

Fakultät für Medizin

In vitro Stimulation von primären Osteoblasten mit pro- und antiinflammatorischen Zytokinen: Eine Nachahmung der Situation bei polytraumatisierten Patienten

Sebastian Michael Leixnering

Vollständiger Abdruck der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfende der Dissertation:

1. apl.Prof. Dr. Martijn van Griensven
2. apl. Prof. Dr. Rainer Burgkart

Die Dissertation wurde am 20.09.2019 bei der Technischen Universität eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.04.2020 angenommen.

**In vitro Stimulation von primären Osteoblasten mit
pro- und antiinflammatorischen Zytokinen: Eine
Nachahmung der Situation bei polytraumatisierten
Patienten**

Doktorand: Sebastian Leixnering

Betreuer: Prof. Dr. Martijn van Griensven

Mentor: PD. Dr. Elizabeth Rosado Balmayor

Danksagung:

Ich möchte mich ausdrücklich bei all jenen bedanken, die mich bei der Verfassung meiner Dissertation unterstützt haben und diese Arbeit ermöglicht haben.

Insbesondere gilt mein Dank Prof. Dr. Martijn van Griensven und PD Dr. Elizabeth Rosado Balmayor. Sie sind mir stets mit Ratschlägen zur Seite gestanden und unterstützten mich in jeder Situation. Ihre motivierende Art und vor allem ihr fachliches Wissen trugen wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit bei.

Weiters möchte ich mich noch bei dem gesamten Team des Labors der experimentellen Unfallchirurgie am Klinikum Rechts der Isar bedanken. Besonders richtet sich mein Dank an Marina Schnelzer und Fritz Seidl, MA MBA.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meiner Familie bedanken, die immer hinter mir gestanden ist und mich unermüdlich unterstützt hat. Insbesondere bei meiner Freundin Anna, sie hat mich anhaltend in meinem Schaffen gestärkt und stets motiviert.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
1.1 Knochen	6
1.1.1 Knochenmatrix.....	7
1.1.2 Knochenzellen.....	8
1.1.2.1 Osteoblasten	9
1.1.2.2 Osteozyten	9
1.1.2.3 Osteoklasten	9
1.2 Osteoblastäre Differenzierung.....	11
1.3 Frakturheilung	15
1.3.1 Phasen der Frakturheilung.....	15
1.3.1.1 Entzündungsphase	16
1.3.1.2 Reparationsphase	17
1.3.1.2.1 Primäre Frakturheilung	17
1.3.1.2.2 Sekundäre Frakturheilung	18
1.3.1.3 Fraktur – Remodelling.....	20
1.3.2 Knochenheilung bei inflammatorischer Situation.....	20
1.3.2.1 Lokale Entzündung	20
1.3.2.2 Akute Systemische Entzündung	21
1.4 Die Rolle von Zytokinen bei der Frakturheilung	23
1.4.1 Zytokine	24
1.4.1.1 Interleukine	24
1.4.1.1.1 Interleukin-1 β	25
1.4.1.1.2 Interleukin-6	25
1.4.1.1.3 Interleukin 10	25
1.4.1.2 Tumornekrosefaktor- α	26
1.4.2 Der Einfluss von Zytokinen auf Osteoblasten	27
1.5 Fragestellung	28
2. Material	29
3. Methoden	31
3.1 Osteoblastenisolation	31
3.2 Zellzählung.....	32
3.3 Zytokinstimulation	32
3.4 MTT.....	33
3.5 LDH –Test.....	34
3.6 Alkalische Phosphatase Test.....	34
3.7 RNA – Isolation	35
3.8 RNA-Messung	35
3.9 Transkription RNA-cDNA.....	36
3.10 PCR.....	36
3.11 Statistische Auswertung	37
4. Ergebnisse.....	38
4.1 LDH	38
4.1.1 IL-1 β :	38
4.1.2 IL-6	39

4.1.3 IL-10	39
4.1.4 TNF- α	40
4.1.5 LDH intrazytokinärer Vergleich	41
4.2 MTT	42
4.2.1 IL-1 β	42
4.2.2 IL-6	43
4.2.3 IL-10	44
4.2.4 TNF- α	45
4.2.5 MTT – intrazytokinärer Vergleich	46
4.3 ALP-Test	48
4.3.1 IL-1 β	48
4.3.2 IL-6	49
4.3.3 IL-10	49
4.3.4 TNF- α	50
4.3.5 ALP – intrazytokinärer Vergleich.....	51
4.4 PCR	53
4.4.1 Kollagen	53
4.4.1.1 Kollagen – IL-1 β	53
4.4.1.2 Kollagen – IL-6	54
4.4.1.3 Kollagen – IL-10	54
4.4.1.4 Kollagen – TNF- α	55
4.4.1.5 Kollagen – intrazytokinärer Vergleich	56
4.4.2 Osteokalzin	59
4.4.2.1 Osteokalzin – IL-1 β	59
4.4.2.2 Osteokalzin – IL-6	59
4.4.2.3 Osteokalzin – IL-10	60
4.4.2.4 Osteokalzin – TNF- α	61
4.4.2.5 Osteokalzin – Intrazytokinärer Vergleich	62
4.4.3 Osteopontin	65
4.4.3.1 Osteopontin – IL-1 β	65
4.4.3.2 Osteopontin – IL-6.....	65
4.4.3.3 Osteopontin – IL-10.....	66
4.4.3.4 Osteopontin – TNF- α	67
4.4.3.5 Osteopontin – Intrazytokinärer Vergleich.....	67
4.4.4. RunX2.....	71
4.4.4.1 RunX2 – IL-1 β	71
4.4.4.2 RunX2 – IL-6	71
4.4.4.3 RunX2 – IL-10	72
4.4.4.4 RunX2 – TNF- α	73
4.4.4.5 RunX2 – Intrazytokinärer Vergleich:	73
5. Diskussion	76
6. Ausblick	80
7. Zusammenfassung	81
8. Tabellenverzeichnis	85
9. Abbildungsverzeichnis	85
10. Literaturverzeichnis	87

1. Einleitung

Im Jahr 2016 gab es allein in Deutschland 18.479 schwerverletzte Patienten. Durchschnittlich verbringt ein Patient mit einem Verletzungsgrad von einem Injury Severity Score (Baker et al., 1974), ISS, > 16, 20 Tage in einem Krankenhaus. Die dabei verursachten Kosten belaufen sich hier auf 19.382 € pro Patient. (Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU) & Sektion Intensiv- & Notfallmedizin, Schwerverletztenversorgung (NIS) und AUC - Akademie der Unfallchirurgie GmbH, n.d.) Dies verdeutlicht sowohl die medizinische als auch die sozialökonomische Bedeutung von polytraumatisierten Patienten.

Ein Polytrauma führt zu einer akuten Aktivierung des Immunsystems. Damit verbunden ist eine massive Ausschüttung von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen. (Griensven, 2014 ; Keel & Trentz, 2005) In den meisten Fällen erleidet ein polytraumatisierter Patient einen Bruch eines langen Röhrenknochens. Besonders bei diesen schwerverletzten Patienten kommt es häufig zu einer unzureichenden und verlangsamten Knochenheilung (Bastian et al., 2011), die nicht selten in der Bildung von Pseudarthrosen endet und dadurch den Krankenhausaufenthalt des Patienten deutlich verlängert. Einer der Gründe für die insuffiziente Knochenheilung könnten die in hoher Konzentration, im Serum des Patienten, vorhandenen Zytokine sein. Aus diesem Grund untersucht die vorliegende Studie den Einfluss von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen auf knochenbildende Zellen, sogenannten Osteoblasten. Studien konnten bereits zeigen, dass vereinzelte Zytokine unter Umständen einen negativen Einfluss auf die Knochenheilung haben. (Dresner-Pollak et al., 2004; L. C. Gerstenfeld et al., 2003; Hughes & Howells, 1993; Q. Zhang et al., 2014)

Ziel der vorliegenden Studie ist es den Einfluss von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen, in Konzentrationen wie sie bei polytraumatisierten Patienten vorliegen, auf Präosteoblasten zu untersuchen. Hierdurch sollen neue Erkenntnisse über die Knochenheilung bei schwerverletzten Patienten gewonnen werden.

1.1 Knochen

Der menschliche Körper besteht aus 223 Knochen. Der Knochenapparat ist multifunktional, er stellt den fragilen Rahmen, der unserem Körper seine Form gibt, dient als Schutz für unsere inneren Organe, ermöglicht dem Körper die Fähigkeit zur Bewegung, dient als Hauptspeicher für mineralische Salze und dient der Hämatopoese. (C. Karaplis, 2002) Knochengewebe zählt zu einem der härtesten Gewebe des menschlichen Organismus. Es unterliegt einem ständigen Auf- und Abbau. Nicht nur während der Embryonalentwicklung und des Wachstums wird Knochen aufgebaut, vielmehr erfolgt auch im adulten Organismus eine ständige Knochensynthese. Aufgrund der andauernden mechanischen Belastung des Knochengewebes erfolgt ein ständiger Auf- und Abbauprozess, welcher als „bone remodelling“ bezeichnet wird. (Parfitt, 1994)

Es werden drei verschiedenen Knochenarten unterschieden:

- Lange Knochen: z.B. Röhrenknochen
- Kurze Knochen: z.B. Wirbelkörper
- Platte Knochen: z.B. Schulterblatt

Der Aufbau eines jeden Knochen ist gleich. Er besteht aus einer Innenstruktur mit einer außen kompakten, den Knochen umgebenden Schicht, der Substantia compacta und einer im Inneren, ein schwammartiges Balkenwerk bildenden Schicht, der Substantia spongiosa. Röhrenknochen lassen sich in 3 Teile gliedern, die proximale und distale Epiphyse, die Diaphyse und die dazwischenliegende Metaphyse. Im Inneren des Knochenschafts liegt das für die Hämatopoese essenzielle Knochenmark in der Knochenmarkhöhle. Das Innere der Epiphyse ist durch eine typische Knochenbälkchenstruktur mit einer dünnen Substantia compacta gekennzeichnet. Von außen umhüllt die Knochenhaut, das Periost, den Knochen. Diese den Knochen ernährende Schicht ist reich an Blutgefäßen und Nerven. Sie wird unterteilt in zwei Schichten. Das äußere Stratum fibrosum, eine faserreiche Schicht und dem inneren Stratum osteogenicum, eine gefäß-, nerven- und zellreiche Schicht. Innen wird der Knochen zum Markraum hin durch das der Substantia compacta anliegende Endost bedeckt.

Die Knochensubstanz selbst besteht aus einer Knochenmatrix, in die die unterschiedlichen Knochenzellen eingebettet sind. (Schiebler, 2000; Welsch, 2010)

1.1.1 Knochenmatrix

Die Knochenmatrix besteht aus organischen Materialien, vor allem Kollagenfasern, Knochenproteinen und Proteoglykanen, und aus anorganischen Salzen, also mineralischem Material. Diese Zusammensetzung erlaubt eine erhebliche Torsions- und Biegebeanspruchung. (Welsch, 2010)

Die extrazelluläre Knochenmatrix bildet ein festes Gerüst und dient als Leitschiene für die Zellen. Sie bildet den so genannten Osteoid, aus dem nach Kalzifizierung der eigentliche Knochen entsteht. Das Kollagen macht ca. 90% des organischen Knochenmaterials aus. Das fibrilläre Kollagen I ist das häufigste Kollagen im Knochen, aber auch Kollagen III und V sowie die fibrillenassoziierten Kollagene VI und X wurden nachgewiesen. (Welsch, 2010) Die zu Fibrillen assoziierte und quervernetzte Trippelhelixstruktur von Kollagen ist maßgeblich für die beeindruckende mechanische Belastbarkeit verantwortlich. Weiter bildet diese 3-dimensionale Struktur ebenfalls die Hauptmatrix für die Ablagerung von Hydroxylapatitkristallen. (J. E. Aubin, 1998) Weitere wichtige Bestandteile der extrazellulären Matrix sind die Strukturproteine Osteokalzin, Osteopontin, Osteonectin, Sialoglykoproteine (bone sialoproteine, BSP) und Fibrinonektin. Sie besitzen Bindestellen für andere Matrixmoleküle, Zellen und Hydroxylapatit. (Welsch, 2010)

Grundsätzliche Bestandteile des Knochens sind die Knochengrundsubstanz sowie die Knochenzellen mit unterschiedlichen Funktionen. Die Knochengrundsubstanz besteht aus etwa 50 % Mineralien (Phosphat und Kalzium etwa im Verhältnis 2:1, Zitat, Carbonat, Nitrat, Magnesium, Fluor und Spurenstoffe), etwa 25 % organischen Verbindungen (Kollagenfasern, davon etwa 90 % Kollagen-Typ I Fasern) und etwa 25 % Hydratationswasser. (Schiebler, 2000) (*Abbildung 1*)

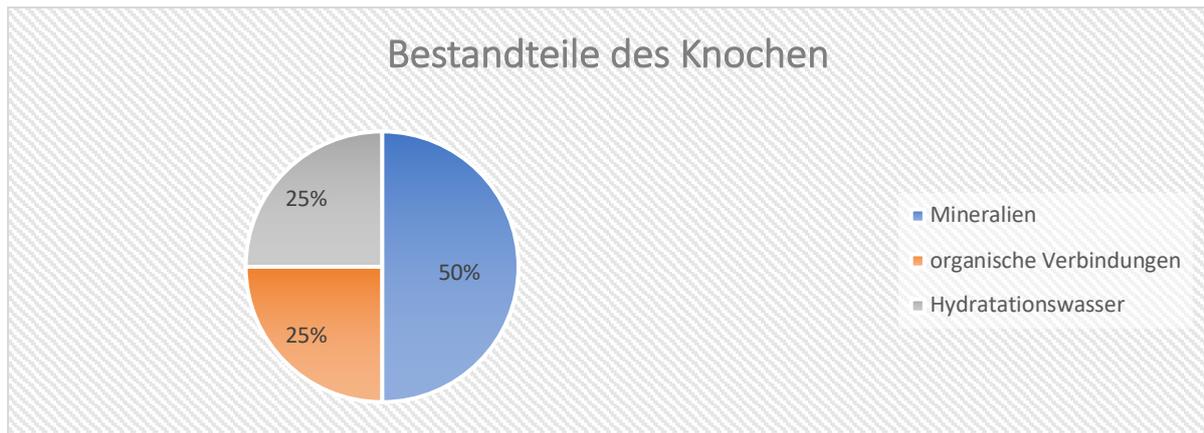


Abbildung 1: Bestandteile der Knochengrundsubstanz

Histologisch können zwei Arten von Knochengewebe unterschieden werden. Der Geflechtknochen (primäre Knochen) und der Lamellenknochen (sekundärer Knochen). Ersterer bildet ein geflechtartiges, unregelmäßiges Grundgerüst aus Knochenzellen und Kollagenfasern. Er entsteht direkt aus dem Mesenchym und findet sich vor allem während der Phase der Knochenneubildung. Im ausgereiften Skelett ist er nur vereinzelt zu finden. Der Lamellenknochen besteht wiederum aus sich wiederholenden Strukturen mit einer hohen Osteozytenzahl und einem geringen Bestand an Mineralien. Grundbaustein ist das Osteon mit Havers-Kanal und Havers-Blutgefäß. (Welsch, 2010)

1.1.2 Knochenzellen

In der Knochenmatrix eingebettet befinden sich die unterschiedlichen Knochenzellen. Zu diesen zählen:

- Osteoblasten
- Osteozyten
- Osteoklasten

1.1.2.1 Osteoblasten

Osteoblasten sind die basophilen knochenbildenden Zellen wachsender und ausgereifter Knochen. Sie bilden die Knochenmatrix, leiten sich von Osteoprogenitorzellen ab und sind über Nexus miteinander verbunden. Die Membran ist reich an alkalischer Phosphatase, die eine wichtige Rolle bei der Mineralisierung spielt und deren Aktivität im Serum zur Schätzung der Osteoblastentätigkeit dient. Weiters erfolgt über sie die Sekretion von Kollagen, Proteoglykanen, Osteokalzin, Osteopontin, Osteonectin. (Welsch, 2010)

Osteoblasten sind differenzierte Zellen, die für die Produktion der Knochenmatrix verantwortlich sind. Sie regulieren die Mineralisation der Knochenmatrix. (Marks Jr. & Odgren, 2002) Die initial von ihnen gebildete Matrix ist dabei noch nicht verkalkt und wird Osteoid genannt. Unterhalb von Osteoblasten befindet sich immer eine Schicht von unverkalkten Osteoid. Daraufhin erfolgt eine durch die Knochenmatrix induzierte Umwandlung in Osteozyten.

1.1.2.2 Osteozyten

Osteozyten sind in die Knochenmatrix eingemauerte, morphologisch veränderte, terminal ausdifferenzierte Osteoblasten. Sie sind für die Aufrechterhaltung der Knochenmatrix zuständig. (Buckwalter et al., 1996) Ihr Zellkörper liegt in kleinen Lakunen der Knochenmatrix, die Fortsätze liegen in feinen Kanälen (Canaliculi), an ihrer Oberfläche befindet sich ein schmaler Saum unverkalkter Matrix. Untereinander sind Osteozyten über Gap junctions verbunden. Sie sind nicht nur in der Lage Matrix zu produzieren, sondern auch bis zu einem gewissen Grad zu resorbieren. Je weiter ein Osteozyt von einem Osteoblasten entfernt ist, desto geringer sind die Zellorganellen entwickelt. (Welsch, 2010)

1.1.2.3 Osteoklasten

Osteoklasten sind große vielkernige Zellen die Knochen resorbieren können. Im spongiosen Knochen liegen sie in flachen, von ihnen selbst geschaffenen Höhlungen, der Knochenoberfläche, den Howship-Lakunen. Die Osteoklasten liegen der

Knochenmatrix besonders dicht an, hier entsteht eine Versiegelungszone, in der besonders das $\alpha_v\beta_3$ Integrin der Zellmembran mit den Matrixkomponenten, insbesondere dem Osteopontin fest verbunden ist. Osteoklasten besitzen zwei Plasmamembranspezifikationen: einen Faltensaum und eine „clear zone“. Der Faltensaum dient der Knochenresorption und wird von der mikrofilamentreichen und zellorganellfreien Clear zone umgeben. Sie dient der Anheftung an der Knochenmatrix. Die Knochenresorption erfolgt mithilfe von Säure und lysosomalen sowie nicht lysosomalen Enzymen. Durch von Osteoblasten sezernierte Zytokine erfolgt die Aktivierung der Osteoklasten. Osteoklasten sind im Gegensatz zu den anderen Knochenzellen hämatopoetischen Ursprungs. Sie stammen von Stammzellen der Monozyten-Makrophagenreihe ab und gehören somit zum mononukleären Phagozytensystem. (Marks Jr. & Odgren, 2002; Welsch, 2010)

1.2 Osteoblastäre Differenzierung

Wie bereits erwähnt sind Osteoblasten diejenigen Knochenzellen, die für die Bildung des Knochens verantwortlich sind. Charakteristisch für sie ist die außergewöhnliche Fähigkeit eine Typ 1 kollagenreiche extrazelluläre Matrix (EZM) zu sezernieren, welche dann mineralisiert (siehe Sektion „Osteoblasten“). Die Erstbeschreibung erfolgte durch Gegenbaur 1864 und bis zum heutigen Tag wurde ihre Funktion als die wichtigsten proteinexprimierenden Knochenzellen sehr detailliert erforscht. (Gegenbaur, 1864)

Vereinfacht ausgedrückt verläuft die osteoblastäre Differenzierung über mehrere Zellstadien, wobei eine fortschreitende Differenzierung mit einer Abnahme der Proliferationskapazität einhergeht.

