

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss des IL-6 Transsignaling-Mechanismus auf die Frakturheilung im
Mono-/ Polytrauma-Mausmodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jens Michael Reinhold

aus Frankfurt (Oder)

Datum der Promotion: 18.12.2020

meiner Familie

Vorwort

Diese Arbeit baut auf die bereits durch unsere Arbeitsgruppe publizierten Daten zur Etablierung eines neuartigen Langzeitüberleben-Mono- /Polytrauma-Mausmodells auf.

Diese Daten wurden veröffentlicht in:

Kleber C, Becker CA, Malysch T, **Reinhold JM**, Tsitsilonis S, Duda GN, Schmidt-Bleek K, Schaser KD. Temporal profile of inflammatory response to fracture and hemorrhagic shock: Proposal of a novel long-term survival murine multiple trauma model. *J Orthop Res.* 2015

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	6
TABELLENVERZEICHNIS.....	7
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	8
I. ZUSAMMENFASSUNG.....	10
II. ABSTRACT ENGLISH.....	12
1. EINLEITUNG.....	14
1.1. DEFINITIONEN: TRAUMA UND POLYTRAUMA	14
1.2. EPIDEMIOLOGIE DES TRAUMAS UND POLYTRAUMAS	16
1.3. STAND DES WISSENS.....	19
1.3.1. <i>Knochengewebe</i>	19
1.3.2. <i>Knochenstoffwechsel</i>	20
1.3.3. <i>Frakturheilung</i>	22
1.3.4. <i>Posttraumatische, systemische Immunantwort</i>	24
1.3.5. <i>Interleukin-6, Interleukin-6-Rezeptoren und Transsignaling</i>	25
1.3.6. <i>Einfluss von Interleukin-6 auf die Frakturheilung</i>	27
1.4. FRAGESTELLUNG	29
2. MATERIAL UND METHODEN.....	30
2.1. STUDIENDESIGN.....	30
2.2. VERSUCHSTIERE UND GRUPPENVERTEILUNG	31
2.3. OPERATIVE INTERVENTION UND PROBENGEWINNUNG.....	32
2.3.1. <i>Anästhesie und Monitoring</i>	32
2.3.2. <i>Einleitung und Kontrolle des hämorrhagischen Schocks</i>	32
2.3.3. <i>Induktion der Femur- und Tibiafraktur</i>	34
2.3.4. <i>Euthanasierung und Probenentnahme</i>	35
2.3.5. <i>Probenfixierung und Kryo-Einbettung</i>	36
2.4. μ CT-BILDGEBUNG UND ANALYSE	37
2.5. HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG	39
2.5.1. <i>TRAP-Färbung</i>	40
2.5.2. <i>Osteocalcin-Färbung</i>	41
2.5.3. <i>Auswertung der histologischen Präparate</i>	44
2.5.4. <i>Analyse TRAP-Färbung</i>	44
2.5.5. <i>Analyse Osteocalcin-Färbung</i>	46

2.6. STATISTIK	48
3. ERGEBNISSE	49
3.1. UNTERSCHIED FRAKTURHEILUNG MONO-/POLYTRAUMA	49
3.1.1. μ CT	49
3.1.2. Histologie	50
3.2. EINFLUSS DES TRANSSIGNALING-MECHANISMUS AUF DIE FRAKTURHEILUNG BEIM MONOTRAUMA	52
3.2.1. μ CT	52
3.2.2 Histologie	56
3.3. EINFLUSS DES TRANSSIGNALING-MECHANISMUS AUF DIE FRAKTURHEILUNG BEIM POLYTRAUMA	62
3.3.1. μ CT	62
3.3.2 Histologie	65
3.4. UNTERSCHIEDE DER FRAKTURHEILUNG DURCH DEN EINFLUSS DES TRANSSIGNALING-MECHANISMUS IM MONO- UND POLYTRAUMA?	71
3.4.1. μ CT	71
3.4.1. Histologie	73
4. DISKUSSION	77
4.1. FRAKTURHEILUNG IM MONOTRAUMA VS. POLYTRAUMA	77
4.2. MODULATION DES TRANSSIGNALINGS IM MONOTRAUMA	78
4.3. MODULATION DES TRANSSIGNALINGS IM POLYTRAUMA	80
4.4. MODULATION DES TRANSSIGNALINGS IM VERGLEICH MONO-/ POLYTRAUMA	81
4.5. HISTOLOGIE	82
4.5.1. Osteoblasten	82
4.5.2. Osteoklasten	83
4.6. ZUSAMMENFASSENDE BEANTWORTUNG DER FRAGESTELLUNG	86
4.7. LIMITATIONEN DER STUDIE	87
4.7.1. Limitation des Frakturmodells	87
4.8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	88
5. LITERATURVERZEICHNIS	90
III. EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	99
IV. ANTEILSERKLÄRUNG AN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN	100
V. LEBENS LAUF	101
VI. KOMPLETTE PUBLIKATIONS LISTE	102
VII. DANKSAGUNG	104

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1:	SCHEMATISCHER ABLAUF DER VORLIEGENDEN ARBEIT	30
ABB. 2:	VERSUCHSTIER IN NARKOSE	33
ABB. 3:	FRAKTURERZEUGUNG IM VERSUCH.....	34
ABB. 4:	POSTOPERATIVE RÖNTGENKONTROLLE	35
ABB. 5:	PROBENHALTER FÜR DAS μ CT.....	37
ABB. 6:	DURCHFÜHRUNG DES μ CT	38
ABB. 7:	HISTOLOGISCHER KRYO-ZUSCHNITT.....	39
ABB. 8:	SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES OSTEOCALCIN-FÄRBEPRINZIPS.....	42
ABB. 9:	ANALYSESchRITTE DER TRAP-FÄRBUNG	45
ABB. 10:	ANALYSESchRITTE DER OSTEOCALCIN-FÄRBUNG	47
ABB. 11:	ERGEBNISSE μ CT FX VS. PT.....	49
ABB. 12:	ERGEBNISSE TRAP-FÄRBUNG FX VS. PT	50
ABB. 13:	ERGEBNISSE OSTEOCALCIN-FÄRBUNG FX VS. PT	51
ABB. 14:	ERGEBNISSE μ CT FX VS. FX + SIL-6R.....	52
ABB. 15:	ERGEBNISSE μ CT FX VS. FX + SIL-6R-AK	53
ABB. 16:	ERGEBNISSE μ CT FX + SIL-6R VS. FX + SIL-6R-AK	55
ABB. 17:	ERGEBNISSE TRAP-FÄRBUNG FX VS. FX + SIL-6R	56
ABB. 18:	ERGEBNISSE OSTEOCALCIN-FÄRBUNG FX VS. FX + SIL-6R	57
ABB. 19:	ERGEBNISSE TRAP-FÄRBUNG FX VS. FX + SIL-6R-AK.....	58
ABB. 20:	ERGEBNISSE OSTEOCALCIN-FÄRBUNG FX VS. FX + SIL-6R-AK.....	59
ABB. 21:	ERGEBNISSE TRAP-FÄRBUNG FX + SIL-6R VS. FX + SIL-6R-AK	60
ABB. 22:	ERGEBNISSE OSTEOCALCIN-FÄRBUNG FX + SIL-6R VS. FX + SIL-6R-AK.....	61
ABB. 23:	ERGEBNISSE μ CT PT VS. PT + SIL-6R.....	62
ABB. 24:	ERGEBNISSE μ CT PT VS. PT + SIL-6R-AK.....	63
ABB. 25:	ERGEBNISSE μ CT PT + SIL-6R VS. PT + SIL-6R-AK	64
ABB. 26:	ERGEBNISSE TRAP-FÄRBUNG PT VS. PT + SIL-6R	65
ABB. 27:	ERGEBNISSE OSTEOCALCIN-FÄRBUNG PT VS. PT + SIL-6R	66
ABB. 28:	ERGEBNISSE TRAP-FÄRBUNG PT VS. PT + SIL-6R-AK.....	67
ABB. 29:	ERGEBNISSE OSTEOCALCIN-FÄRBUNG PT VS. PT + SIL-6R-AK.....	68
ABB. 30:	ERGEBNISSE TRAP-FÄRBUNG PT + SIL-6R VS. PT + SIL-6R-AK.....	69
ABB. 31:	ERGEBNISSE OSTEOCALCIN-FÄRBUNG PT + SIL-6R VS. PT + SIL-6R-AK.....	70
ABB. 32:	ERGEBNISSE μ CT FX + SIL-6R VS. PT + SIL-6R	71
ABB. 33:	ERGEBNISSE μ CT FX + SIL-6R-AK VS. PT + SIL-6R-AK	72
ABB. 34:	ERGEBNISSE TRAP-FÄRBUNG FX + SIL-6R VS. PT + SIL-6R.....	73
ABB. 35:	ERGEBNISSE OSTEOCALCIN-FÄRBUNG FX + SIL-6R VS. PT + SIL-6R.....	74
ABB. 36:	ERGEBNISSE TRAP-FÄRBUNG FX + SIL-6R-AK VS. PT + SIL-6R-AK.....	75
ABB. 37:	ERGEBNISSE OSTEOCALCIN-FÄRBUNG FX + SIL-6R-AK VS. PT + SIL-6R-AK.....	76

Alle Abbildungen sind, sofern nicht gesondert gekennzeichnet, selbst erstellt.

Tabellenverzeichnis

TAB. 1:	μ CT-MESSWERTE FX VS. PT	50
TAB. 2:	HISTOLOGISCHE MESSWERTE FX VS. PT.....	51
TAB. 3:	μ CT-MESSWERTE FX VS. FX + SIL-6R.....	53
TAB. 4:	μ CT-MESSWERTE FX VS. FX + SIL-6R-AK	54
TAB. 5:	μ CT-MESSWERTE FX + SIL-6R VS. FX + SIL-6R-AK.....	55
TAB. 6:	HISTOLOGISCHE MESSWERTE FX VS. FX + SIL-6R	57
TAB. 7:	HISTOLOGISCHE MESSWERTE FX UND FX + SIL-6R-AK.....	59
TAB. 8:	HISTOLOGISCHE MESSWERTE FX + SIL-6R VS. FX + SIL-6R.....	61
TAB. 9:	μ CT-MESSWERTE PT VS. PT + SIL-6R.....	62
TAB. 10:	μ CT-MESSWERTE PT VS. PT + SIL-6R-AK	63
TAB. 11:	μ CT-MESSWERTE PT + SIL-6R VS. PT + SIL-6R-AK.....	64
TAB. 12:	HISTOLOGISCHE MESSWERTE PT VS. PT + SIL-6R	66
TAB. 13:	HISTOLOGISCHE MESSWERTE PT VS. PT + SIL-6R-AK.....	68
TAB. 14:	HISTOLOGISCHE MESSWERTE PT + SIL-6R VS. PT + SIL-6R-AK.....	70
TAB. 15:	μ CT-MESSWERTE FX + SIL-6R VS. PT + SIL-6R.....	71
TAB. 16:	μ CT-MESSWERTE FX + SIL-6R-AK VS. PT + SIL-6R-AK.....	73
TAB. 17:	HISTOLOGISCHE MESSWERTE FX + SIL-6R VS. PT + SIL-6R.....	74
TAB. 18:	HISTOLOGISCHE MESSWERTE FX + SIL-6R-AK VS. PT + SIL-6R-AK	76

Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
AIS	Abbreviated Injury Scale
Aqua dest.	Aqua destillata
BAST	Bundesanstalt für Straßenwesen
BAuA	Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin
BE	Base Excess
BMU	basic multicellular units
BSA	bovine serum albumin
CLC	cardiotrophin like cytokine
DAMP	Damage-associated molecular pattern
DGU	Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EKG	Elektrokardiogramm
Fx	Fraktur
GCS	Glasgow Coma Scale
Gp130	Glykoprotein 130
Hb	Hämoglobin
HCL	Chlorwasserstoff
Hct	Hämatokrit
HS	Hämorrhagischer Schock
ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme
IL-6	Interleukin-6
IL-6-Ak	Interleukin-6-Antikörper
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
INR	International Normalized Ratio
ISS	Injury Severity Score
IQR	Interquartilsabstand
i.p.	Intraperitoneal
JAK	Januskinase

LAGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LIF	leukemia inhibitory factor
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
n	Anzahl
Nr.	Nummer
Osx	Osterix
MAP	mitogen-activated protein
MOV	Multiorganversagen
MSC	Mesenchymale Stammzelle
OC pos [%]	prozentualer Flächenanteil osteocalcin-positiver Bereiche
OPG	Osteoprotegerin
PBS	phosphate buffered saline
PRR	Pattern Recognition Receptors
PT	Polytrauma
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of interest
RRsys	systolischer Blutdruck
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
SCEM	Super Cryo Embedding Medium
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
sIL-6R	löslicher Interleukin-6-Rezeptor
sIL-6R-Ak	Antikörper des löslichen Interleukin-6-Rezeptors
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase
TSR	Transsignaling-Ratio
VOI	Volume of interest
μ CT	Micro-Computertomographie

I. Zusammenfassung

Einleitung: Das Polytrauma ist eines der häufigsten Todesursachen bei jungen Erwachsenen. Frakturen der Extremitäten repräsentieren das dominierende Verletzungsmuster in diesem Kollektiv. Häufig sind polytraumatisierte Patienten durch einen hämorrhagischen Schock (HS) gefährdet. Extremitätenverletzungen und HS sind als Induktoren des Interleukin-6 (IL-6) bekannt und können zu einer überschießenden systemischen inflammatorischen Reaktion führen. IL-6 bindet normalerweise an seinen membrangebundenen Rezeptor (IL-6R), kann jedoch auch membranungebunden als löslicher IL-6R (sIL-6R) vorliegen und mit IL-6 den agonistischen IL-6/sIL-6-Komplex bilden. Der IL-6/sIL-6-Komplex kann am transmembranären Protein gp130 binden, welches ubiquitär auf den Zellen exprimiert wird. Somit kann das Spektrum der IL-6-Zytokinaktivität erheblich erweitert werden. Dieser Vorgang wird als Transsignaling bezeichnet. Trotz eines pathophysiologisch hochwahrscheinlichen Zusammenhangs zwischen dem Transsignaling und der Frakturheilung gibt es hierzu noch wenige Studien. Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss des IL-6-Transsignaling-Mechanismus auf die Frakturheilung standardisiert anhand eines Mono-/ Polytrauma-Mausmodells mit in vivo Immunmodulation zu untersuchen.

Methodik: 36 weibliche C57BL/6N Mäuse mit einer Femur- und Tibiafraktur wurden randomisiert auf sechs Interventionsgruppen aufgeteilt (**I.** Fraktur [Fx], **II.** Fx+sIL-6R-Applikation, **III.** Fx+sIL-6R-Ak-Applikation, **IV.** Polytrauma [PT; Fx+HS], **V.** PT+sIL-6R-Applikation, **VI.** PT+sIL-6R-Ak-Applikation). Die Euthanasierung der Mäuse erfolgte am 21. postinterventionellen Tag. Anschließend erfolgte die μ CT-gestützte Analyse der femoralen Frakturheilung (Parameter: BV, TV, BV/TV, Volumina für Kallus und Kortikalis) sowie die histologische Aufarbeitung mittels TRAP- und Osteocalcin-Färbung zur Quantifizierung der Osteoblasten und Osteoklasten.

Ergebnisse: Im direkten Vergleich der Fraktur- und Polytraumagruppe zeigte sich in unserer Arbeit kein signifikanter Unterschied in der Frakturheilung (BV/TV, $p=0,699$). Beim alleinigen Trauma ohne HS führt eine Steigerung des Transsignaling-Mechanismus zu einer signifikanten Verbesserung der Frakturheilung (BV/TV, $p=0,002$; Kortikalis, $p=0,026$) in Konstellation mit einer signifikant geringeren Dichte an Osteoklasten ($p=0,041$). Eine Blockade ergab einen Trend hin zu einer Verschlechterung der Frakturheilung (TV, $p=0,065$), ebenfalls in Konstellation mit einer signifikant geringeren

Dichte an Osteoklasten ($p=0,004$). Bei der PT-Gruppe mit HS hatte eine Steigerung des Transsignalings keine (BV/TV, $p=0,394$), jedoch die Blockung des Transsignaling-Mechanismus eine signifikant bessere (BV/TV, $p=0,015$) Frakturheilung und einen Trend ($p=0,065$) zu einer höheren osteoblastären Aktivität zur Folge.

Schlussfolgerung: Wir konnten zeigen, dass der Transsignaling-Mechanismus in den Knochenheilungsprozess nach Mono-/ Polytrauma involviert ist. Ein Polytrauma war in unserer Studie nicht grundsätzlich mit einer beeinträchtigten Frakturheilung verbunden. Vielmehr ist das Ausmaß der Transsignaling-Aktivität für eine ungestörte Frakturheilung verantwortlich. Der Transsignaling-Mechanismus stellt ein potentielles Ziel für eine spezifische in vivo-Immunmodulation des Knochenheilungsprozesses dar.

II. Abstract English

Introduction: Polytrauma is one of the most common causes of death in young adults. Limb fractures represent the dominant pattern of injury in this population. Often, polytraumatized patients are at risk for hemorrhagic shock (HS). Limb injuries and HS are known to induce an interleukin-6 (IL-6) release and may lead to an overwhelming systemic inflammatory response. IL-6 normally binds to its membrane-bound receptor (IL-6R), but may also be membrane-unbound as soluble IL-6R (sIL-6R) to form the agonistic IL-6/sIL-6-complex. The IL-6/sIL-6-complex can bind to gp130, a transmembrane protein which is ubiquitously expressed on cells and whereby IL-6 activity can be greatly expanded. This process is called transsignaling. Despite a pathophysiologically highly probable interaction between transsignaling and fracture healing, there are still few studies available. The aim of this work was to investigate the influence of the IL-6-transsignaling mechanism on fracture healing with a standardised murine mono-/polytrauma model and in vivo immunomodulation.

Method: 36 female C57BL/6N mice with a femur and tibial fracture were randomized to six groups with different interventions (I. fracture [Fx], II. Fx + sIL-6R, III. Fx + sIL-6R-Ab, IV. Polytrauma [PT; Fx + HS], V. PT + sIL-6R, VI. PT + sIL-6R-Ab), which were euthanized 21 days after intervention. Subsequently μ CT-assisted analysis of the femoral bone healing (parameters: BV, TV, BV/TV, volumes for callus and cortex) and histological processing (TRAP, osteocalcin staining) for the quantification of osteoblasts and osteoclasts were performed.

Results: Comparing the Fx and PT groups, there was no significant difference in fracture healing (BV/TV, $p=0,699$). In the case of a trauma without HS, an increase in the transsignaling mechanism leads to a significant improvement in fracture healing (BV/TV, $p=0,002$, cortex, $p=0,026$) combined with a significantly lower density of osteoclasts ($p=0,041$). A blockade showed a trend towards a worsening of fracture healing (TV, $p=0,065$) also combined with a significantly lower density of osteoclasts ($p=0,004$). In the PT group, boosting the transsignaling mechanism had no significant effect (BV/TV, $p=0,394$) however, a blockade resulted in significantly better fracture healing (BV/TV, $p=0,015$) and a trend toward higher osteoblast activity ($p=0,065$).

Conclusion: We showed that the transsignaling is fundamentally involved in the bone healing process after mono-/polytrauma. Furthermore, polytrauma is generally not

associated with impaired fracture healing. Notably, the extent of transsignaling activity was responsible for undisturbed fracture healing. The transsignaling mechanism poses a potential target for specific in vivo immunomodulation of the bone healing process.

1. Einleitung

1.1. Definitionen: Trauma und Polytrauma

Das Trauma (aus dem Griechischem: τραύμα „Wunde“) ist die Bezeichnung für die durch die Einwirkung äußerer Gewalt bzw. die Übertragung großer Energiemengen innerhalb kurzer Zeit entstehende Schädigung oder Verletzung von Gewebe oder Knochen (1). In der hier vorliegenden Arbeit wird das Trauma infolge mechanischer Energieeinwirkungen betrachtet, wie es z. B. nach Verkehrsunfällen entsteht. Die schädigende Energie kann jedoch auch auf anderen Energieformen wie thermischen, chemischen oder elektrischen Ursprungs zurückzuführen sein (1, 2).

Für die Begrifflichkeit „Polytrauma“ gibt es verschiedene Definitionen. Es existiert keine endgültige und international einheitliche Definition des Polytraumas, was die Vergleichbarkeit der existenten Studien und damit den Fortschritt in diesem Gebiet der Medizin erschwert (3).

Eine der in Deutschland bekanntesten und seit den 1960er Jahren etablierte Definition des Polytraumas, die jedoch recht allgemein gehalten ist, stammt von Harald Tscherne, dem ersten deutschen Lehrstuhlinhaber für Unfallchirurgie an der Medizinischen Hochschule Hannover, wonach es sich um eine Kombination mehrerer gleichzeitig erworbener Verletzungen verschiedener Körperregionen handle, von denen eine oder die Kombination mehrerer potentiell lebensbedrohlich sind (4).

Baker et al. etablierten 1974 den Injury Severity Score (ISS), der eine Punktzahl von 0 bis 75 annehmen kann und zur Einteilung verschiedener anatomischer Verletzungsgrade dient (5, 6). Dabei korrelieren Verletzungsschwere und Mortalität mit aufsteigender Punktzahl (5, 6). Von einem Polytrauma wird ab einer Punktzahl von ≥ 16 gesprochen (5, 6). Als Berechnungsgrundlage dient der AIS (Abbreviated Injury Scale) (6, 7). Der AIS wurde zuerst im Jahr 1971 eingeführt und im Laufe der Jahre durch die Association for the Advancement of Automotive Medicine (AAAM) verbreitet und weiterentwickelt (7-9). Der AIS gruppiert Verletzungen in verschiedenen Körperregionen und kodiert die Verletzungsschwere auf einer Skala von 1 (geringste Verletzung) bis 6 (maximale, tödliche Verletzung) (6, 8, 9). Der ISS berechnet sich aus der Summe der Quadrate der AIS-Werte der drei am schwersten verletzten Körperregionen (6). Nimmt dabei eine

Körperregion den AIS-Wert von 6 ein, so ergibt sich automatisch ein ISS von 75 Punkten (5).

Wie bereits erwähnt korreliert der ISS zwar mit der Verletzungsschwere und der Mortalität der Patienten, jedoch bildet er nur die schwersten drei Verletzungen aus den verschiedenen Körperregionen ab (6, 10). Dies bildet gut Monotraumata ab, jedoch werden Mehrfachverletzungen einer Körperregion nicht abgebildet, die in ihrer Kombination Einfluss auf die Mortalität haben können (10, 11). Diesen Umstand sollte der New ISS (NISS) lösen, der sich aus der Summe der Quadrate der insgesamt drei höchsten AIS-Werte, unabhängig von der Körperregion berechnet (11). Der Studie von Osler et al. zufolge gibt der NISS die Überlebenswahrscheinlichkeit besser als der ISS wieder und sei zusätzlich leichter zu berechnen (11). Die Überlegenheit des NISS gegenüber des ISS ist jedoch in der Literatur umstritten (12).

Eine neue Definition des Polytraumas erfolgte mit der „Berlin-Definition“ durch eine internationale Konsensusgruppe um Pape et al. im Jahre 2014. So habe der polytraumatisierte Patient mindestens zwei schwere Verletzungen ($\text{AIS} \geq 3$) anatomisch verschiedener Körperregionen und zusätzlich mindestens eine physiologische Pathologie (Koma [$\text{GCS} \leq 8$], Hypotension [$\text{RR}_{\text{sys}} < 90 \text{ mmHg}$], metabolische Azidose [$\text{BE} \leq -6$], Koagulopathie [$\text{PTT} \geq 50 \text{ s}$ oder $\text{INR} \geq 1,4$] und Alter > 70 Jahre) (13).

1.2. Epidemiologie des Traumas und Polytraumas

Die Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA) teilte in einer Pressemitteilung mit, dass im Jahre 2014 in der Bundesrepublik Deutschland ungefähr jeder achte Bürger einen Unfall gehabt habe, von denen rund 30.000 einen tödlichen Ausgang nahmen (14-16). Diese Todesfälle (Verletzungen und bestimmte andere Folgen äußerer Ursachen nach ICD 10 verschlüsselt: S00 - T35 und T66 - T98) stellten anhand der Todesursachenstatistik des Statistischen Bundesamtes mit einem Anteil von ungefähr 4 % der Gesamttodesfälle nur einen kleinen Prozentsatz dar (15). Bei genauerer Betrachtung der Altersklasse von 1 bis 39 Jahren bedingten sie jedoch ungefähr jeden dritten und bei den 15- bis 25-Jährigen sogar jeden zweiten Todesfall (15).

Unfälle und resultierende Traumata zählen somit zu den häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität von Jugendlichen und jungen Erwachsenen (17, 18). In der deutschen, männlichen Bevölkerung unter 65 Jahren sind Unfälle, noch vor den bösartigen Neubildungen und kardiovaskulären Erkrankungen die führende Ursache für den vorzeitigen Verlust von Lebensjahren (19). Bei der weiblichen Bevölkerung steht der Lebenszeitverlust durch den Unfalltod noch an zweiter Stelle nach den bösartigen Neubildungen (19).

Es ist schwierig, eine genaue Angabe über die Lebensbereiche zu treffen, in denen Unfälle sich ereignen, da keine einheitliche Erfassung existiert. Die BAuA veröffentlichte eine Gesamtunfallstatistik, die auf den Erhebungen des Statistischen Bundesamtes, Straßenverkehrsunfallstatistiken, Statistiken der gesetzlichen Unfallversicherungsträger und Datensätze des Robert Koch-Institutes basiert. Demzufolge seien Unfälle in der Freizeit, gefolgt von Unfällen im Haushalt, für die meisten Verletzten und Toten verantwortlich. Der Verkehr steht an dritter Stelle der tödlichen Unfälle, jedoch sind Unfälle auf der Arbeit und in der Schule für mehr Verletzte verantwortlich (16). Dabei ist zu bedenken, dass es viele Überschneidungen der verschiedenen Bereiche gibt, insbesondere im Verkehr, in der Schule und auf der Arbeit. Weiterhin handelt es sich bei einer Vielzahl der Freizeitunfälle, wie z. B. einem Fahrradsturz, um Alleinunfälle im Verkehrsbereich, die häufig nicht registriert werden (16).

Betrachtet man die Verletzungsschwere, so sind Verkehrsunfälle als führende Ursache für mehr als jedes zweite Polytrauma zu nennen. Die größte Gruppe der Betroffenen

bilden PKW- und LKW-Insassen, gefolgt von Zweiradfahrern und Fußgängern. Abseits des Straßenverkehrs führen Stürze aus großer Höhe die Ursachen an (20-23).

Als einer der Ersten beschäftigten sich 1997 Haas et al. mit der Inzidenz des schweren Traumas oder Polytraumas in Deutschland und berechneten eine ungefähre Fallzahl von 32.500 pro Jahr (24). Neuere Hochrechnungen, die auf dem Datensatz von 2012 des TraumaRegister DGU® basieren, kamen auf eine jährliche Anzahl von ca. 18.200 bis 18.400 Polytraumata (25). Dabei ist jedoch zu beachten, dass im TraumaRegister DGU® nur Fälle erfasst werden, in denen Patienten in der Klinik behandelt wurden. Patienten, die bereits präklinisch an den Folgen eines Traumas versterben, was einer Studie unserer Arbeitsgruppe zufolge ca. 60 % sind, finden somit keinen Eingang in das Register (26).

Unfälle, Verletzungen und ihre Folgen sind nicht nur ein nationales Problem, sondern stellen eine globale Belastung für die Gesellschaft dar. Analysen zufolge sei diesbezüglich in den kommenden Jahren noch ein Anstieg zu erwarten (1, 27-29). Besonders der hohe Anteil an Betroffenen im erwerbsfähigen Alter zeigt dabei nicht zu vernachlässigende sozioökonomische Konsequenzen auf.

Betrachtet man die Kosten der stationären Erstbehandlung von polytraumatisierten Patienten, so findet man in der Literatur durchschnittliche Behandlungskosten von ca. 22.000 € bis 38.000 € pro Patient, die jedoch in der Einzelfallbetrachtung starke Abweichungen von den Mittelwerten aufweisen und einen Indikator für die individuelle Anforderung in der Behandlung eines jeden einzelnen Patienten darstellen (30-33).

Die Gesamtlast für die Gesellschaft ergibt sich jedoch nicht nur aus der stationären Behandlung, sondern aus der Summe aller notwendigen Maßnahmen und Folgen wie z. B. Kosten der Nachbehandlung, Pflege, Hilfsmittel, Arbeitsunfähigkeit oder eine Minderung der Erwerbsfähigkeit des Betroffenen, die ein Unfall mit sich führt. Die Bundesanstalt für Straßenwesen (BASt) veröffentlicht jährlich die Personenschadenkosten nach Verkehrsunfällen und unterscheidet dabei nach getöteten, schwerverletzten und leichtverletzten Personen (Getötete: Versterben innerhalb von 30 Tagen an den Unfallfolgen; Schwerverletzte: mindestens 24 Stunden in stationärer Behandlung und nicht zu den Getöteten zugerechnet; Leichtverletzte: alle sonstigen Verletzten). Dabei entstand im Jahr 2015 bei Verkehrsunfällen ein berechneter volkswirtschaftlicher Schaden von 1.191.937 € pro getöteter, 123.510 € pro schwerverletzter und 5.139 € pro leichtverletzter Person. Somit ergab sich in Deutschland

durch Verkehrsunfälle allein in diesem Jahr ein gesamtwirtschaftlicher Personenschaden von insgesamt 14,31 Milliarden Euro (34, 35).

Unfallmechanismen unterscheiden sich zum Teil bedeutend in der Lokalisation und Stärke, mit der sie auf den Verunfallten einwirken. Angeschallte PKW-Insassen unterliegen bei einem Frontalunfall anderen Kraftvektoren, als z. B. eine Person, die bei der Landung, nach einem Sturz oder Sprung aus großer Höhe, axiale Stauchung erfährt. Dadurch bedingen sie verschiedenste Verletzungsmuster bei den Betroffenen (36).

Am häufigsten sind muskuloskelettale Verletzungen, im Speziellen Frakturen, zu beobachten, wobei die Extremitäten am stärksten betroffen sind (22, 23, 37). Weiterhin sind auch Schädel-Hirn- und Thorax-Traumata von großer Bedeutung (22, 23, 37). Durch die Schädigung des Bewegungsapparates, innerer Organe oder Gefäße kommt es bei polytraumatisierten Patienten oft zusätzlich zu Blutungen und konsekutiv zu einem hämorrhagischen Schock (HS), der eine zusätzliche vitale Bedrohung darstellt (38).

Somit stellt die Versorgung von Frakturen eine zentrale Herausforderung in der Unfallchirurgie dar. Optimales Behandlungsziel ist die *Restitutio ad integrum*, die vollständige Ausheilung der Verletzung. Jedoch wird dieses Ziel in zahlreichen Fällen nicht erreicht. Insbesondere bei Verletzungen der Extremitäten haben Störungen des Heilungsprozesses negative Auswirkungen auf das funktionelle Outcome der Patienten. Sie beeinflussen enorm die Lebensqualität durch Bewegungseinschränkungen, Funktionsverluste und Schmerzen (39, 40).

Die Heilung einer Fraktur ist ein Vorgang, der in seiner Komplexität noch nicht vollständig verstanden ist. Er ist ein Zusammenspiel mechanischer Einflüsse, verschiedener Zelltypen und extrazellulärer Matrixbestandteile, die über lokal oder systemisch wirkende Hormone, Zytokine und Differenzierungsfaktoren im Rahmen der posttraumatischen Immunantwort orchestriert werden (41, 42).

1.3. Stand des Wissens

1.3.1. Knochengewebe

Das Knochengewebe bildet zusammen mit Knorpel, Sehnen und Bändern den passiven Bewegungs- und Stützapparat. Es ist, nach dem aus Dentin bestehenden Zahnschmelz, das zweithärteste Gewebe des Organismus (43, 44). Betrachtet man die Zusammensetzung des Knochengewebes, so besteht der größte Teil mit ca. 45 % aus anorganischem Material, wobei Hydroxylapatit die wesentliche Komponente darstellt. Somit ist das Knochengewebe zugleich das wichtigste Calcium- und Phosphatreservoir des Körpers. Den restlichen Anteil bilden mit ungefähr 30 % organisches Material und zu 25 % Wasser (43, 45).

Die räumliche Anordnung der Kollagenfibrillen lassen zwei verschiedene Arten des Knochens unterscheiden. Der Geflechtknochen oder auch primärer Knochen genannt (43, 45) entsteht bei der Osteogenese in der Fetalperiode oder bei der Frakturheilung durch desmale Ossifikation (43). Charakteristisch ist eine ungeordnete, verflochtene Ausrichtung von Osteozyten und Kollagenfasern in der Knochenmatrix (43). Im adulten Skelett existiert Geflechtknochen nur noch in wenigen Bereichen, z. B. in den Schädelnähten, den Gehörknöchelchen oder im Felsenbein (43). Das restliche Skelett durchläuft einen Reifungsprozess, in dem Geflechtknochen sukzessiv in Lamellenknochen oder auch sekundären Knochen umgebaut wird, wodurch eine optimale Anpassung an funktionelle Anforderungen und Belastungen erreicht wird (45). Der Lamellenknochen ist durch eine regelmäßige Anordnung seiner Kollagenfibrillen in der Knochenmatrix charakterisiert. Die Organisation erfolgt in funktionellen Einheiten als Osteon, welches von einem zentralen Havers-Kanal mit darin verlaufendem Havers-Blutgefäß und konzentrischen umschlingenden Knochenlamellen gebildet wird. Die Kollagenfibrillen verlaufen in Schraubentouren und untereinander parallel ausgerichtet durch die Lamellen des Osteons (43, 45).

Knochen des entwickelten Skelettes weisen die verschiedensten Formen auf. So lassen sich unter anderem platte Knochen (z. B. Schulterblatt), unregelmäßig geformte Knochen (z. B. Wirbelkörper), kurze Knochen (z. B. Handwurzelknochen) und die langen Röhrenknochen (z. B. Femur, Tibia) unterscheiden (46). Die langen Röhrenknochen bestehen aus dem Schaft, der Diaphyse, die sich proximal und distal in die Metaphyse verbreitert. Strukturell betrachtet besteht die Diaphyse hauptsächlich aus Substantia compacta, in welcher die Knochenlamellen sehr dicht gepackt sind. Sie umgibt die

Markhöhle, welche überwiegend gelbes Knochenmark enthält. An die Metaphysen grenzen die Epiphysen, die die knorpeligen Gelenkflächen tragen. Die Epiphysen haben ebenfalls eine umgebende Schicht aus Substantia compacta, und sind im Inneren aus schwammartig angeordneten Knochen trabekeln, der Substantia spongiosa, aufgebaut. In den Hohlräumen der Spongiosa konzentriert sich im adulten Skelett der Sitz des roten Knochenmarks (45, 46). Die Trabekel haben eine trajektorielle Ausrichtung. Die Ausrichtung entlang mechanischer Kräfte und Belastungen wurde erstmals von Julius Wolff beschrieben und trägt heute den Namen Wolffsches Gesetz (47). Zwischen Metaphyse und Epiphyse befindet sich die Epiphysenfuge, die postnatal aus Knorpel besteht und den Ort des Längenwachstums darstellt. Mit dem Ende der Pubertät verknöchert diese, womit das Längenwachstum abgeschlossen ist (45, 46).

Die äußeren und inneren Oberflächen des Knochens sind durch dünne Gewebeschichten, dem Endost und Periost, ausgekleidet und bedeckt (45). Die Zellen des Knochengewebes sind die Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten.

1.3.2. Knochenstoffwechsel

Der Knochen ist ein dynamisches und metabolisch aktives Gewebe. Es unterliegt ständigen Umbauprozessen. Schätzungsweise werden jährlich ca. 10% des Skelettes erneuert (48). Dieser Prozess, in dem die Osteoblasten und Osteoklasten als Gegenspieler fungieren, wird auch als Remodeling bezeichnet. Ohne kontinuierlichen Umbau und Erneuerung könnte das Skelettsystem seine Funktionen nicht erfüllen oder würde durch eine schnelle Überalterung besonders den mechanischen Anforderungen nicht mehr gerecht werden. So ist das Remodeling substantiell für die Reparatur von Mikrofrakturen, als auch für den Anpassungsprozess, der durch das Wolffsche Gesetz beschrieben wird (47). Weiterhin gewährleistet er die Funktion des Skelettsystems als größtes Mineralreservoir für Calcium, Phosphat und Magnesium sowie deren Homöostase (49, 50). Grundlegend ist der Abbau von altem Knochenmaterial und die Neubildung von neuem, vitalem Knochengewebe durch das koordinierte Zusammenspiel der Osteoklasten und Osteoblasten.

Osteoklasten sind mehrkernige Riesenzellen, die der Fusion von Zellen aus der Monozyten- und Makrophagenfamilie entstammen (51). Eine wichtige Funktion in der Differenzierung der Osteoklasten nimmt der Makrophagenkolonie-stimulierende-Faktor (M-CSF) ein, welcher von Stromazellen des Knochenmarks und Osteoblasten sezerniert wird (52). Er fördert die Proliferation und das Überleben von osteoklastären

Vorläuferzellen und stimuliert weiterhin die Aktivität der reifen Osteoklasten (52-55). Die Schlüsselrolle in der Differenzierung von Osteoklastenvorläufern zu reifen Osteoklasten nehmen der Rezeptor RANK (Receptor Activator of NF- κ B), sein Ligand RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) und OPG (Osteoprotegrin) ein. RANK ist ein Transmembranprotein sowohl auf Osteoklasten, als auch auf deren Vorläuferzellen, welches nach dem Binden von RANKL die Differenzierung induziert (55). OPG ist ein löslicher Decoy-Rezeptor für RANKL und konkurriert mit RANK um dessen Bindung und ist somit ein Inhibitor für die RANK/RANKL-Interaktion (55). Das Verhältnis zwischen RANK, RANKL und OPG ist folglich essentiell für die Skeletthomöostase (56). Die aktivierten Osteoklasten lagern sich an die Knochenoberfläche an. Sie formen in der Grenzregion zum Knochengewebe eine stark gefaltete Plasmamembran (ruffled boarder), die der Oberflächenvergrößerung und der Schaffung eines abgeschlossenen Milieus dienen (57). In diesem abgeschlossenen Bereich sezernieren sie Chlorwasserstoff (HCl) und Cathepsin K (57). HCl führt zur Verminderung des pH-Wertes und einer Demineralisierung des anorganischen Teils der Knochenmatrix, so dass der organische Anteil exponiert wird und durch Cathepsin K abgebaut werden kann (57). Die Osteoblasten übernehmen im Remodeling-Prozess den knochenaufbauenden Part. Sie entstehen, wie viele andere Zellen des Bindegewebes, aus mesenchymalen Stammzellen (MSCs) (58). Bei der Differenzierung der MSCs zu Osteoblasten nehmen die Transkriptionsfaktoren RUNX2 (Runt-related transcription factor 2) und Osx (Osterix) Schlüsselpositionen ein (59). Reife Osteoblasten sezernieren im aktiven Zustand unter anderem Proteine der organischen Knochenmatrix, auch Osteoid genannt (Kollagen I als Hauptbestandteil) und steuern - über die Abgabe von Calcium und Phosphat beladenen Vesikeln - die Mineralisierung der Matrix (60). Nach abgeschlossener Knochenbildung können Osteoblasten verschiedene Richtungen einschlagen. Zum einen können sie apoptotisch werden oder in einen inaktiven Zustand übergehen und sich als Saumzellen (bone lining cells) im Periost und Endost aufreihen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass sie während des knochenaufbauenden Prozesses in der Matrix eingemauert werden und dort eine Transformation von Osteoblasten zu Osteozyten vollziehen (61). Die Organisation des Remodelings findet in BMUs (basic multicellular units) statt, die kleine, kegelförmige Umbauregionen im Knochen beschreiben, die Osteoklasten durch den Abbau von Knochen durch das Knochengewebe vorantreiben und nachfolgende Osteoblasten mit neugebildeter Matrix füllen (62).

