig war. In den restlichen sechs Fällen (40%) der Methode OnControl Aspiration System konnte ein Volumen kleiner 10 ml aspiriert werden. Für die Methode A-MAX (Jamshidi-Hohlnadel) konnte in vier Fällen (26,67%) ein Volumen kleiner 10 ml und in weiteren vier (26,67%) konnte initial kein Knochenmark gewonnen werden (Abb 19). Der statistische Vergleich der Anzahl erfolgloser Aspirationen beider Aspirationsmethoden ergab einen p-Wert von 0,035 auf einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$. Es zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Aspirationsmethoden OnControl Aspiration System und A-MAX Aspirationsnadel bezüglich der Anzahl an initial erfolglosen Aspirationen. Mit der konventionellen Aspirationsmethode A-MAX (Jamshidi-Hohlnadel) waren signifikant häufiger initial erfolglose Aspirationen zu verzeichnen als mit der automatisierten Methode.

3.3 Postinterventionelle Beobachtungen

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der postoperativen Nachbeobachtung von elf Göttinger Minischweinen dargestellt. Über 7 Tage (Tag des Eingriffs und 6 Folgetage) wurden die postoperativen Wundverhältnisse, die Suffizienz der verabreichten Analgesie und Bewegungseinschränkungen beurteilt.

3.3.1 Postoperative Wundverhältnisse

Getrennt nach der Aspirationsmethode wurden beide Seiten des Versuchstieres beurteilt. Berücksichtigte Veränderungen waren Schorf/Rötung, Schorf/reizlos, reizlos, Wunddehiszenz, Rötung und Eiter/Fistel. Da sich intraindividuell kein Unterschied zwischen den Wundverhältnissen beider Körperhälften/Aspirationsmethoden zeigte, wurden die Ergebnisse pro Tier zusammengefasst und nicht getrennt nach Methode und Seite dargestellt. Am Tag der Intervention bestand bei allen Tieren eine lokale Rötung mit Schorfbildung an den Inzisionsstellen. Abbildung 20 zeigt exemplarisch die als Rötung mit Schorf beurteilten Wundverhältnisse am ersten postoperativen Tag. Vom ersten bis zum vierten postoperativen Tag nahm die Anzahl der Rötungen kontinuierlich ab. Am fünften postoperativen Tag bestanden bereits bei 90,9% der Tiere reizlose Wundverhältnisse mit wenig Schorfbildung (Abb. 21).



Abb. 20: Exemplarische Darstellung der Wundverhältnisse am ersten postoperativen Tag. Bewertung der Wundverhältnisse als Rötung und Schorf.

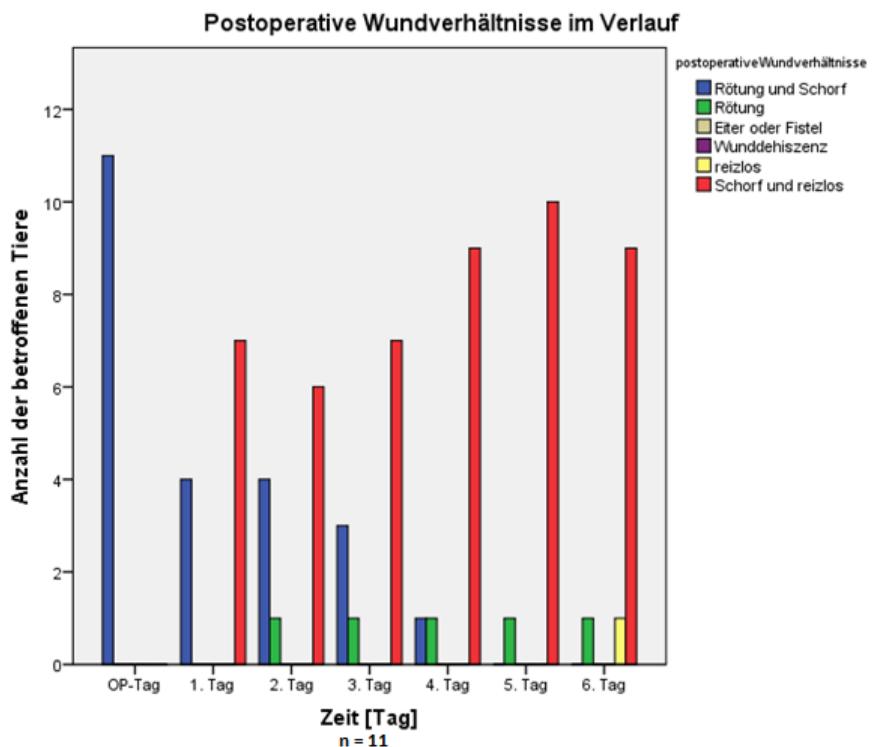


Abb. 21: Postoperative Wundverhältnisse, seitengleiche Verteilung der Wundverhältnisse. Es ergab sich kein Unterschied der postoperativen Wundheilung zwischen beiden Methoden. Erkennbar ist die kontinuierliche Abnahme der Wundverhältnisse Rötung und Schorf als Zeichen eines normalen Heilungsverlaufs.

Zu keinem Zeitpunkt traten Komplikationen im Heilungsverlauf oder Wundinfektionen auf. Beide Aspirationsmethoden können in Bezug auf die postoperative Wundheilung als gleichwertig betrachtet werden.

3.3.2 Postoperative Analgesie

Über insgesamt 7 Tage wurden 10 von 15 Tieren mit Schmerzmitteln versorgt und die Suffizienz der Analgesie beobachtet. Jedes Tier erhielt eine Basisanalgesie von insgesamt 300 mg Tilidin, welche mit dem Basisfutter dreimal täglich verabreicht wurde. Alle Versuchstiere wurden auf Schmerzäußerungen wie Nahrungsverweigerung oder Verhaltensänderungen (vermindertes Interesse an der Umgebung, verringerte Aktivität) untersucht. In die Bewertung gingen 10 Tiere ein, da von 12 Tieren aus dem ersten Versuchsvorhaben ein Tier (Tier-Versuchs-Nr.: 7) direkt nach der Intervention aufgrund eines vorbestehenden Mandibularabszesses eingeschläfert werden musste und an einem weiteren Tier einzeitig mit der Knochenmarkentnahme ein weiterer Eingriff an den Hinterläufen durchgeführt wurde, der keine vergleichbare Interpretation der Bewegungseinschränkungen zuließ. Drei Tiere (2. Versuchsreihe) wurden intraoperativ zur Organentnahme im Rahmen anderer Versuche euthanasiert.

Schmerzmittelbedarf

Bei einer Basisanalgesie von 100 mg Tilidin per os, dreimal täglich, zeigten alle 10 Tiere keinerlei Anzeichen einer insuffizienten Analgesie, wie Nahrungsverweigerung oder Verhaltensänderungen, so dass bei keinem der 10 Tiere eine schrittweise Dosiserhöhung um jeweils 50 mg Tilidin erfolgten musste. Alle Tiere zeigten bereits am Tag des Eingriffs eine unveränderte Nahrungsaufnahme, was die orale Verabreichung der Analgesie unproblematisch machte.

Postoperative Bewegungseinschränkungen

An insgesamt 7 Tagen (Tag der Intervention und 6 folgende Tage) wurden die Tiere auf Bewegungseinschränkungen hin beobachtet. Endpunkte waren: nicht aufstehen können, Hinken der Hinterläufe, keine Bewegungseinschränkungen. Beide Seiten eines Tieres wurden getrennt beurteilt. In der Nachbeobachtung zeigten sich keine Unterschiede zwischen beiden Körperhälften/Methoden. Alle Veränderungen traten parallel an beiden Körperhälften auf. Am Tag des Eingriffs konnte bei allen Versuchstieren ein leichtes Hinken an beiden Hinterläufen beobachtet werden. Am ersten postoperativen Tag waren bereits 80 % der Tiere beschwerdefrei, am zweiten postoperativen Tag waren alle Tiere ohne Bewegungseinschränkung mobil (Abb. 22). Die beiden Aspirationsmethoden sind in Bezug auf die postoperativen Bewegungseinschränkungen als gleichwertig anzusehen

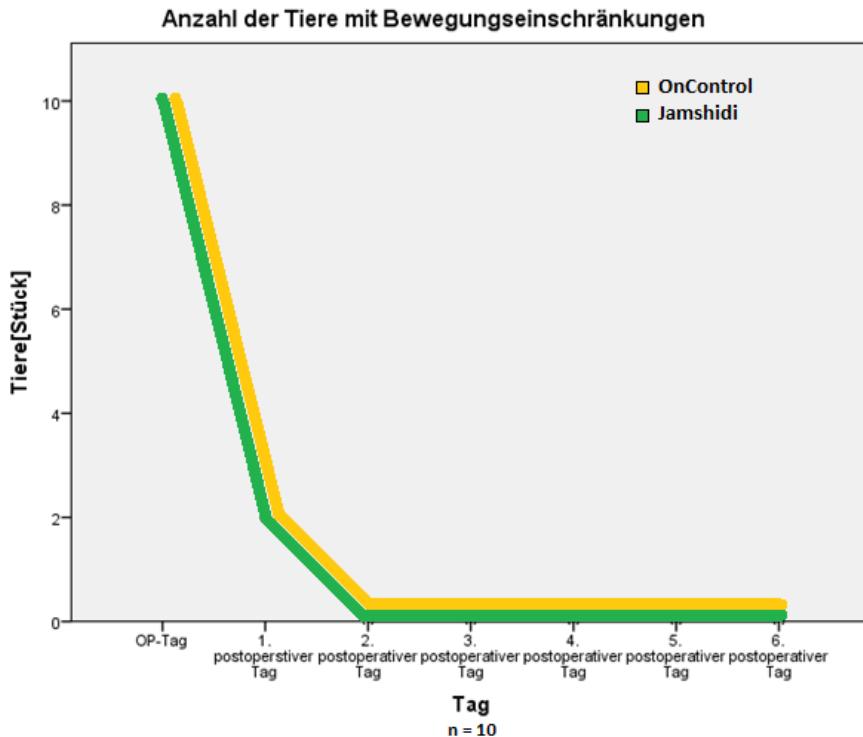


Abb. 22: Graphische Darstellung der Anzahl der Tiere mit Bewegungseinschränkungen an den Hinterläufen. Berücksichtigt wurden die Endpunkte Hinken an den Hinterläufen und keine Bewegungseinschränkungen. Der Beobachtungszeitraum betrug 7 Tage. Zwischen beiden Aspirationsmethoden ergab sich kein Unterschied in der postoperativen Mobilität der Tiere. Am Tag des Eingriffs zeigten 100% der Tiere Hinken an beiden Hinterläufen. Am ersten postinterventionellen Tag war bei zwei Tieren noch ein Hinken beider Hinterläufe zu beobachten. Ab dem zweiten postinterventionellen Tag waren alle Tiere ohne Bewegungseinschränkungen mobil.

In der Abbildung entspricht die Bezeichnung Jamshidi der A-MAX Aspirationsnadel.

3.4 Knochenmarkausstriche

Im folgenden Kapitel werden die Ergebnisse der Auswertung der angefertigten Knochenmarkausstriche dargestellt. Die Knochenmarkausstriche wurden unmittelbar nach der Knochenmarkaspiration im Operationssaal angefertigt, pro Entnahmestelle konnten zwei bis sieben Knochenmarkausstriche angefertigt werden. Zur statistischen Auswertung wurde pro Entnahmestelle das arithmetische Mittel gebildet und verglichen (insgesamt 22 Mittelwerte nach Jamshidi-Aspiration / 22 nach OnControl, beide Methoden je 11 Becken und 11 Femur). Die jeweiligen Mittelwerte sind in Tabelle 4 im Anhang dargestellt.

3.4.1 Mikroskopische Auswertung

Nach Pappenheimfärbung wurden alle angefertigten Ausstriche mäanderförmig auf Knochenmarkkonglomerate/-bröckel durchsucht. Als Knochenmarkkonglomerate/-bröckel

wurden Aggregate aus Spongiosabälkchenfragmenten und mindestens fünf knochenmarkspezifischen Zellen definiert. Im roten Knochenmark befinden sich Stammzellen und Präkursorzellen der myeloischen Reihe in unterschiedlichen Reifestufen. Ebenfalls im Knochenmark zu finden sind MSC. Da diese nicht spezifisch anfärbbar und lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden können, wurde als Kriterium zur Auszählung der Knochenmarkkonglomerate das Vorhandensein von fünf oder mehr Präkursorzellen der myeloischen Reihe, in unmittelbarer Nähe zu den Spongiosafragmenten, verwendet. Mit einem Objektiv der zehnfachen Vergrößerung erkennt man mikroskopisch in der Pappenheimfärbung die gesuchten Knochenmarkbröckel (Abb. 23 bis 28).

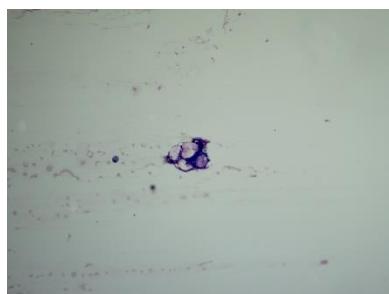


Abb. 23: 10 x Objektiv

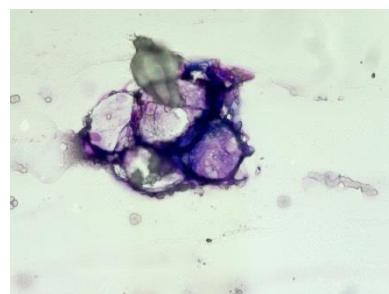


Abb. 24: 20 x Objektiv



Abb. 25: 100 x Objektiv + Öl

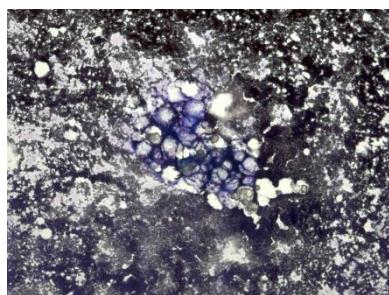


Abb. 26: 10 x Objektiv

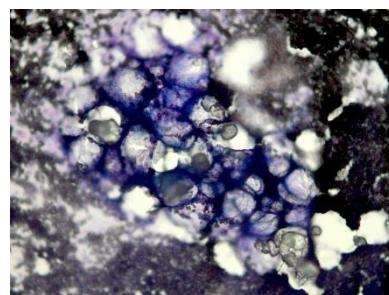


Abb. 27: 20 x Objektiv

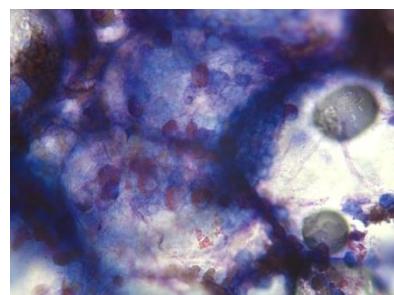


Abb. 28: 100 x Objektiv + Öl

Die hundertfache Vergrößerung (100 x Objektiv + Immersionsöl) zeigt die einzelnen Strukturen der Knochenmarkkonglomerate. Die Spongiosabälkchen im Bereich des Markraumes sind als blau angefärbtes Gerüst (Abb. 29/II) erkennbar. Die Präkursorzellen der erythrozytären Reihe stellen sich in der Färbung als kleine blaue Zellen dar (Abb. 29/III). Erste, in einem zytologischen Knochenmarkausstrich erkennbare und lichtmikroskopisch identifizierbare, erythrozytäre Vorstufen sind Pronormoblasten (= Proerythroblast = Rubriblast) mit tiefblauem Zytoplasma und Erythroblasten mit ebenfalls blau angefärbtem Zytoplasma. Normoblasten haben zunächst ein basophiles Zytoplasma. Als Zellen mit rotem Zytoplasma (azidophil) stellen sich Zellen der Granulopoese (Metamyelozyten und Myelozyten) dar (Abb. 29/I).

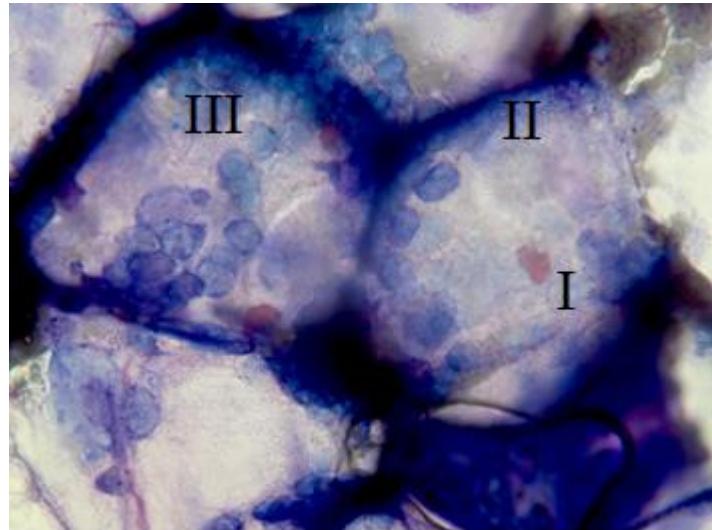


Abb. 29: Vergrößerte Ansicht eines Knochenmarkbröckels unter dem Mikroskop (100x Objektiv + Öl). Zu erkennen sind die einzelnen Zellen der myeloischen Reihe (I & III), eingebettet in ein Gerüst aus Spongiosabälkchen (II).

I: Zellen der Granulopoese

II: Spongiosabälkchen

III: Präcursorzellen der erythrozytären Reihe

3.4.2 Anzahl der Knochenmarkkonglomerate pro Ausstrich

Für die schließende Statistik wurde pro Seite und Entnahmestelle das arithmetische Mittel aus den gezählten Knochenmarkkonglomeraten von zwei bis sieben Ausstrichen gebildet. Rein deskriptiv liegt die Anzahl der Knochenmarkkonglomerate pro Ausstrich für die konservative Aspirationsmethode A-MAX (Jamshidi-Hohlnadel) mit einem Mittelwert von 2,30 Stück pro Ausstrich marginal über der für die Methode OnControl Aspiration System mit einem Mittelwert von 2,07 Stück pro Ausstrich (Abbildung 30). Statistisch besteht bei einem p-Wert von 0,79, auf einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$, kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Methoden. Die Methoden können hinsichtlich der Anzahl an Knochenmarkkonglomeraten pro Ausstrich als gleichwertig betrachtet werden.

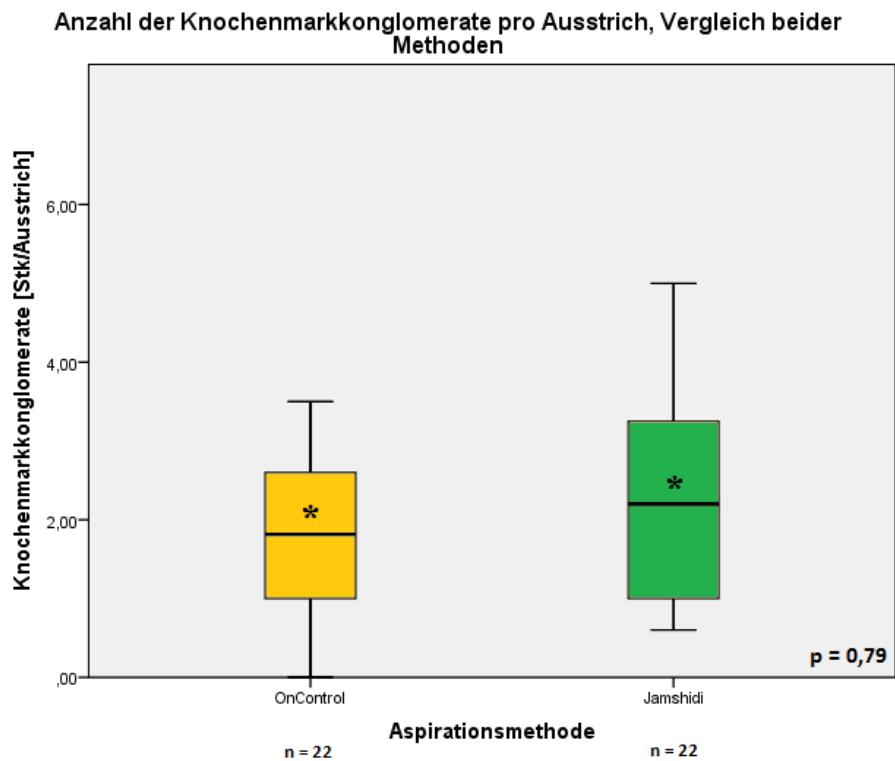


Abb. 30: Boxplot der Anzahl an Knochenmarkkonglomeraten im Vergleich beider Aspirationsmethoden. In der Abbildung entspricht die Bezeichnung Jamshidi der A-MAX Aspirationsnadel. (In der Graphik wurden Extremwerte zur besseren Darstellung der Ergebnisse zensiert). Mittelwerte mit * markiert.

OnControl Aspiration System: $\bar{X}=2,07 \pm 1,50$ Stück pro Ausstrich, Varianz= 2,26;

A-MAX: $\bar{X}= 2,30 \pm 1,30$ Stück pro Ausstrich, Varianz=1,69.