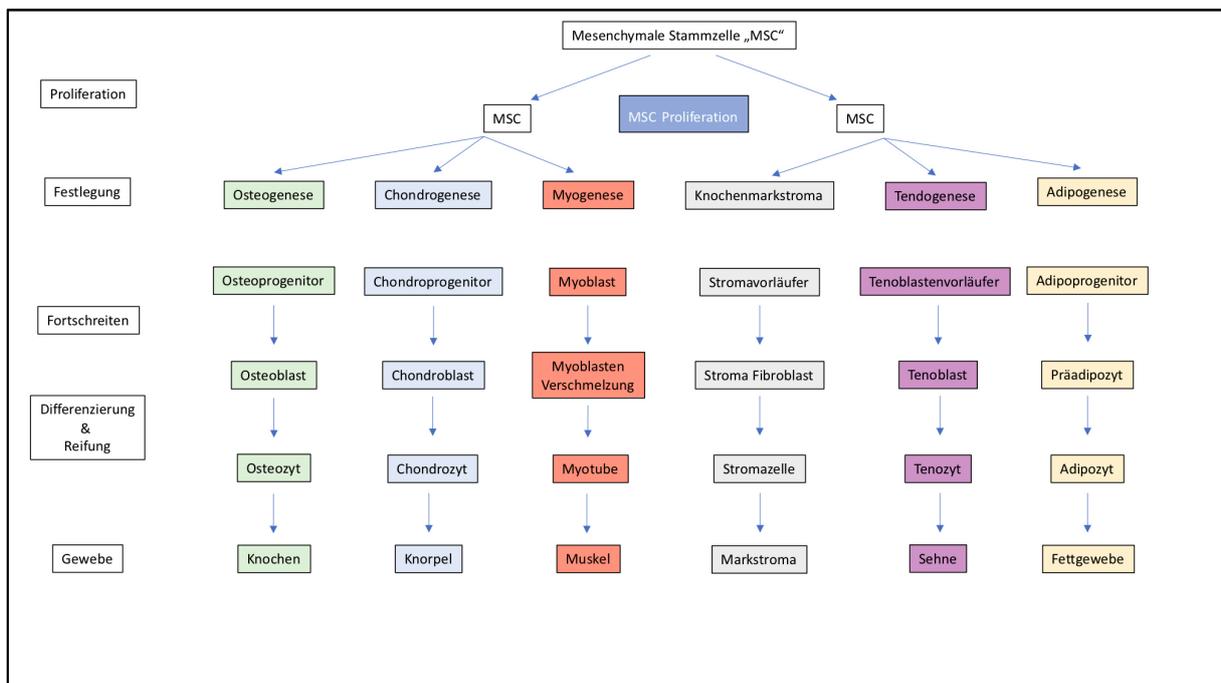


Abbildung 2: Humane MSCs können multipotent in mesenchymale Gewebe differenzieren. Das Diagramm zeigt die Stadien der Differenzierung verschiedener mesenchymaler Phänotypen bis zur reifen ausdifferenzierten Zelle (modifiziert von Caplan und Bruder, 2001). (Caplan & Bruder, 2001)

Den Ursprung der osteoblastären Differenzierungskaskade bildet die mesenchymale Stammzelle (engl. Mesenchymal stem cell MSC). (J. E. Aubin, 1998; J. E. Aubin & Triffitt, 2002) Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, die in der Lage sind sich selbst zu erneuern, zu proliferieren und unterschiedlich differenzierte Nachkommen zu bilden. Der Inbegriff der Stammzellen stellt die totipotente embryonale Stammzelle dar, welche in der Lage ist alle Zelltypen und jedes Gewebe zu bilden. Jedoch existieren

auch im adulten Organismus Stammzellen, deren Plastizität allerdings eingeschränkt ist. Ihre Funktion ist die Aufrechterhaltung und Regeneration verschiedenster Gewebe. Aufgrund der Tatsache, dass sie sich nur zu bestimmten Zelltypen ihres embryonalen Ursprungsgewebes (Endo-, Meso-, Ektoderm) differenzieren können spricht man von multipotenten Stammzellen. (Heng et al., 2004)

Caplan prägte den Begriff der mesenchymalen Stammzellen. (Caplan, 1991) Er beschreibt Zellen mit der Fähigkeit der stetigen Replikation, die sich multipotent in mesenchymale Gewebezellen wie z.B. Chondrozyten (Pittenger et al., 1999; Wakitani et al., 1994), Tenozyten (Altman et al., 2002), Adipozyten (Bennett et al., 1991; Beresford et al., 1992) und eben Osteoblasten (Maniatopoulos et al., 1988; Pittenger et al., 1999) differenzieren können. (Abbildung 2) Friedenstein et al. entdeckte als Erster, dass das Knochenmark eben diese mesenchymale Stammzellen enthält. (Friedenstein et al., 1968)

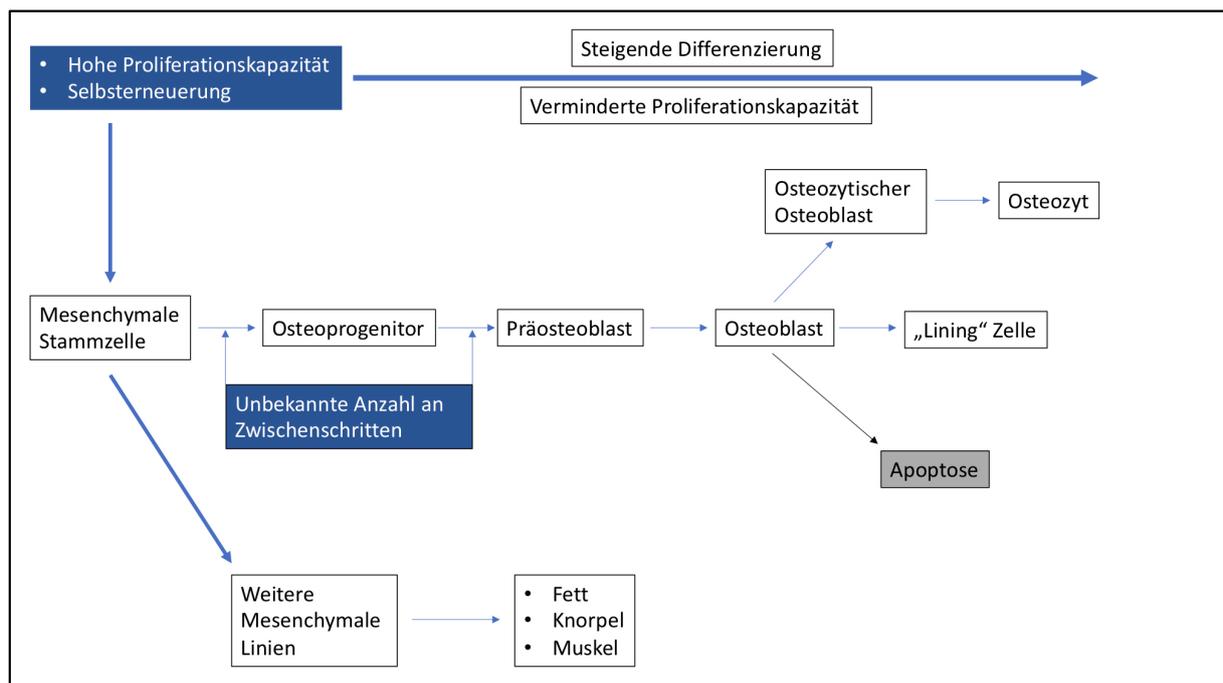


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Entwicklung der Osteoblastenlinie von einer Stammzelle zu Osteoblasten, Osteozyten und lining cells (modifiziert von Aubin et al., 1998). (J. E. Aubin, 1998)

Vollkommen ausdifferenzierte Osteoblasten entstehen aus multipotenten Vorläuferzellen von mesenchymalen Stammzellen. (Abbildung 3) Diese befinden sich im Periost, dem Endost und dem Knochenmark. (J. E. Aubin & Triffitt, 2002; Burger et al., 1986) Es ist noch nicht endgültig geklärt durch welche Signalwege MSC den Weg

der osteogenen Differenzierung einschlagen, jedoch gibt es Hinweise, dass bestimmte Hormone und Zytokine eine wichtige Rolle spielen. (Falconi et al., 2007; S. Zhang et al., 2006) Ein „Master-Gen“ für die Differenzierung von MSC zu Osteoblasten ist der Transkriptionsfaktor „run-related transcription Factor 2“ (RunX2). Es ist der früheste bekannte Marker der osteoblastären Differenzierung und ist von immenser Bedeutung. Die Eliminierung von RunX2 in Mäusen führte zu Tieren die nur Chondrozyten und Knorpel produzierten. (Ducy, 2000; Ducy et al., 1997; Komori et al., 1997; Mundlos et al., 1997; Nakashima et al., 2002; Otto et al., 1997; Rodan & Harada, 1997) Es ist bekannt, dass RunX2 die osteoblastäre Differenzierung durch aufeinanderfolgende Aktivierung von Osteoblasten Phänotyp-spezifischen Genen wie Kollagen 1 und Osteokalzin kontrolliert. (Ducy, 2000; Nakashima et al., 2002)

Bei Knochentraumata, Frakturen oder anderen Begebenheiten, welche ein „bone remodelling“ benötigen kommt es zu einer Rekrutierung durch chemotaktische Moleküle wie Osteopontin, Stroma cell-derived factor 1 (*SDF-1*) und verschiedenen anderen Mitgliedern der transforming growth factor beta family, eben dieser mesenchymalen Stammzellen. (Aho, 1966)

Die osteoblastäre Differenzierung von MSCs kann nicht einfach als lineare Abfolge von Osteoblasten verschiedener Reifungsstufe betrachtet werden. Es handelt sich vielmehr um einen hochkomplexen Differenzierungsprozess, der die Ausbildung verschiedener mesenchymaler Phänotypen verknüpft. Eine Frage von fundamentaler Bedeutung ist, wodurch es zu der Differenzierung einer Osteoprogenitorzelle zu einem reifen matrixsynthetisierenden Osteoblasten kommt. Durch die Expression bestimmter Gene und Marker lässt sich dieser Prozess in 3 Stadien gliedern.

- Proliferation
- Reifung und Entwicklung der extrazellulären Matrix
- Mineralisierung

Jedes Stadium ist durch bestimmte Gene charakterisiert. Am Anfang entwickelt sich die unreife Osteoprogenitorzelle aus der MSC. Typisch für dieses Stadium ist die hohe Expression von RunX2. (Yamaguchi et al., 2000) Die Vorläuferzellen verfügen noch über eine hohe Proliferationskapazität, dementsprechend sind hier Gene der Zellzykluskontrolle, z.B. Histone und Proto-Onkogene (*c-fos* und *c-myc*) aktiv. (Stein et al., 1996) Durch die weitere Differenzierung zum Präosteoblasten, der noch die

Fähigkeit zur Zellteilung besitzt beginnt die Osteoblastenreifung. Hier kommt es zur Expression der typischen Osteoblasten-assoziierten Gene wie Kollagen Typ 1 (Coll1), Osteopontin (OPN), Bone sialoprotein (BSP), Osteokalzin (OCN), alkaline Phosphatase (ALP). Mit zunehmender Differenzierung kommt es zu einer immer höheren Expression dieser Gene. Der nächste Schritt ist die Weiterentwicklung zum reifen Osteoblasten. Dieser ist nur mehr vermindert Teilungsfähig und sezerniert alle für die Knochenmatrix typischen Strukturproteine, wobei die Expression von Osteokalzin mit der Mineralisierung der extrazellulären Matrix korreliert. (J. E. Aubin & Triffitt, 2002)

Aubin et al. zeigte, dass nicht alle reifen Osteoblasten ident miteinander sind und eine hohe Heterogenität der nicht kollagen Matrix Moleküle aufweisen. (J. E. Aubin, 1998) Nur ALP und Parathyroidhormon 1 Rezeptor (PTH1R) scheint bei allen Osteoblasten gleichmäßig exprimiert zu sein. Der Grund dafür könnte das Alter und die Funktion des Knochens sein (Trabekulärer vs. spongiöser Knochen). (Candelieri et al., 2001) Dies zeigt, dass die osteoblastäre Differenzierung noch viele offene Fragen beherbergt und sie höchst komplex ist um den geringsten Ansprüchen des Körpers gerecht zu werden.

1.3 Frakturheilung

Frakturen stellen eine häufige Verletzung des muskuloskeletalen Systems dar. (Meisinger et al., 2002) Obwohl es in den letzten Jahrzehnten zu großen Fortschritten in der Behandlung von Frakturen gekommen ist, stellen verzögerte Heilungsverläufe und Komplikationen wie Pseudarthrosen ein gegenwärtiges Problem dar. (Raschke et al., 2017) Der optimale Heilungsverlauf eines Knochenbruches hängt von einer Vielzahl von Faktoren ab, wie zum Beispiel von der Schwere des Traumas, der Qualität der Frakturreposition, der Technik der Fixierung sowie von Komorbiditäten. (L. E. Claes et al., 2012)

Folglich benötigt eine optimale Behandlung eine konservative oder operative Stabilisation der Frakturfragmenten. Dennoch kommt es oft auch unter optimaler Versorgung und perfekter Behandlung nicht zu einem zufriedenstellenden Ergebnis. Insbesondere, wenn zusätzliche Verletzungen wie schwerwiegende Weichteilschäden oder ein Polytrauma vorliegen oder der Patient unter einer komorbiden Krankheit leidet. (Bhandari et al., 2003; Karladani et al., 2001) Nichtsdestotrotz sind Knochen in der Lage, bei optimierter Frakturbehandlung und bei nichtvorhandenen Komorbiditäten ohne Narbe und Funktionsverlust zu heilen und gänzlich wieder in ihre ursprüngliche Form zurückzukehren. (Hayda et al., 1998)

Die meisten Erkenntnisse über Knochenheilung basieren auf Tiermodellen. Zwar ist die Heilungskapazität größer und die Heilungsdauer in kleinen Tieren kürzer als beim Menschen, die grundlegenden Vorgänge scheinen jedoch gleich zu sein.

1.3.1 Phasen der Frakturheilung

Kommt es zu einem Bruch eines Knochens so kommt es immer zu einem charakteristischen Ablauf der Frakturheilung. Der Heilungsverlauf lässt sich in drei sich teilweise überlappenden Phasen gliedern:

- Entzündung
- Reparatur
- Wiederherstellung/Remodelling

Dieser Ablauf konnte bereits in vielen verschiedenen Studien bestätigt werden und ist

am ausführlichsten im Rattenmodell beschrieben worden. (L. E. Claes et al., 2012)

1.3.1.1 Entzündungsphase

Im Zuge eines Knochenbruchs kommt es zu einer Ruptur von zahlreichen kleinen Blutgefäßen innerhalb des Knochens selbst und in dem ihm umliegenden Weichteilen. Dies und die Verletzung von anderen Zellen führt zur Aktivierung der Entzündungskaskade und Einleitung der Knochenbruchheilung. (Kolar et al., 2010) Es kommt zu den charakteristischen Veränderungen einer akuten Entzündung in den umliegenden Geweben mit Vasodilatation und Exsudation von Plasmazellen und Leukozyten. (McKibbin, 1978; Wray, 1964) Innerhalb des Frakturspalts kommt es durch die Konversion von Fibrinogen zu Fibrin zur Ausbildung des Frakturhämatoms. (Aho, 1966) Das Frakturhämatom beinhaltet für die Frakturheilung essentielle periphere Entzündungszellen zusammen mit proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen. (Kolar et al., 2010, 2011)

Das Frakturhämatom dient als temporäres Gerüst für die aktive Invasion von zusätzlichen Entzündungszellen. Vielkernige neutrophile Leukozyten (polymorphonuclear neutrophils; PMNs) werden als erstes durch nekrotische Zellen und Debris aktiviert. Innerhalb der ersten Stunden nach dem Trauma kommt es zu einer rapiden Akkumulation. PMNs sind kurzlebige Zellen die viele Chemokine (wie CC – chemokine ligand 2, CCL2, und Interleukin – 6, IL-6) ausschütten welche langlebigere Makrophagen aktivieren. PMNs wird zugesagt, dass sie einen negativen Effekt auf den Prozess der Frakturheilung haben, wohingegen Makrophagen vom M₂ Subtyp einen positiven Effekt haben sollen. (Bastian et al., 2011; Göktürk et al., 1995) Nachdem ausreichend Makrophagen rekrutiert und aktiviert wurden, kommt es zu einer Migration von Lymphozyten und zu einer Aktivierung des erworbenen Immunsystems.

Schon sehr früh zu Beginn der Entzündungsphase kommt es zu einer Ausschüttung von einer Vielzahl an proinflammatorischen Zytokinen (Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)) und Mitgliedern der „transforming growth factor – β superfamily“ (Bone morphogenetic protein (BMP) -2,4,5,6). (Ai-Aqi et al., 2008; L. C. Gerstenfeld et al., 2003; Kon et al., 2001) Zusätzlich kommt es zur Ausschüttung von angioproliferierenden Faktoren (angiopoetin-1, vascular endothelial growth factor (VEGF)). (Ai-Aqi et al., 2008) Die Revaskularisierung ist essentiell für

einen reibungslosen Heilungsverlauf. Nur durch eine optimale Durchblutung kann die Frakturzone mit Zellen und Mediatoren versorgt werden, Debris entfernt werden und normoxische Kondition wiederhergestellt werden. Im Verlauf kommt es zu einer sukzessiven Umwandlung des Hämatoms in ein kollagen- und zellreiches Granulationsgewebe.

Im Tiermodell erfolgt die akute Entzündungsantwort über die ersten 7 Tagen nach der Fraktur. IL-1 β und IL-6 erreichen innerhalb der ersten 24 Stunden ihr Maximum. (Cho et al., 2002; T. A. Einhorn, 2005; Marsell & Einhorn, 2011) Man geht davon aus, dass diese frühe Entzündungsreaktion, mit seinem komplexen Netzwerk an Interaktionen zwischen molekularen Faktoren, Immunzellen und Progenitorzellen, die Reparaturkaskade durch Aktivierung der Angiogenese und Förderung der Differenzierung von MSCs initiiert. Studien lassen vermuten, dass MSCs sowohl einen lokalen als auch einen systemischen antiinflammatorischen Effekt während der Frakturheilung haben. Nichtsdestotrotz scheint eine gewisse Entzündungsreaktion notwendig zu sein, da eine Behandlung mit antiinflammatorischen Medikamenten wie cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitoren zu einer verzögerten Frakturheilung führt. (Cottrell & O'Connor, 2010)

1.3.1.2 Reparationsphase

Im Anschluss an die Entzündungsphase folgt die Reparationsphase. Je nach biomechanischen Gegebenheiten erfolgt hier entweder eine primäre oder eine sekundäre Knochenheilung.

1.3.1.2.1 Primäre Frakturheilung

Zur primären Knochenheilung kommt es nur, wenn zwischen den Frakturrenden nahezu keine interfragmentäre Beweglichkeit vorhanden ist, oder die Fragmente einer hohen Kompression ausgesetzt sind. (S. M. Perren 2002; S. M. Perren & Claes 2000) Durch den Einsatz modernster Osteosynthesetechniken ist es möglich die hierfür notwendige Kompression zu erreichen. (Rüedi & Murphy, 2000) Hierdurch kommt es zur vollkommenen Stabilisation der Fraktur und zur Ausbildung von Havers-Systemen, die zu einer Überbrückung des Frakturspalts führen. Dies ähnelt sehr dem normalen

„bone-remodelling“ Prozess. (McKibbin 1978; S. M. Perren 2002; Willenegger, Perren, & Schenk 1971) Es kommt zur Resorption von Knochen durch Osteoklasten, welche Tunnel bilden, welche Blutgefäßen als Schiene dienen. Dadurch erreichen Vorläuferzellen über das Blut genau die Frakturzone und differenzieren sich direkt zu knochenbildenden Osteoblasten. (T. A. Einhorn 2005; S. M. Perren 2002) Diese bilden nun neue Osteone, die die beiden Frakturrenden miteinander verbinden.

