

Aus dem Institut für Immunologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Julius Wolff Institut und dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Virchow Klinikum, Berlin

**FACS- und Expressionsanalyse des
ovinen Osteotomie- und Weichteilhämatoms
24, 36 und 48 Stunden post Osteotomie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Claudia Martin
Tierärztin
aus Frankfurt/Oder

Berlin, 2013
Journal-Nr.: 3671

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Prof. Dr. Michael F. G. Schmidt
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Georg N. Duda
Dritter Gutachter: PD Dr. Michael Veit

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

bone fractures, hematoma, factor analysis, cell differentiation, inflammation

Tag der Promotion: 28.05.2014

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-495-7

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2013

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2014

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	9
2	STAND DER WISSENSCHAFT	12
2.1	Knochen	12
2.2	Zellen des Knochens	14
2.2.1	<i>Osteoblasten</i>	14
2.2.2	<i>Osteozyten</i>	14
2.2.3	<i>Osteoklasten</i>	15
2.3	Fraktur	15
2.4	Frakturheilung	15
2.4.1	<i>Direkte Knochenheilung</i>	16
2.4.2	<i>Indirekte Knochenheilung</i>	16
2.4.3	<i>Verzögerte oder ausbleibende Knochenheilung</i>	18
2.5	Frakturhämatom	18
2.6	Zellen der Frakturheilung	19
2.6.1	<i>CD 45⁺ Leukozyten</i>	20
2.6.2	<i>CD 14⁺ Monozyten, Makrophagen</i>	20
2.6.3	<i>CD 21⁺ reife B-Zellen</i>	21
2.6.4	<i>CD 5⁺ T-Lymphozyten</i>	21
2.6.5	<i>CD 8⁺ cytotoxische T-Lymphozyten</i>	21
2.6.6	<i>CD 4⁺ T-Helferzellen</i>	21
2.6.7	<i>CD 25⁺ aktivierte und regulatorische T-Lymphozyten</i>	22
2.6.8	<i>CD31⁺ Endothelzellen</i>	22
2.6.9	<i>CD 19⁺ B-Lymphozyten</i>	22
2.6.10	<i>CD 34⁺ hämatopoetische Stammzellen</i>	23
2.6.11	<i>CD 73⁺ mesenchymale Stammzellen</i>	23

2.7	Einflussfaktoren auf die Frakturheilung.....	23
2.7.1	Zytokine	24
2.7.2	Wachstumsfaktoren	27
2.7.3	Transmembrane Transportproteine	30
2.7.4	Transkriptionsfaktoren	31
2.7.5	Extrazelluläre Matrixproteine.....	31
2.8	Tiermodell	33
2.9	Fixateur externe.....	33
2.10	Zielsetzung	34
3	MATERIAL UND METHODEN	36
3.1	Materialien und Bezugsquellen.....	36
3.1.1	Geräte und Software.....	36
3.1.2	Verbrauchsmaterial.....	37
3.1.3	Chemikalien.....	38
3.1.4	Medikamente	40
3.2	Methoden.....	40
3.2.1	Versuchsablauf.....	40
3.2.2	Versuchstiere	41
3.2.3	Fixateur externe	41
3.2.4	Operatives Vorgehen.....	42
3.2.5	Blutentnahme	44
3.2.6	Tötung.....	45
3.2.7	Hämatomentnahme.....	45
3.2.8	FACS-Analyse	45
3.2.9	Molekularbiologische Untersuchung	47
3.2.10	Statistische Analyse	54
4	ERGEBNISSE	55
4.1	Ergebnisse der FACS Untersuchung.....	55
4.1.1	CD 45	56

4.1.2	CD 14	57
4.1.3	CD 21	58
4.1.4	CD 5	59
4.1.5	CD 8	60
4.1.6	CD 4	61
4.1.7	CD 25	63
4.1.8	CD 31	66
4.2	Ergebnisse der PCR	67
4.2.1	BMP-2	67
4.2.2	CD 19	68
4.2.3	CD 34	69
4.2.4	CD 73	70
4.2.5	GDF-8	71
4.2.6	GLUT 1	72
4.2.7	HIF 1 α	73
4.2.8	HMOX 1	74
4.2.9	IL-1 β	75
4.2.10	IL-2	76
4.2.11	IL-2R α	77
4.2.12	IL-6	78
4.2.13	IL-10	79
4.2.14	OPN	80
4.2.15	PDGF	82
4.2.16	TGF β 1	83
4.2.17	TNF α	84
4.2.18	VEGF	85
4.2.19	vWF	86
5	DISKUSSION	87
5.1	Diskussion des Materials und der Methoden	88
5.1.1	Versuchsablauf	88
5.1.2	Fixateur extern	90
5.1.3	FACS-Analyse	90

5.1.4	<i>Molekularbiologische Untersuchung</i>	90
5.2	Diskussion der Ergebnisse	92
5.2.1	<i>Die Zusammensetzung des initialen Hämatoms ist ein entscheidender Faktor für den Erfolg der Knochenheilung und wird durch die umliegenden Gewebe beeinflusst</i>	92
5.2.2	<i>Das initiale Hämatom ist ein Reservoir proinflammatorischer Faktoren</i>	94
5.2.3	<i>Antiinflammatorische Faktoren treten zu einem etwas späteren Zeitpunkt auf und dämpfen die Entzündungsreaktion ein - im Osteotomiehämatom verläuft dieser Prozess mit einer größeren Intensität</i>	95
5.2.4	<i>Die nach der Ruptur der versorgenden Gefäße auftretende Hypoxie fällt im Osteotomiehämatom deutlich stärker aus als im Weichteilhämatom</i>	96
5.2.5	<i>Angiogenese, als eine Reaktion auf die Hypoxie, wird im Osteotomiehämatom schneller und stärker vorangetrieben als im Weichteilhämatom</i>	96
5.2.6	<i>Osteogene Faktoren treten bereits nach 48 Stunden auf und kennzeichnen den Beginn der Wiederherstellung des Knochens</i>	98
5.2.7	<i>Nach Beendigung der Untersuchungen ist eine detailliertere Darstellung der Anfangsphase der Frakturheilung möglich</i>	99
6	ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	102
7	LITERATURVERZEICHNIS	106
8	ANHANG	115
8.1	Abkürzungsverzeichnis	115
8.2	Tabellenverzeichnis	119
8.3	Abbildungsverzeichnis	120

1 Einleitung

"Es gibt 1 000 Krankheiten, aber nur eine Gesundheit." Mit wenigen Worten spiegelt das Zitat von Ludwig Börne (Börne, 1987) wider, welchen hohen individuellen und gesellschaftlichen Wert die Gesundheit hat. Gerade im Zeitalter der Leistungsgesellschaft und der Solidargemeinschaft, in dem individuelle Lebensgestaltung und gesteigerte Risikobereitschaft eine große Rolle spielen, ist die Erhaltung bzw. Wiederherstellung des körperlichen und seelischen Wohlergehens ein großes Ziel. Ca. 800.000 Frakturen werden jährlich in Deutschlands Krankenhäusern versorgt. Dabei ist die Häufigkeit der Verletzungen des Skeletts in den letzten 10 Jahren um 15% gestiegen (Statistisches Bundesamt, 2012). Einen beträchtlichen Anteil an der gravierenden Zunahme der Knochenbrüche dürften veränderte Lebensgewohnheiten und die gestiegene Risikobereitschaft haben. Risikosportarten wie z.B. Snowboarding und Mountainbiking, welche in einem rasanten Tempo ausgeführt werden und im Falle eines Sturzes die Kräfte direkt auf den Körper einwirken lassen, bringen häufig Verletzungen des Bewegungsapparates mit sich. Ein weiterer Aspekt ist die gestiegene Lebenserwartung, die sich unter anderem aus der Verbesserung der Lebensumstände und des medizinischen Fortschritts ergibt. Das Wohlbefinden des Einzelnen im hohen Alter sollte ein Ziel der Gesellschaft sein, wenngleich die Gefahr von Verletzungen mit dem Alter steigt. Auch der Anspruch an eine möglichst lang anhaltende Mobilität ist hoch.

Trotz großer Fortschritte treten dennoch bei 10 bis 20 % aller Frakturen Heilungsstörungen auf (Haas, 2000). 5 bis 10 % der Frakturen heilen nur verzögert oder gar nicht (Bostrom und Camacho, 1998; Dimitriou et al., 2005). In Deutschland belaufen sich die prozentualen Angaben für das Vorkommen der verzögerten Frakturheilung und der Pseudarthrosenbildung im Jahr 2010 auf 2 %. Diesbezüglich kam es in den letzten 10 Jahren zu einer Verdopplung der Problemfälle (Statistisches Bundesamt, 2012).

64 % aller Frakturen sind solche der langen Röhrenknochen (Statistisches Bundesamt, 2012). Alle genannten Gründe rechtfertigen es dieses Thema aufzugreifen und die Vorgänge, die während der Frakturheilung ablaufen, zu untersuchen, um Frakturheilungsstörungen behandeln oder gar vermeiden zu können.

Was weiß man zum heutigen Zeitpunkt? Die Heilung von Knochengewebe läuft nach einem bestimmten Schema ab (siehe Abb. 1.1.), welches, vor allem in der Anfangsphase, ähnlich auch im Weichteilgewebe zu finden ist. Die Ergebnisse sind jedoch sehr unterschiedlich. Der Knochen besitzt das Potential sich vollständig zu regenerieren und ist dann wieder ohne

Einschränkungen funktionstüchtig und belastbar. Andere Gewebe heilen unter Narbenbildung aus, was nicht selten, z.B. bei großflächigen Verletzungen oder an ungünstigen Lokalisationen, durch den Narbenzug zu Problemen wie Strikturen und Bewegungseinschränkungen führt. Auch ästhetische Gesichtspunkte spielen dabei eine große Rolle (Ferguson und O'Kane, 2004).

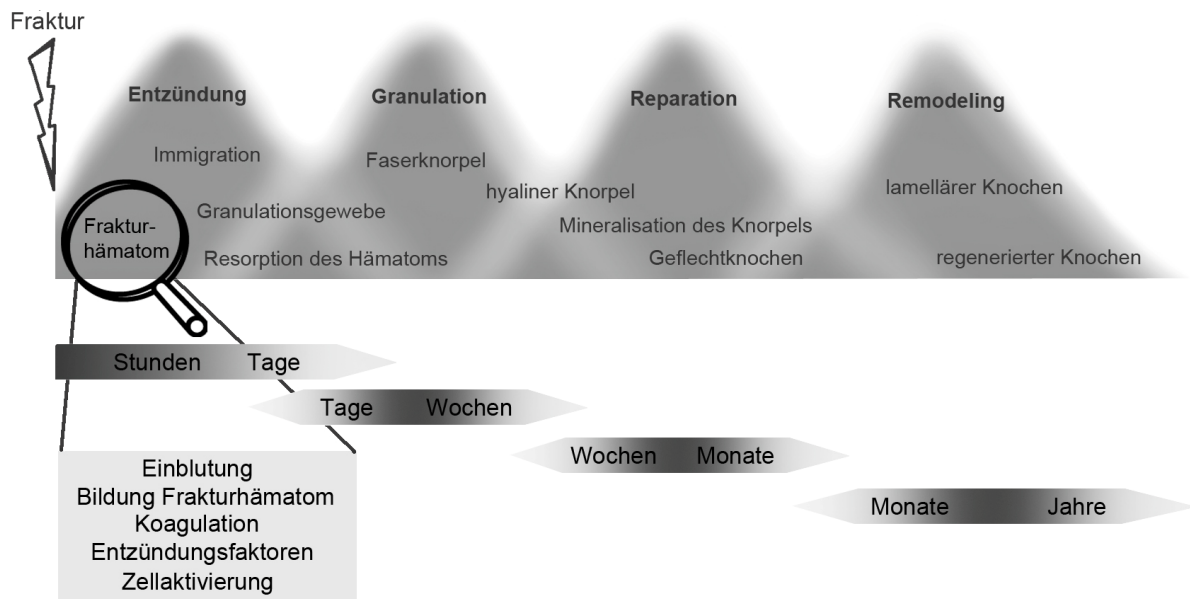


Abbildung 1.1.

Der Prozess der Frakturheilung, dargestellt in vier, sich überlappenden Phasen (nach Kolar et al., 2010)

Dennoch führt nicht jede Verletzung zwangsläufig zur Narbenbildung. Untersuchungen an Säugetierembryonen zeigten, dass Blessuren der Haut, zugefügt in der ersten Hälfte der Gravidität, narbenfrei ausheilen. Zu diesem Zeitpunkt ist das Immunsystem des Embryos noch nicht vollständig entwickelt, so dass deutlich weniger und primitivere Immunzellen an der Wiederherstellung beteiligt sind. Hinzu kommt, dass das Verteilungsmuster verschiedener Wachstumsfaktoren unterschiedlich ist. Vor allem den drei Isoformen von TGF β wird eine entscheidende Funktion in der narbenfreien Heilung bzw. der Heilung mit Narbenbildung zugeschrieben (Ferguson und O'Kane, 2004). Wie bereits erwähnt, spielt das Immunsystem ebenfalls eine entscheidende Rolle. Schon lange ist bekannt, dass die zu Beginn einer Fraktur hervorgerufene Entzündungsreaktion essentiell für eine erfolgreiche Heilung ist. Wird diese Reaktion z.B. durch die Hemmung der Cyclooxygenasen eingedämmt, verzögert sich auch

gleichzeitig die Knochenheilung (Phillips, 2005). Die angestoßene Entzündungsreaktion stellt einen kaskadenartigen Ablauf von Ereignissen dar, über den sowohl die zelluläre als auch die molekulare Zusammensetzung des Frakturhämatoms bestimmt wird. Die weitestgehende Unversehrtheit der umliegenden Gewebe (Ozaki et al., 2000) ist dabei ebenso wichtig wie die Erhaltung des Frakturhämatoms an sich. Es konnte belegt werden, dass die Entfernung des Frakturhämatoms zur Heilungsverzögerung führt (Grundnes und Reikeras, 1993). Mizuno und Mineo gingen bei ihren Untersuchungen sogar so weit und transplantierten Frakturhämatome sowohl unter das Periost eines unversehrten Knochens als auch in Muskelgewebe (Mizuno et al., 1990). Aus den Ergebnissen wurde die Schlussfolgerung gezogen, dass das Frakturhämatom osteogenetisches Potenzial besitzt, welches sowohl nach der subperiostalen als auch intramuskulären Transplantation zu einer Knochenneubildung führt. Ein weiterer, wichtiger Aspekt ist das zeitgleiche Auftreten beider Hämatomarten in einem Frakturgeschehen. Gesehen werden solche Konstellationen vor allem in Frakturen, die unter großem Energieeinfluss entstehen, wodurch zusätzlich ein großer Weichteilschaden hervorgerufen wird. Die Heilungsaussichten solcher Brüche sind eher vorsichtig zu beurteilen (Austin, 1977; Hulth, 1980).

Im Focus der Arbeit steht der Knochen mit seinem Aufbau und im Falle seiner Verletzung dessen Fähigkeiten zur vollständigen Regeneration. Die Untersuchungen beziehen sich auf die zeitige Phase der Frakturheilung - die Entzündungsphase. Die zelluläre Zusammensetzung des Frakturhämatoms und die molekularbiologischen Vorgänge werden beleuchtet, insbesondere werden proinflammatorische, antiinflammatorische, hypoxische, angiogenetische und osteoinduktive Parameter bestimmt.

Die formulierte Hypothese lautet, dass sich das Osteotomiehämatom in der zellulären Zusammensetzung im Vergleich zum Weichteilhämatom von diesem unterscheidet. Außerdem wird behauptet, dass die Expression ausgewählter Zytokine, Transkriptions- und Wachstumsfaktoren, transmembraner Transport- und extrazellulärer Matrixproteine in beiden Hämatomen unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Darauf basierend wird folgende Kernthese aufgestellt:

Die inflammatorische Reaktion im frakturierten Knochen ist auf Grund der Nähe zum Knochenmark strikter geregelt als im Weichteilhämatom.

2 Stand der Wissenschaft

2.1 Knochen

Knochen gehören zu den Bindegeweben und stellen einen der festesten Bestandteile des Körpers dar. Die Aufgaben der Knochen sind vielfältig und beinhalten vor allem die Stützfunktion des Körpers und den Schutz innerer Organe. Aber auch als Stoffwechselorgan besitzen die Knochen große Bedeutung (Remedios, 1999). Ihrer Form nach werden platte Knochen, kurze Knochen, lufthaltige Knochen, unregelmäßige Knochen und Röhrenknochen unterschieden (Waldeyer, 2003). Das *Os tibiae* gehört zu den langen Röhrenknochen. Die Enden des Knochens bilden die Epiphysen (siehe Abb. 2.1.). Diese sind an den Gelenkflächen mit Knorpel überzogen. Im Inneren der Epiphysen befindet sich die *Substantia spongiosa*, in welcher sich Bestandteile des hämatopoetischen Systems befinden (Remedios, 1999). Im Bereich zwischen den Knochenenden liegt der Schaft, auch Diaphyse genannt. Dieser erhält seine Festigkeit durch die umgebende Kortikalis (*Substantia compacta*), welche den Markraum mit dem Knochenmark umschließt. Der Markraum ist mit dem Endost ausgekleidet. Die Übergangszonen von der Diaphyse zu den Epiphysen werden als Metaphysen bezeichnet. In diesen Regionen findet das Längenwachstum statt. Äußerlich ist der gesamte Knochen, mit Ausnahme der knorpelüberzogenen Gelenkflächen, von der Knochenhaut (*Periost*) bedeckt. Das *Periost* besteht aus zwei Schichten. Die äußere faserhaltige Schicht führt Nerven und Blutgefäße zur Versorgung des Knochens. Der innere Teil des Periosts (Kambiumschicht) ist zellreich und bietet vor allem ein Reservoir an Osteoprogenitorzellen (Remedios, 1999; Simmons, 1985) und Wachstumsfaktoren (Malizos und Papatheodorou, 2005). Sharpey`sche Fasern bilden als Verlängerung der periostalen kollagenen Fasern die Verbindung zum Knochengewebe (Malizos und Papatheodorou, 2005). Anhand des Feinbaus des Knochens kann man lamelläre Knochen und Geflechtknochen unterscheiden. Geflechtknochen findet man während der Embryonalentwicklung und bei der Frakturheilung als Vorstufe für den lamellären Knochen (Remedios, 1999). Die Grundstruktur des Lamellenknochens besteht aus einer Anordnung von Osteonen, auch Havers-System genannt. Im Zentrum der Osteone befinden sich die Havers-Kanäle, die Gefäße zur Blutversorgung, Nerven und Lymphbahnen führen. In den Osteonen liegen in Lakunen eingebettet die Osteozyten. Um diese herum befindet sich das konzentrisch geschichtete,

mineralisierte Knochengewebe (Osteoid). Durch die Schichtung primärer und sekundärer Havers-Systeme entsteht eine Lamellenstruktur (Dunning, 2002).

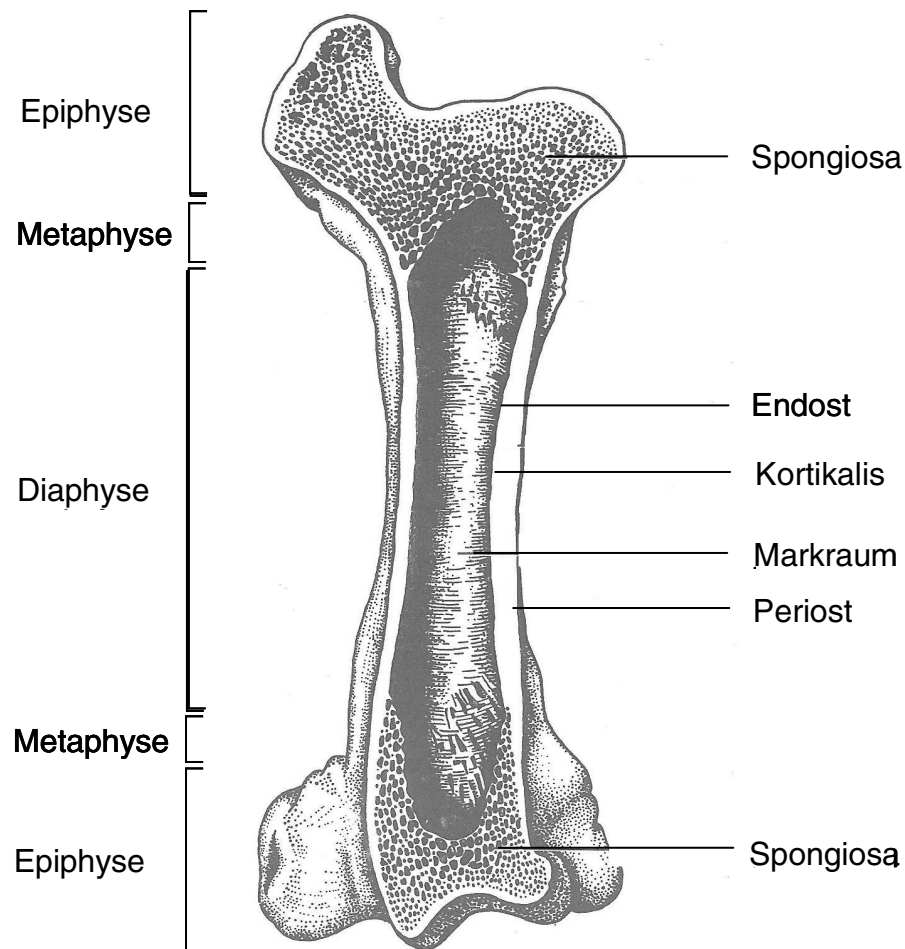


Abbildung 2.1.

Längsschnitt durch einen Röhrenknochen (Femur) (nach Michel, Salomon und Gutte, 1986)

Die osteogenen Zellen des Knochens (Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten) bilden zusammen mit Kollagen Typ I und verschiedenen Proteoglykanen die organischen Komponenten des Knochens (Dunning, 2002; Remedios, 1999). Die organische Phase besitzt einen Anteil von etwa 35%. Der restliche, anorganische Anteil von 65 % besteht aus einer mineralischen, festen Phase (Hadjidakis und Androulakis, 2006). Kalziumphosphat, Kalziumkarbonat und Phosphat (Hydroxylapatit) sind dabei die Hauptkomponenten (Michel, Salomon und Gutte, 1986; Schmidmaier und Wildemann, 2006). Durch die Anlagerung der Mineralien an die organischen Bestandteile wird das Gewebe zu einer festen Substanz.

2.2 Zellen des Knochens

Die ständig stattfindenden Auf- und Umbauprozesse werden im gesunden Knochen durch Osteoblasten und Osteoklasten realisiert. Es ermöglicht dem Knochen sich individuell, dem Wolffschen Gesetz folgend, an die gegebenen Druck- und Belastungsverhältnisse anzupassen (Wolff, 1892).

2.2.1 Osteoblasten

Osteoblasten differenzieren sich aus den mesenchymalen Stammzellen der Kambiumschicht und des Knochenmarks (Dunning, 2002; Remedios, 1999). Dieser Vorgang, der von Urist als Osteoinduktion bezeichnet wird (Urist, 1965), kann durch eine Vielzahl von Stimuli ausgelöst werden (Hofmann et al., 2009). Osteoblasten synthetisieren Osteoid und zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus über die Produktion von alkalischer Phosphatase die Mineralisation der extrazellulären Matrix in Gang zu setzen (Hofmann et al., 2009; Remedios, 1999). Zudem konnte von Bouletreau et. al. gezeigt werden, dass Osteoblasten aktiv am Prozess der Revaskularisierung beteiligt sind. In Folge verschiedener Stimuli, wie Hypoxie und einem niedrigeren pH-Wert, produzieren sie VEGF (Bouletreau et al., 2002). Gegenspieler der Osteoblasten sind die Osteoklasten, deren Differenzierung und Funktion z.B. über die Sekretion von RANKL gesteuert wird (Hofmann et al., 2009).

2.2.2 Osteozyten

Osteozyten entwickeln sich aus Osteoblasten. Es sind die reifen Stadien der die Knochengrundsubstanz bildenden Zellen, die zu diesem Zeitpunkt, in Lakunen liegend, vollständig von Matrix umgeben sind. Über feine Zellfortsätze stehen Osteozyten untereinander in Verbindung, um Ionen und kleine Moleküle austauschen zu können (Parfitt, 2002; Remedios, 1999).

2.2.3 Osteoklasten

Die Zellen, welche mit der Aufgabe der Resorption betraut sind, sind die Osteoklasten. Es sind große, mehrkernige Zellen, die durch die Fusion mononukleärer Zellen aus der hämatopoetischen Zelllinie entstehen (Schmidmeier und Wildemann, 2006). Sie liegen größtenteils in Nestern, in sogenannten Howship-Lakunen an der Oberfläche des Knochens (Remedios, 1999). Während des Remodelings lagern sich Osteoklasten an mineralisierte Matrix an und geben Proteasen und Säuren an ihre Umgebung ab. Diese bewirken die Entmineralisierung der Matrix und den Abbau der organischen Komponenten. Die Abbauprodukte werden über Vesikel ins Innere der Zellen transportiert. Schließlich werden die Osteoklasten entweder apoptotisch oder gehen in einen inaktiven Zustand über (Schindeler et al., 2008).

2.3 Fraktur

Frakturen werden als vollständige oder unvollständige Kontinuitätsunterbrechung des Knochens definiert und treten auf, wenn die Grenze der Belastbarkeit überschritten wird. Der Ursprung einer Fraktur kann sehr vielfältig sein. Durch Zugkräfte an Sehnen können Abrissfrakturen, durch Druck Kompressionsfrakturen, durch Einwirkung von Biegekräften Biegefrakturen oder durch Rotationsbewegungen Torsionsfrakturen entstehen (Rössler und Rüter, 2007). Autefage zeigte in seinen Untersuchungen die Zusammenhänge zwischen der am Knochen einwirkenden Kraft (Zug, Kompression, Biegung, Drehung) und dem oft typischen Frakturtyp, welcher daraufhin entsteht (Autefage, 2000). Weitere Einteilungsmöglichkeiten ergeben sich zum Beispiel aus dem Ausmaß der Weichteilverletzung (geschlossene bzw. offene Fraktur) und aus der Anzahl der Bruchstücke (Trümmerfrakturen) (Rössler und Rüter, 2007).

2.4 Frakturheilung

Die Heilung einer Fraktur unterscheidet sich grundsätzlich von der Heilung anderer Gewebe des Körpers: Knochen ist in der Lage ohne Narbenbildung auszuheilen (Giannoudis et al., 2007; McKibbin, 1978; Remedios, 1999). Daher kann dieser Prozess als Regeneration

bezeichnet werden, wohingegen man bei der Wiederherstellung anderer Gewebe (z.B. Muskel- oder Bindegewebe) unter Narbenbildung von Reparatur spricht (Braun und Ruter, 1996). Bei der Frakturheilung werden sehr komplexe Vorgänge in Gang gesetzt, die in ihrer Abfolge bestimmten Gesetzmäßigkeiten folgen (Simmons, 1985). Direkt nach dem Eintreten einer Fraktur beginnt eine Entzündungsreaktion, der eine Reparaturphase folgt. Die Frakturheilung endet mit dem Abschluss des Umbaus in lamellären Knochen (Remedios, 1999). Die Phasen (siehe Abb. 1.1.) können in ihrer zeitlichen Ausdehnung variieren und gehen fließend ineinander über (Kolar et al., 2010). In Abhängigkeit des Abstandes und der Stabilität der Frakturenenden zueinander, kann man die direkte von der indirekten Frakturheilung unterscheiden, deren wesentliches Differenzierungsmerkmal das Vorhandensein bzw. Nicht-Vorhandensein von Kallus darstellt (Sturmer, 1996).

2.4.1 Direkte Knochenheilung

Voraussetzung für die direkte oder auch primäre Knochenheilung ist der Kontakt, die anatomisch korrekte Reposition, eine gewisse Kompression und die absolute Stabilität der Frakturenenden (Remedios, 1999). Die Havers-Systeme haben dann die Möglichkeit, die Frakturlinie direkt zu überbrücken (Verzapfung), und selbst die abgestorbenen Frakturenenden der Kortikalis werden rekanalisiert statt resorbiert (Cornell und Lane, 1992). Die Überbrückung geschieht ohne Bildung eines Kallus. Bereiche, in denen die Frakturenenden keinen direkten Kontakt haben, werden mit neuer Knochensubstanz aufgefüllt (Braun und Ruter, 1996). Bei der direkten Frakturheilung kann zwischen einer Kontaktheilung mit dicht aneinander liegenden Frakturenenden ($<0,01$ mm) und einer Spalthheilung mit einem Frakturspalt von weniger als 1 mm (Cornell und Lane, 1992; Remedios, 1999) bzw. weniger als 0,5 mm (Dunning, 2002) unterschieden werden.

2.4.2 Indirekte Knochenheilung

Besteht ein Frakturspalt von mehr als 1 mm spricht man von der indirekten Frakturheilung. Durch das Eintreten einer Fraktur werden umliegende Blutgefäße zerstört. Es kommt zur Bildung eines Hämatoms im Frakturspalt und aufgrund der Durchtrennung der Versorgungsbahnen zu einer Minderversorgung des betroffenen Gewebes mit Sauerstoff und

einem ungenügenden Abtransport von Stoffwechselprodukten. Der pH-Wert in dieser Region sinkt und Zellen sterben ab. Nekrosen der Frakturrenden und des umliegenden Gewebes und eine akute, aseptische Entzündung sind die Folge (Braun und Ruter, 1996; Dunning, 2002; Simmons, 1985). Durch das Absterben von Osteozyten am Frakturspalt werden lysosomale Enzyme freigesetzt, die ein Auflösen der organischen Matrix bewirken. Akute-Phase-Proteine wie Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) werden durch die ersten Entzündungszellen (Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten) freigesetzt. Sie aktivieren durch ihr Auftreten eine Enzymkaskade, womit die Entzündungsreaktion verstärkt und weitere Zellen angelockt werden (Einhorn, 2005; Remedios, 1999). Infolge der Entzündung führen vasoaktive Substanzen zu einer Vasodilatation im umliegenden Gewebe (Simmons, 1985). Die zelluläre Antwort wird des Weiteren u.a. von TGF β , PDGF, VEGF, TNF α und BMPs unterstützt und koordiniert. Diese beeinflussen nicht nur die Rekrutierung von Entzündungszellen sondern auch von mesenchymalen Stammzellen aus dem Periost, dem Knochenmark, dem umliegenden Gewebe und auch aus dem zirkulierenden Blut (Schindeler et al., 2008). Bereits in dieser Phase der Frakturheilung beginnen Osteoklasten und Makrophagen mit der Resorption abgestorbenen Materials (Cornell und Lane, 1992). Das Hämatom aus Thrombozyten und nun auch Granulozyten und Makrophagen wird durch einsprossende Blutgefäße und Fibroblasten sowie einem Netz aus Fibrin organisiert und bildet die erste Überbrückung des Knochendefektes. Das Ziel der Granulationsphase ist der sogenannte „weiche Kallus“ (Braun und Ruter, 1996; Remedios, 1999). Pluripotente, mesenchymale Zellen im Granulationsgewebe differenzieren sich zu Chondroblasten und letztendlich zu reifen Chondrozyten. In diesem Prozess der enchondralen Ossifikation wird die gebildete extrazelluläre Matrix kalzifiziert und erzeugt in diesem Bereich eine stabile Überbrückung der Fraktur. Von der Kambiumschicht des Periosts stammende Osteoprogenitorzellen differenzieren sich zu Osteoblasten und bilden im Bereich des Periosts eine Manschette aus Geflechtknochen. Im Gegensatz zur enchondralen Ossifikation verläuft dieser Prozess ohne die vorherige Anlage von Knorpel. Dies wird intramembranöse Ossifikation genannt (Bolander, 1992; Schindeler et al., 2008). In der Reparaturphase wird der weiche, aus Knorpel bestehende Kallus durch einen harten Kallus aus Geflechtknochen ersetzt. Dieser wird anschließend in der Phase des Remodelings in lamellären Knochen umgewandelt (Kolar et al., 2010). Dieser abschließende Prozess kann mehrere Monate bis Jahre in Anspruch nehmen und richtet sich nach dem Wolffschen Gesetz (Cornell und Lane, 1992). Die Frakturheilung endet mit der vollständigen Wiederherstellung der Funktion und

Belastbarkeit des Knochens. Der Ablauf der Frakturheilung wurde schematisch in Abb. 1.1. dargestellt.

2.4.3 *Verzögerte oder ausbleibende Knochenheilung*

Trotz des großen regenerativen Potentials des Knochengewebes kann es immer wieder zur verzögerten oder ausbleibenden Heilung von Frakturen kommen. Bei 5 bis 10 % der Patienten werden solche ernsthaften Komplikationen festgestellt (Bostrom und Camacho, 1998; Einhorn und Lane, 1998). Eine ausreichende Blutversorgung, Kontakt der Fragmentenden und die relative Stabilität (dynamische Stabilität) der Fraktur sind die Grundlagen jeder Knochenbruchheilung. Können diese Voraussetzungen nicht gewährleistet werden, kommt es zur verzögerten Frakturheilung oder Pseudarthrosenbildung. Die Blutversorgung kann entweder bei der Entstehung der Fraktur stark in Mitleidenschaft gezogen oder während operativer Maßnahmen beschädigt worden sein (Sturmer, 1996). Andere, die Durchblutung beeinträchtigende Faktoren spielen ebenfalls eine Rolle. So können sich z.B. arterielle Erkrankungen, die ggf. durch Nikotinkonsum hervorgerufen werden, negativ auswirken. Bei dem Fragmentkontakt und der Stabilität gibt es eine gewisse Varianz, je nachdem ob die direkte oder indirekte Frakturheilung angestrebt ist. Bei einer Distanz von mehr als 3 bis 4 mm besteht jedoch die Gefahr einer Bruchheilungsstörung. Schwierigkeiten ergeben sich gleichermaßen bei ausgedehnten Knochennekrosen einer oder beider Fragmentenden infolge einer Entzündung. Im Gegensatz dazu beeinflusst die Durchblutungsförderung durch die Bewegung der umgebenden Muskulatur die Knochenheilung positiv (Muhr, 1997).

2.5 Frakturhämatom

Durch das Auftreten einer Fraktur wird nicht nur die Kontinuität des Knochens unterbrochen, sondern auch die der Blutgefäße. Betroffen sind sowohl die Gefäße des Knochenmarks und des Periosts als auch die des umliegenden Gewebes. Die Zusammenhangstrennung verursacht ein Einbluten in den Frakturspalt und damit die Bildung eines Hämatoms (Schmidt-Bleek et al., 2009). Somit sind die im Blut vorhandenen Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten und Mastzellen u.a. die ersten Zellen im Bereich der Fraktur (Martin und Leibovich, 2005). Thrombozyten bilden eine Barriere, die den Verlust weiteren Blutes verhindern und durch

Degranulation chemotaktisch aktive Stoffe freisetzen (Malizos und Papatheodorou, 2005). Kurze Zeit später wird das Hämatom v.a. von weiteren Granulozyten, Monozyten und Mastzellen infiltriert. Mastzellen fördern über die Freisetzung von Heparin und Histamin die Entzündungsreaktion (Schmidmaier und Wildemann, 2006). Weitere Bestandteile des Hämatoms sind Entzündungszellen und mesenchymale Stammzellen aus dem zirkulierenden Blut sowie dem Knochenmark. Die Immunzellen werden durch die in Gang gesetzte Gerinnungskaskade aktiviert (Kolar et al., 2010). Das Frakturhämatom kann als essentieller Bestandteil der Frakturheilung angesehen werden, da es als Ausgangspunkt der Entzündungsreaktion gilt (Kolar et al., 2010). Ohne Entzündungsreaktion ist wiederum eine Fraktur nicht in der Lage zu heilen (Phillips, 2005).

Das Frakturhämatom gilt als Quelle verschiedener Signalstoffe; unter ihnen Interleukine (IL-1, IL-6 und TNF α), PDGF, VEGF und Mitglieder der TGF β -Familie (Giannoudis et al., 2007). Untersuchungen von Grundnes und Reikeras zeigten, dass die Entfernung des Frakturhämatoms unmittelbar nach Eintreten der Fraktur deren Heilung deutlich weniger beeinträchtigte als zu einem späteren Zeitpunkt, an dem das Hämatom bereits eine organisierte Struktur aufwies (Grundnes und Reikeras, 1993).