1.3.3. Frakturheilung

Die Heilung einer Fraktur ist eine bemerkenswerte und komplexe Fähigkeit des Organismus, die ihn in die Lage versetzt, geschädigtes Knochengewebe ohne die Bildung von Narben zu reparieren und die Knochenstruktur wieder so herzustellen, dass sie mit der Ausgangssituation vergleichbar ist (63). Die Frakturheilung kann auf zwei verschiedene Arten ablaufen.

Bei der **primären Frakturheilung** kommt es zu einem Zusammenwachsen der Frakturrenden ohne die Ausbildung eines sichtbaren Knochenkallus. Sie kann nur bei direktem Kontakt der Frakturrenden ablaufen.

Die **sekundäre Frakturheilung** ist ein mehrphasiger Prozess, bei dem ein bestehender Frakturspalt durch ein, initial knorpeliges Kallusgewebe, welches im weiteren Verlauf mineralisiert, überbaut wird (63).

Eine primäre Frakturheilung ist in der Regel das angestrebte Ziel einer offenen Reposition und Osteosynthese in der modernen Unfallchirurgie. Sie erfordert eine anatomisch korrekte, spaltlose Reposition ($< 1 \text{ mm}$) der Frakturrenden und deren stabile Fixierung (interfragmentäre Zugschraube, dynamische Kompressionsplatten, dynamische Verriegelung einer Marknagelosteosynthese) (64). Die sekundäre Frakturheilung ist klinisch am häufigsten zu beobachten und kann als natürlicher Prozess der Knochenheilung betrachtet werden. Sie läuft immer dann ab, wenn z. B. keine anatomisch perfekte Reposition der Frakturrenden stattgefunden hat, ein zu großer Defekt vorliegt oder die Fixierung der Frakturrenden nicht absolut starr erfolgt ist und somit Bewegung zwischen ihnen möglich ist (65). Im Rahmen der Weiterentwicklung der Unfallchirurgie, mit Verständnis der Bedeutung des Weichteiltraumas, werden multifragmentäre, extraartikuläre Frakturen heute minimal-invasiv operativ stabilisiert (66). Dabei werden die Frakturrenden in Achse, Länge und Rotation ohne anatomische Reposition der Einzelfragmente mittels Platten oder Nägeln stabilisiert.

Die sekundäre Frakturheilung läuft in unterschiedlichen Phasen ab. In der Literatur finden sich Einteilungen in drei bis fünf verschiedene Phasen (63, 67, 68), die fließend ineinander übergehen und zum Teil simultan ablaufen. Wichtige Eckpunkte sind dabei:

- Initiales Trauma
- Frakturhämatombildung und inflammatorische Phase
- Bildung eines weichen Kallus durch Grannulationsprozesse mit Angio- und Chondrogenese
- Umbau zum harten Kallus durch Mineralisierungs-, Resorptions- und

Ossifikationsprozesse

- Remodeling.

Marsell et al. und Sfeir et al. behandeln in ihren Übersichtsarbeiten (65, 68) die dabei grundlegenden Mechanismen und Vorgänge. So steht am Anfang der Frakturheilung das initiale Trauma, bei dem das Knochengewebe und die umliegenden Weichteilstrukturen geschädigt werden (65, 68). Durch die Verletzung von Blutgefäßen kommt es zu Einblutungen in den Frakturspalt, den Markraum, zwischen Knochen und Periost und in das umliegende Weichteilgewebe. Das Blut im Bereich der Fraktur gerinnt durch die aktivierte Gerinnungskaskade und formiert sich zu einem fibrinreichen Frakturhämatom, in welchem sich zahlreiche Zellen aus dem peripheren Blut und dem Knochenmark befinden (65, 68, 69). In ihrer Gesamtheit bilden sie die Grundlage für die weitere Kallusbildung. Weiterhin immigrieren Immunzellen (u. a. Makrophagen, Lymphozyten und Monozyten), die über die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (z. B. Tumornekrosefaktor- α [TNF- α], IL-1, IL-6 und IL-11) eine inflammatorische Reaktion, die Differenzierung von Fibroblasten, Chondroblasten und Osteoblasten aus MSCs sowie die Angiogenese initiieren (65, 68, 69). Der inflammatorische Prozess im Bereich des frakturierten Knochens und umgebenden Weichteilgewebes geht zusätzlich mit den bekannten Kardinalsymptomen einer Entzündung einher, von denen besonders Schwellung und Schmerzen zu einer Einschränkung und Verminderung der Beweglichkeit führen und eine erste Stabilisierung der Fraktur bewirken (68).

Im weiteren Verlauf erfolgt der Abbau von geschädigtem, nekrotischen Knochen- und umgebenden Weichteilgewebe durch Osteoklasten und Makrophagen. Differenzierte Fibroblasten und Chondroblasten sezernieren Kollagene (65, 68). Mit fortschreitender Angiogenese erfolgt, von den Frakturändern ausgehend, die Ausbildung eines feinen Kapillarnetzes (65, 68). Durch diese kontinuierlichen Prozesse findet ein Umbau des Frakturhämatoms in einen weichen Kallus, bestehend aus gut vaskularisiertem, kollagenreichem Granulationsgewebe, statt (65, 68). Die Osteogenese läuft auf zwei verschiedenen Wegen ab. Im Bereich der gut vaskularisierten Frakturrenden erfolgt die Ossifikation auf dem desmalen Weg (65). Osteoblasten, die aus MSCs differenzieren, sezernieren vom Frakturrand ausgehend neues Osteoid, welches im weiteren Verlauf mineralisiert (65). In den peripher gelegenen Bereichen des Kallus, die erst später vaskularisiert werden und aus mechanischer Sicht mehr Bewegung aufweisen, beschreitet die Ossifikation den chondralen Weg (65). In einem ersten Schritt wird der

Frakturspalt durch knorpeliges Gewebe durchbaut und stabilisiert, bis es in einem zweiten Schritt durch einwachsende Kapillaren und folgenden Geflechtknochen ersetzt wird (65).

Als abschließender Schritt findet der Remodelingprozess statt. Der gebildete harte Kallus aus Geflechtknochen stellt eine stabile Überbauung des Frakturspalts dar, jedoch entsprechen seine biomechanischen Eigenschaften nicht denen des ursprünglichen, lamellären Knochens (65, 68). Bei dem am längsten dauernden Schritt der Heilung resorbieren Osteoklasten den Geflechtknochen und nachfolgende Osteoblasten bilden neuen Lamellenknochen, bis die Knochenarchitektur der Ausgangssituation ähnelt (65, 68).

1.3.4. Posttraumatische, systemische Immunantwort

Traumata können nicht nur zu einer lokalen Reaktion führen, sondern mit zunehmender Verletzungsschwere zusätzlich systemische immunologische Reaktionen hervorrufen. Bei überschießenden Immunantworten des Organismus kann sich dieses klinisch als systemisches inflammatorisches Response-Syndrom (SIRS) manifestieren, welches bis hin zum Multiorganversagen (MOV) eskalieren kann (70-72).

Das initiale Trauma führt zu einer Schädigung von Gewebe und Zellen, wodurch es zu einer Freisetzung von Biomolekülen wie z. B. Hitzeschockproteinen, Matrix-, Membran-, RNA- und DNA-Bestandteilen (73), den DAMPs (Damage-associated molecular patterns) kommt, die dem Immunsystem unter physiologischen Bedingungen nicht exponiert sind (71). Über Pattern Recognition Receptors (PRRs) aktivieren sie die humoralen und zellulären Komponenten des angeborenen Immunsystems, was über verschiedenste Signalkaskaden zu einer Freisetzung proinflammatorischer (TNF- α , IL-1b, -6, -8) und antiinflammatorischer Zytokine (IL-4, -6 -10, -13 und Transforming Growth Factor- β [TGF- β]) führt (72, 74). Besonders IL-6 sticht dabei mit pro-, als auch antiinflammatorischen Charakteristika hervor (74).

Hinzu kommt, dass besonders das schwere Trauma häufig mit einem HS vergesellschaftet ist (38). Über das Zusammenspiel verschiedener Faktoren wie die Hämorrhagie, freigesetzte Stresshormone (Kortisol, Katecholamine) und Zytokine kann es zu einer Beeinflussung der Hämodynamik, besonders der Mikrozirkulation kommen, die in einem Ischämie-/Reperfusionsschaden resultieren können (70). Dabei ist das Ausmaß des Reperfusionsschadens, dem multifaktorielle Pathomechanismen zugrunde liegen, im Wesentlichen abhängig von der Dauer und der Ausdehnung der

vorhergehenden Ischämie (75). Als wesentliche Pathomechanismen seien dabei zum einen der Energiemangel und die konsekutive Laktatakkumulation durch anaerobe Glycolyse genannt sowie die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen durch gewebs- und endothelständige Mastzellen und Makrophagen. Weiterhin kommt es zur Immigration und endothelialen Adhäsion von u. a. neutrophilen Granulozyten, die reaktive Sauerstoffspezies und weitere Zytokine freisetzen und somit zu einer Inflammation und Schädigung des Endothels und der Endorgane führen (75). Auf diesem Wege kommt es zu einer weiteren Freisetzung von DAMPs, die eine exponentiell gesteigerte, überschießende, systemische Zytokinfreisetzung induzieren, was sich klinisch im SIRS manifestiert und bei Persistenz zu MOV führen kann (75, 76).

IL-6 und sein löslicher Rezeptor (sIL-6R) spielen bei der posttraumatischen Immunantwort eine zentrale Rolle (77). Über seine vielfältigen Signalwege (siehe 1.3.5) hat es Einfluss auf Zellen der unspezifischen sowie der spezifischen Immunabwehr und ist somit bei der Verbindung des angeborenen und adaptiven Immunsystems beteiligt (74, 78). So konnte gezeigt werden, dass erst das Zusammenspiel von IL-6 und sIL-6R den Übergang der frühen Infiltration von neutrophilen Granulozyten hin zu mononukleären Zellen orchestriert (79).

In verschiedenen Studien zeigten sich u. a. die Korrelationen zwischen dem IL-6-Serumspiegel und der Gesamtverletzungsschwere, der Ausdehnung von operativen Maßnahmen, dem Auftreten von MOV und der Prognose der Patienten, was die Bedeutung des IL-6-Systems weiter unterstreicht (80-82).

1.3.5. Interleukin-6, Interleukin-6-Rezeptoren und Transsignaling

IL-6 ist mit seinen membrangebundenen, als auch löslichen Rezeptoren ein wichtiger Mediator der posttraumatischen Immunantwort. Unter physiologischen Bedingungen produzieren Lymphozyten, Adipozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen IL-6 und halten einen Basalwert im Plasma aufrecht. Durch z. B. Infektionen, Tumor- und chronisch entzündliche Erkrankungen kann die IL-6 Freisetzung und dessen Plasmaspiegel um ein Vielfaches ansteigen (83). Weiterhin konnten wir während der Etablierung unseres Polytrauma-Mausmodells den HS als Induktor für IL-6 nachweisen (84).

Strukturell ist IL-6 ein aus 184 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, welches in vier α -Helices angeordnet ist (85). Es kann als Ligand zum einen am membranständigen

Interleukin-6-Rezeptor (IL-6-R), als auch am löslichen Interleukin-6-Rezeptor (sIL-6R) binden (86).

Der klassische Signalweg erfolgt über den membrangebundenen Rezeptorkomplex, der aus zwei wesentlichen Untereinheiten besteht (86). Zum einen aus dem IL-6-R (auch IL-6-R α , gp80), der nicht signaltransduzierend ist und dem signaltransduzierenden, transmembranären Glycoprotein 130 (gp130, auch IL-6R β) (86, 87). IL-6 und der spezifische IL-6R (IL-6R α) binden und bilden den IL-6/IL-6R-Komplex, welcher die Dimerisation des assoziierten gp130 initiiert und über eine Aktivierung des JAK-STAT-Signalweges, als auch des MAP-Kinase-Weges die Expression intrazellulärer Gene stimuliert (86-88). Der klassische IL-6-Signalweg ist vom membrangebundenen IL-6R abhängig, der jedoch hauptsächlich auf Monozyten, Makrophagen, Hepatozyten und vereinzelt auf Lymphozyten exprimiert wird. IL-6 vermittelt über diesen Weg überwiegend regulatorische und antiinflammatorische Effekte (88).

Über einen alternativen IL-6-Signalweg, den sogenannten Transsignaling-Mechanismus, können auch Zellen durch IL-6 stimuliert werden, die auf ihrer Membran keinen IL-6R exprimieren (88, 89). Die Signaltransduktion erfolgt beim Transsignaling ebenfalls über das Transmembranprotein gp130. Gp130 ist nicht nur eine Rezeptoruntereinheit für den membrangebundenen IL-6R, sondern auch Bestandteil weiterer Rezeptoren wie u. a. für IL-11, IL-27, CLC (cardiotrophin like cytokine) und LIF (leukemia inhibitory factor) (88). Im Gegensatz zum membrangebundenen IL-6R, der wie bereits beschrieben nur auf einigen Zellen exprimiert wird, ist gp130 hingegen ubiquitär und in höherer Dichte auf den Zellen vorhanden (88). Beim Transsignaling bindet IL-6 am agonistisch wirkenden sIL-6R, der eine ähnliche Affinität zu IL-6 aufweist, wie der membrangebundene Rezeptor. IL-6, sowie sIL-6R haben allein keine Affinität zu gp130. Bilden sie jedoch den sIL-6R/IL-6-Komplex, so kann dieser an gp130 binden (88). Der Transsignaling-Mechanismus hat aufgrund der höheren Dichte an gp130, welches zusätzlich auf allen Zellen lokalisiert ist, eine höhere Signalamplitude zur Folge, als der klassische Signalweg und vermittelt hauptsächlich proinflammatorische Effekte (88).

Die Bildung und Freisetzung des sIL-6R kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Zum einen über Shedding, der proteolytischen Abspaltung des α -Rezeptors vom membranständigen IL-6R mittels ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) oder durch alternatives Splicing der IL-6R-mRNA (88). Wir konnten bereits zeigen, dass auch der HS ein Induktor für den sIL-6R darstellt (84).

In einer früheren Studie unserer Arbeitsgruppe wurde die Transsignaling-Ratio (TSR) etabliert, die sich mittels der Quotienten aus den Blutkonzentrationen von IL-6 und sIL-6R errechnet (77). Dabei gilt die Annahme, dass die Höhe der TSR ein Maß für die agonistische, proinflammatorische Aktivität des Transsignalings darstellt. Durch vermehrtes Transsignaling kommt es zu einer Abnahme des sIL-6R, da dieser im Zuge der Komplexbildung mit IL-6 (IL-6/sIL-6R-Komplex) und der anschließenden Bindung an gp130 verbraucht wird. Eine erhöhte TSR korrelierte mit dem Auftreten von Organversagen, SIRS und einem schlechteren Outcome der Patienten (77).

1.3.6. Einfluss von Interleukin-6 auf die Frakturheilung

Sowohl auf lokaler als auch auf systemischer Ebene scheint das Gleichgewicht von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen einen entscheidenden Einfluss auf den Knochenheilungsprozess zu haben.

So wurde gezeigt, dass IL-6 einen beschleunigenden Effekt auf die Kallusbildung sowie die Knochenheilung selbst hat (90). Im Umkehrschluss zeigten IL-6-depletierte Mäuse eine reduzierte Kallusbildung und eine vermehrte Knochenresorption (91). Diese Effekte unterstreichen die zentrale Rolle des IL-6-Systems auf die Frakturheilung.

Hingegen ist der genaue Einfluss eines HS auf das posttraumatische Immunprofil und folglich auch auf die Frakturheilung noch nicht geklärt. Es ist bekannt, dass es Interaktionen zwischen HS und der Frakturheilung gibt und sie einen prognostischen Einfluss auf die individuelle Heilung zu haben scheinen. Obwohl klinische Studien eine verzögerte Knochenheilung bei Polytraumata zeigten, wird der Einfluss eines HS auf individuelle Heilungsvorgänge kontrovers diskutiert. Studien zeigen bei polytraumatisierten Patienten mit HS sowohl eine verminderte (90, 92, 93), als auch eine verbesserte (94, 95) Frakturheilung.

Bumann et al. zeigten eine verbesserte Frakturheilung bei Ratten mit induziertem HS gegenüber der Vergleichsgruppe mit isolierter Fraktur (94). Lucas et al. untersuchten gleichfalls den Einfluss eines HS an Ratten und beschrieben eine systemische osteogenetische Antwort, die sich in gesteigerter Mineralapposition der Spongiosa, erhöhten Osteoblastenzahlen und ebenso erhöhtem Serumlevel an osteogenem Wachstumspeptid zeigte (95). Eine Untersuchung an Schafen mit Tibiafraktur und HS erbrachte keine Einflüsse auf die mechanische Stabilität, die Knochenbildung oder das Kallusremodeling (96). Neunaber et al. induzierten bei Mäusen einen HS, isolierten anschließend Osteoprogenitorzellen aus dem Knochenmark und differenzierten diese in

vitro zu Osteoblasten und Osteoklasten (97). Es wurden nur eine geringe Beeinflussung der Osteoblastendifferenzierung und Mineralisationskapazität, jedoch eine verringerte Alpl-Genexpression beobachtet, woraus ein Einfluss des HS auf die Mineralisierungskapazität zu schlussfolgern sei (97). Weiterhin zeigte sich nach dem HS eine deutlich verzögerte Osteoklastendifferenzierung in der Zellkultur, welche in vivo theoretisch zu einer verminderten Resorption an nekrotischem Knochen führe. Die verzögerte Differenzierung sei auf den Einfluss von RANKL/OPG zurückzuführen, für welche noch in Vivo verminderte (RANKL) sowie erhöhte (OPG) Serumspiegel gemessen wurden (97). Wichmann et al. fanden bei Untersuchungen am murinen Sepsis- und Schockmodell verminderte Osteocalcin-Plasmaspiegel und eine erhöhte Anzahl an Osteozytennekrosen, was zu verzögerter oder erschwerter Frakturheilung führte (90, 92). Andermahr et al. verglichen polytraumatisierte Patienten mit und ohne Schädel-Hirn-Trauma (SHT) (93). Sie fanden bei den polytraumatisierten Patienten mit SHT einen verminderten Kollagenabbau, der gegenüber der Patientengruppe ohne SHT eine verstärkte Osteogenese zur Folge hatte (93). Die Arbeitsgruppe um Recknagel et al. induzierte bei Ratten eine starke posttraumatische Immunantwort mittels eines stumpfen Thoraxtraumas und untersuchte die Frakturheilung im Vergleich zu Versuchstieren mit einer isolierten Fraktur. In der Gruppe mit stumpfen Thoraxtrauma kam es zu einer verschlechterten Frakturheilung mit vermindertem Kallusvolumen und einer verringerten Biegefestigkeit gegenüber der Kontrollgruppe (98).

Angesichts der Kontroverse in der Literatur und anhand klinischer Erfahrungen ist ersichtlich, dass der Effekt des Polytraumas und des Transsignaling auf die Frakturheilung nicht abschließend geklärt ist. Zur Untersuchung dieses Sachverhaltes etablierten wir ein neuartiges Langzeitüberlebens-Mono-/ Polytrauma-Mausmodell, das die klinisch relevanten Verletzungsmuster imitiert (84). Das Mausmodell kombiniert einen HS mit einer Femur- und Tibiafraktur, um systematisch den Einfluss des HS und des Transsignaling-Mechanismus auf die Frakturheilung zu untersuchen.

1.4. Fragestellung

Im Rahmen dieser Dissertation stellen wir uns folgende Fragen:

- I. Gibt es Unterschiede der Frakturheilung zwischen Mono- und Polytrauma?
- II. Welchen Einfluss hat der Transsignaling-Mechanismus auf die Frakturheilung beim Monotrauma?
- III. Welchen Einfluss hat der Transsignaling-Mechanismus auf die Frakturheilung beim Polytrauma?
- IV. Gibt es Unterschiede der Frakturheilung bezüglich des Transsignaling-Mechanismus im Mono- und Polytrauma?
- V. Welchen Einfluss hat die Modulation des Transsignaling-Mechanismus auf die Aktivität der Osteoklasten und Osteoblasten?

2. Material und Methoden

2.1. Studiendesign

In dieser tierexperimentellen Studie untersuchten wir den Einfluss von IL-6 und des IL-6-Transsignaling-Mechanismus auf die Frakturheilung im Mono-/ Polytrauma-Mausmodell. Die Studie wurde nach den internationalen Regularien für Tierexperimente durchgeführt und durch die zuständige Tierschutzbehörde genehmigt (Landesamt für Gesundheit und Soziales, Landesbehörde des öffentlichen Gesundheitsdienstes in Berlin, [LAGeSo, Nr. G 0274/10]).

In der hier vorliegenden Promotion handelt es sich um ein Teilprojekt des Projektes „TiREX“ der AG Polytrauma (Abb. 1). Die Versuche wurden am Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration der Charité durchgeführt. Insgesamt wurden in diesem Teilprojekt 36 Versuchsmäuse in die Studie eingeschlossen. Die Operationen an den Mäusen fanden zwischen Januar 2011 und Januar 2014 statt.

Zur Untersuchung des Einflusses von IL-6 und des Transsignaling-Mechanismus auf die Frakturheilung wurde den Versuchstieren in Narkose operativ ein standardisiertes Mono- bzw. Polytrauma induziert (84). Das IL-6-System wurde mittels der Gabe von IL-6R bzw. durch die Gabe von IL-6R-Ak modelliert. Nach anschließender 21-tägiger Heilungsphase erfolgte die Finalisierung der Versuchstiere und die anschließende Analyse der abgelaufenen Frakturheilung mittels μ CT und histologischer Aufarbeitungen.

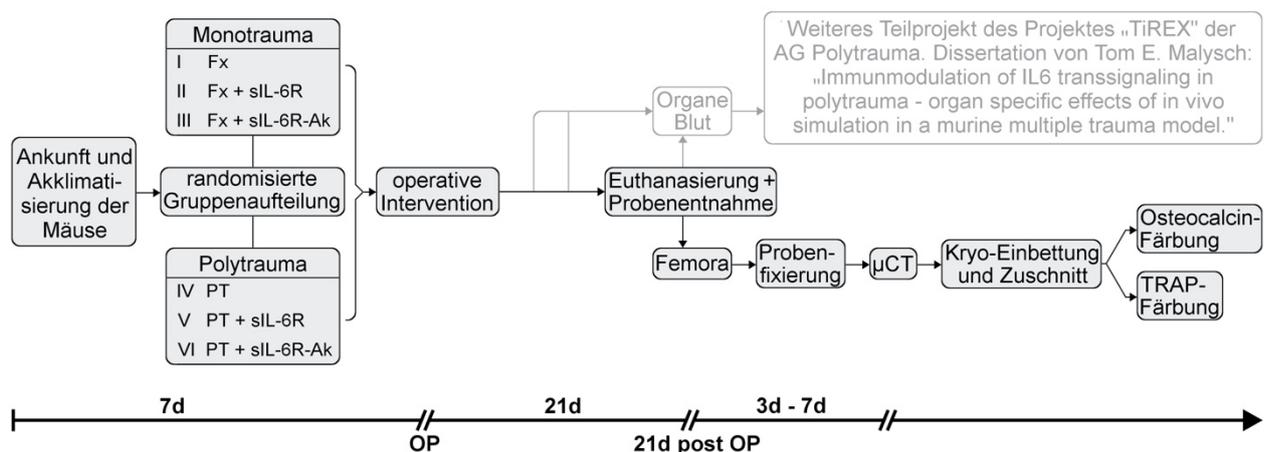


Abb. 1: Schematischer Ablauf der hier vorliegenden Arbeit im Rahmen des Projektes „TiREX“ der AG Polytrauma.

2.2. Versuchstiere und Gruppenverteilung

Es wurden weibliche, 12 bis 14 Wochen alte C57BL/6N Mäuse (Charles River Laboratories) verwendet. Die Mäuse wurden bei 22 ± 2 °C Raumtemperatur und einem 12 h Licht/ Tag Zyklus in Macrolan-Käfigen gehalten. Die Fütterung erfolgte mittels konventionellem Maus-Pellet-Futter und Wasser ad libitum. Nach einer einwöchigen Akklimatisierungsphase erfolgte die randomisierte Verteilung von 36 Versuchstieren auf 6 Gruppen mit jeweils 6 Tieren:

- I. Fraktur (Fx; Femur- und Tibiafraktur)
- II. Fx + sIL-6R-Applikation (10 µg intraperitoneal, recombinant mouse IL-6R α , R&D Systems, Minneapolis, USA)
- III. Fx + sIL-6R-Ak-Applikation (100 µg intraperitoneal, LEAFTM Purified anti-mouse CD126 antibody IL6-R α chain, BioLegend, San Diego, USA)
- IV. Polytrauma (PT; Fx + HS)
- V. PT + sIL-6R-Applikation (10 µg intraperitoneal, recombinant mouse IL-6R α , R&D Systems, Minneapolis, USA)
- VI. PT + sIL-6R-Ak-Applikation (100 µg intraperitoneal, LEAFTM Purified anti-mouse CD126 antibody IL6-R α chain, BioLegend, San Diego, USA)

Die Gruppen I - III repräsentieren das **Monotrauma**, welches in Form einer Kettenverletzung durch eine Femur- und Tibiafraktur simuliert wurde. In Versuchsgruppe I wurde zusätzlich zum Monotrauma kein weiterer Einfluss auf die posttraumatische Immunantwort vorgenommen. In Gruppe II wurde durch die i.p. Applikation von sIL-6R eine zusätzliche Steigerung der posttraumatischen Immunantwort über den Transsignaling-Mechanismus induziert. Gruppe III erfuhr durch die Applikation von sIL-6R-Ak eine Blockierung des Transsignaling-Mechanismus.

Die Gruppen IV - VI repräsentieren das **Polytrauma**, welches durch die Kombination der Kettenverletzung mit einem zusätzlichen HS simuliert wurde. Die Gruppenverteilung erfolgte beim Polytrauma analog zum Monotrauma. Versuchsgruppe IV erhielt in diesem Falle neben der Polytraumatisierung keine zusätzliche Alteration des Transsignaling-Mechanismus. Gruppe V erfuhr wiederum eine Stimulierung des Transsignaling-Mechanismus durch die i.p. sIL-6R-Gabe. In Gruppe VI erfolgte eine Blockierung des Transsignaling-Mechanismus via einer i.p. sIL-6R-Ak-Applikation.

2.3. Operative Intervention und Probengewinnung

2.3.1. Anästhesie und Monitoring

Die operative Intervention wurde unter einer Isoflurannarkose ([Isofluran Baxter International, Deerfield, Illinois, USA] 1,6 Vol.-%; N₂O: 0.3 L/min, O₂: 1.8 L/min), bei Spontanatmung der Versuchstiere durchgeführt. Die Zufuhr des Narkosegasgemisches erfolgte über eine maßangefertigte Maske (einschließlich eines Abluftsystems für die Ausatemluft und des überschüssigen Narkosegasgemisches), die mit einem Verdampfer verbunden war. Weiterhin wurden die Mäuse gewogen und erhielten eine gewichtsadaptierte, subkutane Injektion mit Buprenorphin (Temgesic[®], Essex Pharma GmbH, München, Deutschland) 0,03 mg/kg, sowie zur perioperativen antimikrobiellen Prophylaxe eine einmalige subkutane Clindamycininjektion mit 8 mg/kg (Clindamycin-ratiopharm[®], Ratiopharm, Ulm, Deutschland) verabreicht. Die Überwachung der korrekten Narkosetiefe wurde über die Messung der Herz- und Atemfrequenz und einer entsprechenden Anpassung des Narkosegasflusses gewährleistet. Zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur erfolgte eine Lagerung der Mäuse in Rückenlage auf einer regulierbaren Wärmeplatte. Die Messung der Körpertemperatur (Ziel 37,0 ± 0,5 °C) geschah über einen rektalen Messfühler und einer entsprechenden Anpassung der Wärmeplatte. Die EKG-Ableitung erfolgte über Nadelelektroden (ADInstruments, Dunedin, Neuseeland), die mit beiden Vorderbeinen und dem linken Hinterbein verbunden wurden. Eine invasive Blutdruckmessung erfolgte über die Kanülierung der rechten A. carotis communis (unter Verwendung von ADInstruments Power Lab 4/30, Animal Bio Amp ECG, Bridge Amp, Memscap SD844 physiological pressure transducer und LabChart 7 Software; ADInstruments, Dunedin, Neuseeland). Für die postoperative Analgesie wurden in den ersten drei Tagen 25 mg/L Tramadol (Tramal[®], Grünenthal, Aachen, Deutschland) zum Trinkwasser hinzugefügt.

2.3.2. Einleitung und Kontrolle des hämorrhagischen Schocks

Die Simulation des HS erfolgte aus einer Kombination der Methoden von Wichmann und Vollmar (92, 99). Nach der Einleitung der Narkose wurde die Maus in Rückenlage, für die mikrochirurgische Präparation, positioniert (Abb.2, links). Ein PE10 Polyethylenschlauch (Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,61 mm; Schubert Medizinprodukte GmbH & Ca. KG, Wackersdorf, Deutschland) wurde in die rechte A. carotis communis mikrochirurgische via Arteriotomie eingelegt (Abb. 2, rechts), um den arteriellen Blutdruck

zu messen (physiological pressure transducer, ADInstruments, Dunedin, Neuseeland). Die korrekte Narkosetiefe wurde via Blutgasanalyse der kanülierten Arterie (Na-Heparin Hämatokrit-Kapillare 60 µl; Hirschmann®, Neckartenzlingen, Deutschland; ABL800 Flex, Radiometer®, Krefeld, Deutschland) verifiziert. Anschließend erfolgte die Einleitung des HS. Über einen Zeitraum von 10 min wurde arterielles Blut abgezogen, bis ein mittlerer arterieller Blutdruck von 35 - 40 mmHg erreicht war. Dieser mittlere arterielle Blutdruck wurde für einen Zeitraum von 1 h aufrechterhalten und über eine weitere Blutentnahme, bzw. über die Gabe von Ringer-Lösung (B. Braun Melsungen AG; Melsungen, Deutschland) im Zielbereich gehalten. Um in der Phase des HS die ausreichende Atmung und Oxygenierung sicherzustellen, fanden regelmäßige Blutgasanalysen zur Kontrolle der O₂- und CO₂-Partialdrücke, sowie Messungen von Hämoglobin (Hb) und Hämatokrit (Hct) statt. Der Schockzustand wurde über die standardisierte Dauer von 20 min durch die Infusion der 1,5-fachen Menge Ringer-Lösung des zuvor abgenommenen Blutvolumens beendet. Nach anschließender Entfernung des Katheters aus der rechten A. carotis communis, der Ligatur der Arterie und Hautnaht mittels Prolene^W 5.0 (Ethicon) wurde das Versuchstier - in Vorbereitung auf die Osteotomie des Femurs und die geschlossene Tibiafraktur - in Rechtsseitenlage gedreht.

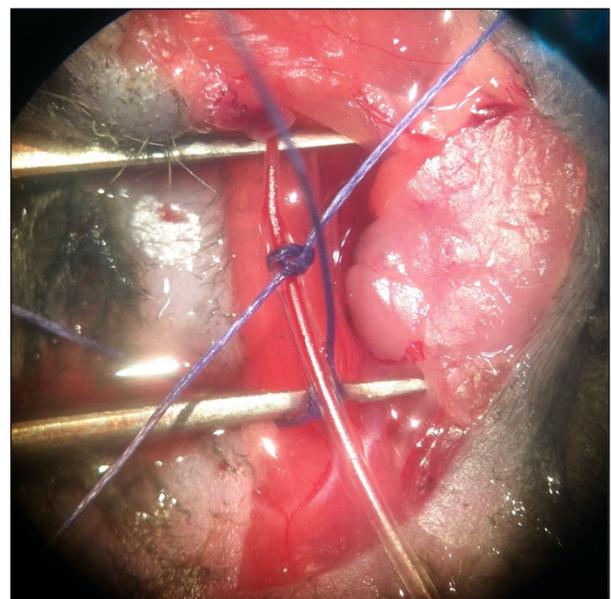


Abb. 2: Links: Versuchsaufbau mit narkotisiertem Maus, anliegenden EKG-Elektroden und invasiver Blutdruckmessung. Rechts: Detailaufnahme durch ein Auflichtmikroskop: rechte A. carotis communis mit einliegendem Polyethylenschlauch.

2.3.3. Induktion der Femur- und Tibiafraktur

Die Durchführung der Femur- und Tibiafraktur folgten nacheinander. Begonnen wurde mit der Femurosteotomie, gefolgt von der externen Fixation (Abb. 3, links). Anschließend wurde mittels 3-Punkt-Biegetechnik eine geschlossene Tibiafraktur induziert (Abb. 3, rechts).

Für die Osteotomie des rechten Femurs wurde der ipsilaterale Oberschenkel rasiert und mit Povidon-Iod (Braunol®; B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Der chirurgische Zugang erfolgte über eine laterale Hautinzision im Bereich zwischen den Flexoren und Extensoren. Es erfolgte die weitere stumpfe Präparation entlang der Muskelsepten bis zur Identifizierung und Freilegung des lateralen Femurkortexes. Im Anschluss erfolgten vier Bohrungen, je zwei proximal und distal von der geplanten Osteotomieposition, die bikortikale Fixierung von vier Schanzschrauben (Gewindedurchmesser 0,45 mm, Schaftdurchmesser 0,8 mm) und die anschließende Befestigung des Fixateurs externe (MouseExFix, RISystem, Davos, Schweiz). Mittels einer Gigli Drahtsäge (\varnothing 0,66 mm, AO Development Institute, Davos, Schweiz) erfolgte daraufhin eine quer zur Femurdiaphyse verlaufende Durchtrennung des Knochens.

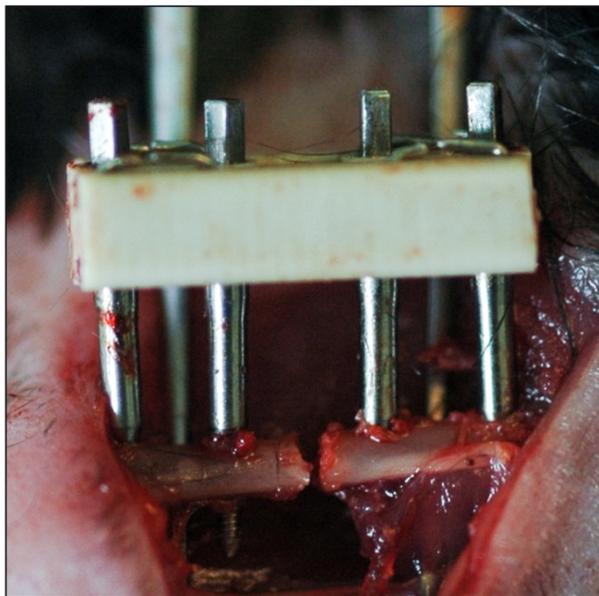


Abb. 3: Links, Kleber C, 2012, AG Polytrauma: Mausfemur mit angebrachtem Fixateur externe und mittlerer Osteotomie. Rechts: verwendete Vorrichtung zur Erzeugung der Biegefraktur im Bereich der Tibia mittels 3-Punkt-Biegetechnik.

Vor der Erzeugung der geschlossenen Tibiafraktur erfolgte die Flexion im Bereich des Knies und eine parapatellare Inzision zur Identifizierung des exakten Eintrittspunktes (medial des Ligamentum patellae) für eine antegrade intramedulläre Marknagelung

mittels einer Kanüle (BD Microlance™ 3, 27G $\frac{3}{4}$ " , 0,4 mm x 19 mm, Heidelberg, Deutschland). Nach Eröffnung des tibialen Kortexes wurde die 0,4 mm Kanüle, unter leichten Drehbewegungen und der tibialen Axe folgend, in den Markraum eingeführt. Die geschlossene Tibiafraktur wurde nach der 3-Punkt-Biegetechnik erzeugt (100).

Die richtigen Implantatposition wurde noch vor der Narkoseausleitung klinisch (achsgerechte Ausrichtung und Torsionsstabilität) und röntgenologisch verifiziert (Abb. 4). Es erfolgten tägliche postinterventionelle Visiten der Versuchsmäuse. Am 21. postoperativen Tag erfolgte eine abschließende Röntgenkontrolle der erfolgreichen Frakturheilung (28 kV, 8 s, Faxitron MX 20, Illinois, USA).

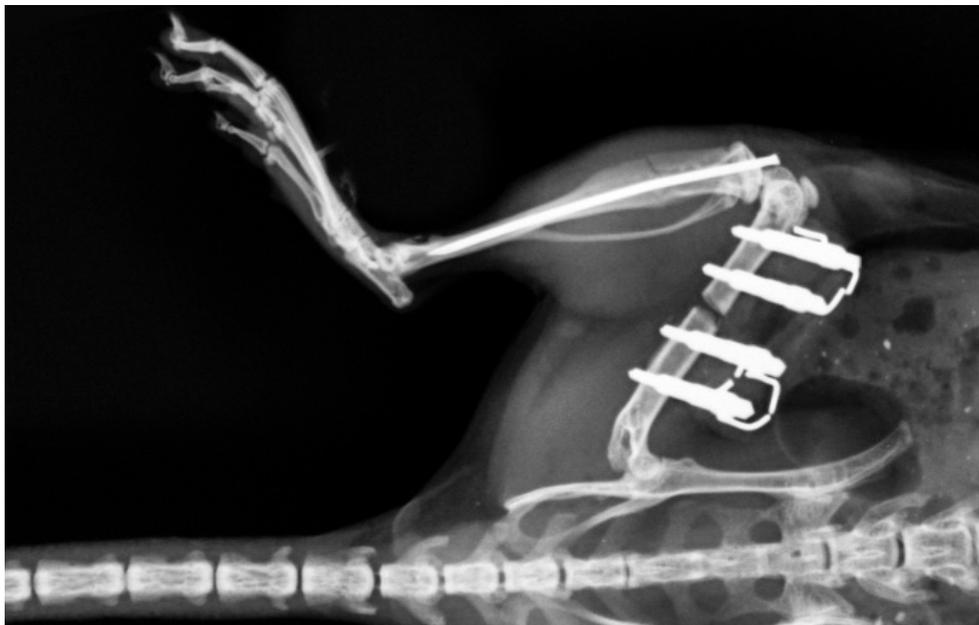


Abb. 4: Ausschnitt einer postoperativen Röntgenkontrolle. Die Osteotomie des Femurs sowie der Frakturspalt der Biegefraktur im Bereich der Tibia sind deutlich erkennbar. Weiterhin ist die regelrechte Materiallage des Fixateur externe und des Tibianagels bei insgesamt achsgerechter Fragmentstellung zu sehen.