Die Frakturheilung durch Havers-Systeme ist langsam und nimmt viel Zeit in Anspruch bis die ehemalige Frakturzone wieder vollkommen belastungsfähig ist und somit das Osteosynthesematerial entfernt werden kann.

Aufgrund der Tatsache, dass Entzündungszellen keinen großen Einfluss auf die primäre Knochenheilung haben, ist davon auszugehen, dass sie weniger von systemischen Entzündungsreaktionen betroffen sind. (Bastian et al., 2011)

1.3.1.2.2 Sekundäre Frakturheilung

Ist es nicht möglich die Fraktur komplett zu stabilisieren, wie es bei konservativen Behandlungsmethoden mittels Gipsruhigstellung oder Nagelosteosynthesen der Fall ist, so bleibt eine, im Vergleich zur Kompressionsosteosynthese, relativ große interfragmentäre Beweglichkeit bestehen. (Sarmiento & Latta 1981; Mow and Huiskes 2005; Duda et al. 2002; L. Claes et al. 2002; Duda et al. 2002) Aus diesem Grund ist keine primäre Knochenheilung möglich. In diesem Fall kommt es zu indirekten Frakturheilung. Sekundäre Knochenheilung stellt den bei weitem häufigeren Frakturheilungsverlauf dar. (L. E. Claes et al., 2006; T. A. Einhorn, 1998; McKibbin, 1978)

Der Beginn der Kallusformation startet bereits überlappend mit dem Ende der Entzündungsphase. Bereits 3-7 Tage nach dem Frakturereignis kommt es bei Ratten zu einer intramembranösen Knochenformation. Es ist anzunehmen, dass die Knochenformation im Bereich des noch intakten Periosts startet, wo es zu keiner Verletzung der Blutgefäße im Zuge des Traumas kam und nur geringe interfragmentäre Kräfte wirken. (L. E. Claes & Heigele, 1999)

Das eigentliche weitere Kalluswachstum erfolgt 7-10 Tage nach dem Trauma durch

Chondrozyten. Die Größe und Form des Weichenkallus ist von der Distanz zwischen den Frakturrenden und der vorhandenen interfragmentären Beweglichkeit abhängig. (Bassett & Herrmann, 1961; McKibbin, 1978) Er erreicht im Tiermodell mit Ratten nach ca. 14 Tagen sein Maximum. (L. E. Claes et al., 2006) Der Grund für die primäre Bildung eines Knorpelgewebes anstelle von Knochen könnte in der insuffizienten Blutversorgung des Kallus liegen. (L. E. Claes et al., 2002; Rhinelander, 1974) Die hierdurch bedingte geringe Oxygenierung verbietet eine Osteoblastenaktivität, ermöglicht jedoch Chondrozyten zur Differenzierung und Proliferation. (Bassett & Herrmann, 1961; McKibbin, 1978)

Nach einer Proliferationszeit von in etwa 10 – 14 Tagen werden Chondrozyten hypertroph, sezernieren Calcium und unterziehen sich der Apoptose. (T. A. Einhorn, 1998) Dies entspricht dem selben Mechanismus der während der enchondralen Ossifikation in den Wachstumsfugen abläuft. (T. A. Einhorn, 1998)

Die Ausbildung eines knorpeligen Kallus führt zu einer Reduktion der interfragmentären Beweglichkeit und sorgt für höhere Stabilität der Fraktur, die die Einsprossung von Blutgefäßen ermöglicht. (L. E. Claes et al., 1997) Hierdurch kommt es nun zu einer Hypervaskularisation des kalzifizierten Knorpels. Dies ermöglicht nun die Einwanderung von MSCs und Monozyten an den Ort der Fraktur. Monozyten verschmelzen und differenzieren sich nun zu Osteoklasten ähnlichen Zellen, die dem Abbau des kalzifizierenden Knorpels dienen und MSCs entwickeln sich zu knochenbildenden Osteoblasten, welche den ehemaligen Frakturspalt nun mit Knochen auffüllen. (L.E. Claes et al., 2006; T. A. Einhorn, 2005) Hierdurch entsteht ein Geflechtknochen mit einer trabekulären Struktur. Dieses Stadium ist im Tiermodell ca. 28-35 Tagen nach dem Frakturereignis erreicht. (L. E. Claes et al., 2006; T. A. Einhorn, 2005)

Knöcherne Durchbauung des peripheren Kallus kann als Zeichen der erfolgreichen Frakturheilung gesehen werden. Ab diesem Zeitpunkt ist eine Steigerung der Belastung des verletzten Knochens wieder erlaubt. Abhängig von der Art der Fraktur und dem Alter des Patienten dauert es ca. 8 – 16 Wochen bis zur kompletten knöchernen Durchbauung. (L. E. Claes et al., 2002)

Kommt es zu einer Persistenz des fibrösen – knorpeligen Gewebes zwischen den beiden Frakturrenden über mehr als 6 Monate und keiner Aktivität in den letzten 3

Monaten so spricht man von einer Pseudarthrose. (Raschke et al., 2017) Die häufigste Ursache hierfür bei sonst vollkommen gesundem Patienten ist eine insuffiziente Frakturstabilisation oder ein, nach stattgefundener Reposition, persistierender großer Frakturspalt. (L. E. Claes et al., 1997; Histing et al., 2009)

1.3.1.3 Fraktur – Remodelling

Ist es nun zu einer kompletten Auffüllung des ehemaligen Frakturspalts gekommen, folgt nun die Resorption des äußeren Periosts durch Osteoklasten. Es erfolgt der Abbau von Geflechtknochen und durch den Aufbau von neuen Osteonen kommt es zu einem Remodelling zu Lamellenknochen, ähnlich der direkten Knochenheilung. In dieser Phase kommt es zu einem Abfall nahezu aller Zytokine, wobei eine hohe Expression von IL-1 β und TNF- α auch hier bestehen bleibt. (L. E. Claes & Heigele, 1999; Marsell & Einhorn, 2011) Im Gegensatz zu der während der Reparationsphase vorhandenen Hypervaskularisation erfolgt nun ein Remodelling der Durchblutung zurück zum Ausgangsstatus vor der Fraktur.

Remodelling und Resorption von Periost- und Knochenmarkkallus benötigt im Tiermodell bei Ratten etwa 5-8 Wochen und kann beim Menschen Jahre in Anspruch nehmen. (Lutz Claes et al., 2012) Das Endresultat nach abgeschlossenem Remodelling ist ein vollbelastbarer neugebildeter Knochen.

1.3.2 Knochenheilung bei inflammatorischer Situation

1.3.2.1 Lokale Entzündung

Wie es bereits aus dem vorangegangenen Text ersichtlich ist, ist eine Entzündung wesentlicher und wichtiger Faktor während der Knochenheilung. Schon die kleinsten Störungen in diesem fein abgestimmten System, bestehend aus molekularen Faktoren und Immunzellen, führen zu einer Beeinträchtigung der Frakturheilung. Dies konnte durch IL-6 und TNF- α Gene-knockout Mäuse belegt werden. (L. C. Gerstenfeld et al., 2003; Yang et al., 2007)

Lokale biomechanische Begebenheiten beeinflussen sehr stark die Ausprägung der

lokalen Entzündung. Bei unzureichender Fixierung und daraus resultierender zu geringer Stabilität kommt es zu einer beträchtlich ausgeprägteren Immunreaktion, mit einem Überfluss an zytotoxischen T-Zellen und anderen Leukozyten im Vergleich zu einer starr fixierten Fraktur. Hierdurch kommt es zu einer deutlichen Verlängerung der Entzündungsphase. (Schmidt-Bleek et al., 2012) Grund dafür könnten die vermehrt von zytotoxischen T-Zellen sezernierten Zytokine sein. Diese Zytokine führen zu einem verlängerten Verbleib von proinflammatorischen M1 – Makrophagen, indem sie eben diese an der Weiterdifferenzierung zu mehr antiinflammatorisch wirksamen proangiogenen M2 Makrophagen hindern. (Grundnes & Reikeraas, 2000)

Tiefere Einblicke in die Auswirkung von lokalen Entzündungen konnten durch eine Studie mit an inflammatorischer Arthritis erkrankten Hasen gewonnen werden. Überraschender Weise zeigte sich hier trotz der hohen lokalen Entzündung keine Störung der Knochenheilung im Vergleich zu gesunden Tieren. Dies gibt Anlass zu der Annahme, dass ein lokales proinflammatorischen Milieu nicht zwangsläufig zu einer Störung der Knochenheilung führt. (Bogoch et al., 1993a, 1993b)

In einer weiteren Studie mit RAG1-Knockout Mäusen (Recombination activating gene 1), konnte gezeigt werden, dass die Knochenheilung unter Abwesenheit von T- und B-Zellen verbessert werden kann. Dies legt nahe, dass die Aktivierung des erworbenen Immunsystems einen negativen Einfluss auf die Knochenregeneration hat. (Toben et al., 2011)

1.3.2.2 Akute Systemische Entzündung

Akute systemische Entzündungen, wie bei einem Polytrauma oder einer Sepsis, haben einen gravierenden Einfluss auf die Knochenheilung. Hierbei spielt die Aktivierung von speziellen Immunzellen, wie PMNs und Makrophagen, eine entscheidende Rolle. Systemische Aktivierung von PMNs führt im Tiermodell zu einer verzögerten Knochenheilung. (Göktürk et al., 1995) Der schädliche Einfluss von PMNs während systemischen Entzündungen auf den Knochen konnte durch die Beobachtung einer verstärkten Frakturheilung bei systemisch neutropenisch gemachten Tieren widerlegt werden. Im Gegensatz hierzu führt eine systemische Neutropenie im Tiermodell zu einer verbesserten Knochenheilung, wodurch sich der schädliche Einfluss von PMNs widerlegen lässt. (Grøgaard et al., 1990)

Weiters wird bei polytraumatisierten Patienten eine längere Heilungsdauer bei Frakturen beobachtet. (Bhandari et al., 2003; Karladani et al., 2001) Man geht heute davon aus, dass der Grund hierfür eine komplexe posttraumatische systemische Immunantwort ist. Diese ist durch die verstärkte Sekretion von schnellen proinflammatorischen Zytokinen, eine Chemokin Ausschüttung, die Komplementaktivierung und die Überaktivierung von PMNs gekennzeichnet. (Keel & Trentz, 2005)

Die Interaktionen zwischen der systemischen Entzündung und der Frakturheilung sind hoch komplex und sind Thema zahlreicher gegenwärtiger Studien.

Zusammenfassend dürfte es eine „gute“ und eine „schlechte“ Entzündung bei Knochenbrüchen geben. Eine entscheidende Rolle spielt vor allem der zeitliche Ablauf. Die genauen Auswirkungen der Entzündung auf die Knochenheilung sind jedoch noch weitgehend ungeklärt.

1.4 Die Rolle von Zytokinen bei der Frakturheilung

Inflammatorischen Zytokinen wird eine bedeutende Rolle in der Initiierung der Reparationsphase nach einer Fraktur zugeschrieben. Direkt nach dem Traumaereignis erfolgt die Produktion der Zytokine, die sofort für eine gewisse Zeitperiode einsatzbereit und funktionsfähig sind. Während dem mittleren Stadium der Knochenheilung erfolgt eine Hochregulation einzelner Zytokine, so dass die Osteoklastogenese zur Entfernung des mineralisierten Knorpels stimuliert wird. Andere Zytokine hingegen, werden erst beim späteren Stadium des „bone-remodelling“ aktiviert. (Ai-Aqi et al., 2008)

Eine besondere Rolle wird den IL-1 und IL-6 sowie dem TNF- α während der Reparationsphase zugeschrieben. Sie führen zu einer nachgeschalteten Aktivierung von anderen Entzündungszellen, verstärken die extrazelluläre Matrixsynthese und stimulieren die essentielle Angiogenese. (Kon et al., 2001) Innerhalb der ersten 24h erreicht ihre Expression das Maximum und fällt anschließend rasch ab, so dass sie 3 Tage nach dem Trauma nicht mehr nachzuweisen sind. (Cho et al., 2002; Kon et al., 2001)

Die Expression von IL-1 β und IL-6 erreicht nach dem Beginn des „bone-remodelling“ während der sekundären Knochenformation erneut einen Höhepunkt, wohingegen TNF- α noch einmal vermehrt während der Resorption von mineralisiertem Knorpel am Ende der enchondralen Phase der Frakturheilung exprimiert wird. (L. C. Gerstenfeld et al., 2003) Zusätzlich zur Stimulation von Osteoblasten, verstärkt TNF- α auch die Rekrutierung von MSC und leitet die Apoptose von Chondrozyten während der enchondralen Knochenformation ein. Seine Abwesenheit führt zur verzögerten Resorption von mineralisiertem Knorpel und verhindert die Bildung von neuem Knochen. (Kayal et al., 2007)

1.4.1 Zytokine

Zytokine sind Signalmoleküle die von Zellen des Immunsystems freigesetzt werden. Sie sind im Stande das Wachstum und die Differenzierung von Zellen zu beeinflussen. Im Groben können 5 Hauptgruppen von Zytokinen differenziert werden:

- Interferone
- Interleukine
- Chemokine
- Koloniestimulierende Faktoren
- Tumornekrosefaktoren

Insbesondere in Situationen, in denen es zu einer starken Aktivierung des Immunsystems kommt, werden Zytokine verstärkt exprimiert. Diese führen als entzündungsfördernde, proinflammatorische Zytokine zu einer Verstärkung, oder als entzündungshemmende, antiinflammatorische Zytokine, zu einer Abschwächung der Immunantwort. Bei polytraumatisierten Patienten zum Beispiel kommt es zu einer Vielfalt an Verletzungskombinationen. Durch diese schwerwiegenden Verletzungen von Gewebe und Zellen kommt es zu einer Ausschüttung von „danger associated molecular patterns“ (DAMP) und somit zu einer akuten Aktivierung des Immunsystems mit einer starken Zytokinausschüttung. Aus diesem Grund können Zytokine auch als Prädiktionsmarker bei Polytraumata eingesetzt werden. (Griensven, 2014) Bei der akuten Immunantwort kommt es zur Sezernierung der primären Zytokine „tumor necrose factor alpha“, $\text{TNF-}\alpha$, und $\text{IL-1}\beta$. Diese führen zu einer Aktivierung der sekundären Immunantwort, wo IL-6 und das antiinflammatorische IL-10 ausgeschüttet werden. (Griensven, 2014)

1.4.1.1 Interleukine

Interleukine sind körpereigene Botenstoffe und dienen der Kommunikation zwischen Leukozyten und vielen anderen Zellen des Immunsystems.

1.4.1.1.1 Interleukin-1 β

IL-1 β ist ein entzündungsfördernder Botenstoff und somit ein proinflammatorisches Zytokin. IL-1 β ist jene Form von IL-1 die an den meisten inflammatorischen Prozessen beteiligt ist. Die Halbwertszeit von IL-1 β im menschlichen Organismus beträgt circa 10 Minuten. IL-1 β dient als primäre Antwort und induziert die Ausschüttung des sekundären Zytokins IL-6. (Griensven, 2014)

1.4.1.1.2 Interleukin-6

IL-6 ist ein sekundäres Zytokin welches durch TNF- α , IL-1 β und anderen Faktoren induziert wird. Es gilt ebenso wie IL-1 β als proinflammatorisches Zytokin, weist jedoch auch antiinflammatorische Eigenschaft auf. Klinisch hat IL-6 bei polytraumatisierten Patienten die höchste Wertigkeit. Es zeigt bereits frühzeitig das Risiko von posttraumatischen Komplikationen wie systemisches inflammatorisches response Syndrom (SIRS) und multi organ dysfunction syndrome (MODS) an. (Griensven, 2014)

IL-6 zählt zu der Gruppe von gp130 Zytokinen und ist ein akutphase Protein mit pleiotropischen Effekten. Die physiologische Rolle dieses Zytokins ist vielseitig. Es spielt eine Rolle in der Immunregulation, der Hämatopoese, der Angiogenese und in der Regulation der Osteogenese. (Bakker et al., 2014) Besonders bekannt ist IL-6 für seine Auswirkung auf die Knochenmasse. Chronische Überexprimierung von IL-6 verstärkt den Knochenumbau und führt zur einer verstärkten Knochenresorption, resultierend in einem Verlust der Knochenmasse. (De Benedetti et al., 2006; Rufo et al., 2011) In einem Tiermodell mit IL-6 Knockout Mäusen konnte gezeigt werden, dass diese eine geringere Knochenmasse haben, eine geringere Osteoblastenzahl und es zu einer verzögerten Frakturheilung gekommen ist. (Yang et al., 2007) Neueste Studien lassen vermuten, dass eine selektive pharmakologische Hemmung von IL-6 nach einem schweren Trauma zu einer verbesserten Knochenheilung führt. (Kaiser et al., 2018)

1.4.1.1.3 Interleukin 10

IL-10 ist im Gegensatz zu IL-1 β und IL-6 ein antiinflammatorisches Zytokin. (Q. Zhang et al., 2014) Es hemmt die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen und ist somit

in der Lage die Konzentrationen von TNF- α , IL-1 β und IL-6 zu verringern. (Hourihaddad et al., 2007; Mosser & Zhang, 2008) Aus diesem Grund wird IL-10 als Regulator der Knochenhomöostase angesehen. (Hourihaddad et al., 2007; Mosser & Zhang, 2008) IL-10 fördert übergreifend die osteoblastäre Differenzierung. Dresner-Pollak et al. zeigte in einem Experiment mit IL-10^{-/-} Knockoutmäusen, dass es zu einer reduzierten Osteoblastensynthese kommt. (Dresner-Pollak et al., 2004) In der Abwesenheit von IL-10 wiesen die Mäuse auch die Charakteristika der Osteoporose auf. Weiters wurde gezeigt, dass Zytokine und andere Entzündungsmediatoren wie TNF- α , Interferon- γ (IFN- γ) und Stickstoffmonoxid (NO), welche bei IL-10^{-/-} Mäusen vermehrt ausgeschüttet wurden, einen schädlichen Einfluss auf die Differenzierung, Proliferation und Funktion von Osteoblasten haben. (Dresner-Pollak et al., 2004) Somit kann man davon ausgehen, dass IL-10 die osteoblastäre Differenzierung verstärkt. (Q. Zhang et al., 2014)

1.4.1.2 Tumornekrosefaktor- α

TNF- α wird hauptsächlich von Makrophagen gebildet. Es ist an der Aktivität verschiedener Immunzellen beteiligt. TNF- α ist ein proinflammatorisch wirksames Zytokin. Es ist schnell reagierend und hat eine kurze Halbwertszeit von 14 Minuten. Bei Polytraumapatienten könnte es als Marker für die Entwicklung eines SIRS nach dem Trauma verwendet werden, aufgrund der kurzen Halbwertszeit ist dies jedoch klinisch noch nicht möglich. (Griensven, 2014)

Die Rolle von TNF- α bei der Knochenheilung wird sehr kontrovers betrachtet. 24 Stunden nach einer Fraktur erreicht es seinen Peak. Es konnte bewiesen werden, dass eine kurze Exposition von TNF- α humane Osteoblasten dazu befähigt adipöse MSCs in den osteogenen Differenzierungsprozess zu führen. (Lu et al., 2012) Die molekulare Analyse von humanen Frakturen zeigte auch, dass an der Frakturstelle produziertes TNF- α Stammzellen rekrutieren kann und die Heilung fördern kann. (Glass et al., 2011)

Bisherige Studien konnten jedoch auch beweisen, dass TNF- α die osteoblastäre Differenzierung und die Frakturheilung in vivo hemmt. TNF- α ist ein potenter Inhibitor des osteoblastären Differenzierungsprozess. Es führt zu einer Inhibierung der RunX2 Expression und von Osterix durch die mitogen activated protein kinase kinase (MEK1 Kinase). (Nanes, 2003)

Es scheint, dass die Höhe des TNF- α Spiegels für den Einfluss auf den Knochen ausschlaggebend ist. So führt ein hoher TNF- α Spiegel zu einer Inhibierung der direkten Knochenformation in Kulturen und in vivo. Niedrige Spiegel hingegen können die Proliferation von Osteoblasten verstärken. Einer Studie mit doppelten TNF-Rezeptortyp 1 / TNF-Rezeptortyp 2 (TNF-R1/TNF-R2) Knockoutmäusen führte zu einer beeinträchtigten Knochenheilung. (Aggarwal, 2000) Dies deutet daraufhin, dass ein Gleichgewicht von TNF- α Signalen für einen optimalen Heilungsprozess von Nöten ist.