3.5 Zellkultur

Die durch Knochenmarkaspiration gewonnenen Zellen wurden mit Dichtegradientenzentrifugation separiert (Separationsmedium Ficoll). Die gewaschenen Zellpellets wurden in einem 20% igen Kulturmedium (80 % DMEM und 20 % autologes Serum) resuspendiert und im Schnitt $12,91 \pm 2,39$ Tage kultiviert. Es wurden die Zellzahlen aus der Primärkultur von 14 Göttinger Minischweinen untersucht und verglichen, vom ersten Versuchstier (Tier-Versuchs-Nr.: 7) der ersten Versuchsreihe, welches frühzeitig wegen eines Mandibularabszesses euthanasiert werden musste, wurde keine Zellkultur angelegt. Als MSC wurden die Zellen gezählt, die ein plastikadhärentes Wachstum aufwiesen. Die Abbildungen 31 bis 36 zeigen Beispiele des Wachstums der plastikadhärenten Zellen in Kultur



Abb. 31: 4. Tag in Kultur



Abb. 32: 5. Tag in Kultur

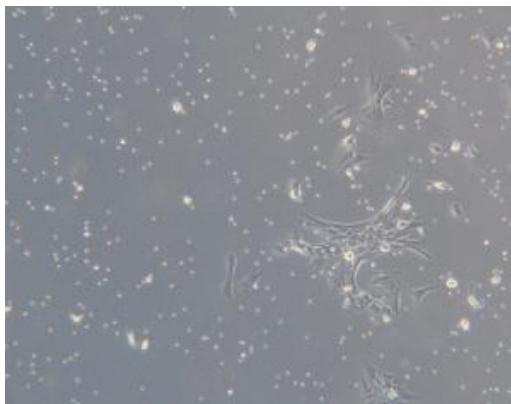


Abb. 33: 6. Tag in Kultur

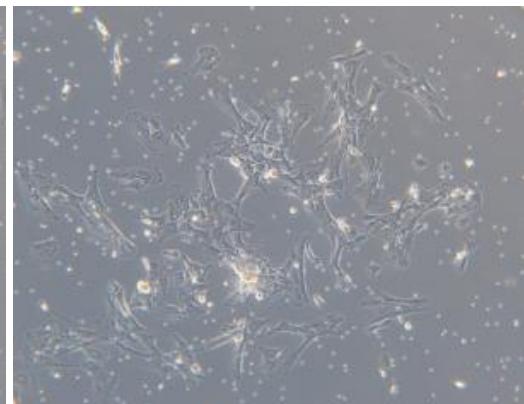


Abb. 34: 7. Tag in Kultur

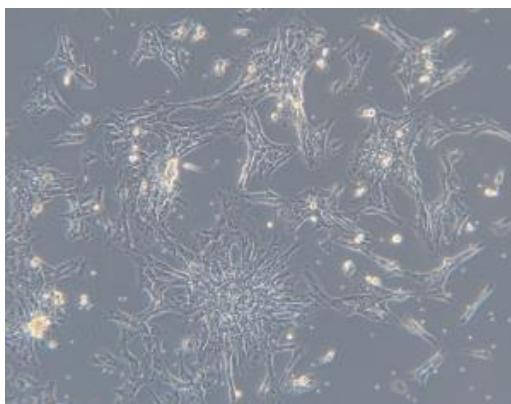


Abb. 35: 8. Tag in Kultur

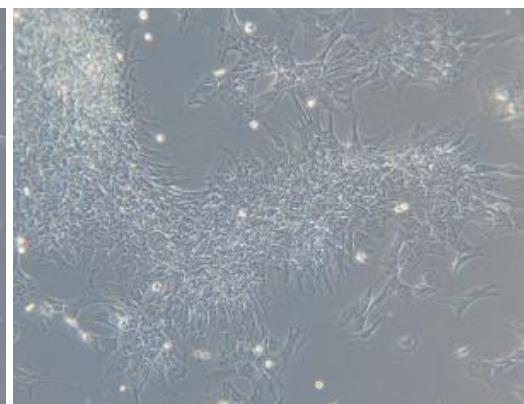


Abb. 36: 11. Tag in Kultur

Abb.31 bis 36: Fotos der porcinen plastikadhärenen Zellen unter dem Mikroskop mit typischer Fibroblasten-ähnlicher Morphologie und podozytenartigen Zellausläufern. Beispielbilder vom 4.bis 8.und vom 11. Tag in Kultur. Im Verlauf sichtbare Reduktion der nichtadhärenen runden Erythrozyten und hämatopoetischen Zellen nach Mediumwechsel.

3.5.1 Vergleich der Primärkulturdauern, Vergleich beider Methoden

Zunächst wurden die Zellzahlen aus den Primärkulturen der konventionellen und automatisierten Aspirationsmethode verglichen. Da die Zellen für einen anderen Tierversuch benötigt wurden, konnte die Kulturdauer nicht auf eine einheitliche Anzahl an Tagen

standardisiert werden. Die Passage der Zellen erfolgte daher wenn eine ausreichende Konfluenz der Zellen bestand und das Poolen sinnvoll war. Die Primärkulturzahlen der initial (beim ersten Aspirationsversuch) erfolglosen Aspirationen wurden in der schließenden Statistik als „erfolglos“ gewertet, auch wenn im zweiten Anlauf stellenweise hohe Volumina mit gleichsam hoher Zellausbeute entnommen wurden.

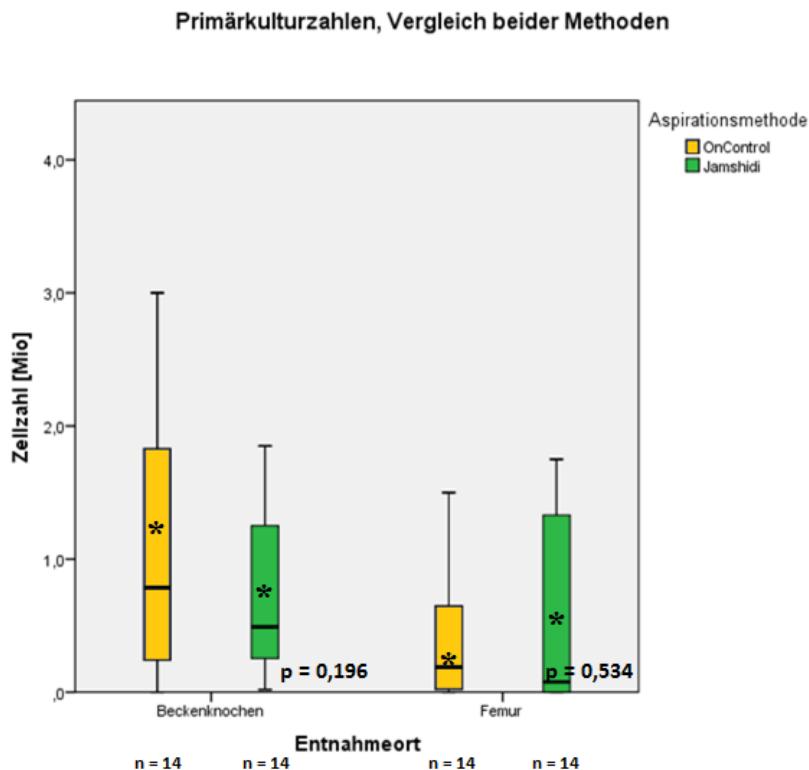


Abb. 37: Boxplot der Zellzahlen aus der Primärkultur. Vergleich beider Aspirationsmethoden, Darstellung getrennt nach Entnahmestandort.

In der Abbildung entspricht die Bezeichnung Jamshidi der A-MAX Aspirationsnadel. Mittelwerte mit * markiert.
(In der Graphik wurden Extremwerte zur besseren Darstellung der Ergebnisse zensiert)

OnControl Aspiration System: Becken $\bar{X} = 1,27 \pm 1,54$ Millionen Zellen, Varianz = 2,37; Femur $\bar{X} = 0,36 \pm 0,43$ Millionen Zellen, Varianz = 0,18.

A-MAX: Becken $\bar{X} = 0,74 \pm 0,65$ Millionen Zellen, Varianz = 0,43; Femur $\bar{X} = 0,53 \pm 0,72$ Millionen Zellen, Varianz = 0,51.

Im statistischen Vergleich ergab sich für die automatisierte Methode OnControl Aspiration System, Entnahmestandort Becken, ein arithmetisches Mittel von $1,27 \pm 1,54$ Millionen Zellen bei einer Spannweite der Werte von 5,57 Millionen Zellen in der Primärkultur. Für den Entnahmestandort Femur betrug das arithmetisches Mittel $0,36 \pm 0,43$ Millionen Zellen, Spannweite 1,50 Millionen Zellen. Für die konventionelle Methode A-MAX (Jamshidi-Hohlnadel) ergab die explorative Datenanalyse ein arithmetisches Mittel von $0,74 \pm 0,65$ Millionen Zellen bei einer Spannweite von 1,83 Millionen Zellen für den Entnahmestandort

Becken. Für den Entnahmestandort Femur war das arithmetisch Mittel mit $0,53 \pm 0,72$ Millionen Zellen zu beziffern, Spannweite 1,75 Millionen Zellen. Nach der schließenden Statistik (Wilcoxon-Test) ergab sich weder für den Entnahmestandort Becken, $p = 0,196$, noch für den Entnahmestandort Femur, $p = 0,534$, ein signifikanter Unterschied der Zellzahl zwischen beiden Methoden auf einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ (Abb. 37).

3.5.2 Korrelation zwischen der Anzahl an Knochenmarkkonglomeraten und der Ausbeute an Zellen in der Primärkultur

Knochenmarkkonglomerate stellen ein Gütekriterium bei der Gewinnung haematopoetischer Stammzellen aus dem Knochenmark dar. Es galt zu untersuchen, ob zwischen der Zellausbeute an MSC und der Anzahl der Knochenmarkkonglomerate ein statistischer Zusammenhang bestand. Es wurden 44 Wertepaare, entsprechend der Anzahl an Werten für die Knochenmarkkonglomerate, hinsichtlich der Hypothese überprüft, dass eine hohe Anzahl an Knochenmarkkonglomeraten im Ausstrich mit einer hohen Anzahl an Zellen in der Primärkultur einhergeht.

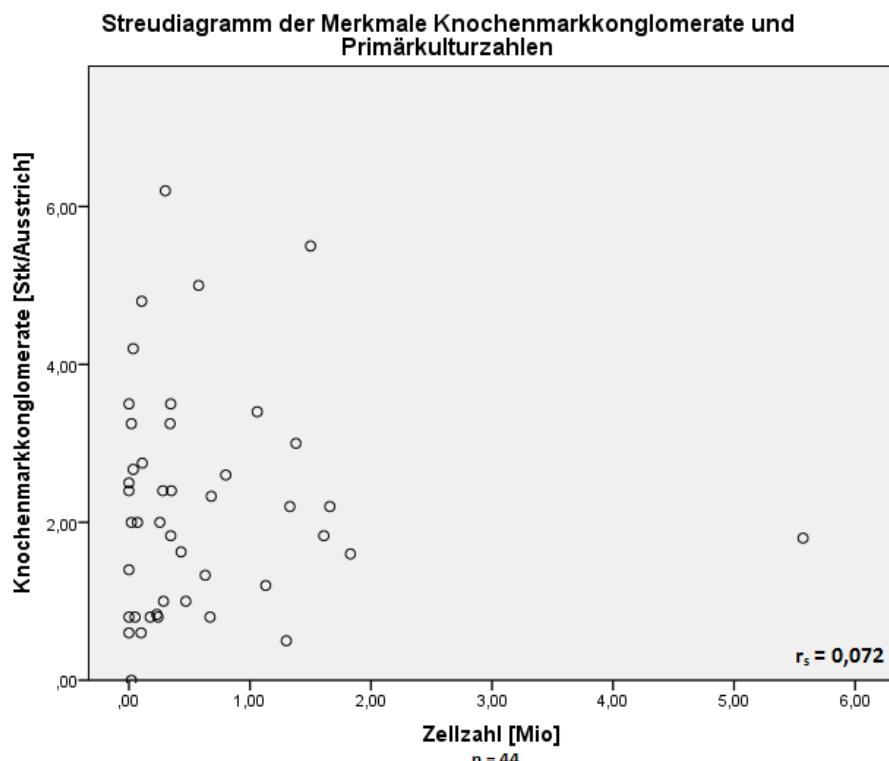


Abb. 38: Streudiagramm der Merkmale Knochenmarkkonglomerate pro Ausstrich und Zellzahl in der Primärkultur. Bei einem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman von 0,072 besteht kein statistischer Zusammenhang zwischen der Anzahl der Knochenmarkkonglomerate und der Ausbeute an Zellen in der Primärkultur.

Dies würde bedeuten, dass die Anzahl an Knochenmarkkonglomeraten im Ausstrich einen möglichen Surrogatparameter für die Menge an Zellen in der Primärkultur darstellt und sich durch eine höhere Anzahl der Knochenmarkkonglomerate im Knochenmarkaspirat die Ausbeute an MSC erhöhen ließe. Bei einem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman von $r_s = 0,072$ ergab sich kein statistischer Zusammenhang zwischen der Anzahl der Knochenmarkkonglomerate pro Ausstrich und der Ausbeute an Zellen in der Primärkultur (Abb. 38). Der Anzahl an Knochenmarkkonglomeraten pro Ausstrich kann keine Markerfunktion für die Höhe der Zellausbeute in der Primärkultur zugeschrieben werden. Eine große/geringe Anzahl an Knochenmarkkonglomeraten im Ausstrich geht also nicht mit einer hohen/geringen Anzahl an Zellen in der Primärkultur einher.

3.6 Computertomographie

Elf Tiere wurden postoperativ mittels Computertomographie auf das Ausmaß des Knochendefektes untersucht. Dazu wurden innerhalb der ersten postoperativen Woche sowie nach 8 und 12 Wochen Nativ-CT-Aufnahmen der Becken- und Femurknochen angefertigt. Untersucht wurden das Stichkanalvolumen, die Anzahl der Kollateraldefekte und der postoperative Heilungsverlauf der Knochendefekte. Bei den ersten vier Tieren wurde aber eine zu große Schichtdicke gewählt, sodass die entstandenen CT-Bilder nicht auswertbar waren.

3.6.1 Volumetrische Vermessung der postoperativen Knochendefekte

Ausgewertet wurden die CT-Bilder von sieben Göttinger Minischweinen, welche innerhalb der ersten postoperativen Woche angefertigt wurden. In die Auswertung gingen alle sichtbaren Knochendefekte, auch die von erfolglosen Aspirationsversuchen, ein. Die ersten postoperativen CTs wurden mit einer Schichtdicke von 1 mm angefertigt. Eine Schichtdicke von 1mm erwies sich jedoch in der Auswertung als nicht geeignet für die volumetrische Vermessung.

Vergleich des postoperativen Knochendefekts beider Aspirationsmethoden im Bereich des Beckenknochens

Die Auswertung der CT-Bilder von sieben Tieren ging in die Wertung ein. Es wurden alle sichtbaren Stichkanäle volumetrisch vermessen, auch Stichkanäle von frustranen Aspirationsversuchen. Somit wurden für das OnControl Aspiration System 45 Stichkanäle vermessen (21 planmäßige, 24 zusätzliche Punktionen). Sechs der Stichkanäle waren mit der

geplanten Auswertungstechnik nicht messbar. Für die Methode A-MAX (Jamshidi-Hohlnadel) wurden 34 Stichkanäle ausgewertet, drei davon waren nicht auswertbar (21 planmäßige, 13 zusätzliche Punktationen). Aus den gemessenen Stichkanalvolumina wurde pro Tier, getrennt nach Aspirationsmethode, das arithmetische Mittel gebildet und zur weiteren statistischen Auswertung verwendet. In der Auswertung ergaben sich ähnliche Werte für beide Methoden: OnControl Aspiration System $\bar{x} = 13,72 \pm 3,06$ Voxel; A-MAX (Jamshidi-Hohlnadel) $\bar{x} = 15,12 \pm 6,77$ Voxel. Bei einer errechneten Signifikanz von 0,697, auf einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$, zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 39).

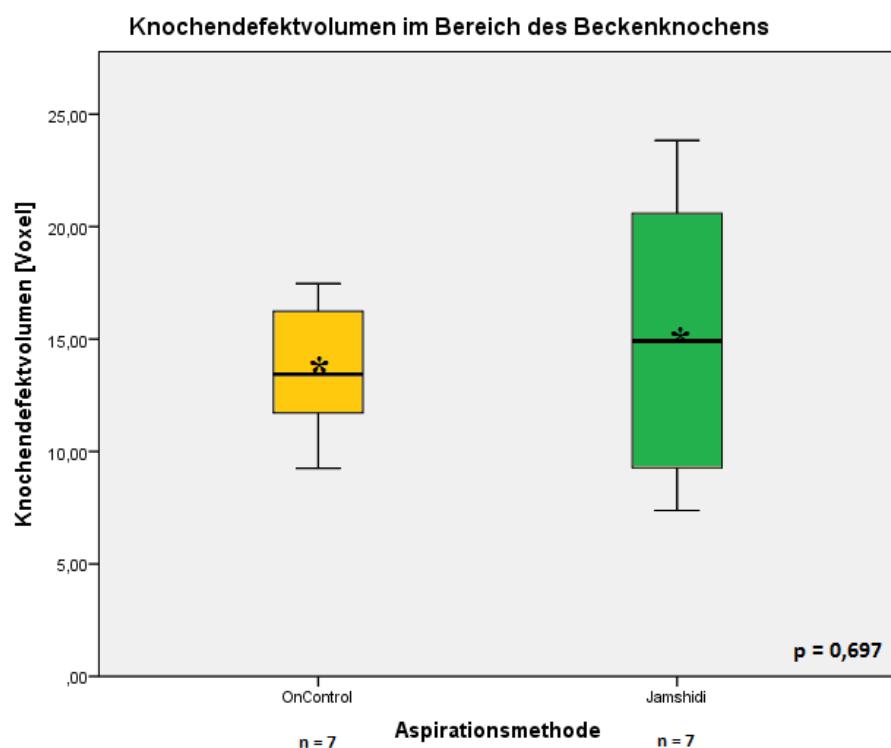


Abb. 39: Boxplot der gemessenen Stichkanalvolumina im Bereich des Beckens in Voxeln. Verglichen wurden die beiden Aspirationsmethoden. In der Abbildung entspricht die Bezeichnung Jamshidi der A-MAX Aspirationsnadel. Mittelwerte mit * markiert.

OnControl Aspiration System: $\bar{x} = 13,72 \pm 3,06$ Voxel, Varianz = 9,39;

A-MAX: $\bar{x} = 15,12 \pm 6,77$ Voxel, Varianz = 45,89

Vergleich des postoperativen Knochendefekts beider Aspirationsmethoden im Bereich des Femurknochens

Die Stichkanalvolumina von Becken- und Femurknochen wurden aufgrund der stark unterschiedlichen anatomischen Verhältnisse getrennt voneinander ausgewertet. Die CT-Bilder von sieben Tieren wurden ausgewertet und verglichen. Durch Artefakte auf den CT-

Bildern konnten für das OnControl Aspiration System bei 5 Tieren und A-MAX bei 6 Tieren Werte generiert werden.

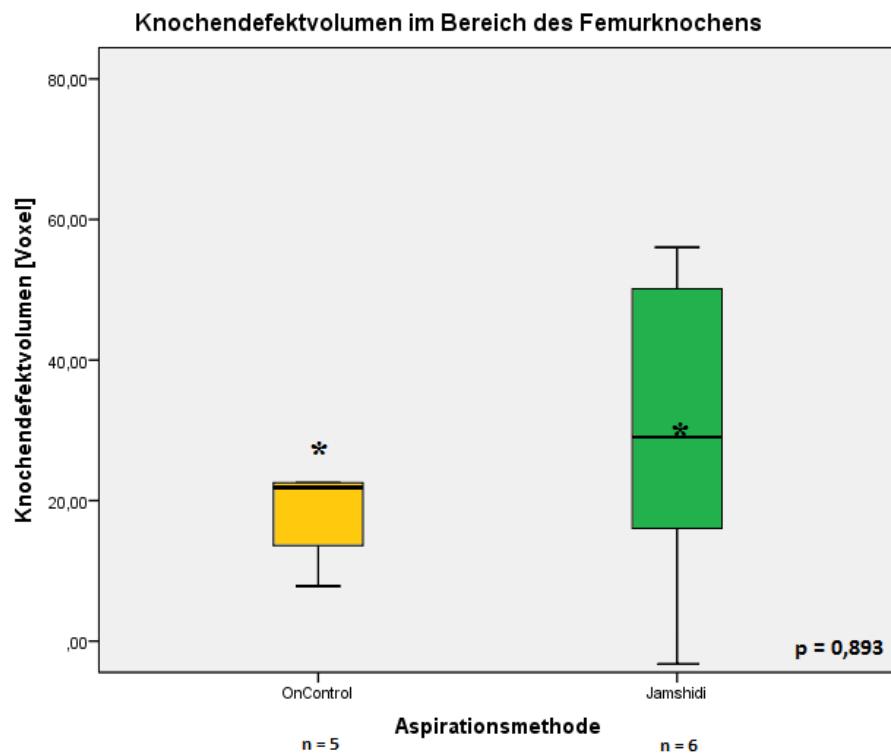


Abb. 40: Boxplot der gemessenen Volumina in Voxeln im Bereich des Femurknochens. Verglichen wurden die beiden Aspirationsmethoden.

In der Abbildung entspricht die Bezeichnung Jamshidi der A-MAX Aspirationsnadel. Mittelwerte mit * markiert.

OnControl Aspiration System: $n=5$, $\bar{x}= 28,62 \pm 27,86$ Voxel, Varianz= 776,181;

A-MAX: $n= 6$, $\bar{x}= 30,28 \pm 20,69$ Voxel, Varianz=428,001

Rein deskriptiv unterscheiden sich die arithmetischen Mittel der Aspirationsmethoden stark: OnControl Aspiration System $\bar{x}= 28,62 \pm 27,86$ Voxel; die berücksichtigten Werte lagen zwischen 7,83 und 77,25 Voxeln. A-MAX (Jamshidi-Hohlnadel) $\bar{x}= 30,28 \pm 20,69$ Voxel, Werte zwischen 1,33 und 56,04 Voxel. Im statistischen Vergleich ergab sich eine Signifikanz von $p = 0,893$ auf einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ (Abb. 40). Es zeigte sich also kein signifikanter Unterschied zwischen der Größe der Stichkanalvolumina beider Aspirationsmethoden im Bereich des Femurknochens. Durch unterschiedliche anatomische Bedingungen, zum Beispiel einer dickeren Kompakta, waren die gemessenen Stichkanalvolumina im Bereich des Femurknochens deutlich höher als im Bereich des Beckenknochens. OnControl Aspiration System Becken: $\bar{x}= 13,72 \pm 3,06$ Voxel; Femur: $28,62 \pm 27,86$ Voxel. A-MAX Becken: $\bar{x}= 15,12 \pm 6,77$ Voxel; Femur: $\bar{x}= 30,28 \pm 20,69$ Voxel.

3.6.2 Kollateraldefekte

Alle Stichkanäle im ersten postoperativen CT wurden auf das Vorliegen von Kollateraldefekten untersucht. In die Wertung ging das Durchdringen der gegenüberliegenden Kompakta (Abb. 43) ein. Defekte über die gegenüberliegende Kompakta hinaus (Abb. 42) wurden als einfacher Kollateraldefekt gewertet.



Abb. 41



Abb. 42

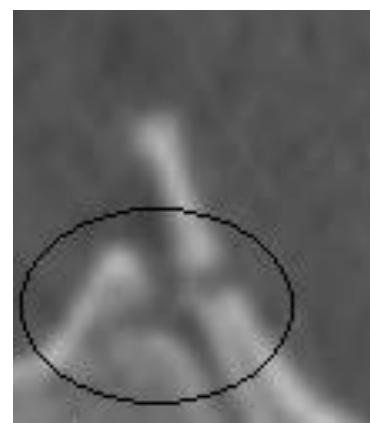


Abb. 43

Abb. 41 bis 43: Varianten der Stichkanalform. Abbildung 41 zeigt die korrekte Lage mit Beendigung des Kanals im Markraum. Die folgenden Abbildungen zeigen Varianten der Kollateraldefekte. Durchdringen der gegenüberliegenden Kompakta (Abb.42) und zusätzliches Eindringen in benachbarte Strukturen/Knochen (Abb.43).

Die CT-Bilder von sieben Schweinen zeigten für die Aspirationsmethode OnControl Aspiration System bei 27 von 59 Stichkanälen (45,8 %) Kollateraldefekte. Für die Aspirationsmethode A-MAX (Jamshidi-Hohlnadel) lagen bei 27 von 50 Stichkanälen (54%) Kollateraldefekte vor. (Abb. 44). Im statistischen Vergleich ergab sich eine Signifikanz von 0,394 auf einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$. Es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied für das Auftreten von Kollateraldefekten zwischen der konventionellen und der automatisierten Aspirationsmethode.