2.3.4. Euthanasierung und Probenentnahme

Am 21. postoperativen Tag wurden die Versuchsmäuse durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (Ketavet®, Pharmacia & Upjohn GmbH, Wien, Österreich) 60 mg/kg Körpergewicht und Medetomidin 0,3 mg/kg Körpergewicht (Domitor®, Orion Pharma, Zug, Schweiz) in tiefe Narkose versetzt, bis auf äußere Reize keine Reflexantwort mehr ersichtlich war. Die Mäuse wurden anschließend in Rückenlage fixiert. Der Tod trat im Versuch durch eine maximale Blutentnahme aus dem Herzen ein

(subxiphoidaler Einstich in Richtung des linken Akromioklavikulargelenkes). Zusätzlich zur kardialen Punktion wurde die Halswirbelsäule überstreckt. Der Untersuchungszeitpunkt am 21. postoperativen Tag wurde bei der Planung dieses Projektes in der Fachkonferenz am Julius Wolff Institut festgelegt. Dieser Zeitpunkt gilt institutsintern für alle zur Knochenheilung durchgeführten Projekte und garantiert die Vergleichbarkeit auch zwischen verschiedenen Studien (101, 102). 21 Tage nach einer Osteotomie mit einer Spaltgröße von 0,66 mm am Mausmodell ohne weitere Intervention ist die Heilung und Überbrückung des Spaltes in der Regel noch nicht vollständig abgeschlossen. Dies bedeutet, dass eine Heilungsverbesserung oder Verschlechterung im direkten Vergleich der verschiedenen Therapiegruppen besser detektiert werden kann (101, 103).

Es folgte die Entnahme des rechten Beines durch Exartikulation im Hüftgelenk mit anschließender Präparation (Entfernung von Fell, Haut, Nahtmaterial und eine Reduktion des muskulären Weichteilmantels zur besseren anschließenden Fixierung).

2.3.5. Probenfixierung und Kryo-Einbettung

Sofort nach der Entnahme der Knochenproben erfolgte eine Vorfixierung für 2 h in 4%iger PFA-Lösung (Paraformaldehyde; Merck, Darmstadt, Deutschland) und eine anschließende Dehydrierung der Proben in aufsteigend konzentrierten Zuckerlösungen (Saccharose, Haushaltszucker; 10 %, 20 % und 30 %) für je 24 h und bei 4 °C. Die maximale Lagerungsdauer der Femora durfte 7 Tage in den Zuckerlösungen bei 4 °C betragen. Die so präparierten Knochenproben wurden mittels μ CT gescannt (siehe 2.4.) und im Anschluss in Super Cryo Embedding Medium (SCEM, Section-Lab Co. Ltd. Hiroshima, Japan) eingebettet und schockgefrostet. Dazu wurden Femur und Tibia einer Probe im Kniegelenk voneinander getrennt und auf einer Lage Einbettmedium in eine selbstgebaute, quaderförmige (4 cm x 3 cm x 3 cm) Gefrierform gegeben und mit einer weiteren, blasenfreien Schicht Kryo-Medium bedeckt. Zum Schockfrostern wurde ein Thermobehälter für flüssigen Stickstoff mit Aceton (SIGMA ALDRICH GmbH, Steinheim, Deutschland) und Trockeneis (CO₂, -78,5 °C) gefüllt. In das Aceton-Trockeneis-Gemisch wurde ein mit n-Hexan (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) gefülltes Becherglas gestellt und in dieses die Gefrierformen gehalten, bis die Proben und das Einbettmedium komplett gefroren waren. Die Lagerung der Proben erfolgte bis zur weiteren histologischen Aufarbeitung (siehe 2.5.) bei -80 °C.

2.4. μ CT-Bildgebung und Analyse

In dieser Arbeit wurden *in vitro* μ CT-Aufnahmen für die Analyse der Frakturheilung durchgeführt (vivaCT40, SCANCO Medical, Brüttisellen, Schweiz; Abb. 6, links). In Vorbereitung auf die Bildgebung wurden die Proben mit montiertem Fixateur externe in einen maßangefertigten Probenhalter eingespannt (Abb. 5). Im Anschluss erfolgte die Entfernung des Fixateurs externe. Durch die sichere Fixierung im Probenhalter wurden so sekundäre Dislokationen der verheilten Frakturen entgegengewirkt.

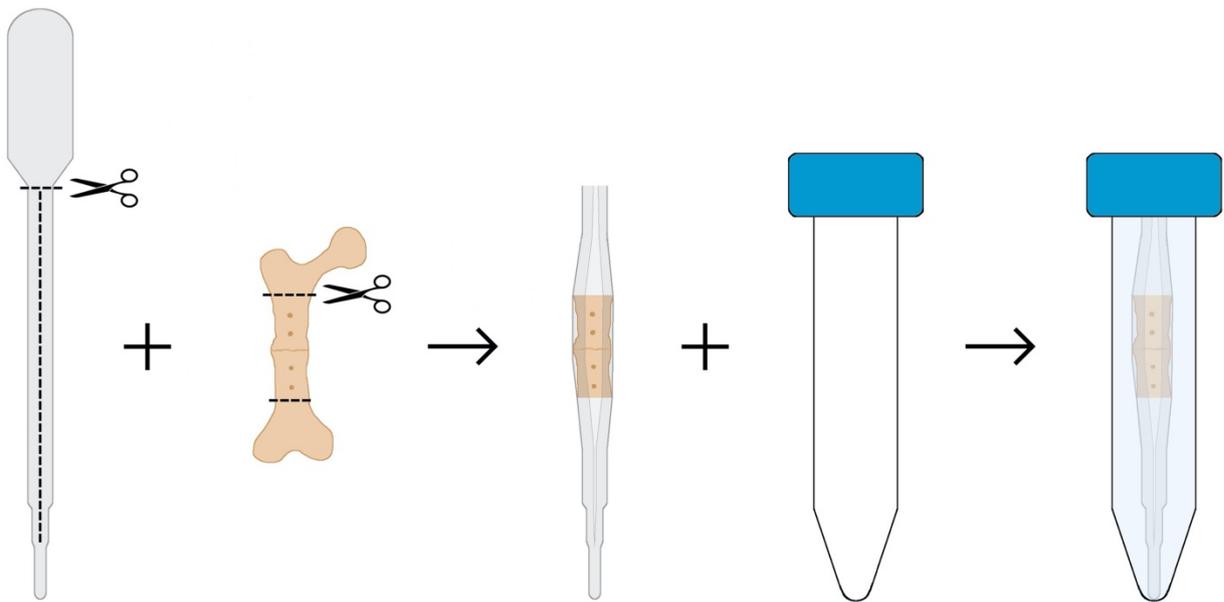


Abb. 5: Für den Probenhalter wurde eine Einwegpipette aus Kunststoff gekürzt und längs eröffnet. In einem zweiten Schritt erfolgte die, hier nur symbolisch dargestellte, Reduktion des Weichteilmantels, um den Knochen in die eröffnete Pipette einzubringen. Nach dem Einspannen des Femurs erfolgte die Entfernung des Fixateurs externe (hier nicht dargestellt). Im letzten Schritt wurde die Pipette mit eingespanntem Femur in ein Zentrifugenröhrchen (15 ml Falcon® Conical Centrifuge Tubes, Corning, New York, USA) eingebracht, welches möglichst luftfrei mit 30%iger Zuckerlösung gefüllt wurde.

Insgesamt wurden 400 Schnittbilder mit einer Auflösung von 10 μ m isotropischer Voxels (55 kV, 142 μ A) aufgenommen. In einer Übersichtsröntgenaufnahme wurde der verheilte Frakturspalt mittig platziert. Für die Analyse der Femurfrakturen wurde das VOI (volume of interest), ausgehend von der Frakturspaltmitte, mit je 1 mm (95 Schnittbilder) nach proximal und distal definiert. Somit ergab sich eine Gesamtlänge des VOI von 2 mm (190 Schnittbilder). Für die Bestimmung der Frakturspaltmitte wurden bei jeder Probe das jeweils erste proximal und distal des Frakturspaltes gelegene CT-Schnittbild identifiziert (transversale Schnittführung), in welchen die zirkuläre Kortikalis erstmals diskontinuierlich erschien (Abb. 6, rechts). Über die Berechnung des arithmetischen

Mittels erfolgte die Festlegung desjenigen CT-Schnittbildes, welches den Mittelpunkt des Frakturspaltes markierte. Die Analyse wurde mit der IPLv5.15 Software (SCANCO Medical, Brüttisellen, Schweiz) durchgeführt. Es wurden folgende Parameter bestimmt:

- **bone volume (BV):** gesamtes Knochenvolumen (mm^3) im VOI unter der Verwendung der Grenzwerte + 242 bis + 1000
- **total volume (TV):** gesamtes Volumen des VOI unter der Verwendung der Grenzwerte + 242 bis + 1000
- **Knochenvolumenverhältnis (BV/TV):** Gesamter Anteil des mineralisierten Knochens
- **Kalluszentrum:** Kallusvolumen im Zentrum der Osteotomie. Der mediane CT-Schnitt des Osteotomiespaltes (Bestimmung oben beschrieben) und die beiden benachbarten Schnittbilder wurden in die Analyse einbezogen und durch deren Mittelwert dargestellt. Der kortikale Knochen wurde manuell aus der Analyse mit den Grenzwerten -1000 und +1000 entfernt.
- **Kallusranddefekt:** Die ersten drei Schnitte vom Beginn der Kallusdiskontinuität jeder Seite wurden analysiert (insgesamt 6 Schnittbilder) und durch deren Mittelwert dargestellt. Der kortikale Knochen wurde manuell aus der Analyse mit den Grenzwerten - 1000 und + 1000 entfernt.
- **Knochenvolumen der Kortikalis:** Gesamtes Volumen des kortikalen Knochens (mm^3) innerhalb des VOI. Die Analyse wurde mit den Grenzwerten von - 1000 und + 1000 durchgeführt.

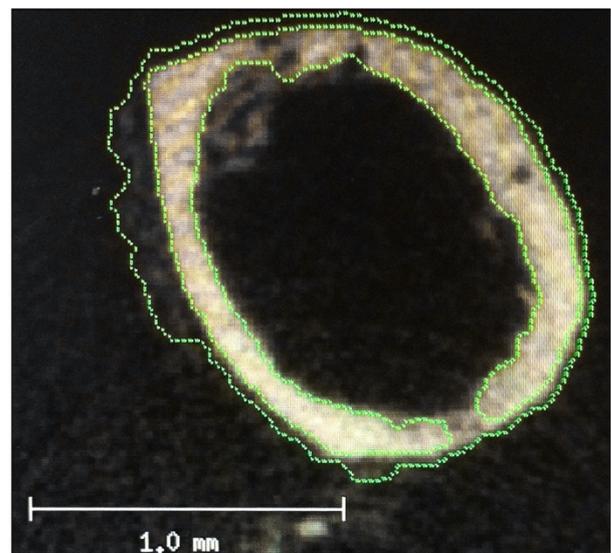
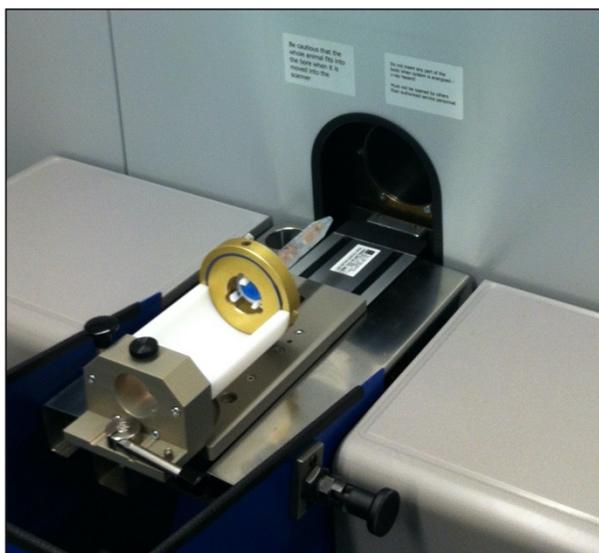


Abb. 6: Links: Eingespannter Probenhalter vor dem Einbringen in das μ CT. Rechts: transversales Schnittbild durch einen Femurknochen. Im Bild ist die grün eingezeichnete ROI erkennbar. Weiterhin ist eine Unterbrechung der Kortikalis auf ca. 5 Uhr sichtbar.

2.5. Histologische Aufarbeitung

Für die weitere histologische Aufarbeitung wurden Gefrierschnitte mit einem Kryotom (Leica CM3050S, Leica Microsystems GmbH, Nussloch, Deutschland) angefertigt. Eine Stunde vor dem Anfertigen der Schnitte wurden die Proben zur Temperaturanpassung aus dem Tiefkühlschrank (-80 °C) in die Arbeitskammer des Kryotoms (-20 °C) überführt. Die Proben wurden nach ihrer Akklimatisierung eingespannt und 7 µm dicke Längsschnitte der Femura angefertigt. Dafür erfolgte zunächst ein Trimmen der Proben, bis der Markraum der Diaphysen gleichmäßig eröffnet war (Abb. 7, links). Im Anschluss wurde ein Kryofilm (Cryofilm type II C (9), Section-Lab Co. Ltd. Hiroshima, Japan) auf die Proben aufgeklebt und im Anschluss der 7 µm starke Schnitt durchgeführt (Abb. 7, Mitte). Es erfolgte die Übertragung des Kryofilms mit dem anhaftenden histologischen Schnitt auf einen Objektträger (Marienfeld) und dort die Befestigung an den Rändern mit Klebestreifen (Tesafilm®, Tesa Ag, Hamburg, Deutschland; Abb. 7, rechts). Nach anschließender Lufttrocknung erfolgte die Lagerung bis zum Gebrauch bei -80 °C. Beim Anfertigen der Kryoschnitte ist eine Probe der PT + sIL-6R-Gruppe zerbrochen, so dass für die histologischen Analysen dieser Versuchsgruppe eine verminderte Gruppenstärke von n = 5 resultierte. Dies ist im Ergebnisteil an entsprechender Stelle gekennzeichnet.

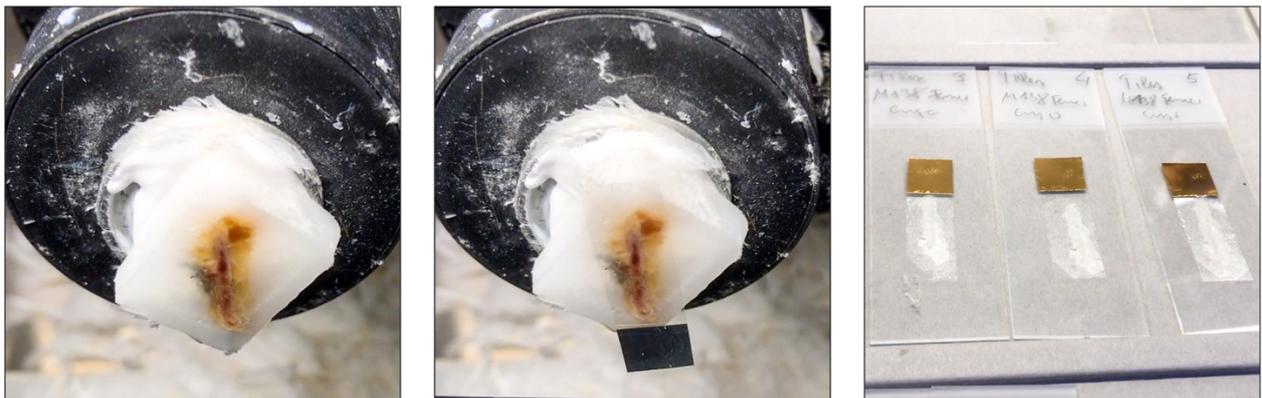


Abb. 7: Darstellung des Kryo-Schnittes. Im linken Bild ist die bereits getrimmte Probe im Kryotom zu erkennen. Es ist der gleichmäßig, längs eröffnete Markraum als rotbrauner Strich erkennbar. Im mittleren Bild wurde bereits der Kryofilm aufgebracht. Im rechten Bild liegen die, auf dem Kryofilm befindlichen Femurschnitte, zum Trocknen auf Objektträgern.

2.5.1. TRAP-Färbung

Mit der TRAP-Färbung (Tartrate resistant acid phosphatase, Tartratresistente saure Phosphatase) können Osteoklasten in den Kryoschnitten angefärbt und identifiziert werden. Die tartratresistente saure Phosphatase ist ein Enzym, welches unter anderem von aktiven Osteoklasten synthetisiert wird. Bei der Färbung findet ein indirekter Nachweis des Enzyms statt, indem von einer phosphatierten Naphtolverbindung Phosphat abspaltet wird. Das so freigesetzte Naphthol bindet an ein Diazoniumsalz und bildet mit ihm einen Farbstoff, der die Osteoklasten nach dieser Färbung im Schnitt rot erscheinen lässt (104).

Färbeprotokoll für TRAP:

- | | | |
|-----|---|------------|
| 1. | Schnitte bei Raumtemperatur auftauen und lufttrocknen lassen | 30 min |
| 2. | Fixierung in 4%iger Formaldehydlösung | 10 min |
| 3. | In Aqua dest. spülen | 5 min |
| 4. | Inkubation im TRAP-Puffer | 10 min |
| 5. | Inkubation in TRAP-Färbelösung 1:5 verdünnt und unter mikroskopischer Kontrolle | 7 - 10 min |
| 6. | In Aqua dest. spülen | 5 min |
| 7. | Kernfärbung Hämalaun nach Mayer (Merck, Darmstadt, Deutschland) 1:4 verdünnt | 25 s |
| 8. | In fließendem Leitungswasser bläuen | 10 min |
| 9. | In Aqua dest. spülen | 5 min |
| 10. | Kryofilm vom Objektträger lösen und Tesafilm® entfernen | |
| 11. | Kryofilm auf einen frischen Objektträger transferieren | |
| 12. | Eingedeckte Schnitte trocknen lassen | 24 h |

Der TRAP-Puffer und die TRAP-Färbelösung wurden vor jedem Färbedurchlauf, während des Auftauens und Trocknens der Schnitte, hergestellt.

TRAP-Puffer

3,28 g (40 mMol) Natriumacetat (Merck, 1.06268, Darmstadt, Deutschland) und 2,3 g di-Natriumtartrat-Dihydrat (Merk, 1.06663, Darmstadt, Deutschland) wurden in 1 Liter Aqua

dest. gelöst und im Anschluss mittels pH-Meter (inoLab®, pH Level 1, WTW, Weilheim, Deutschland) auf pH 5,0 eingestellt.

TRAP-Färbelösung

20 mg Naphtol AS-MIX-Phosphat (Sigma-Aldrich, N5000, Hamburg, Deutschland) und 120 mg Fast Red Violet LB Salt (Sigma-Aldrich, F3381, Hamburg, Deutschland) wurden zuerst in 50 ml TRAP-Puffer gelöst und anschließend 2 ml N,N-Dimethylformamid (Sigma-Aldrich, D4551, Hamburg, Deutschland) und 1 ml Triton X (Sigma-Aldrich, T8787, Hamburg, Deutschland) hinzugegeben. Abschließend wurde die Färbelösung mit TRAP-Puffer auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt.

2.5.2. Osteocalcin-Färbung

Die Osteocalcin-Färbung ist eine immunhistologische Untersuchungsmethode, die zum Nachweis von Osteoblasten dient. Osteocalcin gehört zu den extrazellulären, nicht-kollagenen Matrixproteinen wie z. B. auch Osteopontin oder Osteonectin und stellt dessen größte Fraktion dar (105). Es wird hauptsächlich von Osteoblasten und Odontoblasten bei deren Differenzierung und der Mineralisation synthetisiert und sezerniert (106), was das Osteocalcin zu dem spezifischsten Marker für die Osteoblastenaktivität macht (107).

Mittels der Immunhistologie lassen sich Antigene durch die Bindung spezifischer Antikörper nachweisen. In der hier vorliegenden Arbeit wurde die ABC-Technik, Avidin-Biotin-Komplex-Technik (englisch: avidin-biotin complex) verwendet. Diese Technik nutzt die starke Affinität des Glykoproteins Avidin zum Vitamin Biotin (108). Bei dieser immunhistologischen Färbung fand zuerst ein primärer Antikörper (polyklonaler Osteocalcin-Antikörper, hergestellt im Kaninchen, Osteocalcin (mouse) (NT) polyclonal antibody, ALX-210-333-C100, Enzo Life Sciences AG, Lausen, Schweiz) Anwendung, der spezifisch an Epitope des Osteocalcins bindet. Im Anschluss wurde dieser durch einen biotinylierten sekundären Antikörper detektiert, der gegen die IgGs der Spezies gerichtet war, in der der Primärantikörper hergestellt wurde (primärer Osteocalcin-Antikörper aus dem Kaninchen, sekundärer Antikörper aus der Ziege, welche mit den Kaninchen-IgGs immunisiert wurde). In einem weiteren Schritt wurde die starke Affinität von Avidin zu Biotin genutzt. Über die Zugabe von Avidin und biotinylierter alkalischer Phosphatase (VECTASTAIN® ABC-AP Kit, AK-5000, Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA) fand eine Kopplung der alkalischen Phosphatase mit dem

biotinylierten Sekundärantikörper statt, wobei Avidin als Bindeglied fungierte (siehe Abb. 8). Abschließend erfolgte die Hinzugabe eines Substratgemisches (VECTOR® Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit, SK-5100, Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA), welches in Kombination mit der alkalischen Phosphatase eine rötliche Farbreaktion erzeugte.

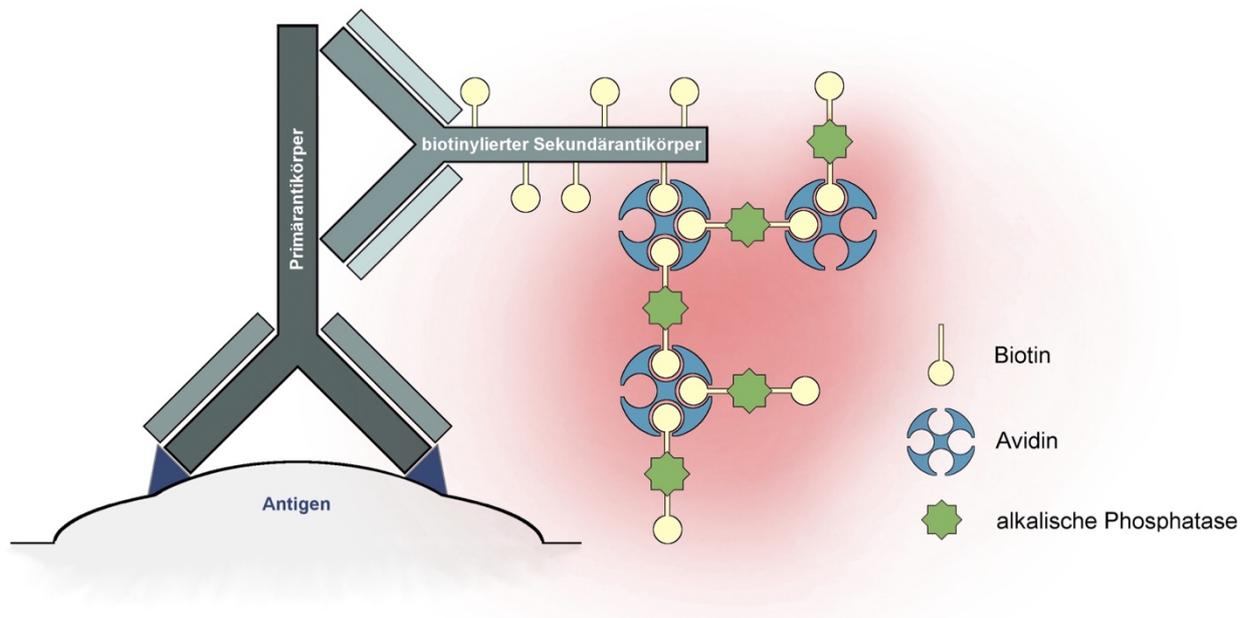


Abb. 8: Schematische Darstellung des Osteocalcin-Färbepinzips mittels ABC-Technik. Ein polyklonaler Osteocalcin-Antikörper, bindet am Antigen, den Epitopen des Osteocalcins. An den Primärantikörper bindet wiederum ein biotinylierter sekundärer Antikörper, der gegen spezifische Regionen des Primärantikörpers gerichtet ist. Über Avidin erfolgt die Kopplung eines Enzyms (alkalische Phosphatase) mit dem Sekundärantikörper. Durch die Zugabe eines entsprechenden Farbgemisches wird durch das Enzym eine Farbreaktion hervorgerufen.

Färbeprotokoll für Osteocalcin:

- | | | |
|-----|---|------------|
| 1. | Schnitte bei Raumtemperatur auftauen und lufttrocknen | 30 min |
| 2. | Fixierung in 4 %iger Formaldehydlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) | 10 min |
| 3. | Mit PBS-Lösung spülen (Waldeck Chroma, Münster, Germany) | 2 x 5 min |
| 4. | Proben ab diesem Zeitpunkt in feuchter Kammer | |
| 5. | Inkubation und Permeabilisierung mit Trypsin (0,185 %) (Activity: 3173.7 U/mg; Calbiochem, San Diego, CA, USA) | 10 min |
| 6. | Mit PBS-Lösung spülen | 2 x 5 min |
| 7. | Blocken mit 2 % Normalserum Goat in PBS-2%BSA-Fertigmischung | 30 min |
| 8. | Inkubation mit primärem Antikörper bei 4 °C | über Nacht |
| 9. | Mit PBS-Lösung spülen | 2 x 5 min |
| 10. | Inkubation mit sekundärem Antikörper | 30 min |
| 11. | Mit PBS-Lösung spülen | 2 x 5 min |
| 12. | Inkubation mit AB-Komplex | 50 min |
| 13. | Mit PBS-Lösung spülen | 2 x 5 min |
| 14. | Inkubation mit Chromogenpuffer | 2 x 5 min |
| 15. | Inkubation mit Substratgemisch und Kontrolle unter dem Mikroskop | 7 - 10 min |
| 16. | Mit PBS-Lösung spülen | 2 x 5 min |
| 17. | Gegenfärbung mit Methylgrün (Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, USA) | 25 min |
| 18. | Alkohol 96 % (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) | kurz |
| 19. | Alkohol 100 % (Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland) | 2 x 2 min |
| 20. | Intermedium (Xylol, Quartett GmbH, Berlin, Deutschland) | 2 x 2 min |
| 21. | Kryofilm vom Objektträger lösen und Tesafilm® entfernen | |
| 22. | Kryofilm auf einen frischen Objektträger mit dem Schnitt nach oben legen und mit Vitro-Clud (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland) eindecken | |
| 23. | Eingedeckte Schnitte trocknen | 24 h |

2.5.3. Auswertung der histologischen Präparate

Im Anschluss an die TRAP- und Osteocalcin-Färbungen wurden die getrockneten Schnitte digitalisiert. Dies erfolgte durch die Erstellung von mikroskopischen Mosaikaufnahmen in 40-facher Vergrößerung, die softwaregestützt zu einem Gesamtbild zusammengefügt wurden (Abb. 9, Bild 1). Verwendet wurde das Durchlichtmikroskop Axioskop 40, die Kamera AxioCam MRc 5 und die Software AxioVision (Release 4.8.2 SP3) (alle Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland). Die anschließende Bearbeitung und Auswertung der digitalisierten Bilder erfolgte mittels der Software Fiji/ImageJ (Version 1.0, Rasband., W.S., NIH, Bethesda, Maryland, USA).

2.5.4. Analyse TRAP-Färbung

In den digitalisierten Bildern wurden, analog zur μ CT-Auswertung, eine ROI (region of interest) mit einer Gesamtbreite von 2 mm festgelegt (je 1 mm nach proximal und distal von der Frakturspaltmitte ausgehend). Die Höhe der ROI wurde so gewählt, dass der gesamte Knochen inklusive Kortikalis eingeschlossen war (Abb. 9, Bild 2). Anschließend erfolgte die manuelle Auszählung und Markierung (mittels fortlaufend nummerierter Punktmarkierungen) aller Osteoklasten in der ROI (Abb. 9, Bild 2). Es mussten folgende Kriterien erfüllt werden, um eine Zelle als Osteoklast zu identifizieren (Abb. 9, Bild 3).:

- TRAP-positive Färbung
- Mehrkernigkeit
- Lage an der Knochenoberfläche in Resorptionslakunen (Howship-Lakunen).

Die Anzahl der ausgezählten Osteoklasten wurde zur besseren Vergleichbarkeit der einzelnen Tiere und Gruppen (analog zu 2.5.5.) in das Verhältnis zur Fläche des Binde- und Knochengewebes in der betrachteten ROI gesetzt:

$(n \text{ Osteoklasten}) / (\text{Fläche Binde- und Knochengewebe}) = \text{Osteoklasten} / \text{mm}^2$.

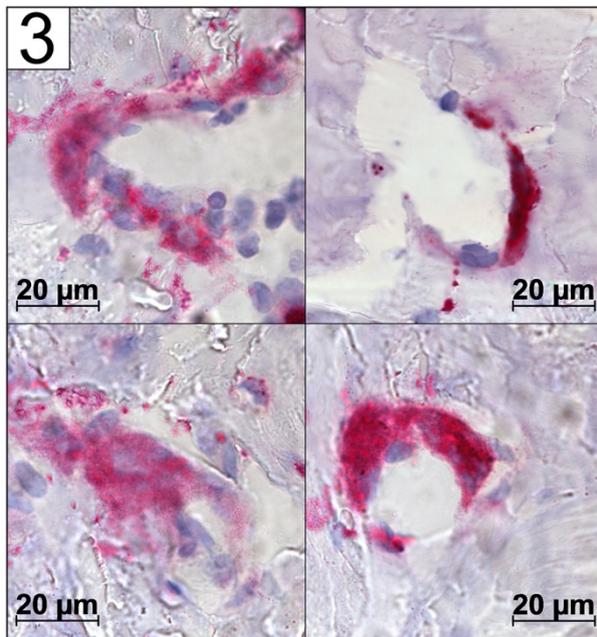
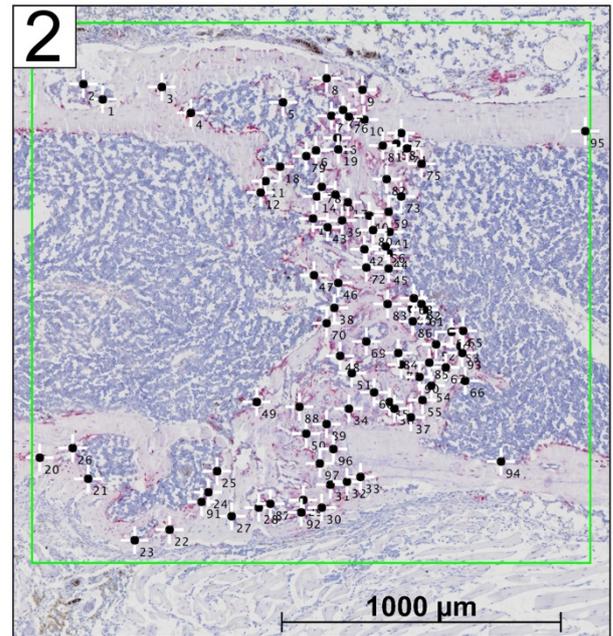
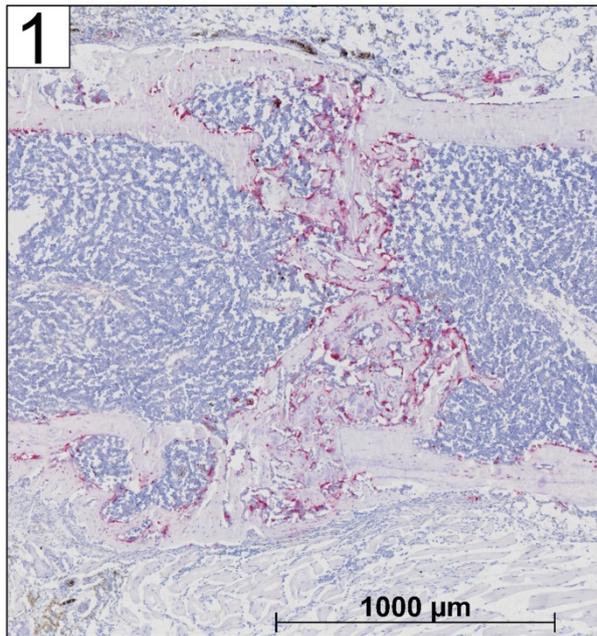


Abb. 9: Analyseschritte der TRAP-Färbung. Bild 1: Mosaikbild aus Einzelaufnahmen in 40-facher Vergrößerung. Bild 2: Bearbeitetes Bild 1. Grün eingezeichnete ROI und zur Auszählung markierte Osteoklasten. Bild 3: In 100-facher Vergrößerung aufgenommene Osteoklasten.

Die Auszählung in den digitalen Bildern erfolgte neben dem Mikroskop, um bei Unsicherheiten parallel dazu eine genauere Betrachtung in 40-facher Vergrößerung durchzuführen. Die Auszählung der Präparate fand zufällig und ohne Kenntnis über die Gruppenzugehörigkeit statt.

2.5.5. Analyse Osteocalcin-Färbung

Für die Auswertung der Osteocalcin-Färbung wurde die ROI nach den gleichen Gesichtspunkten wie bei der TRAP-Färbung festgelegt. Zusätzlich erfolgte die Ausrichtung der ROI anhand histologischer Landmarken des korrespondierenden Bildes der TRAP-Färbung, um bei jeder zu einer Maus gehörigen Probe, den gleichen Bereich zu analysieren.

Im ersten Schritt wurde mit dem Programm Fiji das Bild auf die exakte Größe der ROI zugeschnitten (Abb. 10, Bild 1). Anschließend wurde über die Verwendung des Color Thresholds (Farbschwellenwert) eine Maske erstellt und deren Fläche in μm^2 bestimmt, die der Fläche des Knochen- und Kallusgewebes entsprach (verwendete Werte: Hue: 0 - 255, Saturation: 0 - 255, Brightness: 0 - 225; Abb. 10, Bild 2). Der letzte Analyseschritt am digitalen Bild war die Bestimmung der osteocalcin-positiven Bereiche in der ROI. Dazu erfolgte, in analoger Verfahrensweise zum vorhergehenden Schritt, die Erstellung einer Maske mittels der Verwendung des Color Thresholds und die anschließende Ermittlung ihrer Fläche in μm^2 (verwendete Werte: Hue: 0 - 18, 225 - 255, Saturation: 41 - 255, Brightness: 80 - 250; Abb. 10, Bild 3).

Über die Bildung des Quotienten aus (Fläche osteocalcin-positiver Bereiche) / (Fläche Binde- und Knochengewebe) konnte der relative Anteil der osteocalcin-positiven Bereiche ermittelt werden (OC pos [%]).

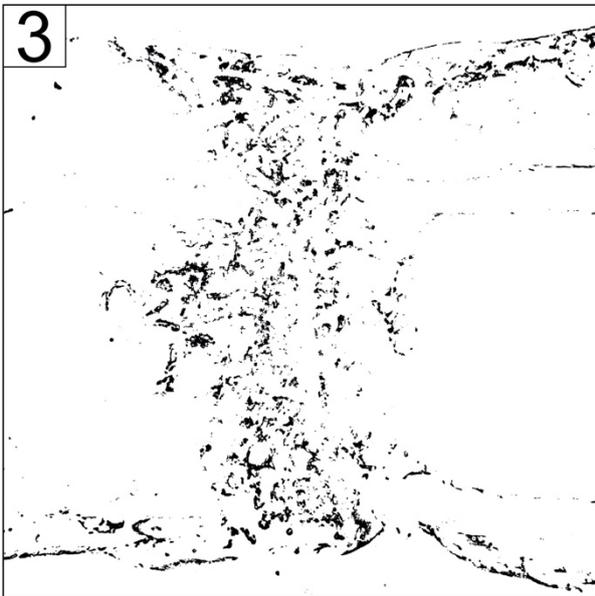
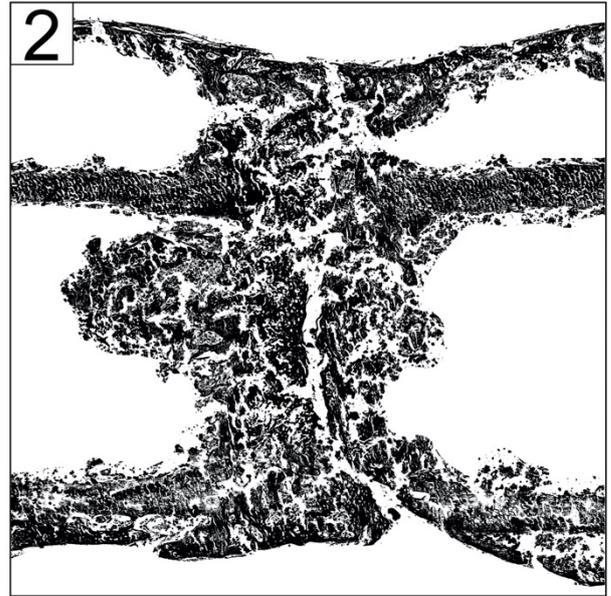
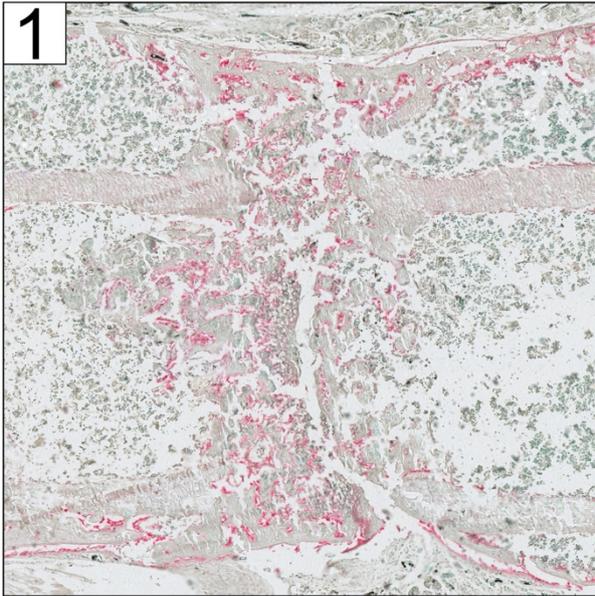


Abb. 10: Analyseschritte der Osteocalcin-Färbung in 40-facher Vergrößerung. Alle drei Bilder zeigen die gleiche ROI nach verschiedenen Bearbeitungsschritten. Die Breite eines Bildes entspricht 2000 μm im Präparat. Bild 1: native ROI Bild 2: Maske für Knochen- und Kallusgewebe. Bild 3: Maske für osteocalcin-positive Bereiche.

2.6. Statistik

Die Dokumentation der erhobenen Daten erfolgte mittels Microsoft® Excel für Mac OS (© Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA; Version 16.10). Für die statistische Analyse der Messwerte wurden die Daten in IBM® SPSS® Statistics 25.0 (© IBM Corporation, Armonk, NY, USA) importiert.