1.4.2 Der Einfluss von Zytokinen auf Osteoblasten

Die Funktion von Osteoblasten ist bei Erkrankungen und Verletzungen mit einer starken Immunreaktion beträchtlich eingeschränkt. Dies konnte auf den Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen auf Osteoblasten zurückgeführt werden.

So führt TNF- α zu einer Inhibition der Osteoblastendifferenzierung. Dies erfolgt über mehrere Wege. Einerseits über den TNF-R1 und über die Inhibition des Differenzierungsfaktors RunX2. (Gilbert et al., 2002)

Weiters inhibieren andere proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und IL-6 die Osteoblastogenese. (Ding et al., 2009; Hughes & Howells, 1993) Nur das Zytokin Oncostatin M scheint eine Osteoblasten fördernde Wirkung zu haben. (Walker et al., 2010) Viele Zytokine aktivieren außerdem den Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) Pathway welcher einen negativen Einfluss auf die Osteoblastenfunktion hat. Dieser führt zu einer Inhibition von JUN-N – terminal Kinase 1 und weiter zu einer Inhibition des Transkriptionsfaktors AP1. (Krum et al., 2010)

Der negative Effekt von proinflammatorischen Zytokinen auf Osteoblasten wird durch Dickkopf-related protein – 1 (DKK1) noch weiter verstärkt. DKK1 wird durch TNF- α aktiviert und ist ein Inhibitor des WNT-signalling – Pathway. (Diarra et al., 2007)

Eine verstärkte Expression von proinflammatorischen Zytokinen führt zu einer Hypoaktivierung von Osteoblasten und somit zu einer Reduktion der Knochenmasse und Verzögerung der Knochenheilung. (Redlich & Smolen, 2012)

1.5 Fragestellung

Aus der Einleitung ist klar ersichtlich, dass der Einfluss von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen auf die Knochenheilung ein viel diskutiertes Thema und Thema vieler gegenwärtiger Forschungsarbeiten ist. Die verzögerte, insuffiziente Frakturheilung bei polytraumatisierten Patienten stellt ein großes Problem im klinischen Alltag dar.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es die Auswirkung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α und des antiinflammatorischen Zytokin IL-10 auf Präosteoblasten in Konzentrationen, wie sie bei polytraumatisierten Patienten vorliegen und auf die osteogene Differenzierung zu untersuchen. Dadurch soll es zu einem besseren Verständnis der Frakturheilung bei schwerverletzten Patienten kommen.

Folgende Fragestellungen sind hierbei von Bedeutung:

- Welchen Einfluss haben proinflammatorische (IL-1 β , IL-6, TNF- α) und antiinflammatorische (IL-10) Zytokine auf Präosteoblasten und die osteogene Differenzierung?
- Haben die zu untersuchenden Zytokine in unterschiedlichen Konzentrationen einen vermehrt positiven oder negativen Einfluss auf Präosteoblasten und die osteogene Differenzierung?

2. Material

	Company	Order Number	CAS Number
175cm ² cell culture flasks	PAA	71175	none
20ml Syringe	B. Braun	4606205V	none
4-Nitrophenol solution 10mM	Sigma	N7660	10-02-7
4-Nitrophenyl phosphate di-Sodium salt hexahydrate (pNpp)	Sigma	N4645	333338-18-4
50ml polypropylene tubes	Sarstedt	62.547.254	none
Agarose	Sigma	A9539	none
All protect	Qiagen	76405	none
Aqua ad iniectabilia	Diaco/MRI pharmacy	none	none
Aqua Delta Select	MRI pharmacy	none	none
B Glycerolphosphate disodium salt hydrate	AppliChem	A2253	154804-51-0
Bone rongeur (Luer's pliers)	Aesculap	DX500R	none
Boric Acid	Roth	6943.1	10043-35-3
Bromophenol Blue	Roth	T116.1	none
CaCl ₂ ·2H ₂ O	Sigma	C3881	10035-04-8
CFX96 (PCR-Maschine)	BioRad, Hercules		
Chloroform	Roth	6340.1	67-66-3
CO2 Inkubator	Heraeus-Kendro, Thermo Scientific	none	none
Cryotubes	Sarstedt	none	none
Dexamethasone water soluble	Sigma	D2915	50-02-2
Dimethylsulfoxyde (DMSO)	Roth	4720.2	67-68-5
DMEM low glucose	Sigma	D6056	none
dNTP Mix	Axon Labortechnik	24478	none
Dulbecco's PBS (DPBS)	PAA	H15-002	none
Dulbecco's PBS without Ca & Mg	Sigma	D8537	none
Ethanol 70%	MRI Pharmacy	none	64-17-5
Ethidium bromide	Roth	2218.1	1239-45-8
FCS (lot number 111M3398)	Sigma	F0804	none
FCS Gold EU approved	PAA	A15-151	none
First Strand cDNA Synthesis Kit	Fermentas	K1611	none
Forceps	Aesculap	FO604R	none
Glycerol	Sigma	G5516	56-81-5
Glycine	Sigma	G8898	55-40-6
HEPES 1 M	PAA	S11-001	7365-45-9
Isopropanol	Pharmacy MRI	none	none
Kollagen (Coll1α1)	Eurofins	none	none
L-ascorbate-2-phosphate	Sigma	A8960	113170-55-1
MgCl ₂	Axon Labortechnik	22466	none
MrFrosty	Thermo Fisher	none	none

NaOH	Roth	9265.2	7647-14-5
NaOH 1M	Roth	K021.1	1310-73-2
Osteokalzin	Eurofins	none	none
Osteopontin	Eurofins	none	none
Penicillin/Streptomycin	PAA	P11-010	none
Petri dishes 100mm	PAA	PAA-20101X	none
Platereader Fluostar Omega	BMG Labtech	none	none
Primer	eurofins MWG	none	none
pUC 19 DNA marker	Roth	X901.2	none
Reaction Buffer BD	Axon Labortechnik	22466	none
RNA later	Sigma	R0901	none
RunX2	Eurofins	none	none
Stainless steel scalpel	MRI	210083	none
Sterilbank	BDK	none	none
Sterile surgical gloves	MRI pharmacy	varies	none
Syringe filter 0,2m	Sartorius Stedim Biotech	16534	none
Taq DNA Polymerase	Axon Labortechnik	22466	none
TRIS	Roth	4855.3	77-86-1
Tris-Base	Sigma	T1503	77-86-1
Trypan Blue 0,5% 100ml	Biochrom	L6323	72-57-1
Tubulin	Eurofins	none	none

3. Methoden

3.1 Osteoblastenisolation

Die Isolation von primären Osteoblasten erfolgte aus menschlichen Hüftköpfen (nach Bewilligung der Ethikkommission und anhand der Deklaration von Helsinki), die im Rahmen eines totalendoprothetischen Hüftgelenksersatz entfernt wurden.

Nach Ablation des Femurkopfes wurde dieser in einen sterilen Behälter aufbewahrt und an das Labor für experimentelle Unfallchirurgie gesendet. Die weiteren Schritte erfolgten ausschließlich unter der Sterilbank, um eine Kontamination zu vermeiden. Um Osteoblasten erfolgreich zu isolieren wurde das Knochenfragment mit sterilen Handschuhen unter Zuhilfenahme eines Luers nach Entfernung jeglichen Weichteilgewebes in kleine ca. 5mm Knochensplitter zerteilt. Diese wurden in einem 50ml Falcon Tube (Abhängig von der Menge, wurde mehr als ein Falcon Tube benötigt) gesammelt und darauf durch Zugabe von Dulbeccos Phosphate Buffered Saline (DPBS) gewaschen, welches danach vorsichtig abgesaugt wurde. Dieser Schritt wurde so lange wiederholt bis das Knochengewebe nahezu von allem Fett und Blutbestandteilen entfernt war und ein elfenbeinartiges Aussehen hatte. Dafür waren in der Regel drei Waschvorgänge von Nöten. Die nun bearbeiteten Knochenfragmente wurden in ein 175cm² Zellkulturflaschen transferiert mit einer ungefähren Dichte von circa 10ml Knochengewebe pro Flasche. Nun wurden 25ml Kulturmedium, welches aus 500ml low glucose Dulbecco's modified eagle medium (DMEM), 25 mg L-Ascorbat-2-Phospat (50µg/ml), 50ml fötales kälber Serum (fetal calf serum; FCS) (10%) und 50ml Pen/Strep (100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin) besteht, hinzugefügt.

Anfänglich wurde die Fragmente in einem Inkubator bei 37° Celsius und einer Luftfeuchtigkeit von 5% CO₂ inkubiert. Sie blieben 5 Tage komplett unberührt, um die Zellproliferation nicht zu stören. Anschließend erfolgte unter außerordentlicher Vorsicht der erste Mediumwechsel unter der Sterilbank. Bereits nach circa 5 Tagen konnte der erste Zellauswuchs beobachtet werden. Es erfolgte nun regelmäßig 2-mal pro Woche ein Mediumwechsel bis eine zufriedenstellende Zellkonfluenz von 90% erreicht wurde. Dies dauerte meist 2 bis 3 Wochen.

Für das Passagieren der Zellen wurde das Kulturmedium von der nun fast gänzlich konfluierenden Kulturflasche entfernt. Danach wurde der Rückstand mit 15ml DPBS in

zwei Waschvorgängen gereinigt. Um die Zellen von der Flasche zu lösen erfolgte die Zugabe von 2ml Trypsin-ethylendiamintetraacetat Säure (Trypsin-ethylendiaminetetraacetic acid, EDTA) und eine Inkubation von 5 min bei 37°C. Um die chemische Reaktion zu Beenden und Trypsin zu inaktivieren wurden nun 10ml Kulturmedium hinzugefügt. Als nächstes wurde die Zelllösung in ein 50ml polypropylen Fläschchen überführt und für 10 min bei 490g zentrifugiert. Nach vorsichtigem Absaugen des dadurch entstanden Überstandes wurde das Zellpellet mit Nährmedium resuspendiert und entsprechend auf neue Kulturflaschen aufgeteilt.

3.2 Zellzählung

Um eine genaue Angabe über die Anzahl der vorhandenen Zellen zu haben wurden aus der Zellsuspension 50µl entnommen und mit 50µl Trypanblau – Lösung, bestehend aus 0,75ml 0,5%Trypanblau und 2,25ml DPBS, gemixt. Aus der entstandenen Mixtur wurden 10µl in jeweils eine der zwei Zählkammern des Hämozytometers pipettiert. Da Trypanblau avitale Zellen blau färbt lassen sich nun die vitalen ungefärbten Zellen einfach unter dem Lichtmikroskop zählen. Mithilfe der Formel Gesamtanzahl der Zellen = $n \cdot V_f \cdot V \cdot 10^4$ (n: Durschnitt der gezählten Zellen V_f : Verdünnungsfaktor, V: Volumen der Zellsuspension, 10^4 : Faktor der Zellzählkammern) berechnete sich die genaue Zellzahl.

3.3 Zytokinstimulation

Die Zytokinstimulation der Zellen erfolgte über 4 Stunden. Hierfür wurde für jedes Zytokin (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α) eine Stammlösung mit einer Konzentration von 1µg/ml hergestellt. Dies erfolgte bei IL-1 β , und IL-10, welche beide in einer Konzentration von 10µg/ml vorliegen durch die Zugabe von 10ml H₂O und 0,1% BSA zum Lyophilisat. Bei IL-6, in der Hersteller Konzentration von 20µg/ml, erfolgt die Zugabe von 20ml H₂O und 0,1% BSA zum Lyophilisat. TNF- α liegt mit einer Herstellerkonzentration von 50µg/ml vor. Es erfolgte die Verdünnung mit 50ml H₂O und 0,1% BSA zum Lyophilisat.

Nach der Herstellung der Stammlösung folgt die Stimulation der Zellen mit den Zytokinen in den Konzentrationen C1 (0pg/ml), C2 (10pg/ml), C3 (100pg/ml), C4 (500pg/ml) und C5 (1000pg/ml).

Dafür erfolgt für den MTT, LDH und ALP Test das Ausplattieren der Osteoblasten (3.300 Zellen pro Well) auf eine 96-Well Platte. 24 Stunden später werden durch Verdünnung der Stammlösung von 1µg/ml auf die jeweiligen Konzentrationen, jeweils 0,1ml der Zytokinlösung pro Well den ausplattierten Osteoblasten zugeführt.

Nach einer Stimulationsdauer von 4 Stunden erfolgt ein Absaugen der Zytokine und stattdessen werden 0,1ml Kulturmedium hinzugefügt.

Für die Polymerasekettenreaktion Testung erfolgt das Ausplattieren der Osteoblasten auf eine 8-Wellplatte (100.000 Zellen pro Well). Hier werden 24 Stunden später durch Verdünnung der Stammlösung von 1µg/ml auf die jeweiligen Konzentrationen, jeweils 2ml der Zytokinlösung pro Well den ausplattierten Osteoblasten zugeführt

Nach einer Stimulationsdauer von 4 Stunden erfolgt ein Absaugen der Zytokine und stattdessen werden 2ml Kulturmedium hinzugefügt.

3.4 MTT

3-(4,5 dimethylthiazol-2y-l)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ist ein gelbes Salz, welches durch die Succinat-Dehydrogenase in lebenden Zellen in violette Formazan reduziert wird. Dadurch ermöglicht dieser Assay einen Rückschluss auf die Toxizität einer Substanz und gibt Aufschluss über die Anzahl der lebenden Zellen einer Probe im Vergleich zu einer Kontrolle.

Die auf einer 96-Well Plate ausplattierten Proben werden dafür nach zweimaligen waschen mit DPBS mit 100µl/well frisch zubereiteter MTT-Arbeitslösung, 1ml MTT-Stammlösung und 9ml DPBS, für 2 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Innerhalb dieser Zeitperiode findet die Reduktion des gelben MTT zu violetten Formazan statt. Nach Ablauf der zwei Stunden erfolgte die vorsichtige Aspiration des Zellüberstandes und die Zugabe der Solubilisierungslösung bestehend aus 5g Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfat, SDS) (w/v), 49,7ml dymethyl sulfoxid und 0,3ml Azetat-Säure. Nach 5 Minuten am Rüttler erfolgte die kontinuierliche photometrisch Messung der Formazan Konzentration. Über die gemessene optische Dichte (optical density, OD) sowohl bei 570 als auch bei 690nm erfolgte nun die Berechnung der Überlebensrate:

(Durchschnitt Kontrolle/Durchschnitt Probe) * 100 = Prozentueller Anteil an lebenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle. $OD_{570}-OD_{690}$ = Durchschnitt Probe/Kontrolle.

3.5 LDH –Test

Das Absterben von Gewebe und Zellen führt zu einer Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH), demzufolge korreliert LDH im Zellüberstand der Proben genau mit dem Zelltod. LDH katalysiert die Reaktion von der reduzierten Form von Nicotinamidadenindinukleotid (NAD) zu der oxidierten, sprich NADH zu NAD^+ . Da der Abfall von NADH direkt proportional zur LDH Aktivität ist, lässt sich dadurch die Konzentration von LDH bestimmen.

75 μ l des Zellüberstandes werden auf eine unsterile 96-Well Plate für die LDH-Quantifizierung gegeben. Als nächstes erfolgt die Herstellung einer Standardkurve. Durch die Hinzugabe von 100 μ l LDH-Arbeitslösung/Well startet die chemische Reaktion und es erfolgt die sofortige Messung der Absorption bei 340nm über eine Zeitspanne von 10 Minuten.

Über die Standardkurve lassen sich nun die LDH Konzentration bei 1 Minute und bei 10 Minuten berechnen. Durch Formel $c(\text{LDH}) \text{ (U/l/min)} = \frac{c(\text{LDH})_{10\text{min}} - c(\text{LDH})_{0\text{min}}}{10}$ lässt sich die gesamte LDH Konzentration in der Probe eruieren.

3.6 Alkalische Phosphatase Test

Alkalische Phosphatase (AP) ist ein Enzym, dass man in Osteoblasten findet und als Marker für die osteogene Differenzierung dient. AP dephosphoryliert para-nitrophenylphosphat zu para-nitrophenol, was durch einen Farbumschlag sichtbar gemacht werden kann. Dafür wurden die Proben nach zweimaligen waschen mit DPBS mit frisch hergestellter AP-Substrat Lösung, welche aus 1,3mg 4-nitrophenyl phosphate Dinatriumsalz hexahydrat in einem Buffer von 2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol, Glycin und Magnesiumchlorid besteht. Es folgten 30 Minuten im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ mit anschließender photometrischer Messung der Konzentration von para-nitrophenol bei einer Lichtwellenlänge von $\lambda=405\text{nm}$. Über die Standardkurve, welche bei jeder Messung neu angelegt wurde, erfolgte die Berechnung der AP-Aktivität.

3.7 RNA – Isolation

Für die Analyse der Genexpression mittels Echtzeit Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (reverse transcriptase – polymerase chain reaction, RT-PCR) war die Ribonukleinsäure (RNA) Isolation mit nachfolgender Desoxyribonukleinsäure (DNA) Transkription erforderlich. Hierfür wurde die RNA Isolation mit TRI-Reagent verwendet. Der Zellüberstand der Proben wurde vorsichtig abpipettiert, mit TRI-Reagent ersetzt und im -80°C Gefrierschrank eingefroren. Als nächstes folgte die Lösung und Sammlung der Zellen mittels Zell-Kratzer in einem 2ml Eppendorf Rohr. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis, erfolgte die Zugabe von 100µl Chloroform/500µl TRI-Reagent. Das Zellgemisch wurde kurz mittels Vortex durchgemischt und es folgten weitere 10 Minuten Inkubation auf Eis. Nach 10-minütiger Zentrifugation bei 14.000g und 4°C, wodurch die Auftrennung in wässrige Phase und organische Phase gelang, wurde die die RNA beinhaltenden wässrige Phase in vorbereitete 1,5ml Eppendorf Rohre mit je 250µl Isopropanol pipettiert. Nach erneuter Inkubation auf Eis für 10 Minuten, folgender 10-minütiger Zentrifugation bei 14.000g 4°C, formte die RNA ein Pellet am Boden des Tubes. Als nächster Schritt folgte das vorsichtige Dekantieren des Isopropanol-Zellüberstandes und eine zweimaliger Waschvorgang. Hierfür wurde 1ml 70% Ethanol in die Probe pipettiert und anschließend erneut für 10 Minuten bei 14.000g und 4°C zentrifugiert. Nach dem letzten Waschvorgang wurde das Ethanol dekantiert. Die isolierte RNA wurde mit Aqua ad iniectabilia resuspendiert und im -80°C Gefrierschank gelagert.

3.8 RNA-Messung

Damit RNA in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (complementary DNA, cDNA) umgeschrieben werden kann, muss die Menge der Isolierten RNA bekannt sein. Für die Messung der RNA wurde Hellma-Tray cell verwendet. Um die Konzentration der RNA in einer Lösung ermitteln zu können, wird der Absorptionswert der Lösung bei einer Wellenlänge von 260nm verwendet. Über die Formel nach dem Lambert-Beer-Gesetz: $\text{Konzentration} = \text{Probenspezifischer Faktor} * \text{virtueller Verdünnungsfaktor} + 280\text{nm}$ für 260/280 Ratio, bezüglich der Reinheit, erfolgte die Berechnung.