Im weiteren postoperativen Verlauf war die volumetrische Vermessung der Stichkanäle nicht mehr möglich, so dass die CT-Bilder nach 8 und 12 Wochen bildmorphologisch auf den Heilungsfortschritt der Knochendefekt untersucht wurden.

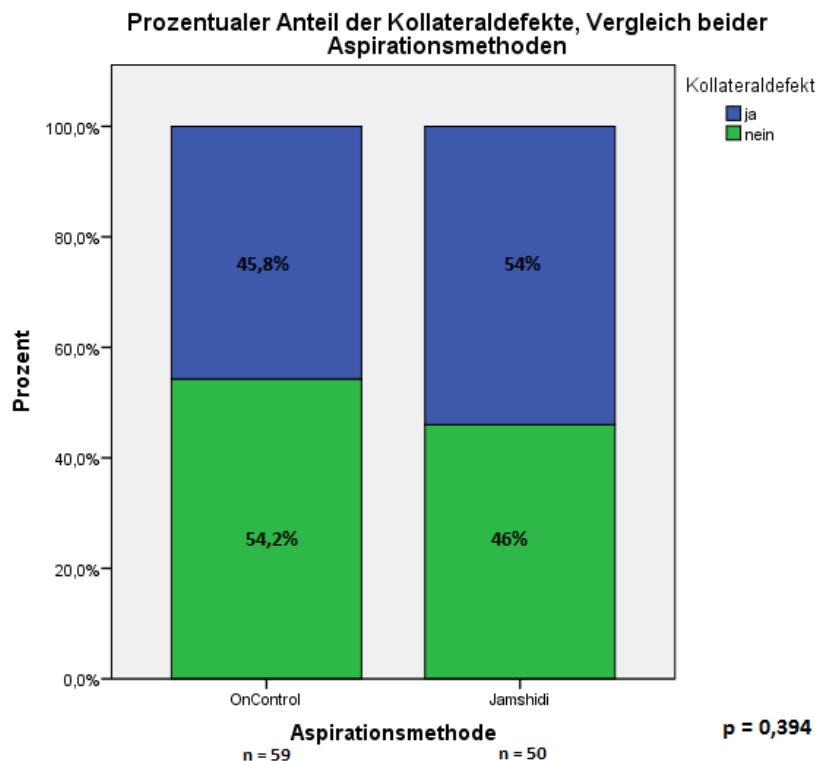


Abb. 44: Prozentualer Anteil der Stichkanäle mit Durchdringen der gegenüberliegenden Kompakta an der Gesamtanzahl der Stichkanäle. Für die Aspirationsmethode OnControl Aspiration System wurde in 27 von 59 Fällen (45,8%) ein Kollateraldefekt festgestellt. Für die Aspirationsmethode A-MAX in 27 von 50 Fällen (54%). In der Abbildung entspricht die Bezeichnung Jamshidi der A-MAX Aspirationsnadel.

3.6.3 Korrelation zwischen der Anzahl an Knochenmarkkonglomeraten und den Stichkanalvolumina

Bei jeder Aspirationsmethode entsteht ein Stichkanaldefekt im Bereich der Kompakta und des Markraums. Es galt zu untersuchen, ob die Anzahl der Knochenmarkkonglomerate pro Ausstrich, als leicht in der Mikroskopie zu erkennende Strukturen, mit der Größe des Stichkanalvolumens, als Maß des Knochendefektes, korrelierte. Es wurden 25 Wertepaare, entsprechend der Anzahl an Werten für das Stichkanalvolumen, auf einen statistischen Zusammenhang untersucht. Zwischen den beiden Parametern konnte kein statistischer Zusammenhang gezeigt werden. Eine große/niedrige Anzahl an Knochenmarkkonglomeraten im Ausstrich ging nicht mit einem hohen/geringen Knochendefektvolumen einher. Die Anzahl der Knochenmarkkonglomerate pro Ausstrich ist bei einem Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman von $r_s = 0,099$ nicht als Surrogatparameter für das Ausmaß des Knochendefektes zu verwenden (Abb. 45).

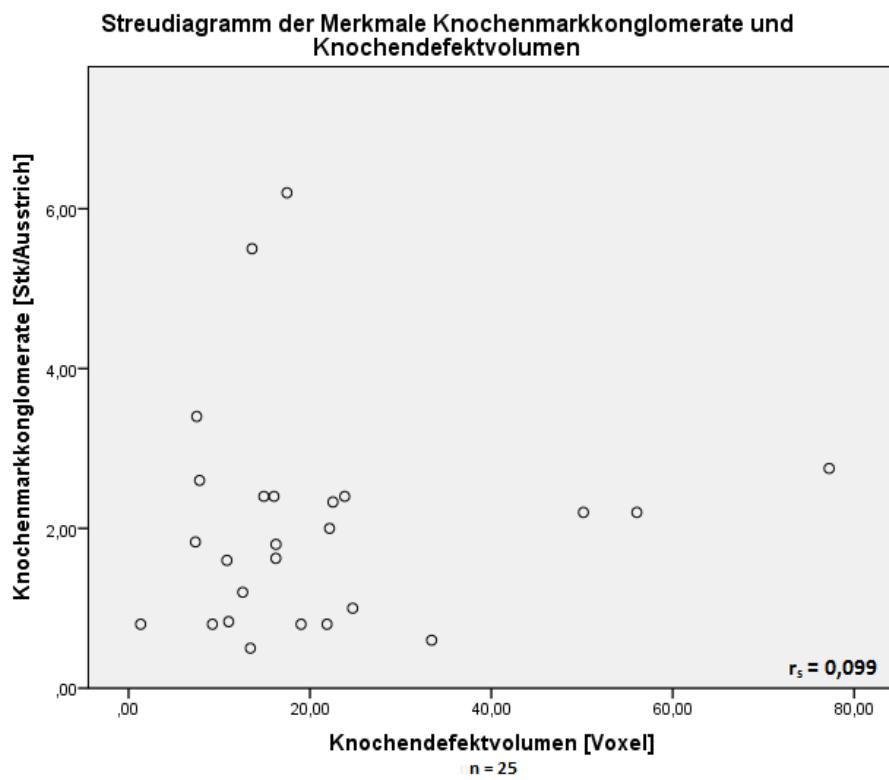


Abb. 45: Streudiagramm der Merkmale Knochenmarkkonglomerate und Stichkanalvolumen. Bei einem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman von 0,099 besteht kein statistischer Zusammenhang zwischen der Anzahl der Knochenmarkkonglomerate und der Volumina der Knochendefekte. n = 25

3.6.4 Computertomographische Auswertung der Knochendefektheilung im späteren postoperativen Verlauf

Zur Bewertung des Heilungsverlaufs der Stichkanaldefekte wurden Nativ-CT-Aufnahmen 8 und 12 Wochen nach der Knochenmarkaspiration angefertigt. Diese Aufnahmen wurden auf das Vorhandensein von sichtbaren Restdefekten und hyperdensen Arealen im Bereich der Stichkanäle untersucht. Das bildmorphologische Korrelat der Stichkanäle, im Sinne einer intraossären, länglichen Hypodensität, wurde als Restdefekt bezeichnet. Als hyperdense Areal wurde das Vorkommen von Zonen mit Abschwächung der Röntgenstrahlen durch einen erhöhten Mineralgehalt im, und/oder um den Bereich des Stichkanals gewertet.

Sichtbare Restdefekte, Vergleich beider Methoden, 8 und 12 Wochen postoperativ

In der bildmorphologischen Bewertung der Stichkanäle nach 8 Wochen zeigten sich für die Aspirationsmethode OnControl Aspiration System in 37 von 51 Fällen noch Restdefekte, das entsprach einer relativen Häufigkeit von 72,55%. Für die Methode A-MAX Aspirationsnadel waren in 36 von 42 Fällen, also bei 85,71% der Stichkanäle noch Restdefekte erkennbar.

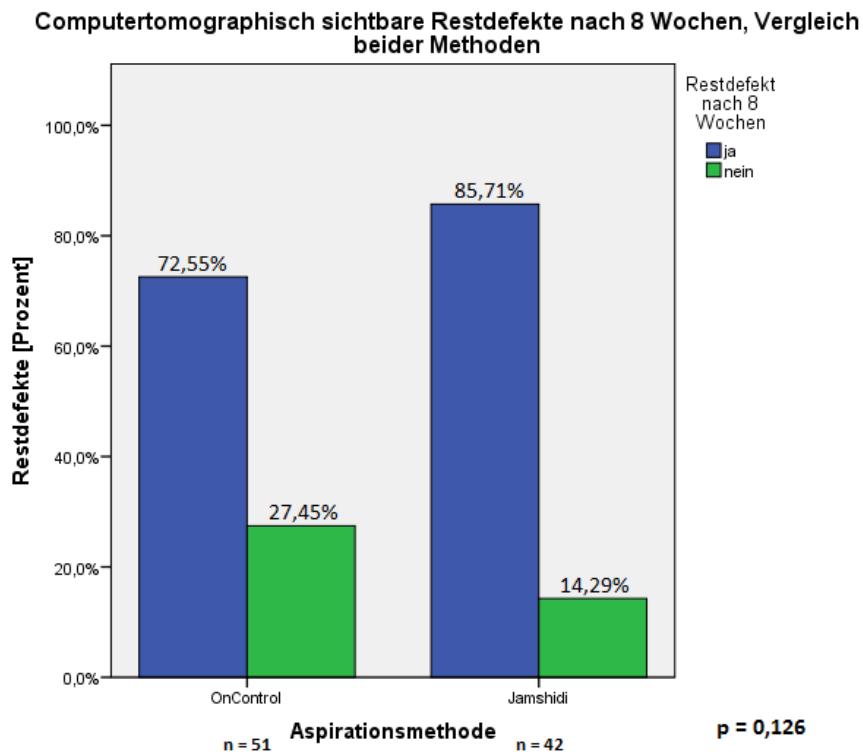


Abb. 46: Relative Häufigkeiten der bildmorphologisch sichtbaren Restdefekte nach acht postoperativen Wochen. In 72,55% der Fälle wurde für das OnControl Aspiration System ein Restdefekt im Bereich des Stichkanals festgestellt, für die A-MAX Aspirationsnadel in 85,71% der Fälle.
In der Abbildung entspricht die Bezeichnung Jamshidi der A-MAX Aspirationsnadel.

Es zeigte sich eine deutliche Tendenz, dass bei der konventionellen Methode A-MAX Aspirationsnadel häufiger eine Persistenz des sichtbaren Stichkanaldefekts nach acht postoperativen Wochen erkennbar war. Im statistischen Vergleich der Häufigkeiten ergab sich jedoch eine Signifikanz von $p= 0,126$ bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ (Abb. 46).

Nach 12 postoperativen Wochen waren für die Aspirationsmethode OnControl Aspiration System noch bei 54,90% (28 von 51) der Stichkanäle Restdefekte im CT erkennbar. Für die A-MAX Aspirationsnadel waren es noch 64,29% (27 von 42). Auch hier war eine deutliche Tendenz erkennbar, dass bei der konventionellen Aspirationsmethode A-MAX noch häufiger Restdefekte im Bereich der Stichkanäle bestanden. Im statistischen Vergleich der Häufigkeit der Restdefekte ergab sich jedoch eine Signifikanz von $p= 0,362$ bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ (Abb. 47).

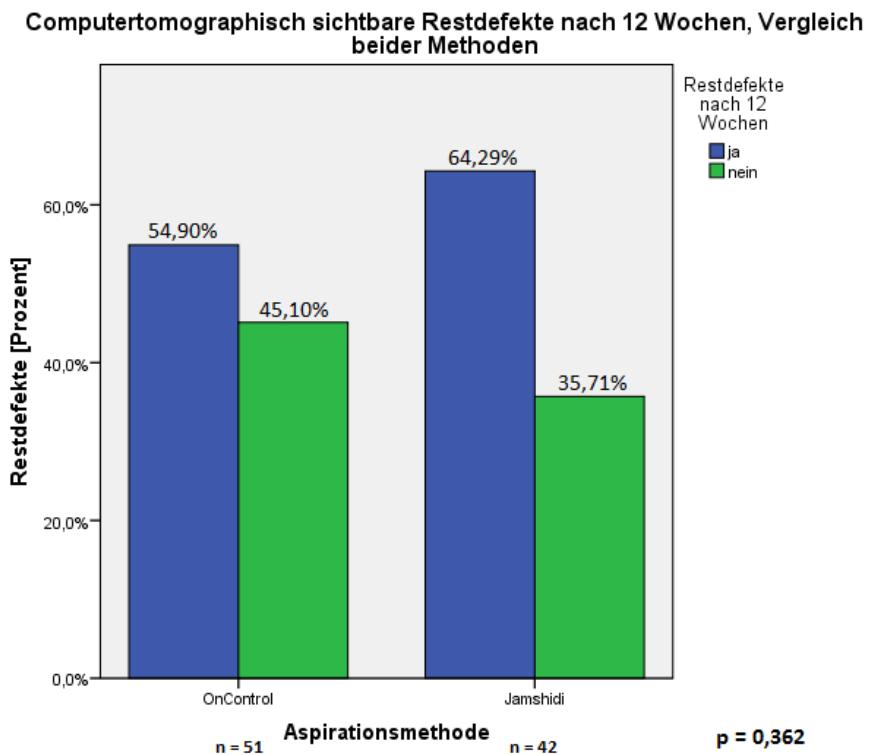


Abb. 47: Relative Häufigkeiten der bildmorphologisch sichtbaren Restdefekte nach zwölf postoperativen Wochen. In 54,90% der Fälle wurde für das OnControl Aspiration System ein Restdefekt im Bereich des Stichkanals festgestellt, für die A-MAX Aspirationsnadel in 64,29% der Fälle.
In der Abbildung entspricht die Bezeichnung Jamshidi der A-MAX Aspirationsnadel.

Sichtbare hyperdense Areale, Vergleich beider Methoden, 8 und 12 Wochen postoperativ

Für die Aspirationsmethode OnControl Aspiration System waren im CT nach acht postoperativen Wochen bei 88,24% der Stichkanäle (45 von 51) ausgeprägte hyperdense Areale erkennbar. Bei der konventionellen Methode A-MAX waren es 100% (42 von 42). Der statistische Vergleich zeigte eine signifikant höhere Anzahl an hyperdensen Arealen für die konventionelle Aspirationsmethode bei einer Signifikanz von $p= 0,022$ bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$. (Abb. 48)

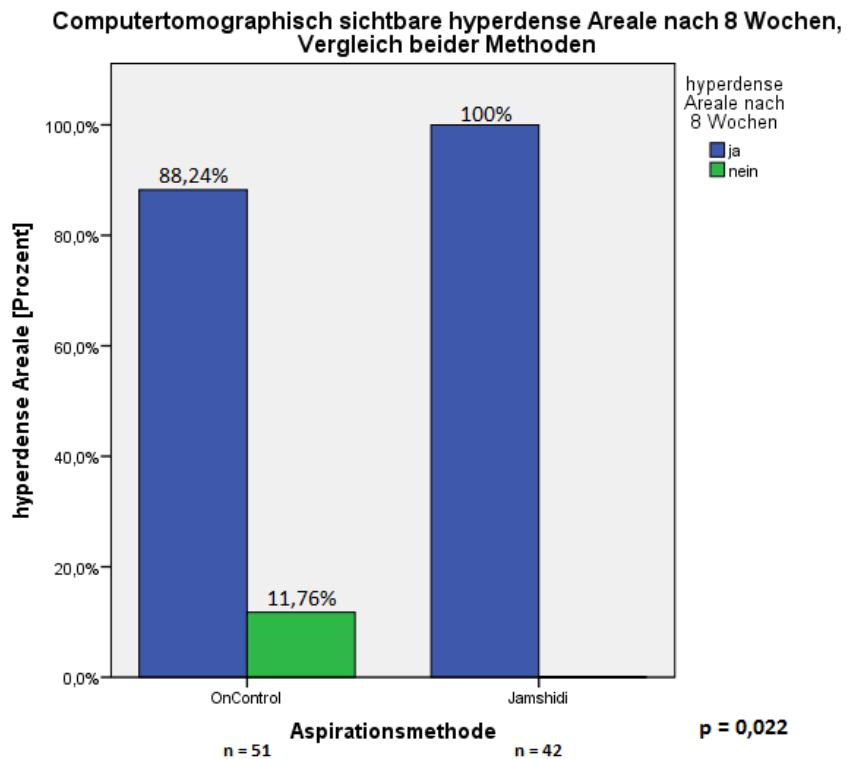


Abb. 48: Relative Häufigkeiten der bildmorphologisch sichtbaren hyperdensen Areale nach acht postoperativen Wochen. In 88,24% der Fälle wurde für das OnControl Aspiration System ein hyperdense Areal im Bereich des Stichkanals nachgewiesen, für die A-MAX Aspirationsnadel in 100% der Fälle.

In der Abbildung entspricht die Bezeichnung Jamshidi der A-MAX Aspirationsnadel.

Nach zwölf postoperativen Wochen waren in der bildmorphologischen Auswertung in 58,82% der Stichkanäle (30 von 51), nach Knochenmarkpunktion mit dem OnControl Aspiration System, sichtbare hyperdense Areale erkennbar. Für die konventionelle Methode A-MAX waren noch 73,81% der Stichkanäle (31 von 42) betroffen. Im statistischen Vergleich ergab sich eine Signifikanz von $p= 0,132$ bei einem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ (Abb. 49).

Tendenziell zeigte sich eine deutlich höhere Anzahl an hyperdensen Arealen, im Bereich der Stichkanäle nach 8 und 12 Wochen, bei Verwendung der konventionellen Aspirationsmethode A-MAX Aspirationsnadel.

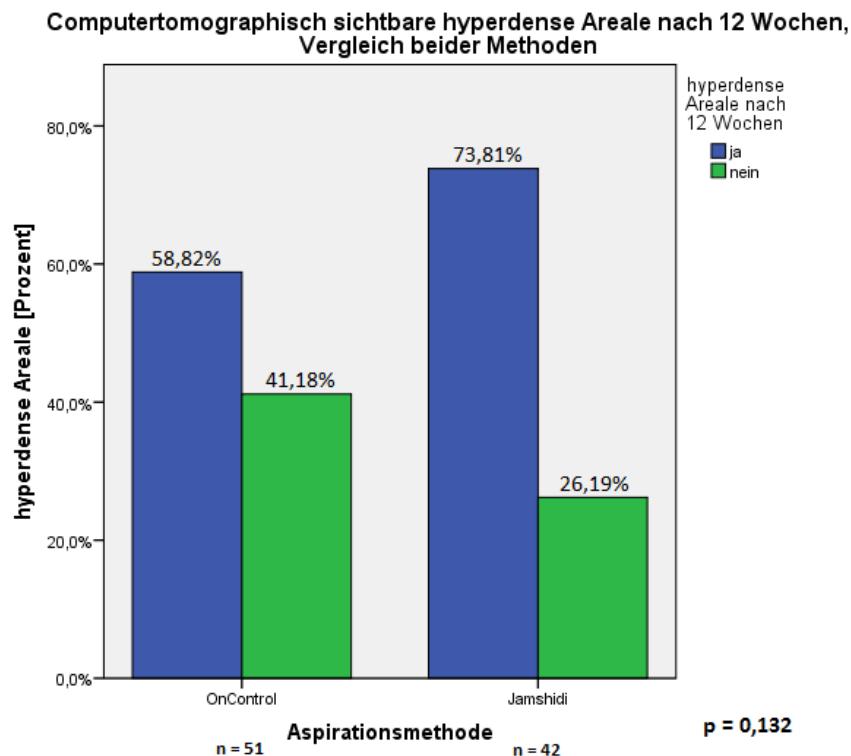


Abb. 49: Relative Häufigkeiten der bildmorphologisch sichtbaren hyperdensen Areale nach zwölf postoperativen Wochen. In 58,82% der Fälle wurde für das OnControl Aspiration System ein hyperdense Areal im Bereich des Stichkanals nachgewiesen, für die A-MAX Aspirationsnadel in 73,81% der Fälle.
In der Abbildung entspricht die Bezeichnung Jamshidi der A-MAX Aspirationsnadel.

3.7 Vergleich der Entnahmeorte

Dauer der Aspiration im Vergleich von Becken- und Femurknochen

Becken- und Femurknochen unterscheiden sich stark in ihrer Konfiguration. Während der Beckenknochen zu den platten Knochen gehört, ist der Femurknochen als Röhrenknochen zu klassifizieren. Es wurde untersucht, ob sich ein statistischer Unterschied zwischen der Aspirationsgeschwindigkeit von Knochenmark an den unterschiedlichen Knochentypen ergab. Da nur die reine Aspirationszeit unabhängig von der Anzahl der Aspirationsstellen gemessen wurde, ist der statistische Vergleich zwischen Femur- und Beckenknochen möglich. Die deskriptive Datenanalyse ergab für den Entnahmestandort Beckenknochen ein arithmetisches Mittel der Aspirationsdauer von $182,86 \pm 53,63$ Sekunden. Für den Entnahmestandort Femurknochen errechnete sich ein arithmetisches Mittel von $101,23 \pm 55,90$ Sekunden. Der statistische Vergleich der Werte zwischen Röhrenknochen (Femurknochen) und platten Knochen (Beckenknochen) ergab im t-Test einen p-Wert von 0,001, auf einem Signifikanzniveau von $\leq 0,05$. Entsprechend konnte die Nullhypothese verworfen werden.

Hinsichtlich der Aspirationsgeschwindigkeit zeigte sich die Aspirationszeit im Bereich des Femurknochens bis zum Erreichen eines Volumens von 10ml als signifikant kürzer als im Bereich des Beckenknochens (Abb. 50).