2.6 Zellen der Frakturheilung

Das Immunsystem stellt ein komplexes System von Geweben, Zellen und Zellprodukten dar. Zu den immunologisch aktiven Zellen gehören Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten. Alle Blutzellen entstammen den hämatopoetischen Stammzellen, welche hauptsächlich im Knochenmark zu finden sind. Von dort gelangen sie an den jeweiligen Ort ihrer Weiterentwicklung bzw. ihres Wirkens. Granulozyten gehören zu den Zellen der unspezifischen (angeborenen) Abwehr. Sie verteidigen den Körper gegen Bakterien, Parasiten und Pilze im Blut oder im Gewebe. Monozyten bzw. Makrophagen sind zur Phagozytose befähigte Zellen. Sie sind sowohl im Blut (Monozyten) als auch in den Geweben (Makrophagen) zu finden. Eine Spezialform der Makrophagen bilden die Knochen resorbierenden Osteoklasten. Lymphozyten stellen die dritte Gruppe der Leukozyten dar. Sie sind in allen Geweben des Organismus anzutreffen und bilden die spezifische (erworbene) Abwehr. B-Lymphozyten reagieren auf Antigenkontakt mit der Bereitstellung von Antikörpern. T-Lymphozyten reifen im Thymus. Dort erhalten sie ihre Spezifität gegen

bestimmte Antigene und treten dann in den Blutkreislauf über. Sie produzieren verschiedene Signalmoleküle, die im gesamten Körper wirken. Schon seit längerem weiß man, dass Immunzellen vor allem in der zeitigen Phase der Wundheilung eine große Rolle spielen. Sie sind in der Lage verschiedene Faktoren zu synthetisieren, die ihrerseits chemotaktisch wirksam sind, als Wachstumsfaktoren oder Proteasen auftreten (DiPietro, 1995) und damit den Heilungsprozess koordinieren (Andrew et al., 1994). Von Interesse für diese Arbeit sind vor allem die aus der lymphoiden Stammzellreihe hervorgehenden T-Lymphozyten. Die verschiedenen Cluster of Differentiation (CD) dienen der Zuordnung der einzelnen Zellen zu den verschiedenen Zellpopulationen.

2.6.1 CD 45⁺ Leukozyten

CD 45 ist ein transmembranöses Glykoprotein, welches auf allen kernhaltigen, hämatopoetischen Zellen, den Leukozyten, zu finden ist. Zu den Leukozyten gehören verschiedene Untergruppen, die mit Hilfe der FACS-Analyse weiter differenziert werden können.

2.6.2 CD 14⁺ Monozyten, Makrophagen

Der Rezeptor CD 14 befindet sich auf Monozyten und Makrophagen zur Erkennung von bakteriellen Lipopolysacchariden (Ziegler-Heitbrock und Ulevitch, 1993). Er kann zur Identifizierung von Makrophagen und deren Vorstufe genutzt werden. Sie gehören zum Mononukleären Phagozytensystem und sind zur Phagozytose befähigt. Monozyten bzw. Makrophagen werden als Schlüsselfaktoren in der Entzündungsphase gesehen. Einerseits sind sie selbst sehr sensibel gegenüber verschiedenen Stimuli, andererseits sezernieren sie ungefähr 100 unterschiedliche biologisch aktive Substanzen. Unter ihnen auch Wachstumsfaktoren wie PDGF und TGF β (Probst und Spiegel, 1997) oder Zytokine wie IL-1 und TNF α (Canalis et al., 1988). Durch das Freisetzen dieser Faktoren werden unter anderem Osteoblasten und Osteoklasten aktiviert und dadurch die Frakturheilung beeinflusst.

2.6.3 *CD 21⁺ reife B-Zellen*

Das Molekül CD 21, auch als Komplementrezeptor 2 bezeichnet, befindet sich ausschließlich auf reifen B-Zellen, weshalb es zur Bestimmung dieser Zellgruppe herangezogen werden kann (el Habbal und Strobel, 1993). Im Körper dient es der Bindung von Antigenen an die B-Zelle. Die Hauptfunktion der B-Zellen ist die Bildung von Antikörpern zum Zweck der Infektabwehr.

2.6.4 *CD 5⁺ T-Lymphozyten*

Die Bestimmung CD 5⁺ Zellen lässt eine Abgrenzung der T-Lymphozyten von den B-Lymphozyten an der Gesamtanzahl der Leukozyten zu. T-Lymphozyten sind über die Synthese verschiedenster Lymphokine an der Regulation der Knochenheilung beteiligt. Innerhalb der T-Lymphozyten unterscheidet man cytotoxische T-Lymphozyten und T-Helferzellen.

2.6.5 *CD 8⁺ cytotoxische T-Lymphozyten*

An der Zelloberfläche cytotoxischer T-Zellen wird charakteristischerweise das CD 8 Molekül exprimiert (Park und Barbul, 2004). Es dient im Rahmen unserer Untersuchungen der Abgrenzung von T-Helferzellen. Cytotoxische T-Zellen zerstören Zellen, die mit Erregern infiziert sind, indem sie bei ihnen ein Apoptoseprogramm auslösen (Janeway, 2002).

2.6.6 *CD 4⁺ T-Helferzellen*

CD 4⁺, unreife T-Zellen (T_H0) sind in der Lage sich entweder in proinflammatorische T-Zellen (T_H1) oder in Helferzellen (T_H2) zu differenzieren. Sie sezernieren jeweils unterschiedliche Zytokine. IL-2 wird von T_H1-Zellen und IL-6 von T_H2-Zellen exprimiert

(Park und Barbul, 2004). Zellen, die den IL-2 Rezeptor, mit allen drei Untereinheiten exprimieren, werden in Folge der Verbindung mit IL-2 zur Proliferation und Produktion verschiedener anderer Interleukine und Tumornekrosefaktoren angeregt.

2.6.7 *CD 25⁺ aktivierte und regulatorische T-Lymphozyten*

Im Laufe der Reifung der T-Lymphozyten wird das Molekül CD 25 exprimiert. CD 25 stellt die α -Kette des IL-2-Rezeptors (IL 2R α) dar und ist somit ein Merkmal aktivierter und regulatorischer T-Zellen. Die Anzahl der auf der Zelloberfläche präsentierten CD 25 Antigene lässt, über die FACS-Analyse und die Wahl der geeigneten Gates, die Differenzierung in aktivierte (CD 25⁺) und regulatorische (CD 25⁺⁺ oder CD 25^{high}) T-Zellen zu. Regulatorische T-Zellen fördern die Entwicklung der nicht-hämatopoetischen, multipotenten Stammzellen (Liu et al., 2011). Die Produktion von immunregulativen Faktoren wie IL-10 und TGF β wirkt sich ebenfalls positiv auf die Knochenheilung aus (Geiger und Tauro, 2012).

2.6.8 *CD31⁺ Endothelzellen*

CD 31 oder auch PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule-1) ist ein 130 kDa großes Transmembranprotein mit über 65 kb, welches von Endothelzellen präsentiert wird (DeLisser et al., 1994). Es interagiert mit Leukozyten und ermöglicht den Entzündungszellen die Diapedese während eines entzündlichen Prozesses (Martin und Leibovich, 2005). Des Weiteren spielt es vermutlich während der Angiogenese eine Rolle für die Verbindung von Endothelzellen untereinander (DeLisser et al., 1994). Damit dient CD 31 als Endothelzellmarker, dessen Anstieg als Zeichen der Revaskularisierung gesehen werden kann.

2.6.9 *CD 19⁺ B-Lymphozyten*

Als zuverlässigster Oberflächenmarker von Zellen der B-Zelllinie aller Reifestadien gilt CD 19 (Uckun et al., 1988). Er ist aus zwei extrazellulären Domänen und einem intrazellulär gelegenen Anteil aufgebaut (Zhou et al., 1991).

2.6.10 CD 34⁺ hämatopoetische Stammzellen

Dieses Glykophosphoprotein ist ein Oberflächenantigen hämatopoetischer Stammzellen und kann als Marker für die frühe Phase der Zellentwicklung gesehen werden. Hämatopoetische Stammzellen sind der Ausgangspunkt aller Hämocyten, so auch der an der Wundheilung beteiligten T-Lymphozyten und Monozyten/Makrophagen. Hämatopoetische Stammzellen finden sich im Knochenmark und wandern von dort aus an die Orte ihres Wirkens bzw. ihrer Weiterentwicklung. CD 34 wird auch auf Endothelzellen kleinerer Gefäße exprimiert. Es vermittelt dort die Leukozytenadhäsion in einem Entzündungsgeschehen (Krause et al., 1996).

2.6.11 CD 73⁺ mesenchymale Stammzellen

CD 73 ist ein auf der Oberfläche mesenchymaler Stammzellen befindliches Antigen, welches als Hinweis auf das Vorhandensein von Stammzellen gesehen und zur Differenzierung und Abgrenzung zu hämatopoetischen Stammzellen herangezogen werden kann (Chamberlain et al., 2007). Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind in der Lage sich vielfältig weiter zu entwickeln (mesenchymale Gewebe wie z.B. Knochen, Knorpel, Sehnen, Muskel und Fett). Die Quellen mesenchymaler Stammzellen in der Knochenheilung sind das Knochenmark, das Granulationsgewebe, das Periost, das Endost und auch das umliegende Weichteilgewebe mit dem Gefäßsystem (Dimitriou et al., 2005). Nach Knochenläsionen vermitteln sie durch die Entwicklung zu Osteoblasten und Chondrozyten die Knochenheilung. Liu et. al. untersuchten das Zusammenwirken von regulatorischen T-Zellen und MSC während der Heilung frakturierter Knochen. Es zeigt sich ein positiver Effekt auf das Knochenmark durch MSC in Verbindung mit CD 4⁺, CD 25⁺ und FoxP3⁺ (regulatorischen) T- Zellen (Liu et al., 2011).

2.7 Einflussfaktoren auf die Frakturheilung

Die Einflussfaktoren auf die Frakturheilung sind äußerst vielfältig. Dazu gehören neben allgemeinen Einflüssen wie dem Alter, der Ernährung und dem Gesundheitszustand bzw. Vorerkrankungen (Infektionen, Diabetes mellitus (Ai-Aql et al., 2008)) des Patienten auch

aktuelle medikamentöse Therapien (Kortikosteroide, COX 2 Inhibitoren, bestimmte Antibiotika, Antikoagulantien) und Nikotinkonsum. Die Lokalisation der Fraktur, die Ausdehnung der Läsion, die Art der Frakturversorgung und die Stabilität selbiger sind maßgeblich an der Heilung beteiligt. Nicht zuletzt spielen auch genetische Faktoren und die allgemeine Knochengesundheit eine Rolle (Hayda et al., 1998; Pape et al., 2010; Schindeler et al., 2008; Xie et al., 2008). Als systemische Faktoren stehen verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, transmembrane Transport- und extrazelluläre Matrixproteine im Focus der Untersuchungen. Frakturen werden durch sie beeinflusst, im positiven oder auch im negativen Sinne. Die koordinierte Interaktion dieser Faktoren ist ebenfalls eine Grundvoraussetzung für einen reibungslosen Heilungsverlauf. Kleinste Defizite können zu Komplikationen im Heilungsverlauf führen (Giannoudis et al., 2007).

2.7.1 Zytokine

Zytokine sind Glykoproteine, die von den verschiedensten Zellen sezerniert werden und durch die Bindung an die passenden Rezeptoren autokrine, parakrine oder zum Teil auch endokrine Reaktionen hervorrufen (Janeway, 2002). Sie werden nur bei Bedarf exprimiert. Aufgrund der kurzen Halbwertszeiten der Zytokine spiegelt der Nachweis der jeweiligen mRNA den jeweiligen aktuellen Bedarf der einzelnen Zytokine wieder (Fitzgerald et al., 2001).

2.7.1.1 Interleukin-1 β (IL-1 β)

Interleukin-1 ist ein Polypeptid mit einer Größe von 17 bis 18 kDa, welches in zwei Formen existiert: IL-1 α und IL-1 β . Die Aminosäurezusammensetzung beider ist ähnlich, genauso wie die biologische Aktivität (Canalis et al., 1988). Interleukin-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches die Knochenresorption stimuliert. Es gelingt einerseits durch die Stimulation der vorhandenen Osteoklasten ihre resorptiven Kapazitäten zu steigern (Kon et al., 2001) und durch Stimulation der hämatopoetischen Progenitorzellen sich zu Osteoklasten zu entwickeln (Kon et al., 2001). Andererseits erfolgt die Wirkung indirekt durch die Anwesenheit von Osteoblasten (Canalis et al., 1988), wobei die Proliferation der Präosteoblasten durch IL-1 β stimuliert wird (Lange et al., 2010). Interleukin-1 wird von

Makrophagen und Epithelzellen produziert und beeinflusst die T-Zell- und Makrophagenaktivierung über die Stimulation der IL-2 Produktion. Die Bildung wird auch durch die Anwesenheit von Lipopolysacchariden (LPS) in Bakterienzellwänden induziert (Canalis et al., 1988; Einhorn et al., 1995; Kon et al., 2001).

2.7.1.2 *Interleukin-2 (IL-2)*

Interleukin-2 wird von T-Zellen sezerniert, wie bereits erwähnt vor allem von T_H1-Zellen und bewirkt eine Proliferation der T-Zellen (Park und Barbul, 2004). IL-2 kann somit als T-Zellwachstumsfaktor angesehen werden und besitzt proinflammatorische Eigenschaften (Canalis et al., 1988).

2.7.1.3 *Interleukin-2 Rezeptor α (IL-2R α)*

Der Rezeptor für Interleukin-2 besteht aus 3 Untereinheiten, einer β - und einer γ -Kette, die gemeinsam auf ruhenden T-Zellen exprimiert werden und eine geringe Affinität für IL-2 haben, und einer α -Einheit (IL-2R α bzw. CD 25), die den Rezeptor in einen für IL-2 hoch affinen Rezeptor umwandelt. Ruhende T-Zellen werden durch die Verbindung von IL-2 und diesem Rezeptor aktiviert und treten in den Zellzyklus ein (Janeway 2002). IL-2R α kann daher als Marker für aktivierte und regulatorische T-Zellen verwendet werden. Diese fördern die Proliferation der T-Zellen und damit die Produktion immunregulativer Faktoren. Unter ihnen antiinflammatorische Zytokine wie IL-10 und TGF β (Canalis et al., 1988; Geiger und Tauro, 2012; Park und Barbul, 2004). In großen Mengen und in Verbindung mit FoxP3, einem Transkriptionsfaktor der forkhead-Familie, entfalten die regulatorischen T-Zellen antiinflammatorische Eigenschaften (Zheng und Rudensky, 2007). Die regulatorischen T-Zellen fördern mesenchymale Stammzellen, welche ihrerseits immunoregulatorisch wirksam sind. Sie reduzieren inflammatorische Zytokine und fördern dadurch die Knochenheilung (Liu et al., 2011).

2.7.1.4 *Interleukin-6 (IL-6)*

Zusammen mit IL-1 und TNF α spielt Interleukin-6 eine große Rolle bei der Initiierung der Frakturheilungskaskade. IL-6 wird vor allem von Makrophagen und von T-Helferzellen (T_H2-Zellen) sezerniert. Außerdem wird es von mesenchymalen Vorläuferzellen des Periosts produziert, unterstützt die Differenzierung knochenresorbierender Zellen aus Vorläuferzellen und wirkt chemotaktisch auf andere inflammatorische Zellen (Dimitriou et al., 2005; Einhorn et al., 1995). Es besteht ein Synergismus zwischen Interleukin-1 β und Interleukin-6, wobei IL-6 durch IL-1 β induziert wird (Bataille et al., 1992).

2.7.1.5 *Interleukin-10 (IL-10)*

Interleukin-10 ist ein Zytokin, welches immunmodulatorisch tätig ist. Es wird durch regulatorische T-Zellen gebildet und wirkt antiinflammatorisch. Diese Eigenschaft entfaltet IL-10 über die Beeinflussung der Produktion proinflammatorischer Mediatoren in myeloiden Zellen. Diese verlieren die Fähigkeit, proinflammatorische Faktoren herzustellen. IL-10 ist damit in der Lage, Entzündungsreaktionen einzudämmen (Grutz, 2005; Toben et al., 2011).

2.7.1.6 *Tumornekrosefaktor α (TNF α)*

TNF α ist ein multifaktorieller Signalstoff, der von den verschiedensten Zellen produziert und bei lokalen und systemischen Entzündungen vor allem durch aktivierte Makrophagen freigesetzt wird. Er besitzt eine endothelaktivierende Wirkung und ist in der Lage, die Leukozytenadhäsion am Gefäßendothel zu steigern (Kon et al., 2001). Des Weiteren findet eine Stimulation der IL-1 Produktion statt (Canalis et al., 1988). Gemeinsam regen diese Zytokine die Rekrutierung mesenchymaler Stammzellen, die Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu Osteoklasten in der zeitigen Phase der Frakturheilung und damit die Resorption nekrotischen Gewebes an (Dimitriou et al., 2005; Gerstenfeld et al., 2003; Malizos und Papatheodorou, 2005).

2.7.2 Wachstumsfaktoren

Wachstumsfaktoren sind Polypeptide, die durch verschiedene Gewebe und Zellen synthetisiert werden. Diese wirken sowohl autokrin als auch parakrin. Die Einteilung kann aufgrund ihrer Herkunft in a) von Knochenzellen synthetisierte, b) aus Knochenmatrix isolierte und c) von umliegenden Zellen synthetisierte Wachstumsfaktoren erfolgen (Canalis et al., 1988). Die meisten Wachstumsfaktoren werden als Vorstufen freigesetzt und durch Proteolyse in ihre aktiven Spaltprodukte mit einem niedrigeren Molekulargewicht umgewandelt (Solheim, 1998).

2.7.2.1 Transforming growth factors β superfamily

Zu dieser Familie von Wachstumsfaktoren gehören 34 Mitglieder. Zusammengefasst sind unter anderem die Gruppe der Bone morphogenetic proteins (BMPs), der Growth and differentiation factors (GDFs) und die Transforming growth factors (TGFs) (Marsell und Einhorn, 2009).

2.7.2.1.1 Transforming growth factor β 1 (TGF β)

Den transformierenden Wachstumsfaktoren gehören zwei Gruppen an, TGF α und TGF β , wobei TGF α nicht aus Knochengewebe isoliert werden konnte. TGF β ist ein hoch konserviertes Polypeptid bestehend aus 2 Untereinheiten, die über Disulfidbrücken verbunden sind und ein molekulares Gewicht von 25 kDa besitzen (Canalis et al., 1988). In Abhängigkeit der Untereinheiten wird TGF β nochmals in 3 Gruppen eingeteilt: TGF β 1 und TGF β 2 bestehen je aus identischen, TGF β 1.2 aus unterschiedlichen Untereinheiten. TGF β 1 wird in hohem Maße auch in nicht frakturierten Knochen exprimiert (Cho et al., 2002).

Innerhalb der ersten 24 Stunden nach Frakturintritt wird TGF β von Thrombozyten in das Hämatom abgegeben (Bolander, 1992; Cornell und Lane, 1992). Des Weiteren wird TGF β auch von Osteoblasten als inaktive Form sezerniert und in das Osteoid eingebettet. Die aktivierte Form des TGF β entsteht im sauren Milieu und wird während der Resorptionsphase

der Frakturheilung freigesetzt (Bostrom und Asnis, 1998), reguliert sodann die Zellteilung und –differenzierung vor allem der Osteoblasten und fördert die Synthese von Kollagen (Rosier et al., 1998). Die Freigabe aus der Knochenmatrix wird durch Hormone wie das Parathormon gefördert (Canalis et al., 1988). Weiterhin ist TGF β ein sehr potent chemotaktisch wirksamer Signalstoff für mesenchymale Stammzellen (Dimitriou et al., 2005; Martin und Leibovich, 2005). Verschiedene Studien weisen auf die positive Beeinflussung der Frakturheilung durch TGF β hin (Rosier et al., 1998).

2.7.2.1.2 *Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2)*

Alle BMPs besitzen eine ähnliche chemische Struktur, dennoch variieren die Funktionen dieser Proteine. Die BMPs werden vier verschiedenen Gruppen zugeordnet: Zur Gruppe 1 gehören BMP-2 und BMP-4, in der Gruppe 2 wurden BMP-5, BMP-6 und BMP-7 zusammengefasst, die Gruppe 3 bilden GDF-5 (BMP-14), GDF-6 (BMP-13) und GDF-7 (BMP-12). BMP-3 und GDF-10 (BMP-3b) bilden die Gruppe 4. BMP-1 wird nicht zur TGF β Superfamilie gezählt, da es zu den Metalloproteasen gehört (Marsell und Einhorn, 2009). BMPs bewirken sowohl intrazelluläre als auch extrazelluläre Effekte (Phillips, 2005). Die Rolle der BMPs besteht vor allem darin, mesenchymale Progenitorzellen chemotaktisch zu beeinflussen sowie deren Proliferation und Differenzierung zu Zellen der Knorpel- und Knochenbildung zu steuern (Dimitriou et al., 2005; Giannoudis und Einhorn, 2009; Phillips, 2005).

Die Expression von BMP-2 ist in den ersten 24 Stunden nach Auftreten einer Fraktur am stärksten ausgeprägt und es konnte gezeigt werden, dass dieses Protein äußerst wichtig für die Knochenheilung ist (Tsuji et al., 2006). BMP-2 beeinflusst die Aktivität anderer BMPs und ist auch in der Lage die Produktion anderer BMPs zu initiieren. BMP-2 wird vor allem von mesenchymalen Stammzellen, aber auch von Osteoblasten und Chondrozyten gebildet (Marsell und Einhorn, 2009). Fehlt BMP-2 während der Frakturheilung kann dieser Prozess nicht beginnen. Es erfolgt keine Chondrogenese, Stammzellen verbleiben in einem undifferenzierten Stadium, und eine Heilung des Knochendefekts ist nicht möglich (Ai-Aql et al., 2008; Tsuji et al., 2006). In verschiedenen Studien konnte die Wirksamkeit des Einsatzes von BMP-2 und BMP-7 in der Frakturheilung belegt werden, so dass BMPs erfolgreich in der Klinik eingesetzt werden (Gautschi et al., 2007; Lissenberg-Thunnissen et al., 2011; Wildemann et al., 2011).

2.7.2.1.3 *Growth and differentiation factor-8 (GDF-8)*

Myostatin gehört ebenfalls zu der Gruppe der TGF β -Superfamilie. Es wirkt negativ regulierend auf die Muskel- und Knochenmasse des Körpers und wird in der zeitigen Phase der Frakturheilung exprimiert. Untersuchungen zeigten, dass die Ausschaltung des GDF-8-Gens eine Zunahme der Kallusmasse während der Frakturheilung zur Folge hat und gleichzeitig BMP-2 hochreguliert wird (Kellum et al., 2009). Als Rezeptor konnte der Typ IIB des Activin Rezeptors (Act R IIB) identifiziert werden, der sich an mesenchymalen Stammzellen des Knochenmarks befindet. Dadurch spielt Myostatin eine Schlüsselrolle in der Rekrutierung und Proliferation von Vorläuferzellen der Knochenbildung (Hamrick et al., 2010; Kellum et al., 2009). Der Rezeptor kann auch mit weiteren Liganden eine Verbindung eingehen, was dann eine gegenseitige Antagonisierung zur Folge hat (Kellum et al., 2009). Der Mechanismus der Wirkungsweise von GDF-8 konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden. Es ist jedoch klar, dass, als antiosteogener bzw. antimyogener Faktor, direkte, negative Effekte auf die Proliferation und Differenzierung mesenchymaler Stammzellen bestehen (Elkasrawy und Hamrick, 2010).

2.7.2.2 *Platelet-derived growth factor (PDGF)*

Mit einer Größe von 330 kDa besteht PDGF aus zwei Polypeptidketten und wird von Monozyten, Makrophagen, Osteoblasten und aggregierten Thrombozyten freigesetzt. Daher spielt es in der zeitigen Phase der Knochenheilung eine Rolle vor allem bei der Stimulation der Knochenresorption (Canalis et al., 1988; Dimitriou et al., 2005) und Fibroblastenproliferation (Remedios, 1999). Es fördert zu einem späteren Zeitpunkt der Knochenheilung die Kollagen-I-Synthese der Osteoblasten (Bouletreau et al., 2002). PDGF wirkt mitogen auf mesenchymale Stammzellen, Osteoblasten und Endothelzellen und chemotaktisch auf Makrophagen, wodurch die Knochenresorption stimuliert wird (Malizos und Papatheodorou, 2005; Phillips, 2005).

2.7.2.3 *Vascular endothelial growth factor (VEGF)*

VEGF wird zusammen mit anderen proangiogenetischen Substanzen in den α -Granula der Thrombozyten gespeichert und während der Aggregation freigesetzt (Jurk und Kehrel, 2010). Es unterstützt die Reparatur des Endothels und die Angiogenese (Yaguchi et al., 2004). Dabei gilt VEGF, im Zusammenhang mit dem Rezeptor VEGFR2, als sehr potenter Vermittler der Hypoxie induzierten Angiogenese. Währenddessen reduziert VEGFR1 die Bildung von Blutgefäßen (Lienau et al., 2009). Beim Auftreten einer Hypoxie wird Hypoxia inducible factor 1 α (HIF 1 α), ein Transkriptionsfaktor, aktiviert. Dieser ist in der Lage, die Expression von VEGF in Osteoblasten zu steigern. VEGF wird als Reaktion auf die Hypoxie und einen sauren pH-Wert von den Osteoblasten freigesetzt (Bouletreau et al., 2002; Wang et al., 2007a).

2.7.3 *Transmembrane Transportproteine*

Transmembrane Transportproteine sind Proteine, die sich stationär in den Zellwänden verschiedenster Zellen befinden. Sie ermöglichen (aktiv) oder unterstützen (passiv) den Transport bestimmter Substanzen durch die Zellmembran hindurch

2.7.3.1 *Glucosetransporter 1 (GLUT 1)*

Der GLUT 1 ist ein Protein in der Zellmembran, welches die Einschleusung von Glucose und Vitamin C und anderer Pen- und Hexosen realisiert. Glucose ist ein essentieller Ausgangsstoff zur Gewinnung von Energie während des Citratzyklus. Fällt dieser aufgrund von Sauerstoffmangel aus, setzt zur Energiegewinnung die Glykolyse ein. Dabei wird für die gleiche Menge ATP deutlich mehr Glucose benötigt. Die Enzyme der Glykolyse liegen in hoher Anzahl in der Zelle vor, so dass bei erhöhtem Bedarf die Expression ihrer Gene erst verspätet angeschaltet wird. Ein Enzym, welches schnell hochreguliert wird, ist der Glucosetransporter, der versucht, den erhöhten Bedarf an Glucose zu kompensieren. GLUT 1, welches eines der HIF-aktivierten Gene darstellt, kann somit in einer hypoxischen Stoffwechsellage als anaerober Stoffwechselindikator verstanden werden.

2.7.4 *Transkriptionsfaktoren*

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die in der Lage sind die Transkription bestimmter Gene zu modellieren. Dies geschieht beispielsweise über die Bindung an regulatorische Sequenzen der DNA (Barnes, 2006).

2.7.4.1 *Hypoxia inducible factor 1 α (HIF 1 α)*

HIF ist ein Dimer bestehend aus zwei heterogenen Helices (HIF α und HIF β) (Gaber et al., 2005; Wang et al., 2007b). Infolge einer Hypoxie reagieren Osteoblasten und Osteozyten mit einer Erhöhung von HIF, welches seinerseits in der Lage ist, die Genexpression verschiedener Zielgene zu modifizieren (Wang et al., 2007a). Dazu gehört die Expression von VEGF, GLUT 1 und EPO. Erythropoese, Angiogenese und die Umstellung der Zellen auf einen glykolytischen Stoffwechsel sind die Folgen. HIF 1 α gilt daher als Hypoxiemarker. Andererseits kann die Bindung, unter anderem von proinflammatorischen Mediatoren wie Interleukin-1 β und TNF α an die betreffenden Rezeptoren, HIF 1 α induzieren (Gaber et al., 2005). Die Signalkette, die durch die Hypoxie und intrazelluläre Erhöhung von HIF ausgelöst wird, verknüpft die Angiogenese mit der Osteogenese (Wang et al., 2007a).

2.7.5 *Extrazelluläre Matrixproteine*

Die extrazelluläre Matrix, mit Kollagen als Hauptstrukturprotein, gibt dem Knochen einen strukturellen Rahmen an dem Zellen anhaften und migrieren können. Matrixproteine sind Bestandteile der extrazellulären Matrix (Ng et al., 1997).

2.7.5.1 *Osteopontin (OPN)*

Osteopontin gehört zu den nicht-kollagenen, extrazellulären Matrixproteinen und wird von Zellen in einer Vielzahl von Geweben exprimiert. Es ist im Rahmen der Frakturheilung an der Entzündungsreaktion, der Regulation der Angiogenese, der Kallusbildung und des Remodelings beteiligt. Zu den Osteopontin exprimierenden Zellen gehören Monozyten/

Makrophagen, Endothelzellen und Muskelzellen (Duvall et al., 2007) genauso wie Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Auf T-Zellen wirkt OPN chemotaktisch und fördert gleichzeitig deren Adhäsion. OPN wird durch verschiedene Wachstumsfaktoren, unter ihnen PDGF, TGF β , BMPs und inflammatorische Zytokine, hochreguliert (Sodek et al., 2000). Über die Interaktion mit verschiedenen Integrinen vermittelt OPN die Adhäsion und Migration unterschiedlicher Zellen, unter ihnen Thrombozyten, Makrophagen, Osteoblasten und Osteoklasten (Einhorn, 1998; Sodek et al., 2000). OPN ummantelt die nach einer Fraktur anfallenden Gewebstrümmer und opsoniert diese den zur Phagozytose fähigen Zellen (McKee und Nanci, 1996). Als nicht-kollagenes, extrazelluläres Matrixprotein unterhält OPN Bindungen sowohl mit sich selbst als auch zu Kollagen und Mineralien (Sodek et al., 2000). Somit übernimmt OPN sowohl in der frühen Phase (Inflammation, Angiogenese) als auch zu einem etwas späteren Zeitpunkt der Frakturheilung (Osteoinduktion) vielfältige und bedeutende Aufgaben.

2.7.5.2 *Von Willebrand Faktor (vWF)*

Bereits 1924 begann Erik von Willebrand die Zusammenhänge der Bluterkrankheit zu erforschen. Mittlerweile sind die Verknüpfungen der ablaufenden Prozesse bei der Blutgerinnung gut untersucht. Der Von Willebrand Faktor spielt dabei eine nicht unwesentliche Rolle.

Das multimere Glykoprotein besteht aus mehreren identischen Untereinheiten (je ca. 250 kDa groß), die über Disulfidbrücken verbunden sind. Insgesamt erreicht es eine Größe von über 20.000 kDa. Es wird von Endothelzellen der Intima und von Megakaryozyten gebildet. Endothelzellen sezernieren 95 % in das subendotheliale Bindegewebe und speichern die restlichen 5 % als so genannte Weibel-Palade-Körper. Die Speicherung des Proteins erfolgt außerdem in der α -Granula der Thrombozyten. Durch Histamin, Thrombin, Fibrin und Kalzium-Ionen wird die Ausschüttung aus den Endothelzellen stimuliert. Der vWF vermittelt die Adhäsion von Thrombozyten an Gefäßwanddefekte durch die Bindung an das freigelegte Bindegewebe. Die Interaktion mit verschiedenen Kollagenen, aber auch Verwirbelungen im Blutfluss lässt die Blutplättchen eine Verbindung mit dem vWF eingehen. Der vWF fungiert ebenfalls im Plasma als Trägerprotein für den Gerinnungsfaktor VIII (Ruggeri, 2003; Sadler,

1998). Der vWF gilt als Endothelzellmarker (Lienau et al., 2009) und wurde daher für die Untersuchungen der Angiogenese während der Frakturheilung herangezogen.

2.7.5.3 Hämoxigenase 1 (HMOX 1)

HMOX 1 ist ein 32 kDa großes Enzym, welches die Reaktion von Hämoglobin zu Eisen, Biliverdin und Kohlenmonoxid katalysiert. Die Expression von HMOX 1 wird durch verschiedene Stimuli beeinflusst. Dazu gehören Hämoglobin, Wachstumsfaktoren wie TGF β , VEGF und PDGF, NO, HIF und unterschiedliche Zytokine. Die Effekte von HMOX 1 werden über die Endprodukte der erwähnten Reaktion vermittelt, vor allem von Kohlenmonoxid. HMOX 1 wirkt proangiogenetisch, antiinflammatorisch, antioxidativ, antifibrotisch und antiapoptotisch (Dulak et al., 2008).

2.8 Tiermodell

Für die Durchführung der Studie wurde das Schaf als Modelltier gewählt. Zwar lässt die unterschiedliche Gangweise auf grundsätzliche Ungleichheiten schließen, dennoch kommt die Schaftibia in Größe und Form, im Vergleich zu den anderen zur Verfügung stehenden Tierarten, der des Menschen am nächsten. Bei der Belastung befindet sich die Tibia wie beim Menschen in der Tragachse des Beines. Die Größe der Tiere erlaubt die Verwendung von Instrumenten aus der Humanmedizin (Wissing und Stürmer et al., 1990). Eine gewisse Variation des genetischen Materials ist zum Zweck der durchzuführenden Untersuchungen wünschenswert und beim Schaf als Versuchstierspezies gegeben. Die Haltung weiblicher Tiere wurde der von männlichen vorgezogen, da diese leichter handhabbar sind und somit, nicht zuletzt aus Tierschutzgründen, eine Gruppenhaltung möglich ist.

2.9 Fixateur externe

Der Fixateur externe wird als „von außen zugängliches Festhalte- und Spannsystem zur operativen Behandlung von Erkrankungen des Skelettsystems“ definiert (Pschyrembel, 1993). Eine Befestigung der Schrauben (Schanz-Schrauben) erfolgt fern der Fraktur perkutan im

Knochen. Über ein externes, die Schrauben verbindendes Stangensystem werden die Frakturrenden ausgerichtet und stabilisiert (Krämer und Grifka, 2007; Wülker, 2005). Diese Art der Frakturversorgung hat zum Vorteil, dass das Gewebe, welches direkt mit der Fraktur in Verbindung steht, keiner Manipulation ausgesetzt ist (Egger, 1991). Der bei der Osteotomie verwendete Fixateur wurde aus der Humanmedizin übernommen und der Anatomie des Schafes folgend angepasst.

2.10 Zielsetzung

Frakturen können, auch im Zeitalter der fortschrittlichen Medizin, zu Problemen führen. Darum ist es notwendig, die Forschung auf diesem Gebiet weiter voranzutreiben. Zur Verbesserung der Knochenheilung wird im Bereich des Tissue engineering zum Beispiel der Einsatz von Scaffolds, BMPs und Immunmodulatoren untersucht (Ai et al., 2012; Lissenberg-Thunnissen et al., 2011). Im Rahmen dieser Studie wird die zeitige Phase der Frakturheilung beleuchtet. Es ist zu vermuten, dass der Grundstein für den unterschiedlichen Ausgang der Heilung von Frakturen (narbenlose Heilung) und Weichteilgewebe (Narbenbildung) schon zu Beginn der Rekonvaleszenz gelegt wird. Daher ist es wichtig, die Vorgänge genau zu kennen. Am Schafmodell wurde eine standardisierte Defekt-Osteotomie durchgeführt, welche mit einem rigiden Fixateur extern versorgt wurde. Das in der Wundhöhle entstandene Hämatom wurde nach einer definierten Zeit entfernt und auf seine zelluläre Zusammensetzung und das Vorhandensein verschiedener Faktoren untersucht. Das Ergebnis wurde mit dem, am gleichen Tier gewonnenen, Weichteilhämatom verglichen. Als Untersuchungsmethoden wurden das Fluorescence activated cell sorting (FACS-Analyse) und die Polymerasekettenreaktion (PCR) gewählt. Zur Analyse der Zellen und deren Zuordnung zu den verschiedenen Untergruppen stellt die FACS-Untersuchung ein sehr effizientes Verfahren dar. Die PCR bietet die Möglichkeit auch kleinste Mengen synthetisierter messenger Ribonukleinsäure (mRNA) nachzuweisen und ist als solche die Methode der Wahl zur Untersuchung exprimierter Faktoren. Als Referenzgen wurde Cyclophilin A gewählt, da es ein elementares Gen ist. Es codiert ein Protein, welches in fast allen Zellen des Körpers vorhanden ist. Die mRNA wird in den Zellen in ausreichend großen Mengen exprimiert und ist außerdem hoch konserviert.