3.9 Transkription RNA-cDNA

Die Umschreibung von RNA in cDNA wurde unter Verwendung des First Strand cDNA Synthesis Kit durchgeführt. Hierbei wurde die RNA mit Primer gemixt und bei 65°C für 5 Minuten denaturiert, um das Primer annealing zu gewährleisten, mit anschließender Kühlung auf 4°C. Darauf folgte die Zugabe eines 9µl Mix, bestehend aus 4µl 5x Reaction Buffer, 1µl RiboLock™RNase Inhibitor (20U/µl), 2µl 10mM dTNP Mix, 2µl M-MuLV reverse Transkriptase (20U/µl). Die Transkription erfolgte während einer 60-minütigen Inkubation bei 37°C im Eppendorf MasterCycler S. Durch eine terminale Erhitzung auf 70°C für 5 Minuten wurde die Reaktion beendet. Die neu transkribierte cDNA wurde mit Aqua ad iniectionabilia auf eine Konzentration von 10ng/µl verdünnt und bei -20°C gelagert.

3.10 PCR

Mittels einer Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurde die Genexpression für Kollagen (Human Collagen Typ1 $\alpha 1$), Osteopontin, Osteokalzin, und RunX2 untersucht. Eine PCR besteht prinzipiell aus 3 aufeinanderfolgenden Arbeitsschritten, welche sich einige Male wiederholen. Innerhalb der Zyklen kommt es zu einer sich wiederholenden Erhitzung und Abkühlung.

Zu allererst erfolgt eine initiale Erhitzung auf 95°C um die DNA-Polymerase zu aktivieren.

Dann kommt es zu den 3 aufeinanderfolgenden Schritten:

1. Denaturation (30-40 sec; 95°C)

Es erfolgt die Separation der doppelsträngigen DNA, in zwei Einzelstränge

2. Annealing (30-40 sec; Temperatur ist Primerabhängig)

Dieser Schritt ermöglicht die Bindung des spezifischen Primers zu seiner DNA Zielsequenz.

3. Extension (30-40 sec, 72°C)

Während dieses Schrittes produziert die verwendete DNA – Polymerase einen komplett zur Ziel-DNA-Sequenz komplementären DNA-Strang.

Nach erfolgreichem Ablauf der Zyklen, erfolgt eine Erhitzung der Reaktionsmischung auf 72°C für 5 Minuten. Hierdurch kommt es zur Elongation der übrigen Einzelstrang DNA.

Zur Durchführung der PCR wurden jeweils 3µl der zuvor Hergestellte cDNA in eine PCR-Platte auspipettiert. Danach erfolgt die Zugabe von 3µl H₂O. Im letzten Schritt bevor die PCR gestartet wird erfolgt die Zugabe von 17µl des Mastermix (Tabelle 1) des jeweiligen Proteins, Kollagen, Osteokalzin, Osteopontin und RunX2, sowie für den Housekeeper, Human-Tubulin-β 2a. (Tabelle 2)

Mastermix - Zusammensetzung	
Supermix (Puffer, dNTPs, SYBR Green, Polymerase)	300µl
Primer F (Col1α1, OC, OP, RunX2, TUB)	24 µl
Primer R (Col1α1, OC, OP, RunX2, TUB)	24 µl
H ₂ O:	160 µl
10 sekundige Zentrifugation des Mixes	

Tabelle 1: Zusammensetzung des Mastermix: Primer F (Primer Forward); Primer R (Primer reverse); dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphate); Col1α1 (Collagen Typ 1 α1); OP (Osteopontin); RunX2 (Run related transcription factor 2); TUB (Human-Tubulin-β 2a), OC (Osteokalzin)

PCR – Primer Sequenzen	
Housekeeper: TUB (Human-Tubulin-β 2a)	Forward: gagggcgaggacgaggctta Reverse: tctaacagaggcaaaactgagcacc
Coll1α1	Forward: cagccgcttcacctacagc Reverse: tttgtattcaatcactgtcttgcc
RunX2	Forward: tgccctaggcgatttcaggtgc Reverse: tgaggtgactggcggggtgt
OP	Forward: ctccattgactcgaacgactc Reverse: cgtctgtagcatcagggtactg
OC	Forward: ccagcgggtgcagagtcacgc Reverse: gacaccctagaccgggcccgt

Tabelle 2: PCR – Primer Sequenzen: Coll1α1 (Collagen Typ 1 α1); OP (Osteopontin); RunX2 (Run related transcription factor 2), OC (Osteokalzin); t (Thymin); c (Cytosin); g (Guanin); a (Adenin)

Nach Zugabe des Mastermixes erfolgt eine shortspin Zentrifugation der kompletten PCR Platte für 15 Sekunden. Darauf folgt das Einsetzen der PCR – Platte in das PCR – Gerät und es beginnt der oben beschriebene Ablauf der PCR.

3.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mittels dem Computerprogramm Graphpad Prism 6. Es erfolgte die Testung der Parameter mittels 2-way ANOVA Test. Die Signifikanzgrenze wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Zu den Mittelwerten wird jeweils der Standardfehler (SEM) mit angegeben.

4. Ergebnisse

4.1 LDH

Zur Bestimmung der Zytotoxizität der verschiedenen Zytokine erfolgte die Durchführung eines LDH-Tests. Es wurde jedes Zytokin in 5 unterschiedlichen Konzentrationen (C1=0pg/ml, C2=10pg/ml, C3=100pg/ml, C4=500pg/ml, C5=1000pg/ml) stimuliert und über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet. Die Messung erfolgte an drei Messzeitpunkten: 24h, 48h und 7 Tage nach der Stimulation. Pro Zytokin und Konzentration wurden 4 Proben getestet.

Die Ergebnisse zeigen, dass höhere Zytokinkonzentrationen bei den getesteten Zytokinen mit einer höheren Zytotoxizität einhergehen.

4.1.1 IL-1 β :

Es kommt bei allen Konzentrationen im zeitlichen Verlauf zu einem LDH Anstieg und somit zu einem gesteigerten Zellsterben. Es kommt zu keinen signifikanten Veränderungen. Die höchste LDH Aktivität zeigt sich nach 7 Tagen bei C2 (10pg/ml). (Abbildung 4)

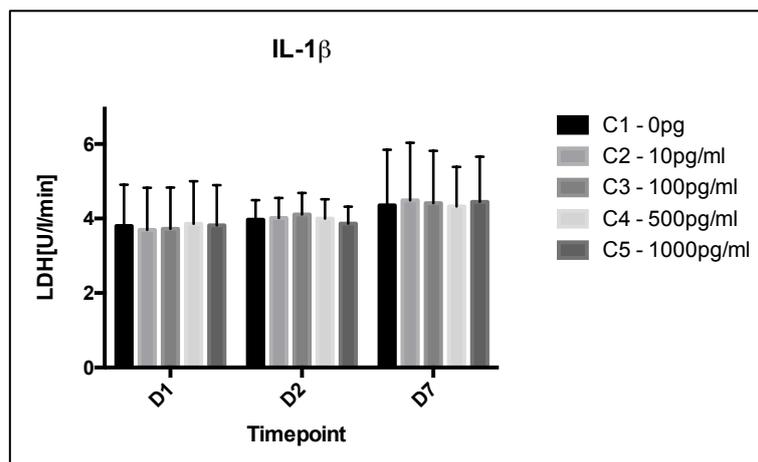


Abbildung 4: Datenauswertung der IL1- β LDH Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2 (10pg/ml), C3(100pg/ml), C4(500pg/ml), C5(100pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D2 (nach 48h), D7 (nach 7 Tagen). Bei allen Konzentrationen kommt es im Verlauf zu einem LDH Anstieg.

4.1.2 IL-6

Im Verlauf kommt es bei den Konzentrationen C1, C2, C3 zu erhöhten LDH Werten. Die Konzentrationen C4 und C5 zeigen niedrigere Werte an D2 verglichen mit D1. Im weiteren Beobachtungszeitraum steigt die LDH-Aktivität, und somit die Zellzytotoxizität weiter an. Somit zeigt sich nach 7 Tagen bei allen Konzentrationen ein Anstieg des LDHs, jedoch ohne Signifikanz. (Abbildung 5)

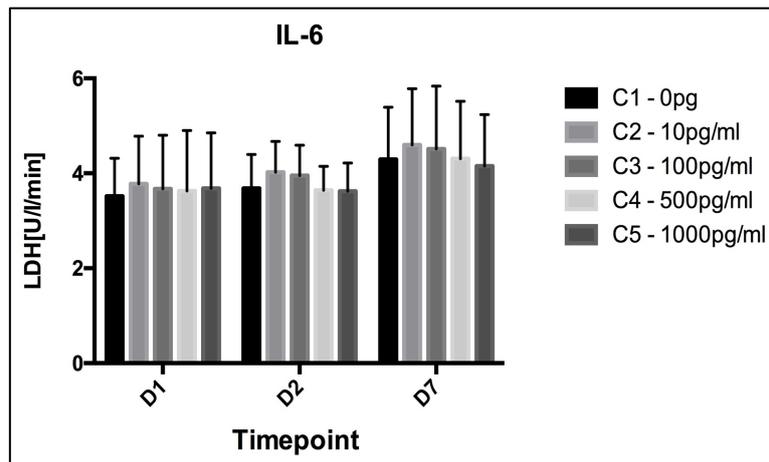


Abbildung 5: Datenauswertung der IL-6 LDH Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2 (10pg/ml), C3(100pg/ml), C4(500pg/ml), C5(1000pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D2 (nach 48h), D7 (nach 7 Tagen). Bei allen Konzentrationen kommt es nach 7 Tagen zu einem LDH Anstieg.

4.1.3 IL-10

Interleukin-10 führt bei allen Konzentrationen zu einem zeitlich immer stärker werdenden Anstieg von LDH, sprich einer erhöhten Zelltoxizität. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konzentrationen. (Abbildung 6)

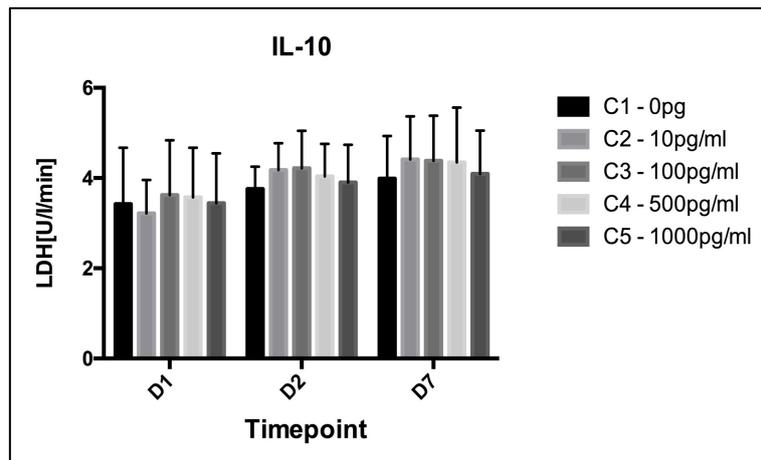


Abbildung 6: Datenauswertung der IL-10 LDH Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2 (10pg/ml), C3(100pg/ml), C4(500pg/ml), C5(1000pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D2 (nach 48h), D7 (nach 7 Tagen). Bei allen Konzentrationen kommt es im Verlauf zu einem LDH Anstieg.

4.1.4 TNF- α

Die Konzentrationen C1 und C2 zeigen bei TNF- α einen stetigen LDH Anstieg. Bei den Konzentrationen C3, C4 und C5 kommt es von D2 auf D7 zu einer Stagnierung und keinem weiteren Anstieg mehr. Innerhalb und zwischen den Konzentrationen zeigen sich keine signifikanten Veränderungen. (Abbildung 7)

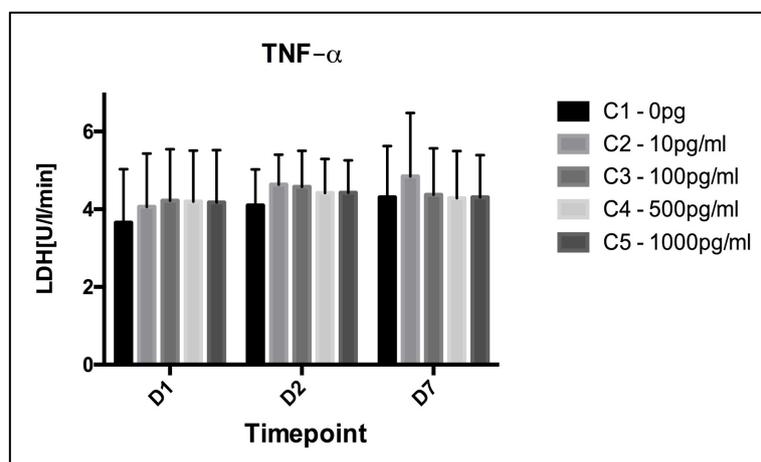


Abbildung 7: Datenauswertung der TNF- α LDH Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2 (10pg/ml), C3(100pg/ml), C4(500pg/ml), C5(1000pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D2 (nach 48h), D7 (nach 7 Tagen). Nur die Konzentrationen C1 und C2 zeigen einen kontinuierlichen LDH Anstieg. Die Konzentration C3, C4 und C5 stagnieren zwischen den Messzeitpunkten D2 und D7.

4.1.5 LDH intrazytokinärer Vergleich

Vergleicht man die Ergebnisse der untersuchten Zytokine gegeneinander so kommt es zu keinen signifikanten Unterschieden. Es zeigt sich die Tendenz, dass je höher die Zellkonzentration ist und je länger der Beobachtungszeitraum ist, desto höher ist die zytotoxische Wirkung. Es kommt bei allen Zytokinen bei allen Konzentrationen im Verlauf zu einem LDH Anstieg. (Abbildung 8)

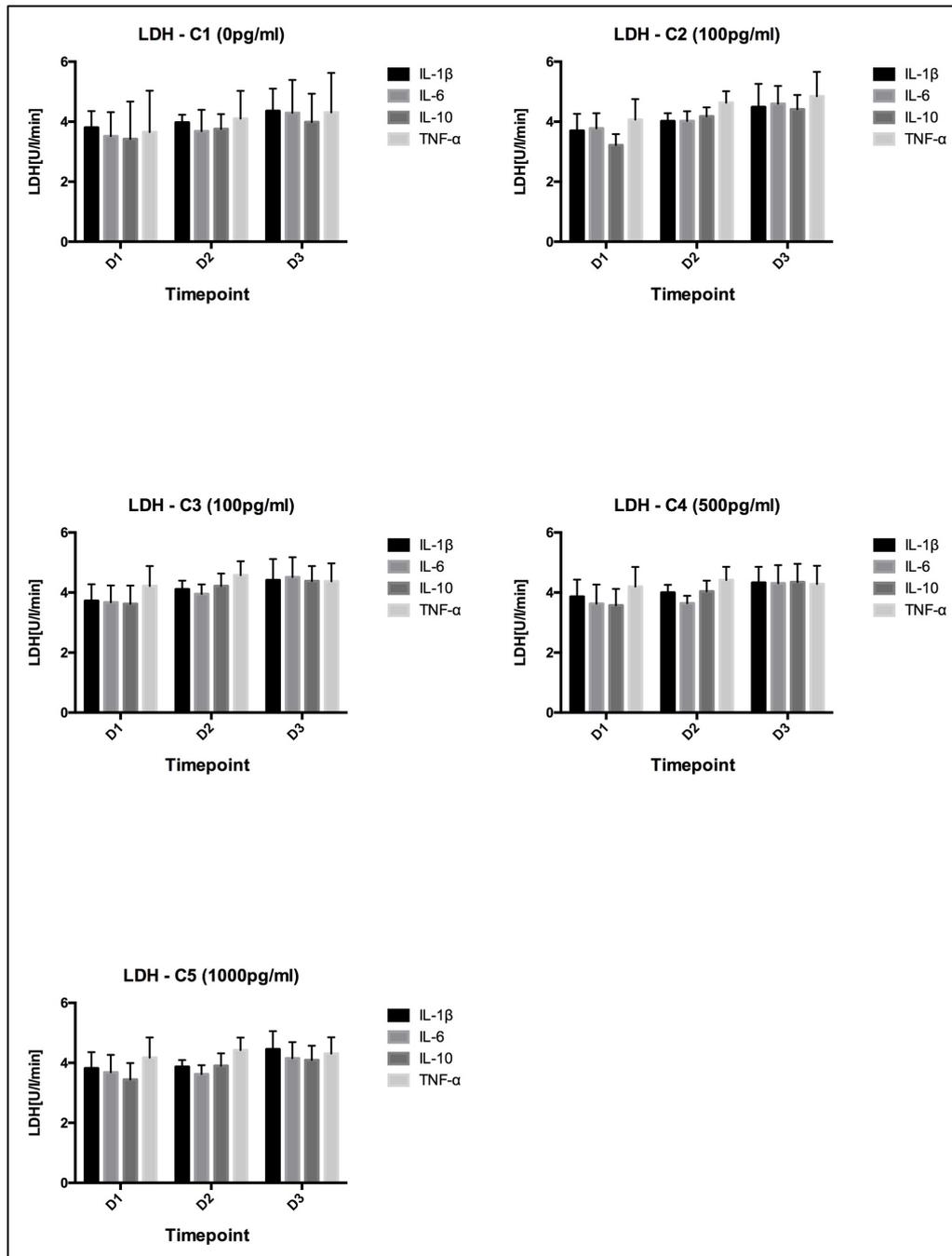


Abbildung 8: Intrazytokinärer Vergleich in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg), C2 (100pg/ml), C3 (100pg/ml), C4 (500pg/ml), C5 (1000pg/ml) zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (24h), D2 (48h), D7 (7Tage). Es zeigt sich die Tendenz, dass je höher die Zellkonzentration ist und je länger der Beobachtungszeitraum ist, desto höher ist die zytotoxische Wirkung.

4.2 MTT

Der MTT-Test gibt Aufschluss über die Anzahl der lebenden Zellen einer Probe im Vergleich zu einer Kontrolle.

Mit dem MTT-Test wurde die Toxizität der verschiedenen Zytokine in den unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Es wurde jedes Zytokin in 5 unterschiedlichen Konzentrationen (C1=0pg/ml, C2=10pg/ml, C3=100pg/ml, C4=500pg/ml, C5=1000pg/ml) stimuliert und über einen Zeitraum von 7 Tagen beobachtet. Die Messung erfolgte an drei Messzeitpunkten: 24h, 48h und 7 Tage nach der Stimulation.

Um ein statistisch aussagekräftiges Ergebnis zu erreichen wurden immer 4 Proben pro Zytokin und Konzentration getestet.

4.2.1 IL-1 β

Die Proben bis einschließlich der Konzentration C4 (500pg/ml) führen im zeitlichen Verlauf zu einer Steigerung der Zellviabilität. Die hohe Konzentration C5 (1000pg/ml) führt zu einem Verlust der Zellviabilität.