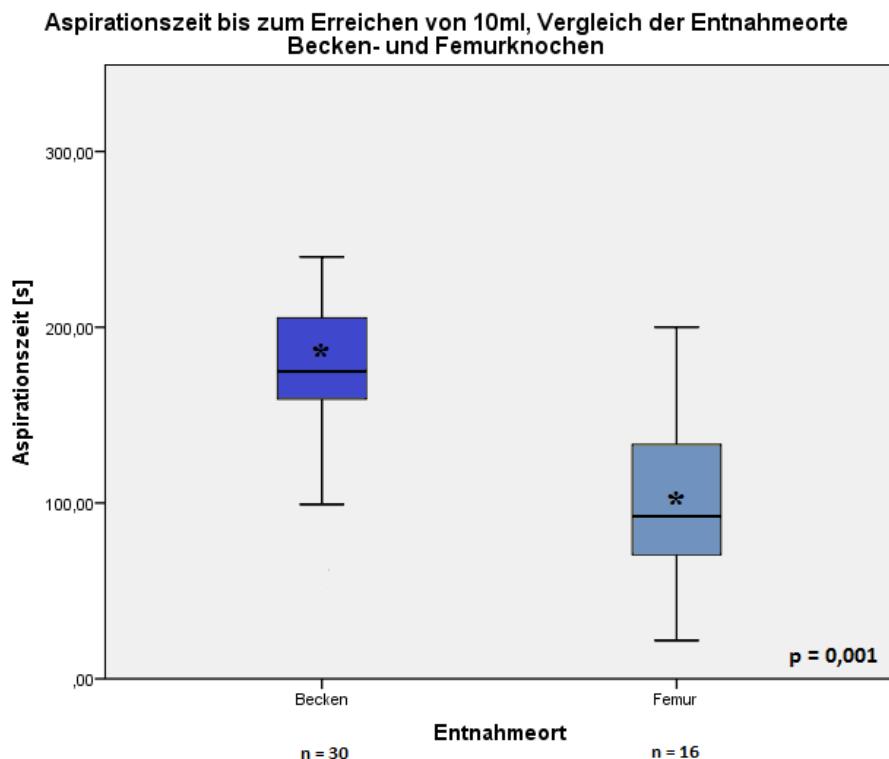


Abb. 50: Boxplot der benötigten Aspirationszeit bis zum Erreichen eines Mindestaspirationsvolumens von zehn Millilitern, Vergleich der Entnahmestellen Becken- und Femurknochen. Mittelwerte mit * markiert.

Beckenknochen: $n=30$, $\bar{X}=182,86 \pm 53,63$ Sekunden, Varianz = 2876,57;

Femurknochen: $n=16$, $\bar{X}=101,23 \pm 55,90$ Sekunden, Varianz = 3124,49

(In der Graphik wurden Extremwerte zur besseren Darstellung der Ergebnisse zensiert)

Vergleich der Zellausbeute von Becken- und Femurknochen

Vorherige Studien haben gezeigt, dass die Zellausbeute an MSC bei der Verwendung mehrerer Aspirationsstellen und somit mehrerer kleiner Knochenmarkvolumina signifikant höher ist, als bei einer einzelnen Knochenmarkaspiration und großen Aspirationsvolumina. In diesem Kapitel soll die Annahme geprüft werden, dass sich die Primärkulturdichten zwischen Becken- und Femurknochen signifikant unterscheiden. Der Versuchsaufbau wurde entsprechend gewählt. Im Bereich des Beckens wurde an drei Stellen jeweils eine geringere Menge an Knochenmark aspiriert, bis insgesamt ein Volumen von mindestens 10 ml erreicht wurde. Am Femurknochen wurde nur eine Knochenmarkpunktion vorgenommen und solange aspiriert, bis ein Mindestvolumen von 10 ml erreicht war.

Deskriptiv ergab sich für die Entnahmestelle Beckenknochen ein arithmetisches Mittel von $1,01 \pm 1,20$ Millionen Zellen und für den Femurknochen $0,50 \pm 0,60$ Millionen Zellen. Im statistischen Vergleich der Aspirationsstellen ergab sich eine Signifikanz von $p = 0,007$ auf dem Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$. Damit zeigte die Aspiration von drei kleineren Mengen aus drei unterschiedlichen Aspirationsstellen eine signifikant höhere Zellausbeute in der Primärkultur (Abb. 51).

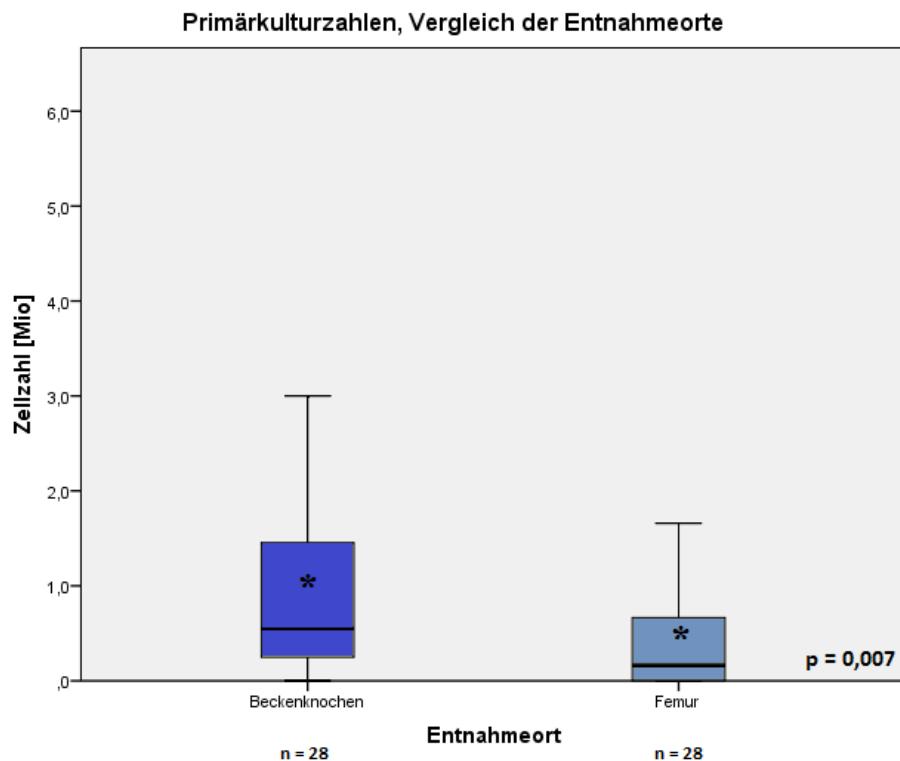


Abb. 51: Boxplot der Zellzahlen aus der Primärkultur. Im Vergleich werden die beiden Entnahmestorte Beckenknochen und Femurknochen dargestellt. Mittelwerte mit * markiert. (In der Graphik wurden Extremwerte zur besseren Darstellung der Ergebnisse zensiert)

Beckenknochen: $n=28$, $\bar{X} = 1,01 \pm 1,20$ Millionen Zellen, Varianz = 1,42

Femurknochen: $n=28$, $\bar{X} = 0,50 \pm 0,60$ Millionen Zellen, Varianz = 0,35

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Knochenmarkaspirationsmethoden hinsichtlich ihrer Anwendungsdauer, Effizienz im Rahmen des TE und Morbidität der Entnahmestelle unter standardisierten und reproduzierbaren Bedingungen untersucht. Als konventionelle Methode diente die A-MAX Aspirationsnadel (HVM Medical; Jamshidi-Hohlnadel), als automatisierte Methode diente das OnControl Aspiration System (Vidacare). Zur Klärung der Fragestellung wurden in einem Tierversuchsmodell an 15 Göttinger Minischweinen Knochenmarkaspirationen durchgeführt und die Dauer des Prozedere (Nadelinsertion) und Geschwindigkeit einer ausreichenden Probengewinnung ($\geq 10\text{ml}$) gemessen sowie die postoperativen Wundverhältnisse und Schmerzen beobachtet. Darüber hinaus erfolgte die Messung der Zellausbeute an MSC nach Expansion in Zellkultur und die computertomographische Vermessung des Knochendefektes mit bildanalytischer Verlaufskontrolle der Knochendefektheilung.

Gezeigt werden konnte, dass mit der automatisierten Knochenmarkaspirationsmethode eine signifikant kürzere Insertionszeit erreicht und die Anzahl an Kollateralschäden verringert werden konnte. Des Weiteren konnte ein Unterschied in der postoperativen Knochenheilung zugunsten der automatisierten Methode gezeigt werden. Die Untersuchungen der Ausbeute an MSC in der Primärkultur aus Knochenmark zeigten keinen signifikanten Unterschied. Innerhalb der Methoden konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den Entnahmestellen Becken- und Femurknochen gezeigt werden.

Im Rahmen der folgenden Diskussion sollen das Versuchsmodell und die erzielten Ergebnisse vor dem Hintergrund der bestehenden Literatur geprüft werden.

4.1 Tiermodell

Als Kriterien für die Auswahl einer bestimmten Tierart als Modell sollten signifikante Parallelen in Physiologie und Pathophysiologie bestehen (Reichert et al. 2009). Die Wahl des Göttinger Minischweins als Versuchstier für diese Studie erfolgte aufgrund der Ähnlichkeit der mechanischen Eigenschaften und der Physiologie des porcinen Knochens hinsichtlich Mineraldichte, Knochenanatomie, Morphologie und Heilung zum menschlichen Knochen (Hall 2011, Thorwarth et al. 2005, Aerssens et al. 1998, Mosekilde et al. 1987, Mosekilde et al. 1993). Allerdings besitzt der porcine Knochen ein dichteres trabekuläres Netzwerk bei

ähnlicher lamellärer Struktur der Kortikalis (Mosekilde et al. 1987, Mosekilde et al. 1993). Durch die Ähnlichkeit zwischen porcinen und humanen MSC ist das Schwein ein besonders nützliches Tiermodellsystem für Studien des TE, die auf mesenchymalen Stammzellen beruhen (Ringe et al. 2002). Göttinger Minischweine weisen einen ähnlichen Metabolismus von Medikamenten wie Menschen auf, da sie omnivor und monogastrisch sind. Durch ihre Skelettkonfiguration und Größe ist das Minischwein als gutes Vergleichsmodell zum Menschen anzusehen. Trotz aller Ähnlichkeiten, muss mit Nachdruck darauf hingewiesen werden, dass die Übertragung der Ergebnisse jeglicher Versuchstiermodelle auf den humanen Organismus nicht uneingeschränkt möglich ist. Prämedikation, Narkose und Analgesie der Göttinger Minischweine erfolgte nach denen von Alstrup 2010 publizierten Vorgaben zur Anaesthesia und Analgesie von Göttinger Minischweinen (Alstrup 2010). Durch die einzeitige Anwendung beider Aspirationsmethoden an einem Minischwein konnten die Versuche zügig und ohne lange Narkosedauer durchgeführt werden.

4.2 Knochenmarkaspiration, Dauer des Prozedere bis zur Aspiration und Aspirationsdauer

Um die Belastung der Tiere durch wiederholte Narkosen zu minimieren wurden beide Aspirationsmethoden einzeitig an den Versuchstieren angewendet. Methodisch wurde die Aspiration von Knochenmark aus dem Becken- und Hüftknochen an jeweils vier, zuvor markierten und standardisierten, Entnahmestellen geplant. An der linken Körperhälfte des Tieres wurde die konventionelle Aspirationsmethode verwendet und an der rechten Körperhälfte die automatisierte. Zur Reduktion von Störfaktoren wurden beide Aspirationstechniken und alle Eingriffe vom selben Operateur durchgeführt. Der Operateur hatte Erfahrung in der Anwendung beider Methoden. War die Aspiration an einer Punktionsstelle nicht möglich, wurde die Nadellage (Eindringtiefe) korrigiert oder gegebenenfalls an einer direkt benachbarten Stelle erneut punktiert. Gemessen wurde die Insertionsdauer der Nadel, das entsprach der Zeit vom Ansetzen der Nadel am Knochen, bis zum Erreichen des Markraums und die reine Aspirationszeit bis zum Erreichen von 10 ml Aspirationsvolumen.

Frühere Studien an hämatologischen Patienten von Berenson et al. und Swords et al. zeigten eine signifikant kürzere Dauer des Biopsieprozedere für das automatisierte System OnControl Aspiration System im Vergleich zu konventionellen Aspirationsmethoden. Berenson et al. untersuchte die Dauer vom Kontakt der Nadel mit der Haut, bis zur Entfernung der Nadel aus dem Knochen, Swords et al. bis zur Platzierung des Bioptats in einer Formalinlösung

(Berenson et al. 2011, Swords et al. 2011). In dieser Studie wurde die Zeitmessung geteilt in erstens: Insertionszeit (Dauer des Prozedere vom Ansetzen der Nadel am Knochen bis zum Erreichen des Markraums, bzw. bis der Operateur dachte, den Markraum erreicht zu haben) und zweitens: Dauer der Probengewinnung (ab dem ersten Erscheinen von Knochenmark in der Spritze bis zum Erreichen von 10 ml Aspirationsvolumen). Die als Cutoff gewählten 10 ml Knochenmark entsprachen der Mindestmenge an Knochenmark, gemäß des verwendeten Protokolls, für die weitere Aufbereitung und Kultur von MSC. Die Zeit zum Durchdringen von Haut und Weichgewebe wurde in der Datenerhebung nicht berücksichtigt, da Göttinger Minischweine eine dicke und feste Haut besitzen, die eine vorherige Stichinzision erforderlich machte auch um eine Kontamination der Nadel mit Hautkeimen zu vermeiden. Es konnte gezeigt werden, dass die Nadelinsertionszeit mit der Methode OnControl Aspiration System (OC) signifikant kürzer war, als mit der konventionellen Aspirationsnadel A-MAX (OC: $4,33 \pm 1,65$ Sekunden, A-MAX (Jamshidi) $11,73 \pm 7,70$ Sekunden, $p= 0,001$). Die Ergebnisse der Untersuchung waren vergleichbar mit einer früheren Studie der Gruppe Cohen et al. von 2008, in der für die Methode OnControl Aspiration System eine Insertionszeit von $4,9 \pm 3,0$ Sekunden beschrieben wurde. Maßgeblich war die Zeit vom Ansetzen des Gerätes an der Haut bis zu dem Zeitpunkt, an dem der Anwender der Meinung war, dass der intraossäre Raum erreicht wäre (Cohen und Gore 2008). Vergleichbare Werte für Insertionszeiten der Jamshidi-Hohlnadel werden in der Literatur nicht beschrieben. Als ursächlich für die signifikante Verkürzung der Nadelinsertionszeit der automatisierten Methode lässt sich der geringere Aufwand an Druck und Körperkraft durch die batteriebetriebene Nadelrotation vermuten. Für die Messungen der reinen Aspirationszeit, bis zu einem Knochenmarkvolumen von 10 ml, ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Methoden. Beide Aspirationsmethoden wurden aufgrund der anatomischen Unterschiede getrennt nach Becken- und Femurknochen untersucht. Für das Becken ergaben sich kaum Unterschiede in der Aspirationszeit (OC $182,40 \pm 64,09$ Sekunden, A-MAX $183,32 \pm 43,03$ Sekunden, $p= 0,967$). Im Bereich des Femurknochens ergaben sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede (OC $100,34 \pm 57,59$ Sekunden, A-MAX $102,38 \pm 58,19$ Sekunden, $p= 0,378$). Der unterschiedlich gestaltete Nadelschliff scheint keinen Einfluss auf die Aspirationsgeschwindigkeit zu haben (Abb. 53 und 54). Die Daten von Insertionszeit und Aspirationsdauer ergeben zusammenfassend, dass das von Berenson und Bucher als zeitlich signifikant kürzere Gesamtprozedere durch den Zeitgewinn beim Durchdringen der Kompakta zustande kommen könnte. Da die Probengewinnung separat berücksichtigt wurde und der Prozess der Nadelinsertion sich zwischen Aspiration und Biopsie nicht unterscheidet, können

die Daten mit dieser Studie verglichen werden, obgleich die oben genannten Studien Daten zur Knochenmarkbiopsie beinhalten.

Interessanterweise zeichnete sich unabhängig von der Aspirationsmethode ein Unterschied in den erhobenen Zeiten der reinen Aspirationsdauer zwischen Becken- und Femurknochen ab. Es konnte eine signifikant kürzere Aspirationszeit im Bereich des Femurknochens gezeigt werden. (Becken $182,86 \pm 53,63$ Sekunden, Femur $101,23 \pm 55,90$ Sekunden, $p= 0,001$). Dieser Unterschied kommt wahrscheinlich durch die anatomischen Unterschiede der platten Knochen und Röhrenknochen zustande. Eine reduzierte Aspirationsgeschwindigkeit könnte aus einer Fehllage der Aspirationsnadel, zum Beispiel partielles Stecken in der gegenüberliegenden Kompakta und damit Verlegen der Aspirationsoberfläche, resultieren. Durch den viel schmäleren Markraum im Bereich des Beckens ist eine derartige Fehllage wahrscheinlicher. Eine schnellere Aspirationszeit könnte aus einem höheren Anteil an Blut aus den Marksinus resultieren, die bei der Aspiration verletzt werden und in einer Reduktion der Zellausbeute in der Primärkultur durch Verdünnung des Knochenmarks resultieren könnten (Muschler et al. 1997, Riley et al. 2004). „Bei Erwachsenen wird Knochenmark üblicherweise aus dem Beckenknochen entnommen und [...] bei Kindern (< zwei Jahren) aus der Tibia“ (Cohen und Gore 2008). Eine Knochenmarkaspiration aus dem Femur wird beim Menschen nicht praktiziert. Interessant sind die Daten aber in Anbetracht weiterführender Versuche an Tiermodellen, die einer schnellen und effizienten Zellgewinnung aus dem Knochenmark bedürfen. Die Knochenmarkentnahme aus der Tibia bei Göttinger Minischweinen wurde als Pilotversuch durchgeführt und zeigt sich aufgrund erheblicher postoperativer Mobilitätseinschränkungen und Schmerzen der Versuchstiere als nicht anwendbar. Kuball et al. und Vanhelleputte et al. berichten in ihren Studien 2004 und 2003 über die positive Korrelation zwischen Schmerzintensität und der Dauer der Knochenmarkpunktion/-aspiration (Kuball et al. 2004, Vanhelleputte et al. 2003). Die Minimierung des Schmerzes ist besonders hilfreich bei multimorbid Patienten und solchen, deren Schmerzschwelle durch Krankheitszustände abgesenkt ist, aber natürlich ist die Reduktion von Schmerzen für jeden Patienten erstrebenswert (Voigt und Mosier 2013). Eine möglichst kurze Dauer der Aspiration ist also anzustreben und kann durch die Anwendung der automatisierten Methode OnControl Aspiration System mit einer signifikant kürzeren Insertionsdauer erreicht werden.

Für die konventionelle Methode wurde der Verbrauch von zwei Nadeln pro Tier, eine für das Becken und eine für den Femur, eingeplant. Häufiger waren nach der ersten Punktions-

Beschädigungen der Nadelspitze, beziehungsweise Verformungen der gesamten Nadel am Widerstand der Kompakta zu beobachten, woraus ein erhöhter Nadelverbrauch resultierte (Abb. 52 und 53). Vor allem bei Punktionsversuchen im Bereich des Femurknochens wurde eine Beschädigung der konventionellen Nadel beobachtet. Ursächlich dafür war eine dickere/härtere Kompakta und häufigeres Abrutschen von der Knochenoberfläche bei stärkerer Oberflächenkrümmung des Femurkochens.



Abb. 52



Abb. 53



Abb. 54

Abb. 52 bis 54: Verbogene A-Max Aspirationsnadel (Abb.52); Detailansicht der verbogenen Nadel mit umgebogener Nadelspitze (Abb.53); Detailansicht der Nadelspitze des OnControl Aspiration System.(Abb.54)

Mit der automatisierten Methode konnten alle Punktions pro Tier problemlos mit der im Nadelset enthaltenen Nadel durchgeführt werden. Eine Verbiegung der Nadel oder des Nadelanschliffs wurde in keinem Fall beobachtet. Beim OnControl Aspiration System wird der Nadelanschiff durch den überstehenden Mandrin vor Verbiegen geschützt (Abb. 54).

Mögliche Fehlerquellen in der Datenerhebung waren unter anderem die interindividuellen konstitutionellen Unterschiede der Versuchstiere. Dieser Fakt wurde durch die Vereinheitlichung des Versuchstierkollektivs hinsichtlich Alter und Geschlecht reduziert. Alle Versuchstiere waren ca. 2 Jahre alt (zwischen 23 und 26 Monate) und weiblich. Sicherlich ist und bleibt der größte Unsicherheitsfaktor bei allen experimentellen, operativen Studien der Anwender/Operateur. Eine Verblindung des Experimentes für Operateur und in Bezug auf die Datenerhebung war in Anbetracht der Versuchsdesigns nicht möglich, was eine gewisse Voreinnahme und Erwartungshaltung an die untersuchten Produkte nicht ausschließen lässt.

Komplikationen von Knochenmarkpunktionen wie Blutungen, Transfusionspflichtigkeit oder Todesfälle, konnten für keine der beiden Methoden beobachtet werden. Diese, in der Literatur beschriebenen Komplikationen, sind allerdings häufig assoziiert mit myeloproliferativen

Erkrankungen, Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern oder Antikoagulanzen (Bain 2003). Die Entnahme eines Knochentransplantats hat deutlich mehr Komplikationen als die perkutane Knochenmarksaspiration (Hernigou et al. 2014). Die Komplexität der Anatomie des Beckens kann allerdings nicht verhindern, dass alle Komplikationen, auch bei Verwendung einer feinen Nadel, verhindert werden. Hernigou et al. publizierten 2014 die ‚Sektor-Regel‘, wobei der Beckenkamm in 6 Sektoren unterteilt und die jeweiligen Sektoren in Relation zu benachbarten Gefäßen und Nerven gesetzt wurden. Auch unter Berücksichtigung der ‚sicheren‘ Sektoren konnten Komplikationen wie Gefäß- oder Nervenverletzungen (A. iliaca externa, A. glutea superior, N. ischiadicus) nicht vollständig verhindert werden (Hernigou et al. 2014). Die Häufigkeit von Blutungskomplikationen kann allerdings durch eine gewissenhafte Vorbereitung mit Ausschluss sämtlicher Blutungsrisikofaktoren und Anwendung des Sektor-Regel zur Reduktion von Gefäßverletzungen und Kontrolle der Nadeleindringtiefe verringert werden (Bain 2003, Hernigou et al. 2014).

4.3 Häufigkeit unterschiedlicher Aspirationsvolumina

In den bisher existenten Vergleichsstudien wurde als gewonnene Probe nur die Knochenmarkbiopsie berücksichtigt, wobei die Länge der Knochenmarkbiopsieprobe als allgemein akzeptierter Surrogatparameter für die Qualität der Knochenmarkbiopsie angesehen wird (Reed et al. 2011). Swords, Berenson, Miller und Reed berichteten von signifikant längeren Knochenmarkbioptaten mit der Methode OnControl Aspiration System (Berenson et al. 2011, Swords et al. 2011, Reed et al. 2011, Miller et al. 2011). Dagegen berichteten Bucher et al. über keinen Unterschied in Länge und Qualität der Knochenmarkstanzen (Bucher et al. 2012). In dieser Studie wurden beide Punktionsnadeln allein für die Gewinnung von Knochenmarkaspiraten verwendet und verglichen. Als primärer Endpunkt wurde das Erreichen eines Knochenmarkvolumens von 10 ml gewählt. Im Bereich des Beckenknochens konnten für beide Methoden in jedem Fall ein Volumen von größer gleich 10 ml gewonnen werden. Im Bereich des Femurknochens konnte mit der Methode OnControl Aspiration System in 60% der Fälle ein Aspirationsvolumen von 10 ml erreicht werden. Mit der Methode A-MAX (Jamshidi) in 46,67%. Mit der konventionellen Methode konnte in 26,67% initial kein Knochenmark gewonnen werden. Es ergab sich statistisch kein signifikanter Unterschied, doch ist das Ergebnis von praktischer Bedeutung. Eine erfolglose Punktionsnadel bedeutet eine erneute Punktionsnadel mit zusätzlichen Schmerzen, zusätzlichen Wundflächen und

Knochentraumata, so wie eine höhere Belastung des Patienten durch Verlängerung des Eingriffs.