Das Immunsystem ist bisher aus therapeutischer Sicht noch nicht in den Fokus der Knochenheilung getreten. Es wird aber immer deutlicher, dass die Immunzellen eine zentrale Rolle bei der Heilung spielen und dass es immer mehr Patienten gibt, bei denen das

immunologische Gleichgewicht verändert ist (alte Patienten, immunsupprimierte Patienten, Diabetiker, HIV-Patienten). Für die Versorgung von knöchernen Verletzungen in diesem steigenden Patientenpool ist ein Verständnis der initialen Immunantwort auf einen Knochenbruch der erste Schritt zur Entwicklung einer Therapie.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Bezugsquellen

3.1.1 Geräte und Software

FACS Gerät	BD FACS-Calibur™ Flow Cytometry System	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Heizblock		VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
PCR Systeme	Mastercycler® gradient	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	iQ™ 5 real time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Software	FlowJo	Tree Star Inc., Ashland OR, USA
	SPSS, Version 18.0	IBM, New York, USA
Ultra-Turrax	T 10 basic ULTRA-TURRAX®	Ika® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Vortex Schüttler	VVR3	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zählkammer	Neubauer Zählkammer	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
	Zentrifuge MiniSpin®	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

3.1.2 Verbrauchsmaterial

96-Loch-Platte	Thermo-Fast [®] -Semi-Skirted PCR Plate	Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Cap Strips	Ultra Clear Cap Strips	ABgene Ltd., Epsom, UK
EDTA-Röhrchen	BD Vacutainer Plus Blood Collection Tubes K ₂ EDTA 10 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fixateur externe	Klemmbacken	Synthes, Umkirch, Deutschland
	Schanzschrauben	Synthes, Umkirch, Deutschland
	Stahlrohre	Synthes, Umkirch, Deutschland
Nahtmaterial	Vicryl [®] Stärke 3-0	
	Prolene [®] Stärke 3-0	
Pipettenspitzen	ep. Dualfilter T.I.P.S. [®] verschiedene Größen	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zellsieb	Zellsieb 70 µm	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	Falcon [™] Tube 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
	DNA LoBind Tubes 1,5 ml und 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

3.1.3 Chemikalien

Ansatz für die PCR	iQ™ Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
	Primer for/rev	Tib Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlin, Deutschland
	Absolute™ Max QRT-PCR SYBR®-Green Fluorescein Mix (100 x 50 µl)	Invirogen, Karlsruhe, Deutschland
Ansatz für die Reverse Transkription	dNTP-Mix 10mM	Bioron GmbH, Ludwigshafen, Deutschland
	Random –Primer	Invirogen, Karlsruhe, Deutschland
	M-MLV RT 5x Reaktions- puffer	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
	RNase Inhibitor 40 U/µl	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
	M-MLV RT RNase H Minus, Point Mutant 200 U/µl	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
	RNase-H 250 U/µl	Promega GmbH, Mannheim, Deutschland
Antikörper	α-ovCD45-PE	Acris Antibodies GmbH, Herford, Deutschland
	α-ovCD8-PE	
	α-bovCD21-FITC	
	α-huCD14-FITC	
	α-bovWC1-FITC	
	α-ovCD5-FITC	AbD Serotec. Düsseldorf, Deutschland
	α-ovCD4-AF647	
	α-ovCD25-FITC	

Material und Methoden

FACS – Puffer	BSA 10 g/l	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
	Natriumazid 1 g/l	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	PBS-Puffer	PAA Laboratories GmbH, Paschingen, Österreich
Formalin	4 % Formalin	Mallinckrodt Baker, Griesheim, Deutschland
Lysepuffer	Ammoniumchlorid 8,29 g/l	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	Kaliumhydrogencarbonat 1,02 g/l	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
	EDTA 0,029 g/l	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
RNA-Isolierung	TRizol [®] Reagens	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
	Chloroform für Molekularbiologie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
	Isopropanol für Molekularbiologie	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
	Ethanol für Molekularbiologie 75 %	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
	RNase Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
RNase – freies Wasser		Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland
Trypanblau		Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

3.1.4 Medikamente

0,9 % NaCl-Lösung		Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
Ampicillin/Sulbactam	Unacid [®] 3 g TS zur Infusion	Pfizer Pharma GmbH, Berlin, Deutschland
Fentanyl Dihydrogencitrat	Fentanyl [®] -Janssen 0,5 mg	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Fentanylpflaster	Fentanyl [®] -Janssen 75 µg/h	Janssen-Cilag GmbH, Neuss, Deutschland
Kaliumchloridlösung	1 M-Kaliumchloridlösung	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland
Povidon-Iod	Braunol [®]	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Thiopental-Natrium	Trapanal [®] 2,5,g	Nycomed Deutschland GmbH, Konstanz, Deutschland

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchsablauf

An 18 zufällig ausgewählten Schafen wurde eine standardisierte diaphysäre Defekt-Osteotomie an der rechten Tibia durchgeführt und mit einem rigiden Fixateur extern versorgt. Aus dem entstandenen Osteotomiespalt wurde in verschiedenen Zeitabständen (24 Stunden (n=6), 36 Stunden (n=6), 48 Stunden (n=6)) das Osteotomiehämatom entnommen. Am gleichseitigen Hinterlauf wurde am *M. gracilis* ein Weichteilschaden gesetzt. Das dort entstandene Weichteilhämatom wurde im gleichen Zeitabstand, dem Osteotomiehämatom entsprechend, entnommen. Die insgesamt 36 Proben wurden hinsichtlich ihrer zellulären Zusammensetzung und der Expression relevanter Faktoren untersucht. Außerdem wurde aus den angrenzenden Knochenenden Knochenmark gewonnen und der zellulären Analyse zugeführt (weitere 18 Proben).

3.2.2 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um weibliche Merinomix-Schafe. Die Tiere waren über zwei Jahre alt, wiesen ein durchschnittliches Gewicht von 71 kg (\pm 9,83 kg) auf und stammen aus der Schäferei Bildt, Gutshof Langerwisch, 14557 Langerwisch, Deutschland.

Die Schafe wurden in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité-Universitätsmedizin Berlin am Campus Virchow-Klinikum gehalten und versorgt. Die Genehmigung des Versuchsvorhabens wurde durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin erteilt (Genehmigungsnummer G 0127/07). Alle Tierversuche wurden gemäß den Prinzipien und Grundsätzen des Tierschutzgesetzes durchgeführt. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde nach Anlieferung überprüft und für gut befunden. Neben dem allgemeinen Gesundheitszustand wurde vor allem auf die Unversehrtheit des Bewegungsapparates geachtet. Die korrekte Stellung und damit eine gleichmäßige Belastung der Gliedmaßen ist für die Durchführung des Versuchsvorhabens notwendig.

3.2.3 Fixateur externe

Es wurde ein rigider Fixateur extern verwendet (siehe Abb. 3.1.), bestehend aus sechs Schanzschrauben mit je einem Durchmesser von 5 mm und zwei Stahlrohren jeweils 10 mm im Durchmesser, die untereinander mit 12 Klemmbacken verbunden waren. Die standardisierten Abstände der Schrauben untereinander betragen 2,1 cm – 3,4 cm – 3 cm – 3,4 cm – 2,1 cm. Der vereinheitlichte Abstand zwischen der Haut und den Klemmbacken betrug 15 mm. Der Fixateur wurde an einer genormten Stelle der nicht-osteotomierten Tibia verschraubt. Das Anbringen der Fixateure erfolgte jeweils in identischer Verfahrensweise.

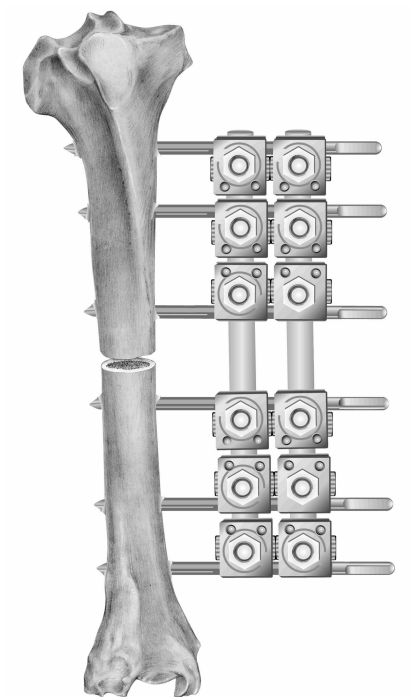


Abbildung 3.1.

Montierter Fixateur extern an der Tibia

3.2.4 Operatives Vorgehen

3.2.4.1 Narkose und Analgesie

In Vorbereitung auf die Operation wurden die Tiere für ca. 12 h nüchtern belassen. Wasser stand ihnen jeder Zeit *ad libitum* zur Verfügung. Präoperativ erhielt jedes Schaf einen venösen Zugang über die *Vena cephalica antebrachii* zur Applikation von 10 mg Thiopental-Natrium (Trapanal[®] 2,5 g) pro Kilogramm Körpergewicht. Die Intubation erfolgte unter Sichtkontrolle. Mit Hilfe eines Beatmungsgerätes wurde die Narkose mit einem Isofluran-N₂O-O₂-Gemisch aufrechterhalten.

Über den venösen Zugang erhielten die Tiere prophylaktisch ein Antibiotikum in Form von 3 g Ampicillin/Sulbactam (Unacid[®] 3 g Trockensubstanz zur Infusion) und über den Zeitraum der Operation 1000 ml Vollelektrolytlösung. Präoperativ wurden zur Analgesie 5 ml

Fentanyl[®]dihydrogencitrat (Fentanyl[®]-Janssen 0,5 mg) intravenös appliziert. Für den Zeitraum nach der Operation erhielten die Tiere zur Schmerzprophylaxe ein Fentanylpflaster (Fentanyl[®]-Janssen 75 µg/h). Das Pflaster wurde postoperativ am rasierten, osteotomierten Bein angebracht.

3.2.4.2 Operationsvorbereitung

Die Tiere wurden in die rechte Seitenlage gebracht. Das rechte hintere Bein wurde geschoren und mit Povidon-Iod (Braunol[®]) desinfiziert und danach steril abgedeckt.

Allen Tieren wurde eine Pansenschlundsonde gelegt, um das Risiko einer intra- oder postoperativen Pansenaufgasung zu senken und damit verbundene Narkosezwischenfälle zu vermeiden. Bei der Lagerung der Schafe ist darauf zu achten, dass das Drehen der Tiere über den Rücken vermieden wird, um die Verlagerung des Labmagens nicht zu provozieren.

3.2.4.3 Operationstechnik

Die Osteotomie erfolgte im medialen, diaphysären Bereich der Tibia. Zur standardisierten Montage des Fixateurs wurde eine eigens angefertigte Schablone an den Malleolus medialis angelegt, der Anatomie folgend ausgerichtet und manuell fixiert. Mit Hilfe der Schablone konnten kleine Hautinzisionen für die spätere Schraubenpositionierung gesetzt werden. Durch die Schablonenöffnungen konnte eine Bohrhülse direkt auf das Periost des Knochens aufgesetzt werden. Diese Hülse diente als Richtungsweiser für die Bohrung und ebenso als Schutz für das Weichteilgewebe. Mit einem druckluftbetriebenen Spiralbohrer wurden unter Spülung mit 0,9 % NaCl-Lösung sechs Kanäle in den Knochen gebohrt. In diese wurden sechs Schanzschrauben bikortikal mit einem Handbohrfutter eingedreht. Über 12 Klemmbacken wurden die Schanzschrauben mit zwei Stahlstangen untereinander fest verbunden. Der Abstand von 15 mm des Fixateurs zur Hautoberfläche wurde durch einen geeigneten Abstandhalter gewährleistet. Der Knochen wurde zwischen der dritten und vierten Schanzschraube nach einer Hautinzision stumpf freipräpariert, so dass zum Schutz des Weichteilgewebes zwei Hohmann Knochenhebel unter die Tibia geschoben werden konnten. Die Osteotomie wurde an dieser Stelle mit Hilfe einer oszillierenden, druckluftbetriebenen Säge durchgeführt. Die Durchtrennung des Knochens erfolgte mittels zweier Schnitte, so dass

ein 2 cm großes Knochenstück entfernt werden konnte. Um eine Erwärmung des Gewebes während des Sägevorganges zu verhindern bzw. zu reduzieren erfolgte über den gesamten Prozess eine Spülung mit 0,9 % NaCl-Lösung. Alle durchgeführten Arbeitsschritte passierten unter maximaler Schonung des Weichteilgewebes, um Einblutungen aus der Muskulatur und der Haut weitestgehend zu verhindern. Die Muskelfaszie wurde über dem Defekt mit Vicryl® der Stärke 3-0 vernäht. Der Verschluss des Hautschnittes erfolgte mit Prolene® der Stärke 3-0. Somit wurde eine Wundhöhle geschaffen, in der sich das Osteotomiehämatom bilden konnte. Im Anschluss daran wurde der gleichseitige *Musculus gracilis* über einen Hautschnitt mittels eines Skalpell und durch stumpfes Präparieren dargestellt. Der Muskelbauch wurde zum Erhalt der Funktion mittig und senkrecht zu Faserrichtung auf einer Länge von 2 cm ca. 2 cm tief eingeschnitten. Die Schnittkanten wurden zur Reproduktion eines stumpfen Traumas mittels einer Pinzette aufgeraut. Durch die Retraktion der Muskelfasern entstand eine der Größe des Knochendefekts entsprechende Wundhöhle. Analog zum Knochendefekt erfolgte der Verschluss der Muskelfaszie und der Haut über dem Weichteiltrauma.

3.2.4.4 Postoperative Versorgung

Die postoperative Versorgung bestand in der sorgfältigen Kontrolle des Verbandes und des Allgemeinbefindens der Tiere. Zur Schmerzprophylaxe wurde den Tieren ein Fentanylpflaster (Fentanyl®-Janssen 75µg/h) am rasierten, osteotomierten Bein angebracht.

3.2.5 Blutentnahme

Unmittelbar vor Einleitung der Narkose wurde den Schafen über den gelegten Venenkatheter eine Blutprobe entnommen. Die Probe (B0), bestehend aus 2 mal 10 ml in je einem mit EDTA beschichteten Röhrchen, wurde schon während der Operation für die FACS-Untersuchung aufbereitet.

3.2.6 Tötung

Zur schmerzlosen Tötung wurde den Schafen ein venöser Zugang gelegt. Über diesen Zugang erhielt jedes Tier 2,5 g Thiopental (Trapanal[®] 2,5 g) gelöst in 50 ml Wasser zu Injektionszwecken. In tiefer Narkose erhielten sie zusätzlich 100 ml Kaliumchloridlösung (1M-Kaliumchlorid-Lösung) intravenös. Der eingetretene Herzstillstand wurde mittels Auskultation festgestellt.

3.2.7 Hämatomentnahme

Direkt im Anschluss an die Euthanasie wurden die Hämatome gewonnen. Die Wundhöhlen wurden durch Eröffnung der Nähte freigelegt und die Hämatome digital, unter Schonung des umliegenden Gewebes zur Vermeidung von erneuten Einblutungen, entnommen. In sterilen Petrischalen erfolgte die Aufteilung des Osteotomiehämatoms (OH) und des Weichteilhämatoms (WH) in jeweils drei Teile. Ein kleiner Teil wurde für die histologische Untersuchung separiert, welche aber nicht Teil dieser Arbeit ist. Ein zweiter Teil wurde in einem steilen Falcon[™] Tube, nach Schockfrost in flüssigen Stickstoff, für die PCR-Untersuchung bei -80°C eingefroren. Der übrig gebliebene Teil der Probe wurde in einem 50 ml Falcon[™] Tube direkt der FACS-Analyse zugeführt.

3.2.8 FACS-Analyse

3.2.8.1 Prinzip

Die FACS-Analyse (Fluorescence activated cell sorting) ist ein durchflusszytometrisches Verfahren, bei dem es möglich ist auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften über verschiedene Detektoren die Größe und die Granularität einzelner Zellen (siehe Abb. 3.2.a und 3.2.b) sowie deren Zugehörigkeit zu den verschiedenen Zelllinien zu bestimmen. Zur Differenzierung werden die einzelnen Zellen mit korrespondierenden, farblich markierten Antikörpern verbunden. Diese fluoreszierenden

Antikörper werden über ein Lasersystem angeregt und die Signale auf Grund der verschiedenen Wellenlängen von den jeweiligen Detektoren empfangen.

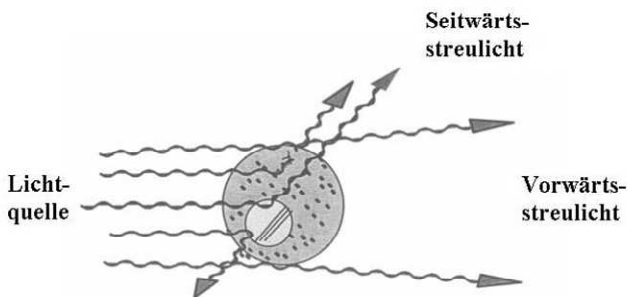


Abbildung 3.2.a

Darstellung der Streulichteigenschaft einer Zelle

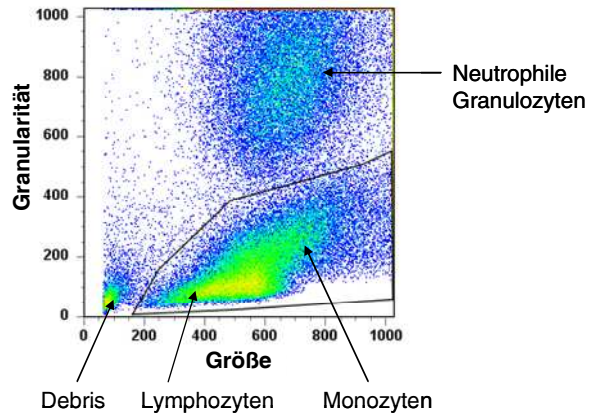


Abbildung 3.2.b

Differenzierung der Zellen auf Grund von Größe und Granularität

3.2.8.2 Durchführung

Die Verarbeitung der Hämatome und der Blutprobe zur FACS-Analyse erfolgten zeitnah und unter Verwendung von Einweghandschuhen. Eingangs wurden die Hämatom- und Blutproben zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die darauf folgend mit 0,9 % NaCl-Lösung versetzten Hämatome wurden mit einem Ultra Turrax homogenisiert und anschließend zur Trennung von vorhandenen Koageln und Fibrinresten durch einen Zellsieb filtriert. Das Filtrat wurde 5 min bei 1800 x g zentrifugiert. Bei der Aufbereitung der Proben für die FACS-Analyse wurde bei allen Schritten die Eppendorf Zentrifuge 5810R verwendet. Nach erneuter Abnahme des Überstandes bei der Hämatomprobe wurde der Hämatom- und der Blutprobe Lysepuffer hinzugefügt und auf 15 ml aufgefüllt. Die in der Suspension noch enthaltenen Erythrozyten wurden damit bei Raumtemperatur und einer Inkubationszeit von 7 min lysiert. Das durch wiederholtes Zentrifugieren (10 min, 450 x g und Raumtemperatur) entstandene Pellet aus weißen Blutkörperchen wurde in 3 ml FACS-Puffer resuspendiert und auf 12 ml

mit PBS-Puffer aufgefüllt. Nach dem anschließenden Zentrifugieren (10 min, 450 x g bei Raumtemperatur) kann bei Bedarf der Lyseschritt wiederholt werden. Schließlich wurde das Pellet in 1 ml FACS-Puffer resuspendiert. Eine Vitalfärbung der Zellen mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer wurde parallel mit einer Zellzählung durchgeführt. Die Färbung der Probe mit den Fluoreszenzmarkern fand für 10 min im Dunkeln bei Raumtemperatur statt. Folgende Antikörper wurden für die FACS-Analyse genutzt: α -ovCD45-PE, α -ovCD8-PE, α -bovCD21-FITC, α -huCD14-FITC, α -bovWC1-FITC, α -ovCD5-FITC, α -ovCD4-AF647, α -ovCD25-FITC. Mit 3 ml FACS-Puffer wurden die ungebundenen Antikörper ausgewaschen und die markierten Zellen mit 250 μ l FACS-Puffer und 250 μ l 4 % Formalin/PBS fixiert. Danach wurde die Probe erneut mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen. Dem Waschen schloss sich jeweils ein 10 minütiges Zentrifugieren bei 450 x g an. Zur Durchführung der FACS-Analyse wurde ein BD FACS-Calibur™ Flow Cytometry System verwendet. Pro Probe wurden dabei 30.000 bis 100.000 Zellen analysiert. Die qualitative und quantitative Bestimmung der markierten Zellen wurde über die Fluoreszenzmessung bei verschiedenen Wellenlängen realisiert. Zur Auswertung der gewonnenen Daten wurde die FlowJo Software herangezogen.

Zur Beurteilung der Zellpopulationen für den Zweck dieser Untersuchungen wurde ein Gate bestimmt, welches Zelltrümmer und Granulozyten ausschließt (siehe Abb. 3.2.b). Somit gehören Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten zu den in dieser Arbeit untersuchten Zellen.

3.2.9 Molekularbiologische Untersuchung

Alle molekularbiologischen Arbeiten erfolgten unter Verwendung von Einweghandschuhen sowie sterilen Dualfiltertips und DNA LoBind Tubes.

3.2.9.1 RNA-Isolierung

Die Ribonukleinsäure (RNA) wurde aus den Hämatomen mit Hilfe von TRIzol® Reagens isoliert. In Vorbereitung dazu mussten die Hämatome aliquotiert werden zu je 150 mg/2 ml Tube. Die Aufarbeitung mit TRIzol® musste unter dem Abzug erfolgen. Auf 150 mg gefrorenen Gewebes wurde 1 ml Lösung gegeben. Das angefrorene Gewebe wurde mit Hilfe

eines Ultra-Turrax homogenisiert. Nach Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben nach gründlicher Durchmischung mit einem Vortex Schüttler 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und nachfolgend noch einmal gemischt. Die darauf folgende Zentrifugation geschah für 10 min bei 14.000 x g und Raumtemperatur. Alle in diesem Abschnitt durchgeführten Zentrifugationsschritte erfolgten mit der MiniSpin[®] Zentrifuge. Der Inhalt der Eppendorfgefäße zeigte eine deutliche Phasentrennung. Die obere, klare Phase enthielt die RNA. Diese wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt. Die übrig gebliebene mittlere Interphase und die untere Chloroform-Phenolphase wurden verworfen. Im Verhältnis 1:2 wurde der wässrigen Phase Isopropanol zugegeben, nach dem Mischen 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann 10 min bei 14.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Die RNA fiel aus und wurde bei reichlich vorhandener RNA als Pellet sichtbar. Das überständige Isopropanol wurde vorsichtig abpipettiert und die RNA zum Waschen mit 1 ml 75%igem Ethanol versetzt und gevortext. Nach dem Zentrifugieren für 5 min bei 14.000 x g und Raumtemperatur wurde der Überstand an Ethanol abpipettiert und das Pellet bei 37°C im Heizblock für ca. 30 min und geöffnetem Tube getrocknet. Zum Schluss wurde das Pellet in 20 µl RNase freiem Wasser bei 50°C im Heizblock bei geschlossenem Eppendorfgefäß gelöst.

Um mögliche Reste von DNA zu entfernen, wurde das RNase Free DNase Set verwendet. 160 µl DNase Mix wurde zu der gelösten RNA gegeben und bei Raumtemperatur 15 min inkubiert. Die Schritte zur RNA-Isolierung mit Hilfe von TRIzol[®] wiederholten sich an dieser Stelle. Die isolierte und gereinigte RNA, gelöst in 20 µl RNase freiem Wasser, wurde bei -80°C aufbewahrt.

3.2.9.2 Photometrische Messung

Die photometrische Konzentrationsmessung der gewonnenen RNA erfolgte mit dem BioPhotometer bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm. Das Gerät wurde mittels 50 µl Nuclease freiem Wasser kalibriert. Danach folgte die Konzentrationsmessung von 1 µl Probe in 49 µl Nuclease freiem Wasser. Zusätzlich wurde die Ratio ermittelt. Sie gibt Auskunft über die Reinheit der RNA und ergibt sich aus der Extinktion bei der Wellenlänge 260 nm/Extinktion bei der Wellenlänge 280 nm. Bei guter Reinheit der RNA erhält man Werte zwischen 1,8 und 2,0.

3.2.9.3 Reverse Transkription (RT)

Da eine Amplifikation der RNA nicht möglich ist, besteht die Notwendigkeit komplementäre DNA (cDNA) herzustellen. Dies geschieht im Arbeitsschritt der Reversen Transkription.

Die verwendeten Random-Primer bestehen aus Nukleotid-Hexameren, die zufällig an die RNA binden. Hierfür wurden 8 µl RNA mit 1 µl eines 10 mM dNTP-Mixes und 1 µl Random-Primer versetzt, um ein Gesamtvolumen von 10 µl zu erhalten. Dieser Ansatz wurde 5 sek zentrifugiert (Centrifuge Mini Spin[®]) und in einem Thermocycler (Mastercycler[®] gradient) 5 min bei 65°C inkubiert. Es folgte eine Kühlung auf Eis. Dem Ansatz wurden 4 µl M-MLV RT 5x Reaktionspuffer, 1 µl RNase-Inhibitor (40 U/µl) und 4,5 µl Wasser (Nuclease Free Water) hinzugefügt, erneut anzentrifugiert und 2 min bei 42°C inkubiert. Im Anschluss wurde 1 µl M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus, Point Mutant (200 U/µl) hinzupipettiert, der Ansatz kurz zentrifugiert und 50 min bei 42°C inkubiert. Das Enzym Reverse Transkriptase erkennt Random-Primer, bindet an diese und schreibt die RNA-Einzelstränge in cDNA um. Nachfolgend wurde der Ansatz 15 min bei 70°C inkubiert, was zu einer Inaktivierung der Reversen Transkriptase führte. Abschließend wurde der Ansatz auf Eis abgekühlt, 1 µl RNase-H (250 U/µl) hinzugegeben und 20 min bei 37°C inkubiert. Dies sicherte den Verdau der restlichen RNA, die sich noch in der Probe befand. Das Endvolumen von 21,5 µl reiner cDNA wurde bis zur Weiterverwendung bei -20°C gelagert.

3.2.9.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

3.2.9.4.1 Qualitätssicherung

Gradientenbestimmung

Das Ziel der Gradientenbestimmung mittels PCR ist es, herauszufinden, welches die optimale Annealingtemperatur der einzelnen Primerpaare ist und an welchem Punkt die maximale Spezifität zur Amplifikation der Zielsequenz besteht. Als Template wurde ein Probepool in der Verdünnung 1:10 verwendet. Die zu testenden Primer (forward und reverse) wurden ebenfalls mit RNase freiem Wasser bis zu einer Endkonzentration von 10 µmol/ml verdünnt. Je Primerpaar wurde eine Temperaturspanne von 10°C getestet beginnend mit der kleinsten

Annealingtemperatur von 55,6°C in acht Schritten bis zur höchsten Annealingtemperatur von 65,6°C. Für jeden Reaktionsansatz wurden 12,5 µl iQTM Supermix, 1 µl SYBR[®]-Green, je 0,5 µl Primer forward und Primer reverse und 8,5 µl Wasser (RNase freies Wasser) vermischt und in eine 96-Loch-Platte pipettiert. Die Bestimmung erfolgte im iQTM 5 real time PCR Detection System im einfachen Ansatz mit je 2 µl Probe. Eine Negativkontrolle pro Temperaturpunkt und Primer diente als Nachweis, um Verunreinigungen mit Fremd-DNA und Primerdimere auszuschließen. Die Auswertung erfolgte über die Betrachtung der Schmelzkurven (siehe Abb. 3.3.a und 3.3.b). Der Threshold wurde dafür für alle Primer bei 50 eingestellt, um eine Vergleichbarkeit zu erreichen. Der Threshold befand sich in der exponentiellen Anstiegsphase. Die Annealingtemperatur von 62°C, die bei der Primerherstellung für alle verwendeten Primer gewünscht wurde, konnte auf diesem Wege bestätigt werden. Somit besteht die Möglichkeit alle Primer gleichzeitig auf einer Platte zu verwenden.

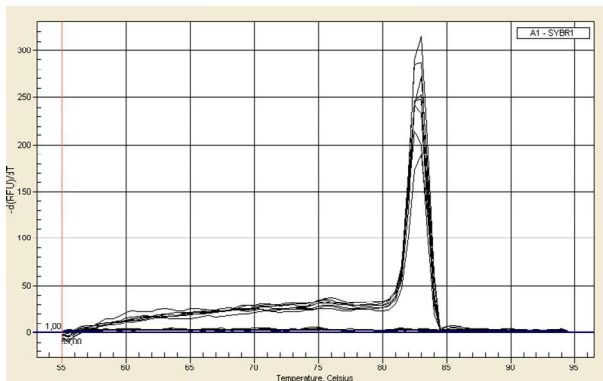


Abbildung 3.3.a

Beispiel einer guten Schmelzkurve über die gesamte Temperaturspanne von 55,6 bis 65,6°C (Abb.3.3.a) und bei 62°C (Abb.3.3.b)

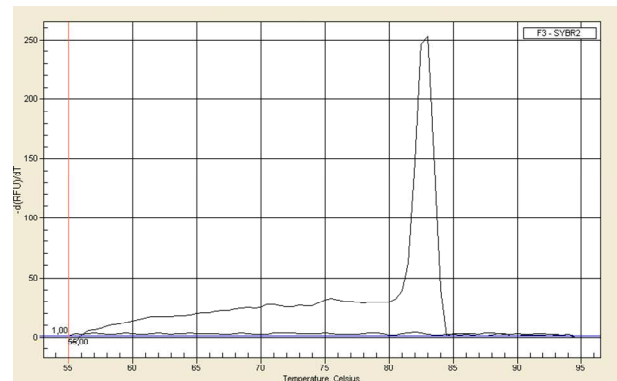


Abbildung 3.3.b

Effizienzbestimmung

Die Effizienz eines Primers trifft eine Aussage über die Spezifität mit welcher dieser an das Template bindet. Der optimale Wert für die Effizienz liegt bei 2, was bedeutet, dass in jedem PCR-Zyklus eine Verdopplung der Templates vorliegt. Dies wurde für jeden verwendeten Primer mittels quantitativer PCR im Doppelansatz überprüft. Von der Probe wurde eine

Verdünnungsreihe hergestellt. Wie schon für die Gradienten-PCR wurde ein Master-Mix, für jeden Reaktionsansatz, bestehend aus 12,5 µl iQ™ Supermix, 1 µl SYBR®-Green, je 0,5 µl Primer forward und Primer reverse und 8,5 µl Wasser hergestellt. Im Diagramm kann anhand der Steigung die Effizienz ermittelt werden (siehe Abb.3.4.), so dass die Grundlage für die Auswertung der PCR mit der Gleichung $2^{-\Delta CT}$ gegeben ist. Eine Primereffizienz zwischen 1,8 und 2,0 ist erstrebenswert. Effizienzen von mehr als 2,0 können durch Nebenprodukte zustande kommen.

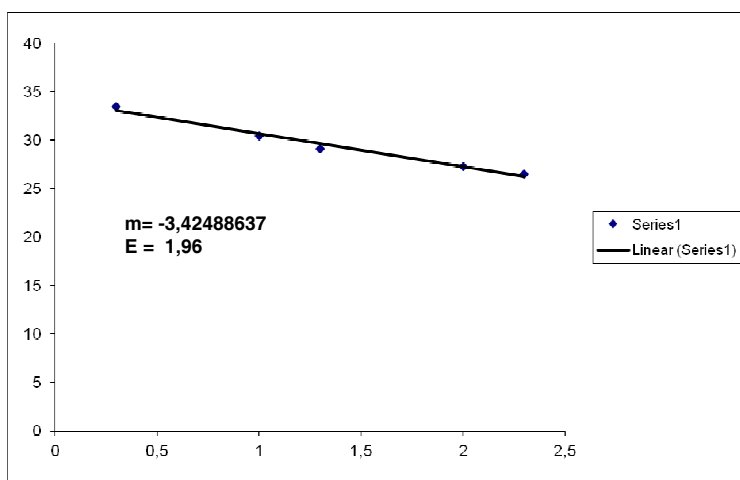


Abbildung 3.4.

Graphische Darstellung zur Berechnung der Effizienz (E)

3.2.9.4.2 Quantitative revers transkribierte PCR (q RT-PCR)

Die gewonnene cDNA diente als Ausgangsmaterial für die PCR. Es wurden ausgewählte Zytokine, Wachstumsfaktoren, extrazelluläre Matrixproteine, ein Transkriptionsfaktor und ein transmembranes Transportprotein in den Gewebeproben untersucht. Als Referenz wurde Cyclophilin A als Housekeeping Gen bestimmt. Bei der quantitativen PCR ist es möglich eine Aussage über die ursprüngliche Menge von RNA zum Entnahmezeitpunkt zu treffen.

Für einen Reaktionsansatz wurden 12,5 µl eines Absolute™ Max QRT-PCR SYBR®-Green Fluorescein Mix und 6,5 µl Wasser (Nuclease Free Water) vermischt. Der Ansatz wurde mit je 4 µl des entsprechenden Templates in einer Verdünnung von 1:10 in eine 96-Loch-Platte pipettiert und mit Ultra Clear Cap Strips verschlossen. Für jeden Primer wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Dadurch konnte die Reproduzierbarkeit gesichert werden.

Als Negativkontrollen wurden je Primer drei Proben ohne Template belassen, um eine Kontamination mit Fremd-DNA auszuschließen. Die Platte wurde für 1 min bei 400 U/min und 20°C zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5810R) und dann im iCycler-System (iQ™ 5 real time PCR Detection System) positioniert. Hier erfolgte die Amplifikation beginnend mit einer initialen Denaturierung von 3 min bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen. Ein Zyklus umfasste eine Denaturierung von 30 sek bei 95°C, ein Annealing von 30 sek bei 62°C und eine Elongation von 30 sek bei 72°C. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR®-Green ist in der Lage, sich unspezifisch in die Doppelstrang-DNA einzulagern. Über den Verlauf der Zyklen kommt es durch die Vermehrung der dsDNA zu einem Fluoreszenzanstieg. Das zunehmende Fluoreszenzsignal konnte gemessen und damit eine Quantifizierung der einzelnen Faktoren vorgenommen werden. Die Basis für die Quantifizierung der PCR bildete der Schnittpunkt der Fluoreszenzkurve mit dem Threshold (Ct-Wert). Der Threshold wurde auf den Wert 50 festgelegt, bei dem der Fluoreszenzanstieg exponentiell erfolgt. Unter Einbeziehung des CT-Wertes des Referenzgens Cyclophilin A erhält man den Δ CT-Wert (relative Quantifizierung, CT-Wert des Zielgens – CT-Wert des Referenzgens). Unter Einbeziehung der Effizienz erhält man mit der Formel $2^{-\Delta CT}$ das quantitative PCR Ergebnis.

Primer	for/rev	Genlokus	Länge der Zielsequenz in bp	Sequenz 5' → 3'
BMP-2	Rev	AF508028	203	CgC AAC gAT CCA gTC ATT
BMP-2	For			CTT TgC ACC AAg ATg AgC
CD 19	Rev	EE800417	249	ggA CTT TCC Agg CAC CAg TC
CD 19	For			TCC ACA AgC ATC CCA TgA Ag
CD 34	Rev	DY522037	179	TTC CAg CTC CAg CCT TTC TC
CD 34	For			gAg AgA Tgg gCA TCC Agg AC
CD 73	Rev	EE829088	181	Agg CCC CTT ggC TTT AAT gT
CD 73	For			CAC CAT CTg gTT CAC CgT gT
CYA	Rev	DY495412	201	ACT ggg Agg ggg ATA Agg AA
CYA	For			Tgg CAA gAC CAg CAA gAA gA
GDF-8	Ase	NM_001009428	295	ggg CAT ggT AAT gAC CgT TT
GDF-8	For			TgA gAA CAg CgA gCA gAA gg
GLUT 1	Rev	EE818738	274	ggC CgA AAC ggT TAA CAA AA
GLUT 1	For			ATg gAg CCC ACC AgA AAg AA
HIF 1a	Rev	AF233078	160	CTg TgT CCA gTT AgT TCA AAC TgA gT
HIF 1a	For			Tgg ATA TTg AAg ATg AAA TgA Agg CA
HMOX 1	Rev		246	ggg TTC TCC TTg TTg CgT TC
HMOX 1	For			AgC ATC gAC CCC ACA CCT AC
IL-1 β	For	X56972	96	TTg ggT ATC Agg gAC AAg AAT CT
IL-1 β	Rev			ggg gTA gAC TTT ggg gTC TAC TT
IL-2	Rev	NM_001009806	165	AgC gTT AAC CTT ggg CAT gT
IL-2	For			gTT gCA AAC ggT gCA CCT AC
IL-2Ra	Rev	NM_001009415	100	Agg ATg CTg gAg AgC Agg Ag
IL-2Ra	For			gCA TAA gTg AAg ggg CgA AC
IL-6	Rev	X68723	127	gCT CTg CAA CTC CAT gAC AgT T
IL-6	For			ATC Tgg gTT CAA TCA ggC gA
IL-10	Rev	CN823380	126	AgA gCA AgC CCC TgT TgT gT
IL-10	For			gAA ggg Agg ggC AAA gAA AC
OPN	Rev	AF152416	103	gAA TTC Tgg ggT TCT Agg AAA gT
OPN	For			gCT CTg Agg AAA AgC AgC TTA A
PDGF	For	X97123	122	TgC ATg gAg ACT CCT TAg ATg A
PDGF	Rev			gAC CgT Tgg ggA ACC Tag
TGF β -1	For	X76916	91	CAA ggg CTA CCA CgC CAA T
TGF β -1	Rev			gTT gTA CAg ggC CAg gAC CT
TNF α	Rev	AY289202	100	gAT gAg gAg ggT CTg AAg gAg TAA AT
TNF α	For			ggC Agg TCT ACT TTg ggA TCA
VEGF	Rev	AF071015	91	TTC ACA TTT gTT ATg CTg TAg gAA
VEGF	For			gTT CAA CAT CAC CAT gCA gAT T
vWF	Rev	EE829929	242	ACC CTg gCT gTg ATg TCC TT
vWF	For			ATT CAg CTA CgA ggg ggA CA

Tabelle 3.1.