Die Analyse der unabhängigen, nicht normalverteilten Messwerte erfolgte über den Mann-Whitney-U-Test. P-Werte $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Die Darstellung der Messdaten erfolgte über den Median und den Interquartilsabstand (IQR). Die Erstellung und Bearbeitung der in dieser Arbeit verwendeten Grafiken und Abbildungen erfolgte mit GIMP für Mac OS (Version 2.8.14).

3. Ergebnisse

3.1. Unterschied Frakturheilung Mono-/Polytrauma

Um herauszufinden, welchen Effekt der HS beim Polytrauma auf die Frakturheilung hat, verglichen wir die Fx-Gruppe (Gruppe I) mit der PT-Gruppe (Gruppe IV).

3.1.1. μ CT

Fx vs. PT

Die μ CT-Analyse ergab in den erhobenen Parametern (BV, TV, BV/TV, Volumina für Kallusmitte, Kallusrand und Kortikalis) keinen signifikanten Unterschied. In der PT-Gruppe wurde ein höherer Volumenanteil an kortikalem Knochen beobachtet, der jedoch nicht als signifikant ($p = 0,132$) nachgewiesen werden konnte ($0,68 \text{ mm}^3$; IQR $0,63 - 0,78$ vs. $0,78 \text{ mm}^3$; IQR $0,74 - 0,82$; Abb. 11; Tab. 1).

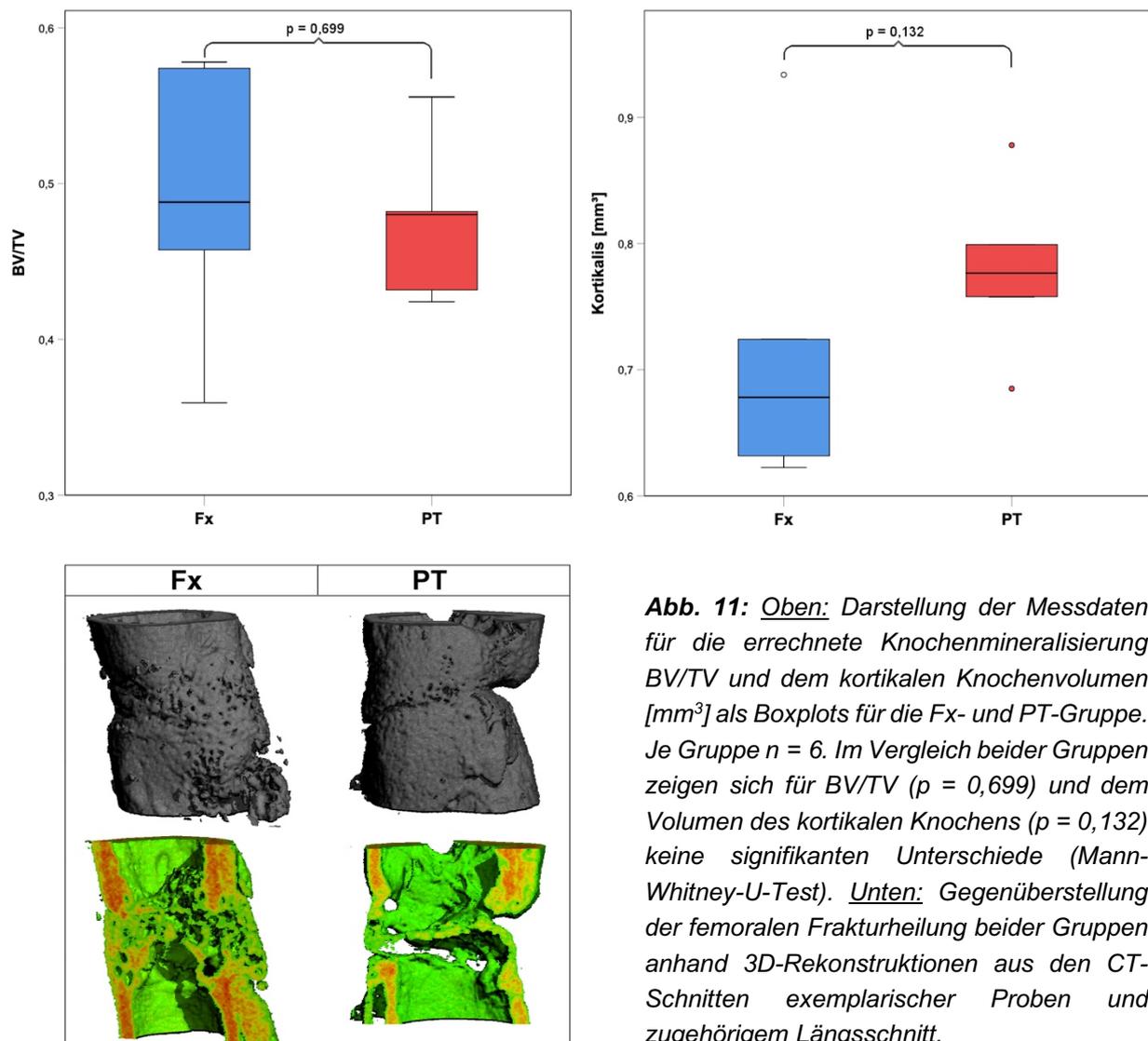


Abb. 11: Oben: Darstellung der Messdaten für die errechnete Knochenmineralisierung BV/TV und dem kortikalen Knochenvolumen [mm³] als Boxplots für die Fx- und PT-Gruppe. Je Gruppe $n = 6$. Im Vergleich beider Gruppen zeigen sich für BV/TV ($p = 0,699$) und dem Volumen des kortikalen Knochens ($p = 0,132$) keine signifikanten Unterschiede (Mann-Whitney-U-Test). Unten: Gegenüberstellung der femoralen Frakturheilung beider Gruppen anhand 3D-Rekonstruktionen aus den CT-Schnitten exemplarischer Proben und zugehörigem Längsschnitt.

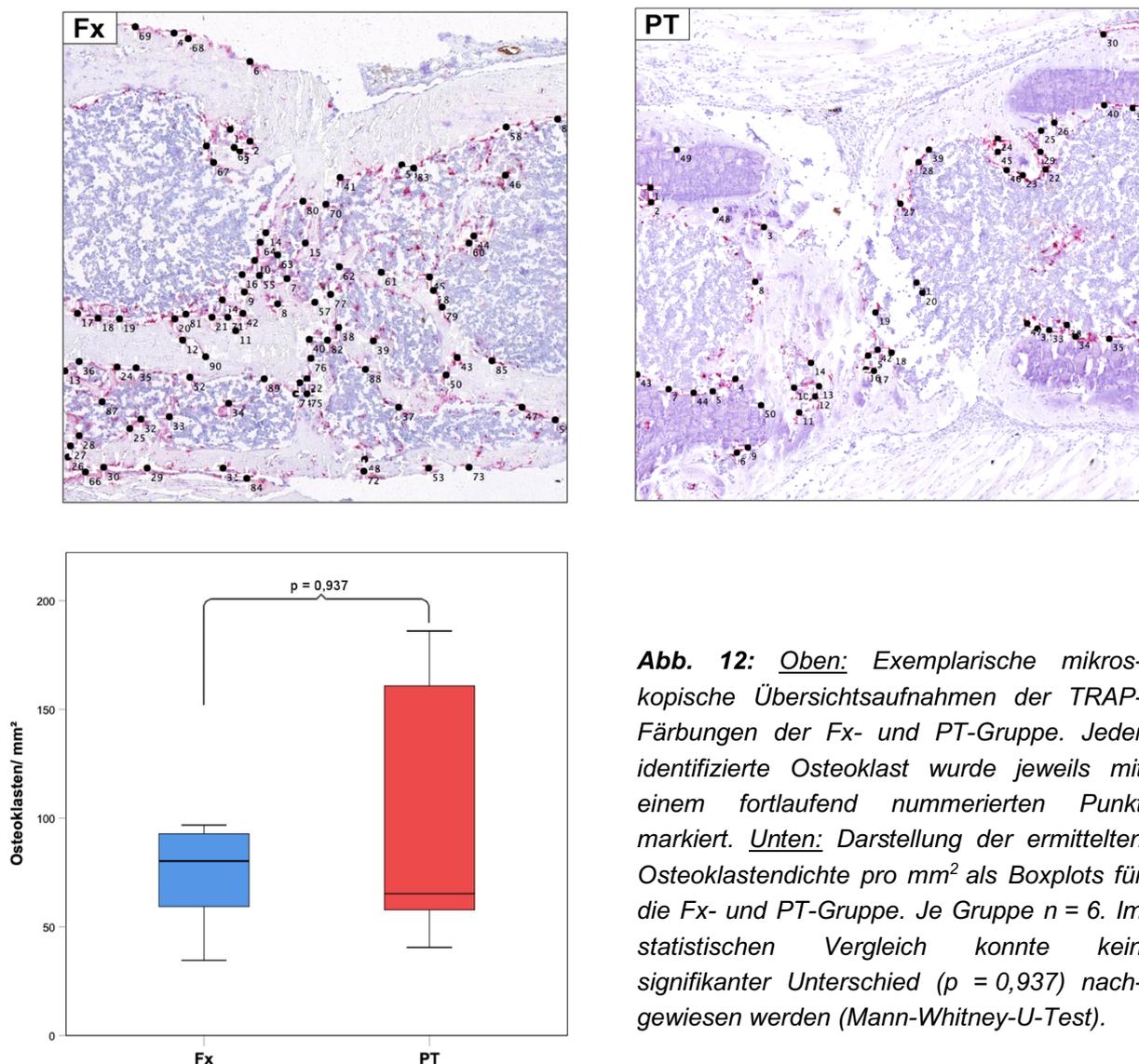
Tab. 1: Übersicht der im μ CT erhobenen Messwerte für die Gruppen Fx und PT sowie statistische Ergebnisse des direkten Gruppenvergleiches (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung mittels Median und IQR. Je Gruppe n = 6.

	I Fx	IQR	IV PT	IQR	Signifikanz
TV [mm ³]	3,58	3,15 - 3,82	3,53	2,68 - 5,45	p = 1,0
BV [mm ³]	1,82	1,46 - 2,04	1,82	1,26 - 2,42	p = 0,818
BV/TV	0,49	0,43 - 0,58	0,48	0,43 - 0,50	p = 0,699
Kallusmitte [mm ³]	0,019	0,014 - 0,023	0,019	0,012 - 0,033	p = 0,818
Kallusrand [mm ³]	0,09	0,080 - 0,091	0,1	0,069 - 0,113	p = 0,699
Kortikalis [mm ³]	0,68	0,63 - 0,78	0,78	0,74 - 0,82	p = 0,132

3.1.2. Histologie

Fx vs. PT

In der histologischen Auswertung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den erfassten Messwerten (Osteoklasten/mm²; OC pos [%]; Abb. 12; Tab. 2).



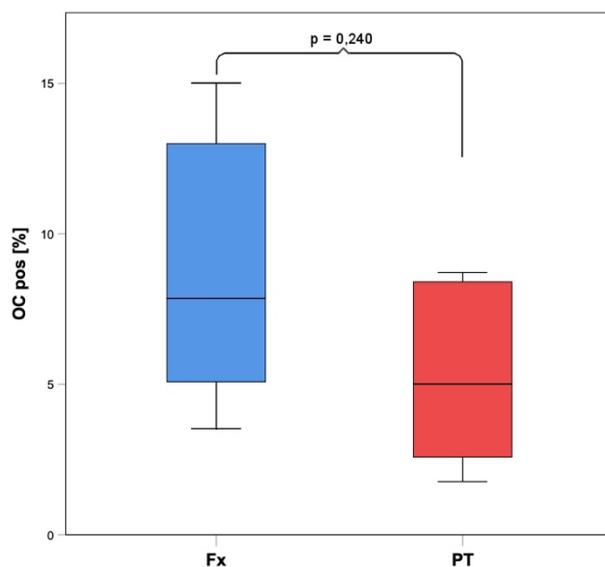
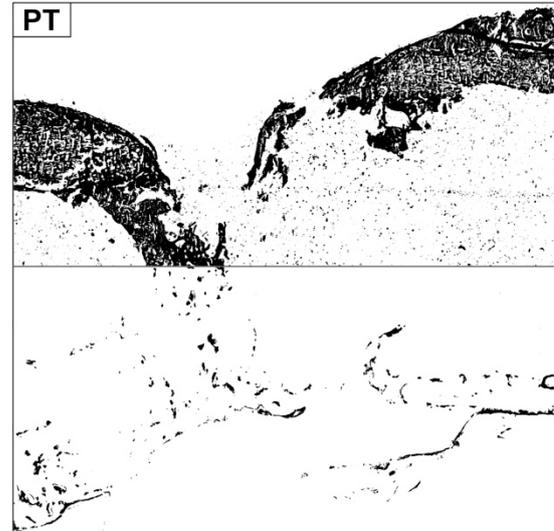
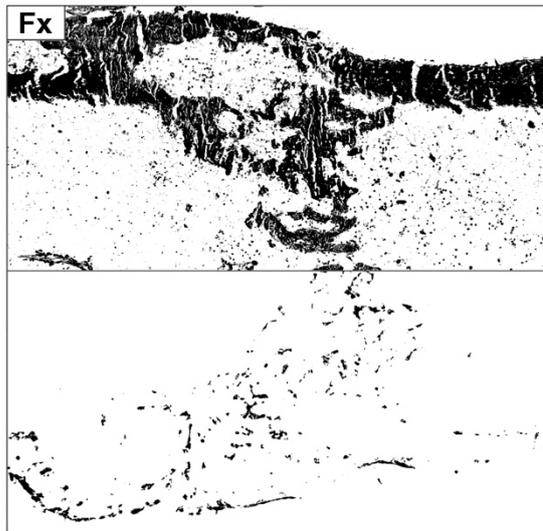


Abb. 13: Oben: Exemplarische Masken der Osteocalcin-Färbungen der Fx- und PT-Gruppe (in 2.5.5. erläutert). Die oberen Bildhälften zeigen die Masken für das Knochen- und Kallusgewebe, die unteren Bildteile die Masken für die osteocalcin-positiven Bereiche. Unten: Darstellung der errechneten osteocalcin-positiven Flächenanteile [%] der Fx- und PT-Gruppe als Boxplots. Je Gruppe $n = 6$. Im statistischen Vergleich konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,240$) nachgewiesen werden (Mann-Whitney-U-Test).

Tab. 2: Übersicht der in der histologischen Aufarbeitung der Präparate erhobenen Messwerte für die Gruppen Fx und PT sowie statistische Ergebnisse des direkten Gruppenvergleiches (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung mittels Median und IQR. Je Gruppe $n = 6$.

	I Fx	IQR	IV PT	IQR	Signifikanz
Osteoklasten / mm^2	80,2	53,1 - 93,8	65,3	53,5 - 167,1	$p = 0,937$
OC pos [%]	7,9	4,7 - 13,5	5,0	2,4 - 8,5	$p = 0,240$

3.2. Einfluss des Transsignaling-Mechanismus auf die Frakturheilung beim Monotrauma

Der Versuchsaufbau wurde in diesem Teil so angelegt, dass der Einfluss des Transsignaling-Mechanismus auf die Frakturheilung ohne HS untersucht werden konnte.

3.2.1. μ CT

Fx vs. Fx + sIL-6R

Zuerst betrachteten wir den Effekt der Verstärkung des Transsignaling-Mechanismus über die sIL-6R-Applikation beim Monotrauma. Dafür verglichen wir Gruppe I (Fx) mit Gruppe II (Fx + sIL-6R). Hier ergaben sich im μ CT bei verstärktem Transsignaling in Gruppe II ein signifikant höherer Anteil an mineralisiertem Knochen (BV/TV; 0,49; IQR 0,43 - 0,58 vs. 0,67; IQR 0,63 - 0,75; $p = 0,002$) und ein signifikant höheres Volumen an kortikalem Knochen ($0,68 \text{ mm}^3$; IQR $0,63 - 0,78$ vs. $0,88 \text{ mm}^3$; IQR $0,83 - 0,97$; $p = 0,026$).

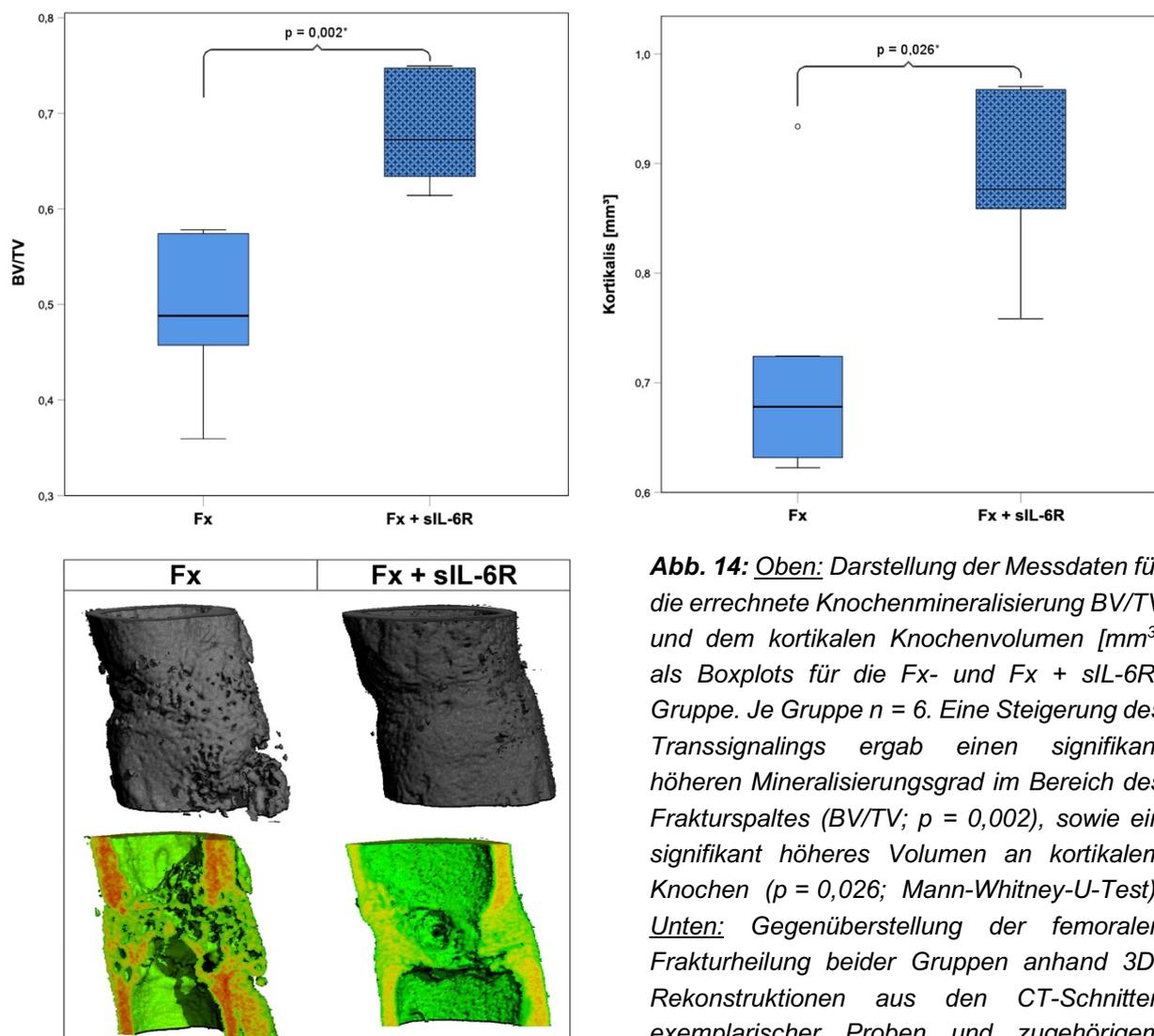


Abb. 14: Oben: Darstellung der Messdaten für die errechnete Knochenmineralisierung BV/TV und dem kortikalen Knochenvolumen [mm³] als Boxplots für die Fx- und Fx + sIL-6R-Gruppe. Je Gruppe $n = 6$. Eine Steigerung des Transsignalings ergab einen signifikant höheren Mineralisierungsgrad im Bereich des Frakturspaltes (BV/TV; $p = 0,002$), sowie ein signifikant höheres Volumen an kortikalem Knochen ($p = 0,026$; Mann-Whitney-U-Test). Unten: Gegenüberstellung der femoralen Frakturheilung beider Gruppen anhand 3D-Rekonstruktionen aus den CT-Schnitten exemplarischer Proben und zugehörigem Längsschnitt.

Tab. 3: Übersicht der im μ CT erhobenen Messwerte für die Gruppen Fx und Fx + sIL-6R sowie statistische Ergebnisse des direkten Gruppenvergleiches (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung mittels Median und IQR. Je Gruppe n = 6. * p < 0,05.

	I Fx	IQR	II Fx + sIL-6R	IQR	Signifikanz
TV [mm ³]	3,58	3,15 - 3,82	2,46	2,01 - 3,21	p = 0,132
BV [mm ³]	1,82	1,46 - 2,04	1,63	1,33 - 2,32	p = 0,937
BV/TV	0,49	0,43 - 0,58	0,67	0,63 - 0,75	p = 0,002*
Kallusmitte [mm ³]	0,019	0,014 - 0,023	0,020	0,015 - 0,027	p = 0,818
Kallusrand [mm ³]	0,09	0,080 - 0,091	0,069	0,065 - 0,082	p = 0,132
Kortikalis [mm ³]	0,68	0,63 - 0,78	0,88	0,83 - 0,97	p = 0,026*

Fx vs. Fx + sIL-6R-Ak

Folgend betrachten wir, welchen Effekt eine Blockierung des Transsignaling-Mechanismus beim Monotrauma hat. Dafür verglichen wir Gruppe III (Fx + sIL-6R-Ak) mit Gruppe I (Fx).

In der μ CT-Analyse ergab sich nach der Blockierung des Transsignaling in Gruppe III keine signifikanten Unterschiede. Für die Parameter TV (3,58 mm³; IQR 0,15 - 3,82 vs. 2,74 mm³; IQR 1,53 - 2,22; p = 0,065), BV und Kallusrand konnte eine Abnahme der Messwerte nach Blockierung des Transsignaling beobachtet werden, die jedoch nicht als signifikant nachgewiesen werden konnte (Abb. 14; Tab. 4).

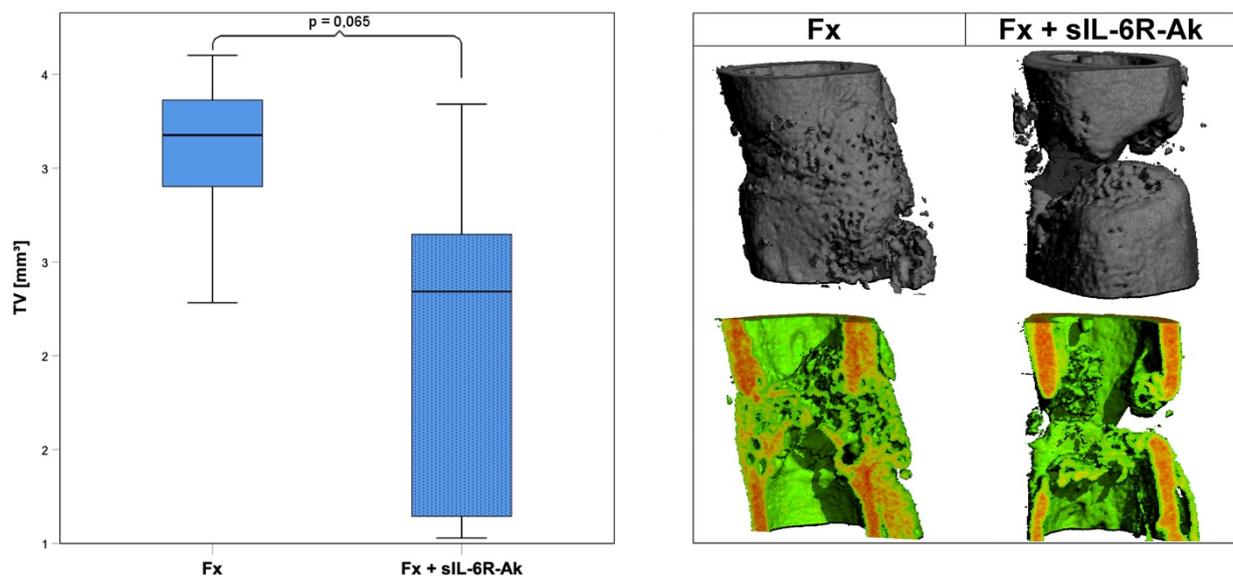


Abb. 15: Links: Darstellung der Gesamtvolumina im Frakturspalt (TV [mm³]) für die Fx- und Fx + sIL-6R-Ak-Gruppe als Boxplots. Nach der sIL-6R-Ak-Applikation kam es zu einer Verminderung des Gesamtvolumens im Frakturspalt, die sich jedoch mit p = 0,065 als nicht signifikant darstellte (Mann-Whitney-U-Test). Rechts: Gegenüberstellung der femoralen Frakturheilung beider Gruppen anhand 3D-Rekonstruktionen aus den CT-Schnitten exemplarischer Proben und zugehörigem Längsschnitt. Die geringere Durchbauung des ehemaligen Frakturspaltess in der Fx + sIL-6R-Ak-Gruppe ist gut erkennbar.

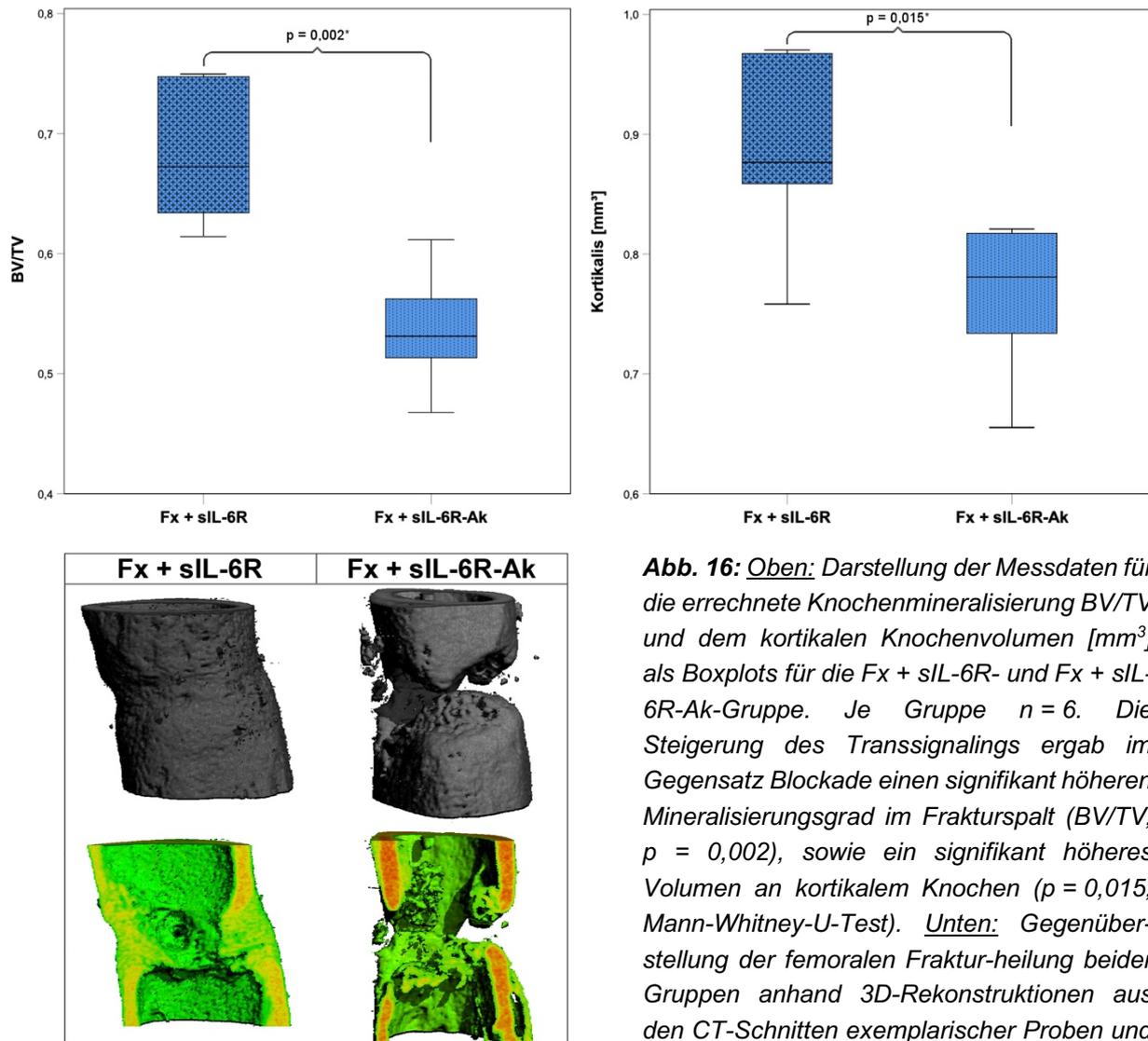
Tab. 4: Übersicht der im μ CT erhobenen Messwerte für die Gruppen Fx und Fx + sIL-6R-Ak sowie statistische Ergebnisse des direkten Gruppenvergleiches (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung mittels Median und IQR. Je Gruppe n = 6.

	I Fx	IQR	III Fx + sIL-6R-Ak	IQR	Signifikanz
TV [mm ³]	3,58	3,15 - 3,82	2,74	1,52 - 3,22	p = 0,065
BV [mm ³]	1,82	1,46 - 2,04	1,58	0,76 - 1,77	p = 0,132
BV/TV	0,49	0,43 - 0,58	0,53	0,50 - 0,57	p = 0,394
Kallusmitte [mm ³]	0,019	0,014 - 0,023	0,016	0,006 - 0,023	p = 0,818
Kallusrand [mm ³]	0,09	0,080 - 0,091	0,07	0,058 - 0,082	p = 0,093
Kortikalis [mm ³]	0,68	0,63 - 0,78	0,78	0,71 - 0,82	p = 0,180

Fx + sIL-6R vs. Fx + sIL-6R-Ak

Abschließend stellten wir eine Verstärkung des Transsignaling-Mechanismus einer Blockierung des selbigen beim Monotrauma gegenüber. Dazu verglichen wir Gruppe II (Fx + sIL-6R) mit Gruppe III (Fx + sIL-6R-Ak).

In der μ CT-Analyse zeigte sich bei Verstärkung des Transsignaling eine signifikante Erhöhung der Knochenmineralisierung (BV/TV; 0,67; IQR 0,63 - 0,75 vs. 0,53; IQR 0,50 - 0,57; p = 0,002) und des Volumens des kortikalen Knochens (0,88 mm³; IQR 0,83 - 0,97 vs. 0,78; IQR 0,71 - 0,82; p = 0,015) gegenüber der Gruppe mit blockiertem Transsignaling (Abb. 16; Tab. 5).



Tab. 5: Übersicht der im μ CT erhobenen Messwerte für die Gruppen Fx + sIL-6R und Fx + sIL-6R-Ak sowie statistische Ergebnisse des direkten Gruppenvergleiches (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung mittels Median und IQR. Je Gruppe n = 6. * p < 0,05.

	II Fx + sIL-6R	IQR	III Fx + sIL-6R-Ak	IQR	Signifikanz
TV [mm ³]	2,46	2,01 - 3,21	2,74	1,52 - 3,22	p = 1,0
BV [mm ³]	1,63	1,33 - 2,32	1,58	0,76 - 1,77	p = 0,485
BV/TV	0,67	0,63 - 0,75	0,53	0,50 - 0,57	p = 0,002*
Kallusmitte [mm ³]	0,020	0,015 - 0,027	0,016	0,006 - 0,023	p = 0,310
Kallusrand [mm ³]	0,069	0,065 - 0,082	0,070	0,058 - 0,082	p = 0,937
Kortikalis [mm ³]	0,88	0,83 - 0,97	0,78	0,71 - 0,82	p = 0,015*

3.2.2 Histologie

Fx vs. Fx + sIL-6R

Die histologische Aufarbeitung erbrachte bei Verstärkung des Transsignalings in Gruppe II (Fx + sIL-6R) eine signifikant verminderte Dichte an Osteoklasten/ mm² (80,2; IQR 53,1 - 93,8 vs. 30,5; IQR 20,9 - 64,3; $p = 0,041$; Abb. 17; Tab. 6).

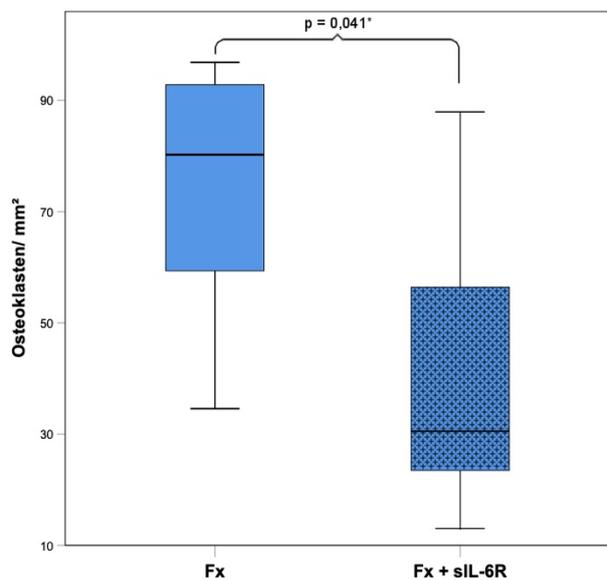
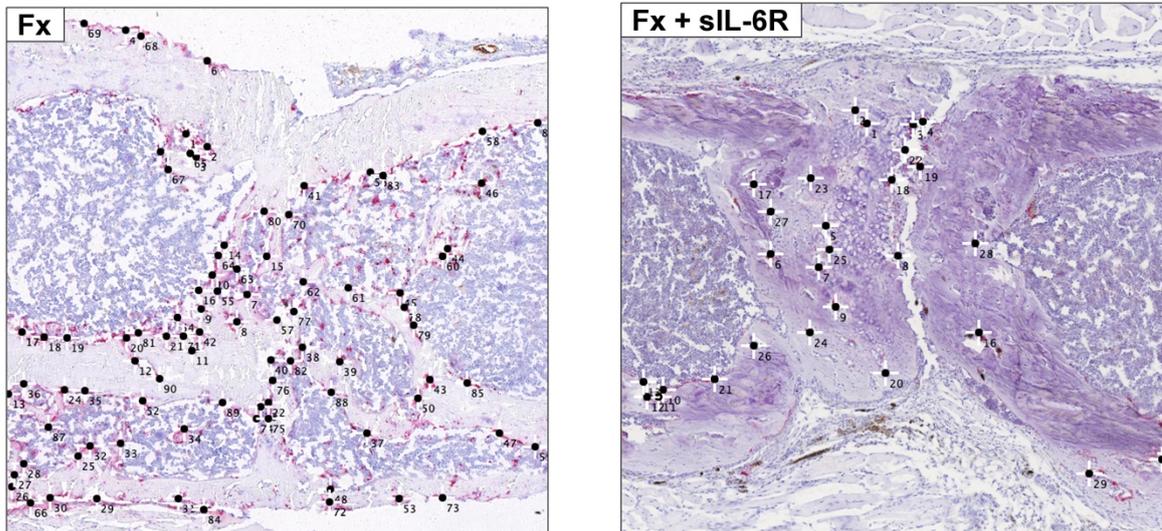


Abb. 17: Oben: Exemplarische mikroskopische Übersichtsaufnahmen der TRAP-Färbungen der Fx- und Fx + sIL-6R-Gruppe. Jeder identifizierte Osteoklast wurde jeweils mit einem fortlaufend nummerierten Punkt markiert. Unten: Darstellung der ermittelten Osteoklastendichte pro mm² als Boxplots für die Fx- und Fx + sIL-6R-Gruppe. Je Gruppe $n = 6$. Im statistischen Vergleich beider Gruppen konnte in der Frakturgruppe mit gesteigertem Transsignaling eine signifikant geringere ($p = 0,041$) Osteoklastendichte pro mm² identifiziert werden (Mann-Whitney-U-Test).

In der Auswertung der Osteocalcin-Färbung konnte bei verstärktem Transsignaling kein signifikanter Unterschied in den osteocalcin-positiven Flächenanteilen beobachtet werden (Abb. 18; Tab. 6).

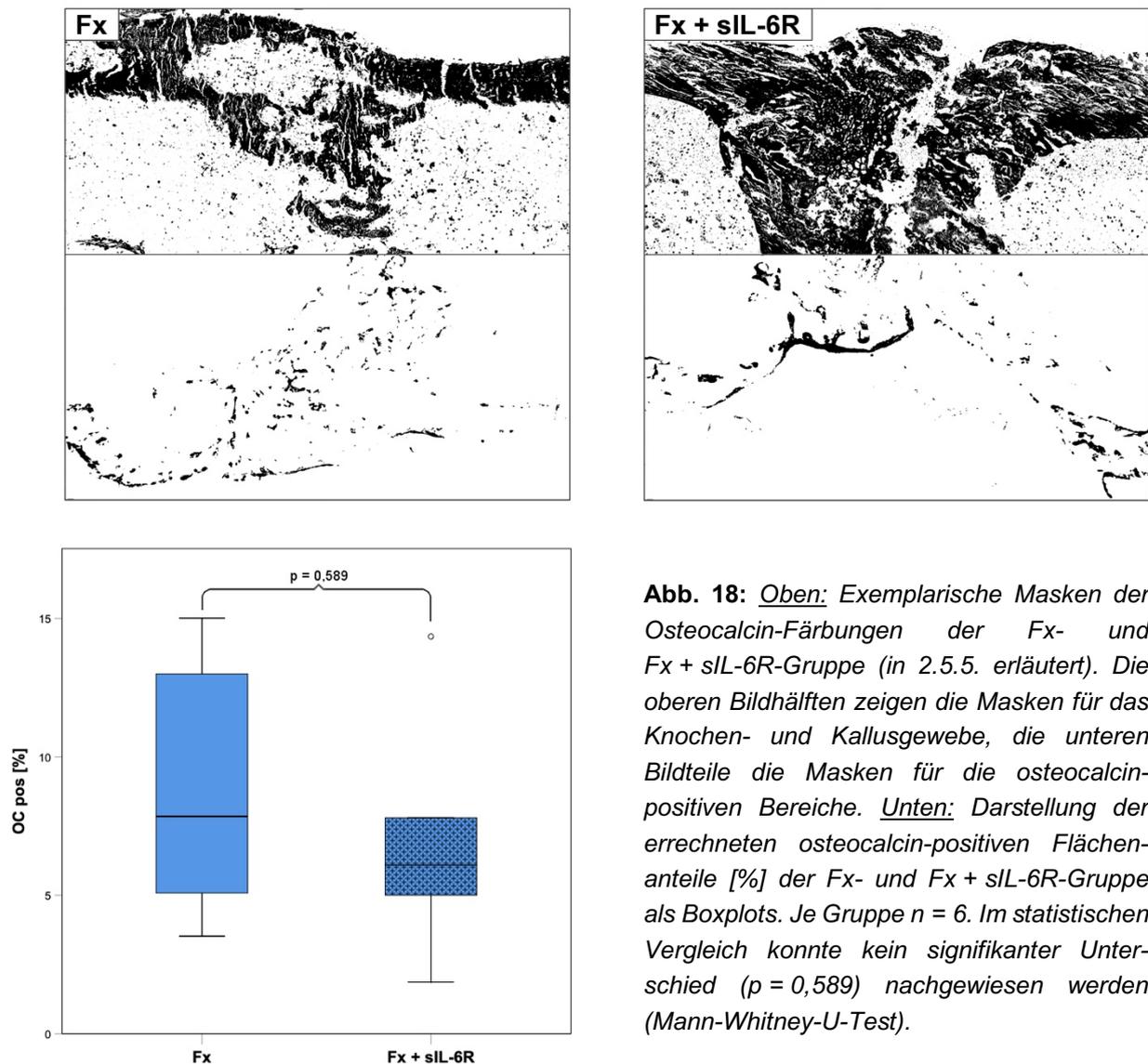


Abb. 18: Oben: Exemplarische Masken der Osteocalcin-Färbungen der Fx- und Fx + sIL-6R-Gruppe (in 2.5.5. erläutert). Die oberen Bildhälften zeigen die Masken für das Knochen- und Kallusgewebe, die unteren Bildteile die Masken für die osteocalcin-positiven Bereiche. Unten: Darstellung der errechneten osteocalcin-positiven Flächenanteile [%] der Fx- und Fx + sIL-6R-Gruppe als Boxplots. Je Gruppe n = 6. Im statistischen Vergleich konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,589$) nachgewiesen werden (Mann-Whitney-U-Test).