4.4 Follow up

Berenson et al. verglich 2011 in einer multizentrischen randomisierten Studie an 102 Patienten die Methoden OnControl und Jamshidi, in der mittels visueller Analogskala die empfundene Schmerzintensität ermittelt wurde. Hinsichtlich der Schmerzintensität des Eingriffs waren beide Methoden als gleichwertig zu betrachten. Allerdings waren am ersten Tag signifikant mehr Patienten schmerzfrei, die mit der Methode OnControl behandelt wurden. Nach sieben Tagen hatten sich die Ergebnisse der Schmerzmessung angeglichen (Berenson et al. 2011). Die Gleichwertigkeit der Schmerzintensität beider Verfahren konnte von Bucher et al. 2012 bestätigt werden (Schmerzintensität nach 15 Minuten und nach 3 bis 5 Tagen) (Bucher et al. 2012).

In dieser Studie wurde der Versuch unternommen, anhand der postoperativen Beobachtung der Versuchstiere eine Beurteilung der Schmerzintensität durchzuführen. Die Erhebung eines Schmerzniveaus bei Versuchstieren ist ohne Frage eine große Herausforderung. Es existiert kein objektives Instrument zur Bewertung der Schmerzen beim Göttinger Minischwein, daher wurden die Tiere postoperativ genau auf Verhaltensänderungen wie vermindertes Interesse an der Umgebung, verringerte Aktivität oder Nahrungsverweigerung untersucht (Alstrup 2010). Aus ethischen Gründen erhielten alle Versuchstiere eine Basisanalgesie, so dass nur eine insuffiziente Analgesie beurteilt werden konnte. Die postoperative Nachbeobachtung erfolgte am Tag des Eingriffs und an sechs folgenden Tagen. Bei zeitgleicher Anwendung beider Aspirationsmethoden an einem Tier, konnte eine separate Beurteilung der Methoden/Körperhälften bezüglich postoperativer Schmerzen und Bewegungseinschränkungen der Hinterläufe nicht realisiert werden. Im postoperativen Verlauf waren bei keinem der Versuchstiere Schmerzäußerungen (s.o.) zu beobachten und eine Steigerung der Dosis war nicht notwendig. Bereits einen Tag nach dem Eingriff waren alle Tiere frei von Bewegungseinschränkungen der Hinterläufe. Die postoperativen Wundverhältnisse zeigten nur geringe Unterschiede, es traten keine Wundinfektionen auf. Geringfügige Unterschiede stellten keine Abweichung vom physiologischen Heilungsprozess dar und sind auf interindividuelle Unterschiede der Versuchstiere zurückzuführen. Ihrer Natur gemäß schubbern sich Minischweine bei Irritationen an der Haut, was zu Störungen des Wundheilungsverlaufs führen kann. Eine ausreichende Abdeckung mit Schmerzmitteln

verhindert eine merkliche Irritation im Bereich der Wundfläche für die Schweine. Um Durchspießungen der Haut und Irritationen nach Absetzen der Analgesie zu verhindern, wurde auf chirurgisches Nahtmaterial verzichtet. Die Beobachtungen erlauben aufgrund des Versuchsaufbaus keinen Vergleich der Methoden, lassen aber den Schluss zu, dass die Knochenmarkaspiration einen komplikationsarmen (0,08 %) und wenig belastenden Eingriff darstellt (Bain 2003).

4.5 Knochenmarkausstriche, mikroskopische Auswertung

Durch die langsame Aspiration von Knochenmark, gewinnt man eine Mischung aus Knochenmarkblut und Bröckeln (Kühn et al. 1989). Als sogenannte ‚Knochenmarkbröckel‘ werden kleine Fragmente aus Spongiosabälkchen und Knochenmarkzellen bezeichnet, die bei der Knochenmarkaspiration im Aspirat gefunden werden können und knochenmarkspezifische Zellen beherbergen. Sie werden in der Diagnostik verwendet um durch Beimischung peripheren Blutes auftretende Fehlerquellen zu vermeiden (Heilmeyer und Begemann 1955). Ausstreichen, panoptische Färbung und Mikroskopie erwiesen sich als einfache und geeignete Methode zum Nachweis von Knochenmarkbröckeln. Fraglich war, ob Unterschiede in der Anzahl der Knochenmarkbröckel zwischen den Methoden bestanden und ob es einen statistischen Zusammenhang mit der Zellausbeute an MSC gab, da an den Spongiosafragmenten besonders viele knochenmarktypische Zellen haften. Der Vergleich beider Aspirationsmethoden hinsichtlich der Anzahl an Markbröckeln pro Ausstrich ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied (OnControl Aspiration System $2,07 \pm 1,5$ Stück pro Ausstrich und A-MAX (Jamshidi) $2,30 \pm 1,30$ Stück pro Ausstrich, $p= 0,79$). Gemäß der Frage nach der Relevanz der Anzahl der Markbröckel pro Ausstrich als Surrogatparameter für die spätere Ausbeute an Zellen in der Primärkultur, wurden die Ergebnisse aus Ausstrich und Zellkultur auf einen statistischen Zusammenhang untersucht. Es ergab sich keine Korrelation zwischen den beiden Parametern. Die Gewinnung von besonders vielen Knochenmarkbröckeln im Aspirat scheint keinen Einfluss auf die Anzahl der MSC im Aspirat und damit die spätere Zellausbeute in der Primärkultur zu haben. Da es sich bei Knochenmarkbröckeln um Fragmente der Spongiosa handelt, wurde zusätzlich untersucht, ob es einen statistischen Zusammenhang zwischen der Anzahl an Knochenmarkkonglomeraten pro Ausstrich und dem Kochendefektvolumen im CT gab. Es zeigte sich keine Korrelation der beiden Parameter. Eine mögliche Fehlerquelle bei der quantitativen Beurteilung der Knochenmarkbröckel stellte bei den ersten Ausstrichen die Existenz von starken Farbniederschlägen nach der Färbung der Knochenmarkausstriche dar. Dicke

Farbniederschläge imponierten stellenweise wie Knochenmarkbröckel, konnten aber bei starker Vergrößerung und gemäß der festgelegten Definition (mind. 5 knochenmarkspezifische Zellen) in der Regel gut differenziert werden. Eine weitere Fehlerquelle stellte die Ausstrichtechnik dar. Es durfte nur so viel Knochenmark auf den Objektträger aufgebracht werden, dass nach dem Ausstreichen eine Fahne entstand, sonst konnte es passieren, dass die Knochenmarkbröckel am Ende vom Objektträger gestrichen wurden. Es wäre auch möglich, dass Knochenmarkbröckel beim Ausstreichen am Deckgläschen kleben blieben und die Anzahl negativ beeinflussten. Die Anfertigung von Knochenmarkausstrichen und Begutachtung von Knochenmarkbröckeln hat seinen festen Stellenwert in der Diagnostik hämatologischer Erkrankungen, zeigte sich im Zusammenhang mit der Knochenmarkaspiration für geweberegenerative Zwecke aber als nicht hilfreich.

4.6 Zellkultur und Zellzählung

Da MSC nur in sehr geringem Maße im Knochenmark vorkommen, etwa 1 von 10^4 kernhaltigen Knochenmarkzellen, ist für therapeutische und experimentelle Anwendungen eine vorherige *in vitro* Expansion essentiell (Caplan 2009). Die Dichtegradientenzentrifugation hat sich als probates Mittel zur Isolierung von MSC aus dem Knochenmark erwiesen. Auch in dieser Versuchsreihe konnten in 91% der Fälle ausreichend plastikadhärente Zellen für die kulturelle Anzucht gewonnen und *in vitro* expandiert werden. Die verwendeten Knochenmarkproben wurden ausschließlich von Göttinger Minischweinen der Versuchsreihe entnommen. Pro Tier wurden vier Zellkulturen angelegt, jeweils zwei pro Aspirationsmethode, unterteilt nach den Entnahmestellen Becken- und Femurknochen. Die kultivierten Zellen dienten der späteren Besiedlung eines Scaffold (Gerüststruktur biologischer oder synthetischer Art, die mit Zellen zu einer 3D-Zellkultur kombiniert werden), die den Tieren im Rahmen einer anderen Versuchsreihe reimplantiert wurden. Zur Vermeidung späterer Abstoßungsreaktionen wurde auf die Verwendung des sonst gebräuchlichen Kälberserums im Nährmedium verzichtet und autologes Schweineserum verwendet. In Hinblick auf die potentielle spätere Anwendung am Menschen sollte auf Kälberserum wegen potentiellem Übertragungsrisiko von Viren oder Prionen generell verzichtet werden. Die Verwendung xenogenfreier Medien und Supplamente ist anzustreben (Fekete et al. 2012). In einer Arbeit von 2002 beschreibt Ringe et al., dass Kulturprotokolle für hMSC problemlos auf porcine MSC übertragen werden können. Die zellkulturellen Arbeiten waren in 50 von 55 Fällen erfolgreich, alle Zellen zeigten den für humane und porcine Stammzellen typischen „fibroblastenartigen Phänotyp“ (Ringe et al. 2002). Jedoch

zeigten die Zellen in Kultur teilweise ein unterschiedliches Proliferationsverhalten. Im statistischen Vergleich zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Zellausbeute (Becken OnControl Aspiration System: $1,27 \pm 1,54$ Millionen Zellen, A-MAX (Jamshidi): $0,74 \pm 0,65$ Millionen Zellen, $p= 0,196$; Femur OnControl Aspiration System: $0,36 \pm 0,43$ Millionen Zellen, A-MAX (Jamshidi): $0,53 \pm 0,72$ Millionen Zellen, $p= 0,534$). Allerdings zeigte der statistische Vergleich bei nichtnormalverteilten Werten eine Tendenz der Zellzahl zugunsten der Methode OnControl Aspiration System. Für einen aussagekräftigen Vergleich wäre gemäß Poweranalyse aber eine Tierzahl von mindestens 70 Tieren notwendig. Für beide Methoden konnten jedoch durchschnittlich zufriedenstellende Zellzahlen aus der Primärkultur gewonnen, passagiert und in Tochterkolonien subkultiviert werden. Mögliche Gründe für eine unterschiedliche Zellausbeute in Kultur könnte das Vorhandensein von Koageln in der Knochenmarkprobe darstellen. Interindividuelle (Alter) und konstitutionelle Unterschiede wurden durch die Vereinheitlichung des Versuchstierkollektivs minimiert (Li et al. 2014). Schädigung der Zellen beim Transport auf Eis oder eine unterschiedliche Sensibilität der Zellen gegenüber verwendeten Substanzen könnten eine Verlangsamung des Wachstums oder eine erhöhte Apoptoserate bedingen.

Die Gesamtzellausbeute der Primärkultur schien besonders von der Art und Anzahl der Entnahmestellen abhängig zu sein. Im Bereich des Beckenknochens wurde die Gesamtaspiratmenge aus drei unterschiedlichen Aspirationsstellen, im Bereich des Femurknochens aus einer Aspirationsstelle, gewonnen. Es konnte eine signifikant höhere Zellausbeute an MSC aus der Aspirationslokalisierung Becken gewonnen werden (Becken: $1,01 \pm 1,20$ Millionen Zellen und Femur: $0,50 \pm 0,60$ Millionen Zellen, $p= 0,007$). In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass die Aspiration kleiner Volumina von 1-4 ml die Verdünnung des Knochenmarks mit Blut verhindert (Hernigou et al. 2013, Muschler et al. 1997, Riley et al. 2004). In einer Studie von 2013 zeigte Hernigou et al., dass die Zahl an MSC in kleinen Aspirationsvolumina im Verhältnis größer ist, als in großen Aspirationsvolumina (Hernigou et al. 2013). Ursächlich hierfür scheint die Abnahme des Unterdrucks in der Spritze mit zunehmender Füllung und die Zunahme der Verdünnung mit Blut und peripheren Blutzellen zu sein. Die Geschwindigkeit, mit der diese Verdünnung auftritt, ist wahrscheinlich abhängig von der Rate der lokalen Durchblutung und der Anzahl und Größe der lokalen Gefäße und Knochenmarksinus (Muschler et al. 1997). Ursächlich für die signifikant höhere Zellausbeute im Bereich des Beckenknochens könnte also die Aspiration mehrerer kleiner Knochenmarkvolumina und damit geringere Blutverdünnung sein.

(Riley et al. 2004). Ein zusätzlicher Faktor könnte ein höherer Anteil an Gefäßen und eine höhere Blutflussrate im großlumigeren Femurknochen sein, der eine stärkere Verdünnung mit Blut verursacht haben könnte.

Die durchschnittliche Kulturdauer der Zellen in der Primärkultur betrug $12,91 \pm 2,39$ Tage, Median 14 Tage. Die expandierten Zellen wurden für einen anderen Tierversuch benötigt, so dass ein Abbruch der Primärkultur zu einem einheitlichen Zeitpunkt nicht möglich war. Die Passage erfolgte bei einer Konfluenz der Zellen von mindestens 33%, spätestens aber bei 80-90 %, um den Untergang der Zellen zu vermeiden.

Die Identifikation der Zellen als MSC erfolgte lichtmikroskopisch, durch das Kriterium der Plastikadhärenz und die typische Zellmorphologie. Die Zellen zeigten einen stabilen Phänotyp, wie von Pittenger beschrieben, ein typisches fibroblastenartiges, spindelförmiges Aussehen mit podozytenartigen Zellfortsätzen (Pitninger 1999). Die Plastikadhärenz entsprach einem der Kriterien zur Identifikation von hMSC, definiert durch das „Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee“ der „International Society for Cellular Therapy“. Eine Identifikation mittels spezieller Oberflächenmarker wurde nicht durchgeführt. Die osteogene oder chondrogene Differenzierung der Zellen wurde in einer weiteren Versuchsreihe des TE durchgeführt. Ein bekanntes Problem bei der Isolierung von MSC verschiedener Modellorganismen, wie Schweine, ist der Mangel geeigneter Arten-spezifischer Markermolekül (Ringe et al. 2002). Einzelne, für MSC typische Marker (CD44 und Vimentin), konnten in einem Tiermodell mit Schweinen zur Plastizität zirkulierender Stammzellen nachgewiesen werden (Willmer 2012). Unspezifische Marker wie CD29, CD44, CD90 und CD105, wurden auf humanen Knochenmarkstammzellen nachgewiesen (Lee et al. 2004). Abgesehen von der Zellausbeute in der Primärkultur stellt natürlich die Qualität der gewonnenen Zellen im weiteren Verlauf des TE, also der Differenzierung der Zellen und Besiedelung von Scaffolds und Bioreaktoren eine große Rolle. Diese Qualitäten wurden im Rahmen dieser Studie nicht untersucht, da die Weiterverarbeitung der gewonnenen Zellen in einer weiteren Studie untersucht wurde.

Zellzählung

Die Verdopplungszeit von hMSC liegt bei 33 Stunden und sie haben in vitro ein großes, aber stark variierendes Expansionspotential (Bruder et al. 1997, Phinney et al. 1999, Conget und Minguell 1999). Daten zum Vermehrungsverhalten porciner MSC sind leider nicht bekannt.

Die Zellausbeute von MSC aus der Primärkultur wurde über die Anzahl der plastikadhärenten Zellen in Kultur verglichen.

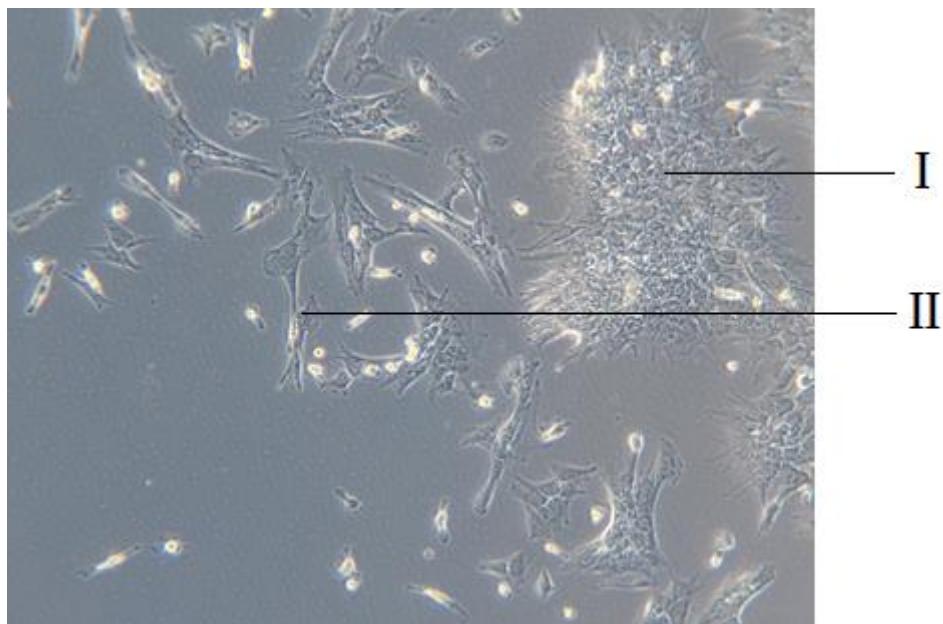


Abb. 55: Porcine plastikadhärente Zellen in der Primärkultur, mikroskopische Darstellung. Sie zeigen die typische fibroblastenartige Morphologie. Unterschiedliches Wachstumsverhalten der Zellen, einzeln (II) oder in Haufen (I)

Zur Vermeidung einer Verlangsamung der Zellteilungsrate durch Zellkontakthemmung erfolgte die erste Passage durchschnittlich nach $12,91 \pm 2,39$ Tagen. In die statistische Auswertung gingen Kulturdauern von neun bis sechzehn Tagen ein. Als Kriterium für eine optimale Kulturdauer vor der ersten Passage galt also kein einheitliches Intervall, sondern der prozentuale Anteil an konfluenten Zellen. Da die Zellen in der ersten Passage für die weitere Verwendung weiter expandiert werden mussten, war die Subkonfluenz der Zellen zwischen 33-80% das Kriterium für die Dauer der Expansion in der Primärkultur, um eine Wachstumshemmung der Zellen zu vermeiden. Des Weiteren sind die Zellzusammensetzung des Knochenmarks sowie die Besiedlungsdichte beim Ansetzen der Kultur sehr unterschiedlich, so dass identische Kultivierungsintervalle der Primärkultur nicht zu einer Verbesserung der Standardisierung, sondern ggfs. auch durch das inhomogene Wachstum der Zellen in Haufen und damit einer ungewollten Konfluenz der Zellen zu einer artifiziellen Homogenisierung der Zellproliferation führen. Zur Verbesserung der Standardisierung wurde die Betreuung der Primärkultur nicht durch den Operateur durchgeführt. Vor der Passage wurden die Zellen trypsinisiert und nach Färbung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Es ist sehr problematisch standardisierte Kulturbedingungen für Pirmärkulturen zu definieren, da die Kultivierung in hohem Maße von der Beschaffenheit der

Probe, hier zum Beispiel dem Anteil an Erythrozyten, hämatologischen oder mesenchymalen Stammzellen, abhängt. Auch die Anatomie des Versuchstieres sowie der psychisch und physische Gesundheitszustand der Versuchstiere beeinflussen die Zusammensetzung der Zellpopulationen maßgeblich (Gyöngyösi et al. 2008). Es ist jedoch möglich Erythrozyten zu lysieren und die mononukleäre Zellfraktion auszuzählen oder mittels Durchflusszytometrie weiter zu differenzieren, um eine Standardisierung des Ansatzes bzw. Daten zur Probe zu erhalten. Alle diese Verfahren belasten jedoch die Zellen und vor allem die Geschwindigkeit der Aufbereitung, so dass diese auf Grund der Weiterverwendung der Zellen nicht durchgeführt werden konnten. Auch ist unklar, ob die Anzahl der Zellen ein relevanter Qualitätsparameter für die Güte der letztlich transplantierten MSC darstellt. Alternative Methoden, wie die Messung der Proliferationsraten, Differenzierungsfähigkeit oder Sortierung nach Oberflächenmarkern können zusätzliche Informationen liefern, benötigen aber viele Zellen, die in diesem Versuch nicht zur Verfügung standen. So ist die Anzahl der MSC aus der Primärkultur in diesem Versuchsaufbau ein relevantes Kriterium, da diese letztlich nur durch eine größere Probe bestimmt ist. Eine Steigerung kann daher nur durch eine größere Probe und damit ein invasiveres Vorgehen erreicht werden.

Limitierende Faktoren der klinischen Anwendung mesenchymaler Stammzellen

Die Transplantation autologer adulter Stammzellen setzt die Entnahme aus einem kranken Körper voraus, doch ist es fraglich, wie viele adulte Stammzellen einem kranken Körper entnommen werden können. Beim Vorliegen genetischer Erkrankungen würden auch Zellen mit schädlichen Mutationen transplantiert (Schöler 2004). Die für Embryonale Stammzellen spezifische Gefahr der Entartung zu Teratokarzinomen besteht bei adulten Stammzellen nicht (Oduncu et al. 2002).

4.7 Computertomographische Vermessung von postoperativen Knochendefekten

Als weiteres Unterscheidungskriterium der Knochenmarkaspirationsmethode wurde die Untersuchung der postoperativen Knochendefekte und ihres Heilungsverlaufs herangezogen. Dazu wurden Nativ-CT-Aufnahmen von elf Versuchstieren angefertigt. Tiere, die nicht im weiteren Tierversuch eingesetzt wurden, konnten nicht weiter gehalten werden. Zunächst wurden CT-Untersuchungen mit einer Schichtdicke von 1mm angefertigt. Diese erwiesen sich für die Volumenanalyse der Stichkanäle als zu grob, da die dünnen Stichkanäle hier nur teilweise sichtbar waren. Durch eine Reduktion der Schichtdicke auf 0,5 mm konnte eine

zufriedenstellende Auflösung für die Volumenanalyse erreicht werden. Leider reduzierte sich somit die verwertbare Stichprobe von 11 auf 7 Versuchstiere. Bevor die CT-Aufnahmen der ersten postoperativen Woche mit dem Mikro-CT-Programm Skyscan CT Analyser Version 1.13 (BRUKER) analysiert werden konnten, erfolgte die Interpolation auf isotope Voxel. Das verwendete Programm und die erstellte Tasklist erwiesen sich als geeignete Methode zur Volumenvermessung der Stichkanäle und die damit verbundene Beurteilung der postoperativen Knochendefekte. Aufgrund der anatomisch stark unterschiedlichen Konfiguration von Becken- und Femurknochen wurden beide Entnahmestellen getrennt betrachtet. In der statistischen Auswertung der gemessenen Daten zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Aspirationsmethoden hinsichtlich der Größe der Stichkanalvolumina im CT (Becken: OnControl Aspiration System $13,72 \pm 3,06$ Voxel; A-MAX (Jamshidi-Hohlnadel) $15,12 \pm 6,77$ Voxel; $p = 0,697$; Femur: OnControl Aspiration System $28,62 \pm 27,86$ Voxel, A-MAX (Jamshidi-Hohlnadel) $30,28 \pm 20,69$ Voxel; $p = 0,893$). Bisher existieren in der Literatur keine vergleichbaren Untersuchungen über das Ausmaß und die Vermessung von Knochendefekten nach Knochenmarkaspiration.