Übersicht der verwendeten Primer mit Genlokalisierung, Gengröße und Primersequenz

Die Zielsequenzen der einzelnen Faktoren wurden über die Datenbank NCBI bezogen und mit Hilfe des Programms „Primer 3“ (<http://frodo.wi.mit.edu/>) entworfen. Zur Gestaltung der Primer waren neben den Zielsequenzen außerdem Angaben zur Größe (zwischen 18 und 26 mer) und zur gewünschten Annealingtemperatur (62°C) erforderlich.

3.2.10 Statistische Analyse

Zur deskriptiven, statistischen Auswertung wurde SPSS eingesetzt. Der Vergleich von Osteotomie- und Weichteilhämatom für jedes Tier eines jeden Zeitpunktes wurde mit dem Wilcoxon-Test durchgeführt. Für die Auswertung des Verlaufs über die Zeitpunkte 24 bis 48 Stunden wurde der Mann-Whitney-U-Test genutzt. Zur graphischen Darstellung wurden Boxplots gewählt.

Die statistische Auswertung wurde für das gesamte Versuchsvorhaben in Absprache mit der statistischen Abteilung der Charité Berlin erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der FACS Untersuchung

Die Werte der FACS Untersuchungen wurden gegen die Resultate aus der Blutuntersuchung, die präoperativ durchgeführt wurde, aufgetragen. Die Ergebnisse der Blutproben wurden für jedes Tier als 100 % definiert, um die individuellen immunologischen Unterschiede der Tiere heraus zu rechnen. Da die Tiere aus einer normalen Schafhaltung stammen, starten sie mit einem individuellen Immunstatus in den Versuch, der aus der Auswertung ausgeschlossen werden sollte. Mit Hilfe einer rot gestrichelten Linie wurden die Ergebnisse aus der Blutuntersuchung in den Graphen kenntlich gemacht.

4.1.1 CD 45

Der Leukozytenmarker CD 45 konnte in allen Proben und zu allen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Die ermittelten Werte der CD 45⁺ Zellen liegen in allen Proben unter den Werten, die in den Blutproben gemessen wurden (OH $p=0,031$; WH $p=0,031$; KM $p=0,031$). Im Osteotomiehämatom ist zum Zeitpunkt 36 Stunden eine leichte Abnahme der Zellpopulation zu erkennen. Anschließend ist nach 48 Stunden ein eindeutiger Anstieg zu verzeichnen ($p=0,041$). In den Weichteilhämatomen und im Knochenmark liegen die Zellzahlen relativ konstant auf einem Niveau. Ein leichter Anstieg ist lediglich zum Zeitpunkt 48 Stunden im Knochenmark zu erkennen. Die Werte der CD 45⁺ Zellen im Knochenmark sind im Vergleich zum Osteotomiehämatom ($p=0,031$) und zum Weichteilhämatom ($p=0,031$) bedeutend niedriger.

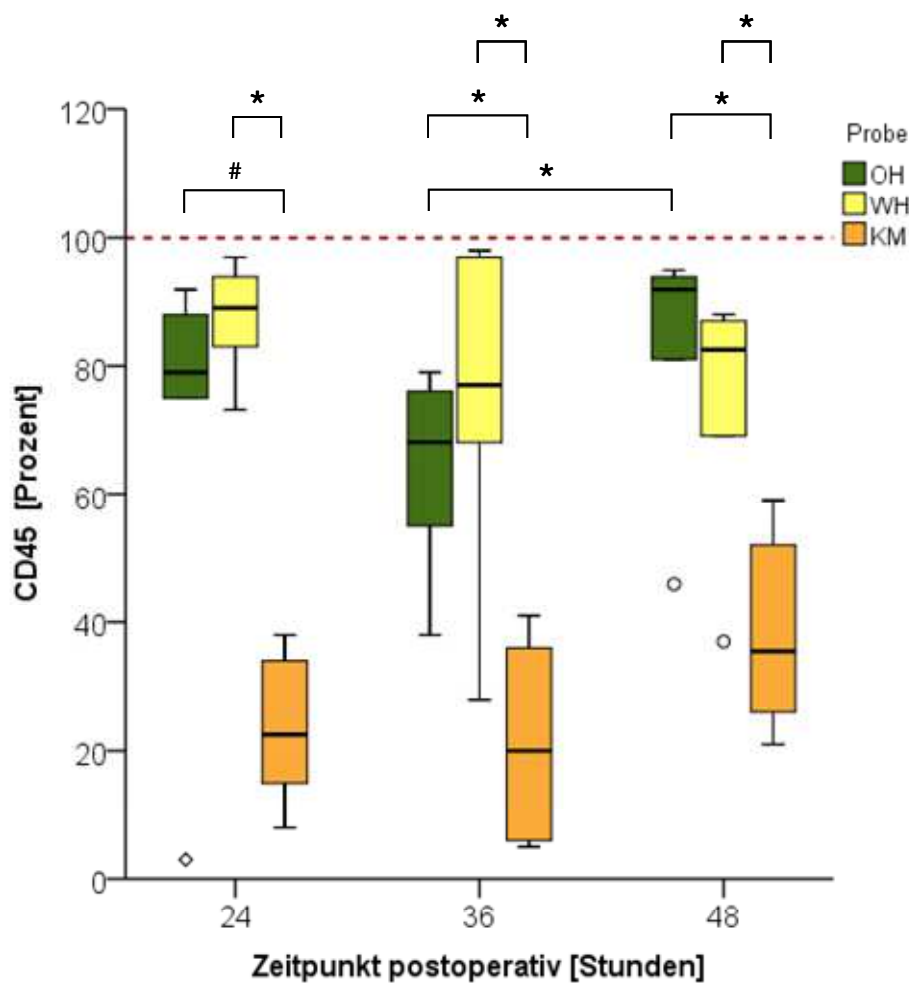


Abbildung 4.1. CD 45 positive Zellen im Osteotomiehämatom (OH), Weichteilhämatom (WH) und im Knochenmark (KM) (* $p<0,05$; # $p<0,1$; o = Ausreißer; \diamond = Extremwert)

4.1.2 CD 14

Das Rezeptorprotein der Monozyten CD 14 konnte in allen Proben und zu allen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Der Anteil CD 14 positiver Zellen liegt in den Proben über den Werten, die im Blut gemessen wurden. Eine Ausnahme bildet zum Zeitpunkt 24 Stunden das Knochenmark. Dort liegen die prozentualen Anteile leicht unter denen im Blut. Im Gegensatz dazu befinden sich die Werte der Osteotomiehämatome ($p=0,031$) und der Weichteilhämatome ($p=0,031$) zu diesem Zeitpunkt auffallend über denen des Knochenmarks. Sowohl in den Proben der Weichteilhämatome als auch in denen des Knochenmarks ist über den gesamten Zeitraum ein leichter Anstieg der Werte zu verzeichnen. Die Anteile der CD 14 positiven Zellen im Osteotomiehämatom sinken zum Zeitpunkt 48 Stunden post OP wieder auf die Werte, die zum Zeitpunkt 24 Stunden gemessen wurden.

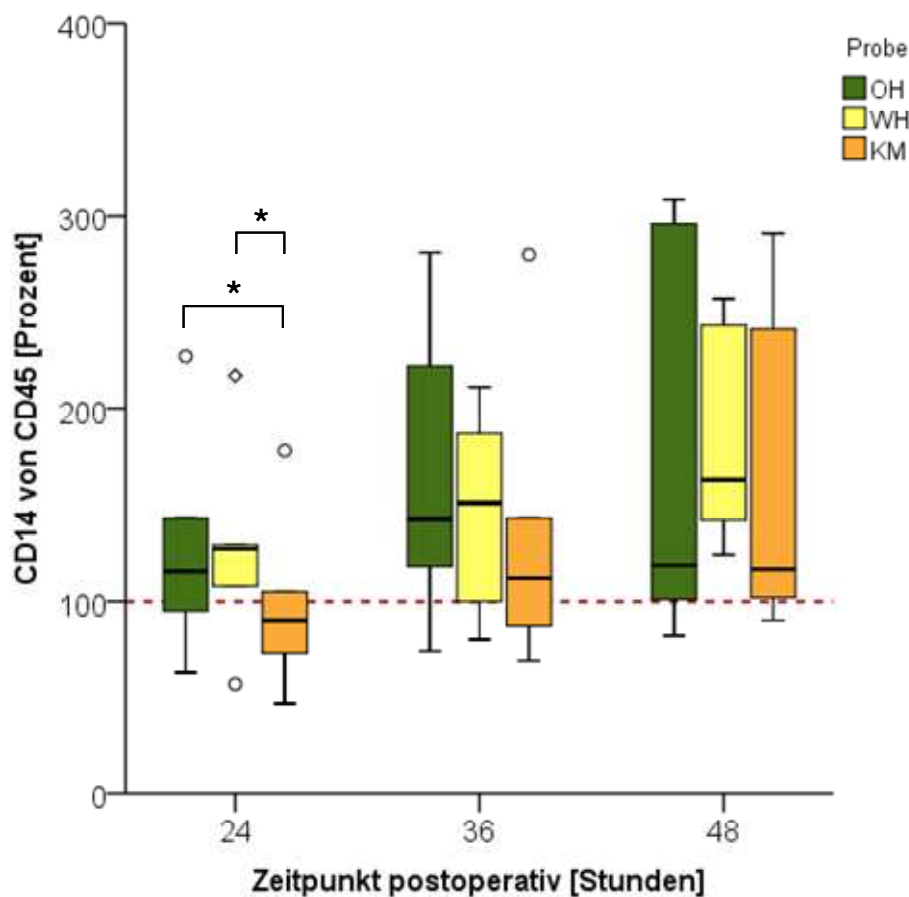


Abbildung 4.2. Anteil CD 14 positiver Zellen in der Leukozytenpopulation im Osteotomiehämatom (OH), Weichteilhämatom (WH) und im Knochenmark (KM) (* $p<0,05$; # $p<0,1$; o = Ausreißer; \diamond = Extremwert)

4.1.3 CD 21

Der Marker reifer B-Lymphozyten CD 21 konnte in allen Proben und zu allen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Dieser Anteil der Zellen liegt in allen Proben unter denen, die im Blut nachgewiesen wurden. Der prozentuale Anteil im Knochenmark ist Bezug nehmend auf die ermittelten Werte im Blut deutlich niedriger ($p=0,031$). Zum Zeitpunkt 48 Stunden findet im Osteotomiehämatom ein leichter Anstieg der CD 21 positiven Zellen statt. Im Weichteilhämatom und im Knochenmark kann über den gesamten Zeitraum kein Trend beobachtet werden. Ein drastischer Unterschied zeigt sich nach 24 Stunden zwischen dem Osteotomiehämatom und dem Knochenmark ($p=0,031$). Sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden lässt sich zwischen Weichteilhämatom und Knochenmark ein Trend erkennen. Die Anzahl der CD 21 positiven Zellen liegt dabei im Weichteilhämatom tendenziell höher als im Knochenmark.

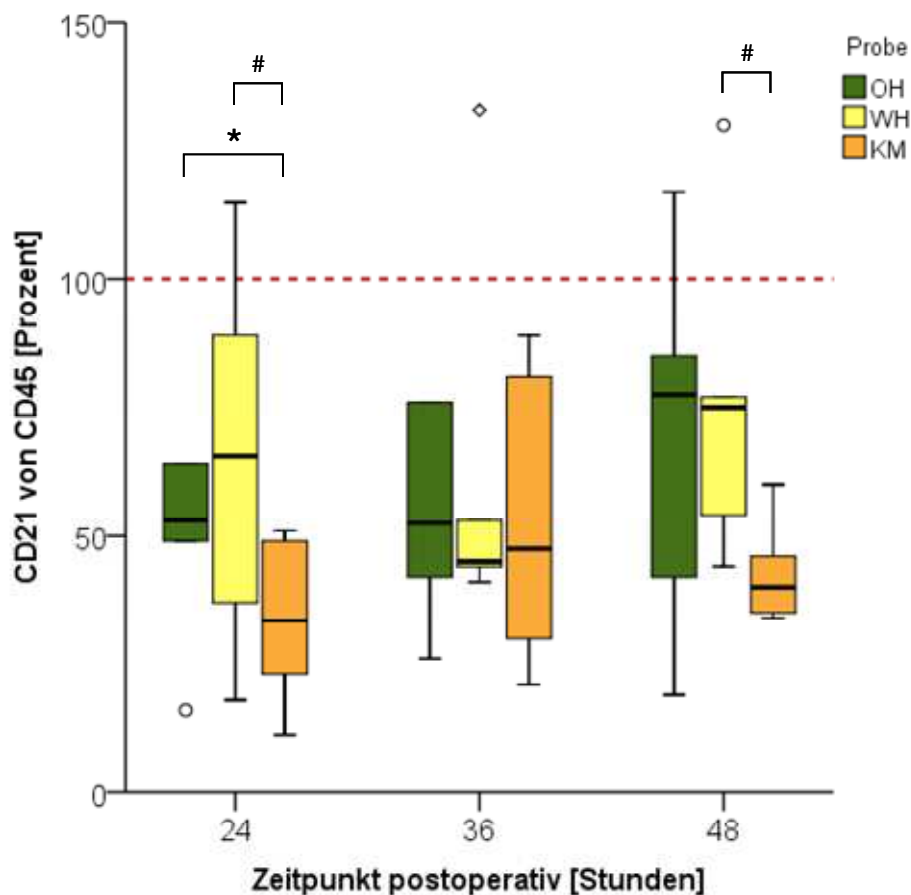


Abbildung 4.3. Anteil CD 21 positiver Zellen in der Leukozytenpopulation im Osteotomiehämatom (OH), Weichteilhämatom (WH) und im Knochenmark (KM) (* $p<0,05$; # $p<0,1$; o = Ausreißer; ◇ = Extremwert)

4.1.4 CD 5

Dieser Marker der T-Lymphozyten konnte in allen Proben und zu allen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Im Knochenmark befinden sich nach 24 ($p=0,031$) und 48 Stunden ($p=0,031$) auffallend weniger CD 5 positive Zellen als im Blut. Zum Zeitpunkt 36 Stunden zeichnet sich lediglich ein Trend ab. Im Osteotomiehämatom stellen sich zum Zeitpunkt 24 Stunden deutlich geringere Werte als im Blut dar ($p=0,031$). Während im Knochenmark über den gesamten Zeitraum relativ konstante Prozentzahlen gemessen wurden, ist sowohl im Osteotomiehämatom als auch im Weichteilhämatom ein leichter Anstieg zu verzeichnen. 24 Stunden post OP zeigen sich im Weichteilhämatom geringgradig mehr CD 5 positive Zellen als im Osteotomiehämatom. Diese wiederum liegen etwas über den Werten im Knochenmark. Eine ähnliche Verteilung ist zu den anderen beiden Zeitpunkten erkennbar. Diese Zellpopulation hat zum Zeitpunkt 48 Stunden im Weichteilhämatom bedeutend höhere Anteile als im Knochenmark ($p=0,031$).

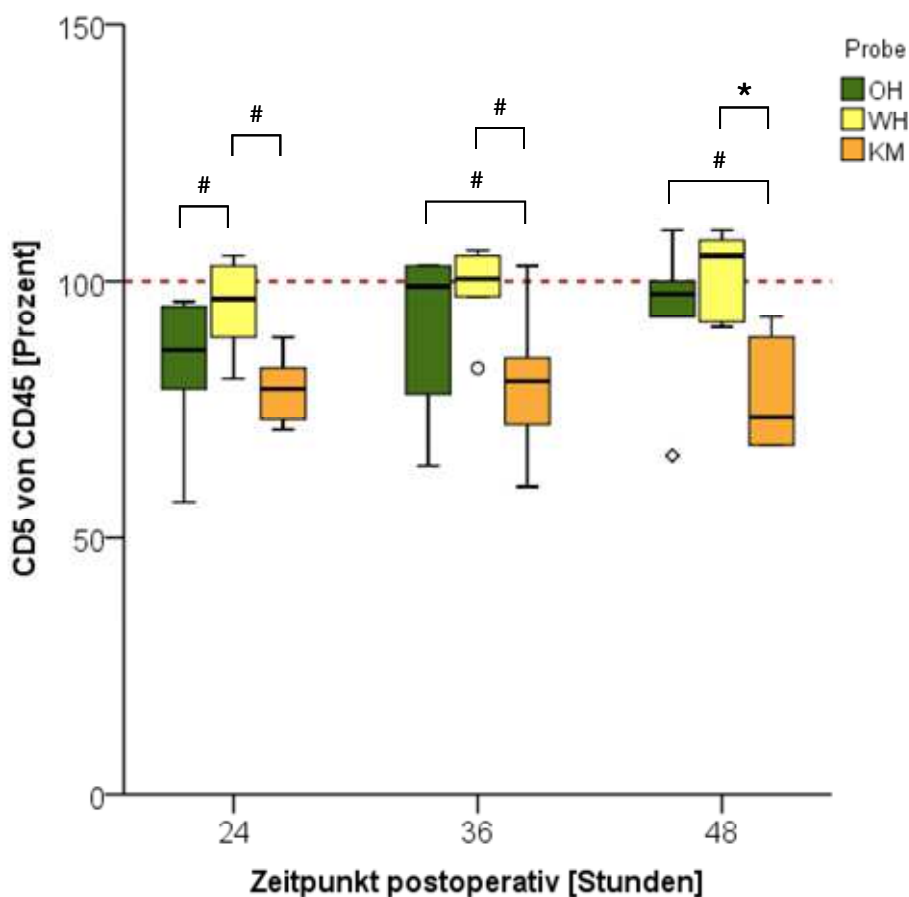


Abbildung 4.4. Anteil CD 5 positiver Zellen in der Leukozytenpopulation im Osteotomiehämatom (OH), Weichteilhämatom (WH) und im Knochenmark (KM) (* $p < 0,05$; # $p < 0,1$; o = Ausreißer; \diamond = Extremwert)

4.1.5 CD 8

Diese Gruppe der cytotoxischen T-Zellen konnte in allen Proben und zu allen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Klare Unterschiede zeigen sich im Vergleich der Proben mit der Blutuntersuchung. Im Osteotomiehämatom liegen die Werte nach 48 Stunden ($p=0,031$) und im Weichteilhämatom nach 36 ($p=0,031$) und 48 Stunden ($p=0,031$) deutlich unter denen der Blutuntersuchung. Im Osteotomiehämatom nimmt der Anteil cytotoxischer T-Zellen über die Zeitspanne ab. Ein leichter Abfall lässt sich auch im Weichteilhämatom erkennen. Das Knochenmark weist zu den Zeitpunkten 24 und 48 Stunden einen insgesamt etwas höheren Anteil an CD 8 positiven Zellen auf. Einen deutlichen höheren Anteil erreichen zum Untersuchungszeitpunkt 48 Stunden die cytotoxischen T-Zellen im Knochenmark im Vergleich zum Osteotomiehämatom ($p=0,031$). Diese Anteile liegen damit auch über den Ergebnissen der Blutuntersuchung.

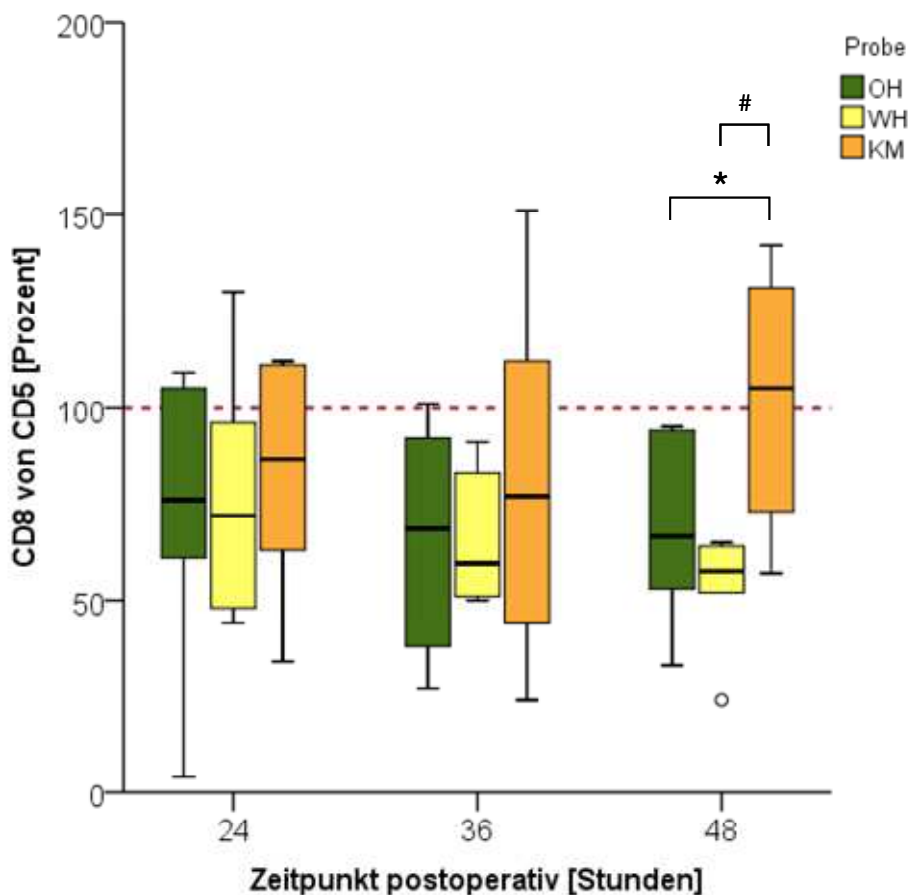


Abbildung 4.5. Anteil CD 8 positiver Zellen in der T-Lymphozytenpopulation im Osteotomiehämatom (OH), Weichteilhämatom (WH) und im Knochenmark (KM) (* $p<0,05$; # $p<0,1$; o = Ausreißer; \diamond = Extremwert)

4.1.6 CD 4

T-Helferzellen konnten in allen Proben und zu allen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Bezug nehmend auf die Blutuntersuchung liegen die prozentualen Anteile der Osteotomiehämatome unter und die der Weichteilhämatome etwas über den Referenzwerten. Ein deutlich geringerer Anteil an T-Helferzellen besteht über den gesamten Zeitraum im Knochenmark verglichen mit den Ergebnissen der Blutuntersuchung ($p=0,031$). Die ermittelten Werte der CD 4 positiven Zellen im Knochenmark liegen im gesamten Zeitintervall deutlich unter dem Niveau der Osteotomie- und Weichteilhämatomproben. So zeichnen sich beim Vergleich mit den Weichteilhämatomproben zum Zeitpunkt 24 Stunden ($p=0,031$), 36 Stunden ($p=0,031$) und 48 Stunden ($p=0,031$) auffällige Unterschiede ab. Nach 36 und 48 Stunden post OP liegen die Ergebnisse der Osteotomiehämatome eindeutig über denen des Knochenmarks ($p=0,031$; $p=0,031$). Zum Zeitpunkt 24 Stunden ist zwischen Osteotomiehämatom und Knochenmark ein Trend erkennbar. Über den gesamten Zeitraum steigen die T-Helfer-Zellen im Knochenmark leicht an. Im Osteotomiehämatom bleiben die Werte, welche gering unter denen der Blutproben liegen, in etwa auf dem gleichen Niveau. Im Weichteilhämatom zeigt sich nach 36 Stunden ein leichter Anstieg der Zellpopulation, um dann nach 48 Stunden etwas unter den Anfangswert (24 Stunden) zu sinken. Zum Zeitpunkt 36 Stunden zeigen sich im Osteotomiehämatom auffallend niedrigere Werte als im Weichteilhämatom ($p=0,031$).

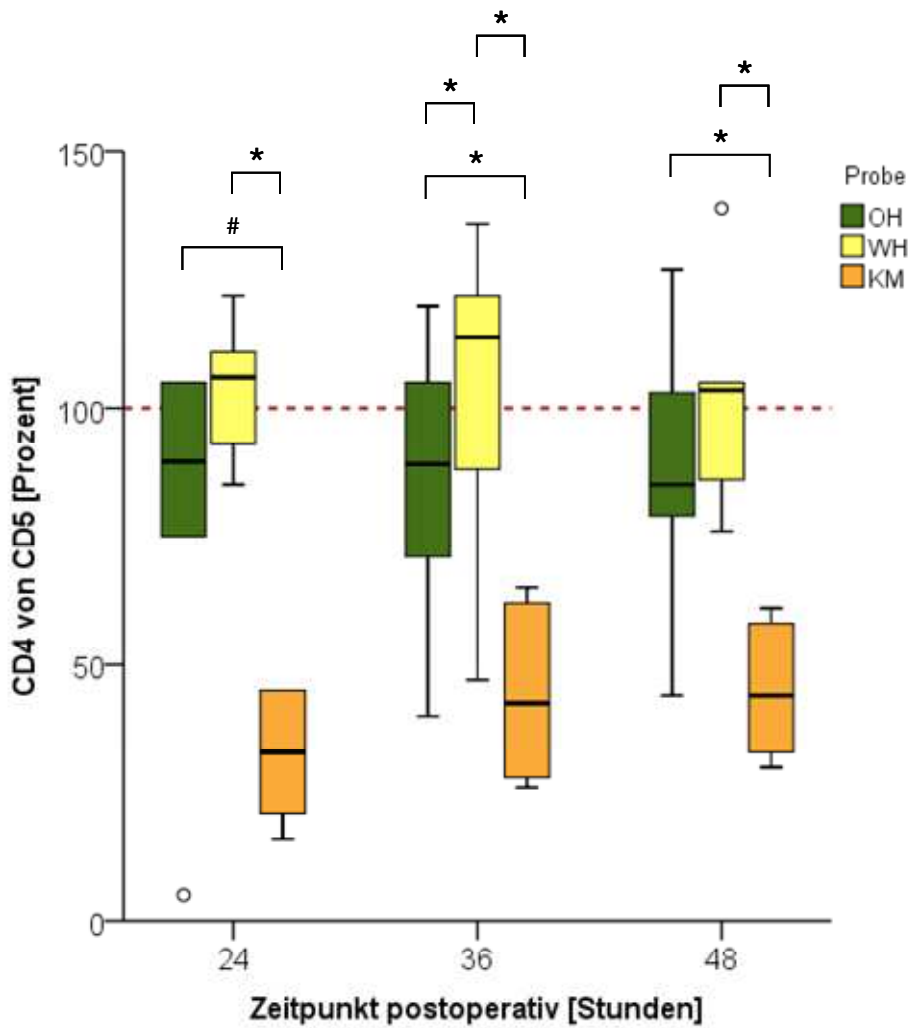


Abbildung 4.6. Anteil CD 4 positiver Zellen der T-Lymphozytenpopulation im Osteotomiehämatom (OH), Weichteilhämatom (WH) und im Knochenmark (KM) (* p<0,05; # p<0,1; o = Ausreißer; ◇ = Extremwert)

4.1.7 CD 25

Aktiviert und regulatorische T-Zellen konnten in allen Proben und zu allen Zeitpunkten nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.7.a). Die Werte der CD 25 positiven Zellen in der T-Helferzellpopulation im Osteotomiehämatom liegen im gesamten Zeitraum auf dem Niveau der im Blut aufgefundenen Zellen. Die Anteile im Weichteilhämatom liegen unter denen der Blutuntersuchung. Zum Zeitpunkt 48 Stunden befanden sich deutlich weniger der untersuchten Zellen im Weichteilhämatom als im Blut ($p=0,031$). In Bezug auf die Blutproben konnten im Knochenmark 24 Stunden postoperativ auffallend höhere Anteile registriert werden ($p=0,031$). Diese Zellpopulation im Weichteilhämatom befindet sich zum Zeitpunkt 24 Stunden klar unter der im Osteotomiehämatom ($p=0,031$) und sinkt zum Zeitpunkt 48 Stunden weiter ab. Die Ergebnisse der Untersuchungen im Knochenmark zeigen deutlich mehr CD 25 positive T-Lymphozyten als in den anderen Proben. Zum Zeitpunkt 24 Stunden ergeben sich daraus deutliche Differenzen sowohl zum Osteotomiehämatom ($p=0,031$) als auch zum Weichteilhämatom ($p=0,031$) sowie zum Zeitpunkt 48 Stunden zum Weichteilhämatom ($p=0,031$).

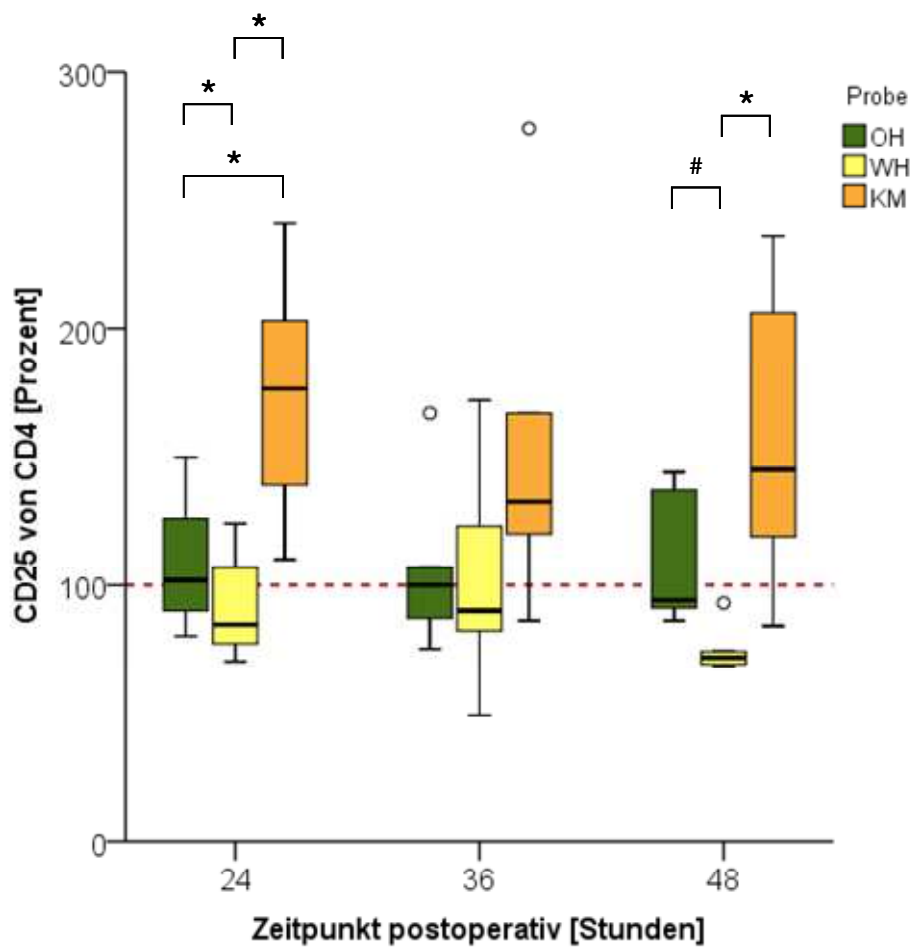


Abbildung 4.7.a Anteil CD 25 positiver Zellen (aktivierte und regulatorische T-Zellen) in der T-Helferzellpopulation im Osteotomiehämatom (OH), Weichteilhämatom (WH) und im Knochenmark (KM) (* $p < 0,05$; # $p < 0,1$; o = Ausreißer; ◇ = Extremwert)

Regulatorische T-Zellen konnten in allen Proben und zu allen Zeitpunkten nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.7.b). Der Anteil regulatorischer T-Zellen (CD 25⁺⁺) an den CD 4 positiven Zellen unterscheidet sich von den aktivierten und regulatorischen T-Zellen (CD 25⁺) anhand der Menge der auf der Oberfläche exprimierten Antigene. Im Osteotomiehämatom bleibt der Anteil der regulatorischen T-Zellen über die gesamte Zeit auf einem Niveau, welches nur leicht über dem des Blutes liegt. Ähnlich verhält es sich im Weichteilhämatom, mit dem Unterschied, dass nach 48 Stunden dieser Anteil leicht absinkt. Im Knochenmark können deutliche Unterschiede festgestellt werden. Die Größe der Zellpopulation ist hier vor allem nach 24 Stunden sichtlich höher, sinkt aber nach 36 Stunden wieder etwas ab, um nach 48 Stunden wieder auf das ursprüngliche Niveau anzusteigen. Auffallend ist die erkennbar breitere Streuung der prozentualen Anteile im Knochenmark.

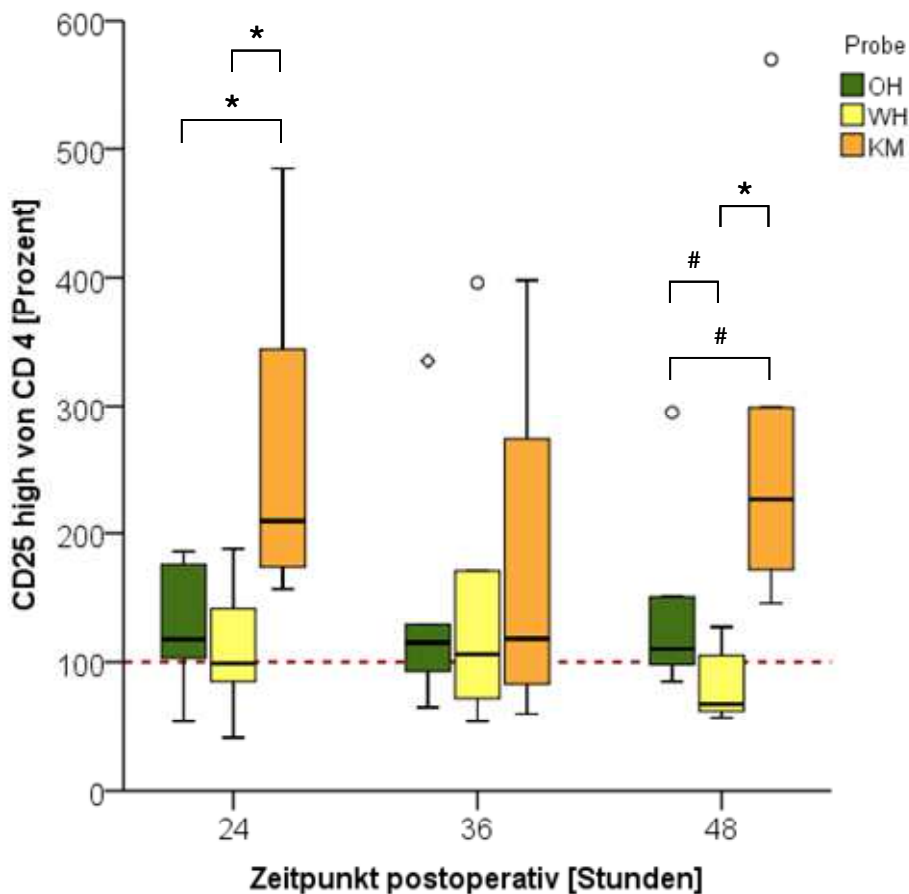


Abbildung 4.7.b Anteil CD 25 positiver Zellen (CD 25⁺⁺, regulatorische T-Zellen) in der T-Helferzellpopulation im Osteotomiehämatom (OH), Weichteilhämatom (WH) und im Knochenmark (KM) (* p<0,05; # p<0,1; o = Ausreißer; ◇ = Extremwert)

4.1.8 CD 31

Der Endothelzellmarker CD 31 konnte in allen Proben und zu allen Zeitpunkten nachgewiesen werden. Die Anzahl der Endothelzellen ist sowohl im Weichteilhämatom als auch im Osteotomiehämatom geringer als im präoperativ entnommenen Blut. Im Gegensatz dazu zeigen sich im Knochenmark zu allen drei Untersuchungszeitpunkten mehr CD 31 positive Zellen als im Blut. Der Anteil der CD 31 positiven Zellen ist jeweils im Osteotomiehämatom, im Weichteilhämatom und im Knochenmark im Laufe der Zeit auf einem ähnlichen Niveau geblieben. Zum Zeitpunkt 24 Stunden post OP sind die Endothelzellen im Knochenmark vermehrt anzutreffen. Diesbezüglich zeichnet sich zum Osteotomie- und Weichteilhämatom ein Trend ab. Das gleiche Verhältnis findet sich zum Zeitpunkt 48 Stunden postoperativ.