Führt man einen Vergleich zwischen den einzelnen Konzentrationen untereinander durch so zeigt sich ein signifikanter Unterschied von * ($p < 0,05$) zwischen C2-C5 und ein sehr signifikanter Unterschied von ** ($p < 0,01$) zwischen C3-C5 7 Tage nach Stimulation. (*Abbildung 9*)

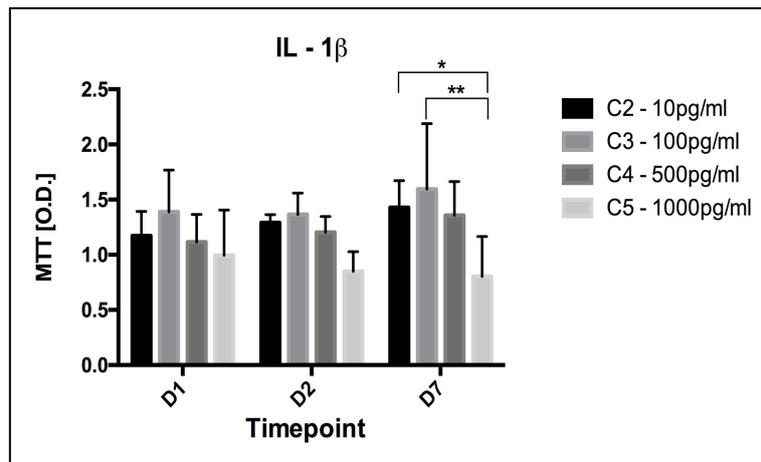


Abbildung 9: Datenauswertung der IL-1 β MTT Tests in den einzelnen Konzentrationen: C2 (10pg/ml), C3(100pg/ml), C4(500pg/ml), C5(1000pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D2 (nach 48h), D7 (nach 7 Tagen). Die Konzentrationen C2, C3 und C4 führen zu einem kontinuierlichen Anstieg. C5 führt zu einem Abfall. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied (* $p < 0,05$) zwischen C2 und C5 und ein sehr signifikanter Unterschied (** $p < 0,01$) zwischen C3 und C5 nach 7 Tagen.

4.2.2 IL-6

Das proinflammatorische Zytokine IL-6 verhält sich sehr ähnlich zu IL-1 β . Die Konzentrationen C1 bis C4 führen auch hier zu einem Anstieg der Zellviabilität im zeitlichen Verlauf.

Allein die hochkonzentriert stimulierten Präosteoblasten, C5 (1000pg/ml), führen bereits nach 48h zu einem Verlust der Zellviabilität. Dieser nimmt im zeitlichen Verlauf noch weiter zu.

Vergleicht man die Konzentrationen an den verschiedenen Messzeitpunkten untereinander zeigt sich nach 48h bereits ein signifikanter Unterschied zwischen C3 und C5 ($p < 0,05$). Nach 7 Tagen besteht bereits ein extrem signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen C2/C5, C3/C5 und ein sehr signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zwischen C4/C5. (Abbildung 10)

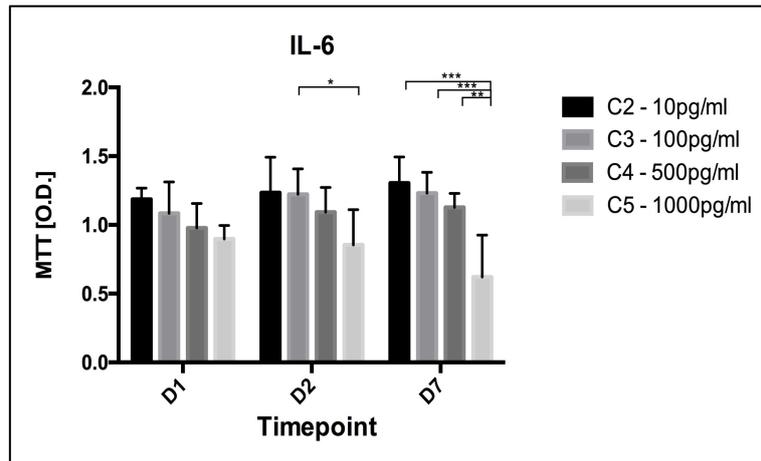


Abbildung 10: Datenauswertung der IL-6 MTT Tests in den einzelnen Konzentrationen: C2 (10pg/ml), C3(100pg/ml), C4(500pg/ml), C5(1000pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D2 (nach 48h), D7 (nach 7 Tagen). Die Konzentrationen C2, C3 und C4 führen zu einem kontinuierlichen Anstieg. C5 führt zu einem Abfall. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($*p < 0,05$) bereits nach 48h (D2) zwischen C3 und C5. Nach 7 Tagen (D7) zeigt sich ein extrem signifikanter Unterschied ($***p < 0,001$) zwischen C2/C5, C3/C5 und ein sehr signifikanter Unterschied ($**p < 0,01$) zwischen C4/C5.

4.2.3 IL-10

Das antiinflammatorische Zytokine IL-10 zeigt bei den niedrigen Konzentrationen C2 und C3 einen im Verlauf kontinuierlichen Anstieg der Zellviabilität.

Bei den höheren Konzentrationen C4 und C5 zeigt sich anfänglich in den ersten 48h eine Steigerung der Zellviabilität. Im weiteren Verlauf kommt es jedoch nach 7 Tagen zu einem Verlust und einem Abfall der Anzahl der lebenden Zellen.

Der Vergleich der Konzentrationen untereinander zeigt 7 Tage nach Stimulation einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) zwischen C2/C5 und einen sehr signifikanten Unterschied ($p < 0,01$) zwischen C3/C5. (Abbildung 11)

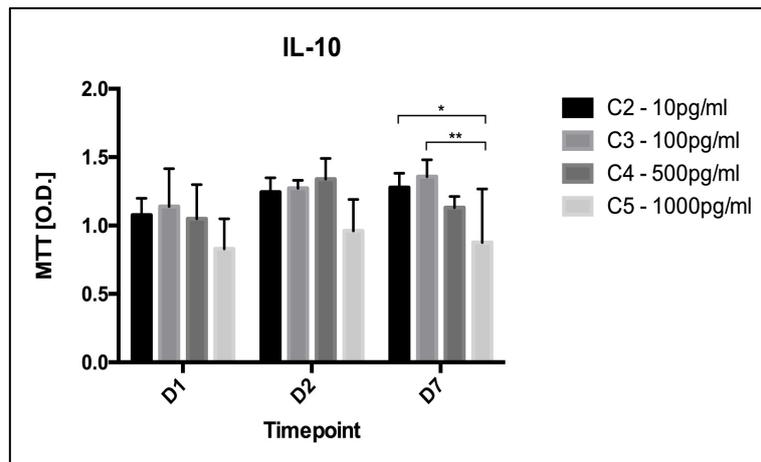


Abbildung 11: Datenauswertung der IL-10 MTT Tests in den einzelnen Konzentrationen: C2 (10pg/ml), C3(100pg/ml), C4(500pg/ml), C5(1000pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D2 (nach 48h), D7 (nach 7 Tagen). Die Konzentrationen C2 und C3 führen zu einem kontinuierlichen Anstieg. C4 und C5 führe nach 48h zu einem Abfall. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied (* $p < 0,05$) zwischen C2 und C5 und ein sehr signifikanter Unterschied (** $p < 0,01$) zwischen C3 und C5 nach 7 Tagen.

4.2.4 TNF- α

TNF- α führt in den Konzentrationen C2, C3 und C4 in den ersten 48h zu einem Anstieg der Zellviabilität. Bei C4 kommt es im weiteren Verlauf zu einem minimalen weiteren Anstieg. Die Konzentrationen C2 und C3 zeigen nach 7 Tagen einen geringen Abfall. Die Stimulation mit TNF- α in hoher Konzentration C5 (1000pg/ml) führt im zeitlichen Verlauf zu einem kontinuierlichen vermehrten Abfall.

Vergleicht man die Wirkung der verschiedenen Konzentrationen untereinander zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. TNF- α führt in keiner Konzentration zu einer Steigerung der Zellviabilität. Besonders in hoher Konzentration von 1000pg/ml führt es zu einem deutlichen Abfall der Anzahl an lebenden Zellen. (Abbildung 12)

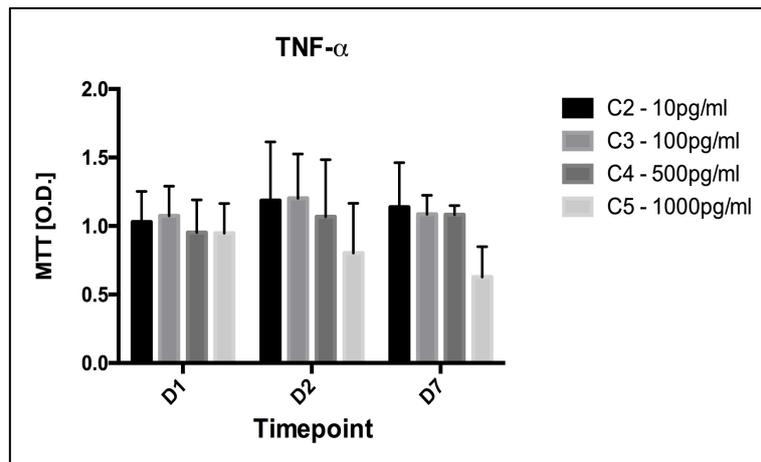


Abbildung 12: Datenauswertung der IL-1 β MTT Tests in den einzelnen Konzentrationen: C2 (10pg/ml), C3(100pg/ml), C4(500pg/ml), C5(1000pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D2 (nach 48h), D7 (nach 7 Tagen). Die Konzentrationen C2, C3 und C4 führen bis zu D2 zu einem Anstieg, im weiteren Verlauf jedoch zu einem Abfall. C5 führt kontinuierlich zu einem Abfall.

4.2.5 MTT – intrazytokinärer Vergleich

Führt man einen Vergleich zwischen allen Zytokinen bei allen Konzentrationen durch so zeigt sich, dass die niedrigeren Konzentrationen C2 (10pg/ml) und C3 (100pg/ml) bei allen Zytokinen zu einem positiven Anstieg der Zellviabilität führen. Die höhere Konzentration C4 (500pg/ml) zeigt nur bei IL-1 β einen kontinuierlichen Anstieg. Bei den Zytokinen IL-6, IL-10 und TNF- α kommt es nach einem anfänglichen Anstieg nach 7 Tagen zu einem Abstieg der Zellviabilität. Die höchste Konzentration C5 (1000pg/ml) wirkt sich auf alle Zytokine zytotoxisch aus.

Auffällig ist, dass IL-1 β die stärkste und positivste Wirkung auf die Zellviabilität hat. Bei den Konzentration C2-C4 kommt es hier zu den höchsten Werten.

Vergleicht man unter den Zytokinen die unterschiedlichen Konzentrationen an den verschiedenen Messzeitpunkten so ist erkennbar, dass die Stimulation mit der Konzentration C3 (100pg/ml) die positivste Wirkung bei allen Zytokinen hat. Hier kommt es immer zu einer Steigerung der Zellviabilität.

Es zeigen sich bei allen Vergleichen keine signifikanten Unterschiede. (Abbildung 13)

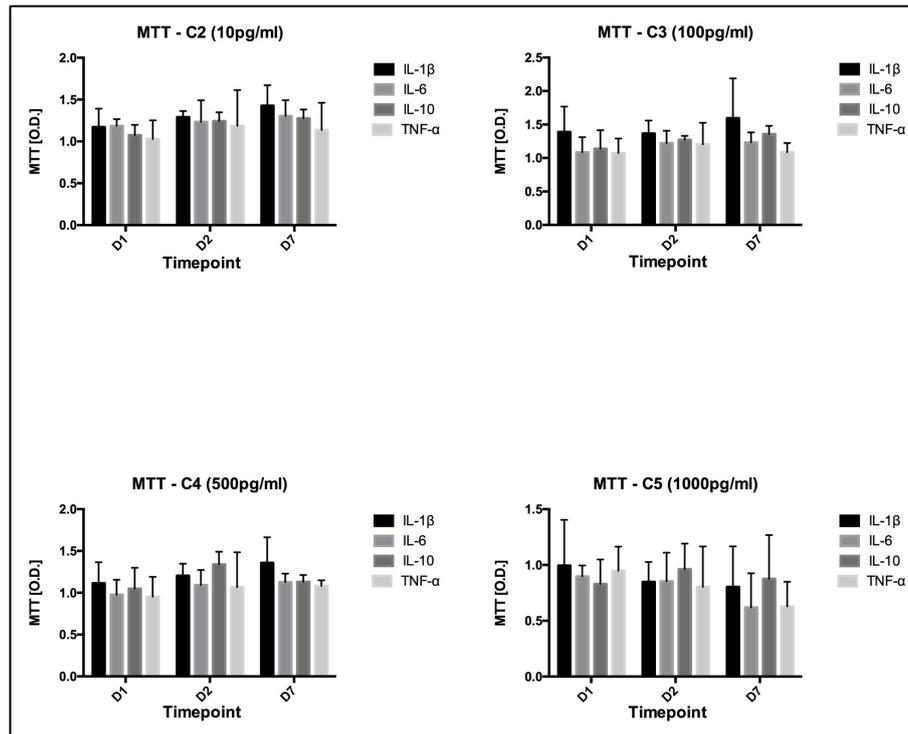


Abbildung 13: Datenauswertung der MTT Tests in den einzelnen Konzentrationen: C2 (10pg/ml), C3(100pg/ml), C4(500pg/ml), C5(1000pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D2 (nach 48h), D7 (nach 7 Tagen). Die Konzentrationen C2, C3 führen bei allen Zytokinen zu einem Anstieg. Die Konzentration C4 führt nur bei IL-1 β zu einem kontinuierlichen Anstieg. C5 bei allen Zytokinen zytotoxisch. IL-1 β hat den positivsten Effekt.

4.3 ALP-Test

Wie bereits erläutert ist ALP ein Enzym, das man in Osteoblasten findet und als Marker für die osteogene Differenzierung dient. Durch die Messung der AP Aktivität lassen sich somit Schlüsse ziehen ob und wie stark eine osteogene Differenzierung stattfindet. Die Messung der ALP-Aktivität erfolgte nach 24 Stunden, 72 Stunden, 7 Tagen und 14 Tagen. Um ein aussagekräftiges Testergebnis zu erreichen wurden 4 Proben pro Konzentration und Zytokin getestet.

4.3.1 IL-1 β

Interleukin-1 β führt bei den niedrigen Zytokinkonzentrationen C2 (10pg/ml) und C3 (100pg/ml) zu einem kontinuierlichen Anstieg der ALP-Aktivität.

Die hohen Zytokinkonzentrationen C4 (500pg/ml) und C5 (1000pg/ml) führen bis zum Messzeitpunkt D7 zu einem starken kontinuierlichen Anstieg mit einem hohen Aktivitätspeak. Im weiteren Verlauf kommt es jedoch zu einem Abfall. Die Aktivität liegt jedoch nach 14 Tagen immer noch über der der Kontrollgruppe C1 (0pg/ml).

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. (Abbildung 14)

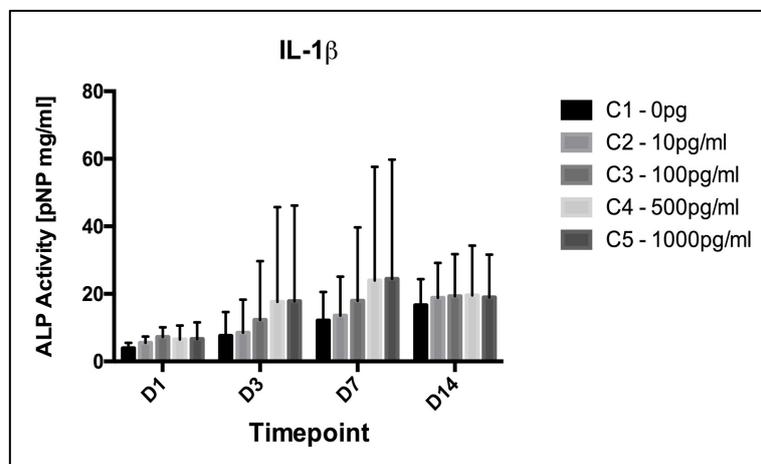


Abbildung 14: Datenauswertung der IL-1 β ALP Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2 (10pg/ml), C3(100pg/ml), C4(500pg/ml), C5(1000pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D3 (nach 72h), D7 (nach 7 Tagen), D14 (nach 14 Tagen). Die Konzentrationen C2 und C3 zu einem kontinuierlichen Anstieg. C4 und C5 führen bis zum Messzeitpunkt D7 zu einem Anstieg, jedoch im weiteren Verlauf zu einem Abfall.

4.3.2 IL-6

Interleukin-6 führt bei allen Konzentrationen zu einem kontinuierlichen Anstieg der AP-Aktivität. Die niedrigen Zytokinkonzentrationen C2 (10pg/ml) und C3 (100pg/ml) führen zu einer stärkeren Aktivität als die hohen Konzentrationen C4 (500pg/ml) und C5 (1000pg/ml). Die höchste Aktivität findet sich bei der Zytokinkonzentration C3.

Es gibt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zytokinkonzentrationen und den Messzeitpunkten. (Abbildung 15)

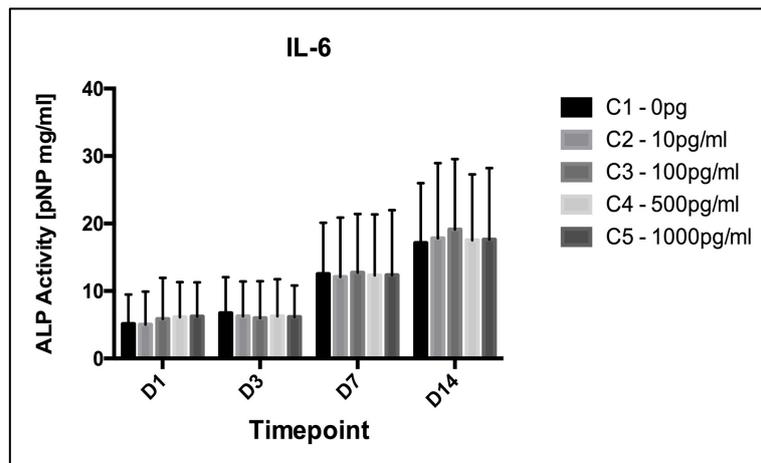


Abbildung 15: Datenauswertung der IL-6 ALP Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2 (10pg/ml), C3(100pg/ml), C4(500pg/ml), C5(1000pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D3 (nach 72h), D7 (nach 7 Tagen), D14 (nach 14 Tagen). Alle getesteten Konzentrationen führen zu einem kontinuierlichen Anstieg. Die höchste Aktivität liegt bei der Konzentration C3 vor.

4.3.3 IL-10

Interleukin-10 führt bei allen Zytokinkonzentrationen zu einem kontinuierlichen Anstieg der ALP-Aktivität. Die niedrigen Konzentrationen, C2 (10pg/ml) und C3 (100pg/ml), führen zu einem stärkeren Anstieg nach 14 Tagen als die hohen Konzentrationen. Die höchste ALP-Aktivität zeigt sich bei der Zytokinkonzentration C3.

Die Zytokinkonzentrationen C4 (500pg/ml) und C5 (1000pg/ml) zeigen nach 14 Tagen eine geringere ALP-Aktivität als die unstimulierte Kontrollprobe C1 (0pg/ml). Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. (Abbildung 16)

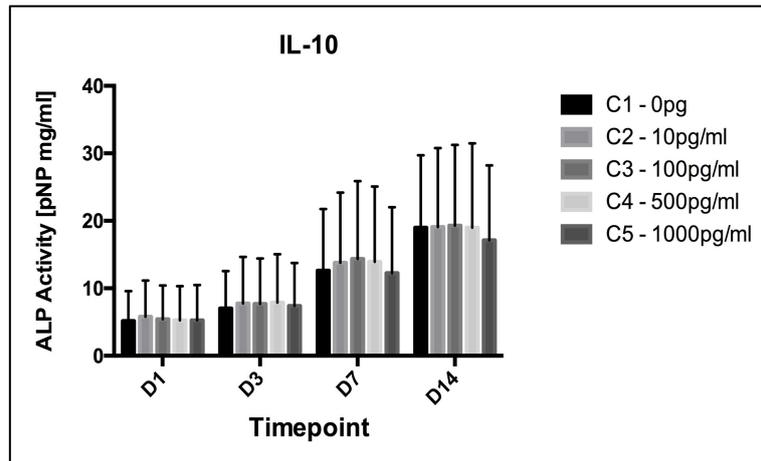


Abbildung 16: Datenauswertung der IL-10 ALP Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2 (10pg/ml), C3(100pg/ml), C4(500pg/ml), C5(1000pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D3 (nach 72h), D7 (nach 7 Tagen), D14 (nach 14 Tagen). Alle getesteten Konzentrationen führen zu einem kontinuierlichen Anstieg. Die höchste Aktivität liegt bei der Konzentration C3 vor. Die Konzentrationen C4 und C5 zeigen an D14 eine niedrigere Aktivität als die Kontrollprobe C1.