Als problematisch erwies sich die Tatsache, dass die vorliegenden Daten als anisotope Voxel vorlagen. Die Interpolation auf isotope Voxel erfolgte mit dem Programm Fiji ImageJ, die zusätzliche Kantenlänge der dritten Achse ergab sich aus der Pixelkantenlänge in 2D. Bei der Datenverarbeitung wurde die Auflösung etwas reduziert, was zu weniger Artefakten führte, aber auch mit einem Datenverlust einherging. Die Stichkanäle im Bereich des Femurknochens unterschieden sich stark, allein durch die anatomisch bedingte Formvariation des Knochens, je nachdem an welcher Stelle er getroffen wurde. Durch die vorherige Ausmessung und Markierung der Punktionsstelle wurde eine Vereinheitlichung der Punktionsstelle versucht. In der bildmorphologischen Auswertung zeigte sich aber eine starke Variation der Lage der Stichkanäle im Bereich des Femurs im Gegensatz zum Beckenknochen.

Kollateraldefekte

Als Kollateraldefekte wurde die Durchdringung der gegenüberliegenden Kompakta mit oder ohne zusätzliche Defektsetzung an benachbarten knöchernen Strukturen gewertet. An Hand der computertomographischen Auswertung konnte gezeigt werden, dass bei der Anwendung der konventionellen Aspirationstechnik A-MAX Aspirationsnadel in 54% der Fälle ein Kollateraldefekt zu beobachten war. Für die automatisierte Methode OnControl Aspiration System war das in 45,8% der Fall. Das häufigere Auftreten von Kollateraldefekten für die

konventionelle Aspirationsmethode A-MAX lässt sich durch das manuelle Einbringen der Nadel in den Markraum erklären. Dabei ist ein starker Druck notwendig, wodurch man schnell akzidentell den Markraum durchdringen kann und der erste merkliche Widerstandsverlust erst nach dem Passieren der gegenüberliegenden Kompakta auftritt (Riley et al. 2004). Dies ist vor allem relevant, wenn der Anschliff der Nadel der Größe des Markraumes entspricht, somit kann beim Durchdringen der Markraumes durch ununterbrochenen Kontakt der Nadel mit der Kortikalis kein merklicher Widerstandsverlust auftreten. Es ist also möglich, dass die Kollateraldefekte mit der speziellen Anatomie des Knochens des Minischweines in Verbindung stehen und durch einen kürzeren Anschliff der Nadel oder eine andere Nadelmorphologie vermieden werden könnten. Beim Menschen ist das Becken sehr unterschiedlich konfiguriert (Geschlecht, Körpergröße, Morphologie des Os ilium), so dass die Form der Nadelspitze auch für die Sicherheit der Punktionstechnik beim Menschen eine Relevanz hat. Prinzipiell sind Nadeln mit kleinerem Anschliff sicherer bezüglich der korrekten Positionierung der Nadelspitze, es ist jedoch deutlich mehr Kraft erforderlich, um diese Nadel einzubringen. Alternativ stehen Nadeln mit zirkulären kleinen Zähnen wie bei der OnControl Aspiration System Needle oder zwei gegenläufigen Anschläften als Alternativen zur Verfügung. Wie in dieser Studie gezeigt, kann dies zu einem geringeren Vorkommen von Kollateraldefekten führen. Allerdings wäre auch bei anders gestaltetem Nadelschliff beim manuellen Vorantreiben der Nadel mit einem deutlich erhöhten Kraftaufwand zu rechnen.

Hernigou et al. führten in einer Studie von 2014 computertomographische Untersuchungen nach Knochenmarkaspirationen durch (manuell eingebrachter Throkar mit 8 Gauge), wobei der potentielle Weichteilschaden und Komplikationen berücksichtigt wurden (Hernigou et al. 2014). In weiteren Studien wurden sehr seltene aber ernsthafte Komplikationen wie Colon-Verletzung, transfusionpflichtige Anämie sowie Blutungen, auch retroperitoneal, beschrieben (Bain 2003, Amann et al. 2009, Luoni et al. 1994). Das akzidentelle Durchdringen des ganzen Knochens stellt also eine potentielle Gefahr dar und erhöht das Risiko der Beschädigung von Gefäßen oder Nerven, wie von Hernigou et al. beschrieben, sollte also unbedingt verhindert werden (Hernigou et al. 2014). In dieser Hinsicht ist die automatisierte Methode im Vorteil. Das Fehlen von starkem Druck beim Einbringen der Nadel hatte eine bessere Kontrolle der Punktionsstiefe zur Folge, zusätzlich ermöglicht die Skalierung der Nadel eine gute Kontrolle der Eindringtiefe. In dieser Studie traten in keinem Fall Komplikationen im postoperativen

Verlauf durch mögliche Verletzungen von Nachbarstrukturen auf, wie in vorherigen Studien beschrieben.

Knochendefektheilung im Verlauf

Die primäre Knochenheilung setzt unter anderem den „Kontakt zwischen den Fragmenten mit einer maximalen Spaltbreite von 0,5 mm“ voraus (Bohdorf 2006). Bei Defekten nach Knochenmarkaspiration mit Nadeln der Größe 15 Gauge, dies entspricht einem Durchmesser von ca. 1,8mm, ist von einer indirekten Knochendefektheilung auszugehen. Durch reduzierte Kontraste im CT war nach acht und zwölf Wochen eine volumetrische Vermessung der Stichkanäle nicht mehr möglich. Um mögliche Unterschiede im Verlauf der Knochendefektheilung erkennen zu können, wurden die CT-Aufnahmen nach acht und zwölf Wochen bildmorphologisch semiquantitativ auf das Vorhandensein von Restdefekten im Bereich des Stichkanals und auf die Existenz von hyperdensen Arealen im Bereich des Stichkanals untersucht. Angelehnt an die Kriterien des Radiographic Union Score for Tibial fractures (RUST-Score) wurde die Knochendefektheilung beurteilt. Der RUST-Score ist ein Punktesystem zur Beurteilung von Knochendefektheilungen im Röntgen. (1 Punkt: Defekt ohne Kallus, 2 Punkte: Kallus und Defektklinie noch sichtbar, 3 Punkte: Brückenkallus ohne sichtbaren Defekt). Ein Punkt entspricht der am wenigsten fortgeschrittenen Knochenheilung (Whelan et al. 2010). Die Zeitpunkte der postoperativen CTs entsprachen den von Markel et al. und Schnarkowski et al. verwendeten Zeitintervallen in ihren Studien zur Beobachtung der Knochenheilung im CT. Sie zeigten, dass der Calciumgehalt des, den Defektpalt ausfüllenden Gewebes, über die Zeit zunahm (Schnarkowski et al. 1995, Markel et al. 1990, Markel et al. 1991, den Boer et al. 1998). Mit einer Mineralisation des Defektgewebes ist ab der dritten bis vierten Woche zu rechnen (Bohdorf 2006). Die Schwächung der Röntgenstrahlen ist im Bereich des erhöhten Calciumgehaltes stärker und damit das Bilddetail im CT heller (Reiser et al. 2011). Entsprechend der Ausführungen in der Studie von Makel et al. entsprechen die hyperdensen Areale im CT am ehesten einem Defektkallus, der durch einen erhöhten Calciumgehalt eine höhere Strahlendichte als der umliegende Knochen hat (Markel et al. 1991). Braunstein et al. zeigten in einer Studie zur Knochenheilung im Röntgen und CT, dass ein Kallus ab der dritten Woche sichtbar wurde, ab der dritten bis vierten Woche beginnt auch die Umformung des Kallus in Geflechtknochen (Braunstein et al. 1986). Bei der Untersuchung der Bilddaten wurde festgestellt, dass nach acht und zwölf Wochen jeweils häufiger noch ein Restdefekt und eine ausgeprägtes hyperdense Areal im Bereich der Stichkanäle der konventionellen Aspirationstechnik A-MAX (Jamshidi) zu erkennen waren.

Dies wurde in Anlehnung an den RUST-Score und der Stadien der Knochenheilung im Röntgen von Bohndorf 2006 als Verzögerung der Knochendefektheilung gedeutet (Bohndorf 2006). Auch die Abnahme der Merkmale von der achten zur zwölften Woche, könnte darauf hindeuten, dass es sich bei einer Persistenz der bildmorphologischen Veränderungen um eine Verzögerung der physiologischen Defektheilung handelt, beziehungsweise um eine schnellere Umwandlung des Defektkallus in spongiösen Knochen. Verzögerungen in der Knochendefektheilung wären denkbar durch Infektionen, Instabilität und Unruhe, Weichteildystrophie oder Knochennekrosen (Rössler et al. 2005, Stürmer 1996). Infektionen traten in keinem der beobachteten Fälle auf. Eine Immobilisation zur Ruhigstellung ist im Tierversuch nicht erforderlich, da es sich um keinen Frakturspalt sondern um einen Stichkanal handelt. Die Entstehung von thermischen Schäden wäre bei der automatisierten Methode OnControl Aspiration System denkbar. Beim Bohren von Knochen entstehen hohe Temperaturen, die zu Schädigung der Gefäße und Denaturierung führt, was eine Störung der Knochenheilung zur Folge hätte (Matthews und Hirsch 1972, Eriksson et al. 1982). Interessanterweise zeigten sich die CT-morphologischen Veränderungen jedoch vor allem bei der konventionellen Methode A-MAX (Jamshidi). So bestanden nach 8 Wochen signifikant häufiger hyperdense Areale und zwar bei allen Stichkanälen nach Anwendung der konventionellen Knochenmarkaspirationsnadel, während diese beim automatisierten System nur in 88% der Fälle zu sehen waren. Diese Beobachtung findet eine Bestätigung im Vorliegen von Restdefekten nach 8 und 12 Wochen und hyperdensen Arealen nach 12 Wochen, da nach Anwendung der automatisierten Nadel, im Vergleich zum konventionellen System, deutliche, wenn auch nicht statistisch signifikante, Unterschiede zu sehen waren (automatisiert vs. konventionell: Restdefekt nach 8 Wochen 73% vs. 86%, Restdefekt nach 12 Wochen: 55% vs. 64%, hyperdense Areale nach 12 Wochen: 59% vs 74%). Sie sind möglicherweise Folge von größeren Knochentraumata/Gewebeverletzungen durch den hohen punktförmigen Druck der konventionellen Nadel. Eventuell wird durch Anschliff der Nadel Gewebe verschoben oder in die Knochenporosität des Kanals gepresst. Damit gleitet die Nadel weniger durch das Gewebe und könnte intraossäre Traumen des Mikromilieus verursachen, die zu einer Verzögerung der Knochenheilung führen könnten. Diese bildmorphologisch nicht darstellbaren Verletzungen der intraossären Strukturen könnten auch zu vermehrter Zerreißung von Gefäßen und Knochenmarksinus führen. Für die konventionelle Aspirationsmethode zeigte sich auch eine geringere Zellausbeute an MSC, was eventuell Folge einer stärkeren Verdünnung des Aspirats mit Blut sein könnte. Diese Thesen können im

Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden, erstrebenswert wäre ihre Klärung in weiteren histologischen Untersuchungen.

Insgesamt erwiesen sich Versuchsplanung und Durchführung der Studie als geeignet zur Beantwortung der Fragestellung. Als methodische Schwachstellen sind das kleine Versuchstierkollektiv, die Unmöglichkeit der Verblindung der Versuche und die weitere Verwendung der Zellen in einem Versuch anzusehen. Abschließend kann man feststellen, dass sich konventionelle und automatisierte Knochenmarkaspirationsmethoden hinsichtlich der Aspirationsdauer, den postoperativen Wundverhältnissen, der Zellausbeute an MSC und dem volumetrisch in der Computertomographie gemessenen Knochendefekt als gleichwertig darstellten. Unterschiede zeigten sich in einer signifikant kürzeren Insertionszeit, der geringeren Anzahl an Kollateraldefekten sowie der raschen Heilung der Knochendefekte gemessen an dem signifikant geringerem Auftreten hyperdenser Areale in der Computertomographie nach 8 Wochen für die automatisierte Methode. Das automatisierte Verfahren zur Knochenmarkaspiration OnControl Aspiration System kann aufgrund seiner Reduktion der Anwendungsdauer, der Effektivität der Zellgewinnung, einem geringeren Anteil an Kollateraldefekten und weniger Störungen der postinterventionellen Knochendefektheilung besonders zur Anwendung bei Patienten mit erhöhtem Frakturrisiko, mit bekannten Osteolysen oder schwerer Osteoporose, bei denen kein unkontrollierter Druck beim Vorschieben der Nadel ausgeübt werden sollte, empfohlen werden. Es konnte die These bestätigt werden, dass eine Aspiration von mehreren kleinen Knochenmarkvolumina an mehreren Punktionsstellen eine höhere Ausbeute an MSC, durch geringere Verdünnung mit Blut, zur Folge hat. Auch im Falle von mehreren Punktionsstellen ist die automatisierte Methode in Anbetracht der Zeitersparnis und der geringeren Beeinträchtigung des Heilungsverlaufs zu bevorzugen. Zwischen der Anzahl an Knochenmarkbröckeln pro Ausstrich und der Anzahl der MSC, beziehungsweise dem Ausmaß des Knochendefekts, konnte kein statistischer Zusammenhang gezeigt werden. Für keine der beiden Methoden wurden peri- oder postinterventionelle Komplikationen beobachtet, die Knochenmarkaspiration allgemein stellt eine geringe Belastung in Bezug auf Schmerzen und Weichteildefekt dar. Ziel aller medizinischen Interventionen sollte die Minimierung von Belastungen, Risiken und Folgeschäden für den Patienten sein. Insgesamt kann die Knochenmarkaspiration zur Gewinnung von MSC im Rahmen des TE mit Blick auf die Zukunft als gute Alternative zur autologen Knochenspende, mit Reduktion der Spenderstellenmorbidität, angesehen werden.

5. Zusammenfassung

Hintergrund und Ziele: Das Tissue Engineering (TE) von Knochengewebe aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) stellt einen neuen Therapieansatz für die Rekonstruktion von Hartgewebedefekten als Alternative zu autologen Knochentransplantaten dar. Die Gewinnung von MSC aus dem Knochenmark für Zwecke des TE sollte bei einer möglichst geringen Belastung für die Patienten eine möglichst hohe Effizienz aufweisen. In dieser Arbeit werden zwei Knochenmarkaspirationsmethoden mit Zielsetzung der Reduktion von Patientenbelastung und Knochentrauma sowie Verbesserung der Zellausbeute verglichen.

Material und Methoden: Bei 15 Göttinger Minischweinen wurde mit einer elektronisch angetriebenen (On Control Aspiration System (OC)) und einer konventionellen Aspirationsnadel (Jamshidi-Hohlnadel (J)) Knochenmark aus Becken und Femur entnommen und die prozedurale Effektivität in Bezug auf Geschwindigkeit und Aspirationsvolumen verglichen. Intraoperativ angefertigte Knochenmarkausstriche wurden auf ihren Anteil an Knochenmarkkonglomeraten mikroskopisch untersucht. Aus dem gewonnenen Knochenmarkaspirat wurden nach etabliertem Schema MSC isoliert, kultiviert und die Anzahl der expandierten Zellen nach Methode verglichen.

Die Versuchstiere wurden eine Woche postinterventionell auf schmerzbedingte Verhaltensweisen und Wundheilung untersucht. Zur Darstellung von Kollateraldefekten und zur volumetrischen Vermessung der erzeugten Stichkanäle sowie ihres knöchernen Heilungsverlaufs wurden in der ersten, achten und zwölften postinterventionellen Woche native CT-Aufnahmen von Becken und Femur angefertigt und ausgewertet. Anhand der CT-Untersuchungen der ersten postinterventionellen Woche wurde das Stichkanalvolumen in Voxeln gemessen und die Anzahl der Kollateraldefekte bestimmt. Die folgenden Aufnahmen dienten der Darstellung des Heilungsverlaufs anhand von Restdefekten und hyperdensen Arealen. Darüber hinaus wurden die Knochenmarkentnahmestellen (Becken und Femur) bezüglich Aspirationsdauer und Anzahl der gewonnenen MSC verglichen.

Ergebnisse: Die Ergebnisse bezüglich der prozeduralen Effektivität zeigten, dass die Dauer der Nadelinsertion mit OC signifikant kürzer ist als mit J ($p = 0,001$). Bei der Dauer der Aspiration bis zum Erreichen eines Aspirationsvolumens von 10 ml ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. In der postinterventionellen Beobachtung der Versuchstiere hinsichtlich Schmerzen und Wundheilung, sowie bei der mikroskopischen Auswertung der

Knochenmarkaussstriche auf Unterschiede in der Anzahl zelltragender Knochenmarkkonglomerate, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Bezuglich der Ausbeute an MSC in der Primärkultur getrennt nach Entnahmestelle ergaben sich auch keine signifikanten Unterschiede (Becken $p = 0,196$, Femur = 0,534).

Die volumetrische Knochendefektmessung und Auswertung der entstandenen Kollateraldefekte mit Hilfe von CT-Aufnahmen ergab keinen signifikanten Unterschied der Methoden. Nach acht postoperativen Wochen war CT-morphologisch kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der sichtbaren Restdefekte erkennbar, jedoch waren signifikant mehr hyperdense Areale um den Stichkanal bei der Methode J vorhanden. Nach Zwölf postoperativen Wochen waren die Anzahl der Restdefekte und hyperdenses Areale wieder ohne signifikanten Unterschied.

Der statistische Vergleich zwischen den Entnahmestellen erbrachte, dass die Aspirationsdauer bis zum Erreichen einer Knochenmarkaspirationsmenge von 10 ml bei Gewinnung aus dem Femur signifikant kürzer war als aus dem Becken ($p = 0,001$), jedoch konnte bei der Aspiration aus dem Becken, mit mehreren Aspirationen kleinerer Teilvolumina, eine signifikant höhere Zellausbeute an MSC in der Primärkultur erlangt werden ($p = 0,007$).

Schlussfolgerung: Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass das automatisierte Verfahren zur Knochenmarkaspiration OnControl Aspiration System aufgrund seiner Reduktion der Anwendungsdauer, gleichwertige Effektivität der Zellgewinnung und weniger Störungen der postinterventionellen Knochendefektheilung zu einer geringeren Belastung der Patienten beitragen kann.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb. = Abbildung

ASC = adipose tissue stem cells

Ca²⁺ = Calcium

CD = Cluster of Differentiation

CT = Computertomographie

dest. = destillata

DMEM = Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA = Ethylen-Diamin-Tetraessigsäure

ESC = embryonale Stammzelle

EschG= Embryonenschutzgesetz

etCO₂= exspiratorisches Kohlenstoffdioxid

FISH = Floureszenz in situ Hybridisierung

g = Erdbeschleunigung

g = Gramm

G= Gauge

h = hour = Stunde

HE= Hounsfield-Einheit

hES= humane embryonale Stammzelllinie

hMSC= humane mesenchymale Stammzelle

HSC = hämatopoietische Stammzelle

I.E.= Internationale Einheit

Jamshidi = Jamshidi-Hohlnadel

kgKG = Kilogramm Körpergewicht

KHCO₃ = Kaliumhydrogencarbonat

KMS = Knochenmarkstammzellen

mg = Milligramm

ml = Milliliter

n = die Anzahl der Merkmalsausprägungen

N = die Größe der Grundgesamtheit

NH₄Cl = Ammoniumchlorid

NSF= National Science Foundation, Virginia, USA

OC = OnControl Aspiration System

OnControl = OnControl Aspiration System
PaCO₂ = arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PaO₂ = Sauerstoffpartialdruck
PBS = phosphate buffered saline
pH = potentia Hydrogenii
ROI = region of interest
rpm = rounds per minute
 r_s = Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
SEM = Standard Error of the Mean
TE = Tissue Engineering
VOI = volume of interest
 \bar{X} = Mittelwert

7 Tabellenverzeichnis

1. Calciumgehalt und Knochenformation im Defektkallus, modifiziert nach Markel et al. 1990
2. Daten der Versuchstiere
3. Anzahl der für die jeweiligen Versuchsparameter berücksichtigten Versuchstiere
4. Auflistung der erhobenen Messdaten (im Anhang)

8 Abbildungsverzeichnis

1. Jamshidi-Nadel mit T-Griff, Quelle: CareFusion (2014): Jamshidi® Nadeln mit T-Griff.
Online im Internet: <http://www.carefusion.de/medical-products/interventional-procedures/biopsy/jamshidi/t-handle-jamshidi.aspx> vom 16.05.2014
2. OnControl Power Driver, Quelle: Vidacare Corporation (2014): OnControl Bone Marrow Brochure. Online im Internet: <http://www.vidacare.com/OnControl/Bone-Marrow.aspx> vom 16.05.2014
3. OnControl Aspiration System Needle Set), Quelle: Vidacare Corporation (2014): OnControl Bone Marrow Brochure. Online im Internet: <http://www.vidacare.com/OnControl/Bone-Marrow.aspx> vom 16.05.2014
4. Intraoperative Lagerung der Versuchstiere
5. Intraoperative Lagerung der Versuchstiere
6. Präoperative Markierung der geplanten Aspirationsstellen
7. A-MAX Aspirationsnadel
8. OnControl Power Driver mit Needle Set und Connector
9. Spezielle Hängevorrichtung für Göttinger Minischweine
10. Lagerung der Versuchstiere während der CT-Untersuchung
11. Exemplarische Darstellung eines Stichkanals, axiale Schnitte
12. Umwandlung der Darstellung in sagittale Schnitte
13. Exemplarische Darstellung eines Stichkanals, sagittale Schnitte
14. Manuelle Festlegung der ROI
15. Stichkanalvolumen
16. Dauer des Prozedere bis zur Aspiration
17. Aspirationszeiten im Bereich des Beckenknochens
18. Aspirationszeit im Bereich des Femurknochens
19. Anzahl der erreichten Aspirationsvolumina im Bereich des Femurknochens
20. Exemplarische Darstellung postoperativer Wundverhältnisse
21. Graphischer Verlauf postoperativer Wundverhältnisse
22. Verlauf postoperativer Bewegungseinschränkungen
23. Knochenmarkbröckel 10x Objektiv
24. Knochenmarkbröckel 20x Objektiv
25. Knochenmarkbröckel 100x Objektiv + Öl
26. Knochenmarkbröckel 10x Objektiv