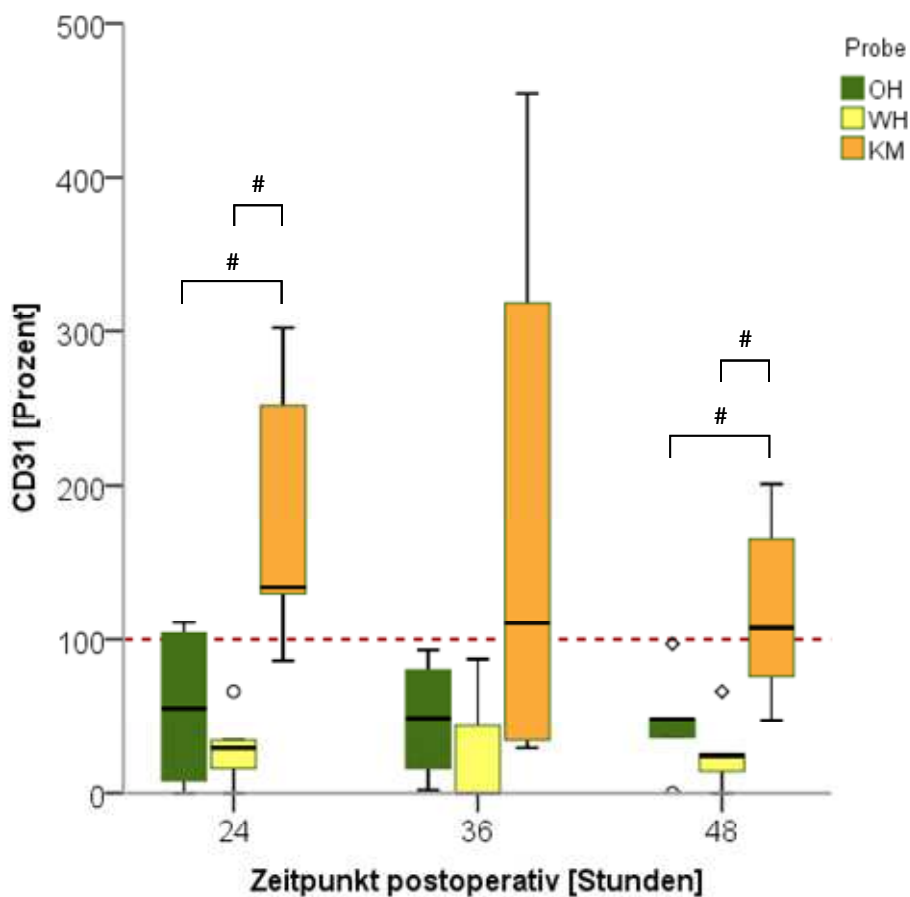


Abbildung 4.8. Anteil CD 31 positiver Zellen im Osteotomiehämatom (OH), Weichteilhämatom (WH) und im Knochenmark (KM) (* $p < 0,05$; # $p < 0,1$; o = Ausreißer; ◇ = Extremwert)

4.2 Ergebnisse der PCR

4.2.1 BMP-2

Für die Expression des osteogenen Faktors BMP-2 konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. In beiden Hämatomarten ist über die Zeit ein Anstieg zu erkennen. In der Gruppe der Osteotomiehämatome erfolgt der Anstieg der mRNA-Konzentration nach 48 Stunden. Auffällig ist dabei die deutliche Varianz der BMP-2-Expression. In den Weichteilhämatomen setzt eine deutliche Erhöhung der Expression bereits nach 36 Stunden ein ($p=0,036$). 48 Stunden postoperativ zeigt der Vergleich beider Gruppen im Osteotomiehämatom eine ausgeprägtere Expression von BMP-2.

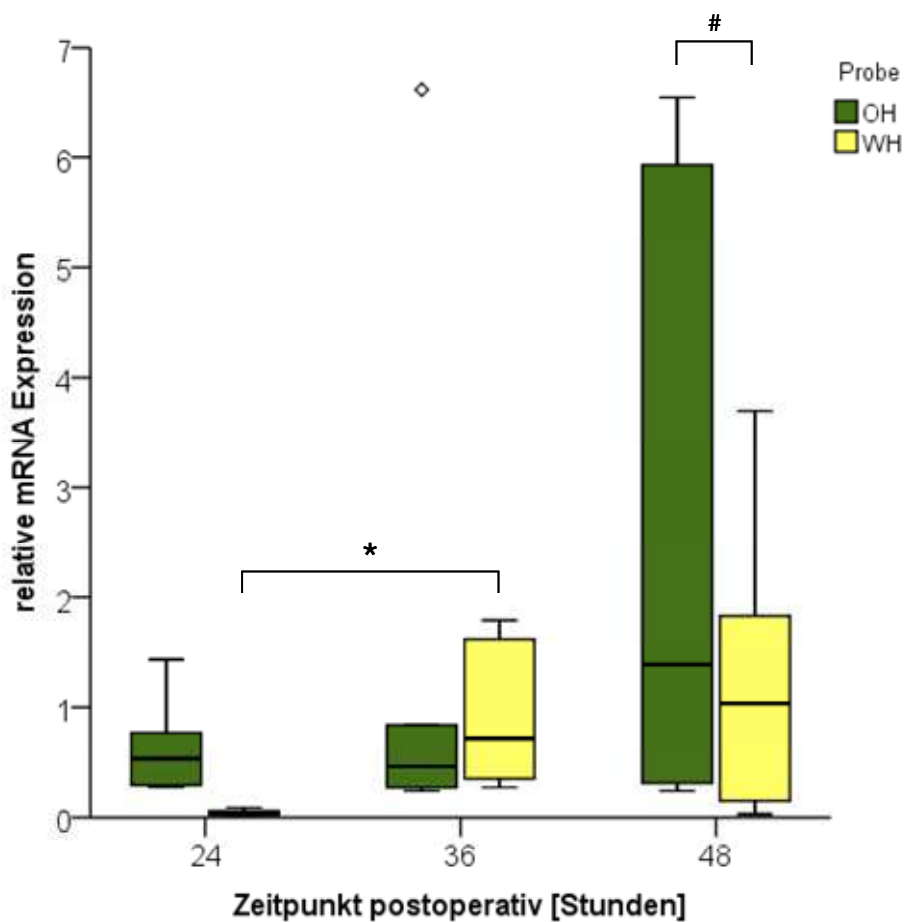


Abbildung 4.9. relative mRNA-Expression von BMP-2 im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p<0,05$; # $p<0,1$; o = Ausreißer; \diamond = Extremwert)

4.2.2 CD 19

Für die Expression des frühen B-Zellmarkers CD 19 konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. Sowohl in den Osteotomie- als auch in den Weichteilhämatomen konnte ein leichter Anstieg der mRNA-Expression von CD 19 im Untersuchungszeitraum registriert werden. Die Mittelwerte beider Untersuchungsgruppen liegen zu allen drei Zeitpunkten sehr nah beieinander, wenngleich nach 48 Stunden in den Osteotomiehämatomen eine größere Varianz vorzufinden ist.

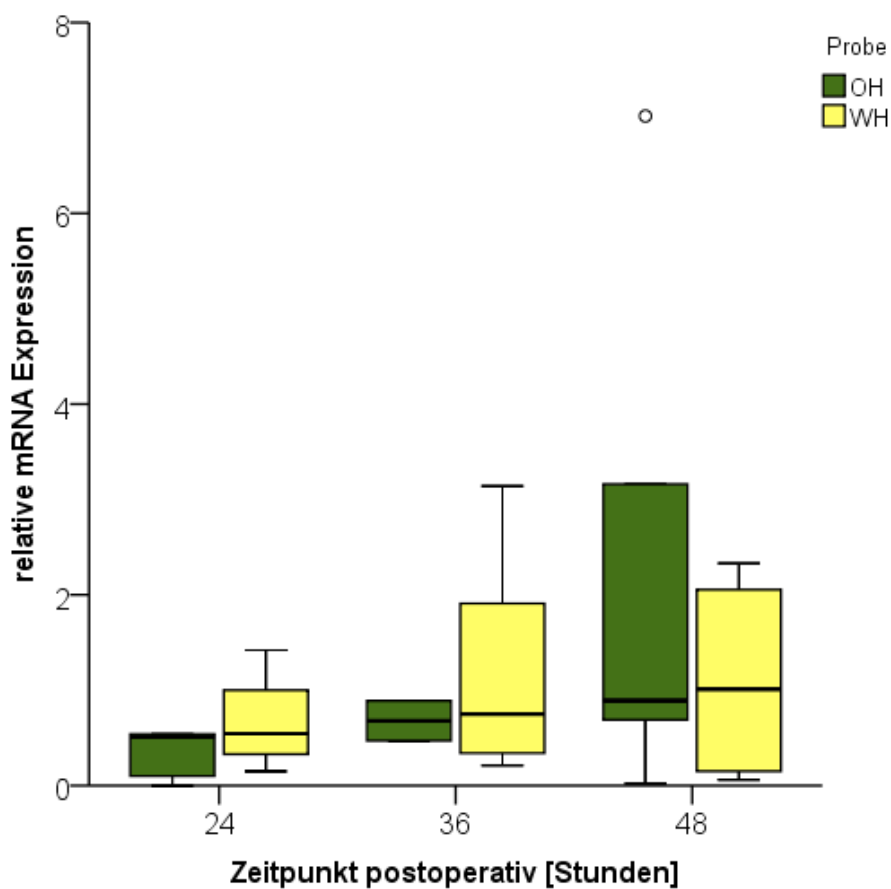


Abbildung 4.10. relative mRNA-Expression von CD 19 im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p < 0,05$; # $p < 0,1$; o = Ausreißer; \diamond = Extremwert)

4.2.3 CD 34

Für die Expression von CD 34, einem Marker hämatopoetischer Stammzellen, konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. In beiden Versuchsgruppen war nach 36 Stunden ein Expressionspeak zu verzeichnen. In den Weichteilhämatomen ist dieser Anstieg deutlicher ($p=0,032$) als in den Hämatomen nach der Osteotomie. Danach nimmt in beiden Gruppen die Konzentration der mRNA für CD 34 wieder ab und erreicht nach 48 Stunden die Werte, welche zum Zeitpunkt 24 Stunden gemessen wurden.

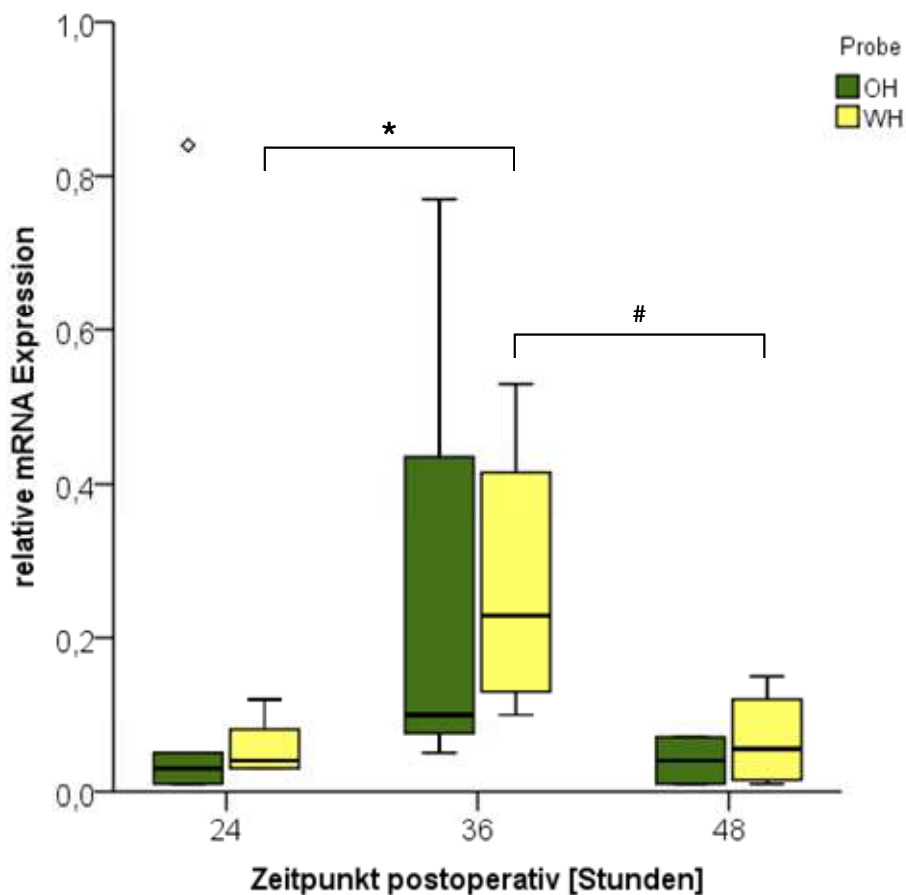


Abbildung 4.11. relative mRNA-Expression von CD 34 im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p<0,05$; # $p<0,1$; o = Ausreißer; \diamond = Extremwert)

4.2.4 CD 73

Für die Expression von CD 73, einem Indikator für mesenchymale Stammzellen, konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. Während die mRNA-Expression in der Gruppe der Weichteilhämatome über den Zeitverlauf auf einem ähnlichen Niveau verbleibt, steigt die Expression für CD 73 in den Osteotomiehämatomen nach 36 Stunden leicht an. Nach diesem Expressionspeak sinken die Werte wieder auf die Ausgangswerte.

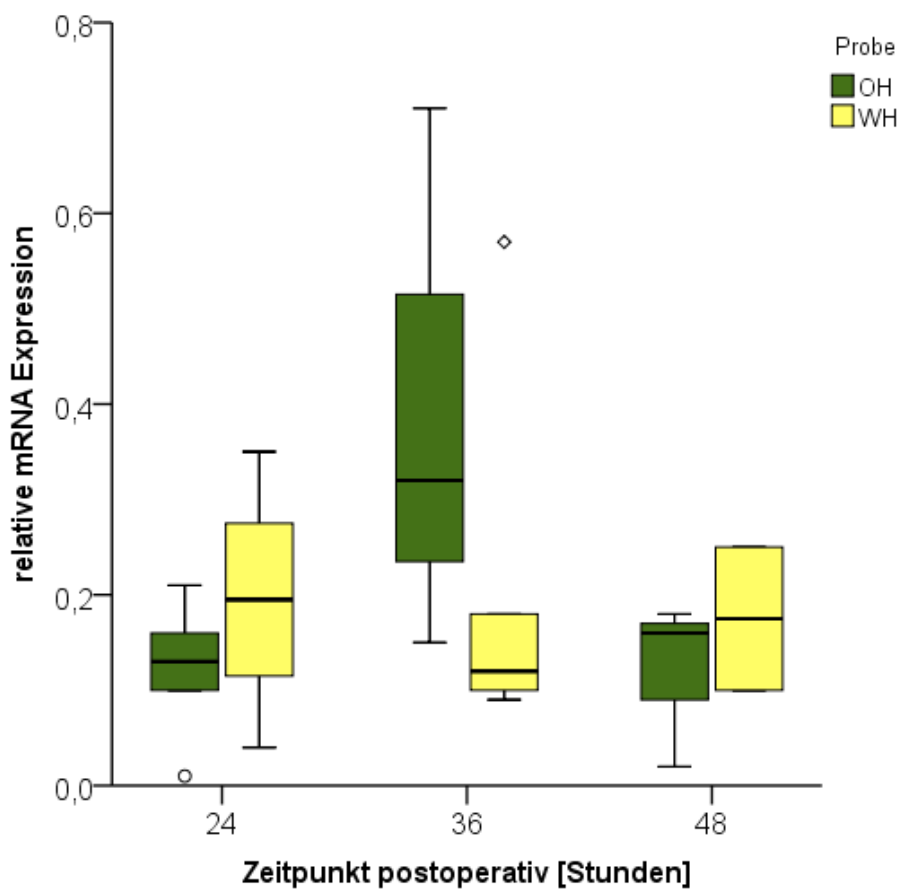


Abbildung 4.12. relative mRNA-Expression von CD 73 im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p < 0,05$; # $p < 0,1$; o = Ausreißer; ◇ = Extremwert)

4.2.5 GDF-8

Für die Expression von GDF-8, welches regulierend auf die Muskulatur und Knochenmasse einwirkt, konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. In der Gruppe der Osteotomiehämatome kann im Zeitverlauf weder ein Ansteigen noch ein Abfallen der GDF-8-Konzentration registriert werden. Die Werte liegen insgesamt dennoch höher als in den Weichteilhämatomen und zeigen eine relativ große Standardabweichung. Nach 36 Stunden konnte in den Weichteilhämatomen ein deutlicher Anstieg der Expression von GDF-8 festgestellt werden ($p=0,036$).

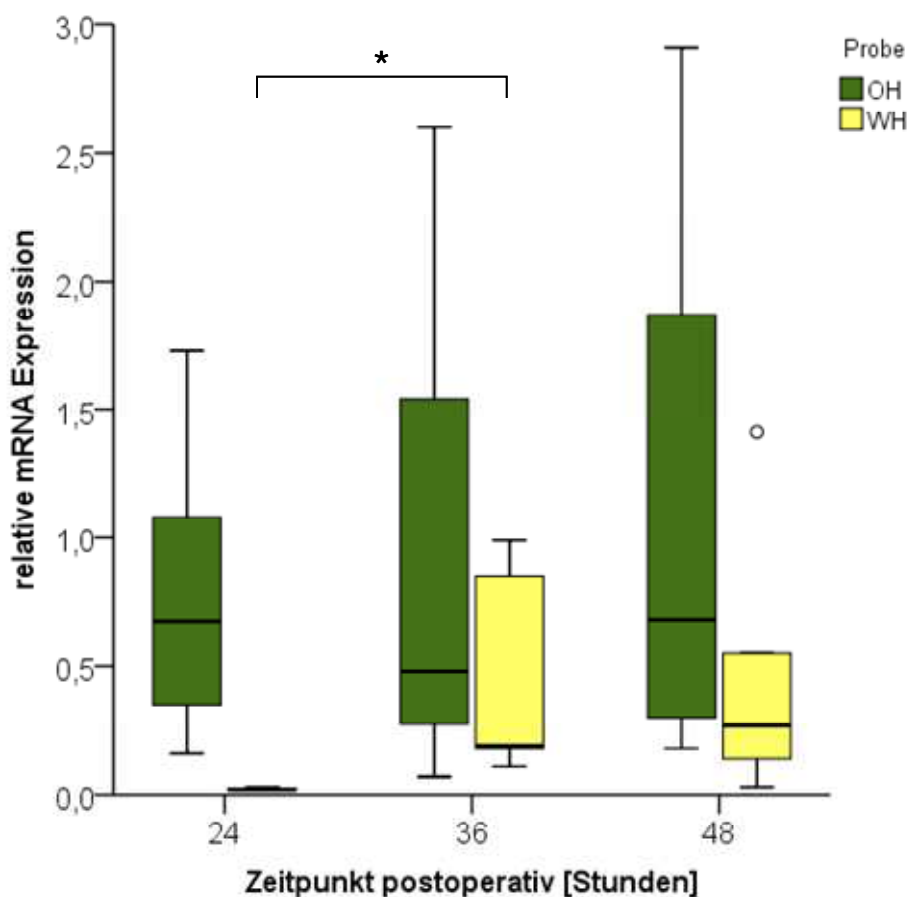


Abbildung 4.13. relative mRNA-Expression von GDF-8 im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p<0,05$; # $p<0,1$; o = Ausreißer; \diamond = Extremwert)

4.2.6 GLUT 1

Für die Expression von GLUT 1, welches ein Indikator für eine anaerobe Stoffwechsellage und somit kennzeichnend für eine Hypoxie ist, konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. Die mRNA-Expression zeigt in den Osteotomiehämatomen einen kontinuierlichen, leichten Anstieg, wohingegen in der Gruppe der Weichteilhämatome zum Zeitpunkt 48 Stunden ein deutlicher Anstieg festzustellen ist ($p=0,016$). Im Ganzen betrachtet besteht in den Osteotomiehämatomen eine höhere Expression als in den Weichteilhämatomen. Im beschriebenen Zeitraum von 24 bis 48 Stunden findet die maximale Expression 48 Stunden postoperativ in den Hämatomen nach der Osteotomie statt.

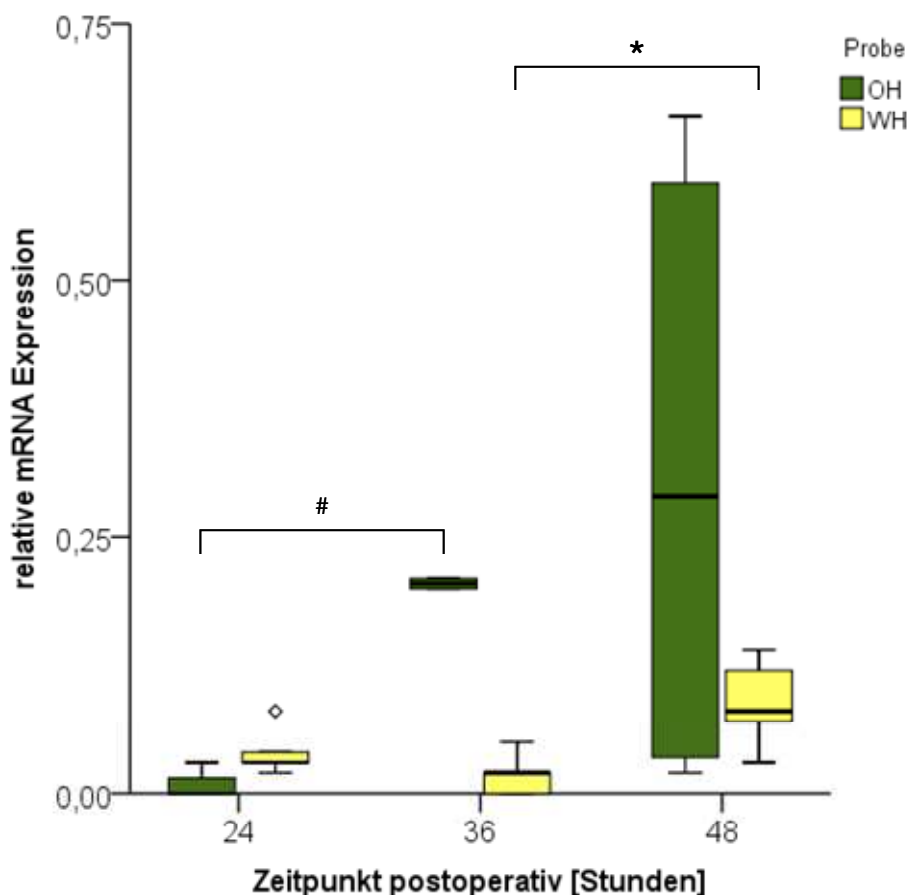


Abbildung 4.14. relative mRNA-Expression von GLUT 1 im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p<0,05$; # $p<0,1$; o = Ausreißer; \diamond = Extremwert)

4.2.7 HIF 1 α

Für die Expression des Hypoxiemarkers HIF 1 α konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. In den Osteotomiehämatomen liegt der Ausgangswert der HIF 1 α -Konzentration zum Zeitpunkt 24 Stunden unter dem der anderen Gruppe. Nach 36 Stunden ist aber im Gegensatz zu den Weichteilhämatomen ein deutlicher Anstieg von HIF 1 α zu erkennen ($p=0,015$). Nach 48 Stunden sinkt der Wert wieder leicht ab. Im Weichteilhämatom ist ersichtlich, dass die HIF 1 α -Expression über den untersuchten Zeitraum nur geringgradig ansteigt.

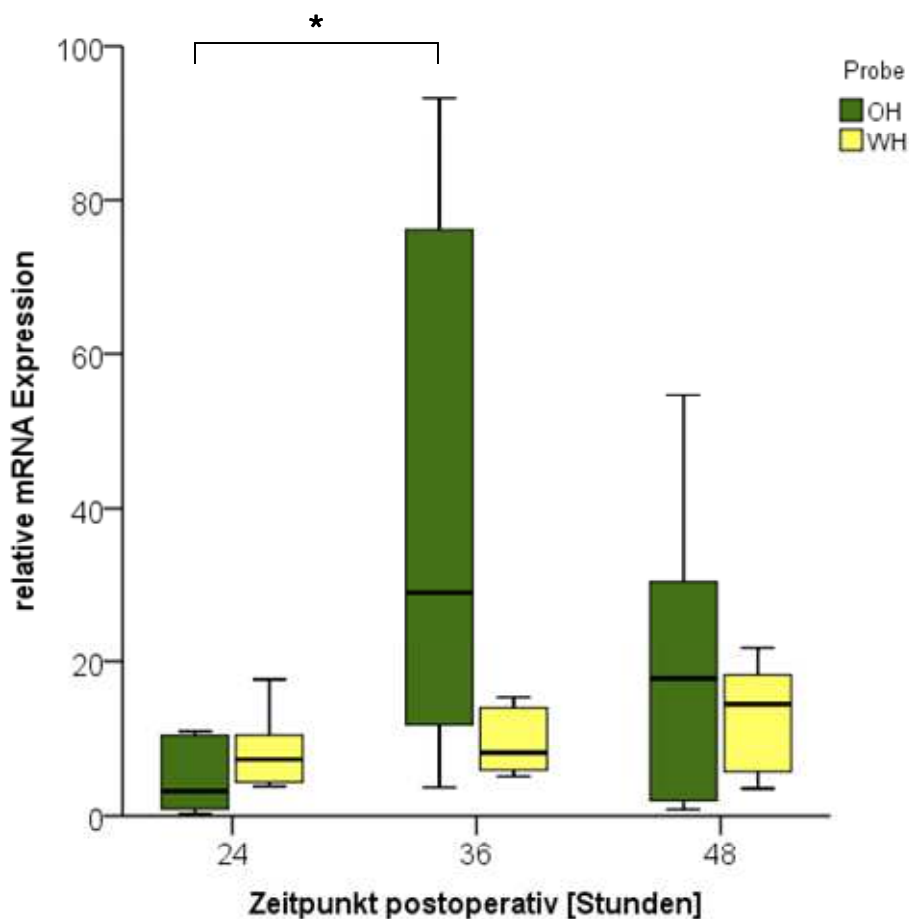


Abbildung 4.15. relative mRNA-Expression von HIF 1 α im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p < 0,05$; # $p < 0,1$; o = Ausreißer; \diamond = Extremwert)

4.2.8 HMOX 1

Für den angiogenen Faktor HMOX 1 konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. Zum Zeitpunkt 24 Stunden liegt die mRNA-Expression von HMOX 1 im Osteotomiehämatom unter der in den Weichteilhämatomen. Nach 36 Stunden nimmt die Expression auffallend zu, geht aber zum Ende des untersuchten Zeitraumes wieder leicht zurück. Die mRNA-Expression von HMOX 1 erfährt in den Weichteilhämatomen nur eine sehr leichte Steigerung, die, im Gegensatz zur Gruppe der Osteotomiehämatome, etwas verzögert einsetzt.

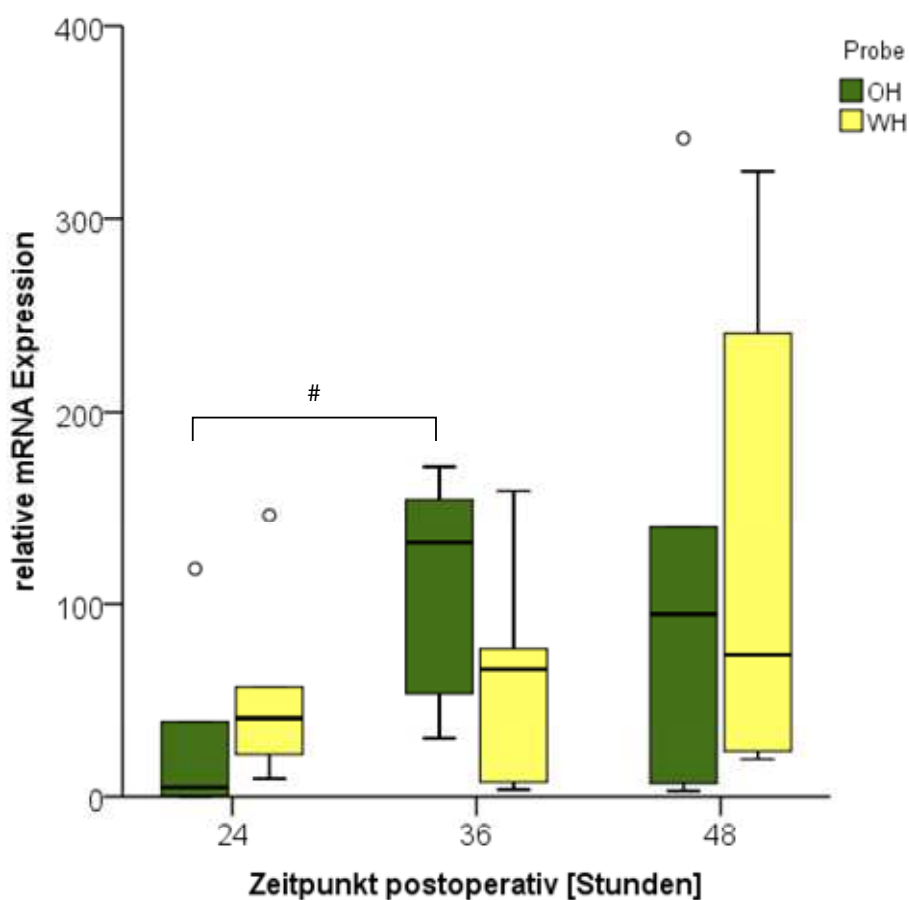


Abbildung 4.16. relative mRNA-Expression von HMOX 1 im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p < 0,05$; # $p < 0,1$; o = Ausreißer; \diamond = Extremwert)

4.2.9 IL-1 β

Für die Expression des proinflammatorischen Faktors IL-1 β konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. 24 Stunden postoperativ wird IL-1 β im Hämatom des Muskels etwas mehr exprimiert als im Osteotomiehämatom und mit einer deutlichen Streuung der Ergebnisse. 12 Stunden später kommt es aber zu einem starken Abfall ($p=0,03$). In den Osteotomiehämatomen verbleibt die Expression über den gesamten Zeitraum auf einem Level. Zum Zeitpunkt 36 Stunden liegt die Expression für IL-1 β leicht über der Expression in den Weichteilhämatomen, auch hier mit einer relativ großen Standardabweichung.

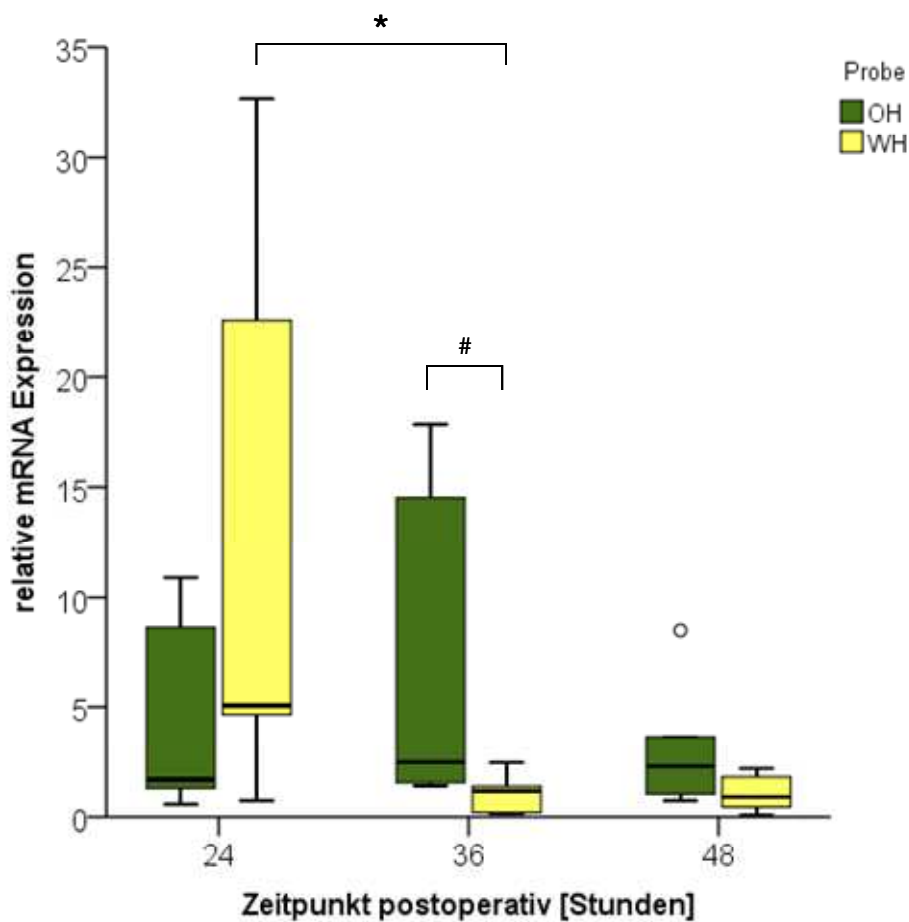


Abbildung 4.17. relative mRNA-Expression von IL-1 β im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p<0,05$; # $p<0,1$; o = Ausreißer; \diamond = Extremwert)

4.2.10 IL-2

Für die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL-2, welches von aktivierten und regulatorischen T-Zellen gebildet wird, konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. Die Expression von IL-2 ist in den Osteotomiehämatomen über den gesamten untersuchten Zeitraum konstant auf einem Niveau. Auffallend ist die relativ große Streuung, die nach 24 Stunden am deutlichsten ausgeprägt ist. Innerhalb der Osteotomiehämatome zeigt sich nach 36 Stunden ein deutlicher Anstieg der mRNA-Expression ($p=0,03$).

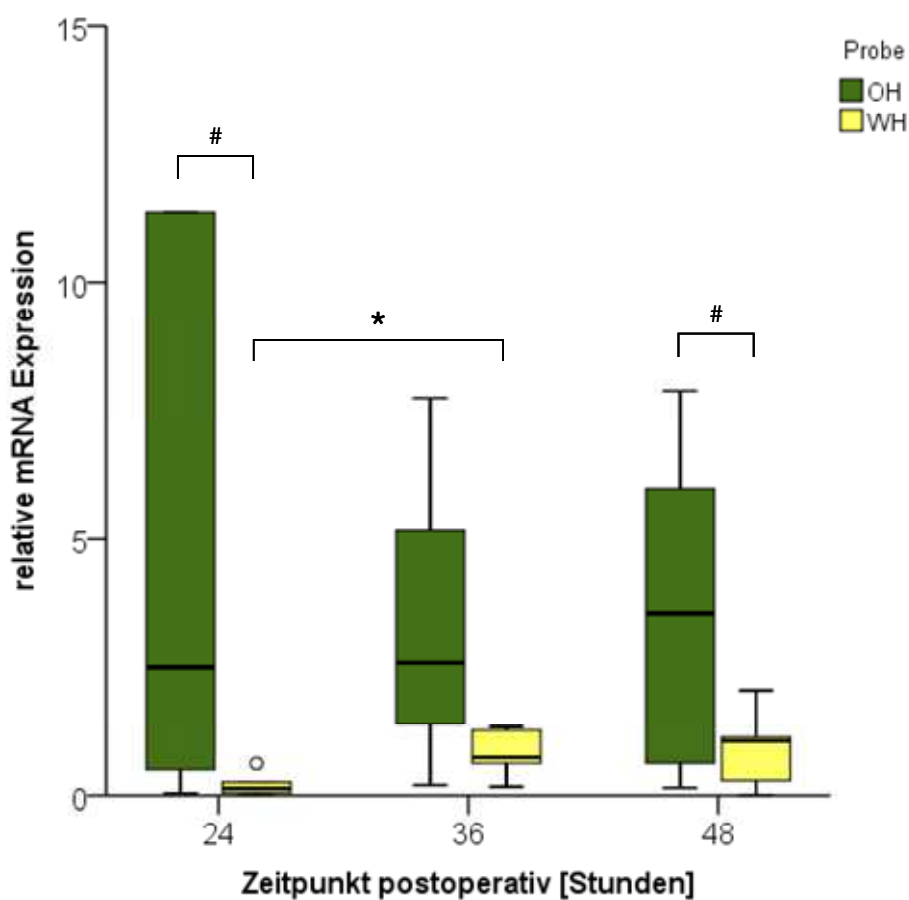


Abbildung 4.18. relative mRNA-Expression von IL-2 im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p<0,05$; # $p<0,1$; o = Ausreißer; ◇ = Extremwert)

4.2.11 IL-2R α

Für die Expression des Rezeptors α für IL-2 konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. Eine Expression des IL-2-Rezeptors α ist zum Zeitpunkt 24 Stunden nach der Operation im Osteotomiehämatom etwas geringer vorhanden als im Weichteilgewebe. Die Werte der Osteotomiehämatome steigen im zeitlichen Verlauf an, erreichen nach 36 Stunden ein Peak und fallen dann zum Zeitpunkt 48 Stunden post OP unter den Ausgangswert. Die Konzentration der mRNA dieses Rezeptors im Weichteilhämatom sinkt stetig und erreicht nach 48 Stunden seinen tiefsten Wert.