4.3.4 TNF- α

TNF- α führt bei allen Zytokinkonzentrationen zu einem kontinuierlichen Anstieg der ALP-Aktivität. Die niedrigen Konzentrationen C2 (10pg/ml) und C3 (100pg/ml) führen zu einer höheren Aktivität als die hohen Zytokinkonzentrationen C4 (500pg/ml) und C5 (1000pg/ml). Die stärkste ALP-Aktivität findet sich bei der Zytokinkonzentration C3 (100pg/ml).

Nach 14 Tagen zeigt sich bei den Zytokinkonzentrationen C4 (500pg/ml) und C5 (1000pg/ml) eine ALP-Aktivität die sich unterhalb der Kontrollprobe C1 (0pg/ml) befindet.

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. (Abbildung 17)

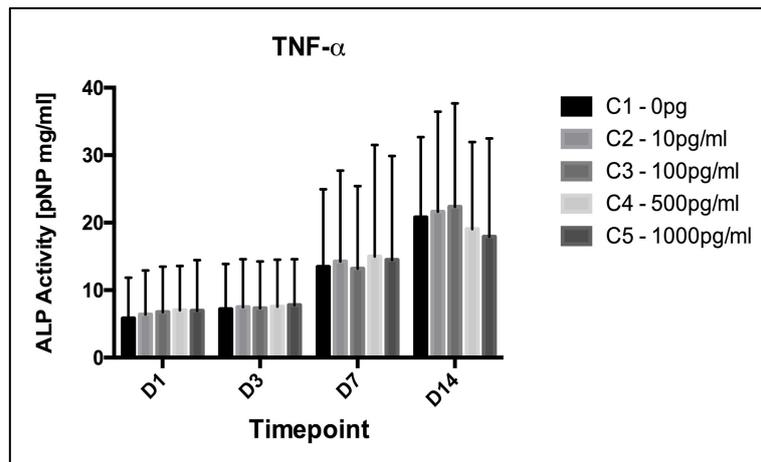


Abbildung 17: Datenauswertung der TNF- α ALP Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2 (10pg/ml), C3(100pg/ml), C4(500pg/ml), C5(1000pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D3 (nach 72h), D7 (nach 7 Tagen), D14 (nach 14 Tagen). Alle getesteten Konzentrationen führen zu einem kontinuierlichen Anstieg. Die höchste Aktivität liegt bei der Konzentration C3 vor. Die Konzentrationen C4 und C5 zeigen an D14 eine niedrigere Aktivität als die Kontrollprobe C1.

4.3.5 ALP – intrazytokinärer Vergleich

Vergleicht man alle Zytokine miteinander so zeigt sich, dass bei den Zytokinen IL-1 β , IL-6, IL-10 und TNF- α eine niedrige Zytokinkonzentration, C2 (10pg/ml) und C3 (100pg/ml) zu einer kontinuierlich hohen ALP Aktivität führt.

IL-1 β führt in hohen Konzentrationen, C4 (500pg/ml) und C5 (1000pg/ml) nach 14 Tagen zu einer Inhibierung der ALP-Aktivität.

Die Zytokinkonzentration C3 führt zur stärksten Stimulation der ALP-Aktivität bei allen Zytokinen. Die stärkste Aktivität zeigt sich hier nach 14 Tagen bei TNF- α , gefolgt von IL-10, IL-1 β und IL6.

Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede. (Abbildung 18)

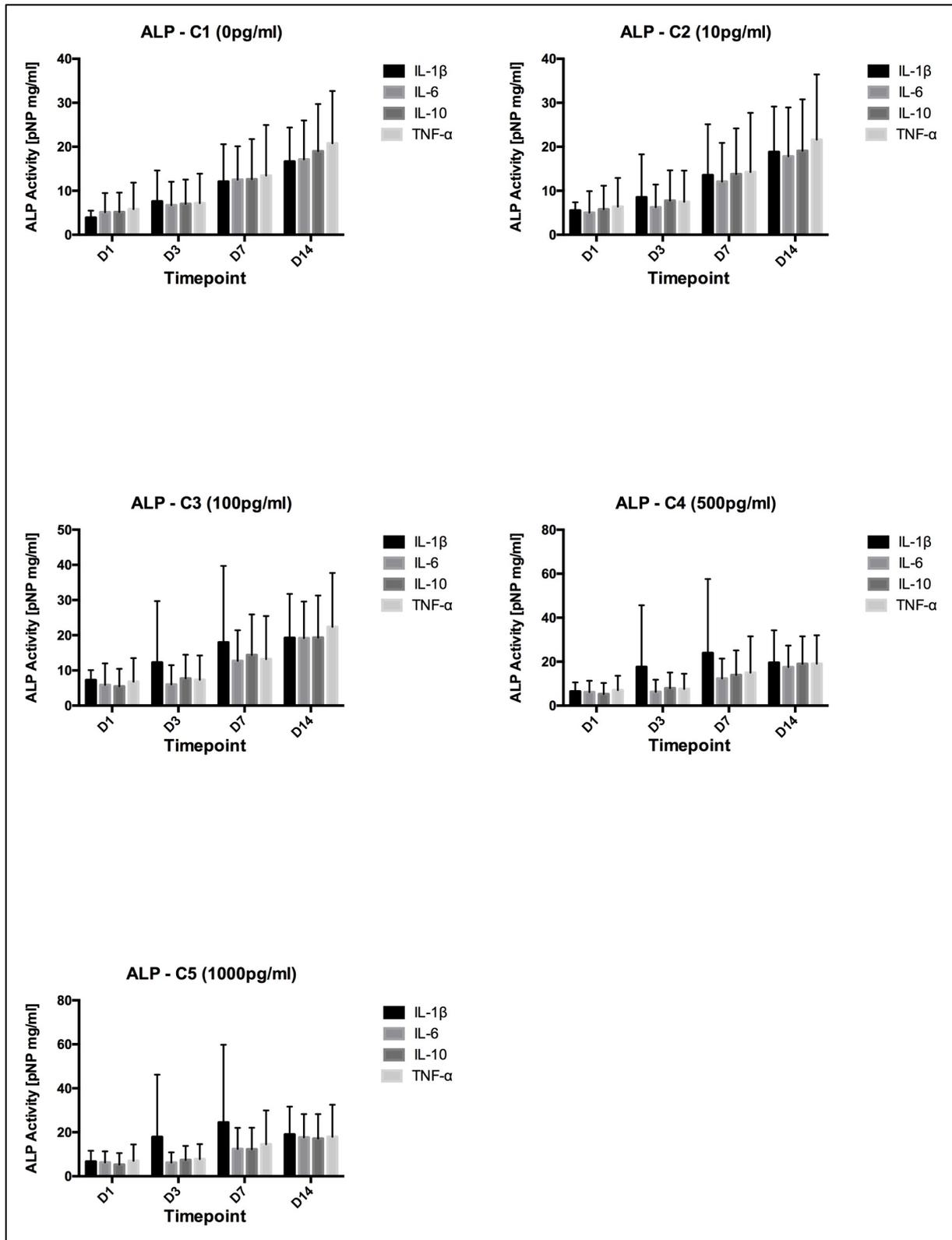


Abbildung 18: Datenauswertung der ALP Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2 (10pg/ml), C3(100pg/ml), C4(500pg/ml), C5(1000pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D3 (nach 72h), D7 (nach 7 Tagen), D14 (nach 14 Tagen). Die Konzentrationen C2 und C3 führen zu einem kontinuierlichen Anstieg bei allen Zytokinen. Die Konzentrationen C4 und C5 führen bei IL-1 β nach einem kontinuierlichen Anstieg an D14 zu einem Abfall.

4.4 PCR

Durch eine Genanalyse mittels PCR lässt sich der Einfluss der zu untersuchenden Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10 und TNF- α auf die Expression der messenger RNA (*mRNA*) potenter osteogener Proteine untersuchen.

Es erfolgte die Untersuchung des Einflusses der Zytokine, in hoher und niedriger Konzentration (C2 (10pg/ml) und C4 (500pg/ml)), auf die Proteine Kollagen (alpha-1-Typ-1Kollagen (Col1 α 1)), Osteokalzin, Osteopontin und RunX2 24h und 14 Tage nach Stimulation. Um ein statistisch aussagekräftiges Ergebnis zu erreichen wurden immer 4 Proben pro Zytokin und Konzentration getestet.

4.4.1 Kollagen

4.4.1.1 Kollagen – IL-1 β

IL-1 β führt nach 24h Stunden in niedriger Konzentration C2 (10pg/ml) zu einer vermehrten mRNA Expression. Hoch konzentriert (C4 (500pg/ml)) führt IL-1 β zu einer verminderten Expression im Vergleich zur Kontrollprobe C1 (0pg/ml).

Nach 14 Tagen zeigt sich eine verminderte mRNA Expression bei niedriger Konzentration und eine minimale Steigerung Expression bei der höheren Zytokinkonzentration C4 (500pg/ml).

Die Unterschiede sind nicht signifikant. (Abbildung 19)

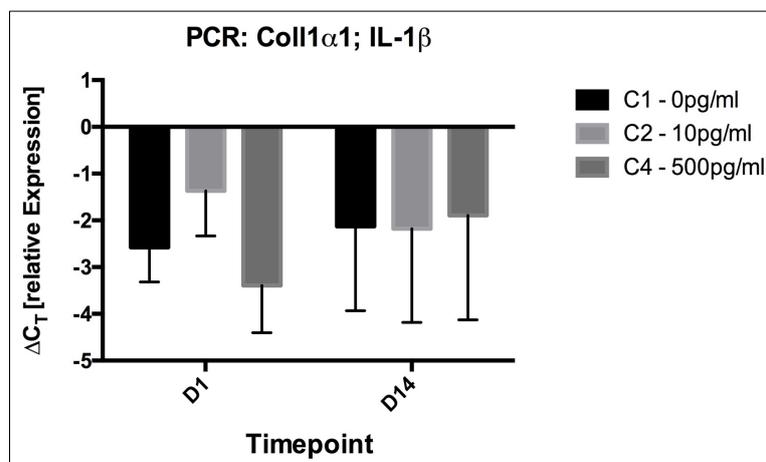


Abbildung 19: Datenauswertung des IL-1 β alpha-1-Typ-1-Kollagen (Coll1 α 1) PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4(500pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). C2 steigert, C4 senkt die mRNA Expression nach 24h. An D14 zeigt sich ein inverses Bild.

4.4.1.2 Kollagen – IL-6

IL-6 führt nach 24h in beiden Konzentrationen C2 und C4 im Vergleich zur Kontrollprobe C1 zu einer Verminderten mRNA Expression. Diese ist bei in niedriger Konzentration deutlicher ausgeprägt als in hoher.

Nach 14 Tagen führt IL-6 weiterhin in beiden Konzentrationen zu einer verminderten mRNA Expression. Diese ist nun bei C4 deutlich ausgeprägter als bei C2.

Die Unterschiede sind nicht signifikant. (Abbildung 20)

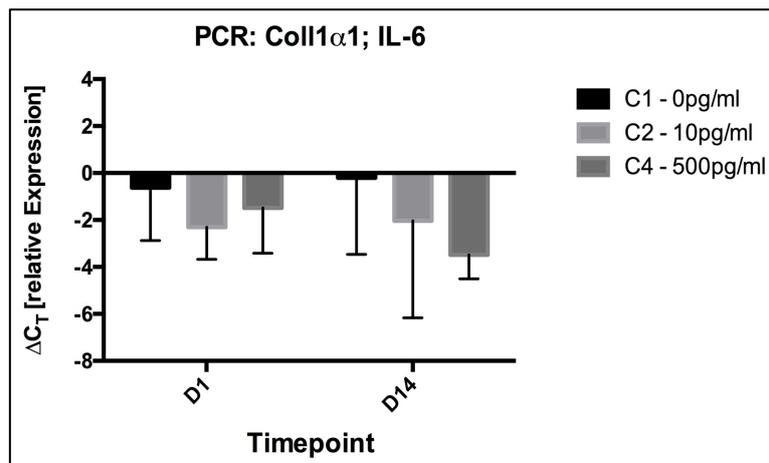


Abbildung 20: Datenauswertung des IL-6 alpha-1-Typ-1-Kollagen (*Coll1 α 1*) PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4(500pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). C2 und C4 senken die mRNA Expression an D1 und D14.

4.4.1.3 Kollagen – IL-10

IL-10 führt nach 24h in niedriger Konzentration C2 (10pg/ml) zu einer verminderten mRNA Expression. In hoher Konzentration C4 (500pg/ml) kommt es hingegen zu einer vermehrten Genexpression.

Nach 14 Tagen zeigen sich für beide Konzentrationen eine Vermehrte mRNA Expression.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 21)

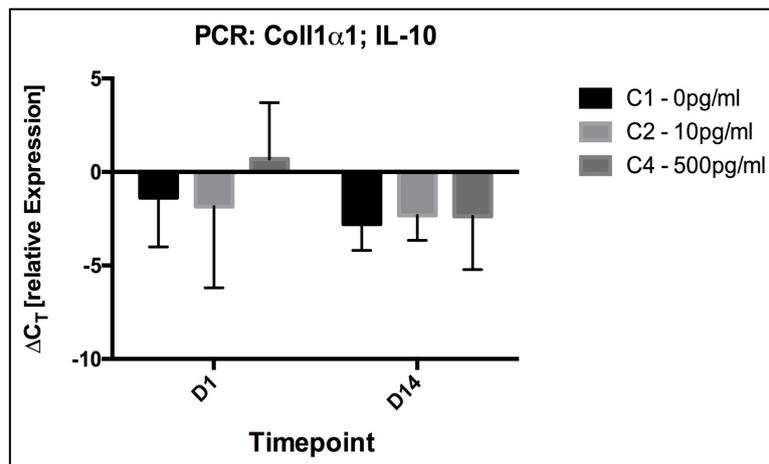


Abbildung 21: Datenauswertung des IL-10 alpha-1-Typ-1-Kollagen (Coll1 α 1) PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4(500pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). C2 senkt, C4 steigert die mRNA Expression an D1. An D14 führen beide Konzentrationen C2 und C4 zu einer gesteigerten Expression.

4.4.1.4 Kollagen – TNF- α

TNF- α führt nach 24h in beiden Konzentrationen zu einer gesteigerten mRNA Expression. Mit Erhöhung der Konzentration steigt auch die Genexpression.

Nach 14 Tagen führt TNF- α in niedriger Konzentration zu einer minimal geringeren Expression im Vergleich zur Kontrollprobe C1 (0pg/ml). In hoher Konzentration kommt es zu einem noch ausgeprägteren Abfall der mRNA Expression.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 22)

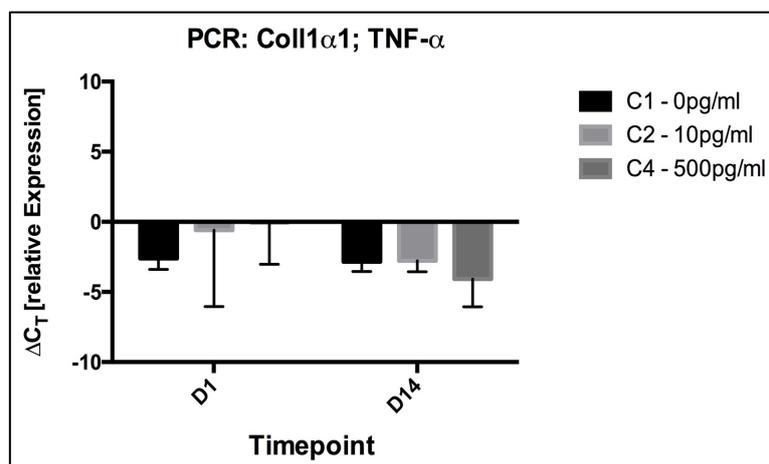


Abbildung 22: Datenauswertung des TNF- α alpha-1-Typ-1-Kollagen (Coll1 α 1) PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4(500pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). C2 und C4 steigern die mRNA Expression an D1. C2 führt an D14 zu einer minimalen Steigerung, C4 zu einem Abfall der Expression.

4.4.1.5 Kollagen – intrazytokinärer Vergleich

Führt man einen Vergleich zwischen allen Zytokinen in der Konzentration C2 (10pg/ml) durch, so zeigt sich die höchste mRNA Expression nach 24h bei TNF- α gefolgt von IL-1 β , IL-10 und IL-6.

Nach 14 Tagen sinkt die Expression bei IL-1 β , IL-10 und TNF- α ab. Einzig bei IL-6 kommt es zu einem Anstieg im zeitlichen Verlauf. (Abbildung 23)

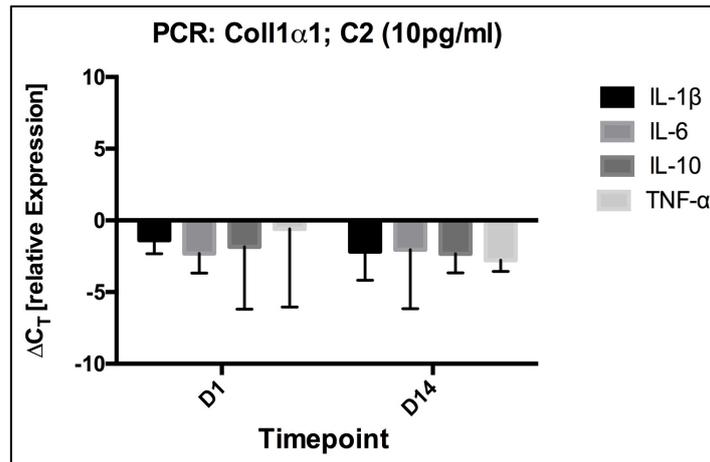


Abbildung 23: Datenauswertung der alpha-1-Typ-1-Kollagen (Coll1 α 1) PCR Tests in der einzelnen Konzentration: C2 (10pg/ml), zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Es zeigt sich nur bei IL-6 ein Anstieg der mRNA Expression im zeitlichen Verlauf, die übrigen Zytokinen führen zu einem Expressionsabfall.

In hoher Konzentration, C4 (500pg/ml) kommt es zur stärksten mRNA Expression bei IL-10 gefolgt von TNF- α , IL-6, IL-1 β .

Nach 14 Tagen zeigt sich nur bei IL-1 β eine im zeitlichen Verlauf ansteigende Expression. Bei allen anderen Zytokinen kommt es zu einer Verminderung.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 24)

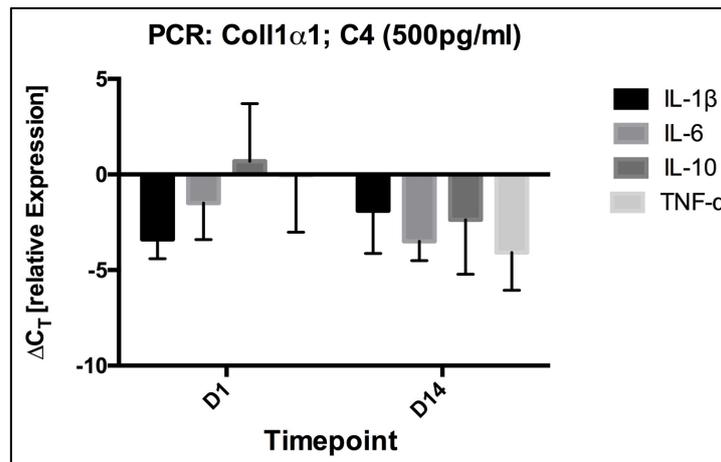


Abbildung 24: Datenauswertung der alpha-1-Typ-1-Kollagen ($Coll1\alpha1$) PCR Tests in der einzelnen Konzentration: C4 (500pg/ml), zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Es zeigt sich nur bei IL-1 β ein Anstieg der mRNA Expression im zeitlichen Verlauf, die übrigen Zytokine führen zu einem Expressionsabfall.