27. Knochenmarkbröckel 20x Objektiv
28. Knochenmarkbröckel 100x Objektiv + Öl
29. Detailaufnahme Knochenmarkbröckel
30. Knochenmarkkonglomerate pro Ausstrich
31. plastikadhärente Zellen in Kultur, 4. Tag
32. plastikadhärente Zellen in Kultur, 5. Tag
33. plastikadhärente Zellen in Kultur, 6. Tag
34. plastikadhärente Zellen in Kultur, 7. Tag
35. plastikadhärente Zellen in Kultur, 8. Tag
36. plastikadhärente Zellen in Kultur, 11. Tag
37. Primärkulturzahlen
38. Streudiagramm Knochenmarkkonglomerate und Primärkulturzahlen
39. Knochendefektvolumen im Bereich des Beckenknochens
40. Knochendefektvolumen im Bereich des Femurknochens
41. normaler Stichkanal im CT
42. Beispiel Kollateraldefekt
43. Beispiel Kollateraldefekt
44. Prozentualer Anteil der Kollateraldefekte
45. Streudiagramm Knochenmarkkonglomerate und Stichkanalvolumen
46. Relative Häufigkeiten sichtbarer Restdefekte nach acht Wochen
47. Relative Häufigkeiten sichtbarer Restdefekte nach zwölf Wochen
48. Relative Häufigkeiten sichtbarer hyperdenser Areale nach acht Wochen
49. Relative Häufigkeiten sichtbarer hyperdenser Areale nach zwölf Wochen
50. Aspirationszeit, Vergleich Entnahmestelle
51. Primärkulturzahlen Vergleich Entnahmestelle
52. Verbogene A-Max Aspirationsnadel
53. Detailansicht der verbogenen Nadel mit umgebogener Nadelspitze
54. Detailansicht der Nadelspitze des OnControl Aspiration System
55. Porcine plastikadhärente Zellen

9 Literaturverzeichnis

1. Aerssens, J., Boonen, S., Lowet, G. and Dequeker, J. (1998), "Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research", *Endocrinology*, Vol. 139 No. 2, pp. 663–670.
2. Alstrup, A. K. O. (2010) Anaesthesia and Analgesia in Ellegaard Göttingen minipigs [Internet]. Mai 2010 [zitiert am 31.05.2014]. URL: <http://minipigs.dk/knowledge-base/publications/>
3. Amann, B.; Luedemann, C.; Ratei, R.; Schmidt-Lucke, J. A. (2009): Autologous Bone Marrow Cell Transplantation Increases Leg Perfusion and Reduces Amputations in Patients With Advanced Critical Limb Ischemia Due to Peripheral Artery Disease. In: *Cell Transplant* 18 (3), S. 371–380. DOI: 10.3727/096368909788534942.
4. Amorin, B., Alegretti, A. P., Valim, V., Pezzi, A., Laureano, A. M., da Silva, M. A. L., Silla, L., et al. (2014). Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. *Human cell*, 27(4), 137-150.
5. André, M., Resnick, O. (1988): Computed tomography. In: Resnick O, Niwayama G, (Hrsg.): *Diagnosis of bone and joint disorders*. 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders, 1988:143-202
6. Bain, B. J. (2003): Bone marrow biopsy morbidity and mortality. In: *Br. J. Haematol.* 121 (6), S. 949–951.
7. Berenson, J. R.; Yellin, O.; Blumenstein, B.; Bojanower, D.; Croopnick, J.; Aboulafia, D. et al. (2011): Using a Powered Bone Marrow Biopsy System Results in Shorter Procedures, Causes Less Residual Pain to Adult Patients, and Yields Larger Specimens. In: *Diagn Pathol* 6 (1), S. 23. DOI: 10.1186/1746-1596-6-23.
8. Bessa, P.C., Casal, M. and Reis, R.L. (2008), "Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery)", *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, Vol. 2 No. 2-3, pp. 81–96.
9. Beyer Nardi, N.; da Silva Meirelles, L (2006): Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. In: *Handb Exp Pharmacol* (174), S. 249–282.
10. Bieback, K. and Klüter, H. (2007), "Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood", *Current stem cell research & therapy*, Vol. 2 No. 4, pp. 310–323.

11. Bjornson, C. R.; Rietze, R. L.; Reynolds, B. A.; Magli, M. C.; Vescovi, A. L. (1999): Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. In: *Science* 283 (5401), S. 534–537.
12. Blau, H.M.; Brazelton, T.R.; Weimann, J.M. (2001): The Evolving Concept of a Stem Cell. In: *Cell* 105 (7), S. 829–841. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00409-3.
13. Bohndorf, K. (2006): Radiologische Diagnostik der Knochen und Gelenke. 2., erw. und vollständig überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme, 44-45.
14. Bolander, M. E. (1992): Regulation of Fracture Repair by Growth Factors. In: *Experimental Biology and Medicine* 200 (2), S. 165–170. DOI: 10.3181/00379727-200-43410A.
15. Boltze, J.; Lukomska, B.; Jolkkonen, J. (2014): Mesenchymal stromal cells in stroke: improvement of motor recovery or functional compensation? In: *J. Cereb. Blood Flow Metab.* DOI: 10.1038/jcbfm.2014.94.
16. Bracht, K. (2008): Stammzellen. Hoch potent und kontrovers diskutiert. In: *Pharmazeutische Zeitung* 153 (35), 14-23.
17. Braunstein, E.M., Goldstein, S.A., Ku, J., Smith, P. and Matthews, L.S. (1986), “Computed tomography and plain radiography in experimental fracture healing”, *Skeletal radiology*, Vol. 15 No. 1, pp. 27–31.
18. Bruder, S.P., Jaiswal, N. and Haynesworth, S.E. (1997), “Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation”, *Journal of cellular biochemistry*, Vol. 64 No. 2, pp. 278–294.
19. Bucher, C. M.; Lehmann, T.; Tichelli, A.; Tzankov, A.; Dirnhofer, S.; Passweg, J.; Rovo, A. (2012): Comparison of a powered bone marrow biopsy device with a manual system: results of a prospective randomised controlled trial. In: *Journal of Clinical Pathology* 66 (1), S. 24–28. DOI: 10.1136/jclinpath-2012-201167.
20. Caplan, A. I. (1991): Mesenchymal stem cells. In: *J. Orthop. Res.* 9 (5), S. 641–650. DOI: 10.1002/jor.1100090504.
21. Caplan, A. I. (2009): Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. In: *J. Pathol.* 217 (2), S. 318–324. DOI: 10.1002/path.2469.

22. Chan, T.-M.; Harn, H.-J.; Lin, H.-P.; Chou, P.-W.; Chen, J. Y.-R.; Ho, T.-J. et al. (2014): Improved human mesenchymal stem cell isolation. In: Cell Transplant 23 (4), S. 399–406. DOI: 10.3727/096368914X678292.
23. Cohen, St. C.; Gore, J. M. (2008): Evaluation of a powered intraosseous device for bone marrow sampling. In: Anticancer Res. 28 (6B), S. 3843–3846.
24. Conget, P.A. and Minguell, J.J. (1999), “Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells”, Journal of cellular physiology, Vol. 181 No. 1, pp. 67–73.
25. Crisan, M.; Yap, S.; Casteilla, L.; Chen, C.-W.; Corselli, M.; Park, T. S. et al. (2008): A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. In: Cell Stem Cell 3 (3), S. 301–313. DOI: 10.1016/j.stem.2008.07.003.
26. den Boer, F C, Bramer, J.A., Patka, P., Bakker, F.C., Barentsen, R.H., Feilzer, A.J., de Lange, E S and Haarman, H.J. (1998), “Quantification of fracture healing with three-dimensional computed tomography”, Archives of orthopaedic and trauma surgery, Vol. 117 No. 6-7, pp. 345–350.
27. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, Fc; Krause, Ds et al. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. In: Cytotherapy 8 (4), S. 315–317. DOI: 10.1080/14653240600855905.
28. Drukała, J., Paczkowska, E., Kucia, M., Młyńska, E., Krajewski, A., Machaliński, B., Madeja, Z. and Ratajczak, M.Z. (2012), “Stem cells, including a population of very small embryonic-like stem cells, are mobilized into peripheral blood in patients after skin burn injury”, Stem cell reviews, Vol. 8 No. 1, pp. 184–194.
29. Ehninger, A. and Trumpp, A. (2011), “The bone marrow stem cell niche grows up: mesenchymal stem cells and macrophages move in”, The Journal of experimental medicine, Vol. 208 No. 3, pp. 421–428.
30. Engelhardt, M., Sandfort, M., Dann, K., Fuhrmann, R., Geitmann, B., Haaker, R. et al. (2014). Engelhardt Lexikon Orthopädie und Unfallchirurgie, Knochentransplantation [Internet]. 2014 [zitiert am 24.05.2014]. URL: <http://www.lexikon-orthopaedie.com/pdx.pl?dv=0&id=01119>

31. Eriksson, A.; Albrektsson, T.; Grane, B.; McQueen, D. (1982): Thermal injury to bone. In: International Journal of Oral Surgery 11 (2), S. 115–121. DOI: 10.1016/S0300-9785(82)80020-3.
32. Evans, M. J.; Kaufman, M. H. (1981): Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. In: Nature 292 (5819), S. 154–156.
33. Fekete, N.; Rojewski, M. T.; Fürst, D.; Kreja, L.; Ignatius, A.; Dausend, J.; Schrezenmeier, H. (2012): GMP-compliant isolation and large-scale expansion of bone marrow-derived MSC. In: PLoS ONE 7 (8), S. e43255. DOI: 10.1371/journal.pone.0043255.
34. Ferrari, G.; Cusella-De Angelis, G.; Coletta, M.; Paolucci, E.; Stornaiuolo, A.; Cossu, G.; Mavilio, F. (1998): Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. In: Science 279 (5356), S. 1528–1530.
35. Friedenstein, A.J., Petrakova, K.V., Kurolesova, A.I. and Frolova, G.P. (1968), “Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues”, Transplantation, Vol. 6 No. 2, pp. 230–247.
36. Friedenstein, A.J., Chailakhyan, R.K., Latsinik, N.V., Panasyuk, A.F. and Keiliss-Borok, I.V. (1974), “Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo”, Transplantation, Vol. 17 No. 4, pp. 331–340.
37. Fuchs, E., Tumbar, T. and Guasch, G. (2004), “Socializing with the neighbors: stem cells and their niche”, Cell, Vol. 116 No. 6, pp. 769–778.
38. Gaebel, R., Furlani, D., Sorg, H., Polchow, B., Frank, J., Bieback, K., Wang, W., Klopsch, C., Ong, L.-L., Li, W., Ma, N. and Steinhoff, G. (2011), “Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration”, PLoS one, Vol. 6 No. 2, pp. e15652.
39. Gadner, H.; Gaedicke, G.; Niemeyer, Ch.; Ritter, J. (Hg.) (2006): Pädiatrische Hämatologie und Onkologie. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 5-7.
40. Gyöngyösi, M., Hemetsberger, H., Steiner, S., Farhan, S., Kvakan, H., Hemetsberger, R., Pavo, N., Kopp, C., Garamvölgyi, R., Petrási, Z., Petneházy, Ö., Manczur, F., Huber, K., Wojta, J., Gyöngyös, M. & Glogar, H. D. (2008). Ischämisches Preconditioning führt zu einer Reduktion zirkulierender mesenchymaler Stammzellen

- im Ischämie/Reperfusionsmodell bei Schweinen. Journal für Kardiologie-Austrian Journal of Cardiology, 15(11), 348-352.
41. Hagmann, F. G., Kroschinsky, F., Herausgeber: Prof. Dr. H. Link (2014). Akute myeloische Leukämie; Morphologie (Methoden, Durchführung, Qualitätsstandards) [Internet]. ONKODIN 2002-2015 [zitiert am 09.06.2014]. URL: <http://www.onkodin.de/e2/e51675/e52556/e52584/#top>
42. Hall, V. J., (2011) Stem Cell Research in Minipigs: a Potential Model for Mimicking Human Disease [Internet]. Ellegaard Newsletter 36. Herbst 2011 [zitiert am 31.05.2014]. URL: <http://minipigs.dk/knowledge-base/publications/>
43. Hare, J.M., Traverse, J.H., Henry, T.D., Dib, N., Strumpf, R.K., Schulman, S.P., Gerstenblith, G., DeMaria, A.N., Denktas, A.E., Gammon, R.S., Hermiller, J.B., Reisman, M.A., Schaer, G.L. and Sherman, W. (2009), "A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction", Journal of the American College of Cardiology, Vol. 54 No. 24, pp. 2277–2286.
44. Hattori, H., Masuoka, K., Sato, M., Ishihara, M., Asazuma, T., Takase, B., Kikuchi, M., Nemoto, K. and Ishihara, M. (2006), "Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold", Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials, Vol. 76 No. 1, pp. 230–239.
45. Hayashi, O., Katsume, Y., Hirose, M., Ohgushi, H. and Ito, H. (2008), "Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue", Calcified tissue international, Vol. 82 No. 3, pp. 238–247.
46. Heilmeyer, L.; Begemann, H. (Hg.) (1955): Atlas der Klinischen Hämatologie und Cytologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2.
47. Hernigou, P.; Homma, Y.; Flouzat Lachaniette, Ch. H.; Poignard, A. A. J.; Chevallier, N.; Rouard, H. (2013): Benefits of small volume and small syringe for bone marrow aspirations of mesenchymal stem cells. In: Int Orthop 37 (11), S. 2279–2287. DOI: 10.1007/s00264-013-2017-z.
48. Hernigou, J.; Picard, L.; Alves, A.; Silvera, J.; Homma, Y.; Hernigou, P. (2014): Understanding bone safety zones during bone marrow aspiration from the iliac crest: the sector rule. In: Int Orthop. DOI: 10.1007/s00264-014-2343-9.

- 49.Horch H.-H., Pautke C. (2006): Regeneration statt Reparation. In: Mund Kiefer GesichtsChir (2006) 10: 213-220
- 50.Islam, A. (1983), “A new bone marrow aspiration needle to overcome the sampling errors inherent in the technique of bone marrow aspiration”, Journal of clinical pathology, Vol. 36 No. 8, pp. 954–958.
- 51.Islam, A.; Henderson, E. S. (1988): Value of long-core biopsy in the detection of discrete bone marrow lesions. In: Histopathology 12 (6), S. 641–648.
- 52.Islam, A.; Frisch, B.; Henderson, E. S. (1989): Plastic embedded core biopsy: a complementary approach to bone marrow aspiration for diagnosing acute myeloid leukaemia. In: Journal of Clinical Pathology 42 (3), S. 300–306. DOI: 10.1136/jcp.42.3.300.
- 53.Jaiswal, S., Jamieson, Catriona H M, Pang, W.W., Park, C.Y., Chao, M.P., Majeti, R., Traver, D., van Rooijen, N. and Weissman, I.L. (2009), “CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis”, Cell, Vol. 138 No. 2, pp. 271–285.
- 54.Jamshidi, K.; Swaim, W. R. (1971): Bone marrow biopsy with unaltered architecture: a new biopsy device. In: J. Lab. Clin. Med. 77 (2), S. 335–342.
- 55.Jamshidi, K., Swaim, W.R. (1971) Bone marrow biopsy with unaltered architecture: a new biopsy device. J. Lab. Clin. Med. 1971; 77(2):335–42
- 56.Janicki, P., Richter, W. (2012): Neue Ansätze für die in situ Regeneration und das Tissue Engineering von Knochen. In: Deutsche Zeitschrift für Sportmedizin, Jahrgang 63, Nr.2 (2012): 33
- 57.Kasper, C.; Sayer, H. G.; Höffken, K. (2001): Potenzial adulter Stammzellen für Transplantationskonzepte. In: Der Onkologe 7 (12), S. 1319–1323. DOI: 10.1007/s007610170006.
- 58.Kessler, P., Thorwarth, M., Bloch-Birkholz, A., Nkenke, E., & Neukam, F. W. (2005). Harvesting of bone from the iliac crest—comparison of the anterior and posterior sites. British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 43(1), 51-56.
- 59.Kneser, U.; Schaefer, D. J.; Polykandriotis, E.; Horch, R. E. (2006): Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view. In: J Cellular Mol Med 10 (1), S. 7–19. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00287.x.

60. Kosch, A., Nowak-Gölte, U., Pekrum, A. and Ritter, J. (2005), "Hämatologie", in Pädiatrie, Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 741–786.
61. Kuball, J.; Schüz, J.; Gamm, H.; Weber, M. (2004): Bone marrow punctures and pain. In: Acute Pain 6 (1), S. 9–14. DOI: 10.1016/j.acpain.2004.02.003.
62. Kühn, H. A.; Schirmeister, J.; Begemann, H.; Böhm, B. O.; Bommer, W.; Brückle, W. et al. (Hg.) (1989): Innere Medizin. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 447.
63. Kuznetsov, S. A., Mankani, M. H., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P., Robey, P. G. (2001): Circulating skeletal stem cells. In: The Journal of cell biology, 153(5), 1133-1140
64. Lane, S.W., Williams, D.A. and Watt, F.M. (2014), "Modulating the stem cell niche for tissue regeneration", Nature biotechnology, Vol. 32 No. 8, pp. 795–803.
65. Laughlin, M. J.; Barker, J.; Bambach, B.; Koc, O. N.; Rizzieri, D. A.; Wagner, J. E. et al. (2001): Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. In: N. Engl. J. Med. 344 (24), S. 1815–1822. DOI: 10.1056/NEJM200106143442402.
66. Lee, R.H., Kim, B., Choi, I., Kim, H., Choi, H., Suh, K., Bae, Y.C., Jung J.S (2004): Characterization and Expression Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Human Bone Marrow and Adipose Tissue. In: Cell Physiol Biochem 2004;14:311–324
67. Leisten, I.(2014) Die Bedeutung der Stammzellniche bei myeloproliferativen Erkrankungen [Dissertation]. Aachen; RWTH Aachen.
68. Li, Yueying; Charif, Naceur; Mainard, Didier; Bensoussan, Danièle; Stoltz, Jean-François; Isla, Natalia de (2014): Donor's age dependent proliferation decrease of human bone marrow mesenchymal stem cells is linked to diminished clonogenicity. In: Biomed Mater Eng 24 (0), S. 47–52. DOI: 10.3233/BME-140973.
69. Liu, R. H.; Li, Y. Q.; Zhou, W. J.; Shi, Y. J.; Ni, L.; Liu, G. X. (2014): Supplementing mesenchymal stem cells improves the therapeutic effect of hematopoietic stem cell transplantation in the treatment of murine systemic lupus erythematosus. In: Transplant. Proc. 46 (5), S. 1621–1627. DOI: 10.1016/j.transproceed.2014.03.003.
70. Löffler, H.; Rastetter, J. (Hg.) (1999): Atlas der klinischen Hämatologie. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 4.

71. Lüllmann-Rauch, R. (2006): Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. 2., komplett überarb. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 81–83.
72. Luoni, M., Croci, E., Paoli, A. de, Fava, S., Grimi, E., Tocci, A., Tosi, A. and Cassi, E. (1994), “Retroperitoneal hemorrhage following bone marrow biopsy”, *Haematologica*, Vol. 79 No. 1, pp. 70–72.
73. Manegold, C., Krempien, B. (1983): Die Beckenkamm-Nadelbiopsie-Wertvolle Methode in der Diagnostik von Knochen- und Knochenmarkerkrankungen. *Deutsches Ärzteblatt* 1983; 80(38): A-45
74. Markel, M.D., Wikenheiser, M.A. and Chao, E.Y. (1990), “A study of fracture callus material properties: relationship to the torsional strength of bone”, *Journal of orthopaedic research official publication of the Orthopaedic Research Society*, Vol. 8 No. 6, pp. 843–850.
75. Markel, M.D., Morin, R.L., Wikenheiser, M.A., Lewallen, D.G. and Chao, E.Y. (1991), “Quantitative CT for the evaluation of bone healing”, *Calcified tissue international*, Vol. 49 No. 6, pp. 427–432.
76. Matthews, L. S.; Hirsch, C. (1972): Temperatures measured in human cortical bone when drilling. In: *J Bone Joint Surg Am* 54 (2), S. 297–308.
77. Mendes, S.C., Tibbe, J.M., Veenhof, M., Bakker, K., Both, S., Platenburg, P.P., Oner, F.C., de Brujin, J. D and van Blitterswijk, C. A (2002), “Bone tissue-engineered implants using human bone marrow stromal cells: effect of culture conditions and donor age”, *Tissue engineering*, Vol. 8 No. 6, pp. 911–920.
78. Miller, L. J.; Philbeck, T. E.; Montez, D. F.; Puga, T. A.; Brodie, K. E.; Cohen, S. C. et al. (2011): Powered bone marrow biopsy procedures produce larger core specimens, with less pain, in less time than with standard manual devices. In: *Hematol Rep* 3 (1), S. e8. DOI: 10.4081/hr.2011.e8.
79. Minuth, W. W., Schumacher, K. (2004) Tissue engineering – Schwierigkeiten und Chancen bei der Herstellung künstlicher Gewebe. *Journal DGPW* 29:20-22.: Tissue engineering – Schwierigkeiten und Chancen bei der Herstellung künstlicher Gewebe. In: *Journal DGPW* 29, Bd. 29, S. 20–22. Online verfügbar unter www.dgpw.org.
80. Moore, K.A. and Lemischka, I.R. (2006), “Stem cells and their niches”, *Science* (New York, N.Y.), Vol. 311 No. 5769, pp. 1880–1885.

- 81.Mosekilde, L., Kragstrup, J. and Richards, A. (1987), “Compressive strength, ash weight, and volume of vertebral trabecular bone in experimental fluorosis in pigs”, *Calcified tissue international*, Vol. 40 No. 6, pp. 318–322.
- 82.Mosekilde, L., Weisbrode, S.E., Safron, J.A., Stills, H.F., Jankowsky, M.L., Ebert, D.C., Danielsen, C.C., Sogaard, C.H., Franks, A.F. and Stevens, M.L. (1993), “Calcium-restricted ovariectomized Sinclair S-1 minipigs: an animal model of osteopenia and trabecular plate perforation”, *Bone*, Vol. 14 No. 3, pp. 379–382.
- 83.Muschler, G. F.; Boehm, C.; Easley, K. (1997): Aspiration to obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: the influence of aspiration volume. In: *J Bone Joint Surg Am* 79 (11), S. 1699–1709.
- 84.Nguyen, T. B. L., Min, Y.K. and Lee, B.-T. (2015), “Nanoparticle biphasic calcium phosphate loading on gelatin-pectin scaffold for improved bone regeneration”, *Tissue engineering. Part A*, Vol. 21 No. 7-8, pp. 1376–1387.
- 85.Niemeyer, P.; Krause, U.; Punzel, M.; Fellenberg, J.; Simank, H-G (2003): Mesenchymale Stammzellen zum Tissue Engineering von Knochen: Dreidimensionale osteogene Differenzierung auf mineralisiertem Kollagen. In: *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 141 (6), S. 712–717. DOI: 10.1055/s-2003-812397.
- 86.Oduncu, F.S., Schroth, U., Vossenkuhl, W. (2002): *Stammzellenforschung und therapeutisches Klonen: Mit 9 Tabellen*. Göttingen: Vandenhoeck & Ruprecht; (Medizin - Ethik - Recht; vol 1)
- 87.Olbrich, A., Felder, S., Herausgeber: Schwartz, F. W. (2003) *Knochen- und Knochenersatzmaterialien zur parodontalen Regeneration oder zum Knochenaufbau für Implantate - ein gesundheitsökonomisches HTA [Internet]*. VOL: 33 (1. Auflage). 2003 [zitiert am 25.05.2014]. URL: http://portal.dimdi.de/de/hta/hta_berichte/hta033_bericht_de.pdf
- 88.Otsu, N. (1979): A threshold selection method from gray level histograms. In: *IEEE Trans. Syst. Man Cybern*, 9 (1979): 62–66
- 89.Pan, X.-H.; Yang, X.-Y.; Yao, X.; Sun, X.-M.; Zhu, L.; Wang, J.-X. et al. (2014): Bone-marrow mesenchymal stem cell transplantation to treat diabetic nephropathy in tree shrews. In: *Cell Biochem. Funct.* DOI: 10.1002/cbf.3037.