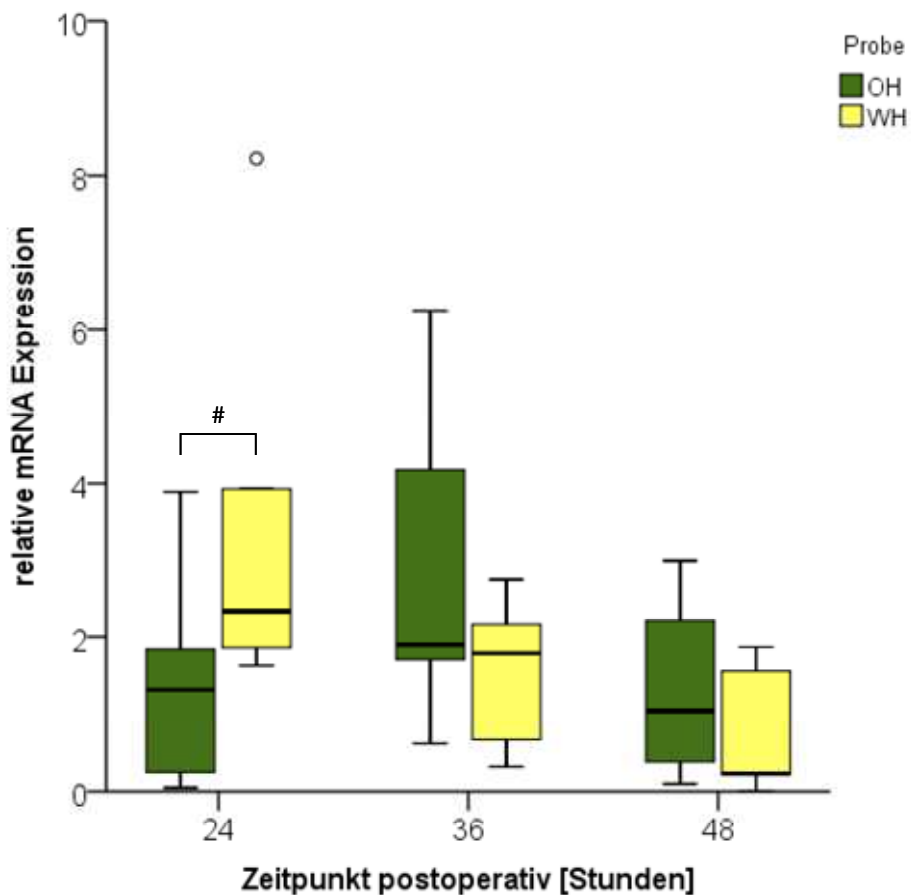


Abbildung 4.19. relative mRNA-Expression von IL-2 R α im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p < 0,05$; # $p < 0,1$; o = Ausreißer; \diamond = Extremwert)

4.2.12 IL-6

Für die Expression des Zytokins IL-6 konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. Die Werte für die relative mRNA-Expression liegen im Osteotomiehämatom zu jedem Zeitpunkt über denen der anderen Versuchsgruppe. Nach 36 Stunden zeigt sich die maximale Ausprägung für Interleukin-6. In den Weichteilhämatomen wird im Zeitverlauf abfallend immer weniger IL-6 exprimiert.

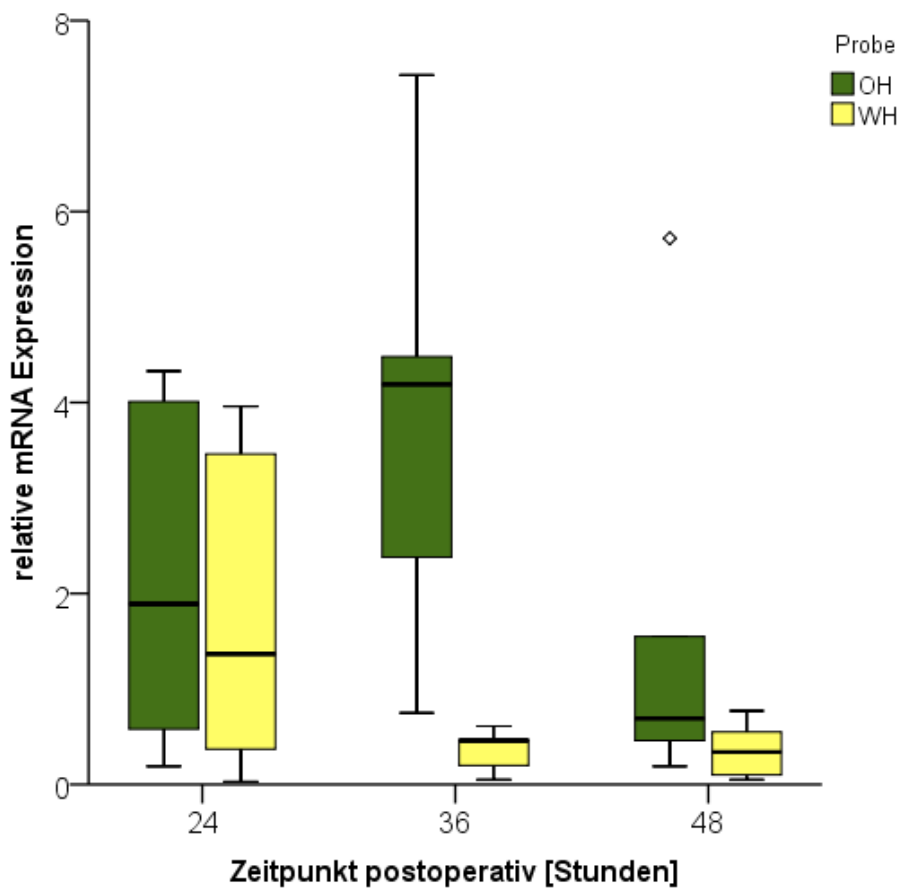


Abbildung 4.20. relative mRNA-Expression von IL-6 im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p < 0,05$; # $p < 0,1$; o = Ausreißer; \diamond = Extremwert)

4.2.13 IL-10

Für die Expression des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. Die stärkste mRNA-Expression für IL-10 findet 24 Stunden postoperativ in den Osteotomiehämatomen statt. Nachfolgend ist die Ausprägung abnehmend. In den Weichteilhämatomen ist die Expression für IL-10 konstant auf einem niedrigen Niveau unterhalb der Werte der Osteotomiehämatome.

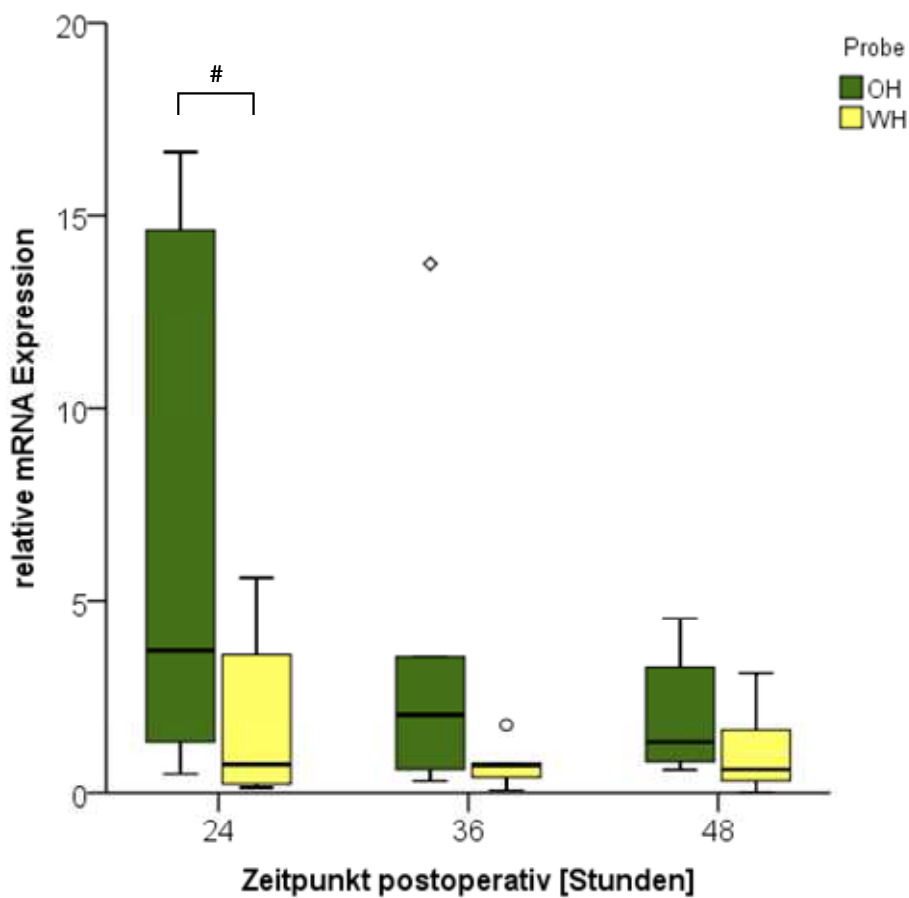


Abbildung 4.21. relative mRNA-Expression von IL-10 im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p < 0,05$; # $p < 0,1$; o = Ausreißer; \diamond = Extremwert)

4.2.14 OPN

Für die Expression des osteogenen und proinflammatorischen Faktors OPN konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. Während die Expression für OPN in den Weichteilhämatomen konstant auf niedrigem Niveau bleibt, wird in den Osteotomiehämatomen nach 36 Stunden ein deutlicher Anstieg der mRNA-Expression ersichtlich ($p=0,026$) (Abb. 4.22.b). Zum Zeitpunkt 48 Stunden zeigt sich nach der Osteotomie eine deutliche stärkere OPN-Expression als in den Weichteilhämatomen ($p=0,031$).

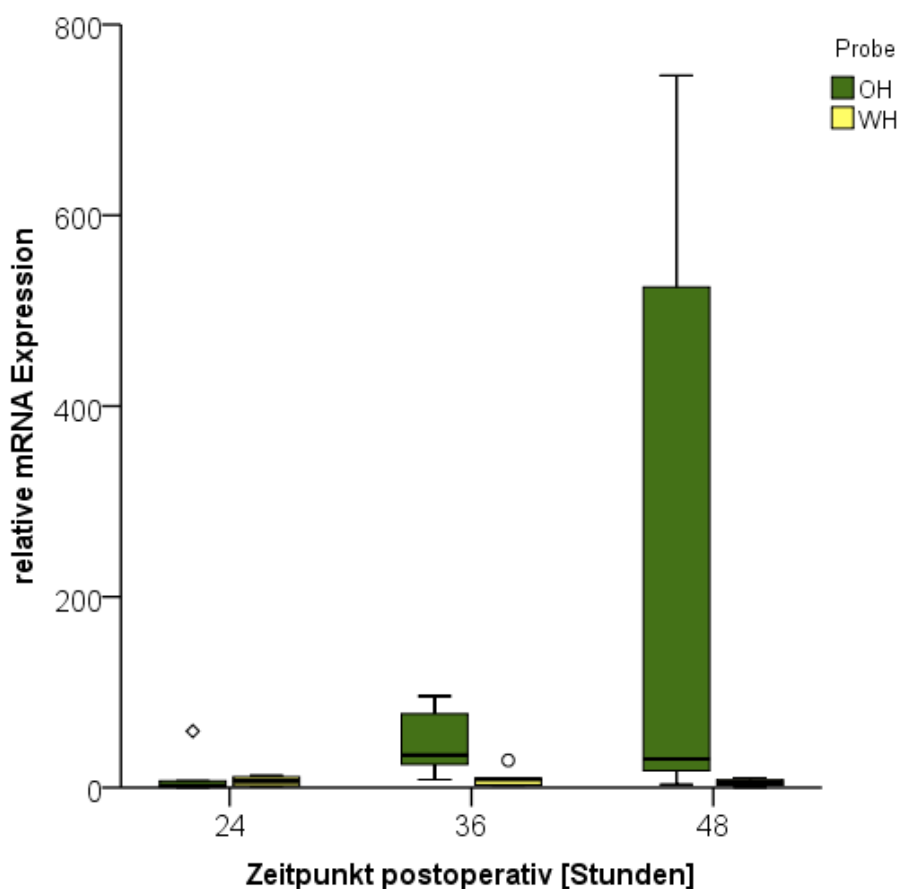


Abbildung 4.22.a relative mRNA-Expression von OPN im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p<0,05$; # $p<0,1$; o = Ausreißer; ◇ = Extremwert)

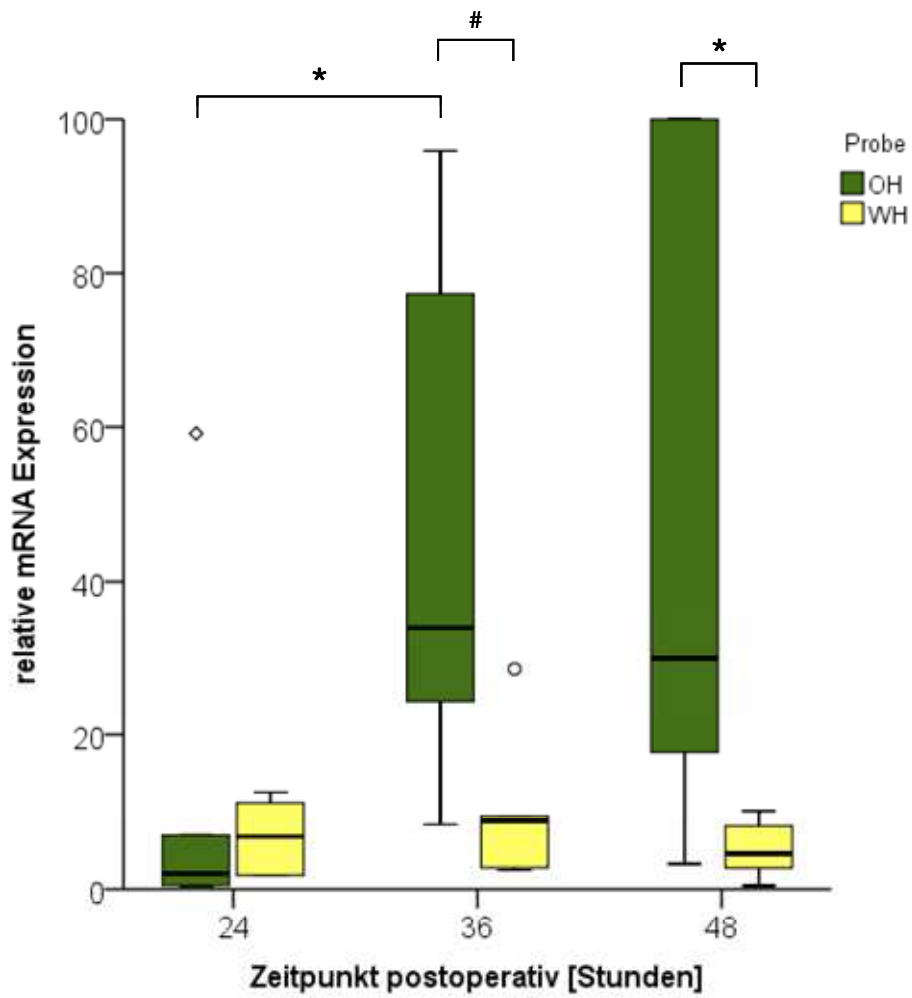


Abbildung 4.22.b relative mRNA-Expression von OPN im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH), Darstellung vergrößert bis zu einer Expression von 100 (* $p < 0,05$; # $p < 0,1$; o = Ausreißer; ◊ = Extremwert)

4.2.15 PDGF

Für die Expression des angiogenen Faktors PDGF konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. Nach 24 und 36 Stunden zeigt die Expression von PDGF im Weichteilhämatom höhere Werte als im Osteotomiehämatom. In den Osteotomiehämatomen steigt die Expression bis zum Zeitpunkt 36 Stunden deutlich an ($p=0,08$) und verbleibt auch nach 48 Stunden Heilungsdauer auf diesem Niveau. Zum Zeitpunkt 24 Stunden liegen die Expressionswerte für PDGF im Weichteilhämatom bereits deutlich höher als im Osteotomiehämatom. Nach einem weiteren Anstieg fallen die Werte 48 Stunden postoperativ bedeutend ab ($p=0,032$).

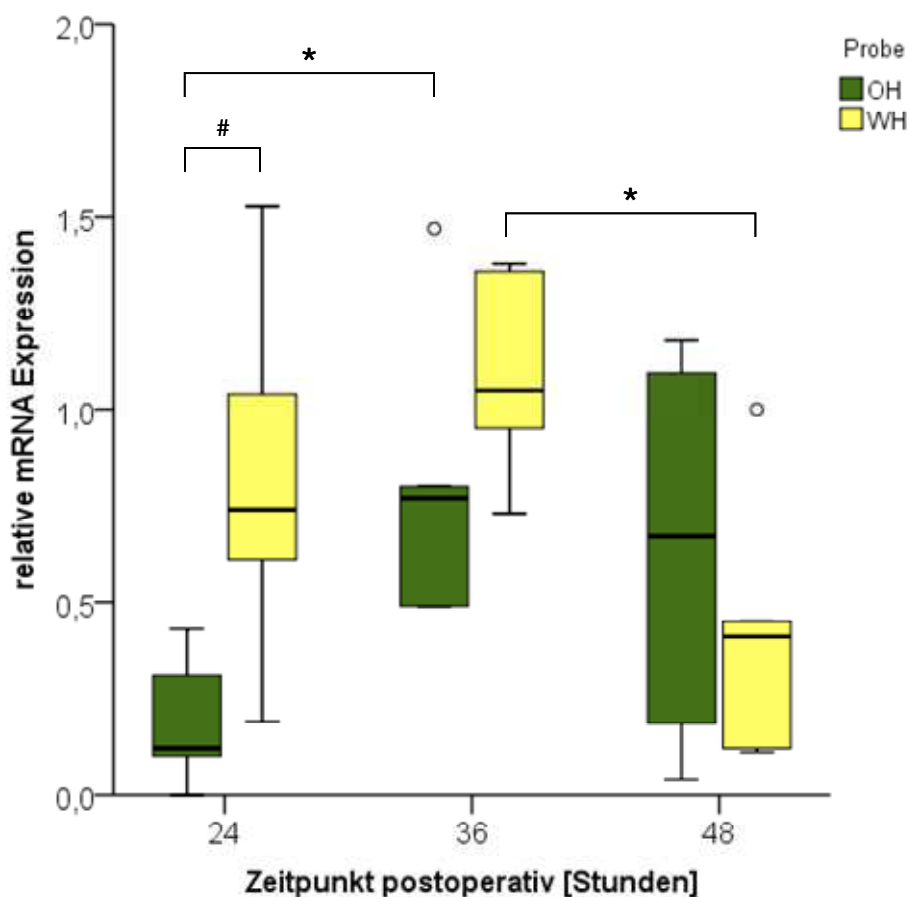


Abbildung 4.23. relative mRNA-Expression von PDGF im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p<0,05$; # $p<0,1$; o = Ausreißer; \diamond = Extremwert)

4.2.16 TGF β 1

Für die Expression des antiinflammatorischen Faktors TGF β 1 konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. In der Gruppe der Osteotomiehämatome ist über den gesamten Beobachtungszeitraum eine steigende TGF β 1-Expression zu erkennen, wobei der Anstieg zum Zeitpunkt 36 Stunden am deutlichsten ausfällt ($p=0,002$). In der Gruppe der Weichteilhämatome zeigt das Expressionsmuster eine maximale Ausprägung zum Zeitpunkt 36 Stunden. Auffallend ist die deutlich höhere mRNA-Konzentration für TGF β 1 in den Weichteilhämatomen als in den Osteotomiehämatomen zum Untersuchungszeitpunkt 24 Stunden.

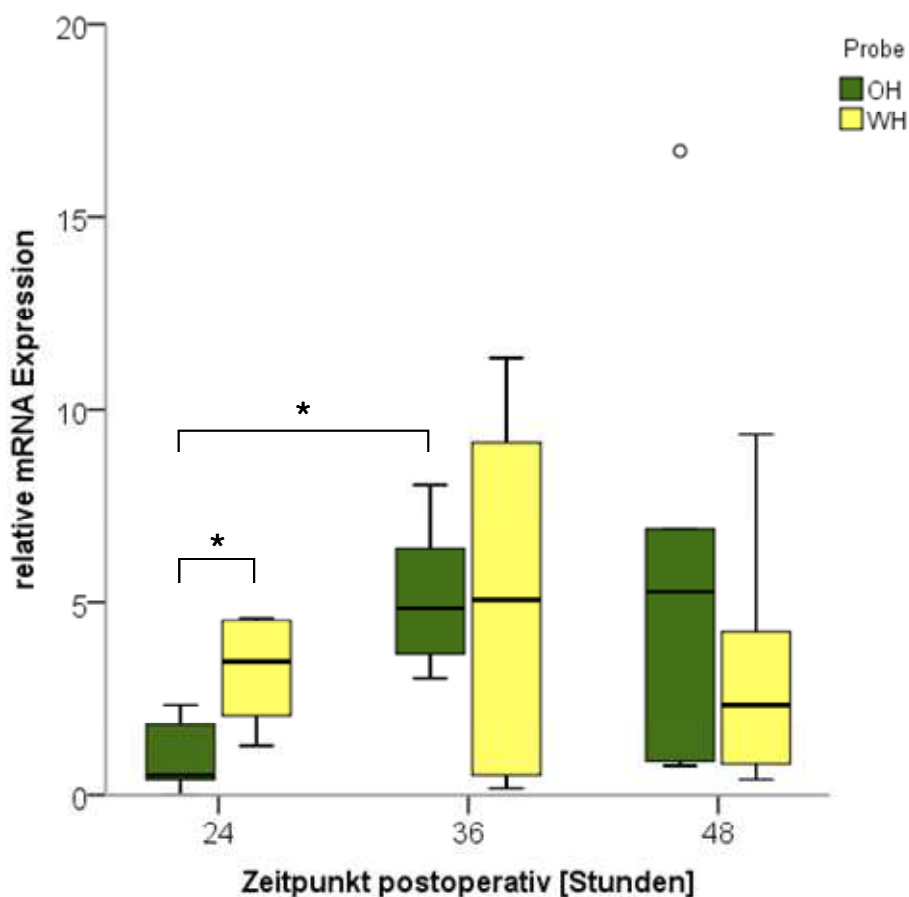


Abbildung 4.24. relative mRNA-Expression von TGF β 1 im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p<0,05$; # $p<0,1$; o = Ausreißer; \diamond = Extremwert)

4.2.17 *TNF α*

Für die Expression des proinflammatorischen Faktors *TNF α* konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. Die maximale Synthese von mRNA findet in beiden Untersuchungsgruppen zum Zeitpunkt 24 Stunden postoperativ statt. Tendenziell ist im Osteotomiehämatom eine stärkere, frühe Expression als im Weichteilhämatom feststellbar. Die mRNA-Konzentrationen sinken in beiden Versuchsgruppen nach 36 und 48 Stunden leicht ab, wobei die Expression im Osteotomiehämatom etwas höher ist als im Weichteilhämatom.

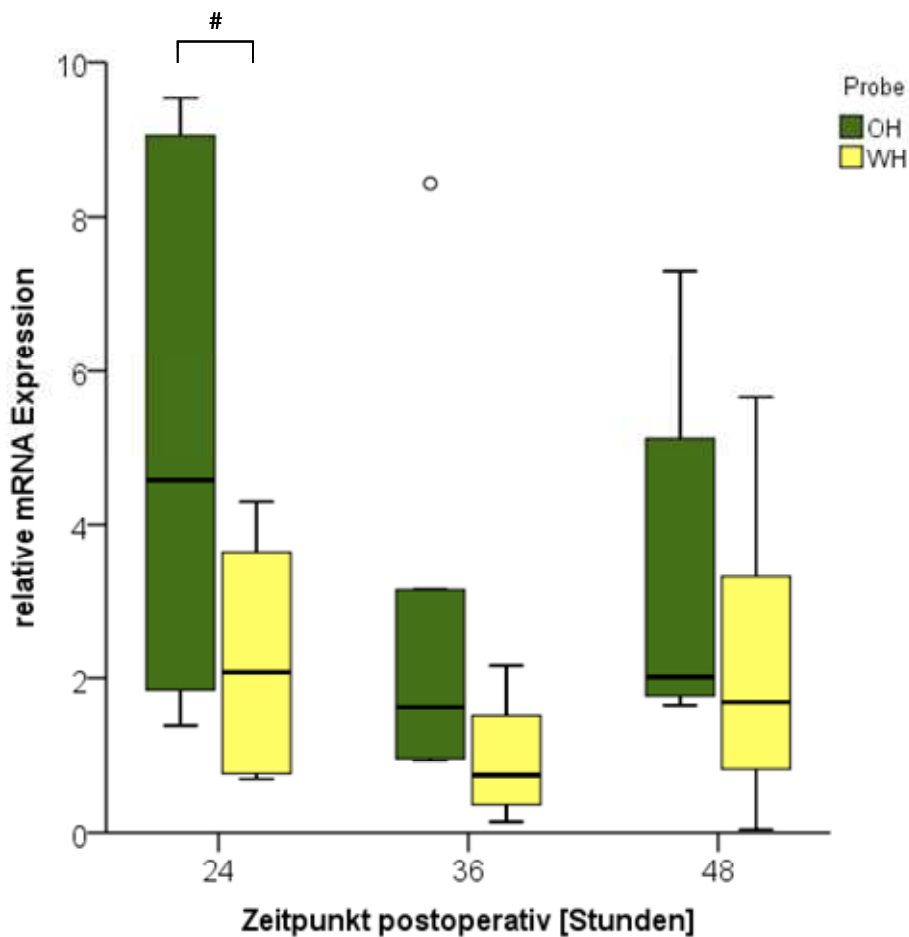


Abbildung 4.25. relative mRNA-Expression von *TNF α* im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p < 0,05$; # $p < 0,1$; o = Ausreißer; ◇ = Extremwert)

4.2.18 VEGF

Für die Expression des angiogenen Faktors VEGF konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. 24 Stunden postoperativ liegen die gemessenen Werte für die mRNA-Expression auf einem ähnlichen Niveau. Nach einem auffälligen Ansteigen der Konzentration und demnach einem Peak zum Zeitpunkt 36 Stunden in der Gruppe der Osteotomiehämatome ($p=0,002$), liegen die Syntheseparameter 48 Stunden postoperativ wieder in beiden Gruppen gleich stark vor. Die Expression von VEGF in den Weichteilhämatomen zeigt im Zeitverlauf einen leichten, aber kontinuierlichen Anstieg.

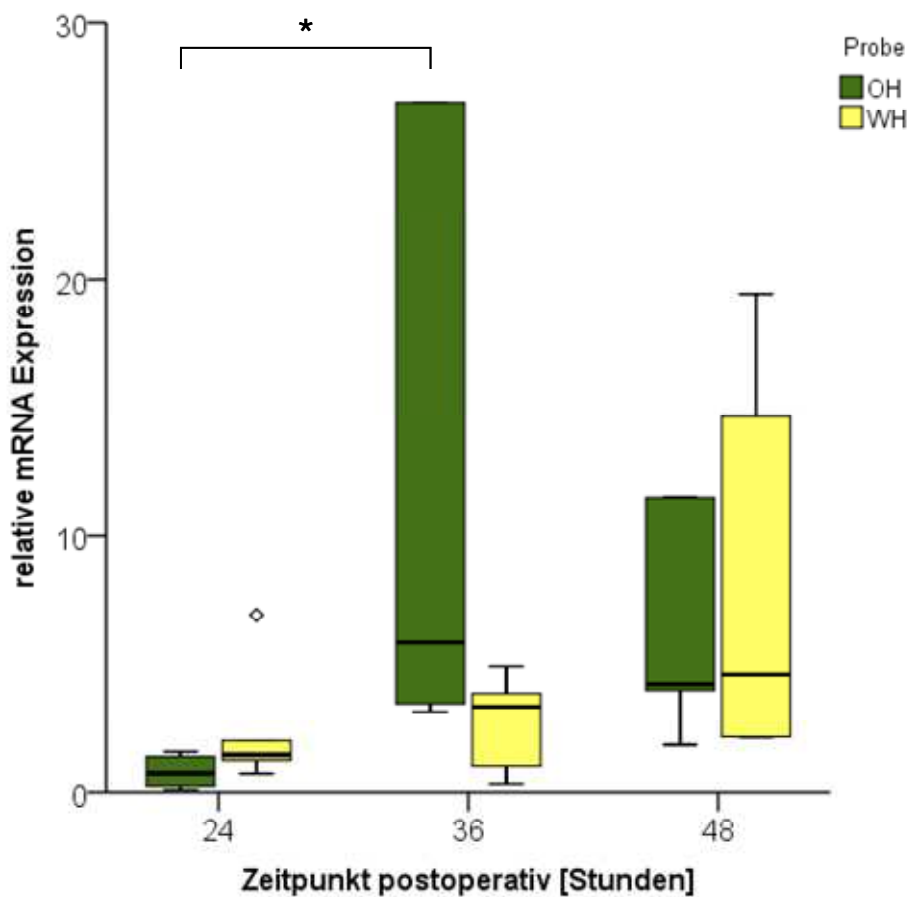


Abbildung 4.26. relative mRNA-Expression von VEGF im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p < 0,05$; # $p < 0,1$; o = Ausreißer; ◇ = Extremwert)

4.2.19 vWF

Für die Expression des angiogenen vWFaktors konnten zu allen Zeitpunkten mRNA-Werte bestimmt werden. In beiden Untersuchungsgruppen ist zum Zeitpunkt 24 Stunden die Expression vom vWF sehr gering ausgeprägt. 36 Stunden postoperativ hat die Expression dieses Faktors im Osteotomiehämatom erkennbar zugenommen, fällt aber nach 48 Stunden wieder fast bis auf die Ausgangswerte ab. Im Weichteilhämatom kann ebenso ein Anstieg registriert werden, welcher aber nicht so deutlich ausfällt wie in den Osteotomiehämatomen. Die Expression des von Willebrand-Faktors im Weichteilhämatom sinkt nach 48 Stunden wieder ab, so dass dessen mRNA-Konzentrationen unter denen der Osteotomiehämatome bleiben.

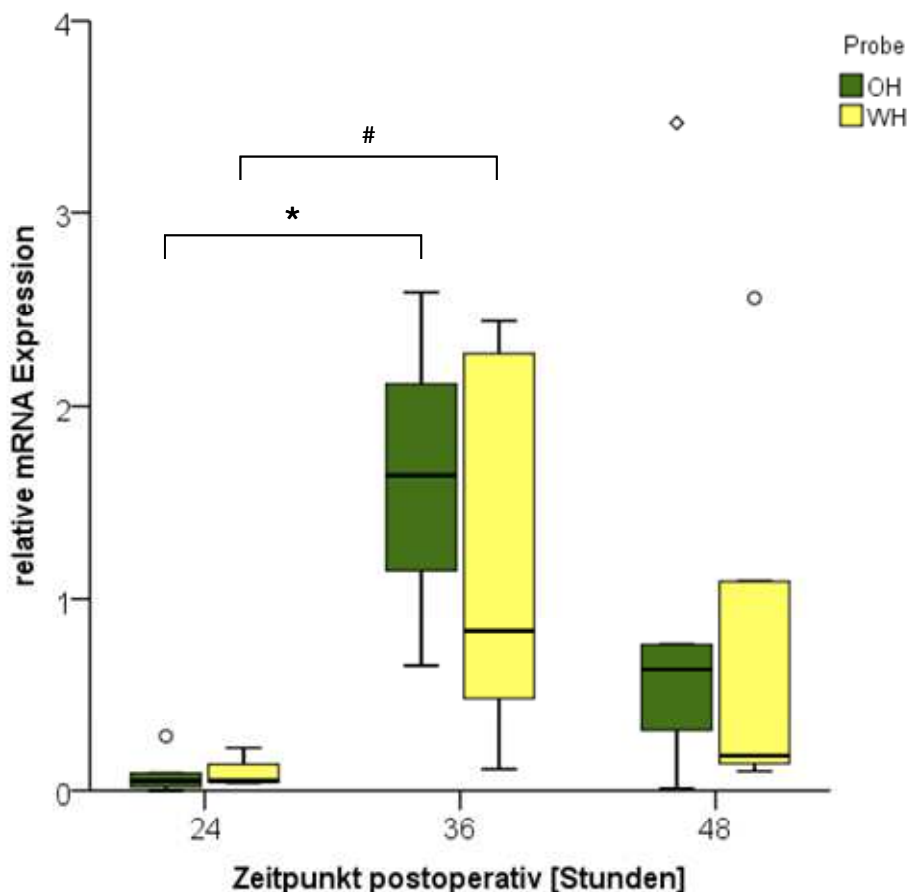


Abbildung 4.27. relative mRNA-Expression von vWF im Osteotomiehämatom (OH) und Weichteilhämatom (WH) (* $p < 0,05$; # $p < 0,1$; o = Ausreißer; \diamond = Extremwert)

5 Diskussion

Trotz weitreichender Forschungen seit mehreren Jahrzehnten, stellen Frakturheilungsstörungen und Pseudarthrosenbildung die Medizin vor große Herausforderungen. Die vorliegende Studie stellt einen Beitrag zur Grundlagenforschung im Gebiet der Frakturheilung dar. Das Ziel war einerseits die zelluläre Zusammensetzung von Osteotomiehämatomen zu ermitteln und diese dann mit der Zusammensetzung von Hämatomen aus Weichteilläsionen und mit der des Knochenmarks zu vergleichen. Andererseits wurde der zeitliche Verlauf der Expression verschiedener Faktoren im Osteotomiehämatom untersucht. Diese Ergebnisse wurden ebenfalls mit den Resultaten aus den Weichteilhämatomen verglichen. Der Schwerpunkt wurde vor allem auf pro- und antiinflammatorische, angiogene und osteogene Faktoren und Hypoxiemarker gelegt.

Die erste zu Beginn der Arbeit formulierte Hypothese lautete, dass sich das Osteotomiehämatom in der zellulären Zusammensetzung im Vergleich zum Weichteilhämatom unterscheidet. Diese Vermutung hat sich als zutreffend erwiesen, wengleich der Unterschied nicht so ausgeprägt sichtbar wird, wie es erwartet wurde.

Außerdem wurde behauptet, dass die Expression bestimmter Zytokine, Transkriptions- und Wachstumsfaktoren, transmembraner Transport- und extrazellulärer Matrixproteine in beiden Hämatomen unterschiedlich stark ausgeprägt ist. Diese Hypothese konnte ebenso bestätigt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass die inflammatorische Reaktion im frakturierten Knochen strikter geregelt ist als im Weichteilhämatom. Im Osteotomiehämatom im Gegensatz zum Weichteilhämatom kommt es zu einer früheren Eingrenzung der proinflammatorischen Reaktion durch eine Hochregulierung der Expression antiinflammatorischer Faktoren. Der Expressionsanstieg der antiinflammatorischen Faktoren stimmt zeitlich mit der Expression angiogener Faktoren überein, was auf einen früheren Beginn der Revaskularisierung hindeutet. Es scheint nahe zu liegen, dass der Grund dafür in der Nähe zum Knochenmark zu suchen ist.