Tab. 6: Übersicht der in der histologischen Aufarbeitung der Präparate erhobenen Messwerte für die Gruppen Fx und Fx + sIL-6R sowie statistische Ergebnisse des direkten Gruppenvergleiches (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung mittels Median und IQR. Je Gruppe n = 6. * $p < 0,05$.

	I Fx	IQR	II Fx + sIL-6R	IQR	Signifikanz
Osteoklasten / mm ²	80,2	53,1 - 93,8	30,5	20,9 - 64,3	$p = 0,041^*$
OC pos [%]	7,9	4,7 - 13,5	6,1	4,2 - 9,4	$p = 0,589$

Fx vs. Fx + sIL-6R-Ak

Nach der Blockierung des Transsignaling-Mechanismus identifizierten wir in der histologischen Aufarbeitung in Gruppe III eine signifikant verminderte Dichte an Osteoklasten pro mm^2 (80,2; IQR 53,1 - 93,8 vs. 25,6; IQR 21,0 - 31,7; $p = 0.004$; Abb. 19; Tab. 7).

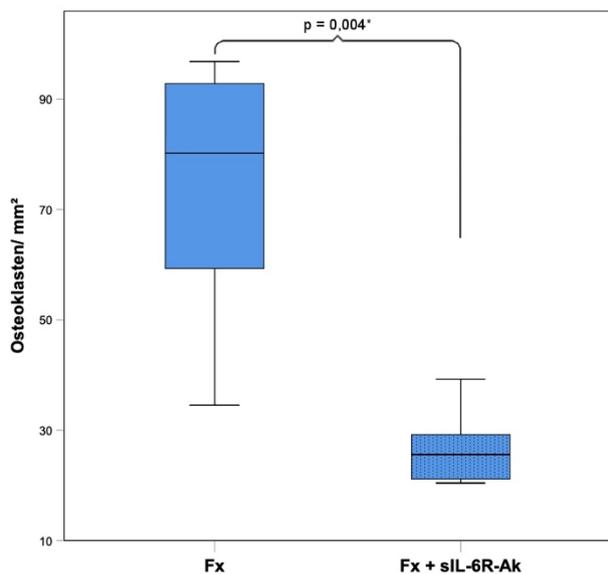
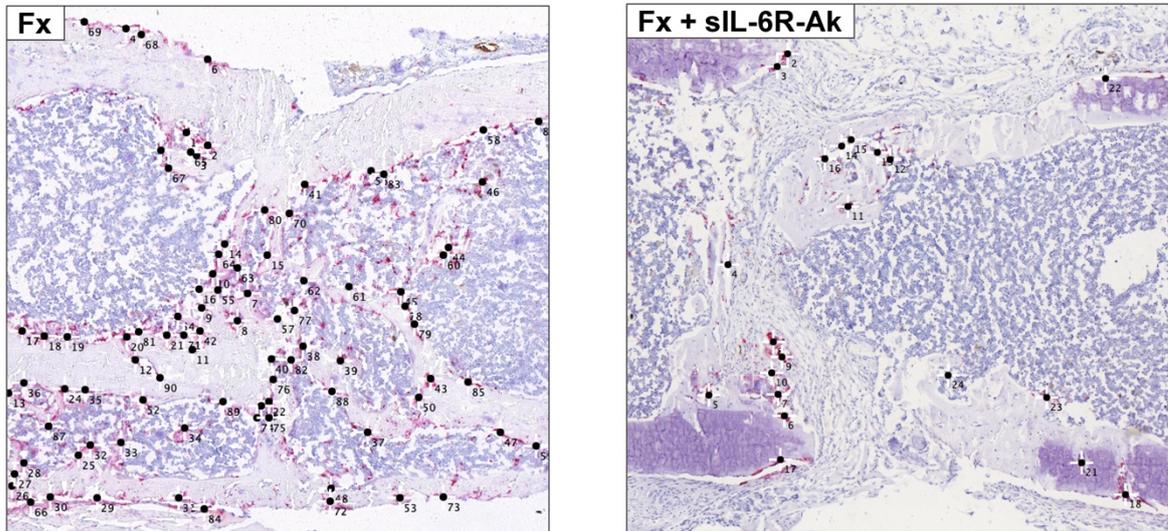


Abb. 19: Oben: Exemplarische mikroskopische Übersichtsaufnahmen der TRAP-Färbungen der Fx- und Fx + sIL-6R-Ak-Gruppe. Jeder identifizierte Osteoklast wurde jeweils mit einem fortlaufend nummerierten Punkt markiert. Unten: Darstellung der ermittelten Osteoklastendichte pro mm^2 als Boxplots für die Fx- und Fx + sIL-6R-Ak-Gruppe. Je Gruppe $n = 6$. Im statistischen Vergleich beider Gruppen konnte in der Frakturgruppe mit blockiertem Transsignaling eine signifikant geringere ($p = 0,004$) Osteoklastendichte pro mm^2 identifiziert werden (Mann-Whitney-U-Test).

In der Osteocalcin-Färbung konnten nach der Blockung des Transssignalings kein signifikanter Unterschied in den osteocalcin-positiven Flächenanteilen beobachtet werden (Abb. 20; Tab. 7).

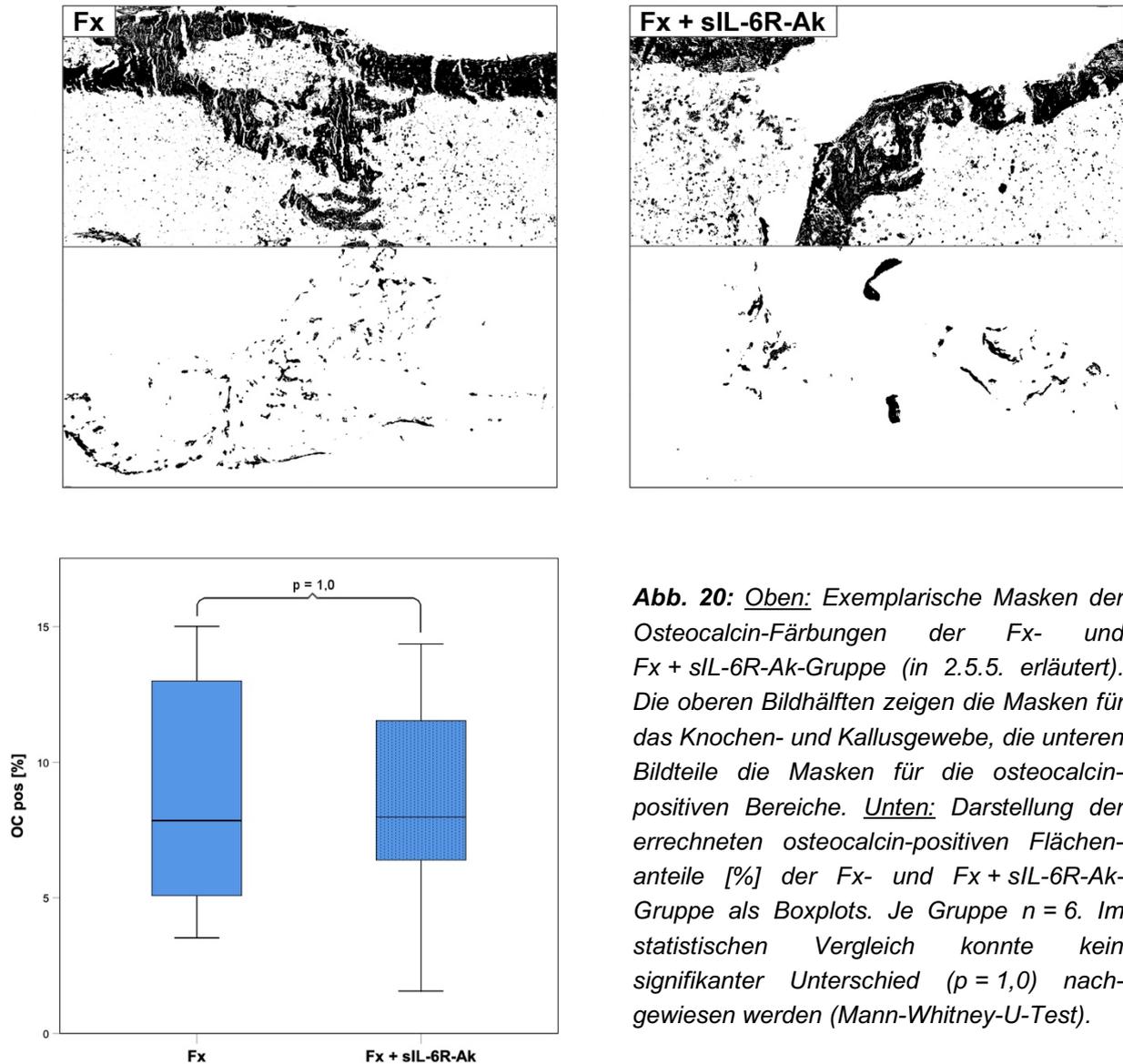


Abb. 20: Oben: Exemplarische Masken der Osteocalcin-Färbungen der Fx- und Fx + sIL-6R-Ak-Gruppe (in 2.5.5. erläutert). Die oberen Bildhälften zeigen die Masken für das Knochen- und Kallusgewebe, die unteren Bildteile die Masken für die osteocalcin-positiven Bereiche. Unten: Darstellung der errechneten osteocalcin-positiven Flächenanteile [%] der Fx- und Fx + sIL-6R-Ak-Gruppe als Boxplots. Je Gruppe $n = 6$. Im statistischen Vergleich konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 1,0$) nachgewiesen werden (Mann-Whitney-U-Test).

Tab. 7: Übersicht der in der histologischen Aufarbeitung der Präparate erhobenen Messwerte für die Gruppen Fx und Fx + sIL-6R-Ak sowie statistische Ergebnisse des direkten Gruppenvergleiches (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung mittels Median und IQR. Je Gruppe $n = 6$. * $p < 0,05$

	I Fx	IQR	III Fx + sIL-6R-Ak	IQR	Signifikanz
Osteoklasten / mm ²	80,2	53,1 - 93,8	25,6	21,0 - 31,7	$p = 0,004^*$
OC pos [%]	7,9	4,7 - 13,5	8,0	5,2 - 12,2	$p = 1,0$

Fx + sIL-6R vs. Fx + sIL-6R-Ak

Im direkten Vergleich der Gruppen sowohl mit gesteigertem als auch blockiertem Transsignaling konnten bei der Auszählung der Osteoklasten keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden (Abb. 21; Tab. 8).

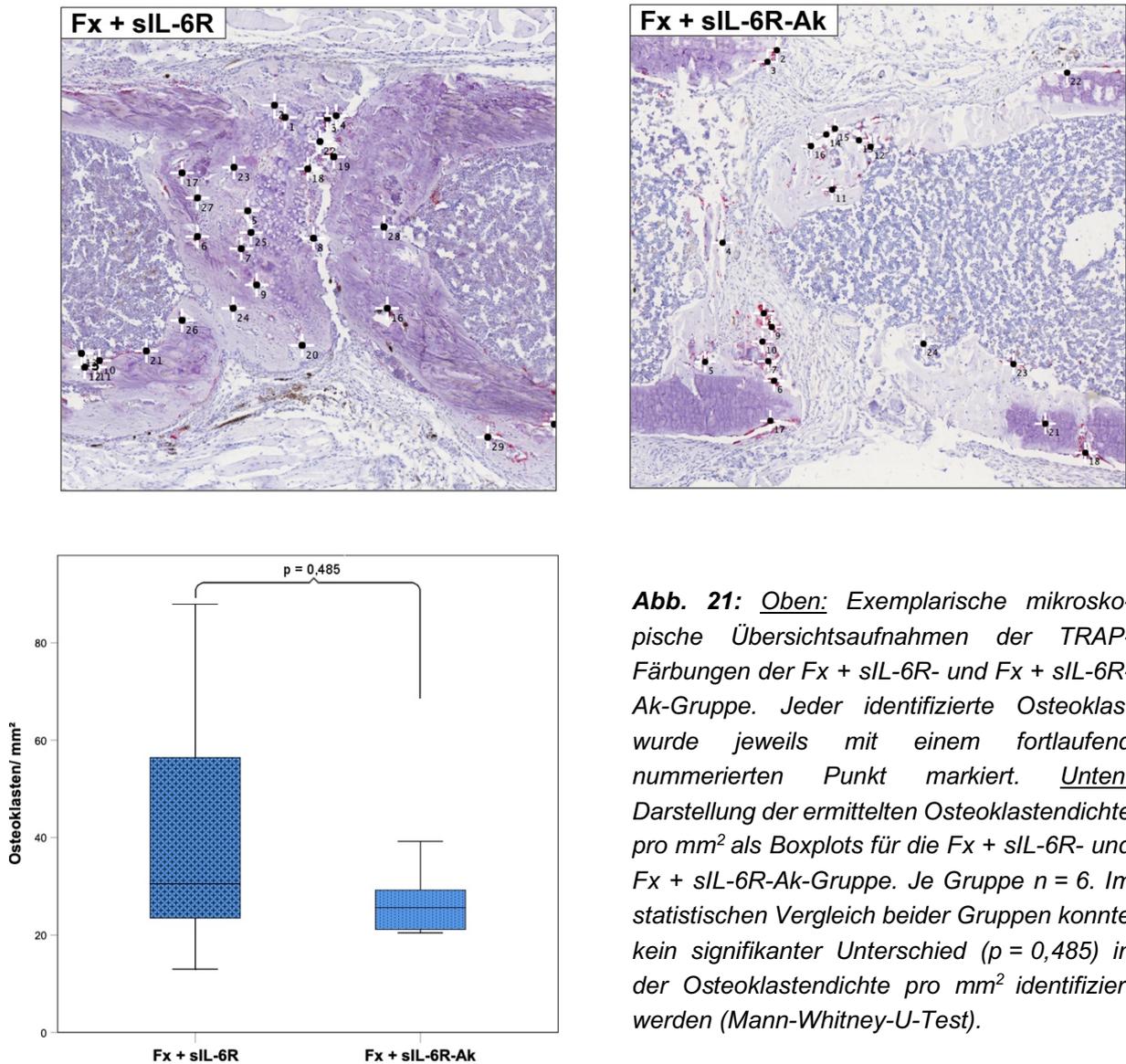


Abb. 21: Oben: Exemplarische mikroskopische Übersichtsaufnahmen der TRAP-Färbungen der Fx + sIL-6R- und Fx + sIL-6R-Ak-Gruppe. Jeder identifizierte Osteoklast wurde jeweils mit einem fortlaufend nummerierten Punkt markiert. Unten: Darstellung der ermittelten Osteoklastendichte pro mm² als Boxplots für die Fx + sIL-6R- und Fx + sIL-6R-Ak-Gruppe. Je Gruppe n = 6. Im statistischen Vergleich beider Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,485$) in der Osteoklastendichte pro mm² identifiziert werden (Mann-Whitney-U-Test).

In der Osteocalcin-Färbung konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in den osteocalcin-positiven Flächenanteilen beobachtet werden (Abb. 22; Tab. 8).

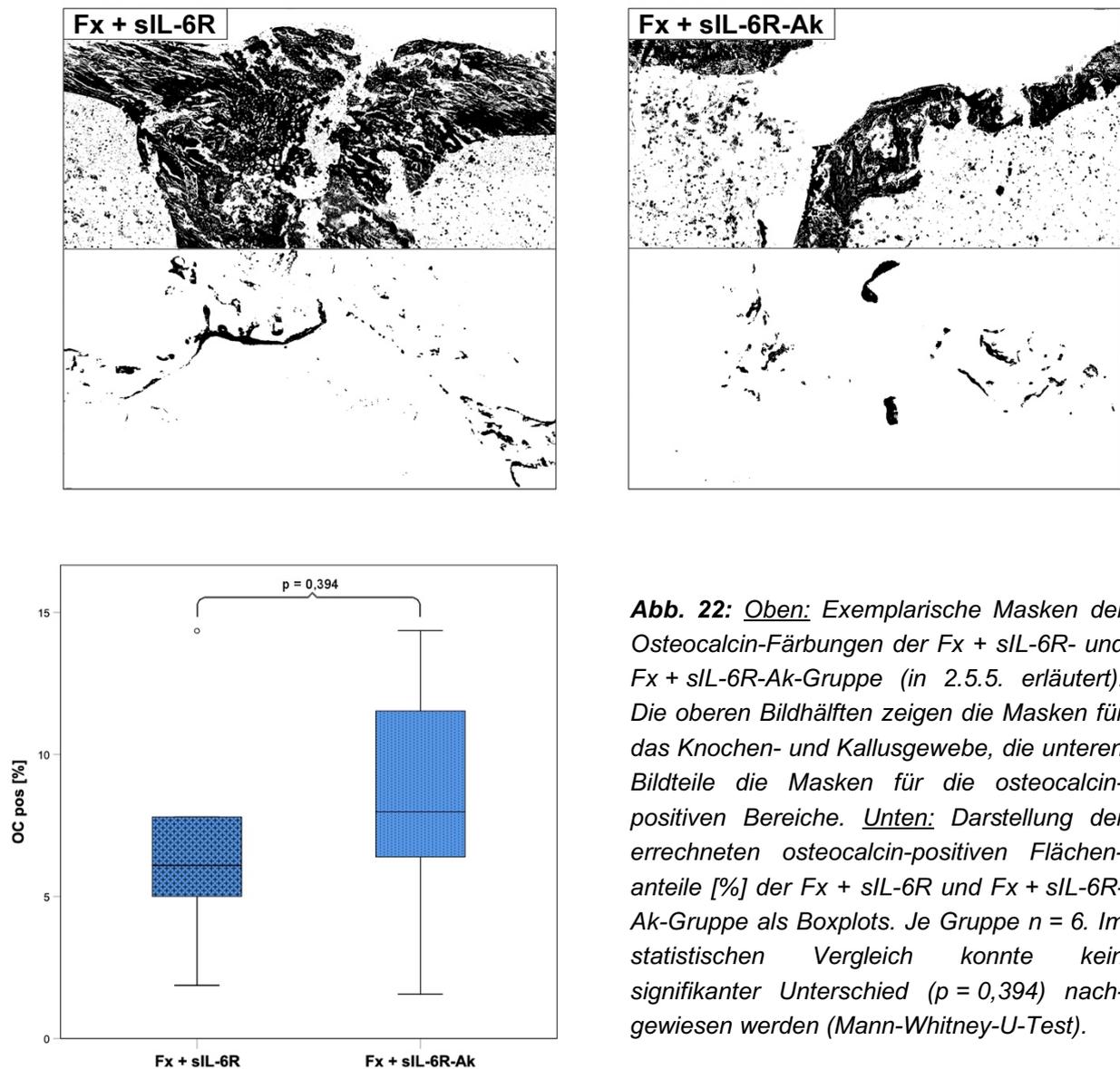


Abb. 22: Oben: Exemplarische Masken der Osteocalcin-Färbungen der Fx + sIL-6R- und Fx + sIL-6R-Ak-Gruppe (in 2.5.5. erläutert). Die oberen Bildhälften zeigen die Masken für das Knochen- und Kallusgewebe, die unteren Bildteile die Masken für die osteocalcin-positiven Bereiche. Unten: Darstellung der errechneten osteocalcin-positiven Flächenanteile [%] der Fx + sIL-6R und Fx + sIL-6R-Ak-Gruppe als Boxplots. Je Gruppe n = 6. Im statistischen Vergleich konnte kein signifikanter Unterschied (p = 0,394) nachgewiesen werden (Mann-Whitney-U-Test).

Tab. 8: Übersicht der in der histologischen Aufarbeitung der Präparate erhobenen Messwerte für die Gruppen Fx + sIL-6R und Fx + sIL-6R sowie statistische Ergebnisse des direkten Gruppenvergleiches (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung mittels Median und IQR. Je Gruppe n = 6.

	II Fx + sIL-6R	IQR	III Fx + sIL-6R-Ak	IQR	Signifikanz
Osteoklasten / mm ²	30,5	20,9 - 64,3	25,6	21,0 - 31,7	p = 0,485
OC pos [%]	6,1	4,2 - 9,4	8,0	5,2 - 12,2	p = 0,394

3.3. Einfluss des Transsignaling-Mechanismus auf die Frakturheilung beim Polytrauma

In diesem Teil der Studie untersuchten wir den Einfluss des Transsignaling-Mechanismus auf die Frakturheilung im Falle eines Polytraumas.

3.3.1. μ CT

PT vs. PT + sIL-6R

Bei der Steigerung des Transsignaling-Mechanismus in der PT Gruppe (Gruppe IV [PT] vs. Gruppe V [PT + sIL-6R]) konnten keine signifikanten Unterschiede in Parametern der TV, BV, BV/TV und den Volumina für die Kallusmitte, den Kallusrand und der Kortikalis identifiziert werden (Abb. 23; Tab.9).

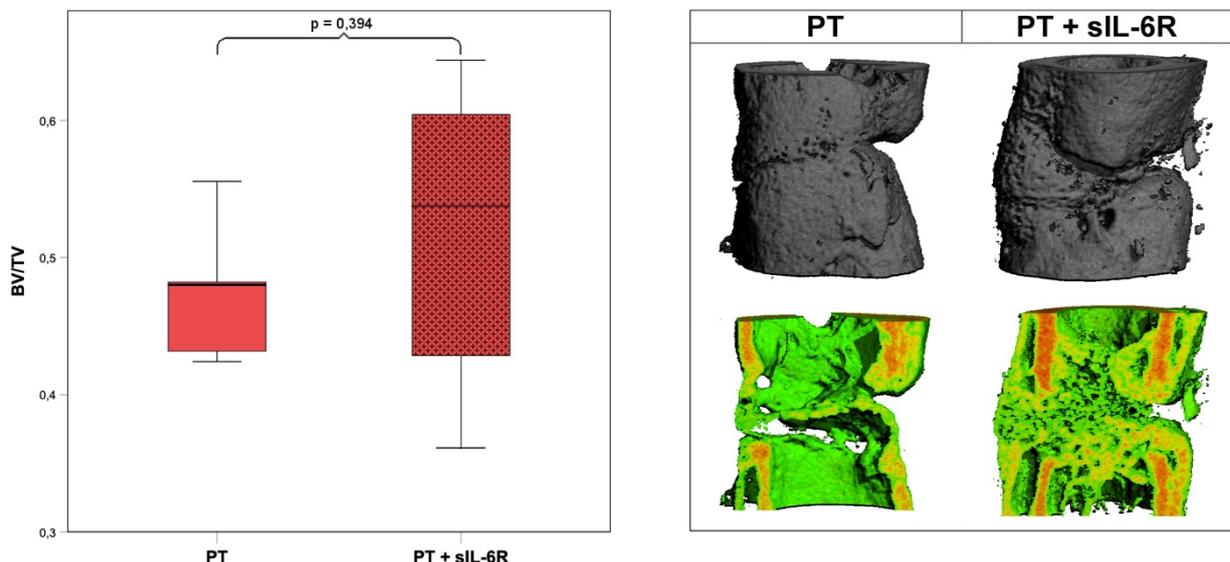


Abb. 23: Links: Darstellung der Messdaten für die errechnete Knochenmineralisierung BV/TV als Boxplots für die PT- und sIL-6R-Gruppe. Je Gruppe n = 6. Eine weitere Steigerung des Transsignalings ergab keine signifikante Veränderung des Mineralisierungsgrades im Bereich des Frakturspaltes (BV/TV; p = 0,394; Mann-Whitney-U-Test). Rechts: Gegenüberstellung der femoralen Frakturheilung beider Gruppen anhand 3D-Rekonstruktionen aus den CT-Schnitten exemplarischer Proben und zugehörigem Längsschnitt.

Tab. 9: Übersicht der im μ CT erhobenen Messwerte für die Gruppen PT und PT + sIL-6R sowie statistische Ergebnisse des direkten Gruppenvergleiches (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung mittels Median und IQR. Je Gruppe n = 6.

	IV PT	IQR	V PT + sIL-6R	IQR	Signifikanz
TV [mm ³]	3,53	2,68 - 5,45	3,21	2,78 - 4,15	p = 0,699
BV [mm ³]	1,82	1,26 - 2,42	1,82	1,23 - 2,50	p = 1,0
BV/TV	0,48	0,43 - 0,50	0,49	0,41 - 0,61	p = 0,394
Kallusmitte [mm ³]	0,019	0,012 - 0,033	0,015	0,011 - 0,023	p = 0,485
Kallusrand [mm ³]	0,1	0,069 - 0,113	0,09	0,074 - 0,108	p = 0,937
Kortikalis [mm ³]	0,78	0,74 - 0,82	0,83	0,62 - 0,91	p = 0,699

PT vs. PT + sIL-6R-Ak

Um den Einfluss einer Blockade des Transsignalings nach einem Polytrauma auf die Frakturheilung zu untersuchen, verglichen wir Gruppe IV (PT) mit Gruppe VI (PT + sIL-6R-Ak).

In der μ CT-Analyse hatte eine Blockade des Transsignalings eine signifikante Erhöhung der Knochenmineralisierung zur Folge (BV/TV; 0,48; IQR 0,43 - 0,50 vs. 0,56; IQR 0,52 - 0,62; $p = 0,015$); Abb. 24; Tab. 10).

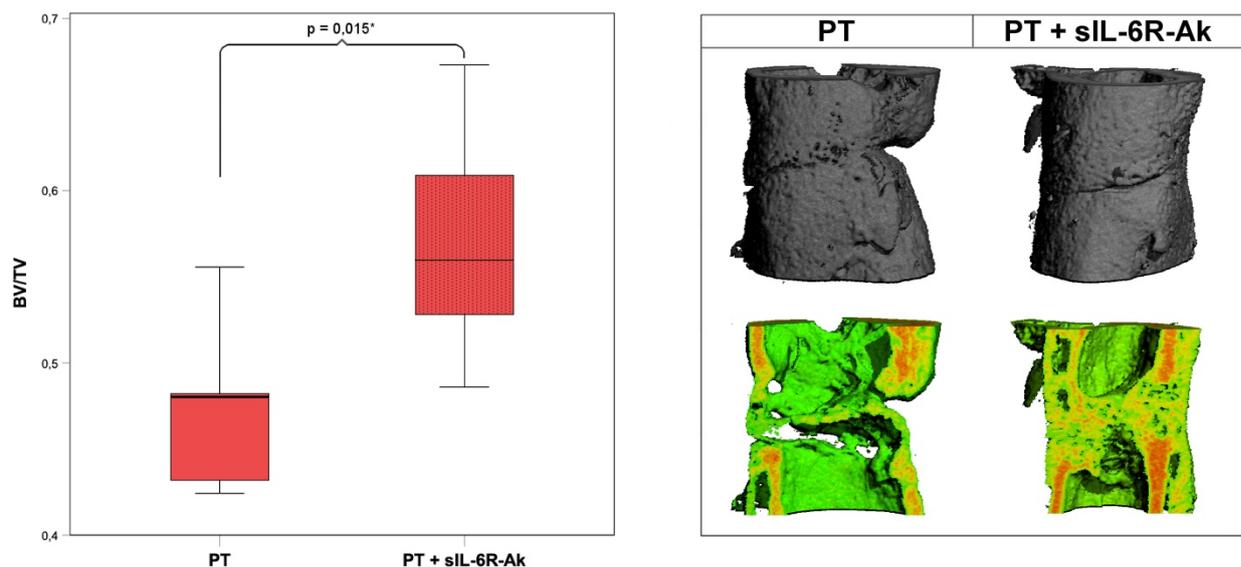


Abb. 24: Links: Darstellung der Messdaten für die errechnete Knochenmineralisierung BV/TV als Boxplots für die PT- und PT + sIL-6R-Ak-Gruppe. Je Gruppe $n = 6$. Die Blockade des Transsignalings im Polytrauma durch die Applikation des sIL-6R-Ak ging mit einer signifikanten Erhöhung des Mineralisierungsgrades im Bereich des Frakturspalttes einher (BV/TV; $p = 0,015$; Mann-Whitney-U-Test). Rechts: Gegenüberstellung der femoralen Frakturheilung beider Gruppen anhand 3D-Rekonstruktionen aus den CT-Schnitten exemplarischer Proben und zugehörigem Längsschnitt.

Tab. 10: Übersicht der im μ CT erhobenen Messwerte für die Gruppen PT und PT + sIL-6R-Ak sowie statistische Ergebnisse des direkten Gruppenvergleiches (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung mittels Median und IQR. Je Gruppe $n = 6$. * $p < 0,05$.

	IV PT	IQR	VI PT + sIL-6R-Ak	IQR	Signifikanz
TV [mm ³]	3,53	2,68 - 5,45	4,06	3,25 - 5,53	$p = 0,699$
BV [mm ³]	1,82	1,26 - 2,42	2,43	1,99 - 2,89	$p = 0,180$
BV/TV	0,48	0,43 - 0,50	0,56	0,52 - 0,62	$p = 0,015^*$
Kallusmitte [mm ³]	0,019	0,012 - 0,033	0,028	0,022 - 0,034	$p = 0,485$
Kallusrand [mm ³]	0,1	0,069 - 0,113	0,11	0,081 - 0,125	$p = 0,989$
Kortikalis [mm ³]	0,78	0,74 - 0,82	0,80	0,65 - 0,83	$p = 0,937$

PT + sIL-6R vs. PT + sIL-6R-Ak

Beim direkten Vergleich der PT-Gruppen mit gesteigertem und geblocktem Transsignaling konnten in der μ CT-Analyse keine signifikanten Unterschiede identifiziert werden (Abb. 25; Tab. 11).

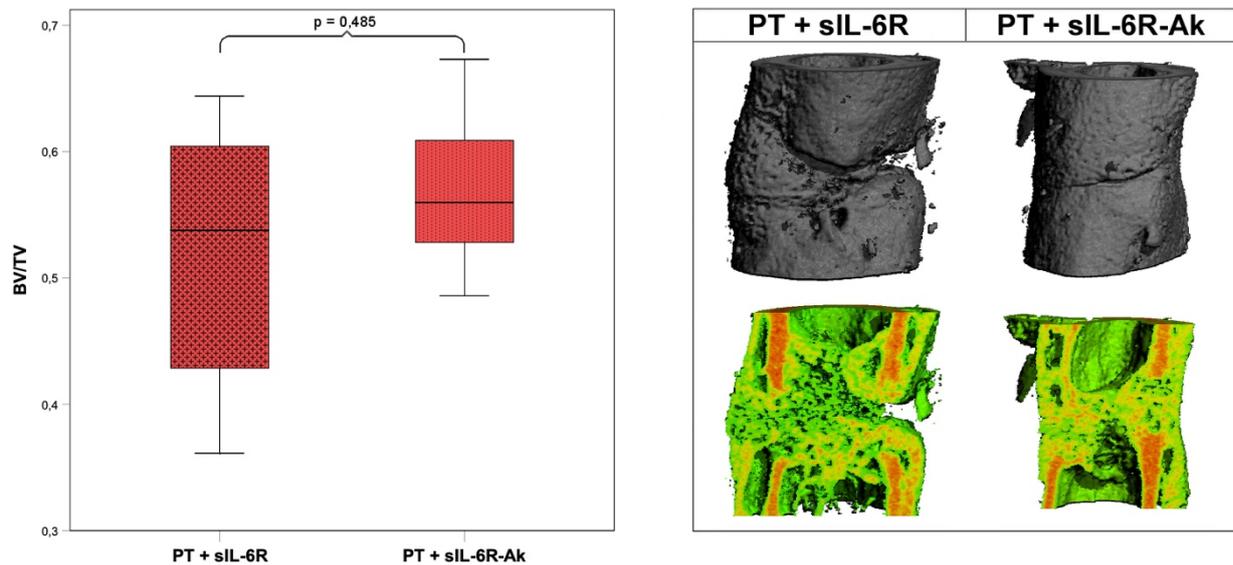


Abb. 25: Links: Darstellung der Messdaten für die errechnete Knochenmineralisierung BV/TV als Boxplots für die PT + sIL-6R- und PT + sIL-6R-Ak-Gruppe. Je Gruppe $n = 6$. Der direkte Vergleich des Effektes der Blockade und der Steigerung des Transsignaling im Polytrauma ergab statistisch keinen signifikanten Unterschied des Mineralisierungsgrades im Bereich des Frakturspaltes (BV/TV; $p = 0,485$; Mann-Whitney-U-Test). Rechts: Gegenüberstellung der femoralen Frakturheilung beider Gruppen anhand 3D-Rekonstruktionen aus den CT-Schnitten exemplarischer Proben und zugehörigem Längsschnitt.

Tab. 11: Übersicht der im μ CT erhobenen Messwerte für die Gruppen PT + sIL-6R und PT + sIL-6R-Ak sowie statistische Ergebnisse des direkten Gruppenvergleiches (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung mittels Median und IQR. Je Gruppe $n = 6$.

	V PT + sIL-6R	IQR	VI PT + sIL-6R-Ak	IQR	Signifikanz
TV [mm ³]	3,21	2,78 - 4,15	4,06	3,25 - 5,53	$p = 0,310$
BV [mm ³]	1,82	1,23 - 2,50	2,43	1,99 - 2,89	$p = 0,180$
BV/TV	0,49	0,41 - 0,61	0,56	0,52 - 0,62	$p = 0,485$
Kallusmitte [mm ³]	0,015	0,011 - 0,023	0,028	0,022 - 0,034	$p = 0,180$
Kallusrand [mm ³]	0,09	0,074 - 0,108	0,11	0,081 - 0,125	$p = 0,485$
Kortikalis [mm ³]	0,83	0,62 - 0,91	0,80	0,65 - 0,83	$p = 0,485$

3.3.2 Histologie

PT vs. PT + sIL-6R

In der histologischen Aufarbeitung konnten wir nach der zusätzlichen Steigerung des Transsignalings, bei der Auszählung der Osteoklasten keinen signifikanten ($p = 0,329$) Unterschied in der Osteoklastendichte beobachten (Abb. 26; Tab. 12)

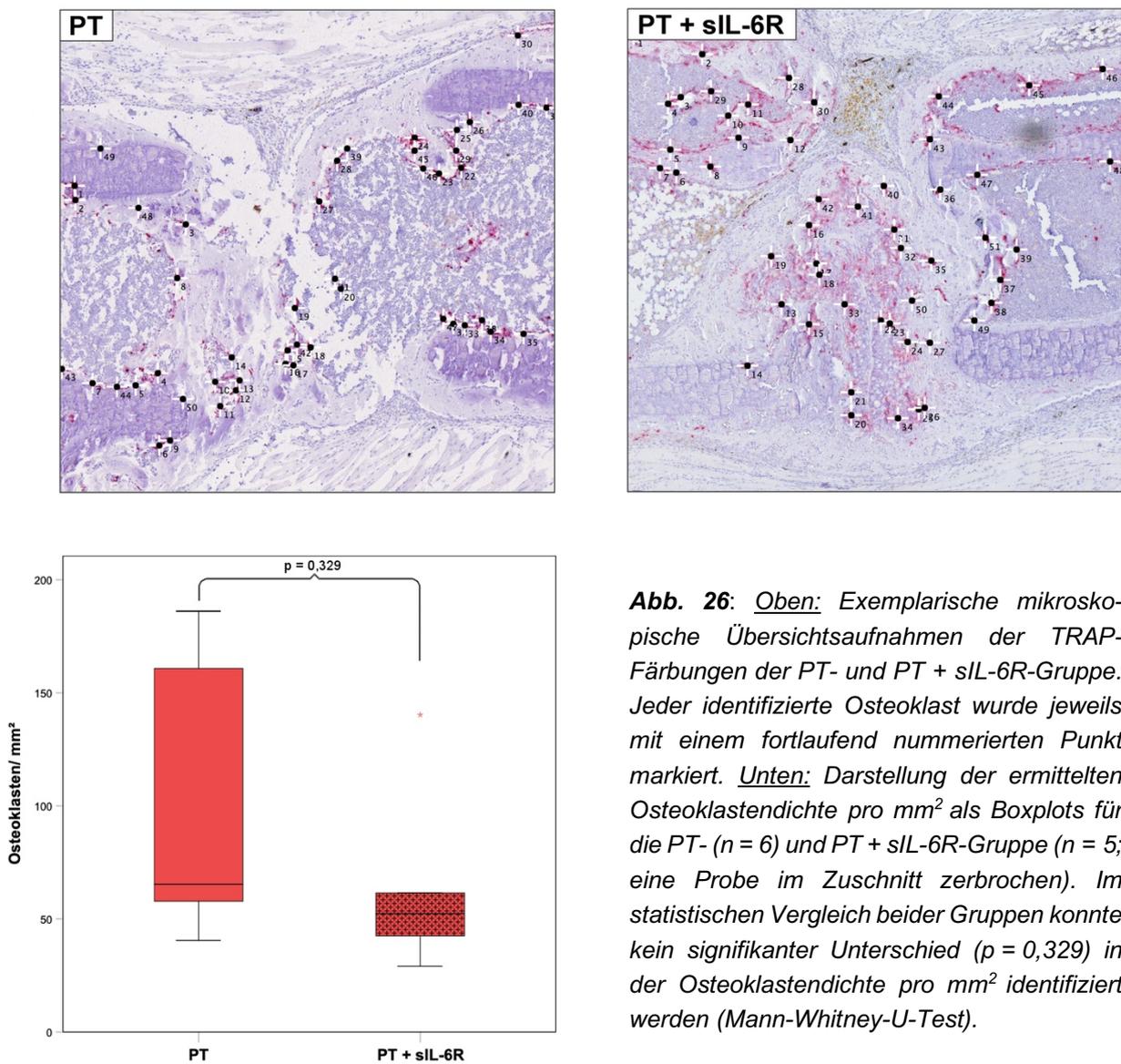


Abb. 26: Oben: Exemplarische mikroskopische Übersichtsaufnahmen der TRAP-Färbungen der PT- und PT + sIL-6R-Gruppe. Jeder identifizierte Osteoklast wurde jeweils mit einem fortlaufend nummerierten Punkt markiert. Unten: Darstellung der ermittelten Osteoklastendichte pro mm² als Boxplots für die PT- ($n = 6$) und PT + sIL-6R-Gruppe ($n = 5$; eine Probe im Zuschnitt zerbrochen). Im statistischen Vergleich beider Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,329$) in der Osteoklastendichte pro mm² identifiziert werden (Mann-Whitney-U-Test).