- 90.Petersen, B. E.; Bowen, W. C.; Patrene, K. D.; Mars, W. M.; Sullivan, A. K.; Murase, N. et al. (1999): Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells. In: Science 284 (5417), S. 1168–1170.
- 91.Phinney, D.G., Kopen, G., Righter, W., Webster, S., Tremain, N. and Prockop, D.J. (1999), “Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells”, Journal of cellular biochemistry, Vol. 75 No. 3, pp. 424–436.
- 92.Pittenger, M. F. (1999): Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. In: Science 284 (5411), S. 143–147. DOI: 10.1126/science.284.5411.143.
- 93.Prockop, D. J. (1997): Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. In: Science 276 (5309), S. 71–74. DOI: 10.1126/science.276.5309.71.
- 94.Quintanilla-Martinez, L.; Tinguely, M.; Bonzheim, I.; Fend, F. (2012): Knochenmarkbiopsie: Aufarbeitung und Einsatzmöglichkeiten molekularpathologischer Methoden. In: Pathologe 33 (6), S. 481–489. DOI: 10.1007/s00292-012-1647-z.
- 95.Ramírez, M., Lucia, A., Gómez-Gallego, F., Esteve-Lanao, J., Pérez-Martínez, A., Foster, C., Andreu, A.L., Martin, M.A., Madero, L., Arenas, J. and García-Castro, J. (2006), “Mobilisation of mesenchymal cells into blood in response to skeletal muscle injury”, British journal of sports medicine, Vol. 40 No. 8, pp. 719–722.
- 96.Reed, Louis Juden; Raghupathy, Radha; Strakhan, Marianna; Philbeck, Thomas E.; Kim, Mimi Y.; Battini, Ramakrishna et al. (2011): The OnControl bone marrow biopsy technique is superior to the standard manual technique for hematologists-in-training: a prospective, randomized comparison. In: Hematol Rep 3 (3), S. e21. DOI: 10.4081/hr.2011.e21.
- 97.Reichert, J.C., Saifzadeh, S., Wullschleger, M.E., Epari, D.R., Schütz, M.A., Duda, G.N., Schell, H., van Griensven, M., Redl, H. and Hutmacher, D.W. (2009), “The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research”, Biomaterials, Vol. 30 No. 12, pp. 2149–2163.
- 98.Reiser, M., Kuhn, F.-P., Debus, J. (2011): Radiologie. 3. Aufl. Stuttgart: Thieme, S. 67
- 99.Rentsch, C., Rentsch, B., Scharnweber, D., Zwipp, H., & Rammelt, S. (2012). Knochenersatz. Der Unfallchirurg, 115(10), 938-949.

- 100.Richter, W. (2005): Stammzellen in der Knorpelforschung. In: Akt Traumatol 35 (5), S. 249–254. DOI: 10.1055/s-2005-865948.
- 101.Riedel, F.; Goessler, U. R.; Stern-Straeter, J.; Riedel, K.; Hörmann, K. (2008): Regenerative Medizin. Chancen für die rekonstruktive Kopf-Hals-Chirurgie. In: HNO 56 (3), S. 262–274. DOI: 10.1007/s00106-007-1604-y.
- 102.Riley, R. S.; Hogan, Thomas F.; Pavot, Dawn R.; Forysthe, Robert; Massey, Davis; Smith, Eileen et al. (2004): A pathologist's perspective on bone marrow aspiration and biopsy: I. Performing a bone marrow examination. In: J. Clin. Lab. Anal. 18 (2), S. 70–90. DOI: 10.1002/jcla.20008.
- 103.Ringe, J.; Kaps, C.; Schmitt, B.; Büscher, K.; Bartel, J.; Smolian, H. et al. (2002): Porcine mesenchymal stem cells. Induction of distinct mesenchymal cell lineages. In: Cell Tissue Res. 307 (3), S. 321–327. DOI: 10.1007/s00441-002-0525-z.
- 104.Rochefort, G.Y., Delorme, B., Lopez, A., Hérault, O., Bonnet, P., Charbord, P., Eder, V. and Domenech, J. (2006), “Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia”, Stem cells (Dayton, Ohio), Vol. 24 No. 10, pp. 2202–2208.
- 105.Rössler, H.; Rüther, W.; Pitzen, P. (2005): Orthopädie und Unfallchirurgie. 19., aktualisierte und erw. Aufl. München, Jena: Elsevier, Urban und Fischer, 200-201.
- 106.Sánchez-Ramos, J. R. (2002): Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. In: J. Neurosci. Res. 69 (6), S. 880–893. DOI: 10.1002/jnr.10337.
- 107.Schenk, R.K. and Willenegger, H.R. (1977), “Zur Histologie der primären Knochenheilung. Modifikationen und Grenzen der Spaltheilung in Abhängigkeit von der Defektgrösse”, Unfallheilkunde, Vol. 80 No. 5, pp. 155–160.
- 108.Schmitt-Graeff, A.; Mattern, D.; Köhler, H.; Hezel, J.; Lübbert, M. (2000): Myelodysplastisches Syndrom (MDS). In: Der Pathologe 21 (1), S. 1–15. DOI: 10.1007/s002920050001.
- 109.Schnarkowski, P., Rédei, J., Peterfy, C.G., Weidenmaier, W., Mutschler, W., Arand, M. and Reiser, M.F. (1995), “Tibial shaft fractures: assessment of fracture healing with computed tomography”, Journal of computer assisted tomography, Vol. 19 No. 5, pp. 777–781.

110. Schöler, H. R. (2004): Das Potenzial von Stammzellen. Eine Bestandsaufnahme. In: Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz 47 (6), S. 565–577. DOI: 10.1007/s00103-004-0818-3.
111. Shambrott, M. J.; Axelman, J.; Wang, S.; Bugg, E. M.; Littlefield, J. W.; Donovan, P. J. et al. (1998): Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. In: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95 (23), S. 13726–13731.
112. Siska, P.; Gruen, G. S.; Menzel, C.; Pape, H. C. (2009): Externe Supportiva zur Förderung der Frakturheilung. In: Unfallchirurg 112 (1), S. 6–14. DOI: 10.1007/s00113-008-1537-2.
113. Snover, D. C. (1989): Biopsy interpretation in bone marrow transplantation. In: Pathol Annu 24 Pt 2, S. 63–101.
114. Spiekermann, K..(2011) Zytomorphologie [Internet]. Medizinische Klinik und Poliklinik der LMU 2011 [zitiert am 14.06.2014]. URL: <http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Medizinische-Klinik-und-Polklinik-III/de/leukaemiediagnostik/zytomorphologie/index.html>
115. Stürmer, K.M. (1987), “Histomorphologie der Frakturheilung im Vergleich der Fixationsverfahren am Tibiaschaft”, in Schmit-Neuerburg, K.P. and Stürmer, K.M. (Eds.), Die Tibiaschaftfraktur beim Erwachsenen, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 23–49.
116. Stürmer, K. M. (1996): Pathophysiologie der gestörten Knochenheilung. In: Der Orthopäde 25 (5), S. 386–393. DOI: 10.1007/s001320050039.
117. Swords, R. T.; Anguita, J.; Higgins, R. A.; Yunes, A. C.; Naski, M.; Padmanabhan, S. et al. (2011): A prospective randomised study of a rotary powered device (OnControl) for bone marrow aspiration and biopsy. In: Journal of Clinical Pathology 64 (9), S. 809–813. DOI: 10.1136/jclinpath-2011-200047.
118. Thorwarth, M., Schultze-Mosgau, S., Kessler, P., Wiltfang, J. and Schlegel, K.A. (2005), “Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite”, Journal of oral and maxillofacial surgery official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons, Vol. 63 No. 11, pp. 1626–1633.

- 119.Tögel F., Lange C., Zander A. R., Westenfelder C. (2007): Regenerative Medizin mit adulten Stammzellen aus dem Knochenmark. In: Deutsches Ärzteblatt 2007; 104(23):A 1663–70.
- 120.Vanhelleputte, P.; Nijs, K.; Delforge, M.; Evers, G.; Vandershueren, S. (2003): Pain during bone marrow aspiration: prevalence and prevention. In: Journal of Pain and Symptom Management 26 (3), S. 860–866. DOI: 10.1016/S0885-3924(03)00312-9.
- 121.Viola, J., Lal, B., Grad, O. (2004): The Emergence of Tissue Engineering as a Research Field [Internet]. 2004 [zitiert am 03.05.2014]. URL: www.nsf.gov/pubs/2004/nsf0450/emergence.htm
- 122.Voigt, J.; Mosier, M. (2013): A powered bone marrow biopsy system versus manual methods: a systematic review and meta-analysis of randomised trials. In: Journal of Clinical Pathology 66 (9), S. 792–796. DOI: 10.1136/jclinpath-2013-201605.
- 123.von Holst, A, Faissner, A (2009:.. Im gemachten Nest – Struktur und Funktionen neuraler Stammzellnischen. Neuroforum, 2/09: 44-55
- 124.Whelan, D. B.; Bhandari, M.; Stephen, D.; Kreder, H.; McKee, M. D.; Zdro, R.; Schemitsch, E. H. (2010): Development of the radiographic union score for tibial fractures for the assessment of tibial fracture healing after intramedullary fixation. In: J Trauma 68 (3), S. 629–632. DOI: 10.1097/TA.0b013e3181a7c16d.
- 125.Wieser, C. (1964): Die primäre Knochenbruchheilung und ihre Störung im Röntgenbild. In: Arch. f. klin. Chir 308 (1), S. 434–440. DOI: 10.1007/BF01576558.
- 126.Willmer, M. (2012) Natural tissue engineering : Plastizität zirkulierender Stammzellen im gesunden kardialen Milieu [Dissertation]. Giessen: Justus-Liebig-Universität.
- 127.Wobus, A. M.; Holzhausen, H.; Jäkel, P.; Schöneich, J. (1984): Characterization of a pluripotent stem cell line derived from a mouse embryo. In: Experimental Cell Research 152 (1), S. 212–219. DOI: 10.1016/0014-4827(84)90246-5.
- 128.Wulf, G.G., Chapuy, B. and Trümper, L. (2006), “Mesenchymale Stammzellen des Knochenmarks. Phänotyp, Aspekte der Biologie und klinische Perspektiven”, Medizinische Klinik (Munich, Germany 1983), Vol. 101 No. 5, pp. 408–413.

- 129.Yoo, J.U. and Johnstone, B. (1998), "The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair", Clinical orthopaedics and related research, No. 355 Suppl, pp. S73-81.
- 130.Zhao, X., Kim, J., Cezar, C.A., Huebsch, N., Lee, K., Bouhadir, K. and Mooney, D.J. (2011), "Active scaffolds for on-demand drug and cell delivery", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Vol. 108 No. 1, pp. 67-72.
- 131.Zilles, K.; Tillmann, B. (2010): Anatomie. Mit 121 Tabellen. Heidelberg: Springer-Medizin-Verl. (Springer-Lehrbuch), 318.
- 132.Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P. and Hedrick, M.H. (2001), "Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies", Tissue engineering, Vol. 7 No. 2, pp. 211-228.
- 133.Zuk, P.A., Zhu, M., Ashjian, P., De Ugarte, Daniel A, Huang, J.I., Mizuno, H., Alfonso, Z.C., Fraser, J.K., Benhaim, P. and Hedrick, M.H. (2002), "Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells", Molecular biology of the cell, Vol. 13 No. 12, pp. 4279-4295.

I Anhang

Wertetabelle

Methode/ Seite/ Entnahme-ort	Tier- Versuchs- Nr. (1)	Nadel- insertion [s]	Asp.- volumen [ml]	Asp.dauer bis 10 ml [s] (2)	Asp.- dauer [s] (2)	Bröckel [Stk/ Ausstrich]	Stichkanal- vol. [Voxel]	Zellzahl [Mio] (3)	Kulturdauer [Tage]
OC/R/B	3	2	14	160	224	1,60	10,85	1,83	9
OC/R/B	4	3	23	159	365,9	1,80	16,25	5,57	10
OC/R/B	5	3	14	314	440	0,50	13,44	1,30	10
OC/R/B	7	3	12	180	216	wegen Mandibularabszeß euthanasiert			
OC/R/B	8	4	18	200	360	6,20	17,46	0,30	16
OC/R/B	9	3	13	277	359,9	1,63	16,23	0,43	14
OC/R/B	10	4	14	218	305	0,80	9,25	0,24	13
OC/R/B	11	2	13	99	129	2,50		0,00	16
OC/R/B	12	4	16	181	290	2,00		0,07	14
OC/R/B	13	3	18	175	315	1,20	12,58	1,13	12
OC/R/B	14	3	12	175	210	1,00		0,47	14
OC/R/B	15	4	15	148	222	2,67		0,04	14
OC/R/B	211715	5	16	163	361			2,30	12
OC/R/B	211343	2	16	235	376			1,10	11
OC/R/B	211717	3	16	51	82			3,00	11
OC/R/F	3	6	12	92	111	2,33	22,54	0,68	9
OC/R/F	4	7	12	92	111	2,60	7,83	0,80	10
OC/R/F	5	5	9			5,50	13,61	1,50	10
OC/R/F	7	3	7			wegen Mandibularabszeß euthanasiert			
OC/R/F	8	5	18	111	200	0,8	21,88	0,18	16
OC/R/F	9	6	18	79	141,6	2,75	77,25	0,11	14
OC/R/F	10	5	9			1,83		0,35	13
OC/R/F	11	2	7			0,60		0,00	16
OC/R/F	12	7	3			0,00		0,02	14
OC/R/F	13	7	6			1,40		0,00	12
OC/R/F	14	7	12	25	30	3,50		0,35	14
OC/R/F	15	5	10	200	200	3,50		0,00	14
OC/R/F	211715	6	15	165	247,5			0,65	12
OC/R/F	211343	5	15	115	172			0,20	11
OC/R/F	211717	6	15	24	36			0,15	11
J/L/B	3	8	12	277	332,3	0,80	19,02	0,67	9
J/L/B	4	12	14	185	258,5	3,40	7,52	1,06	10
J/L/B	5	8	15	166	248,5	1,83	7,38	1,61	10
J/L/B	7	8	16	161	257	wegen Mandibularabszeß euthanasiert			
J/L/B	8	9	20	180	360	2,40	14,91	0,28	16
J/L/B	9	8	19	123	232,75	0,83	11,03	0,23	14
J/L/B	10	9	20	175	349	2,00	22,17	0,26	13
J/L/B	11	9	10	205	205	3,25		0,34	16
J/L/B	12	8	16	138	221	2,00		0,02	14
J/L/B	13	9	17	205	349	2,40	23,83	0,35	12
J/L/B	14	9	13	238	310	1,33		0,63	14
J/L/B	15	8	10	240	240	4,20		0,04	14
J/L/B	211715	9	14	150	210			1,80	12
J/L/B	211343	8	16	169	271			1,85	11
J/L/B	211717	8	16	139	222			1,25	11
J/L/F	3	38	12	86	103	2,20	50,15	1,66	9
J/L/F	4	8	13	133	173,3	0,80	1,33	0,05	10
J/L/F	5	16	15	133	200	2,20	56,04	1,33	10
J/L/F	7	40	9			wegen Mandibularabszeß euthanasiert			
J/L/F	8	14	12	*		2,40	16,04	(0,00)	16
J/L/F	9	12	11	*		1,00	24,71	(0,29)	14
J/L/F	10	11	13	*		0,60	33,42	(0,10)	13
J/L/F	11	14	2			0,80		0,00	16
J/L/F	12	10	5			3,25		0,02	14
J/L/F	13	10	15	*		3,00		(1,38)	12
J/L/F	14	12	7			5,00		0,58	14
J/L/F	15	10	10	200	200	4,80		0,11	14
J/L/F	211715	9	15	80	120			1,75	12
J/L/F	211343	9	17	63	106			1,60	11
J/L/F	211717	9	16	22	35			0,30	11

Tab. 4: Auflistung der erhobenen Messdaten

(1) Tier-Versuchs-Nr. des jeweiligen Grundversuchs

Tier-Versuchs-Nr.:3-15 = erstes Versuchsvorhaben im Rahmen der Mandibulärenregeneration

Tier-Versuchs-Nr.: 211715, 211343, 211717 = zweites Versuchsvorhaben

(2) Beim Becken Summe aus bis zu 3 Aspirationen.

(3) Zellzahlen in Klammern wurden nach initial erfolgloser Aspiration an einer etwas abweichenden Stelle entnommen, hier wurden stellenweise hohe Volumina gewonnen. Da bei initial erfolgreicher Aspiration aber auch Volumina unter zehn Milliliter als Endergebnis akzeptiert wurden, wurden diese Zellzahlen in der schließenden Statistik als nicht erfolgreich einbezogen.

(*) = initial erfolglose Aspiration mit erneuter Punktionsanwendung an leicht abweichender Stelle, keine Messung erfolgt.

OC = OnControl Aspiration System; J = A-MAX Aspirationsnadel (Jamshidi); R = rechts; L = links; B = Becken; F = Femur

Thesen

1. Für die Rekonstruktion von Hartgewebedefekten stellt das Tissue Engineering von Knochengewebe aus mesenchymalen Stammzellen (MSC) einen neuen Therapieansatz als mögliche Alternative zu autologen Knochentransplantaten dar.
2. Die Knochenmarkaspiration ist eine Möglichkeit der effizienten und wenig belastenden Gewinnung von MSC.
3. Das Göttinger Minischwein stellt durch seine Ähnlichkeit der mechanischen Eigenschaften und der Physiologie des Knochens zum menschlichen Knochen ein geeignetes Tiermodell dar.
4. Verglichen wurden eine automatisierte Knochenmarkaspirationsnadel (OnControl Aspiration System) und eine konventionelle Jamshidi- Hohlnadel (A-MAX).
5. An einem Tierkollektiv von 15 Göttinger Minischweinen wurde durch Messungen der prozeduralen Effektivität und des postinterventionellen Knochentraumas vergleichend geprüft, ob eine Modifikation der Aspirationsmethode oder des Aspirationsortes einen Vorteil bezüglich Patientenbelastung, Knochentrauma oder Ausbeute an MSC ermöglicht.
6. Die Anwendung der automatisierten Knochenmarkaspirationsnadel verkürzt signifikant die Insertionszeit der Nadel in den Markraum.
7. Die Aspirationsdauer bis zum Erreichen einer Knochenmarkmenge von 10 ml, die postinterventionellen Schmerzen, die Wundheilung, die Anzahl an Knochenmarkkonglomerate im Ausstrich und die Ausbeute an MSC in der Primärkultur unterscheiden sich nicht bei Anwendung konventioneller oder automatisierter Knochenmarkaspirationsnadeln.
8. Das postinterventionelle Knochentrauma kann in der Computertomographie gut dargestellt und volumetrisch vermessen werden.
9. Eine volumetrische Knochendefektmessung und Auswertung der entstandenen Kollateraldefekte mit Hilfe von CT-Aufnahmen zeigen keinen signifikanten Unterschied der Methoden.
10. Der Heilungsverlauf unterscheidet sich bildmorphologisch nach 8 Wochen, hier bestehen signifikant häufiger hyperdense Areale um die Stichkanäle nach Anwendung der konventionellen Methode.

11. Durch Knochenmarkaspiration aus dem Femurknochen kann die Aspirationsdauer signifikant verkürzt werden, dies stellt aber keinen praktikablen Ansatz für die Entnahme beim Menschen dar.
12. Die Ausbeute an MSC in der Primärkultur kann durch die Aspiration mehrerer kleiner Knochenmarkvolumina aus dem Beckenknochen signifikant gesteigert werden.
13. Beide Knochenmarkaspirationsmethoden erbringen zufriedenstellende Ergebnisse.
14. Die automatisierte Knochenmarkaspirationsnadel kann aufgrund ihrer Reduktion der Anwendungsdauer und geringeren Störung der postinterventionellen Knochendefektheilung zu einer geringeren Belastung der Patienten beitragen.

Selbstständigkeitserklärung zur Dissertation

Ich erkläre ausdrücklich, dass es sich bei der von mir eingereichten schriftlichen Arbeit mit dem Titel: „Vergleichende Analyse konventioneller und automatisierter Knochenmarkaspirationsnadeln hinsichtlich der prozeduralen Effektivität, der Gewinnung mesenchymaler Stammzellen und des postinterventionellen Knochentraumas“ um eine von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasste Arbeit handelt.

Ich erkläre ausdrücklich, dass ich sämtliche in der oben genannten Arbeit verwendeten fremden Quellen, auch aus dem Internet (einschließlich Tabellen, Grafiken u. Ä.) als solche kenntlich gemacht habe. Insbesondere bestätige ich, dass ich ausnahmslos sowohl bei wörtlich übernommenen Aussagen bzw. unverändert übernommenen Tabellen, Grafiken u. Ä. (Zitaten) als auch bei in eigenen Worten wiedergegebenen Aussagen bzw. von mir abgewandelten Tabellen, Grafiken u. Ä. anderer Autorinnen und Autoren (Paraphrasen) die Quelle angegeben habe.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. med. Dr. med. dent. Frerich für die Überlassung des interessanten Themas, seine gute Unterstützung und Beratung danken.

Herrn Dr. med Jan Liese danke ich für seine tolle und sehr engagierte Betreuung, immer freundliche und geduldige Unterstützung sowie stets hilfsbereite Art.

Vielen Dank an Herrn Daniel Wolter für die nette Gesellschaft und tolle Anleitung im Labor und Herrn Dr. med. dent. Daniel Welly für die Bereitstellung weiterer Versuchstiere.

Ich danke Herrn Reinhard Schwärmer und Herrn Roland Gerber für die gute Pflege der Tiere und ihre Hilfe beim Transport der Minischweine.

Für die Erlaubnis der Nutzung ihrer CT-Geräte danke ich dem Institut für Diagnostische und Interventionelle Radiologie und der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie in Rostock.

Meinen Eltern, Elisa und Alex möchte ich herzlichst für ihre Liebe, Geduld und Hilfe in allen Lebenslagen danken.