5.1 Diskussion des Materials und der Methoden

5.1.1 *Versuchsablauf*

Für dieses Versuchsvorhaben wurde das Schaf als Modeltier gewählt. Dieses Tiermodell wurde am Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité etabliert und seit dem Jahre 2003 in verschiedenen Studien mit guten Ergebnissen eingesetzt (Klein et al., 2003; Lienau et al., 2005; Lienau et al., 2009; Schell et al., 2008). Vor Versuchsbeginn wurde großer Wert auf die Handhabbarkeit der Tiere gelegt, was bedeutet, dass die Tiere mittels Fütterung von Kraftfutter aus der Hand weitgehend handzahn gemacht wurden. Besonders für die postoperative Pflege und die Kontrolle des Heilungsverlaufes ist dieser Aspekt sehr wichtig. Hunde, Ziegen, Schafe und Schweine sind die meist genutzten Spezies in Versuchen zur Knochenheilung (Muschler et al., 2010). Wie Muschler et. al. in einer zusammenfassenden Arbeit herausarbeitete, hat das Schaf aus anatomischer Sicht gute Voraussetzungen für den Vergleich mit dem menschlichen Knochen. Das Aussehen der Tibia des Schafes ist dem der humanen Tibia sehr ähnlich. Die Tibia des Schweins ist für die Nutzung eines externen Fixateurs ungeeignet, da die gedrungene Form des Knochens ein Anbringen unmöglich macht. Die Knochenfeinstruktur des Schafes unterscheidet sich zwar von der des menschlichen Knochens. Damit sind auch Unterschiede in der Gefäßversorgung vorhanden. Dennoch sind Abweichungen im Regenerationsverhalten nicht zu belegen (Sturmer und Schuchardt, 1980). Mit einem Alter von über 2 Jahren ist das Größenwachstum des Knochens beim Schaf abgeschlossen. Allerdings ist die Knochenreifung noch nicht beendet, was bedeutet, dass die Osteonstruktur noch nicht vorhanden ist. Erst mit ca. 7 Jahren ist die Reifung des Knochens beim Schaf abgeschlossen (Newman et al., 1995). Schafe gelten zudem als deutlich besser handhabbar als beispielsweise Ziegen. Der Hund, welcher am ehesten aufgrund von Anatomie und Zusammensetzung in Frage käme, schließt sich für Muschler et. al. aus ethischen Gesichtspunkten für die Verwendung als Versuchstierspezies aus (Muschler et al., 2010). Trotz der unterschiedlichen Gangweise von Mensch und Schaf ist es möglich Vergleiche anzustellen, da sich die Tibia in der Tragachse des Beines befindet und somit einer ähnlichen Belastung ausgesetzt ist (Sturmer und Schuchardt, 1980). Nach dem Wolff'schen Gesetz erhält der Knochen durch die Belastung und aufgrund dieser durch immer währende Umbauprozesse die Struktur, welche ihm die größtmögliche Stabilität verleiht (Wolff, 1892). In der Studie von Wissing et. al. wurde ebenfalls die Geschwindigkeit der

Frakturheilung als Kriterium herangezogen. Dabei konnte gezeigt werden, dass der Heilungsverlauf im Schafmodell dem des Menschen am vergleichbarsten ist (Wissing und Stürmer et. al., 1990). Beim Schaf als Fluchttier kann davon ausgegangen werden, dass postoperativ eine baldige Belastung der betroffenen Extremität erfolgt (Sturmer und Schuchardt, 1980). Die schnelle Wiederaufnahme der Funktion wirkt sich positiv auf die Knochenheilung aus (Buckwalter, 1996).

Das mediale Anbringen des externen Fixateurs wurde aufgrund der günstigen anatomischen Gegebenheiten und aus bewegungstechnischen Gründen gewählt. Ein Hängenbleiben am Stallzaun oder an Partnertieren und der damit verbundenen Gefährdung der Stabilität des Fixateurs kann durch diese Platzierung verhindert werden. Da die Tibia direkt unter der Haut liegt, wird die Traumatisierung des Weichteilgewebes möglichst gering gehalten. Einblutungen aus beschädigtem Muskelgewebe in den Osteotomiespalt, welche zu einer Vermischung von Knochen- und Weichteilhämatom führen würden, werden dadurch ebenso weitgehend vermieden.

Die Schmerzbehandlung erfolgte über das Anbringen eines Fentanylpflasters. Für die Applikation muss die darunter liegende Haut sorgfältig geschoren und entfettet werden, um den richtigen Halt gewährleisten zu können. Der korrekte Sitz des Pflasters wurde regelmäßig kontrolliert. In einer Arbeit aus dem Jahr 2010 der Gesellschaft für Versuchstierkunde und der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz zur Schmerztherapie bei Versuchstieren wurden Erfahrungen zum lokalen Einsatz von Fentanyl gesammelt (Gesellschaft für Versuchstierkunde und der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz zur Schmerztherapie bei Versuchstieren, 2010). In dieser Arbeit wird das Ausmaß der Schmerzbelastung bei derartigen Frakturmodellen mit einer stabilen Versorgung als gering bezeichnet. Problematisch ist allerdings die Wahrnehmbarkeit von Schmerzäußerungen bei dieser Spezies. Schafe reagieren auf Schmerzen mit Zähneknirschen, Verweigerung der Futteraufnahme und Absonderung von der Herde. Um diese Anzeichen erkennen zu können, muss das Tier sehr genau beobachtet werden. Nichtsteroidale Antiphlogistika (NSAID`s) sind für dieses Versuchsvorhaben zur Schmerzbehandlung ungeeignet, da sie als Entzündungshemmer nachweislich die Entzündungsreaktion beeinflussen, welche im Mittelpunkt der Untersuchungen steht (Endo et al., 2005).

Die Größe der Versuchstierspezies erlaubt, durch die entsprechend große Menge an gewonnenem Material, deutlich mehr Untersuchungen als z.B. bei der Maus möglich wären. Limitierend ist allerdings der Fakt, dass für das Schaf nicht immer passende Antikörper zur Verfügung stehen.

5.1.2 *Fixateur extern*

Der externe Fixateur wurde bereits in verschiedenen Studien zur Frakturheilung erfolgreich eingesetzt (Epari et al., 2006; Klein et al., 2003; Schell et al., 2008). Die Stabilisierung der Fraktur erfolgt hierbei durch eine definierte Mechanik, welche dem Tier einen guten Halt gibt und bei Fluchttieren unerlässlich ist. Ein weiteres Entscheidungskriterium ist die Unversehrtheit der beteiligten Gewebe (Egger, 1991; Kojimoto et al., 1988). Die Durchführung einer Plattenosteosynthese würde eine Schädigung des Periosts und der periostalen Durchblutung mit sich bringen. Die Marknagelung hätte die Verdrängung des Knochenmarks und die Zerstörung der medullären Gefäße zur Folge (Sturmer, 1984). Beide Gewebe stellen ein Reservoir von Zellen dar, die die Zusammensetzung des Hämatoms maßgeblich beeinflussen. Daher ist sowohl ein intaktes Periost als auch das Knochenmark für diese Studie unverzichtbar. Nachteilig könnten sich Pininfekte auswirken (Egger, 1991). Diese sind aber aufgrund der kurzen Standzeiten der Tiere in dieser Studie unwahrscheinlich und konnten auch nicht beobachtet werden.

5.1.3 *FACS-Analyse*

Die limitierenden Faktoren der FACS-Untersuchung sind einerseits die Zellvereinzelung, ohne die eine Differenzierung der einzelnen Zellen im FACS-Gerät nicht möglich ist und andererseits die im Handel erhältlichen Antikörper. Wie bereits im vorhergehenden Abschnitt erwähnt wurde, bietet die Verwendung des Schafes als Versuchstierspezies viele Vorteile, auch wenn ovine Antikörper bisher nicht für alle Zellen vorhanden sind. Von Vorteil ist, dass sich sowohl humane als auch bovine Antikörper kreuzreaktiv zu ovinen Zellen verhalten, welche in dem Fall alternativ verwendet wurden.

5.1.4 *Molekularbiologische Untersuchung*

Die Ergebnisse der untersuchten Parameter wurden mit Hilfe von Cyclophilin A als Referenz-Gen normalisiert. Cyclophilin A ist ein hochkonserviertes Enzym, welches im Zellkern liegend die Meiose kontrolliert. Es ist ubiquitär vorhanden und wird homogen synthetisiert. Der Vorteil der relativen Quantifizierung ist, dass Fehler innerhalb eines Laufes sowohl das

Gen, welches im Interesse der Untersuchung steht, als auch das Referenz-Gen selbst betreffen (Pfaffl, 2004).

Bei den Untersuchungen wurde jeweils die Expression des entsprechenden Gens evaluiert. Da die Hochregulierung des Gens zeitlich vor der Entstehung des Proteins angesiedelt ist, kann die Veränderung sehr zeitig wahrgenommen werden. Es ist zwar nicht 100 %ig sicher, dass aus der mRNA auch tatsächlich das jeweilige Protein gebildet wird. Aber der Nachweis des Proteins bedeutet auch keine bedeutenden Vorteile, da keine Aussage über die Aktivität und Wirksamkeit des Proteins in Verbindung mit seinem Rezeptor getroffen werden kann. Zudem sind vor allem Zytokine sehr kurzlebig und werden schnell wieder abgebaut, was ihren Nachweis erschweren würde (Fitzgerald et al., 2001).

Zur Interpretation der Ergebnisse muss weiterhin bedacht werden, dass: 1. sowohl die Hämatome als auch das Knochenmark aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zellen bestehen, so dass die Herkunft der exprimierten Gene nicht sicher festgestellt werden kann und 2. die relative Expression der mRNA einzelner Faktoren in Relation zur Anzahl der exprimierenden Zellen gesetzt werden müsste, da wenige Zellen viel mRNA und viele Zellen auch wenig mRNA exprimieren können.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Zur besseren Beurteilung der Ergebnisse wurden Untersuchungen anderer Promotionsvorhaben einbezogen. Die Zeitpunkte 1, 4 und 12 Stunden sowie 60 Stunden postoperativ fließen bei der Diskussion mit ein.

Die FACS-Untersuchung der CD 5, CD 8, CD 4 und CD 21 positiven Zellen ergibt für die im Rahmen dieser Arbeit aufgestellte Hypothese keine aussagekräftigen Erkenntnisse und wird daher in der Diskussion nicht berücksichtigt.

5.2.1 Die Zusammensetzung des initialen Hämatoms ist ein entscheidender Faktor für den Erfolg der Knochenheilung und wird durch die umliegenden Gewebe beeinflusst

Mittlerweile ist die Unentbehrlichkeit des Hämatoms während der Frakturheilung ein unbestrittener Fakt. Untersuchungen verschiedenster Art belegen dies (Grundnes und Reikeras, 1993; Kolar et al., 2010). Erforschungen des Pfeilschwanzkrebses zeigen die phylogenetische Zusammengehörigkeit des Gerinnungssystems und der angeborenen Immunabwehr (Opal, 2000). Durch wiederholte Spülungen und Wundresektion einer offenen Fraktur und der damit verbundenen Entfernung des Frakturhämatoms wird die Frakturheilung deutlich gestört. Es kommt zur verzögerten Heilung bzw. zur Pseudarthrosenbildung (Park et al., 2002). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Transplantation eines Frakturhämatoms in Muskelgewebe auch dort zur Knochenbildung führt (Mizuno et al., 1990). Es ist bekannt, dass das Hämatom die Quelle für verschiedene Signalmoleküle ist. Jedoch ist sowohl das zeitliche Auftreten dieser Signalmoleküle als auch die zelluläre Zusammensetzung des Frakturhämatoms bzw. das Zusammenspiel beider in der zeitigen Phase des Heilungsprozesses noch relativ unbekannt. Darin könnte der entscheidende Unterschied liegen, der es dem Knochen ermöglicht, ohne Narbenbildung auszuheilen. Bestimmend für die Zusammensetzung der Hämatome sind die umliegenden Gewebe. Im Falle des Frakturhämatoms sind das vor allem das Knochenmark und das Periost mitsamt deren Blutzufuhr. Im Weichteilgewebe dominieren neben dem Muskelgewebe die versorgenden Blutgefäße. Die Einblutung aus den umliegend zerstörten Gefäßen zeigt sich deutlich an den Leukozyten, deren prozentualer Anteil 1 Stunde postoperativ auf dem Niveau des Blutes liegt. Die Lebenszeit bestimmter Leukozyten (Granulozyten und

Monozyten/Makrophagen) ist auf wenige Stunden bis zu 2 Tage begrenzt, womit sich das Absinken der Leukozytenwerte bis zu 12 Stunden postoperativ erklären lässt. Ein weiterer Abfall wird kompensiert durch die laufende Rekrutierung neuer weißer Blutkörperchen. Dazu gehören auch Monozyten und Makrophagen, die einen deutlichen Peak 12 Stunden postoperativ zeigen und zum Zeitpunkt 24 Stunden wieder absinken. Der Peak ist sowohl im Osteotomie- und Weichteilhämatom als auch im Knochenmark sichtbar. Über den Zeitverlauf von 24 bis 48 Stunden ist nur noch ein moderater Anstieg zu erkennen. Die prozentualen Anteile der CD 14 positiven Zellen liegen deutlich über der 100-Prozentmarkierung des Blutes und dürften daher vor allem aus dem umliegenden Gewebe stammen und in ihrer Funktion als Gewebsmakrophagen von dort einwandern. Augenscheinlich stellt dabei die Muskulatur ein größeres Reservoir bereit. Monozyten und Makrophagen sind zur Phagozytose befähigt. Sowohl nach der Osteotomie als auch nach der gesetzten Weichteilläsion entsteht ein erheblicher Schaden an den Zellen im gesamten Bereich. Diese Zelltrümmer werden von Makrophagen beseitigt.

CD 34 ist ein Marker für hämatopoetische Stammzellen. Da CD 34 aber auch auf Endothelzellen exprimiert wird, rührt der Anstieg von CD 34 im Weichteilhämatom nach 36 Stunden vermutlich eher von ihnen und ist ein Indiz für die beginnende Angiogenese. Im Osteotomiehämatom ist bereits nach 12 Stunden ein starker Anstieg erkennbar. Die Nähe des Osteotomiehämatoms zum Knochenmark lässt vermuten, dass zu diesem Zeitpunkt Stammzellen von dorthin einwandern.

Sowohl der Interleukin-2 Rezeptor α (IL-2R α) in der Expressionsanalyse als auch CD 25 in der FACS-Analyse zeigen einen ähnlichen Verlauf. Gerade auch im Hinblick auf die regulatorischen T-Zellen (CD 25^{high}) zeigt sich die Nähe des Osteotomiehämatoms zum Knochenmark. CD 73, einem von verschiedenen Oberflächenmarkern für mesenchymale Stammzellen, steigt eine Stunde nach der Osteotomie leicht an bis zum Peak nach 36 Stunden. Das liefert einen Hinweis darauf, dass im Osteotomiehämatom, mit der Unterstützung der regulatorischen T-Zellen und der Nähe zum Knochenmark mesenchymale Stammzellen ansteigen. Im Weichteilhämatom dauert dieser Anstieg deutlich länger, da, falls es sich um Stammzellen handelt, diese über das Blutgefäßsystem rekrutiert werden, was zu diesem Zeitpunkt auf Grund fehlender Blutversorgung nicht möglich ist.

Für CD 34 und CD 73 stehen für das Schaf als Versuchstier zum Zeitpunkt dieser FACS-Analyse keine Antikörper zur Verfügung, so dass die Expression der jeweiligen Gene ermittelt wurden.

5.2.2 *Das initiale Hämatom ist ein Reservoir proinflammatorischer Faktoren*

Makrophagen und Epithelzellen sezernieren im Zusammenhang mit lokalen oder systemischen Entzündungen die Zytokine IL-1 β und TNF α und aktivieren damit T-Zellen und wiederum weitere Makrophagen. Sie entfalten dadurch ihre proinflammatorischen Eigenschaften. Wenngleich die Werte für Interleukin-1 β zum Zeitpunkt 24 Stunden einen Peak zeigen, sind diese Werte doch relativ gering verglichen mit den Untersuchungen 1 bis 12 Stunden postoperativ. Im gesamten Zeitverlauf findet die maximale Expression nach 4 Stunden statt, welche im Weichteilhämatom deutlicher ausfällt als im Osteotomiehämatom, aber mit einer stärkeren Varianz verbunden ist und damit für eine ausgeprägtere Entzündungsreaktion spricht. Die Expression von TNF α im Osteotomiehämatom steigt bereits nach 4 Stunden deutlich an und entwickelt sich nach 24 Stunden zu einem Peak. Demzufolge wird die Rekrutierung weiterer Makrophagen vorangetrieben. Dies wird sichtbar in der nachfolgenden Erhöhung der CD 14⁺ Zellen. Die T-Zellaktivierung ist ein weiterer Effekt der proinflammatorischen Zytokine. Im Osteotomiehämatom steigen die aktivierten und regulatorischen T-Zellen (CD 25⁺) nach 12 Stunden leicht an. Auffallend hoch sind die Anteile dieser Zellen im Knochenmark. Diese Zusammenhänge sprechen dafür, dass die im Knochenmark befindlichen T-Zellen die Zusammensetzung des Osteotomiehämatoms beeinflussen. Die Stimulation der IL-2-Synthese und damit wiederum die Förderung der T-Lymphozytenproliferation durch IL-1 β wird deutlich in einem Expressionsmaximum zum Zeitpunkt 12 und 24 Stunden. Die Expressionssteigerung ist im Osteotomiehämatom viel stärker ausgeprägt als im Weichteilhämatom.

IL-6 ist ein Zytokin, welches gesondert betrachtet werden muss. Es hat sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische Eigenschaften, je nach Zeitpunkt und Umgebung des Auftretens. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigt sich IL-6 in der zeitigen Phase der Heilung zum Zeitpunkt 12 Stunden postoperativ und ist sehr deutlich im Osteotomiehämatom vorzufinden. Dies lässt eher auf sein Auftreten als proinflammatorischer Faktor schließen.

Insgesamt zeigen sich proinflammatorische Faktoren in der frühen Phase der Frakturheilung. Die Entzündungsreaktion findet offensichtlich zeitig, in einem Zeitraum von 4 bis 24 Stunden statt. Sie wird im Osteotomiegebiet maßgeblich beeinflusst durch die Nähe des Knochenmarks.

5.2.3 Antiinflammatorische Faktoren treten zu einem etwas späteren Zeitpunkt auf und dämpfen die Entzündungsreaktion ein - im Osteotomiehämatom verläuft dieser Prozess mit einer größeren Intensität

Sowohl IL-10 als auch TGF β 1 sind antiinflammatorisch wirksame Faktoren. Sie wirken in beiden Hämatomen der Entzündungsreaktion entgegen. Auffallend ist, dass die Expression beider Faktoren im Osteotomiehämatom zwar etwas später einsetzt, aber dafür wesentlich deutlicher ausfällt. IL-10 erfährt eine langsame Steigerung der Expression bis hin zum Maximum nach 24 Stunden im Osteotomiehämatom. Im Weichteilhämatom wird die maximale Expression bereits nach 12 Stunden erreicht, ist aber nicht so deutlich ausgeprägt. TGF β 1 erreicht seinen Peak im Osteotomiehämatom nach 48 Stunden, im Weichteilhämatom bereits nach 36 Stunden, fällt dort aber relativ schnell wieder ab. Betrachtet man den Zeitraum von 1 bis 60 Stunden postoperativ ist festzustellen, dass im Osteotomiehämatom bereits nach 4 Stunden eine starke Expression vorhanden ist. Es gibt viele Studien, die sich mit der Wichtigkeit von TGF β 1 in der Frakturheilung befassen. Die meisten Untersuchungen beziehen sich aber bisher auf andere Gewebe wie z.B. den Kallus bzw. auf die positive Beeinflussung des Kallusvolumens und der biomechanischen Eigenschaften (Rosier et al., 1998). Der antiinflammatorische Effekt dürfte aus der chemotaktischen Beeinflussung mesenchymaler Stammzellen stammen, welche wiederum ihrerseits inflammatorische Zytokine reduzieren (Liu et al., 2011).

Im Muskelgewebe wird die Reparatoren über die Schaffung einer fibrösen Verbindung erreicht, wohingegen eine Fraktur den Prozess der Regeneration durchläuft. Die Entzündung wird 4 bis 24 Stunden postoperativ durch antiinflammatorische Faktoren begrenzt, was Grundlage für eine erfolgreiche Heilung ist (Serhan und Savill, 2005). Eine unbegrenzte und aus dem Ruder laufende Entzündungsreaktion verzögert die Heilung, verhindert diese und führt möglicherweise zur Pseudarthrosenbildung (Granero-Molto et al., 2009).

Auch auf der zellulären Ebene wird die Entzündungsreaktion begrenzt. Regulatorische T-Zellen (CD 25^{high}) fördern die Entwicklung von mesenchymalen Stammzellen, die wiederum durch die Reduktion proinflammatorischer Zytokine (IL-1 β , TNF α) antiinflammatorisch wirksam sind (Granero-Molto et al., 2009; Liu et al., 2011). Regulatorische T-Zellen sind ihrerseits in der Lage, über die Bildung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 proinflammatorische Zytokine wie TNF α und IL-1 und 6 in ihrer Synthese zu hemmen (Grutz, 2005). Regulatorische T-Zellen zeigen sich im Osteotomiehämatom deutlich ausgeprägter als im Weichteilhämatom. Das Knochenmark stellt dafür offenbar ein Reservoir

bereit, was offenkundig wird durch die deutlich erhöhten Werte CD 25^{high} positiver Zellen im Knochenmark.

5.2.4 Die nach der Ruptur der versorgenden Gefäße auftretende Hypoxie fällt im Osteotomiehämatom deutlich stärker aus als im Weichteilhämatom

Die Expression von GLUT 1 zeigt, dass über den untersuchten Zeitraum ein kontinuierlich ansteigender Bedarf des Glucosetransporters besteht. Im Vergleich wird sichtbar, dass im Osteotomiehämatom ein höherer Bedarf an Glucose zu decken ist als im Weichteilhämatom. Betrachtet man die Untersuchungen früherer Zeitpunkte, ist festzustellen, dass der Bedarf an Glucose im Osteotomiehämatom bereits 1 und 4 Stunden postoperativ noch deutlich höher ausfällt. Der Verlauf der Expression des Hypoxiemarkers HIF 1 α unterstreicht das Vorhandensein der Hypoxie. Nach 36 und 48 Stunden ist der hypoxische Zustand im Osteotomiehämatom deutlicher ausgeprägter als im Weichteilhämatom. Das zeigt sich auch in der GLUT 1-Expression, welche im Osteotomiehämatom nachfolgend auf den hypoxischen Zustand nach 48 Stunden ansteigt bzw. durch HIF hochreguliert wird.

5.2.5 Angiogenese, als eine Reaktion auf die Hypoxie, wird im Osteotomiehämatom schneller und stärker vorangetrieben als im Weichteilhämatom

Die Angiogenese muss aus verschiedenen Gründen als essentieller Bestandteil der Frakturheilung gesehen werden. Einerseits stellt sie die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen wieder her, und andererseits realisiert sie den Abtransport von Abfallprodukten wie CO₂. Verschiedene Studien zeigten aber auch die aktive Beteiligung der Blutversorgung bzw. der Angiogenese an der Formation des Knochens, sowohl bei unversehrtem Gewebe als auch während der Osteogenese. Denn nicht zuletzt erreichen auch Progenitorzellen den Ort ihres Wirkens über die Zirkulation (Sturmer, 1996; Wang et al., 2007b).

HMOX 1 ist als angiogener Faktor wirksam und wird im Osteotomiehämatom stärker und zeitiger exprimiert, bereits nach 36 und 48 Stunden. Im Weichteilhämatom verläuft der Anstieg etwas verzögert und nicht so deutlich. Die Angiogenese ist eine Reaktion auf eine Hypoxie, um über neue Gefäße wieder eine bessere Sauerstoffversorgung gewährleisten zu können. Wie bereits festgestellt wurde, zeigen die Hypoxiemarker HIF 1 α und GLUT 1 im

Osteotomiehämatom einen deutlicheren Sauerstoffmangel als im Weichteilhämatom. HIF 1 α ist außerdem ein Faktor, der die Transkription angiogener Faktoren aktiviert. Demzufolge ist die Reaktion angiogener Faktoren auch dort deutlicher anzutreffen als im Weichteilhämatom. PDGF wirkt mitogen auf Endothelzellen und besitzt somit ebenfalls angiogene Eigenschaften. Außerdem beeinflusst PDGF die Expression von HMOX 1 und OPN, wodurch ebenfalls die Angiogenese vorangetrieben wird. In den untersuchten Zeitpunkten dieser Arbeit wird ersichtlich, dass PDGF scheinbar im Weichteilhämatom eine größere Rolle für die Angiogenese spielt als im Osteotomiehämatom. Betrachtet man aber die Zeitpunkte 1, 4 und 12 Stunden der anderen Untersuchungen, zeigt sich, dass PDGF im Osteotomiehämatom bereits deutlich zeitiger ansteigt und nach 12 Stunden die höchsten Expressionsergebnisse erreicht. Daraus folgt, dass PDGF im Weichteilhämatom verzögert ansteigt, aber dann auch eine höhere Expression zeigt. OPN verstärkt die angiogene Wirkung von PDGF im Osteotomiehämatom, was durch den starken Expressionsanstieg nach 48 Stunden sichtbar wird.

Sowohl VEGF als auch vWF, welche beide für die Untersuchungen der Angiogenese herangezogen wurden, verhalten sich im Hinblick auf das Osteotomiehämatom recht ähnlich. Der Expressionspeak liegt jeweils 36 Stunden postoperativ. Die Expression ist damit auch jeweils höher als im Weichteilhämatom.

Der Endothelzellmarker CD 31 ist im Knochenmark verstärkt anzutreffen. Im Vergleich zu beiden Hämatomen befinden sich dort von Beginn an deutlich mehr Endothelzellen. Die im Knochenmark befindlichen Sinusoide, welche die Erweiterung der Gefäße darstellen, werden von Endothelzellen ausgekleidet. Der Anstieg des Markers nach 60 Stunden spricht für den Beginn der Angiogenese im angrenzenden Bereich der Fraktur.

CD 31 ermöglicht über die Interaktion mit den Leukozyten selbigen auch die Diapedese in entzündliche Gebiete. In der zeitigen Phase der Frakturheilung, 12 Stunden postoperativ liegt dieser Marker auf relativ hohem Niveau. Vor allem im Weichteilhämatom und im Knochenmark könnte dieser Anstieg auch für einen entzündlichen Prozess zu diesem Zeitpunkt sprechen.

Insgesamt ist zu bemerken, dass die Hypoxie, verursacht durch die Durchtrennung von Versorgungsbahnen des betroffenen Gebietes, im Osteotomiehämatom deutlicher ausgeprägt ist als im Weichteilhämatom. Sowohl in der sehr zeitigen Phase der Frakturheilung (1 und 4 Stunden) ist die Hypoxie deutlich erkennbar (GLUT 1) als auch nach 36 (HIF 1 α) und 48

Stunden (GLUT 1). Diesem Fakt folgend wird die Angiogenese vorangetrieben, um eine Versorgung mit sauerstoffreichem Blut wieder zu ermöglichen. Letztendlich wurde 36 Stunden post Osteotomie die Angiogenese durch die untersuchten Faktoren bereits stärker vorangetrieben als nach dem gesetzten Weichteilschaden. Möglicherweise hängt die weniger auffällige Hypoxie in der Region des Weichteilschadens mit der besseren Durchblutung in der Muskulatur zusammen, die durch die Kontraktion der Muskeln auch noch gefördert wird. Unklar ist, ob die Sauerstoffversorgung in der Muskulatur auch über Diffusion erfolgen kann.

5.2.6 Osteogene Faktoren treten bereits nach 48 Stunden auf und kennzeichnen den Beginn der Wiederherstellung des Knochens

Der osteogene Wachstumsfaktor BMP-2 erfährt in beiden Hämatomen einen Anstieg über den Zeitverlauf gipfelnd in einem Peak zum Zeitpunkt 48 Stunden. In der Literatur wurde ein Peak 24 Stunden postoperativ erwähnt, welcher vorliegend nicht bestätigt werden konnte (Cho et al., 2002; Marsell und Einhorn, 2009). Eine Ursache für das zeitlich unterschiedliche Auftreten könnte in der Wahl der Versuchstierspezies liegen, da allgemeine Stoffwechselprozesse und so auch die Knochenheilung bei Ratten und Mäusen, welche von Cho et al. und Marsell et al. verwendet wurden, schneller ablaufen. Deutlich schwerer zu rechtfertigen ist das gleichzeitige Auftreten von BMP-2 im Weichteilhämatom. Eine Erklärung könnte das Vorhandensein von BMP-2-produzierenden Zellen, also mesenchymaler Stammzellen im Weichteilhämatom liefern (Marsell und Einhorn, 2009). CD 73, ein Marker der auf das Vorhandensein von MSC schließen lässt, steigt nach 24 Stunden im Weichteilhämatom deutlich an und somit nachfolgend die Expression von BMP-2. Da allerdings der Nachweis vom mRNA keine Aussage über die Umsetzung zu dem entsprechend wirksamen Protein oder die Anwesenheit zugehöriger Rezeptoren zulässt, kann nicht davon ausgegangen werden, dass BMP-2 im Weichteilhämatom seine Wirkung entfalten kann. Der Effekt von BMP kann auch erst dann zum Tragen kommen, wenn der Zusammenschluss von BMP-Monomeren zu Dimeren in Verbindung mit entsprechenden Rezeptoren erfolgt (Marsell und Einhorn, 2009). Diesbezüglich bedarf es weiterer Untersuchungen.

Zum Zeitpunkt 12 Stunden findet im Osteotomiehämatom ein deutlicher Anstieg der GDF-8-Synthese statt. Dieser Level wird bis 60 Stunden postoperativ gehalten. Daraus geht hervor, dass die negative Regulierung der Kallusmasse bereits sehr früh einsetzt, um eine überschießende Kallusproduktion zu verhindern. Im Weichteilhämatom setzt die GDF-8-Synthese etwas später ein und verbleibt auch bis zum Zeitpunkt 48 Stunden unter der Expression im Osteotomiehämatom. Erst nach 60 Stunden übersteigt die GDF-8-Synthese diejenige in den Osteotomiehämatomen. McCroskery et al. konnten in Myostatin-defizienten Mäusen eine beschleunigte Regeneration der Muskulatur, sowie eine reduzierte Fibrosierung des Defekts beobachten. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Ausschaltung von Myostatin eine gesteigerte Immunantwort zur Folge hatte und somit die Entzündung forciert wurde (McCroskery et al., 2005). Demzufolge könnte die Narbenbildung im Muskelgewebe in der GDF-8-Synthese begründet sein. Es ist davon auszugehen, dass noch andere Faktoren eine Rolle spielen da Myostatin auch nach einer Fraktur exprimiert wird.

Das extrazelluläre Matrixprotein OPN besitzt laut Literatur (Duvall et al., 2007) unter anderem proinflammatorische Eigenschaften. Das Expressionsmuster, welches einen Peak im Osteotomiehämatom erst nach 48 Stunden zeigt und im Weichteilhämatom nicht ansteigt, lässt allerdings vermuten, dass es sich hierbei eher um einen angiogenen und osteogenen als um einen proinflammatorischen Effekt handelt.

Sowohl OPN als auch BMP-2, welche in ihrer Funktion osteogen wirksam sind, treten in etwa zum gleichen Zeitpunkt auf, so dass man davon ausgehen kann, dass der Grundstein der Synthese einer festen Überbrückung des Osteotomiespaltes bereits nach 48 Stunden gelegt wird. Bemerkenswert ist allerdings, dass die Regulierung durch GDF-8 bereits nach 12 Stunden einsetzt. Denkbar wäre, dass GDF-8 möglicherweise noch über andere Funktionen verfügt. Auch hierfür sind weitere Untersuchungen erforderlich.

5.2.7 Nach Beendigung der Untersuchungen ist eine detailliertere Darstellung der Anfangsphase der Frakturheilung möglich

Die schon seit längerem bekannte Einteilung der Frakturheilung in verschiedene Phasen (Entzündung, Granulation, Reparation, Remodelling, siehe Abb. 1.1.) kann nun aufgrund der durchgeführten Untersuchungen differenzierter betrachtet werden (siehe Abb.5.1.). Die direkt nach Eintreten einer Fraktur beginnende Entzündungsphase zeigt sich in einem Anstieg

proinflammatorischer Faktoren in einem Zeitrahmen von 4 bis 24 Stunden postoperativ. Kurze Zeit später kann auch schon ein Anstieg antiinflammatorischer Faktoren beobachtet werden, die der Entzündung entgegenwirken. Diese Faktoren kommen nach 24 bzw. 48 Stunden zu einem Peak. Die Zerreißung der versorgenden Blutbahnen nach einer Fraktur lässt im betroffenen Gewebe relativ schnell einen hypoxischen Zustand sichtbar werden, welcher nach 36 und 48 Stunden seinen Höhepunkt erreicht. Als Antwort darauf erfolgt parallel dazu ein Anstieg angiogenetischer Faktoren, um eine baldige Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen über den Blutweg wieder gewährleisten zu können. Der Beginn der stabilen Überbrückung der Fraktur zeigt sich im Auftreten osteogener Faktoren. Bereits 2 Tage nach Eintreten einer Fraktur werden diese exprimiert. Bemerkenswert ist der Fakt, dass die Hochregulation der antiinflammatorischen und angiogenetischen Faktoren im Osteotomiehämatom zeitlich zusammenfällt. Der Grund für eine narbenlose Wiederherstellung des Knochengewebes nach einer Fraktur könnte in diesem Zusammenhang zu suchen sein.

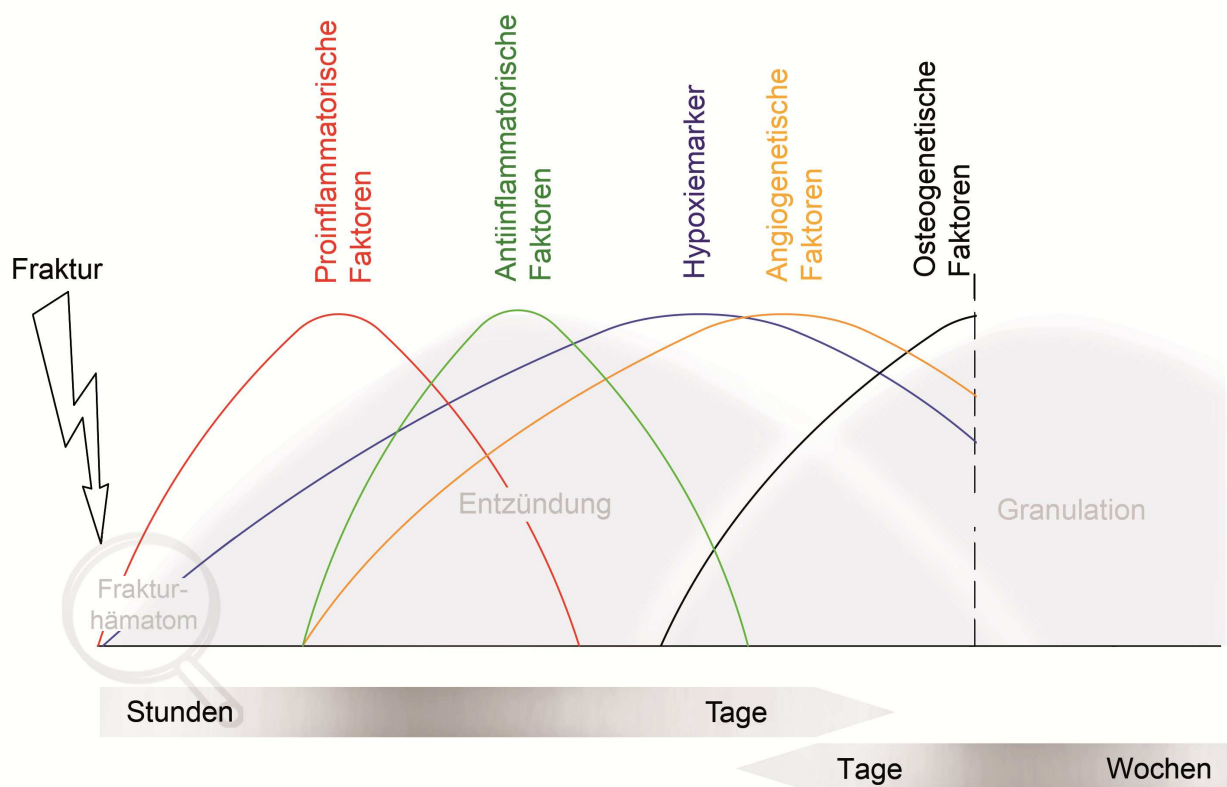


Abbildung 5.1. Übersicht zur differenzierteren Darstellung der zeitigen Phase der Frakturheilung im Untersuchungszeitraum bis 60 Stunden *post operationem*

Die Ergebnisse des Versuchsvorhabens wurden unter dem Titel „Initial immune reaction and angiogenesis in bone healing“ im April 2012 veröffentlicht (Schmidt-Bleek et al., 2012).

6 Zusammenfassung und Ausblick

FACS- und Expressionsanalyse des ovinen Osteotomie- und Weichteilhämatoms 24, 36 und 48 Stunden post Osteotomie

Nach wie vor kommt es im Bereich der Frakturheilung immer wieder zu Komplikationen in Form von Heilungsstörungen oder Pseudarthrosenbildung (Haas, 2000). Im Rahmen dieses Projektes wurde am Schafmodell eine Defekt-Osteotomie zur Gewinnung des Osteotomiehämatoms durchgeführt und diese mit einem rigiden Fixateur extern versorgt. Zu Vergleichszwecken wurde ein Muskelschaden zugefügt, um ein Weichteilhämatom entstehen zu lassen. Ziel des Vorhabens war es, die zelluläre Zusammensetzung beider Hämatome und die Expression unterschiedlicher Zytokine, Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, transmembraner Transport- und extrazellulärer Matrixproteine zu ermitteln.