In der Osteocalcin-Färbung konnten ebenfalls keine signifikanten ($p = 0,126$) Unterschiede identifiziert werden (Abb. 27; Tab 12).

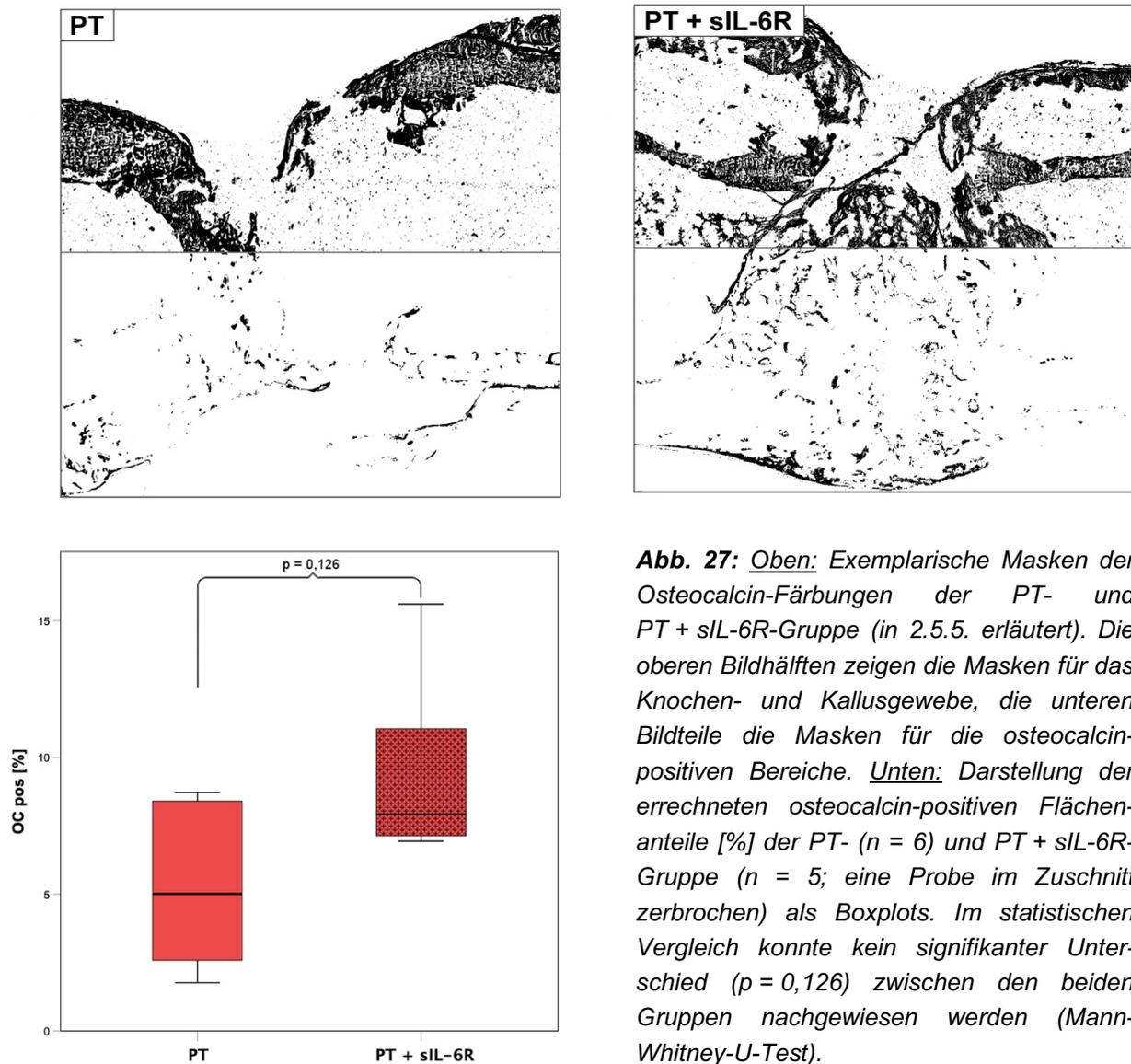


Abb. 27: *Oben:* Exemplarische Masken der Osteocalcin-Färbungen der PT- und PT + sIL-6R-Gruppe (in 2.5.5. erläutert). Die oberen Bildhälften zeigen die Masken für das Knochen- und Kallusgewebe, die unteren Bildteile die Masken für die osteocalcin-positiven Bereiche. *Unten:* Darstellung der errechneten osteocalcin-positiven Flächenanteile [%] der PT- ($n = 6$) und PT + sIL-6R-Gruppe ($n = 5$; eine Probe im Zuschnitt zerbrochen) als Boxplots. Im statistischen Vergleich konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,126$) zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden (Mann-Whitney-U-Test).

Tab. 12: Übersicht der in der histologischen Aufarbeitung der Präparate erhobenen Messwerte für die Gruppen PT ($n = 6$) und PT + sIL-6R ($n = 5$) sowie statistische Ergebnisse des direkten Gruppenvergleiches (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung mittels Median und IQR.

	IV PT	IQR	V PT + sIL-6R	IQR	Signifikanz
Osteoklasten / mm^2	65,3	53,5 - 167,1	52,4	35,8 - 100,9	$p = 0,329$
OC pos [%]	5,0	2,4 - 8,5	7,9	7,0 - 13,3	$p = 0,126$

PT vs. PT + sIL-6R-Ak

Histologisch konnten keine signifikanten Unterschiede ausgemacht werden. In der Gruppe mit blockiertem Transsignaling identifizierten wir einen höheren Anteil osteocalcin-positiver Bereiche, die jedoch nicht als signifikant nachgewiesen werden konnten (Abb. 28 und 29; Tab. 13).

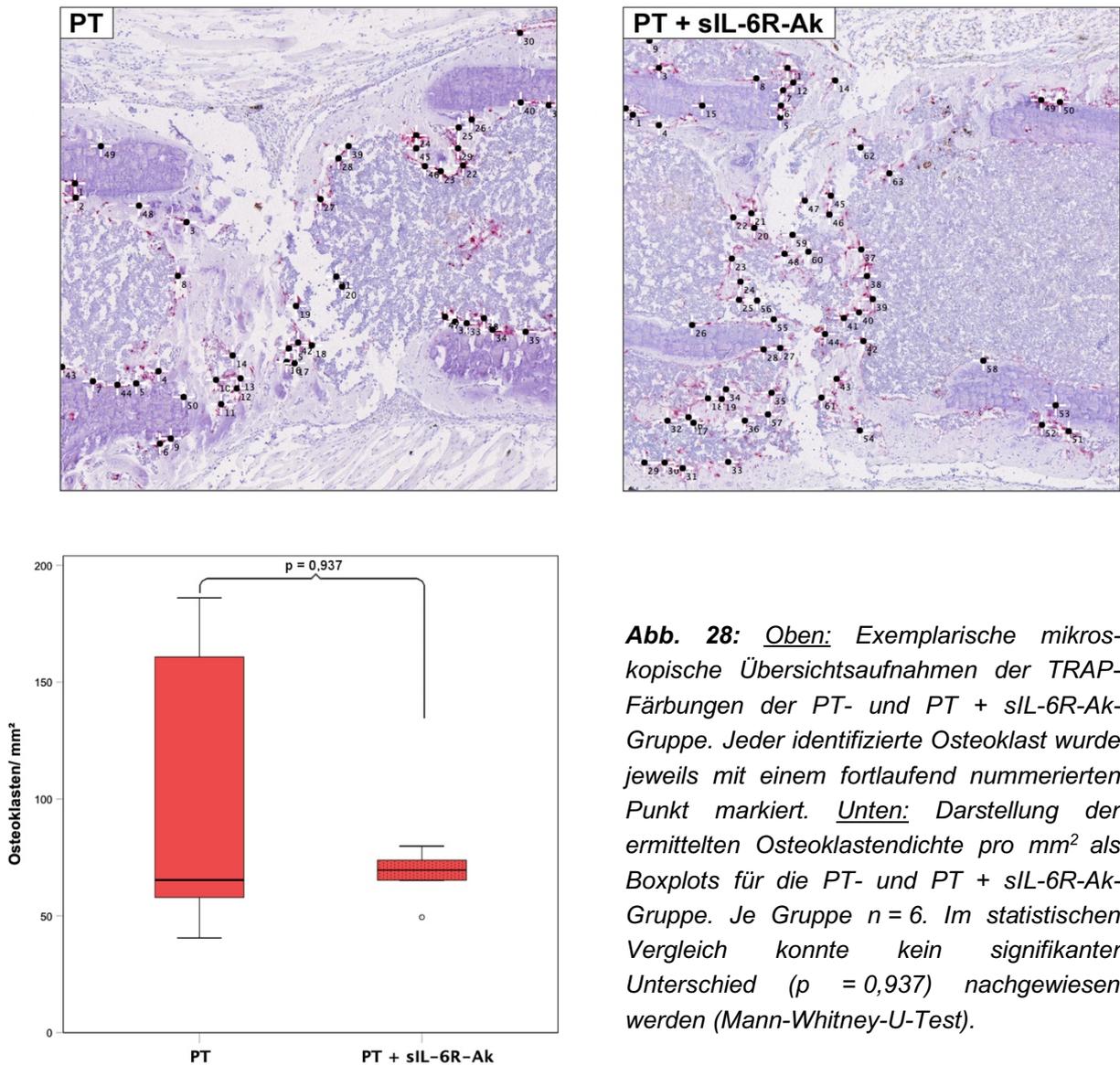


Abb. 28: Oben: Exemplarische mikroskopische Übersichtsaufnahmen der TRAP-Färbungen der PT- und PT + sIL-6R-Ak-Gruppe. Jeder identifizierte Osteoklast wurde jeweils mit einem fortlaufend nummerierten Punkt markiert. Unten: Darstellung der ermittelten Osteoklastendichte pro mm² als Boxplots für die PT- und PT + sIL-6R-Ak-Gruppe. Je Gruppe n = 6. Im statistischen Vergleich konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,937$) nachgewiesen werden (Mann-Whitney-U-Test).

In der Auswertung der Osteocalcin-Färbung konnten keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,065$) ausgemacht werden (Abb. 29; Tab. 13).

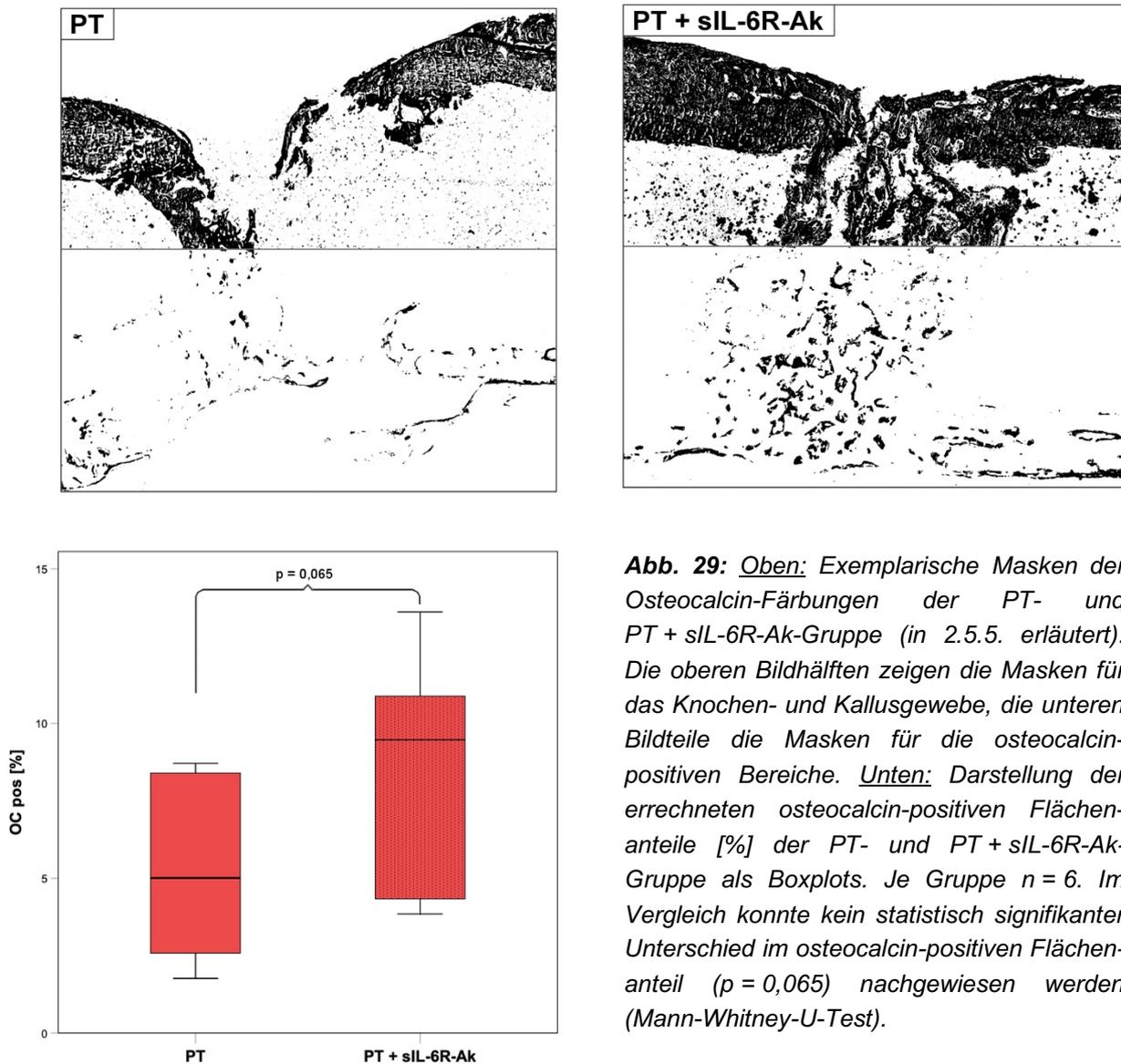


Abb. 29: Oben: Exemplarische Masken der Osteocalcin-Färbungen der PT- und PT + sIL-6R-Ak-Gruppe (in 2.5.5. erläutert). Die oberen Bildhälften zeigen die Masken für das Knochen- und Kallusgewebe, die unteren Bildteile die Masken für die osteocalcin-positiven Bereiche. Unten: Darstellung der errechneten osteocalcin-positiven Flächenanteile [%] der PT- und PT + sIL-6R-Ak-Gruppe als Boxplots. Je Gruppe $n = 6$. Im Vergleich konnte kein statistisch signifikanter Unterschied im osteocalcin-positiven Flächenanteil ($p = 0,065$) nachgewiesen werden (Mann-Whitney-U-Test).

Tab. 13: Übersicht der in der histologischen Aufarbeitung der Präparate erhobenen Messwerte für die Gruppen PT und PT + sIL-6R-Ak sowie statistische Ergebnisse des direkten Gruppenvergleiches (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung mittels Median und IQR. Je Gruppe $n = 6$.

	IV PT	IQR	VI PT + sIL-6R-Ak	IQR	Signifikanz
Osteoklasten / mm^2	65,3	53,5 - 167,1	69,6	61,3 - 75,3	$p = 0,937$
OC pos [%]	5,0	2,4 - 8,5	9,5	4,2 - 11,6	$p = 0,065$

PT + sIL-6R vs. PT + sIL-6R-Ak

Auch im direkten Vergleich der PT-Gruppen mit gesteigertem und blockiertem Transsignaling konnte in der histologischen Aufarbeitung kein signifikanter ($p = 0,247$) Unterschied in der Osteoklastendichte beobachtet werden (Abb. 30; Tab. 14).

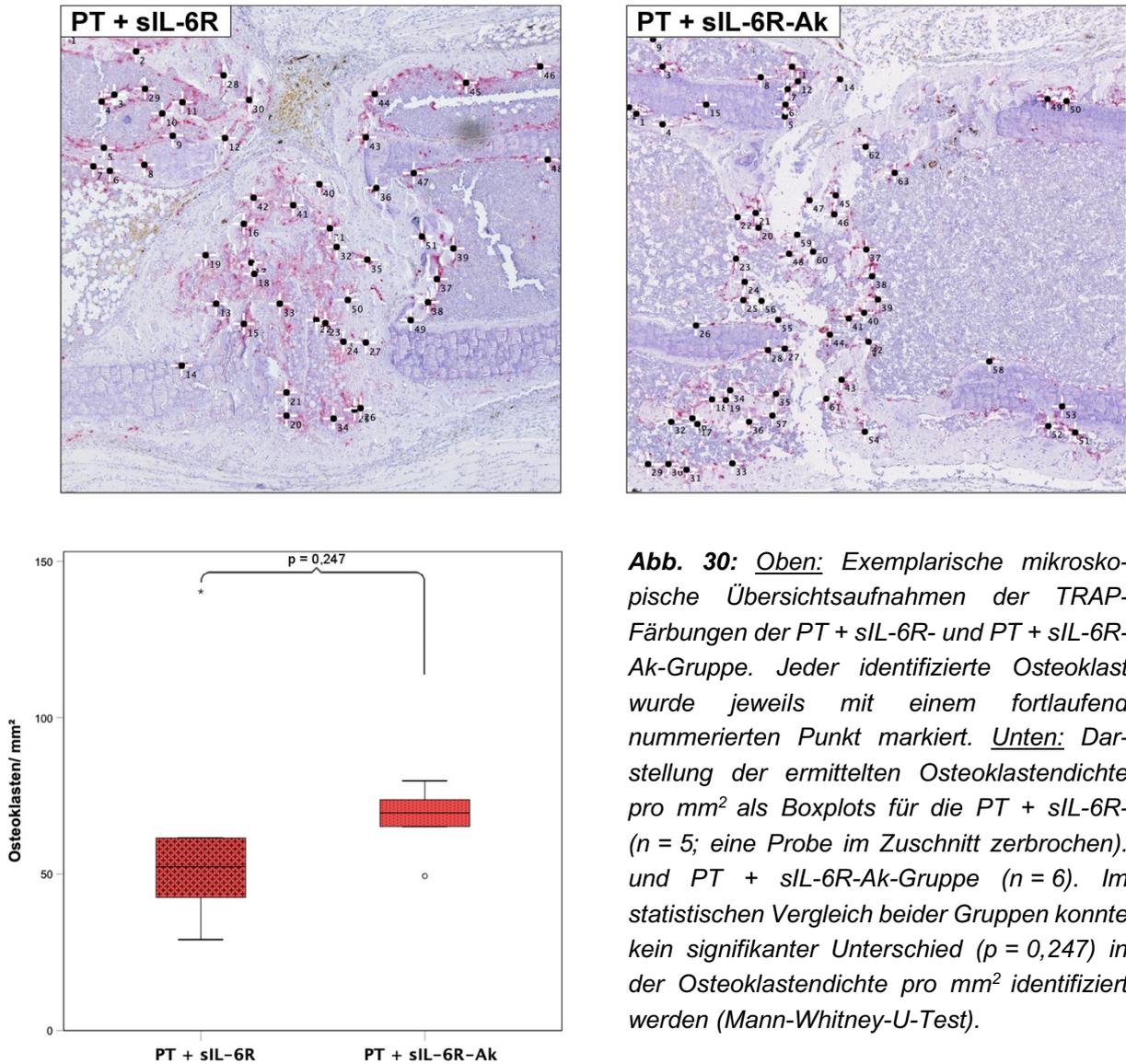


Abb. 30: *Oben:* Exemplarische mikroskopische Übersichtsaufnahmen der TRAP-Färbungen der PT + sIL-6R- und PT + sIL-6R-Ak-Gruppe. Jeder identifizierte Osteoklast wurde jeweils mit einem fortlaufend nummerierten Punkt markiert. *Unten:* Darstellung der ermittelten Osteoklastendichte pro mm² als Boxplots für die PT + sIL-6R- ($n = 5$; eine Probe im Zuschnitt zerbrochen) und PT + sIL-6R-Ak-Gruppe ($n = 6$). Im statistischen Vergleich beider Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,247$) in der Osteoklastendichte pro mm² identifiziert werden (Mann-Whitney-U-Test).

Ebenso in der Auswertung der Osteocalcin-Färbung konnten keine signifikanten ($p = 0,792$) Unterschiede ausgemacht werden (Abb. 31; Tab. 14).

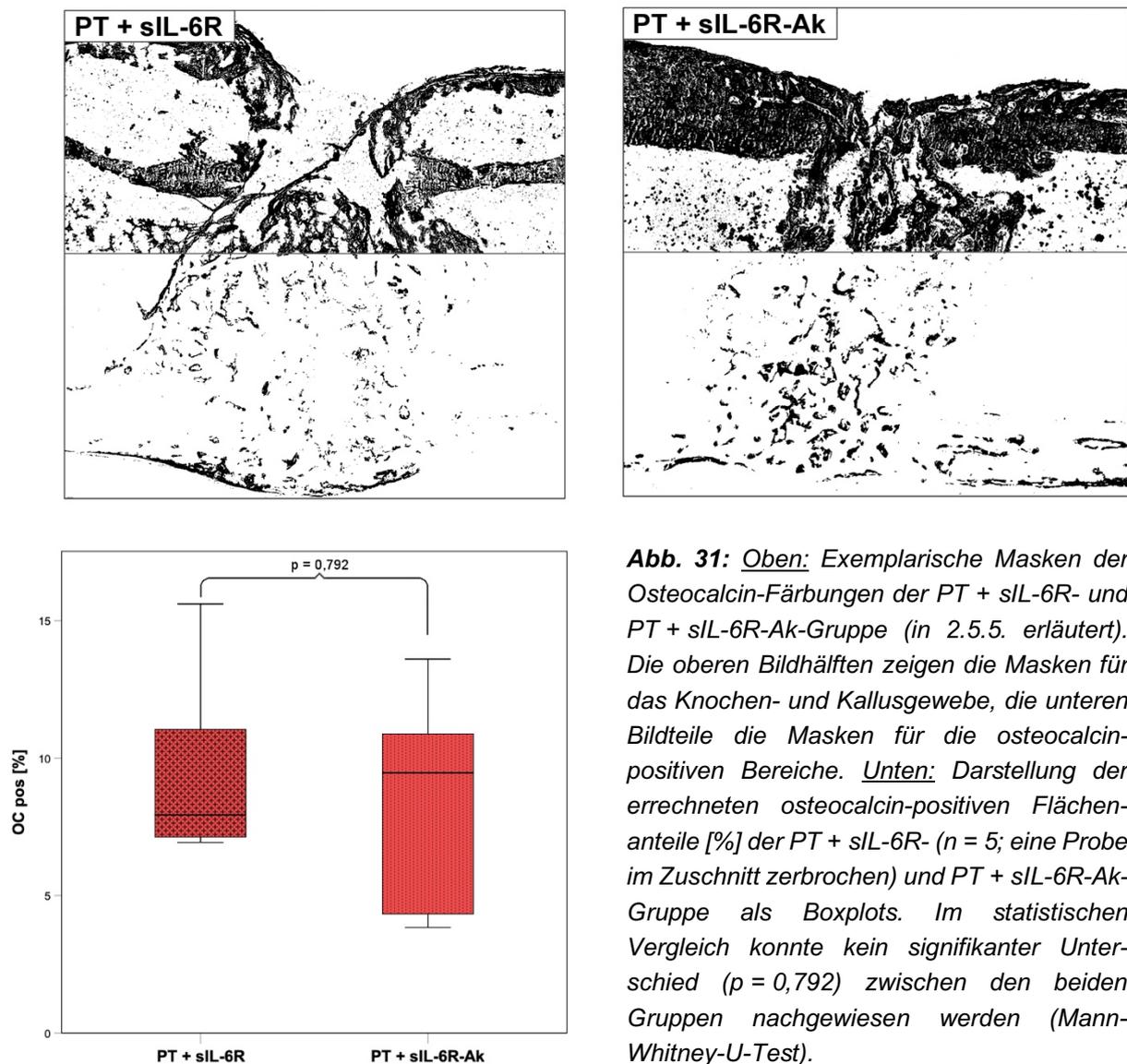


Abb. 31: Oben: Exemplarische Masken der Osteocalcin-Färbungen der PT + sIL-6R- und PT + sIL-6R-Ak-Gruppe (in 2.5.5. erläutert). Die oberen Bildhälften zeigen die Masken für das Knochen- und Kallusgewebe, die unteren Bildteile die Masken für die osteocalcin-positiven Bereiche. Unten: Darstellung der errechneten osteocalcin-positiven Flächenanteile [%] der PT + sIL-6R- ($n = 5$; eine Probe im Zuschnitt zerbrochen) und PT + sIL-6R-Ak-Gruppe als Boxplots. Im statistischen Vergleich konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,792$) zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden (Mann-Whitney-U-Test).

Tab. 14: Übersicht der in der histologischen Aufarbeitung der Präparate erhobenen Messwerte für die Gruppen PT + sIL-6R ($n = 5$) und PT + sIL-6R-Ak ($n = 6$) sowie statistische Ergebnisse des direkten Gruppenvergleiches (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung mittels Median und IQR.

	V PT + sIL-6R	IQR	VI PT + sIL-6R-Ak	IQR	Signifikanz
Osteoklasten / mm ²	52,4	35,8 - 100,9	69,6	61,3 - 75,3	$p = 0,247$
OC pos [%]	7,9	7,0 - 13,3	9,5	4,2 - 11,6	$p = 0,792$

3.4. Unterschiede der Frakturheilung durch den Einfluss des Transsignaling-Mechanismus im Mono- und Polytrauma?

3.4.1. μ CT

Fx + sIL-6R vs. PT + sIL-6R

Im Vergleich der Fx- und PT Gruppen mit gesteigertem Transsignaling präsentierte sich in der μ CT-Analyse in der PT-Gruppe eine signifikant reduzierte Knochenmineralisierung (BV/TV; 0,67; IQR 0,63 - 0,75 vs. 0,49; IQR 0,41 - 0,61; $p = 0,009$) gegenüber der Monotrauma-Gruppe (Abb. 32; Tab. 15).

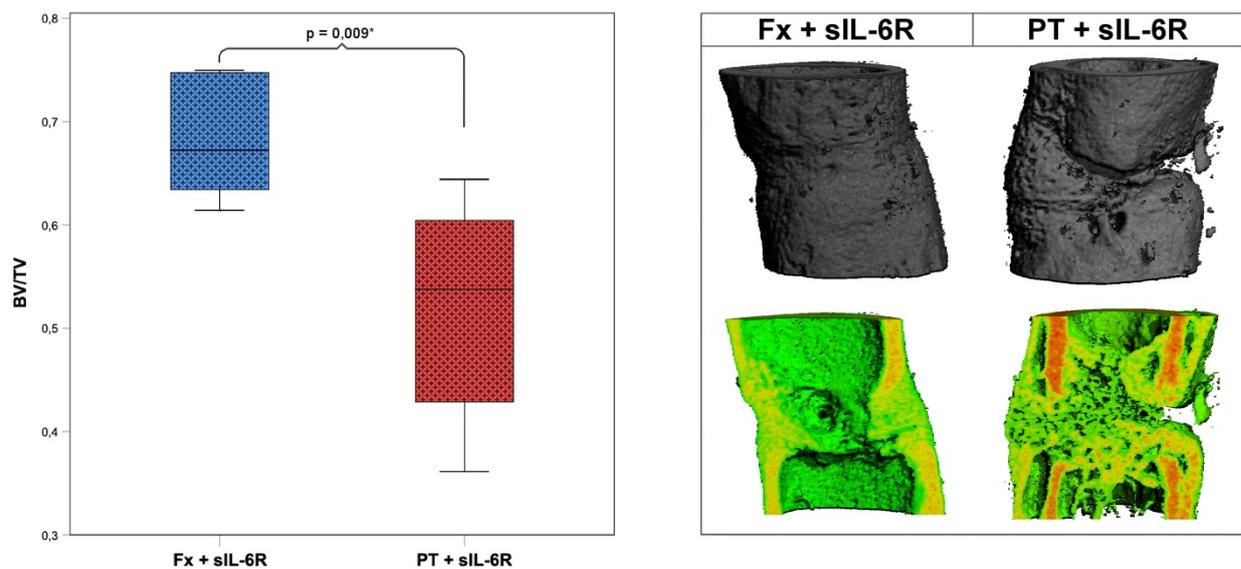


Abb. 32: Links: Darstellung der Messdaten für die errechnete Knochenmineralisierung BV/TV als Boxplots für die Fx + sIL-6R- ($n = 6$) und PT + sIL-6R-Gruppe ($n = 5$; eine Probe im Zuschnitt zerbrochen). Die Steigerung des Transsignaling im Monotrauma führte im Vergleich zur Steigerung im Polytrauma zu einer signifikant höheren Mineralisierungsgrades im Bereich des Frakturspalt (BV/TV; $p = 0,009$; Mann-Whitney-U-Test). Rechts: Gegenüberstellung der femoralen Frakturheilung beider Gruppen anhand 3D-Rekonstruktionen aus den CT-Schnitten exemplarischer Proben und zugehörigem Längsschnitt.

Tab. 15: Übersicht der im μ CT erhobenen Messwerte für die Gruppen Fx + sIL-6R und PT + sIL-6R sowie statistische Ergebnisse des direkten Gruppenvergleiches (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung mittels Median und IQR. Je Gruppe $n = 6$. * $p < 0,05$.

	II Fx + sIL-6R	IQR	V PT + sIL-6R	IQR	Signifikanz
TV [mm ³]	2,46	2,01 - 3,21	3,21	2,78 - 4,15	$p = 0,093$
BV [mm ³]	1,63	1,33 - 2,32	1,82	1,23 - 2,50	$p = 0,937$
BV/TV	0,67	0,63 - 0,75	0,49	0,41 - 0,61	$p = 0,009^*$
Kallusmitte [mm ³]	0,020	0,015 - 0,027	0,015	0,011 - 0,023	$p = 0,310$
Kallusrand [mm ³]	0,069	0,065 - 0,082	0,09	0,074 - 0,108	$p = 0,132$
Kortikalis [mm ³]	0,88	0,83 - 0,97	0,83	0,62 - 0,91	$p = 0,310$

Fx + sIL-6R-Ak vs. PT + sIL-6R-Ak

Im Vergleich der Fx- und PT Gruppen mit blockiertem Transsignaling zeigten sich in der μ CT-Analyse signifikant höhere Werte für TV ($2,74 \text{ mm}^3$; IQR $1,52 - 3,22$ vs. $4,06 \text{ mm}^3$; IQR $3,25 - 5,53$; $p = 0,041$), BV ($1,58 \text{ mm}^3$; IQR $0,76 - 1,77$ vs. $2,43 \text{ mm}^3$; IQR $1,99 - 2,89$; $p = 0,026$) und der Kallusmitte ($0,016$; IQR $0,006 - 0,023$ vs. $0,028$; IQR $0,022 - 0,034$; $p = 0,026$) zu Gunsten der PT-Gruppe (Abb. 33; Tab 16).

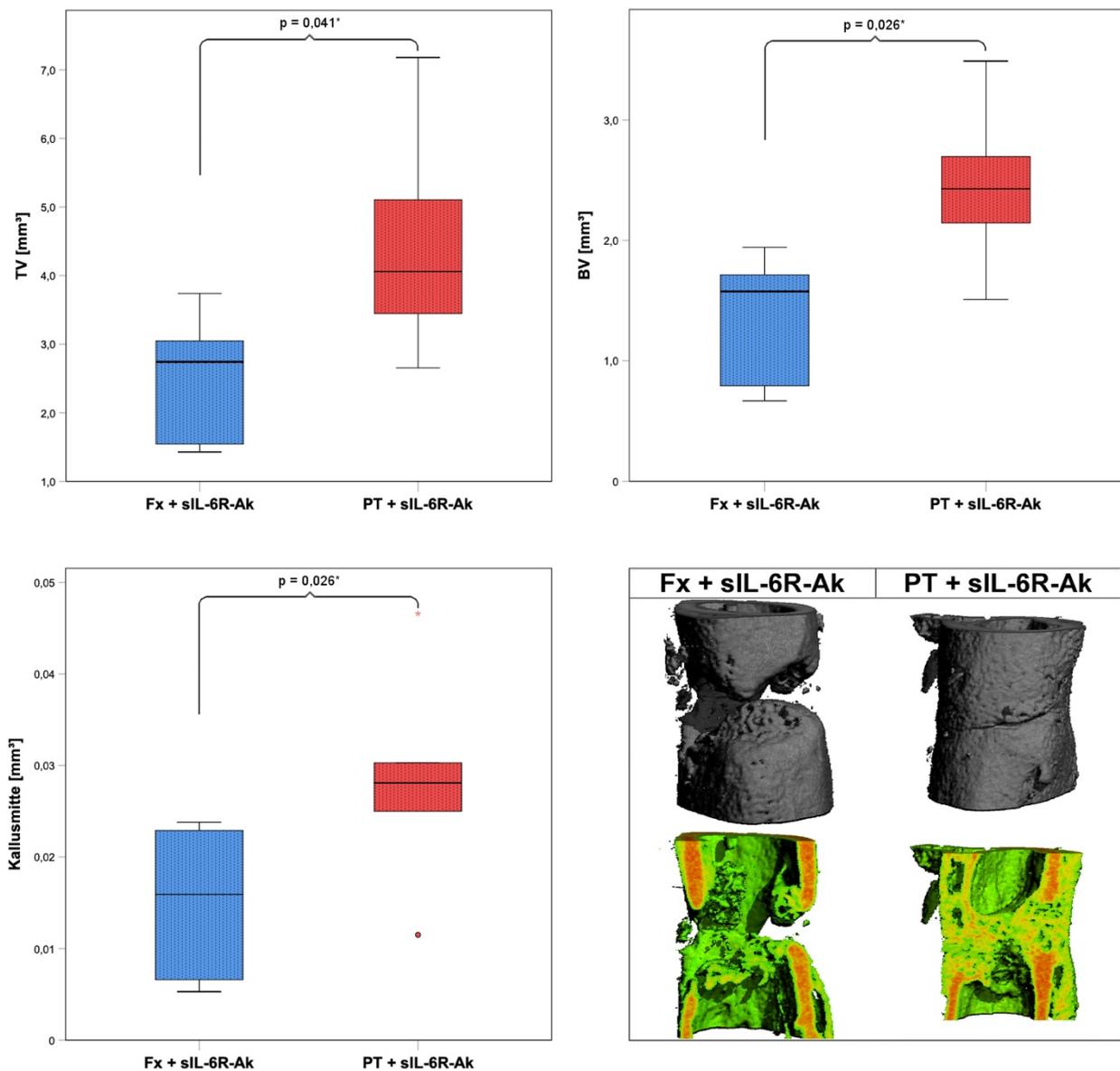


Abb. 33: Oben und links unten: Darstellung der im CT bestimmten Volumina in mm^3 für TV, BV und der Kallusmitte als Boxplots im Vergleich für die Fx + sIL-6R-Ak- und PT + sIL-6R-Ak-Gruppe. Je Gruppe $n = 6$. Die Blockade des Transsignaling in der Fraktur- und Polytraumagruppe führte im direkten Vergleich zu signifikant höheren Messwerten für TV ($p = 0,041$), BV ($p = 0,026$) und der Kallusmitte ($p = 0,026$) zugunsten der Fx + sIL-6R-Ak-Gruppe (Mann-Whitney-U-Test). Rechts unten: Gegenüberstellung der femoralen Frakturheilung beider Gruppen anhand 3D-Rekonstruktionen aus den CT-Schnitten exemplarischer Proben und zugehörigem Längsschnitt.

Tab. 16: Übersicht der im μ CT erhobenen Messwerte für die Gruppen Fx + sIL-6R-Ak und PT + sIL-6R-Ak sowie statistische Ergebnisse des direkten Gruppenvergleiches (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung mittels Median und IQR. Je Gruppe n = 6. * p < 0,05.

	III Fx + sIL-6R-Ak	IQR	VI PT + sIL-6R-Ak	IQR	Signifikanz
TV [mm ³]	2,74	1,52 - 3,22	4,06	3,25 - 5,53	p = 0,041*
BV [mm ³]	1,58	0,76 - 1,77	2,43	1,99 - 2,89	p = 0,026*
BV/TV	0,53	0,50 - 0,57	0,56	0,52 - 0,62	p = 0,394
Kallusmitte [mm ³]	0,016	0,006 - 0,023	0,028	0,022 - 0,034	p = 0,026*
Kallusrand [mm ³]	0,070	0,058 - 0,082	0,11	0,081 - 0,125	p = 0,026*
Kortikalis [mm ³]	0,78	0,71 - 0,82	0,80	0,65 - 0,83	p = 0,818

3.4.1. Histologie

Fx + sIL-6R vs. PT + sIL-6R

In der histologischen Aufarbeitung konnte kein signifikanter Unterschied (p = 0,247) in der Osteoklastendichte beobachtet werden (Abb. 34; Tab. 17).

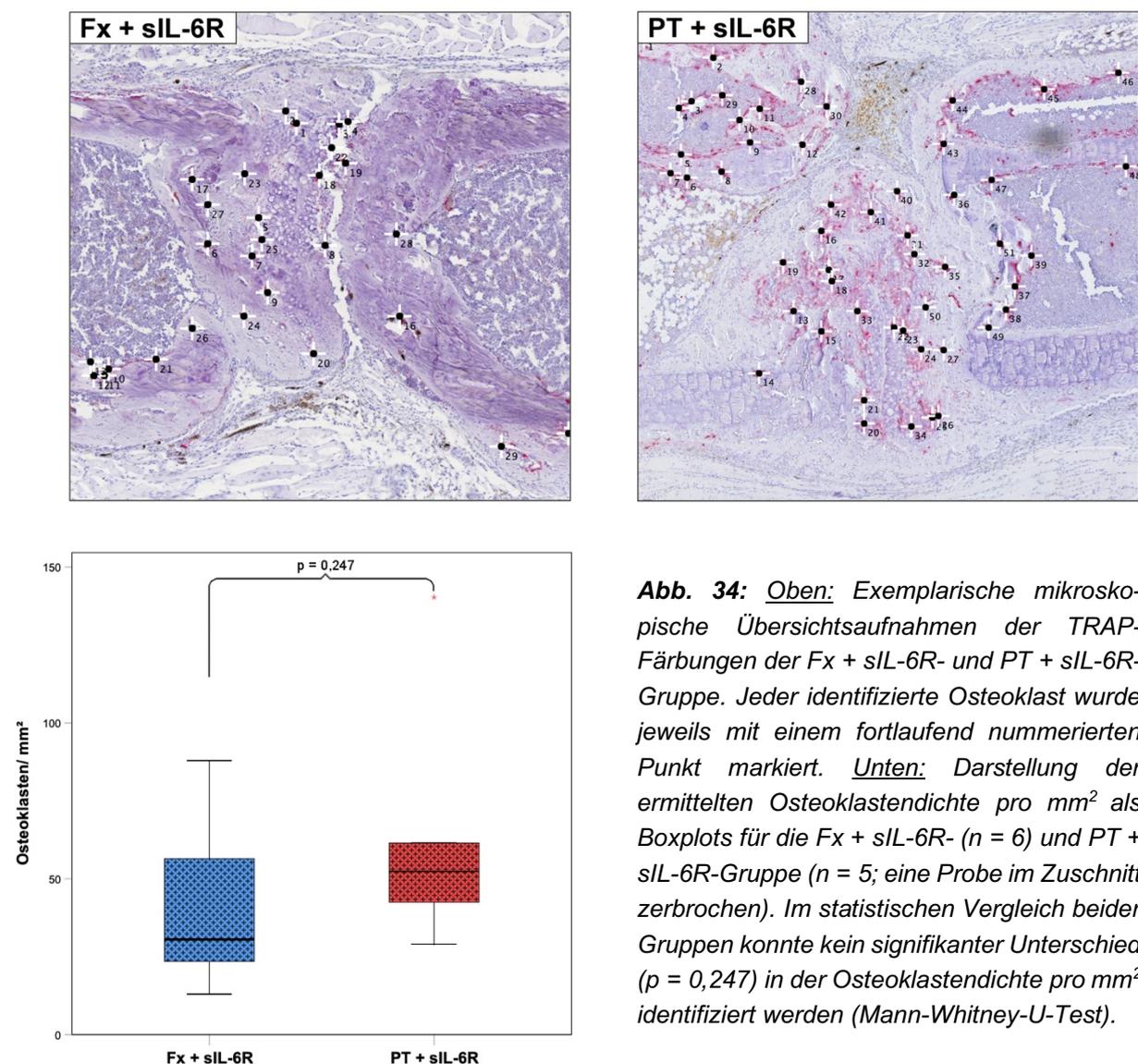


Abb. 34: Oben: Exemplarische mikroskopische Übersichtsaufnahmen der TRAP-Färbungen der Fx + sIL-6R- und PT + sIL-6R-Gruppe. Jeder identifizierte Osteoklast wurde jeweils mit einem fortlaufend nummerierten Punkt markiert. Unten: Darstellung der ermittelten Osteoklastendichte pro mm² als Boxplots für die Fx + sIL-6R- (n = 6) und PT + sIL-6R-Gruppe (n = 5; eine Probe im Zuschnitt zerbrochen). Im statistischen Vergleich beider Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied (p = 0,247) in der Osteoklastendichte pro mm² identifiziert werden (Mann-Whitney-U-Test).

Ebenfalls in der Analyse der Osteocalcinfärbungen konnten im Vergleich der Fx- und PT-Gruppen mit gesteigertem Transsignaling keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,126$) im prozentualen Anteil der osteocalcin-positiven Flächen identifiziert werden (Abb. 35; Tab. 17).

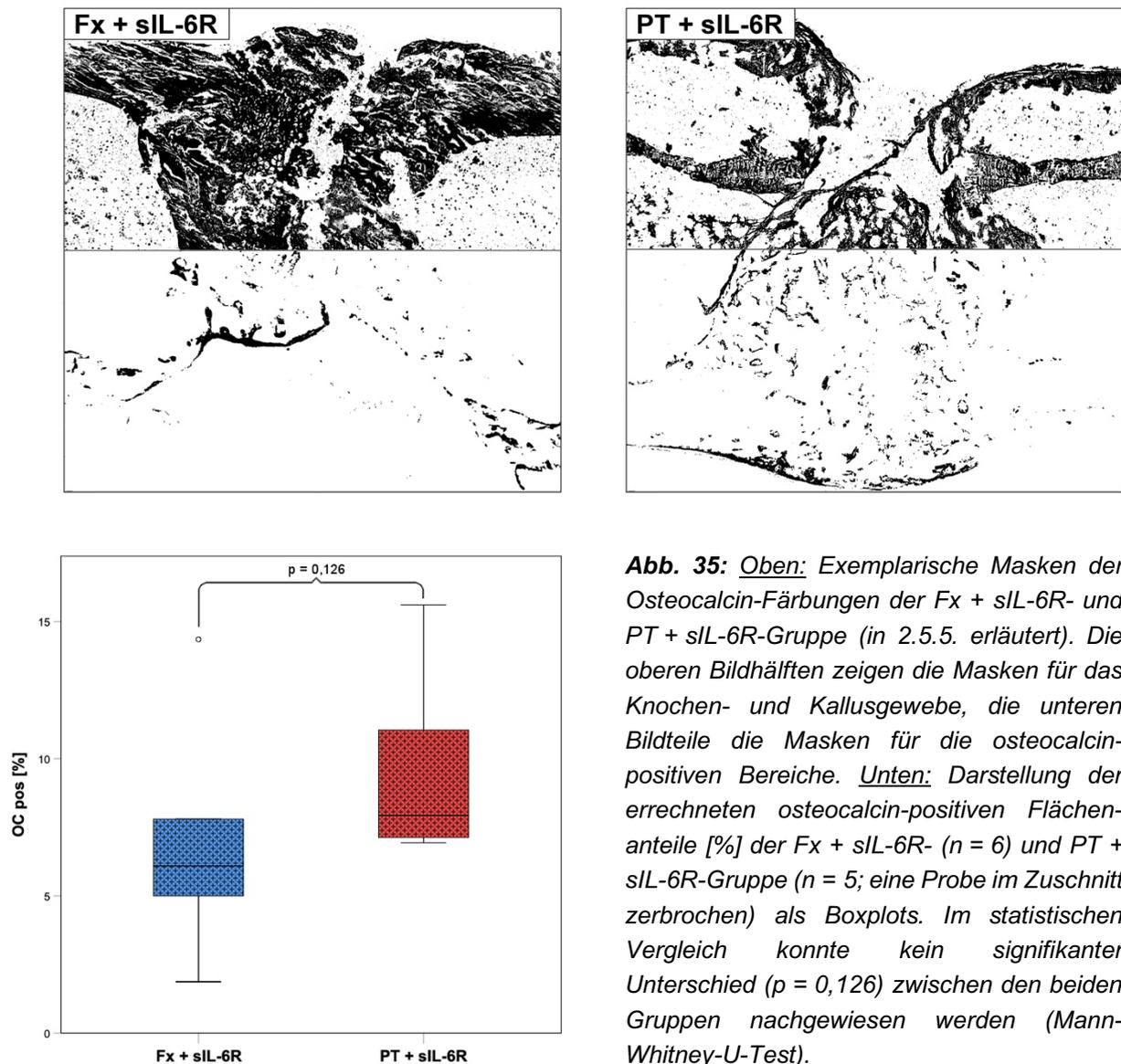


Abb. 35: Oben: Exemplarische Masken der Osteocalcin-Färbungen der Fx + sIL-6R- und PT + sIL-6R-Gruppe (in 2.5.5. erläutert). Die oberen Bildhälften zeigen die Masken für das Knochen- und Kallusgewebe, die unteren Bildteile die Masken für die osteocalcin-positiven Bereiche. Unten: Darstellung der errechneten osteocalcin-positiven Flächenanteile [%] der Fx + sIL-6R- ($n = 6$) und PT + sIL-6R-Gruppe ($n = 5$; eine Probe im Zuschnitt zerbrochen) als Boxplots. Im statistischen Vergleich konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,126$) zwischen den beiden Gruppen nachgewiesen werden (Mann-Whitney-U-Test).

Tab. 17: Übersicht der in der histologischen Aufarbeitung der Präparate erhobenen Messwerte für die Gruppen Fx + sIL-6R ($n = 6$) und PT + sIL-6R ($n = 5$) sowie statistische Ergebnisse des direkten Gruppenvergleiches (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung mittels Median und IQR.

	II Fx + sIL-6R	IQR	V PT + sIL-6R	IQR	Signifikanz
Osteoklasten / mm ²	30,5	20,9 - 64,3	52,4	35,8 - 100,9	$p = 0,247$
OC pos [%]	6,1	4,2 - 9,4	7,9	7,0 - 13,3	$p = 0,126$

Fx + sIL-6R-Ak vs. PT + sIL-6R-Ak

Im abschließenden Vergleich der Fx- und PT-Gruppen mit blockiertem Transsignaling konnten wir eine signifikant höhere Osteoklastenzahl pro mm² (25,6; IQR 21,0 - 31,7 vs. 69,6; IQR 61,3 - 75,3; $p = 0,002$) in der PT-Gruppe feststellen (Abb. 36; Tab. 18).

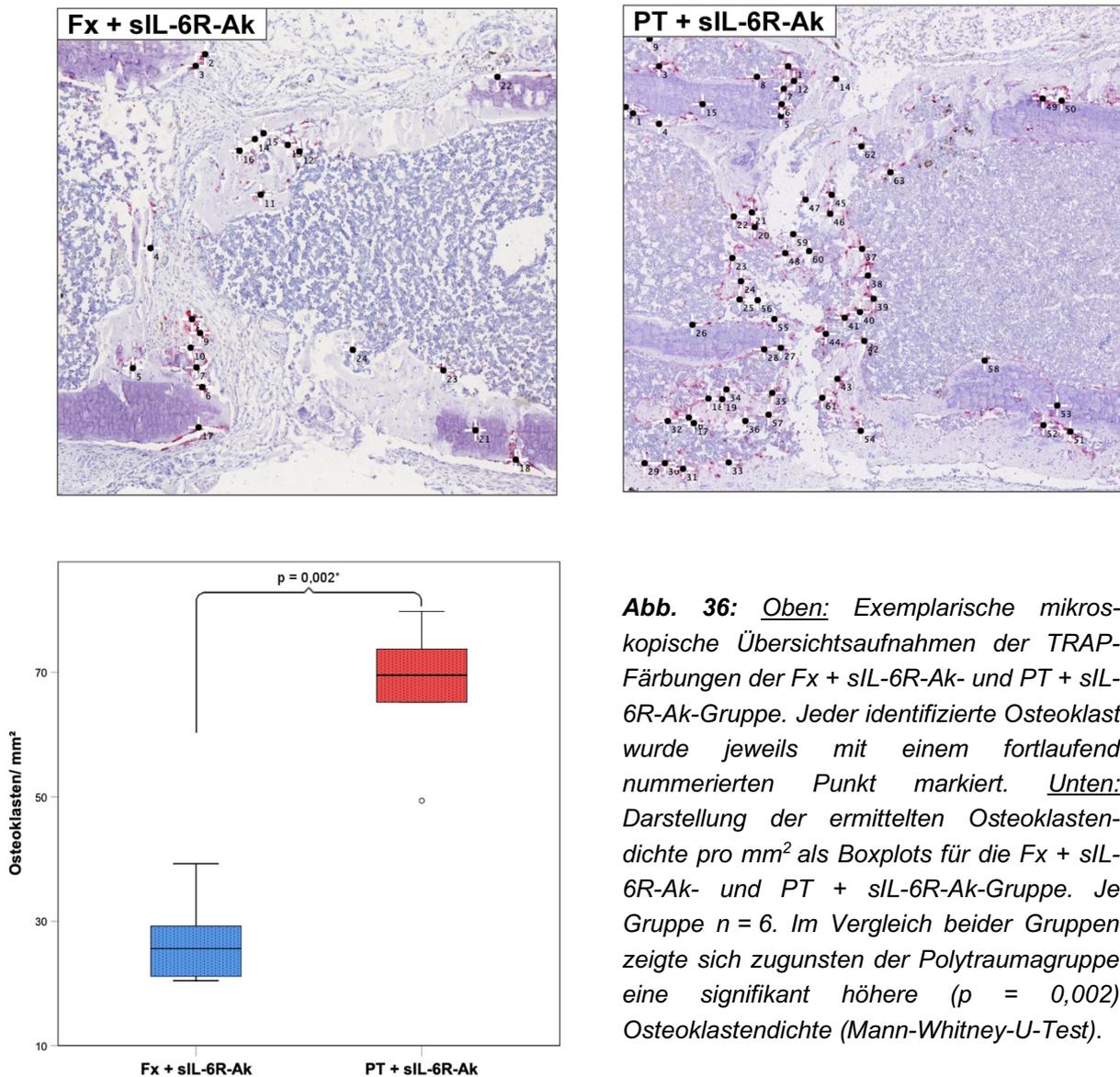


Abb. 36: Oben: Exemplarische mikroskopische Übersichtsaufnahmen der TRAP-Färbungen der Fx + sIL-6R-Ak- und PT + sIL-6R-Ak-Gruppe. Jeder identifizierte Osteoklast wurde jeweils mit einem fortlaufend nummerierten Punkt markiert. Unten: Darstellung der ermittelten Osteoklastendichte pro mm² als Boxplots für die Fx + sIL-6R-Ak- und PT + sIL-6R-Ak-Gruppe. Je Gruppe $n = 6$. Im Vergleich beider Gruppen zeigte sich zugunsten der Polytraumagruppe eine signifikant höhere ($p = 0,002$) Osteoklastendichte (Mann-Whitney-U-Test).

In der Osteocalcin-Färbung konnten keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,937$) identifiziert werden (Abb. 37; Tab 18).

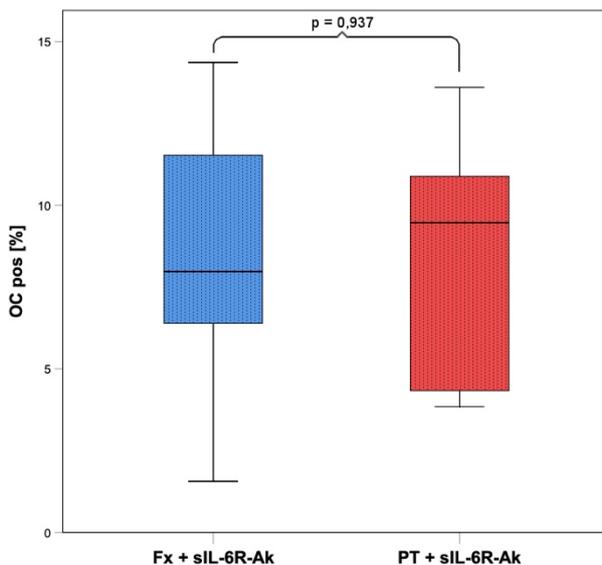
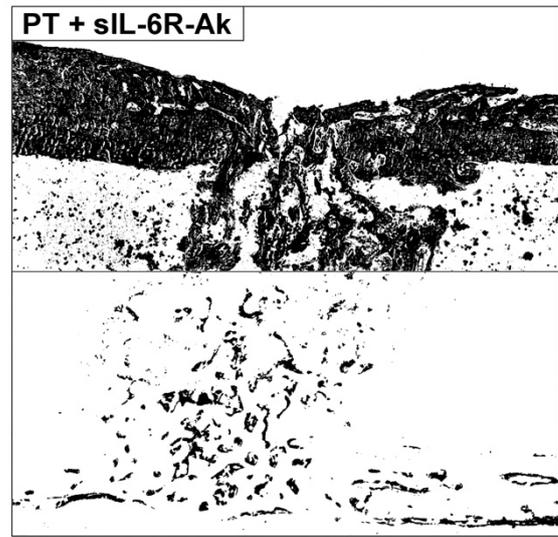
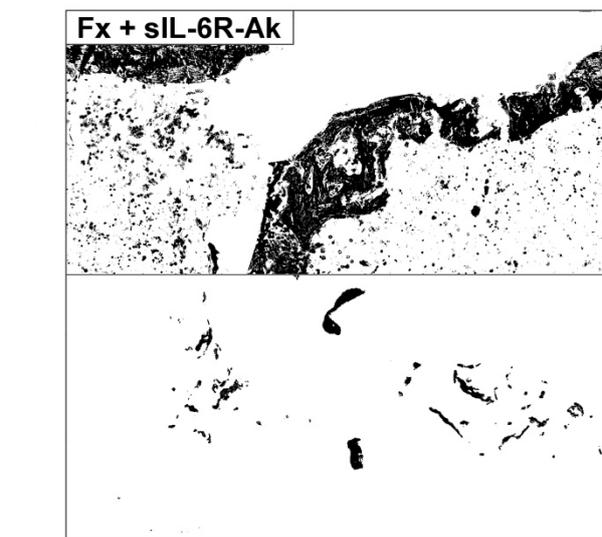


Abb. 37: Oben: Exemplarische Masken der Osteocalcin-Färbungen der Fx + sIL-6R-Ak- und PT + sIL-6R-Ak-Gruppe (in 2.5.5. erläutert). Die oberen Bildhälften zeigen die Masken für das Knochen- und Kallusgewebe, die unteren Bildteile die Masken für die osteocalcin-positiven Bereiche. Unten: Darstellung der errechneten osteocalcin-positiven Flächenanteile [%] der Fx + sIL-6R-Ak- und PT + sIL-6R-Ak-Gruppe als Boxplots. Je Gruppe $n = 6$. Im statistischen Vergleich konnte kein signifikanter Unterschied ($p = 0,937$) nachgewiesen werden (Mann-Whitney-U-Test).

Tab. 18: Übersicht der in der histologischen Aufarbeitung der Präparate erhobenen Messwerte für die Gruppen Fx + sIL-6R-Ak und PT + sIL-6R-Ak sowie statistische Ergebnisse des direkten Gruppenvergleiches (Mann-Whitney-U-Test). Darstellung mittels Median und IQR. Je Gruppe $n = 6$. * $p < 0,05$.

	III Fx + sIL-6R-Ak	IQR	VI PT + sIL-6R-Ak	IQR	Signifikanz
Osteoklasten / mm ²	25,6	21,0 - 31,7	69,6	61,3 - 75,3	$p = 0,002^*$
OC pos [%]	8,0	5,2 - 12,2	9,5	4,2 - 11,6	$p = 0,937$

4. Diskussion

In dieser Studie haben wir den in vivo-Einfluss des Transsignaling-Mechanismus auf die Frakturheilung in einem neuartigen Langzeitüberlebens-, Mono- und Polytraumamausmodell untersucht. Für die Simulation des Monotraumas etablierten wir operativ jeweils eine standardisierte Femur- und eine ipsilaterale Tibiafraktur. Die Simulation des Polytraumas erfolgte durch die zusätzliche Induktion eines hämorrhagischen Schocks. Das IL-6-Zytokinsystem spielt eine Schlüsselrolle in der akuten posttraumatischen Immunreaktion und der frühen Phase der Frakturheilung (< 24h) (69, 77). Deshalb entschieden wir uns für eine einmalige in vivo-Immunmodulation mittels sIL-6R- und sIL-6R-Ak-Applikation direkt nach dem Trauma.

4.1. Frakturheilung im Monotrauma vs. Polytrauma

Bei dem Vergleich der Fx- mit der PT-Gruppe ohne zusätzliche in vivo-Immunmodulation konnten wir im Gegensatz zu den früher publizierten Daten (90, 94, 95) keine statistischen Unterschiede in der Frakturheilung identifizieren (Abb. 11; Tab. 1). Wichmann et. al detektierten nach einer geschlossenen Fraktur in Kombination mit einem HS eine gesteigerte Osteozytennekrose am Frakturspalt und einen reduzierten Osteocalcinspiegel im Mausmodell (90). Daraus schlussfolgerten sie, dass die Kombination aus HS und Fraktur mit einer verschlechterten Frakturheilung einhergeht. In Hinblick auf unsere Daten ist jedoch anzumerken, dass in ihrem Versuch der End- und Untersuchungszeitpunkt nach 72 h und bei uns nach 21 Tagen lag. Bumann et al. untersuchten den Einfluss des HS auf die Frakturheilung an der Ratte. Am Endpunkt ihrer Untersuchungen nach 28 Tagen konnten sie in der anschließenden biomechanischen Untersuchung der geheilten Frakturen eine höhere mechanische Stabilität in der Gruppe mit Fraktur und HS im Vergleich zur Frakturgruppe ohne HS identifizieren (94). Sie konnten in der Gruppe mit HS am dritten postoperativen Tag einen signifikant höheren Blutfluss distal der Frakturregion im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne HS nachweisen. Somit vermag die bessere posttraumatische Durchblutung die Heilungsprozesse eher und in einem größeren Ausmaß zu initiieren (94). Eine biomechanische Testung wurde in unserer Arbeit nicht durchgeführt. Somit können wir nicht ausschließen, dass trotz fehlender signifikanter Unterschiede in unseren Messdaten klinisch relevante

Unterschiede in der mechanischen Stabilität vorlagen. Die Arbeitsgruppe um Lucas et al. untersuchte den Einfluss eines Blutverlustes auf den Knochenstoffwechsel ohne zusätzliche Fraktur an der Ratte. Dabei konnten sie nach 10 Tagen eine erhöhte Serumkonzentration an osteogenem Wachstumspeptid, eine gesteigerte Knochenformation und erhöhte Osteoblastenzahlen nachweisen (95). Weiterhin zeigten sie, dass die Konzentration des osteogenen Wachstumspeptides am 10. postinterventionellen Tag ihr Maximum erreichte und im Anschluss rasant abfiel (95). Eben dieser Umstand sollte beachtet werden, wenn wir uns im weiteren Verlauf die Ergebnisse unserer histologischen Aufarbeitung zuwenden (siehe 4.5.1).

In den genannten Arbeiten konnten, je nach betrachteten Parametern, Verbesserungen sowie Verschlechterungen der knöchernen Heilung identifiziert werden. Dabei gilt jedoch zu beachten, dass alle Arbeiten, bis auf die von Bumann et al., frühere Untersuchungszeitpunkte, als in der hier vorliegenden Arbeit angesetzt haben. Somit können längerfristige Effekte aus diesen Arbeiten nicht abgeleitet werden.

Zusammenfassend stützt der Vergleich der Fx- mit der PT-Gruppe unsere klinischen Erfahrungen, dass ein PT mit einem HS nicht grundsätzlich mit einer beeinträchtigten Frakturheilung einhergeht. Vielmehr bestimmen die komplexen Interaktionen der unterschiedlichen Verletzungsmuster wie z. B. schwere Schädel-Hirn-, Thorax- oder Extremitätentraumata sowie individuelle Voraussetzungen, altersabhängige Unterschiede und das Ausmaß der posttraumatischen Immunantwort den Verlauf der Frakturheilung.

4.2. Modulation des Transsignalings im Monotrauma

Den Einfluss der posttraumatischen Immunantwort im Monotrauma konnten wir durch die signifikanten Unterschiede in der Frakturheilung unserer Versuchsmäuse demonstrieren, die unsere in vivo-Immunmodulationen des Transsignaling-Mechanismus erbrachten (Abb. 14 und 15; Tab. 3 und 5). Dies widerspricht in der Grundaussage von Prystaz et al., welche für das Transsignaling im Monotrauma keinen relevanten Einfluss auf die Frakturheilung identifizieren konnten (109). Laut ihren Ergebnissen sei der klassische Signalweg essentiell für die Frakturheilung. Sie betrachteten in ihrer Arbeit jedoch nur die Blockade und nicht die Steigerung des Transsignalings (109).

In unserer Monotraumagruppe induzierte die Steigerung des Transsignaling-Mechanismus (sIL-6R-Applikation) die Knochenheilung. Dies präsentierte sich nach der

Heilungsdauer von 21 Tagen zum einen in einer gesteigerten Formierung an kortikalen und mineralisierten Knochen (BV/TV) zum anderen auch an einem signifikant erhöhten kortikalen Knochenvolumen im Bereich des femoralen Knochendefektes (Abb. 14; Tab. 3). Diese Ergebnisse stehen mit früheren in vitro-Studien im Konflikt, die erbracht haben, dass IL-6 die Osteoklastendifferenzierung und somit den Knochenabbau fördert (110, 111). Miyaura et al. beobachteten in ihrem in vitro-Versuchsaufbau, dass es durch die Blockierung von IL-6 und IL-6R zu einer verminderten Knochenresorption kommt (110). Palmqvist et al. zeigten, dass IL-6 über die Beeinflussung des Verhältnisses zwischen RANK, RANKL und OPG zu einer Differenzierung der Osteoklasten führt und somit den Knochenabbau fördert (111). Cho et al. untersuchten die Kallusdistraktionsosteogenese am Rattenmodell. Dabei kam es zu einer Hochregulierung von IL-6, welche über die Induktion der Osteoblastendifferenzierung zu einem Knochenaufbau führte (112). Yang et al. untersuchten den Unterschied zwischen IL-6-Knockout-Mäusen gegenüber Wildtyp-Mäusen. Sie detektierten eine verlangsamte und schlechtere Knochenmineralisierung und Knochenreifung in der Knockoutgruppe (113). Diese Ergebnisse decken sich mit unseren Beobachtungen, dass es nach der Steigerung des Transsignalings ebenfalls zur Zunahme der Knochenmineralisierung (BV/TV) kam (Abb. 14; Tab. 3). Yoshitake et al. beschrieben, dass IL-6 die Differenzierung der osteoklastären Vorläuferzellen hemmt, ohne die Aktivität der Osteoblasten zu beeinflussen. Weiterhin beeinflusse IL-6 in Kombination mit seinem löslichen Rezeptor die Proliferation der Osteoblasten und fördert über diesen Weg wiederum die Sekretion von RANKL und die Aktivierung von Osteoklasten (114).

Dieser Mechanismus ließe sich auch in unserem Versuch ableiten. Nach der Blockierung des Transsignalings in der Fx-Gruppe ermittelten wir eine Verminderung des gesamten Knochenvolumens im Frakturspalt, die sich jedoch mit $p = 0,065$ als knapp nicht signifikant darstellte (TV; Abb. 15; Tab. 4). Möglicherweise würde sich dieser Effekt durch eine Erhöhung der Gruppenstärke als signifikant herauskristallisieren. Ein vermindertes gesamtes Knochenvolumen kann dadurch erklärt werden, dass durch das blockierte Transsignaling eine verminderte Osteoblastendifferenzierung und somit weniger Knochenaufbau stattfindet. Weiterhin müssen zum Beginn der Frakturheilung nekrotische Zellbestandteile und Knochenfragmente durch Makrophagen und Osteoklasten abgeräumt werden (115). Bei der Aktivierung dieser ist das Zusammenspiel von IL-6, sIL-6R und dessen Transsignaling in der akuten inflammatorischen Phase von Bedeutung (79). Insgesamt vermuten wir, dass es durch die Blockierung des

Transsignalings zu einer verminderten Remodelingrate kommt (116). Diese Annahme steht im Gegensatz zu Prystaz et al., die im Monotrauma durch die Blockade des Transsignalings keinen Effekt auf die Frakturheilung beobachten konnten (109). In ihrem Versuch verwendeten sie zur Blockade des Transsignalings sgp130FC, ein Fusionsprotein der extrazellulären gp130-Domäne, welches selektiv den IL-6/IL-6R-Komplex bindet und somit das Transsignaling blockiert (109). In unserem Versuchsaufbau nutzten wir den sIL-6R-Ak. Dieser bindet selektiv sIL-6R ohne IL-6, welches somit möglicherweise weiterhin für den klassischen Signalweg verfügbar bleibt, was die beobachteten Unterschiede im Versuch erklären könnte.

Im direkten Vergleich der gegensätzlich modulierten Immunantworten (Abb. 16; Tab. 5) unseres Versuches zeigte sich besonders deutlich, dass der Transsignaling-Mechanismus essentiell für die Knochendefektheilung im Frakturmodell ohne HS ist. Eine Blockierung des Transsignaling-Mechanismus geht, gegenüber der Steigerung mittels der Applikation von sIL-6R, mit einer signifikant verminderten Knochenmineralisierung sowie mit einem signifikant verminderten kortikalem Knochenvolumen einher.

4.3. Modulation des Transsignalings im Polytrauma

Im zweiten Teil unserer Studie untersuchten wir den Einfluss des Transsignaling-Mechanismus auf die Frakturheilung beim PT, die Kombination aus Fraktur mit HS. In dieser Versuchsgruppe erbrachte die zusätzliche Steigerung des Transsignalings über die Applikation des sIL-6R keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Frakturheilung (Abb. 23; Tab. 9). Dies könnte durch den Fakt erklärt werden, dass ein HS an sich zu einer Steigerung des sIL-6R-Spiegels führt, was wir bereits bei der Etablierung unseres Schockmodells gezeigt haben (84). Wie aus unseren früheren Daten hervorgeht, kommt es unmittelbar nach der Initiierung des HS zu einem schnellen Anstieg der sIL-6R-Serumkonzentration, die im weiteren zeitlichen Ablauf wieder rasch rückläufig ist (84). Genau in dieser frühen Phase fand in unserem Versuch die zusätzliche Applikation des sIL-6R statt, welcher den ohnehin erhöhten sIL-6R-Spiegel weiter anhub, jedoch keinen signifikanten Effekt in der Frakturheilung im Vergleich zur PT-Gruppe erzielte. Somit postulieren wir, dass es einen oberen Grenzwert der Transsignaling-Aktivität gibt, über den hinaus eine weitere Steigerung keinen zusätzlichen Einfluss auf die lokale Frakturheilung bewirkt. Dies könnte über eine möglicherweise limitierte gp130-

Exprimierung auf den Zelloberflächen erklärbar sein, wodurch nur eine begrenzte Anzahl an IL-6/IL-6R-Komplexen binden und Signale nach intrazellulär transduzieren können. Hingegen hat die Blockierung der hohen Transsignaling-Aktivität in der PT-Gruppe über die Applikation des sIL-6R-Ak zu einer signifikant erhöhten Knochenmineralisierung (BV/TV; Abb. 24; Tab. 10) im Vergleich zur PT-Gruppe geführt. Diese Ergebnisse unterstützen die in vitro- und in vivo-Studien, die zeigen, dass der Transsignaling-Mechanismus maßgeblich an der Regulation des durch Osteoblasten und Osteoklasten vermittelten Knochenabbau, Aufbau und Umbau beteiligt ist (110-115). Auch in unserer Arbeit konnten wir zeigen, dass eine verringerte Osteoklastendichte mit einer höheren Knochenmineralisierung einhergeht (Abb. 17; Tab. 6). Kaiser et al. konnten in einem vergleichbaren Mausmodell (Femurosteotomie in Kombination mit einem Thoraxtrauma) durch die Blockierung des Transsignalings ebenso eine verbesserte Frakturheilung mit einer schnelleren knöchernen Überbrückung der Frakturzone und einer beschleunigten Knochenmineralisierung nachweisen (117).

Analog zur Frakturgruppe ohne HS reguliert die in vivo-Modulation des Transsignaling-Mechanismus grundlegend die Frakturheilung. Doch im Gegensatz zur Fx-Gruppe ohne HS hat die Blockierung des Transsignaling-Mechanismus über die sIL-6R-Ak-Applikation in der PT-Gruppe einen signifikant bessere Frakturheilung zur Folge (Abb. 24; Tab. 10).

4.4. Modulation des Transsignalings im Vergleich Mono-/ Polytrauma

In der Untersuchung des Transsignaling-Mechanismus im Mono- und Polytrauma konnten wir nachweisen, dass dieser einen relevanten Einfluss auf die Frakturheilung hat. Im Monotrauma hatte die Steigerung des Transsignalings eine verbesserte (Abb. 14; Tab. 3) und die Blockierung desselben eine unveränderte, bzw. angedeutet verschlechterte Frakturheilung zur Folge (Abb. 15; Tab. 4). In der PT-Gruppe konnte durch die Steigerung des Transsignalings keine signifikante Veränderung beobachtet werden (Abb. 23; Tab. 9), jedoch zeigte sich in dieser Gruppe durch die Blockierung des Transsignaling-Mechanismus eine verbesserte Frakturheilung (Abb. 24; Tab. 10). Im direkten Vergleich der Fx-Gruppe und gesteigertem Transsignaling mit der PT-Gruppe und gesteigertem Transsignaling (Fx + sIL-6R vs. PT + sIL-6R) zeigte sich in der PT-Gruppe eine signifikant geringere Knochenmineralisierung (Abb. 32; Tab. 15). Im direkten Vergleich der Fx-Gruppe und blockiertem Transsignaling mit der PT-Gruppe und blockiertem Transsignaling (Fx + sIL-6R-Ak vs. PT + sIL-6R-Ak) konnten wir in der PT-

Gruppe eine bessere Frakturheilung identifizieren, die sich in signifikant höheren Werten für das gesamte Volumen in der VOI (TV), dem Knochenvolumen (BV) und dem Kallusvolumen äußerte (Abb. 33; Tab. 16).

Erstellt man nun eine Art hierarchische Anordnung der Frakturheilung und der Transsignaling-Aktivität in den verschiedenen Gruppen so lässt sich festhalten, dass die geringste Transsignaling-Aktivität in der Fx-Gruppe, mit der zusätzlichen Applikation des sIL-6R-Ak und die höchste Transsignaling-Aktivität in der PT-Gruppe mit zusätzlicher sIL-6R-Applikation anzunehmen sind. Beide Gruppen hatten in unserer Studie jedoch nicht die beste Frakturheilung. Die Gruppen Fx, Fx + sIL-6R, PT + sIL-6R-Ak und PT befinden sich vom Ausmaß des Transsignalings zwischen diesen beiden Extremen. In diesen Gruppen konnten wir die signifikant beste Frakturheilung beobachten.

Daraus schlussfolgern wir, dass es einen optimalen Bereich für die Aktivität des IL-6-Systems gibt, die es in weiterführenden Untersuchungen zu bestimmen gilt.

4.5. Histologie

4.5.1. Osteoblasten

Für die Untersuchung der Osteoblasten in den angefertigten Präparaten entschieden wir uns für eine Osteocalcin-Färbung. Osteocalcin wird hauptsächlich von Osteoblasten und Odontoblasten bei deren Differenzierung und Mineralisation synthetisiert und sezerniert (106). Dies macht Osteocalcin zu dem spezifischsten Marker für die Osteoblastenaktivität (107). Da es uns im Präparat lichtmikroskopisch nicht möglich war, einzelne Osteoblasten sicher zu identifizieren, entschieden wir uns für die Ermittlung der osteocalcin-positiven Bereiche mittels Farbschwellenwert (siehe 2.5.5.; Abb. 10). Diese haben wir in das Verhältnis zur Fläche des gesamten Gewebes im Frakturspalt gesetzt. Diese Methode ermöglichte eine standardisierte und gut reproduzierbare Auswertung.

In der Analyse der Messwerte für die Osteoblasten konnten wir in keiner Gruppe signifikante Unterschiede identifizieren. Nur im Vergleich der PT-Gruppe mit der PT + sIL-6R-Ak-Gruppe zeichnete sich ein Trend ($p = 0,065$) zugunsten eines höheren Flächenanteils an osteocalcin-positiven Bereichen in der Gruppe mit dem geblockten Transsignaling ab (Abb. 29; Tab. 13).

Lucas et al. konnten in ihrer Arbeit nach HS und Knochenmarksablation einen Anstieg der Osteoblastenzahlen und des osteogenen Wachstumspeptids sowie eine höhere mineralische Apositionsrate am trabekulären Knochen messen (95). Diese Daten decken

sich mit unserer Beobachtung, dass im Gruppenvergleich PT vs. PT + sIL-6R-Ak nach der Blockierung des Transsignalings eine signifikant erhöhte Knochenmineralisierung (BV/TV; Abb. 24; Tab. 10) mit einem erhöhten osteocalcin-positiven Flächenanteil einhergeht (Abb. 29; Tab. 13). Weiterhin ergaben die Ergebnisse von Lucas et al. einen rasanten Abfall des osteogenen Wachstumspeptids nach dem 10. postinterventionellen Tag (95). Das osteogene Wachstumspeptid fördert die Differenzierung und Mineralisierung der Osteoblasten (118). Da unser Zeitpunkt der histologischen Aufarbeitung am 21. postinterventionellen Tag stattfand, lässt sich, durch den vermutlich frühzeitigen Abfall des Wachstumspeptids vor unserem Untersuchungszeitpunkt, die relativ homogene Osteoblastenaktivität in unseren Untersuchungsergebnissen erklären. Wichmann et al. beschrieben einen verringerten Plasmaosteocalcinspiegel mit einer einhergehenden verminderten osteoblastären Aktivität 72 h nach der Induktion eines HS (90). Auch hier ist nur die Aktivität der Osteoblasten an einem frühen Zeitpunkt nach der Intervention beschrieben. Langzeitergebnisse fehlen in diesem Falle, um Rückschlüsse auf die weitere Kinetik zu tätigen (90). Yang et al. untersuchten die Frakturheilung an IL-6-depletierten Mäusen im Vergleich zu Wildtyptieren. Dabei fanden sie in den frühen Untersuchungszeitpunkten eine verlangsamte Kallusreifung bei den IL-6-depletierten Mäusen, die sich jedoch, bis zum Endpunkt nach 6 Wochen, der der Wildtypiere angleich (113). Auch Neunaber et al. fanden 21 Tage, respektive 23 Tage nach HS, keine signifikante Beeinflussung der Osteoblasten nach HS im Vergleich zur Sham-Gruppe (97).

Insgesamt decken sich unsere Ergebnisse mit denen bereits in der Literatur vorhandenen Beobachtungen. Der nachweisbare, wenn auch knapp nicht signifikante Unterschied der osteoblastären Aktivität im Gruppenvergleich PT vs. PT + sIL-6Ak zeigt, dass ein Einfluss durch den Transsignaling-Mechanismus auf die Osteoblasten besteht (Abb. 29; Tab 13). Jedoch müssen wir auch zu dem Schluss kommen, dass weitere Untersuchungen zu früheren Zeitpunkten stattfinden müssen, um die genaue Kinetik der Osteoblasten näher zu verstehen.

4.5.2. Osteoklasten

Für die Auswertung der Osteoklasten im Präparat entschieden wir uns für die TRAP-Färbung in Kombination mit einer Kernfärbung mittels Hämalaun nach Mayer. So stellten sich die Osteoklasten gut kontrastiert im Präparat dar und ließen sich unter dem Lichtmikroskop sicher auszählen (siehe 2.5.4.; Abb. 9). Durch den Bezug der

Osteoklastenzahlen auf einen mm^2 ließen sich unterschiedlich große Querschnittsflächen des neu geformten Gewebes im Frakturspalt gut miteinander vergleichen.

Im Vergleich unserer histologischen Daten fanden wir in drei Gruppen signifikante Unterschiede in den Osteoklastenzahlen. Im Vergleich Fx vs. Fx + sIL-6R, sowie Fx vs. Fx + sIL-6R-Ak ermittelten wir jeweils signifikant geringere Osteoklastenzahlen sowohl für das gesteigerte (Abb. 17; Tab. 6) als auch das blockierte Transsignaling (Abb. 19; Tab. 7). Weiterhin zeigten sich die Osteoklastenzahlen im Vergleich der Gruppen Fx + sIL-6R-Ak vs. PT + sIL-6R-Ak in der PT-Gruppe signifikant verringert (Abb. 36; Tab. 18).

Bringen wir diese Ergebnisse mit den Messwerten des μCT s zusammen, so lassen sich deutliche Zusammenhänge erkennen. In der Fx-Gruppe mit gesteigertem Transsignaling gehen niedrige Osteoklastenzahlen (Abb. 17; Tab. 6) mit einer signifikant besseren Knochenmineralisierung und einem höheren Volumen an kortikalem Knochen einher (Abb. 14; Tab. 3). Diese Beobachtung interpretieren wir dahin, dass es durch eine geringere Osteoklastenaktivität bei unveränderter Osteoblastenaktivität, in der Summe die Knochenreifung und Mineralisierung begünstigt sowie im Remodelingprozess vermehrt kortikaler Knochen gebildet wird.