Gerade im Bereich des Entzündungsprozesses gibt es in der Frakturheilung deutliche Unterschiede im Vergleich zu einem Weichteilschaden. Proinflammatorische Zellen sind insgesamt im Osteotomiehämatom weniger vorhanden als im Weichteilhämatom. Dafür zeigen sich proinflammatorische Faktoren mit einer wesentlich größeren Intensität als im Weichteilhämatom. Im Osteotomiehämatom werden antiinflammatorische Faktoren deutlich stärker hochreguliert, genauso wie antiinflammatorische T-Helfer-Zellen in größerer Anzahl zu finden sind. Es ist daher zu vermuten, dass der Grund für eine narbenlose Heilung einer Fraktur in der Regulierung der Entzündungsreaktion zu suchen ist. Dies wird umso deutlicher, als die frühe Hochregulation der angiogenen Faktoren, die zeitgleich mit der Hochregulation antiinflammatorischer Faktoren einsetzt, eine schnelle Revaskularisierung andeuten. Die Wiederherstellung der Versorgung, der Zustrom migrierender, an der Heilung beteiligter Zellen über die neu entstandenen Gefäße, der Abtransport von Zellmüll und Abbauprodukten sind essentiell für eine erfolgreiche Heilung.

Die Einteilung der Frakturheilung in vier sich überlappende Phasen (siehe Abb. 1.1.) ist geläufig und anerkannt. Mit Hilfe dieses Versuchsvorhabens konnten die Abläufe der Anfangsphase konkretisiert werden. Unmittelbar nach dem Entstehen einer Fraktur kommt es zu einem Anstieg proinflammatorischer Faktoren. Gleichzeitig wird die Schädigung des Gewebes, vor allem der Gefäße, deutlich sichtbar am Anstieg der Hypoxiemarker. Bereits nach 1 bis 4 Stunden ist die Hypoxie im Osteotomiehämatom sehr ausgeprägt. Sowohl die Entzündung als auch die Hypoxie sind im Weichteilschaden nicht so stark ausgebildet wie

nach einer Knochenverletzung. Die Untersuchungen zeigen, dass nach einer Fraktur sehr schnell die Regulation sowohl der Entzündung als auch der Hypoxie einsetzt. Dies geschieht einerseits auf molekularer und andererseits auf zellulärer Ebene. Dabei ist hervorzuheben, dass der Anstieg antiinflammatorischer und angiogenetischer Faktoren zeitgleich beginnt. Osteogene Faktoren treten bereits nach 24 Stunden auf, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der Grundstein einer festen Überbrückung des Osteotomiespaltes bereits sehr zeitig gelegt wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass die Entzündungsphase, als initiale Phase der Frakturheilung, richtungweisend für das resultierende Heilungsergebnis ist.

Ein differenzierteres Verständnis der immunologischen Prozesse zu Beginn der Knochenheilung ist der erste Schritt zur Entwicklung vielversprechender neuer Therapieansätze. Denkbar ist hier die Beeinflussung der Entzündungsreaktion sowohl auf molekularer als auch auf zellulärer Ebene. Neueste Untersuchungen zeigen einen Zusammenhang zwischen $CD8^+$ T-Zellen, also negativ beeinflussenden Immunzellpopulationen, und einer verzögerten Knochenheilung (Reinke et al., 2013). Die Ausschaltung solcher Zellen könnte die positive Beeinflussung der Regeneration ermöglichen. Außerdem ist es denkbar, der Fraktur Faktoren zuzufügen, die das Modellieren der zeitigen Phase der Frakturheilung ermöglichen. BMPs werden bereits erfolgreich in der Praxis eingesetzt. Der Einsatz antiinflammatorischer Faktoren wie TGF β und IL-10 zur Eindämmung der Inflammation sollte weiter untersucht werden. Auch die Beeinflussung mesenchymaler Stammzellen durch TGF β und regulatorische T-Zellen und damit eine Reduzierung der Entzündungsreaktion ist ein weiterer Ansatzpunkt für Weiterentwicklungen. Die Wiederherstellung des Blutgefäßsystems ist ebenfalls essentiell für eine erfolgreiche Frakturheilung. Der Einsatz angiogenetischer Faktoren wie PDGF, VEGF und OPN während der Frakturheilung stellt einen weiteren Ansatzpunkt dar, neue Entwicklungen voranzutreiben.

Summary and Outlook

FACS- and expression analysis of the ovine osteotomy and soft tissue hematoma 24, 36 and 48 hours after osteotomy

Complications during fracture healing in form of healing disorders or non-union still occur (Haas, 2000). In this project, a defect osteotomy on a sheep model was performed to obtain a fracture hematoma. The fracture was provided with a rigid external fixator. For comparison purposes, a muscle damage has been done to cause a soft tissue hematoma. The aim of the project was to determine the cellular composition of both hematoma and the expression of various cytokines, growth factors, transcription factors, transmembrane transport- and extracellular matrix proteins.

Especially at the inflammatory processes, there are significant differences in fracture healing compared to soft tissue injuries. In osteotomy hematoma are less inflammatory cells available than in soft tissue hematoma. In return, proinflammatory factors show a much greater intensity than in the soft tissue hematoma. Antiinflammatory factors are significantly stronger upregulated in the osteotomy hematoma as well as antiinflammatory T helper cells are found in larger numbers. It is therefore likely that the reason for the scarless healing of a fracture is a result of the regulation of the inflammatory response. This gets more evident as early upregulation of angiogenic factors, which begins simultaneously with the upregulation of antiinflammatory factors, suggesting a rapid revascularization. The restoration of blood supply, the influx of migrating cells, which are involved in healing of the newly established vessels, the removal of cellular waste and degradation products are essential for successful healing. The classification of fracture healing in four overlapping phases (see fig. 1.1.) is well known and accepted. Using this experimental project, the processes of the initial phase has been substantiated. Immediately after the emergence of a fracture there is an increase of proinflammatory factors. At the same time, the damage to the tissue, especially of the vessels is clearly visible on the increase of the hypoxic marker. After 1 to 4 hours in the osteotomy hematoma the hypoxia is very pronounced. Both the inflammation and the hypoxia in the soft tissue injury are not as strongly developed as after a bone injury. The studies show that after a fracture the regulation of inflammation and hypoxia starts very quickly. This is done on the one hand on the molecular and on the other hand at the cellular level. It should be emphasized that the increase of antiinflammatory and angiogenic factors starts simultaneously. Osteogenic factors already appear after 24 hours. It can be assumed that the foundation of a solid bridging

of the osteotomy gap is set very early. The results of this work show that the initial healing phase, the inflammatory phase, gives the direction for the healing outcome. A more differentiated understanding of the immunological processes at the beginning of bone healing is the first step towards the development of promising new therapeutic approaches. The influence of the inflammatory response both at the molecular and the cellular level is conceivable. Recent studies show an association between CD8⁺ T cells, means negatively influencing immune cell populations, and delayed bone healing (Reinke et al., 2013). The elimination of such cells could provide the positive influence of regeneration. It is also conceivable to add factors, allowing the modeling of the early phase of fracture healing. BMPs have been successfully used in practice. The use of antiinflammatory factors such as TGF β and IL-10 to stem inflammation should be further investigated. Also the influence of mesenchymal stem cells by TGF β and regulatory T-cells, and as a result a reduction of the inflammatory response is another starting point for further developments. The restoration of the vascular system is also essential for successful fracture healing. The use of angiogenic factors such as PDGF, VEGF and OPN during fracture healing is another approach to promote new developments.

7 Literaturverzeichnis

- Ai-Aql, Z.S., Alagl, A.S., Graves, D.T., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A., 2008, Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *J Dent Res* 87, 107-118.
- Ai, J., Ebrahimi, S., Khoshzaban, A., Jafarzadeh Kashi, T.S., Mehrabani, D., 2012, Tissue engineering using human mineralized bone xenograft and bone marrow mesenchymal stem cells allograft in healing of tibial fracture of experimental rabbit model. *Iran Red Crescent Med J* 14, 96-103.
- Andrew, J.G., Andrew, S.M., Freemont, A.J., Marsh, D.R., 1994, Inflammatory cells in normal human fracture healing. *Acta Orthop Scand* 65, 462-466.
- Austin, R.T., 1977, Fractures of the tibial shaft: is medical audit possible? *Injury* 9, 93-101.
- Autefage, A., 2000, The point of view of the veterinary surgeon: bone and fracture. *Injury* 31 Suppl 3, C50-55.
- Barnes, P.J., 2006, Transcription factors in airway diseases. *Lab Invest* 86, 867-872.
- Bataille, R., Chappard, D., Klein, B., 1992, The critical role of interleukin-6, interleukin-1B and macrophage colony-stimulating factor in the pathogenesis of bone lesions in multiple myeloma. *Int J Clin Lab Res* 21, 283-287.
- Börne, L., 1987, *Das Staatspapier des Herzens - Fragmente und Aphorismen, Spiegelbild des Lebens - Aufsätze zur Literatur*, Bund-Verlag, Köln
- Bolander, M.E., 1992, Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 200, 165-170.
- Bostrom, M.P., Asnis, P., 1998, Transforming growth factor beta in fracture repair. *Clin Orthop Relat Res*, S124-131.
- Bostrom, M.P., Camacho, N.P., 1998, Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, S274-282.
- Bouletreau, P.J., Warren, S.M., Spector, J.A., Steinbrech, D.S., Mehrara, B.J., Longaker, M.T., 2002, Factors in the fracture microenvironment induce primary osteoblast angiogenic cytokine production. *Plast Reconstr Surg* 110, 139-148.
- Braun, W., Ruter, A., 1996, [Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects]. *Unfallchirurg* 99, 59-67.
- Buckwalter, J.A., 1996, Effects of early motion on healing of musculoskeletal tissues. *Hand Clin* 12, 13-24.

- Canalis, E., McCarthy, T., Centrella, M., 1988, Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest* 81, 277-281.
- Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., Middleton, J., 2007, Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25, 2739-2749.
- Cho, T.J., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A., 2002, Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *J Bone Miner Res* 17, 513-520.
- Cornell, C.N., Lane, J.M., 1992, Newest factors in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, 297-311.
- DeLisser, H.M., Newman, P.J., Albelda, S.M., 1994, Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today* 15, 490-495.
- Dimitriou, R., Tsiridis, E., Giannoudis, P.V., 2005, Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury* 36, 1392-1404.
- DiPietro, L.A., 1995, Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells. *Shock* 4, 233-240.
- Dulak, J., Deshane, J., Jozkowicz, A., Agarwal, A., 2008, Heme oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis. *Circulation* 117, 231-241.
- Dunning, D., 2002, Basic mammalian bone anatomy and healing. *Vet Clin North Am Exot Anim Pract* 5, 115-128.
- Duvall, C.L., Taylor, W.R., Weiss, D., Wojtowicz, A.M., Guldberg, R.E., 2007, Impaired angiogenesis, early callus formation, and late stage remodeling in fracture healing of osteopontin-deficient mice. *J Bone Miner Res* 22, 286-297.
- Egger, E.L., 1991, Complications of external fixation. A problem-oriented approach. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 21, 705-733.
- Einhorn, T.A., 1998, The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, S7-21.
- Einhorn, T.A., 2005, The science of fracture healing. *J Orthop Trauma* 19, S4-6.
- Einhorn, T.A., Lane, J.M., 1998, Significant advances have been made in the way surgeons treat fractures. *Clin Orthop Relat Res*, S2-3.
- Einhorn, T.A., Majeska, R.J., Rush, E.B., Levine, P.M., Horowitz, M.C., 1995, The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 10, 1272-1281.
- el Habbal, M.H., Strobel, S., 1993, Leucocyte adhesion deficiency. *Arch Dis Child* 69, 463-466.

- Elkasrawy, M.N., Hamrick, M.W., 2010, Myostatin (GDF-8) as a key factor linking muscle mass and bone structure. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 10, 56-63.
- Endo, K., Sairyo, K., Komatsubara, S., Sasa, T., Egawa, H., Ogawa, T., Yonekura, D., Murakami, R., Yasui, N., 2005, Cyclooxygenase-2 inhibitor delays fracture healing in rats. *Acta Orthop* 76, 470-474.
- Epari, D.R., Schell, H., Bail, H.J., Duda, G.N., 2006, Instability prolongs the chondral phase during bone healing in sheep. *Bone* 38, 864-870.
- Ferguson, M.W., O'Kane, S., 2004, Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359, 839-850.
- Fitzgerald, K.A., O'Neill, L.A., Gearing, A.J.H., Callard, R.E., 2001, *The Cytokine Facts Book*. Academic Press, New York, Boston, San Francisco, San Diego, London, Sydney, Tokyo, 2. Auflage
- Gaber, T., Dziurla, R., Tripmacher, R., Burmester, G.R., Buttgereit, F., 2005, Hypoxia inducible factor (HIF) in rheumatology: low O₂! See what HIF can do! *Ann Rheum Dis* 64, 971-980.
- Gautschi, O.P., Frey, S.P., Zellweger, R., 2007, Bone morphogenetic proteins in clinical applications. *ANZ J Surg* 77, 626-631.
- Geiger, T.L., Tauro, S., 2012, Nature and nurture in Foxp3(+) regulatory T cell development, stability, and function. *Hum Immunol* 73, 232-239.
- Gesellschaft für Versuchstierkunde und Tierärztliche Vereinigung für Tierschutz. Empfehlung Schmerztherapie bei Versuchstieren. 2010
- Gerstenfeld, L.C., Cho, T.J., Kon, T., Aizawa, T., Tsay, A., Fitch, J., Barnes, G.L., Graves, D.T., Einhorn, T.A., 2003, Impaired fracture healing in the absence of TNF- α signaling: the role of TNF- α in endochondral cartilage resorption. *J Bone Miner Res* 18, 1584-1592.
- Giannoudis, P.V., Einhorn, T.A., 2009, Bone morphogenetic proteins in musculoskeletal medicine. *Injury* 40 Suppl 3, S1-3.
- Giannoudis, P.V., Einhorn, T.A., Marsh, D., 2007, Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 38 Suppl 4, S3-6.
- Granero-Molto, F., Weis, J.A., Miga, M.I., Landis, B., Myers, T.J., O'Rear, L., Longobardi, L., Jansen, E.D., Mortlock, D.P., Spagnoli, A., 2009, Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem Cells* 27, 1887-1898.
- Grundnes, O., Reikeras, O., 1993, The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand* 64, 340-342.

- Grutz, G., 2005, New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol* 77, 3-15.
- Haas, N.P., 2000, [Callus modulation--fiction or reality?]. *Chirurg* 71, 987-988.
- Hadjidakis, D.J., Androulakis, II, 2006, Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 1092, 385-396.
- Hamrick, M.W., Arounleut, P., Kellum, E., Cain, M., Immel, D., Liang, L.F., 2010, Recombinant myostatin (GDF-8) propeptide enhances the repair and regeneration of both muscle and bone in a model of deep penetrant musculoskeletal injury. *J Trauma* 69, 579-583.
- Hayda, R.A., Brighton, C.T., Esterhai, J.L., Jr., 1998, Pathophysiology of delayed healing. *Clin Orthop Relat Res*, S31-40.
- Hofmann, A., Mattyasovszky, S.G., Bruning, C., Ritz, U., Mehling, I., Meurer, A., Rommens, P.M., 2009, [Osteoblasts : cellular and molecular regulatory mechanisms in fracture healing]. *Orthopade* 38, 1009-1019.
- Hulth, A., 1980, Fracture healing. A concept of competing healing factors. *Acta Orthop Scand* 51, 5-8.
- Janeway, C., 2002, *Immunologie*. Gustav Fischer, 5. Auflage
- Jurk, K., Kehrel, B.E., 2010, [Pathophysiology and biochemistry of platelets]. *Internist (Berl)* 51, 1086, 1088-1092, 1094.
- Kellum, E., Starr, H., Arounleut, P., Immel, D., Fulzele, S., Wenger, K., Hamrick, M.W., 2009, Myostatin (GDF-8) deficiency increases fracture callus size, Sox-5 expression, and callus bone volume. *Bone* 44, 17-23.
- Klein, P., Schell, H., Streitparth, F., Heller, M., Kassi, J.P., Kandziora, F., Bragulla, H., Haas, N.P., Duda, G.N., 2003, The initial phase of fracture healing is specifically sensitive to mechanical conditions. *J Orthop Res* 21, 662-669.
- Kojimoto, H., Yasui, N., Goto, T., Matsuda, S., Shimomura, Y., 1988, Bone lengthening in rabbits by callus distraction. The role of periosteum and endosteum. *J Bone Joint Surg Br* 70, 543-549.
- Kolar, P., Schmidt-Bleek, K., Schell, H., Gaber, T., Toben, D., Schmidmaier, G., Perka, C., Buttgerit, F., Duda, G.N., 2010, The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Eng Part B Rev* 16, 427-434.
- Kon, T., Cho, T.J., Aizawa, T., Yamazaki, M., Nooh, N., Graves, D., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A., 2001, Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *J Bone Miner Res* 16, 1004-1014.

- Krämer, J., Grifka, J., 2007, Orthopädie Unfallchirurgie. Springer, 8. Auflage
- Krause, D.S., Fackler, M.J., Civin, C.I., May, W.S., 1996, CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 87, 1-13.
- Lange, J., Sapozhnikova, A., Lu, C., Hu, D., Li, X., Mclau, T., 3rd, Marcucio, R.S., 2010, Action of IL-1beta during fracture healing. *J Orthop Res* 28, 778-784.
- Lienau, J., Schell, H., Duda, G.N., Seebeck, P., Muchow, S., Bail, H.J., 2005, Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res* 23, 639-645.
- Lienau, J., Schmidt-Bleek, K., Peters, A., Haschke, F., Duda, G.N., Perka, C., Bail, H.J., Schutze, N., Jakob, F., Schell, H., 2009, Differential regulation of blood vessel formation between standard and delayed bone healing. *J Orthop Res* 27, 1133-1140.
- Lissenberg-Thunnissen, S.N., de Gorter, D.J., Sier, C.F., Schipper, I.B., 2011, Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Int Orthop* 35, 1271-1280.
- Liu, Y., Wang, L., Kikuri, T., Akiyama, K., Chen, C., Xu, X., Yang, R., Chen, W., Wang, S., Shi, S., 2011, Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN-gamma and TNF-alpha. *Nat Med* 17, 1594-1601.
- Malizos, K.N., Papatheodorou, L.K., 2005, The healing potential of the periosteum molecular aspects. *Injury* 36 Suppl 3, S13-19.
- Marsell, R., Einhorn, T.A., 2009, The role of endogenous bone morphogenetic proteins in normal skeletal repair. *Injury* 40 Suppl 3, S4-7.
- Martin, P., Leibovich, S.J., 2005, Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *Trends Cell Biol* 15, 599-607.
- McCroskery, S., Thomas, M., Platt, L., Hennebry, A., Nishimura, T., McLeay, L., Sharma, M., Kambadur, R., 2005, Improved muscle healing through enhanced regeneration and reduced fibrosis in myostatin-null mice. *J Cell Sci* 118, 3531-3541.
- McKee, M.D., Nanci, A., 1996, Secretion of Osteopontin by macrophages and its accumulation at tissue surfaces during wound healing in mineralized tissues: a potential requirement for macrophage adhesion and phagocytosis. *Anat Rec* 245, 394-409.
- McKibbin, B., 1978, The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 60-B, 150-162.
- Michel, G., Salomon, F-V., Gutte, G., 1986, Morphologie landwirtschaftlicher Nutztiere. Quelle & Meyer, 1. Auflage

- Mizuno, K., Mineo, K., Tachibana, T., Sumi, M., Matsubara, T., Hirohata, K., 1990, The osteogenetic potential of fracture haematoma. Subperiosteal and intramuscular transplantation of the haematoma. *J Bone Joint Surg Br* 72, 822-829.
- Muhr, G., 1997, Unfallchirurgische Grundlagen: Bedeutung von Biologie und Biomechanik in der Frakturheilung. Festschrift DGU
- Muschler, G.F., Raut, V.P., Patterson, T.E., Wenke, J.C., Hollinger, J.O., 2010, The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev* 16, 123-145.
- Newman, E., Turner, A.S., Wark, J.D., 1995, The potential of sheep for the study of osteopenia: current status and comparison with other animal models. *Bone* 16, 277S-284S.
- Ng, K.W., Romas, E., Donnan, L., Findlay, D.M., 1997, Bone biology. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 11, 1-22.
- Opal, S.M., 2000, Phylogenetic and functional relationships between coagulation and the innate immune response. *Crit Care Med* 28, S77-80.
- Ozaki, A., Tsunoda, M., Kinoshita, S., Saura, R., 2000, Role of fracture hematoma and periosteum during fracture healing in rats: interaction of fracture hematoma and the periosteum in the initial step of the healing process. *J Orthop Sci* 5, 64-70.
- Paffl, M W., 2004, Rael-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung *BIOspektrum*. 10, 92 – 95.
- Pape, H.C., Marcucio, R., Humphrey, C., Colnot, C., Knobe, M., Harvey, E.J., 2010, Trauma-induced inflammation and fracture healing. *J Orthop Trauma* 24, 522-525.
- Parfitt, A.M., 2002, Life history of osteocytes: relationship to bone age, bone remodeling, and bone fragility. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2, 499-500.
- Park, J.E., Barbul, A., 2004, Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg* 187, 11S-16S.
- Park, S.H., Silva, M., Bahk, W.J., McKellop, H., Lieberman, J.R., 2002, Effect of repeated irrigation and debridement on fracture healing in an animal model. *J Orthop Res* 20, 1197-1204.
- Phillips, A.M., 2005, Overview of the fracture healing cascade. *Injury* 36 Suppl 3, S5-7.
- Probst, A., Spiegel, H.U., 1997, Cellular mechanisms of bone repair. *J Invest Surg* 10, 77-86.
- Pschyrembel, W., 1993, Medizinisches Wörterbuch. Nikol Verlagsgesellschaft mbH 257. Auflage

- Reinke, S., Geissler, S., Taylor, W.R., Schmidt-Bleek, K., Juelke, K., Schwachmeyer, V., Dahne, M., Hartwig, T., Akyuz, L., Meisel, C., Unterwalder, N., Singh, N.B., Reinke, P., Haas, N.P., Volk, H.D., Duda, G.N., 2013, Terminally differentiated CD8(+) T cells negatively affect bone regeneration in humans. *Sci Transl Med* 5, 177ra136.
- Remedios, A., 1999, Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29, 1029-1044, v.
- Rössler, H., Rüter, W., 2007, Orthopädie und Unfallchirurgie. Urban Fischer 19. Auflage
- Rosier, R.N., O'Keefe, R.J., Hicks, D.G., 1998, The potential role of transforming growth factor beta in fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*, S294-300.
- Ruggeri, Z.M., 2003, Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J Thromb Haemost* 1, 1335-1342.
- Sadler, J.E., 1998, Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* 67, 395-424.
- Schell, H., Thompson, M.S., Bail, H.J., Hoffmann, J.E., Schill, A., Duda, G.N., Lienau, J., 2008, Mechanical induction of critically delayed bone healing in sheep: radiological and biomechanical results. *J Biomech* 41, 3066-3072.
- Schindeler, A., McDonald, M.M., Bokko, P., Little, D.G., 2008, Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol* 19, 459-466.
- Schmidmaier, G., Wildemann, B., 2006, Biologische und physiologische Grundlagen.
- Schmidt-Bleek, K., Schell, H., Kolar, P., Pfaff, M., Perka, C., Buttgerit, F., Duda, G., Lienau, J., 2009, Cellular composition of the initial fracture hematoma compared to a muscle hematoma: a study in sheep. *J Orthop Res* 27, 1147-1151.
- Schmidt-Bleek, K., Schell, H., Lienau, J., Schulz, N., Hoff, P., Pfaff, M., Schmidt, G., Martin, C., Perka, C., Buttgerit, F., Volk, H.D., Duda, G., 2012, Initial immune reaction and angiogenesis in bone healing. *J Tissue Eng Regen Med*.
- Serhan, C.N., Savill, J., 2005, Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 6, 1191-1197.
- Simmons, D.J., 1985, Fracture healing perspectives. *Clin Orthop Relat Res*, 100-113.
- Sodek, J., Ganss, B., McKee, M.D., 2000, Osteopontin. *Crit Rev Oral Biol Med* 11, 279-303.
- Solheim, E., 1998, Growth factors in bone. *Int Orthop* 22, 410-416.
- Statistisches Bundesamt., 2012, Tabelle: Diagnosedaten der Krankenhäuser nach Behandlungsort. ICD10-4-Steller, ab 2000
- Sturmer, K.M., 1984, [Histologic finding of fracture healing using external fixation and its clinical significance]. *Unfallchirurgie* 10, 110-122.

- Sturmer, K.M., 1996, [Pathophysiology of disrupted bone healing]. *Orthopade* 25, 386-393.
- Sturmer, K.M., Schuchardt, W., 1980, [New aspects of closed intramedullary nailing and marrow cavity reaming in animal experiments. III. Bone-healing, revascularisation and remodelling (author's transl)]. *Unfallheilkunde* 83, 433-435.
- Toben, D., Schroeder, I., El Khassawna, T., Mehta, M., Hoffmann, J.E., Frisch, J.T., Schell, H., Lienau, J., Serra, A., Radbruch, A., Duda, G.N., 2011, Fracture healing is accelerated in the absence of the adaptive immune system. *J Bone Miner Res* 26, 113-124.
- Tsuji, K., Bandyopadhyay, A., Harfe, B.D., Cox, K., Kakar, S., Gerstenfeld, L., Einhorn, T., Tabin, C.J., Rosen, V., 2006, BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nat Genet* 38, 1424-1429.
- Uckun, F.M., Jaszcz, W., Ambrus, J.L., Fauci, A.S., Gajl-Peczalska, K., Song, C.W., Wick, M.R., Myers, D.E., Waddick, K., Ledbetter, J.A., 1988, Detailed studies on expression and function of CD19 surface determinant by using B43 monoclonal antibody and the clinical potential of anti-CD19 immunotoxins. *Blood* 71, 13-29.
- Urist, M.R., 1965, Bone: formation by autoinduction. *Science* 150, 893-899.
- Waldeyer, A., 2003, *Anatomie des Menschen*. de Gruyter, Berlin, New York 17. Auflage
- Wang, Y., Wan, C., Deng, L., Liu, X., Cao, X., Gilbert, S.R., Bouxsein, M.L., Faugere, M.C., Guldberg, R.E., Gerstenfeld, L.C., Haase, V.H., Johnson, R.S., Schipani, E., Clemens, T.L., 2007a, The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to osteogenesis during skeletal development. *J Clin Invest* 117, 1616-1626.
- Wang, Y., Wan, C., Gilbert, S.R., Clemens, T.L., 2007b, Oxygen sensing and osteogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1117, 1-11.
- Wildemann, B., Lange, K., Strobel, C., Fassbender, M., Willie, B., Schmidmaier, G., 2011, Local BMP-2 application can rescue the delayed osteotomy healing in a rat model. *Injury* 42, 746-752.
- Wissing, H., Stürmer, K.M., 1990, Die Wertigkeit verschiedener Versuchstierspezies für experimentelle Untersuchungen am Knochen. *Hefte zur Unfallheilkunde*, Heft 212, Springer-Verlag Berlin
- Wolff, J., 1892, *Das Gesetz von der Transformation der Knochen*. Hirschwald, Berlin
- Wülker, N., 2005, *Orthopädie und Unfallchirurgie*. Thieme 1. Auflage
- Xie, C., Ming, X., Wang, Q., Schwarz, E.M., Guldberg, R.E., O'Keefe, R.J., Zhang, X., 2008, COX-2 from the injury milieu is critical for the initiation of periosteal progenitor cell mediated bone healing. *Bone* 43, 1075-1083.

- Yaguchi, A., Lobo, F.L., Vincent, J.L., Pradier, O., 2004, Platelet function in sepsis. *J Thromb Haemost* 2, 2096-2102.
- Zheng, Y., Rudensky, A.Y., 2007, Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 8, 457-462.
- Zhou, L.J., Ord, D.C., Hughes, A.L., Tedder, T.F., 1991, Structure and domain organization of the CD19 antigen of human, mouse, and guinea pig B lymphocytes. Conservation of the extensive cytoplasmic domain. *J Immunol* 147, 1424-1432.
- Ziegler-Heitbrock, H.W., Ulevitch, R.J., 1993, CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 14, 121-125.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

α	alpha / anti
Act R IIB	Activin Rezeptor IIB
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Bone Morphogenetic Protein
bov	bovine
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CD	Cluster of Differentiation
CO	Kohlenmonoxid
COX	Cyclooxygenase
ct	Threshold Cycle
Δ CT	Delta Threshold Cycle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
ds DNA	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
E	Effizienz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPO	Erythropoetin
et al.	und andere
FACS	Fluorescence activated cell sorting
fig.	figure
FITC	Fluoresceinisothiocyanat

for	forward
FoxP3	Forkhead-Box-Protein P3
g	Fallbeschleunigung
GDF-8	Growth and Differentiation Factor-8
Glut 1	Glucosetransporter Typ 1
HIF 1 α	Hypoxia inducible factor 1 α
HMOX 1	Hämoxigenase 1
hu	human
IL	Interleukin
IL-2 R α	Interleukin 2 Rezeptor α
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
LPS	Lipopolysaccharid
m	Anstieg der Effizienz
M.	Musculus
M-MLV RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
M-MLV RT (H-)	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase H minus
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MSC	Mesenchymale Stammzellen
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
N ₂ O	Distickstoffmonoxid
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NH ₂	Aminogruppe
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid

NSAID	Nichtsteroidales Antiphlogistikum
OH	Osteotomiehämatom
OPN	Osteopontin
ov	ovine
p	Kennzahl für Überschreitungswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
pH	potentia hydrogenii
q RT-PCR	quantitative revers transkribierte Polymerasekettenreaktion
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
rev	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
TGF	Transforming growth factor
TGF α	Transforming growth factor α
TGF β	Transforming growth factor β
T _H 0	unreife T-Zellen
T _H 1	T-Helfer-Zellen Typ 1
T _H 2	T-Helfer-Zellen Typ 2
TNF α	Tumornekrosefaktor α
U	Units
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR1	VEGF receptor 1
VEGFR2	VEGF receptor 2

vWF von Willebrand Faktor

WH Weichteilhämatom

8.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1. Übersicht der verwendeten Primer mit Genlokalisierung, Gengröße und Primersequenz.....53

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1. Der Prozess der Frakturheilung, dargestellt in vier, sich überlappenden Phasen.....	10
Abb. 2.1. Längsschnitt durch einen Röhrenknochen (Femur).....	13
Abb. 3.1. Montierter Fixateur extern an der Tibia.....	42
Abb. 3.2.a Darstellung der Streulichteigenschaft einer Zelle.....	46
Abb. 3.2.b Differenzierung der Zellen auf Grund von Größe und Granularität.....	46
Abb. 3.3.a Beispiel einer guten Schmelzkurve über die gesamte Temperaturspanne von 55,6 bis 65,6°C.....	50
Abb. 3.3.b Beispiel einer guten Schmelzkurve bei 62°C.....	50
Abb. 3.4. Graphische Darstellung zur Berechnung der Effizienz (E).....	51
Abb. 4.1. CD 45 positive Zellen im Osteotomiehämatom, Weichteilhämatom und im Knochenmark.....	56
Abb. 4.2. Anteil CD 14 positiver Zellen in der Leukozytenpopulation im Osteotomiehämatom, Weichteilhämatom und im Knochenmark.....	57
Abb. 4.3. Anteil CD 21 positiver Zellen in der Leukozytenpopulation im Osteotomiehämatom, Weichteilhämatom und im Knochenmark.....	58
Abb. 4.4. Anteil CD 5 positiver Zellen in der Leukozytenpopulation im Osteotomiehämatom, Weichteilhämatom und im Knochenmark.....	59
Abb. 4.5. Anteil CD 8 positiver Zellen in der T- Lymphozytenpopulation im Osteotomiehämatom, Weichteilhämatom und im Knochenmark.....	60
Abb. 4.6. Anteil CD 4 positiver Zellen in der T-Lymphozytenpopulation im Osteotomiehämatom, Weichteilhämatom und im Knochenmark.....	62
Abb. 4.7.a Anteil CD 25 positiver Zellen (aktivierte und regulatorische T-Zellen) in der T-Helferzellpopulation im Osteotomiehämatom, Weichteilhämatom und im Knochenmark.....	64
Abb. 4.7.b Anteil CD 25 positiver Zellen (CD 25 ⁺⁺ , regulatorische T-Zellen) in der T-Helferzellpopulation im Osteotomiehämatom, Weichteilhämatom und im Knochenmark.....	65
Abb. 4.8. CD 31 positive Zellen im Osteotomiehämatom, Weichteilhämatom und im Knochenmark.....	66
Abb. 4.9. relative mRNA-Expression von BMP-2 im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	67

Abb. 4.10. relative mRNA-Expression von CD 19 im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	68
Abb. 4.11. relative mRNA-Expression von CD 34 im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	69
Abb. 4.12. relative mRNA-Expression von CD 73 im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	70
Abb. 4.13. relative mRNA-Expression von GDF-8 im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	71
Abb. 4.14. relative mRNA-Expression von GLUT 1 im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	72
Abb. 4.15. relative mRNA-Expression von HIF 1 α im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	73
Abb. 4.16. relative mRNA-Expression von HMOX 1 im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	74
Abb. 4.17. relative mRNA-Expression von IL-1 β im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	75
Abb. 4.18. relative mRNA-Expression von IL-2 im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	76
Abb. 4.19. relative mRNA-Expression von IL-2R α im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	77
Abb. 4.20. relative mRNA-Expression von IL-6 im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	78
Abb. 4.21. relative mRNA-Expression von IL-10 im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	79
Abb. 4.22.a relative mRNA-Expression von OPN im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	80
Abb. 4.22.b relative mRNA-Expression von OPN im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom, Darstellung vergrößert bis zu einer Expression von 100.....	81
Abb. 4.23. relative mRNA-Expression von PDGF im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	82
Abb. 4.24. relative mRNA-Expression von TGF β 1 im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	83

Abb. 4.25. relative mRNA-Expression von TNF α im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	84
Abb. 4.26. relative mRNA-Expression von VEGF im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	85
Abb. 4.27. relative mRNA-Expression von vWF im Osteotomiehämatom und Weichteilhämatom.....	86
Abb. 5.1. Übersicht zur differenzierteren Darstellung der zeitigen Phase der Frakturheilung im Untersuchungszeitraum bis 60 Stunden <i>post operationem</i>	100

Publikationsverzeichnis

Schmidt-Bleek, K., Schell, H., Lienau, J., Schulz, N., Hoff, P., Pfaff, M., Schmidt, G., Martin, C., Perka, C., Buttgereit, F., Volk, H.D., Duda, G., 2012, Initial immune reaction and angiogenesis in bone healing. *J Tissue Eng Regen Med*.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Dr. Katharina Schmidt-Bleek für die Überlassung des Themas und die damit verbundene Möglichkeit das wissenschaftliche Arbeiten kennen zu lernen, bedanken. Es ist mir ein großes Bedürfnis, dir als aller erstes zu danken, da du mir jederzeit mit hervorragender fachlicher Kompetenz und unendlicher Geduld zur Seite standest und vom ersten Entwurf an alles Korrektur gelesen hast.

Herrn Professor Dr.-Ing. Georg Duda danke ich für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Forschungseinrichtung in die Praxis umsetzen zu können.

Vielen Dank auch an Herrn Professor Dr. Michael F. G. Schmidt für die Übernahme der Funktion als Doktorvater von veterinärmedizinischer Seite aus.

Danken möchte ich auch Norma Schulz für Ihren unermüdlichen Eifer und manch aufmunternden Satz während der vielen Stunden im Labor. Vielen Dank für deine Hilfe.

Nicht zuletzt vielen Dank auch an meine gesamte Familie. Meinen Eltern, die mir dieses Studium überhaupt erst ermöglichten, und meinem Mann, der mir immer wieder Mut zugesprochen und mich unterstützt hat wo es ging. Meiner Schwester danke ich für den Eifer und das Durchhaltevermögen sich beim Korrekturlesen Zeile für Zeile durch dieses unbekanntes Terrain zu kämpfen.

Meinen Kolleginnen und Freundinnen Carmen und Monique möchte ich für den immer wieder stattgefundenen regen Austausch an fachlichen Tipps und Trost danken.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 05.08.2013

Claudia Martin