In der Fx-Gruppe mit blockiertem Transsignaling zeigten sich im Vergleich ebenso verminderte Osteoklastenzahlen (Abb. 19; Tab. 7) mit einem im μCT ermittelten geringeren totalen Knochenvolumen im Frakturspalt (TV; Abb. 15; Tab. 4). Diese Beobachtung wurde bereits unter dem Punkt 4.2. diskutiert. Zusammenfassend vermuten wir, dass es durch eine initiale geringere Rekrutierung und Differenzierung der Osteoblasten und Makrophagen, zu einem verlangsamten Abbau der Zelltrümmer und des nekrotischen Knochenmaterials kam (79, 115). Der dadurch verlangsamte Beginn der Frakturheilung hat sich unserer Interpretation zur Folge dann durch eine verminderte Remodelingrate bis zum Endpunkt nach 21 Tagen fortgesetzt (116). Um diese These zu verifizieren, wäre die Wiederholung der Untersuchung zu früheren Untersuchungszeiträumen sinnvoll.

Der dritte signifikante Unterschied der Osteoklastenzahlen zeigte sich im Vergleich der beiden Gruppen mit blockiertem Transsignaling (Fx + sIL-6R-Ak vs. PT + sIL-6R-Ak; Abb. 36; Tab. 18). In diesem Vergleich ergaben die μCT -Daten signifikant höhere Volumina für TV, BV und der Kallusmitte (Abb. 33; Tab. 16) zu Gunsten der PT-Gruppe. Diese Kombination aus hohen Volumina in der μCT -Analyse mit hohen Osteoklastenzahlen erscheint zuerst konträr zu den vorherigen Interpretationen. Wie

bereits in 4.4. erläutert, ist die Gruppe Fx + sIL-6-R-Ak diejenige mit der geringsten Transsignaling-Aktivität, wohingegen die Gruppe PT + sIL-6R-Ak eine höhere Transsignaling-Aktivität aufweist, welche, so unsere Hypothese, sich in der Nähe des optimalen Bereiches der Transsignaling-Aktivität befindet. Dieser Kontrast untermauert, dass ein niedriges Transsignaling vermutlich mit einer verlangsamten Frakturheilung, mit verlangsamter Rekrutierung und Aktivierung der Osteoklasten sowie einem verlangsamten Remodelingprozess einhergeht (79, 115, 116).

In der Literatur ist zu finden, dass hohe IL-6-Spiegel mit Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis und Osteoporose vergesellschaftet sind (119). Der Auf-, Ab- und Umbau des Knochens und die dabei notwendige Differenzierung von MSCs zu Osteoklasten wird, wie bereits in der Einleitung erörtert, über RANK/RANKL und OPG reguliert (55). Tamura et. al haben in vitro gezeigt, dass IL-6, sowie sIL-6R allein in einer Kultur mit Osteoblasten und MSCs nicht die Osteoklastendifferenzierung stimulieren können (120). Wurden jedoch IL-6 und sIL-6R gemeinsam in die Kultur mit Osteoblasten und MSCs hinzugefügt, so regten sie die Osteoklastendifferenzierung über die Induktion der RANKL- Expression auf den Osteoblasten an (114, 120, 121). Weiterhin wird in der Literatur beschrieben, dass IL-6 auf dem klassischen Signalweg die Differenzierung der Osteoklastenvorläufer blockiert (114). Zusammenfassend zeigen die Daten in der Literatur, dass das IL-6-System und sein Transsignaling-Mechanismus von Bedeutung für die Differenzierung, Rekrutierung und Aktivität der Osteoklasten sein müssen. Dies wird auch durch unsere Daten gestützt.

Aber auch bei der Interpretation der Osteoklastenaktivität gilt der gleiche Kritikpunkt, wie bei den Osteoblasten. Unserer Ergebnisse geben eine Momentaufnahme zum Zeitpunkt des Versuchsendes nach 21 Tagen an, die es erschwert, die genaue Kinetik der osteoklastären Aktivität im Zeitraum von der Intervention bis zum Versuchsende zu charakterisieren.

4.6. Zusammenfassende Beantwortung der Fragestellung

I. Gibt es Unterschiede der Frakturheilung zwischen Mono- und Polytrauma?

Unsere Studie zeigte, dass ein PT mit einem HS nicht grundsätzlich mit einer beeinträchtigten Frakturheilung einhergeht, was sich auch mit unseren klinischen Erfahrungen deckt. Vielmehr bestimmen die komplexe Interaktion der unterschiedlichen Verletzungsmuster, sowie individuelle Voraussetzungen, altersabhängige Unterschiede und das Ausmaß der posttraumatischen Immunantwort den Verlauf der Frakturheilung.

II. Welchen Einfluss hat der Transsignaling-Mechanismus auf die Frakturheilung beim Monotrauma?

Im Monotrauma führte die Steigerung des Transsignaling-Mechanismus zu einer Verbesserung und die Blockierung desselbigen zu einer Verschlechterung der Frakturheilung.

III. Welchen Einfluss hat der Transsignaling-Mechanismus auf die Frakturheilung beim Polytrauma?

Beim Polytrauma hat eine Steigerung des Transsignaling-Mechanismus keinen signifikanten Einfluss auf die Frakturheilung. Hingegen resultiert eine Blockierung des Transsignalings beim Polytrauma in einer Verbesserung der Frakturheilung.

IV. Gibt es Unterschiede der Frakturheilung bezüglich des Transsignaling-Mechanismus im Mono- und Polytrauma?

Während sich im Monotrauma die Frakturheilung mit zunehmender Transsignaling-Aktivität verbessert, konnte beim Polytrauma mit abnehmender Transsignaling-Aktivität eine Verbesserung der Frakturheilung nachgewiesen werden. Dies führt uns zu der Hypothese, dass es einen optimalen Bereich der Transsignaling-Aktivität geben muss.

V. Welchen Einfluss hat die Modulation des Transsignaling-Mechanismus auf die Aktivität der Osteoklasten und Osteoblasten?

Über die Beeinflussung des Transsignalings scheint es auch eine Beeinflussung der Osteoblasten und Osteoklasten zu geben. In unserer Studie zeigten sich mehrfach signifikante Unterschiede in der Osteoklastendichte. Für die Osteoblastendichte zeigten sich nur wenige Langzeiteffekte nach 21-tägiger Heilungsphase. Insgesamt werden weitere Versuche zu früheren Untersuchungszeitpunkten notwendig sein, um die genaue Kinetik der zellulären Aktivität zu beschreiben.

4.7. Limitationen der Studie

In der hier vorliegenden Studie wurde erstmals ein neuartiges Langzeitüberlebens-Mono-/ Polytrauma-Mausmodell verwendet. Aus Gründen des Tierschutzes und der Unklarheit über die zu erwartenden Ergebnisse entschieden wir uns für eine Gruppenstärke von $n = 6$. Vergleichbare Arbeiten verwendeten Gruppenstärken von $n = 4 - 8$ Versuchstieren (90, 92, 94, 95, 109, 117). Dabei gilt jedoch zu beachten, dass eine geringe Fallzahl eine verminderte Testpower bzw. verringerte Trennschärfe bedingt und somit die Wahrscheinlichkeit, einen Fehler 2. Art zu begehen, steigt - d.h. einen in der Realität vorliegenden Unterschied aufgrund einer geringen Effektstärke fälschlicherweise nicht zu erkennen (122). Bei der Interpretation der Ergebnisse mussten wir uns mit den Aussagen auf den hier vorliegenden Datensatz beschränken.

4.7.1. Limitation des Frakturmodells

Die Frakturen wurden in dieser Arbeit auf zwei verschiedenen Wegen erzeugt. Zum einen erfolgte die offene Osteotomie des Femurs mittels Gigli-Sägedraht, sowie im Bereich der ipsilateralen Tibia mittels geschlossener 3-Punkt-Biegetechnik.

Obwohl die, durch die 3-Punkt-Biegetechnik erzeugten Tibiafrakturen eher der realen Biomechanik einer Fraktur entsprechen, entschieden wir uns für die Verwendung der osteotomierten Femora für die anschließenden radiologischen und histologischen Analysen. Durch die Osteotomie wurde ein standardisierter Frakturspalt von 0,66 mm Breite erzeugt, der die Vergleichbarkeit zwischen den Versuchsgruppen ermöglichte. Diese Technik birgt jedoch Aspekte, die nicht unbedacht bleiben sollten. Durch den lateralen Zugang zum Femur kam es zu einer zusätzlichen Schädigung des umgebenden Weichteilgewebes. Weiterhin wurden durch die Osteotomie der bereits zuvor mit einem Fixateur externe versorgte Femora mechanische Belastungen eines realen Frakturmechanismus, wie z. B. Scherkräfte und Stauchungen, minimiert oder sogar vermieden. Die durch die Osteotomie entstandenen Frakturänder waren relativ glatt begrenzt, wodurch es möglicherweise zu einer geringeren Oberfläche der gegenüberliegenden Frakturänder kam, als dies bei einer herkömmlichen Fraktur der Fall ist. Zuletzt besteht die Möglichkeit, dass trotz gründlichen Spülens während der Osteotomie vereinzelt Knochenspäne in das benachbarte Gewebe versprengt wurden.

4.7.2. Limitation der Histologie in unserer Studie

In der hier vorliegenden Arbeit analysierten wir die stattgehabte Frakturheilung am definierten Endpunkt des Versuches nach 21 Tagen. Der Frakturheilungsprozess verläuft, wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit beschrieben, in verschiedenen Stadien. Daraus ergibt sich, dass die hier erhobenen Daten nur eine Momentaufnahme eines dynamischen Prozesses darstellen, der sich im Zeitraum zwischen dem initialen Trauma und dem finalen Abschluss des Remodelingprozesses befindet.

Zur genauen Beurteilung des Einflusses des Transsignaling-Mechanismus auf die osteoblastäre und osteoklastäre Aktivität in diesem dynamischen Prozess wird es in weiterführenden Studien notwendig sein, den Frakturheilungsprozess in mehrere Untersuchungszeitpunkte zu unterteilen, um die oben beschriebene Abläufe im Detail abzubilden und zu verstehen.

Weiterhin erfolgte die histologische Aufarbeitung nur an einer Schnittebene, wodurch die in unserer Arbeit getroffenen Aussagen eine gleichmäßige Verteilung der Zellpopulationen im dreidimensionalen Frakturspalt und im gebildeten Kallusgewebe voraussetzen.

Die Studienpopulation dieses Teilprojektes betrug 36 Mäuse. Dies führte zu einer Gruppenstärke von jeweils 6 Tieren. Besonders in den Zellzahlen gab es eine teils größere Streuung der Messwerte, erkennbar an den Interquartilsabständen, was die Beurteilung signifikanter Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen erschwerte (siehe z. B. Tab. 2 und Tab. 8).

4.8. Zusammenfassung und Ausblick

Wir haben bewiesen, dass der Transsignaling-Mechanismus und die in vivo Modulation im Mono- als auch Polytrauma fundamental an der Regulation des Knochenheilungsprozesses beteiligt sind und diesen nachhaltig beeinflussen können. Das Polytrauma ist nicht generell mit einer beeinträchtigten Frakturheilung verbunden. Vielmehr sind die Höhe der posttraumatischen Immunantwort und das damit einhergehende Ausmaß des Transsignaling ausschlaggebend für die ungestörte Frakturheilung.

Der Transsignaling-Mechanismus stellt einen potentiellen Angriffspunkt für eine spezifische in vivo-Immunmodulation des Frakturheilungsprozesses dar. So könnten in Zukunft möglicherweise Patienten, die ein hohes Risiko für eine verzögerte

Frakturheilung oder die Ausbildung von Pseudarthrosen haben, frühzeitig über die Modulation des Transsignalings therapiert werden.

Die Zielsetzung für weitere Studien wird es sein, den optimalen Zielbereich der posttraumatischen Immunantwort zu identifizieren, um über die Immunmodulation des Transsignaling-Mechanismus eine auf den Patienten abgestimmte Therapie zu ermöglichen.

5. Literaturverzeichnis

1. Norton R, Kobusingye O. Injuries. *New England Journal of Medicine*. 2013;368(18):1723-30.
2. Krug EG, Dahlberg LL, Mercy JA, Zwi AB, Lozano R. World report on violence and health. Geneva: World Health Organization; 2002.
3. Butcher N, Balogh ZJ. The definition of polytrauma: the need for international consensus. *Injury*. 2009;40 Suppl 4:S12-22.
4. Tscherne H. [The treatment of the seriously injured at an emergency station]. *Chirurg*. 1966;37(6):249-52.
5. Copes WS, Champion HR, Sacco WJ, Lawnick MM, Keast SL, Bain LW. The Injury Severity Score revisited. *The Journal of trauma*. 1988;28(1):69-77.
6. Baker SP, O'Neill B, Haddon W, Jr., Long WB. The injury severity score: a method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *The Journal of trauma*. 1974;14(3):187-96.
7. Rating the Severity of Tissue Damage: I. The Abbreviated Scale. *JAMA*. 1971;215(2):277-80.
8. The Association for the Advancement of Automotive Medicine. Abbreviated Injury Scale (AIS) [Internet]. [zitiert am 26.01.2019]. URL: <https://www.aaam.org/abbreviated-injury-scale-ais/>.
9. MacKenzie EJ, Shapiro S, Eastham JN. The Abbreviated Injury Scale and Injury Severity Score: Levels of Inter- and Intrarater Reliability. *Medical Care*. 1985;23(6):823-35.
10. Copes WS, Champion HR, Sacco WJ, Lawnick MM, Gann DS, Gennarelli T, MacKenzie E, Schwaitzberg S. Progress in characterizing anatomic injury. *The Journal of trauma*. 1990;30(10):1200-7.
11. Osler T, Baker SP, Long W. A modification of the injury severity score that both improves accuracy and simplifies scoring. *The Journal of trauma*. 1997;43(6):922-5; discussion 5-6.
12. Tay SY, Sloan EP, Zun L, Zaret P. Comparison of the New Injury Severity Score and the Injury Severity Score. *The Journal of trauma*. 2004;56(1):162-4.
13. Pape HC, Lefering R, Butcher N, Peitzman A, Leenen L, Marzi I, Lichte P, Josten C, Bouillon B, Schmucker U, Stahel P, Giannoudis P, Balogh Z. The definition of polytrauma revisited: An international consensus process and proposal of the new 'Berlin definition'. *The journal of trauma and acute care surgery*. 2014;77(5):780-6.
14. Presseportal. Etwa jeder achte Einwohner Deutschlands hatte einen Unfall [Pressemitteilung Internet]. 15.06.2016 [zitiert am 15.08.2017]. URL: <https://www.presseportal.de/pm/103969/3353662>
15. Todesursachenstatistik Deutschland. Statistisches Bundesamt (Destatis) [Internet]. [zitiert am 10.08.2017]. URL: <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>.

16. Hinnenkamp H, Lück M, Brenscheidt S. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin (BAuA). Unfallstatistik 2015: Unfalltote und Unfallverletzte 2015 in Deutschland [Internet]. Juni 2017 [zitiert am 21.08.2017]. URL: https://www.baua.de/DE/Angebote/Publicationen/Fakten/Unfallstatistik-2015.pdf?__blob=publicationFile&v=9
17. Robert Koch-Institut. Gesundheitsberichterstattung des Bundes gemeinsam getragen von RKI und Destatis: Gesundheit in Deutschland [Internet]. November 2015 [Zitiert am 03.09.2017]. URL: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GesInDtld/gesundheit_in_deutschland_2015.pdf?__blob=publicationFile
18. Champion HR, Copes WS, Sacco WJ, Lawnick MM, Keast SL, Bain LW, Jr., Flanagan ME, Frey CF. The Major Trauma Outcome Study: establishing national norms for trauma care. *The Journal of trauma*. 1990;30(11):1356-65.
19. Wiesner G, Bittner EK. Lebenserwartung, vorzeitig verlorene Lebensjahre und vermeidbare Sterblichkeit im Ost-West-Vergleich. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*. 2004;47(3):266-78.
20. Zenker W, Havemann D, Besch L. Verletzungsmuster—Leitlinie bei der Beurteilung des Mehrfachverletzten? *Unfallchirurgie*. 1992;18(2):69-74.
21. Haas NP, Hoffmann RF, Mauch C, von Fournier C, Sudkamp NP. The management of polytraumatized patients in Germany. *Clin Orthop Relat Res*. 1995(318):25-35.
22. Bardenheuer M, Obertacke U, Waydhas C, Nast-Kolb D. Epidemiologie des Schwerverletzten. *Notfall & Rettungsmedizin*. 2000;3(5):309-17.
23. TraumaRegister DGU®. Jahresbericht 2016 für den Zeitraum bis Ende 2015 [Internet]. 2016 [zitiert am 05.09.2017]. URL: http://www.traumaregister-dgu.de/fileadmin/user_upload/traumaregister-dgu.de/docs/Downloads/TR-DGU-Jahresbericht_2016.pdf
24. Haas NP, von Fournier C, Tempka A, Sudkamp NP. [Trauma center 2000. How many and which trauma centers does Europe need around the year 2000?]. *Unfallchirurg*. 1997;100(11):852-8.
25. Debus F, Lefering R, Frink M, Kühne CA, Mand C, Bücking B, Ruchholtz S, TraumaRegister DGU. Numbers of Severely Injured Patients in Germany: A Retrospective Analysis From the DGU (German Society for Trauma Surgery) Trauma Registry. *Deutsches Ärzteblatt International*. 2015;112(49):823-9.
26. Kleber C, Giesecke MT, Tsokos M, Haas NP, Schaser KD, Stefan P, Buschmann CT. Overall distribution of trauma-related deaths in Berlin 2010: advancement or stagnation of German trauma management? *World J Surg*. 2012;36(9):2125-30.
27. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui

- MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo JP, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nasseri K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA, 3rd, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De Leon FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Yip P, Zabetian A, Zheng ZJ, Lopez AD, Murray CJ, AlMazroa MA, Memish ZA. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* (London, England). 2012;380(9859):2095-128.
28. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* (London, England). 1997;349(9064):1498-504.
 29. Trunkey DD. Trauma. Accidental and intentional injuries account for more years of life lost in the U.S. than cancer and heart disease. Among the prescribed remedies are improved preventive efforts, speedier surgery and further research. *Scientific American*. 1983;249(2):28-35.
 30. Schmelz A, Ziegler D, Beck A, Kinzl L, Gebhard F. [Costs for acute, stationary treatment of polytrauma patients]. *Unfallchirurg*. 2002;105(11):1043-8.
 31. Kinzl L, Gebhard F, Arand M. Polytrauma und Ökonomie. *Unfallchirurgie*. 1996;22(4):179-85.
 32. Grotz M, Schwermann T, Lefering R, Ruchholtz S, Graf v.d. Schulenburg JM, Krettek C, Pape HC. DRG-Entlohnung beim Polytrauma. *Der Unfallchirurg*. 2004;107(1):68-75.
 33. Rösch M, Klose T, Leidl R, Gebhard F, Kinzl L, Ebinger T. Kostenanalyse der Behandlung polytraumatisierter Patienten. *Der Unfallchirurg*. 2000;103(8):632-9.
 34. Baum H, Kranz T, Westerkamp U. Bundesanstalt für Straßenwesen. Volkswirtschaftliche Kosten durch Straßenverkehrsunfälle in Deutschland [Internet]. *Mensch und Sicherheit Heft M 208*. August 2010 [abgerufen am

- 03.01.2018] URL: <https://bast.opus.hbz-nrw.de/opus45-bast/frontdoor/deliver/index/docId/209/file/M208.pdf>
35. Bundesanstalt für Straßenwesen. Volkswirtschaftliche Kosten von Straßenverkehrsunfällen in Deutschland [Internet]. Februar 2019 [zitiert am 03.03.2019]. URL: http://www.bast.de/DE/Statistik/Unfaelle/volkswirtschaftliche_kosten.pdf?__blob=publicationFile&v=9.
 36. Ruchholtz S, Nast-Kolb D, Waydhas C, Schweiberer L. Das Verletzungsmuster beim Polytrauma Stellenwert der Information über den Unfallhergang bei der klinischen Akutversorgung. *Der Unfallchirurg*. 1996;99(9):633-41.
 37. Zenker W, Besch L, Egbers H-J, Havemann D. Verletzungsmuster mit Gradation der Verletzungsschwere beim Polytrauma. *Acta Chirurgica Austriaca*. 1992;24(5):282-5.
 38. Yucel N, Lefering R, Maegele M, Vorweg M, Tjardes T, Ruchholtz S, Neugebauer EA, Wappler F, Bouillon B, Rixen D. Trauma Associated Severe Hemorrhage (TASH)-Score: probability of mass transfusion as surrogate for life threatening hemorrhage after multiple trauma. *The Journal of trauma*. 2006;60(6):1228-36; discussion 36-7.
 39. Banerjee M, Bouillon B, Shafizadeh S, Paffrath T, Lefering R, Wafaisade A. Epidemiology of extremity injuries in multiple trauma patients. *Injury*. 2013;44(8):1015-21.
 40. Pape HC, Probst C, Lohse R, Zelle BA, Panzica M, Stalp M, Steel JL, Duhme HM, Pfeifer R, Krettek C, Sittaro NA. Predictors of late clinical outcome following orthopedic injuries after multiple trauma. *The Journal of trauma*. 2010;69(5):1243-51.
 41. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone healing. *Injury*. 2005;36(12):1392-404.
 42. Park JE, Barbul A. Understanding the role of immune regulation in wound healing. *American journal of surgery*. 2004;187(5a):11s-6s.
 43. Spanel-Borowski K. Zytologie und Histologie - Grundlagen. In: Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Reißig D, Salvetter J, Schmidt W, Schmitz F, Schulte E, Spanel-Borowski K, Wolff W, Wurzingler LJ, Zilch H-G, Hrsg. *Duale Reihe Anatomie*. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2010: 28-51.
 44. Lawn BR, Lee JJ-W, Chai H. Teeth: Among Nature's Most Durable Biocomposites. *Annual Review of Materials Research*. 2010;40(1):55-75.
 45. Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie*. 3. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2009: 137-165.
 46. Drenckhahn D, Waschke J, Hrsg. Benninghoff Drenckhahn *Taschenbuch Anatomie*. 1. Aufl. München: Urban & Fischer; 2008: 23-25.
 47. Wolff J. The Classic: On the Inner Architecture of Bones and its Importance for Bone Growth. *Clin Orthop Relat Res*. 2010;468(4):1056-65.
 48. Cohen MM, Jr. The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *American journal of medical genetics Part A*. 2006;140(23):2646-706.

49. Raisz LG. Physiology and pathophysiology of bone remodeling. *Clinical chemistry*. 1999;45(8 Pt 2):1353-8.
50. Kini U, Nandeesh BN. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. In: Fogelman I, Gnanasegaran G, van der Wall H, editors. *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 29-57.
51. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, Tanaka H, Sasaki T, Nishihara T, Koga T, Martin TJ, Suda T. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(18):7260-4.
52. Ushach I, Zlotnik A. Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage. *Journal of Leukocyte Biology*. 2016;100(3):481-9.
53. Insogna KL, Sahni M, Grey AB, Tanaka S, Horne WC, Neff L, Mitnick M, Levy JB, Baron R. Colony-stimulating factor-1 induces cytoskeletal reorganization and c-src-dependent tyrosine phosphorylation of selected cellular proteins in rodent osteoclasts. *The Journal of clinical investigation*. 1997;100(10):2476-85.
54. Stanley ER, Berg KL, Einstein DB, Lee PS, Pixley FJ, Wang Y, Yeung YG. Biology and action of colony--stimulating factor-1. *Molecular reproduction and development*. 1997;46(1):4-10.
55. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nature reviews Genetics*. 2003;4(8):638-49.
56. Boyce BF, Xing L. Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin. *Arthritis Research & Therapy*. 2007;9(1):S1.
57. Blair HC. How the osteoclast degrades bone. *BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 1998;20(10):837-46.
58. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*. 1999;284(5411):143-7.
59. Katagiri T, Takahashi N. Regulatory mechanisms of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Dis*. 2002;8(3):147-59.
60. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*. 2008;3(Suppl 3):S131-S9.
61. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. 2006;235(1):176-90.
62. Parfitt AM. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *Journal of cellular biochemistry*. 1994;55(3):273-86.
63. McKibbin B. The biology of fracture healing in long bones. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 1978;60-b(2):150-62.
64. Nyary T, Scammell BE. Principles of bone and joint injuries and their healing. *Surgery - Oxford International Edition*. 2018;36(1):7-14.

65. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury*. 2011;42(6):551-5.
66. Krettek C, Schandelmaier P, Nliclau T, Tscherne H. Minimally invasive percutaneous plate osteosynthesis (MIPPO) using the DCS in proximal and distal femoral fractures. *Injury*. 1997;28:A20-A30.
67. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res*. 1998(355 Suppl):S7-21.
68. Sfeir C, Ho L, Doll BA, Azari K, Hollinger JO. Fracture repair . In: Lieberman JR, Friedlaender GE, editors. *Bone regeneration and repair: Biology and clinical applications*. New Jersey: Humana; 2005. p. 21-44.
69. Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, Gaber T, Toben D, Schmidmaier G, Perka C, Buttgerit F, Duda GN. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2010;16(4):427-34.
70. Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. Systemic inflammation after trauma. *Injury*. 2007;38(12):1336-45.
71. Land WG. The Role of Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) in Human Diseases: Part II: DAMPs as diagnostics, prognostics and therapeutics in clinical medicine. *Sultan Qaboos University medical journal*. 2015;15(2):e157-70.
72. Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury*. 2005;36(6):691-709.
73. Tang D, Kang R, Coyne CB, Zeh HJ, Lotze MT. PAMPs and DAMPs: Signal 0s that Spur Autophagy and Immunity. *Immunological reviews*. 2012;249(1):158-75.
74. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature immunology*. 2015;16(5):448-57.
75. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International review of cell and molecular biology*. 2012;298:229-317.
76. Wang H, Ma S. The cytokine storm and factors determining the sequence and severity of organ dysfunction in multiple organ dysfunction syndrome. *The American journal of emergency medicine*. 2008;26(6):711-5.
77. Kleber C, Becker CA, Schmidt-Bleek K, Schaser KD, Haas NP. Are Pentraxin 3 and Transsignaling Early Markers for Immunologic Injury Severity in Polytrauma? A Pilot Study. *Clin Orthop Relat Res*. 2013;471(9):2822-30.
78. Jones SA. Directing Transition from Innate to Acquired Immunity: Defining a Role for IL-6. *The Journal of Immunology*. 2005;175(6):3463.
79. Hurst SM, Wilkinson TS, McLoughlin RM, Jones S, Horiuchi S, Yamamoto N, Rose-John S, Fuller GM, Topley N, Jones SA. IL-6 and Its Soluble Receptor Orchestrate a Temporal Switch in the Pattern of Leukocyte Recruitment Seen during Acute Inflammation. *Immunity*. 2001;14(6):705-14.
80. Gebhard F, Pfetsch H, Steinbach G, Strecker W, Kinzl L, Bruckner UB. Is interleukin 6 an early marker of injury severity following major trauma in humans? *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)*. 2000;135(3):291-5.
81. Strecker W, Gebhard F, Perl M, Rager J, Buttenshon K, Kinzl L, Beck A. Biochemical characterization of individual injury pattern and injury severity. *Injury*. 2003;34(12):879-87.
82. Frink M, van Griensven M, Kobbe P, Brin T, Zeckey C, Vaske B, Krettek C, Hildebrand F. IL-6 predicts organ dysfunction and mortality in patients with multiple

- injuries. *Scandinavian Journal of Trauma, Resuscitation and Emergency Medicine*. 2009;17(1):49.
83. Garbers C, Thaiss W, Jones GW, Waetzig GH, Lorenzen I, Guilhot F, Lissilaa R, Ferlin WG, Grotzinger J, Jones SA, Rose-John S, Scheller J. Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor. *J Biol Chem*. 2011;286(50):42959-70.
 84. Kleber C, Becker CA, Malysch T, Reinhold JM, Tsitsilonis S, Duda GN, Schmidt-Bleek K, Schaser KD. Temporal profile of inflammatory response to fracture and hemorrhagic shock: Proposal of a novel long-term survival murine multiple trauma model. *J Orthop Res*. 2015;33(7):965-70.
 85. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 2011;1813(5):878-88.
 86. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal*. 2003;374(Pt 1):1-20.
 87. Mihara M, Hashizume M, Yoshida H, Suzuki M, Shiina M. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2012;122(4):143-59.
 88. Rose-John S. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International journal of biological sciences*. 2012;8(9):1237-47.
 89. Rose-John S. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane bound and soluble receptors. *Acta biochimica Polonica*. 2003;50(3):603-11.
 90. Wichmann MW, Arnoczky SP, DeMaso CM, Ayala A, Chaudry IH. Depressed osteoblast activity and increased osteocyte necrosis after closed bone fracture and hemorrhagic shock. *The Journal of trauma*. 1996;41(4):628-33.
 91. Balto K, Sasaki H, Stashenko P. Interleukin-6 Deficiency Increases Inflammatory Bone Destruction. *Infection and Immunity*. 2001;69(2):744-50.
 92. Wichmann MW, Ayala A, Chaudry IH. Severe depression of host immune functions following closed-bone fracture, soft-tissue trauma, and hemorrhagic shock. *Crit Care Med*. 1998;26(8):1372-8.
 93. Andermahr J, Elsner A, Brings AE, Hensler T, Gerbershagen H, Jubel A. Reduced collagen degradation in polytraumas with traumatic brain injury causes enhanced osteogenesis. *Journal of neurotrauma*. 2006;23(5):708-20.
 94. Bumann M, Henke T, Gerngross H, Claes L, Augat P. Influence of haemorrhagic shock on fracture healing. *Langenbeck's Archives of Surgery*. 2003;388(5):331-8.
 95. Lucas TS, Bab IA, Lian JB, Stein GS, Jazrawi L, Majeska RJ, Attar-Namdar M, Einhorn TA. Stimulation of systemic bone formation induced by experimental blood loss. *Clin Orthop Relat Res*. 1997(340):267-75.
 96. Starr AJ, Welch RD, Eastridge BJ, Pierce W, Zhang H. The effect of hemorrhagic shock in a caprine tibial fracture model. *J Orthop Trauma*. 2002;16(4):250-6.

97. Neunaber C, Yesilkaya P, Putz C, Krettek C, Hildebrand F. Differentiation of osteoprogenitor cells is affected by trauma-haemorrhage. *Injury*. 2013;44(10):1279-84.
98. Recknagel S, Bindl R, Brochhausen C, Gockelmann M, Wehner T, Schoengraf P, Huber-Lang M, Claes L, Ignatius A. Systemic inflammation induced by a thoracic trauma alters the cellular composition of the early fracture callus. *The journal of trauma and acute care surgery*. 2013;74(2):531-7.
99. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *The American Journal of Pathology*. 1994;145(6):1421-31.
100. Hiltunen A, Vuorio E, Aro HT. A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res*. 1993;11(2):305-12.
101. Schlundt C, Reinke S, Geissler S, Bucher CH, Giannini C, Märdian S, Dahne M, Kleber C, Samans B, Baron U, Duda GN, Volk H-D, Schmidt-Bleek K. Individual Effector/Regulator T Cell Ratios Impact Bone Regeneration. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(1954).
102. Bucher CH, Schlundt C, Wulsten D, Sass FA, Wendler S, Ellinghaus A, Thiele T, Seemann R, Willie BM, Volk H-D, Duda GN, Schmidt-Bleek K. Experience in the Adaptive Immunity Impacts Bone Homeostasis, Remodeling, and Healing. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(797).
103. Isaksson H, Gröngröft I, Wilson W, van Donkelaar CC, van Rietbergen B, Tami A, Huiskes R, Ito K. Remodeling of fracture callus in mice is consistent with mechanical loading and bone remodeling theory. *J Orthop Res*. 2009;27(5):664-72.
104. Fenton HJH. LXXIII.—Oxidation of tartaric acid in presence of iron. *Journal of the Chemical Society, Transactions*. 1894;65(0):899-910.
105. Pastoureau P, Merle B, Delmas PD. Specific radioimmunoassay for ovine bone gla-protein (osteocalcin). *Acta endocrinologica*. 1988;119(1):152-60.
106. Ohsawa K, Neo M, Matsuoka H, Akiyama H, Ito H, Kohno H, Nakamura T. The expression of bone matrix protein mRNAs around beta-TCP particles implanted into bone. *Journal of biomedical materials research*. 2000;52(3):460-6.
107. Marks SC, Jr., Popoff SN. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *The American journal of anatomy*. 1988;183(1):1-44.
108. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 1981;29(4):577-80.
109. Prystaz K, Kaiser K, Kovtun A, Haffner-Luntzer M, Fischer V, Rapp AE, Liedert A, Strauss G, Waetzig GH, Rose-John S, Ignatius A. Distinct Effects of IL-6 Classic and Trans-Signaling in Bone Fracture Healing. *The American Journal of Pathology*. 2018;188(2):474-90.
110. Miyaura C, Kusano K, Masuzawa T, Chaki O, Onoe Y, Aoyagi M, Sasaki T, Tamura T, Koishihara Y, Ohsugi Y, Suda T. Endogenous bone-resorbing factors in

- estrogen deficiency: cooperative effects of IL-1 and IL-6. *J Bone Miner Res.* 1995;10(9):1365-73.
111. Palmqvist P, Persson E, Conaway HH, Lerner UH. IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF-kappa B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF-kappa B in mouse calvariae. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950).* 2002;169(6):3353-62.
 112. Cho TJ, Kim JA, Chung CY, Yoo WJ, Gerstenfeld LC, Einhorn TA, Choi IH. Expression and role of interleukin-6 in distraction osteogenesis. *Calcif Tissue Int.* 2007;80(3):192-200.
 113. Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Pleshko Camacho N, Bostrom MP. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone.* 2007;41(6):928-36.
 114. Yoshitake F, Itoh S, Narita H, Ishihara K, Ebisu S. Interleukin-6 directly inhibits osteoclast differentiation by suppressing receptor activator of NF-kappaB signaling pathways. *J Biol Chem.* 2008;283(17):11535-40.
 115. Loi F, Cordova LA, Pajarinen J, Lin TH, Yao Z, Goodman SB. Inflammation, fracture and bone repair. *Bone.* 2016;86:119-30.
 116. Manolagas SC. The role of IL-6 type cytokines and their receptors in bone. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 1998;840:194-204.
 117. Kaiser K, Prystaz K, Vikman A, Haffner-Luntzer M, Bergdolt S, Strauss G, Waetzig GH, Rose-John S, Ignatius A. Pharmacological inhibition of IL-6 trans-signaling improves compromised fracture healing after severe trauma. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2018;391(5):523-36.
 118. Chen ZX, Chang M, Peng YL, Zhao L, Zhan YR, Wang LJ, Wang R. Osteogenic growth peptide C-terminal pentapeptide [OGP(10-14)] acts on rat bone marrow mesenchymal stem cells to promote differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes. *Regulatory peptides.* 2007;142(1-2):16-23.
 119. Edwards CJ, Williams E. The role of interleukin-6 in rheumatoid arthritis-associated osteoporosis. *Osteoporosis International.* 2010;21(8):1287-93.
 120. Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, Miyaura C, Tanaka S, Yamada Y, Koishihara Y, Ohsugi Y, Kumaki K, Taga T, Kishimoto T, Suda T. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1993;90(24):11924-8.
 121. Udagawa N, Takahashi N, Katagiri T, Tamura T, Wada S, Findlay DM, Martin TJ, Hirota H, Taga T, Kishimoto T, Suda T. Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *The Journal of experimental medicine.* 1995;182(5):1461-8.
 122. Jones SR, Carley S, Harrison M. An introduction to power and sample size estimation. *Emerg Med J.* 2003;20(5):453-8.

III. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jens Michael Reinhold, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Einfluss des IL-6 Transsignaling-Mechanismus auf die Frakturheilung im Mono-/ Polytrauma-Mausmodell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

IV. Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Jens Michael Reinhold hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Kleber C, Becker CA, Malysch T, **Reinhold JM**, Tsitsilonis S, Duda GN, Schmidt-Bleek K, Schaser KD. Temporal profile of inflammatory response to fracture and hemorrhagic shock: Proposal of a novel long-term survival murine multiple trauma model. *J Orthop Res.* 2015

Beitrag im Einzelnen: Mitwirkung im Tier-OP, Einschluss der Tiere in Studiengruppen, postinterventionelle Visite der Tiere, Euthanasierung und Probenentnahme, histologische Aufarbeitung, Erstellung von Abbildungen.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

V. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

VI. Komplette Publikationsliste

Zeitschriftenartikel

1. Kleber C, Becker CA, Malysch T, **Reinhold JM**, Tsitsilonis S, Duda GN, Schmidt-Bleek K, Schaser KD. Temporal profile of inflammatory response to fracture and hemorrhagic shock: Proposal of a novel long-term survival murine multiple trauma model. *J Orthop Res.* 2015

Kongressbeiträge

1. Kleber C, Becker C, Malysch T, **Reinhold JM**, Tsitsilonis S, Duda GN, Schmidt-Bleek K, Schaser KD

Etablierung und Validierung eines Polytraumamodells der Maus zur in vivo Analyse der posttraumatischen Immunantwort und Interaktion von hämorrhagischen Schock und Frakturheilung. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2014). Berlin, 28.-31.10.2014.

2. Kleber C, Becker C, Giesecke MT, **Reinhold JM**, Malysch T, Tsitsilonis S, Schmidt-Bleek K, Schaser KD

In vivo Analyse der posttraumatischen Immunantwort und Interaktion von hämorrhagischen Schock und Frakturheilung: Etablierung und Validierung eines Polytraumamodells der Maus. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie (DKOU 2014). Berlin, 28.-31.10.2014.

VII. Danksagung

Ich möchte meinen Dank an alle Personen aussprechen, die mich auf meinem langen Weg der Promotion begleitet und mich bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt, bestärkt und gefördert haben. Insbesondere möchte ich folgende Personen hervorheben:

Priv.-Doz. Dr. med. Christian Kleber für die Überlassung dieses Themas und die freundschaftliche Zusammenarbeit, die sich auch über den Rahmen dieser Promotion hinaus erstreckte.

Allen Mitgliedern der AG Polytrauma. Besonders möchte ich mich bei Tom Malysch bedanken. Über dich bin ich erst in die Arbeitsgruppe und an dieses Promotionsthema gelangt. Danke auch für die vielen Abende und Nächte gemeinsamen Arbeitens an unseren Projekten und für die sich daraus entwickelte Freundschaft, die dazu beigetragen hat, die Promotion erfolgreich zu beenden.

Allen Mitarbeitern des Julius Wolff Institutes. Nennen möchte ich PD Dr. rer. nat. Katharina Schmidt-Bleek für die vielen produktiven Gespräche und die vielseitige wissenschaftliche Beratung, Gabriela Korus und Norma Schulz für ihre Unterstützung im Bereich der Histologie sowie Mario Thiele für den technischen Beistand bei der Datenverarbeitung. Vielen Dank für euer oft auch sehr kurzfristiges Engagement, mit dessen Hilfe diese Arbeit in der vorliegenden Form erst möglich gemacht wurde.

Ganz besonders möchte ich mich bei Laura bedanken. Dafür, dass du mit mir seit vielen Jahren die kleinen und großen Schwierigkeiten des Lebens meisterst.

Meiner Familie. Ihr habt mich Zeit meines Lebens in meinen Entscheidungen unterstützt und bestärkt. Euer Vertrauen in mich und meine Arbeit währte immer und hat mich motiviert, den langen Prozess der Fertigstellung dieser Promotion durchzustehen.