Führt man einen Vergleich aller Zytokine in allen Konzentrationen nach 24h durch, so zeigt sich, dass es nur bei TNF- α zu einer mit der Konzentration ansteigenden vermehrten Expression kommt.

IL-6 führt in beiden Konzentrationen zu einer verminderten mRNA Expression. IL-1 β führt in hoher Konzentration zu einer verminderten und in niedriger zu einer leicht gesteigerten Expression. IL-10 wiederum führt in hoher Konzentration zu einer vermehrten und in niedriger Konzentration zu einer verminderten Expression.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 25)

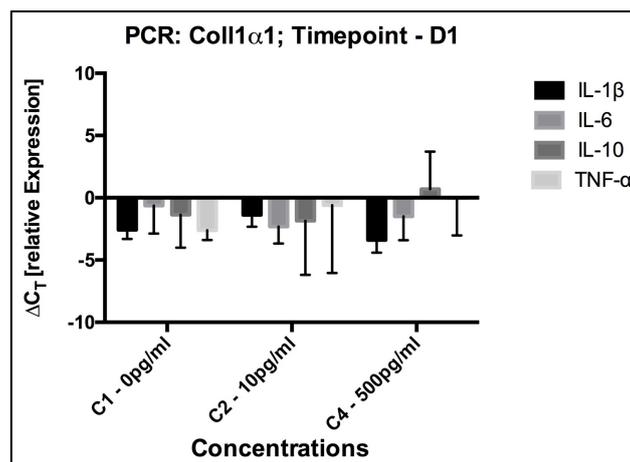


Abbildung 25: Datenauswertung der alpha-1-Typ-1-Kollagen ($Coll1\alpha1$) PCR Tests in den einzelnen Konzentration: C1 (0pg/ml), C2 (10pg/ml), C4 (500pg/ml), zu dem Messzeitpunkt (Timepoint): D1 (nach 24h). Es zeigt sich nur bei TNF- α eine mit höherer Konzentration steigenden mRNA Expression. IL-1 β führt in der Konzentration C2 zu einem Anstieg, C4 zu einem Abfall. IL-6 führt in beiden Konzentrationen zu einem Abfall. IL-1 β führt in der höheren Konzentration C4 zu einem Anstieg der mRNA Expression.

Führt man denselben Vergleich nach 14 Tagen durch so zeigt sich nur bei IL-10 eine konzentrationsabhängige vermehrte mRNA Expression. IL-6 und TNF- α führen in beiden Konzentrationen zu einer Verminderung der Expression. IL-1 β führt in hoher Konzentration zu einer dezenten Steigerung der Expression. In geringer Konzentration kommt es zu einem milden Abfall.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 26)

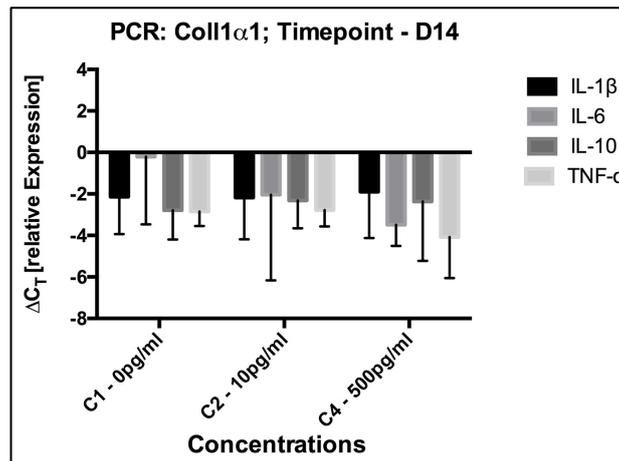


Abbildung 26: Datenauswertung der alpha-1-Typ-1-Kollagen (Coll1 α 1) PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4 (500pg/ml), zu dem Messzeitpunkt (Timepoint): D14 (nach 14 Tagen). Es zeigt sich nur bei IL-10 eine mit höherer Konzentration steigenden mRNA Expression. IL-1 β führt in der Konzentration C4 zu einem Anstieg. IL-6 und TNF- α führen in beiden Konzentrationen zu einem Abfall.

4.4.2 Osteokalzin

4.4.2.1 Osteokalzin – IL-1 β

IL-1 β führt nach 24 Stunden in niedriger Konzentration, C2 (10pg/ml), zu einer minimalen Suppression der mRNA Expression. Hoch konzentriert, C4 (500pg/ml), kommt es zu einer Steigerung der mRNA-Expression.

Nach 14 Tagen führt IL-1 β in beiden Konzentrationen zu einer Verminderung der Expression.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 27)

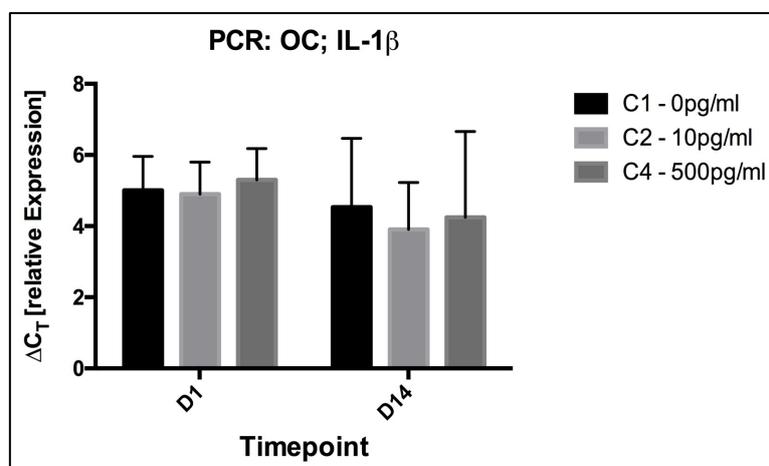


Abbildung 27: Datenauswertung des IL-1 β Osteokalzin (OC) PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4(500pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Die Konzentration C2 führt zu einer verminderten mRNA Expression an beiden Messzeitpunkten. Die Konzentration C4 führt an D1 zu einem minimalen Anstieg, an D14 zu einem Abfall der mRNA Expression.

4.4.2.2 Osteokalzin – IL-6

IL-6 führt nach 24 Stunden niedrig konzentriert, C2 (10pg/ml), zu einem minimalen Anstieg der mRNA – Expression. Hoch konzentriert, C4 (500pg/ml), kommt es zu einem deutlichen Abfall der Expression.

Nach 14 Tagen führt IL-6 in beiden Konzentrationen zu einem deutlichen Abfall der Expression im Vergleich zur Kontrollprobe C1 (0pg/ml). Dieser ist bei der niedrig konzentrierten Probe C2 minimal größer als bei der hochkonzentrierten C4.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 28)

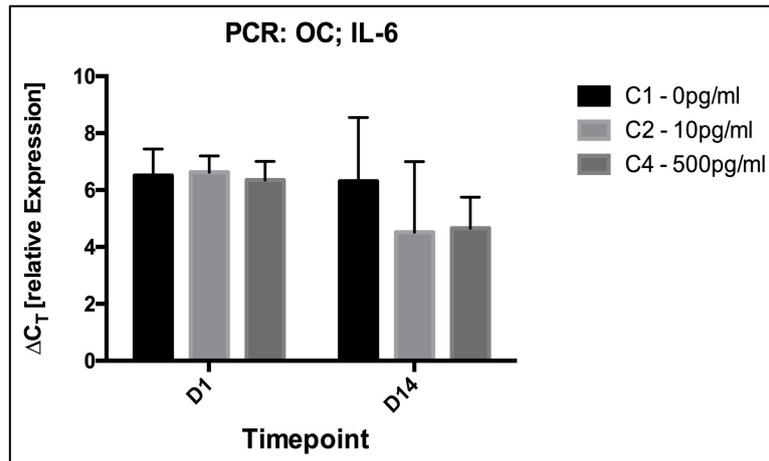


Abbildung 28: Datenauswertung des IL-6 Osteokalzin (OC) PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4(500pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Die Konzentration C2 führt an D1 zu einem minimalen Anstieg, an D14 zu einem Abfall der mRNA Expression. Die Konzentration C4 führt zu einer verminderten mRNA Expression an beiden Messzeitpunkten

4.4.2.3 Osteokalzin – IL-10

IL-10 führt niedrig konzentriert 24 Stunden nach der Stimulation zu einem minimalen Abfall der mRNA Expression. Hoch konzentriert kommt es hingegen zu einem deutlichen Expressionsanstieg.

14 Tage nach der Stimulation führen beide Konzentrationen zu einem Expressionsabfall im Vergleich zur Kontrollprobe C1 (0pg/ml). Dieser ist in der hochkonzentrierten Probe C4 höher als in der niedrig konzentrierten C2.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 29)

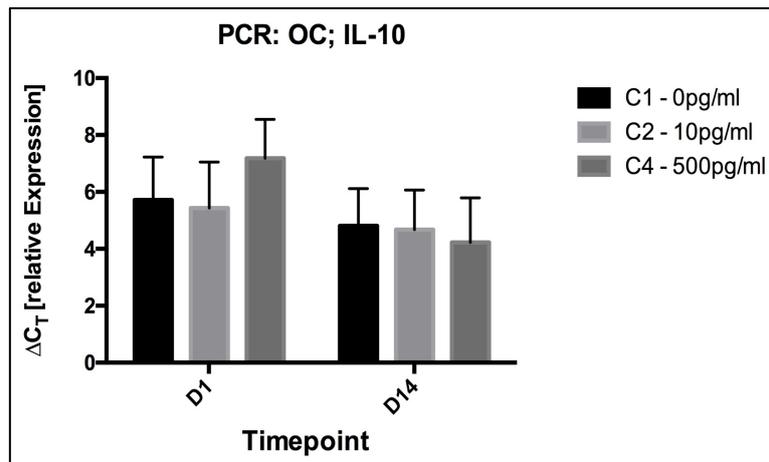


Abbildung 29: Datenauswertung des IL-10 Osteokalzin (OC) PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4(500pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Die Konzentration C2 führt zu einer verminderten mRNA Expression an beiden Messzeitpunkten. Die Konzentration C4 führt an D1 zu einem Anstieg, an D14 zu einem Abfall der mRNA Expression.

4.4.2.4 Osteokalzin – TNF- α

TNF- α führt 24 Stunden nach der Stimulation niedrig konzentriert zu einem Anstieg der mRNA Expression. Hoch konzentriert kommt es zu einer verminderten Expression. 14 Tage nach der Stimulation führt TNF- α niedrig konzentriert immer noch zu einer minimalen Steigerung der Expression. Hochkonzentriert kommt es weiterhin zu einer minimal verminderten Expression.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 30)

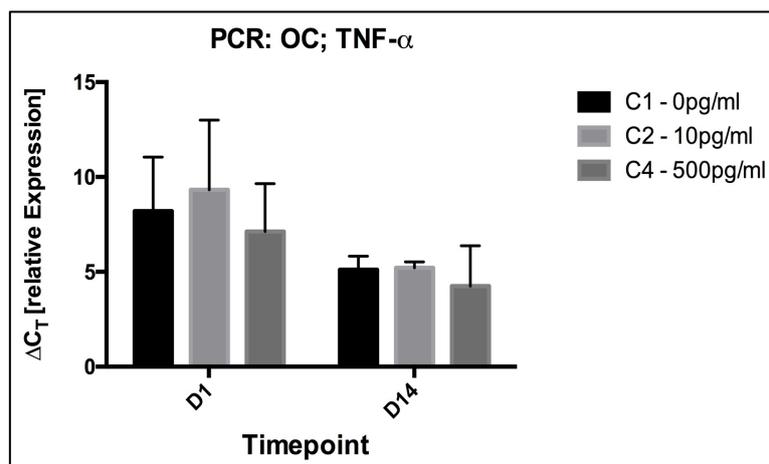


Abbildung 30: Datenauswertung des TNF- α Osteokalzin (OC) PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4(500pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Die Konzentration C2 führt an beiden Messzeitpunkten zu einem Anstieg der mRNA Expression. Die Konzentration C4 führt zu einer verminderten mRNA Expression an beiden Messzeitpunkten.

4.4.2.5 Osteokalzin – Intrazytokinärer Vergleich

Vergleicht man alle Zytokine in der Konzentration C2 (10pg/ml) miteinander, so zeigt sich nach 24h die höchste Expression bei TNF- α gefolgt von IL-6, IL-10 und IL-1 β . Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) in der mRNA Expression von TNF- α gegenüber IL-10 und IL-1 β .

14 Tage nach der Stimulation kommt es zu einer deutlich geringeren Expression als nach 24 Stunden. Die höchste Expression liegt hier bei TNF- α vor gefolgt von IL-10, IL-6 und IL-1 β . (Abbildung 31)

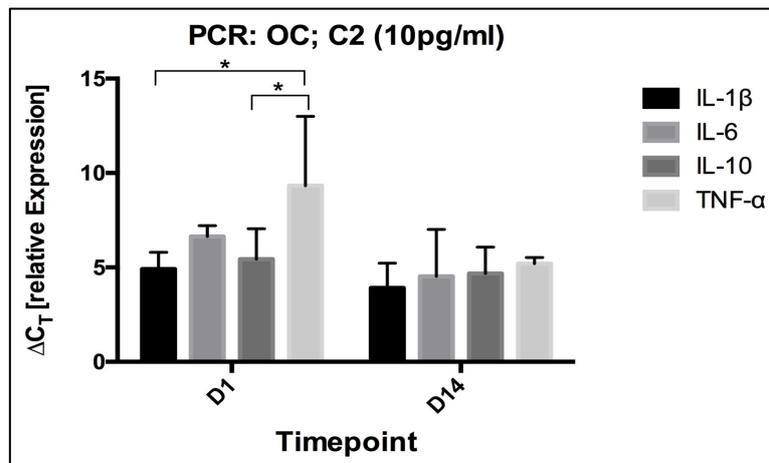


Abbildung 31: Datenauswertung der Osteokalzin (OC) PCR Tests in der einzelnen Konzentration: C2 (10pg/ml), zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Es zeigt sich bei keinem Zytokin ein mRNA Anstieg im zeitlichen Verlauf. An D1 (nach 24h) zeigt TNF- α eine signifikant (* $p < 0.05$) höhere mRNA Expression als IL-1 β und IL-6.

Vergleicht man alle Zytokine in der Konzentration C4 (500pg/ml) miteinander so zeigt sich auch hier nach 24 Stunden die höchste Expression bei TNF- α gefolgt von IL-10, IL-6 und IL-1 β .

Nach 14 Tagen kommt es zu einer Expressionsabnahme bei allen Zytokinen. Die höchste Expression liegt hier bei IL-6 vor gefolgt von TNF- α , IL-10 und IL-1 β .

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 32)

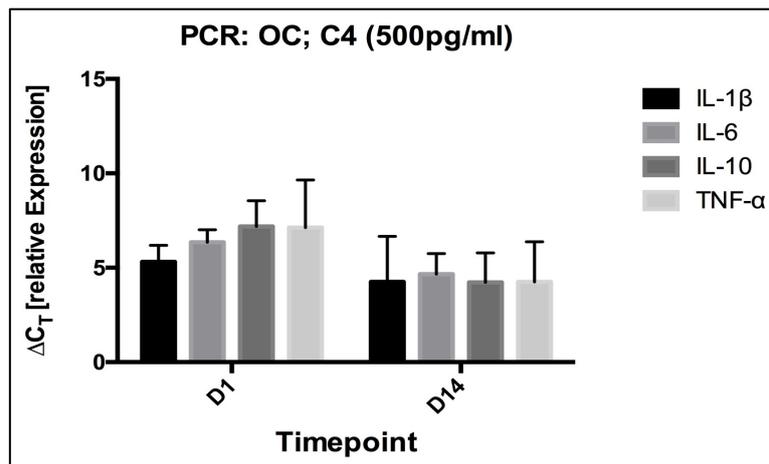


Abbildung 32: Datenauswertung der Osteokalzin (OC) PCR Tests in der einzelnen Konzentration: C4 (500pg/ml), zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Es zeigt sich bei keinem Zytokin ein mRNA Anstieg im zeitlichen Verlauf.

Vergleicht man alle Zytokine in allen Konzentrationen nach 24h miteinander, so zeigt sich bei den niedrig konzentrierten Zytokinen IL-10 und IL-1β eine Abnahme, bei IL-6 und TNF-α allerdings eine Steigerung der Expression. Signifikant hoch ($p < 0,05$) ist die mRNA-Expression von TNF-α gegenüber IL-10 und sehr signifikant ($p < 0,01$) gegenüber IL-1β.

Die hoch konzentrierten Zytokine verhalten sich komplett invers. Hier kommt es durch IL-6 und TNF-α zu einer Verminderung und bei IL-1β und IL-10 zu einer Steigerung der Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe. (Abbildung 33)

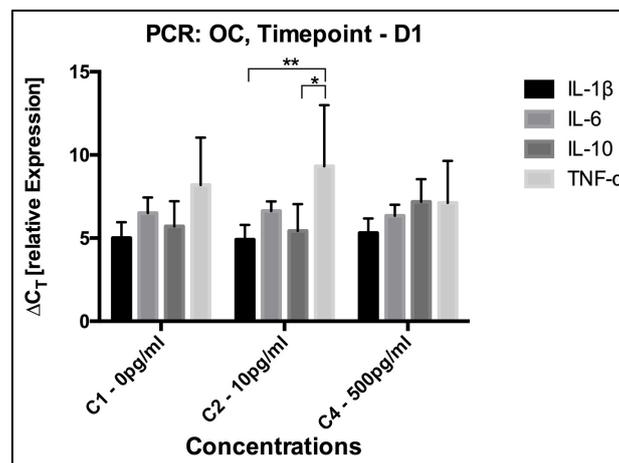


Abbildung 33: Datenauswertung der Osteokalzin (OC) PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2 (10pg/ml), C4 (500pg/ml), zu dem Messzeitpunkt (Timepoint): D1 (nach 24h). Es zeigt sich bei keinem Zytokin eine mit höherer Konzentration steigende mRNA Expression. In der Konzentration C2 führt TNF-α zu einer signifikant ($*p < 0,05$) höheren mRNA Expression als IL-10 und sehr signifikant ($**p < 0,01$) höheren mRNA Expression als IL-1β.

Führt man denselben Vergleich nach 14 Tagen durch, so zeigt sich, dass IL-1β, IL-6 und IL-10 niedrig konzentriert zu einer Verminderung der mRNA Expression führen. TNF-α führt wiederum niedrig konzentriert zu einer Steigerung.

Hoch konzentriert führen alle Zytokine zu einem Abfall der Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 34)

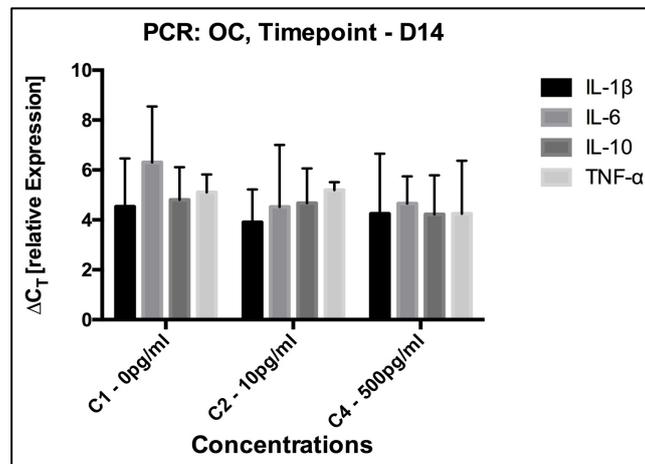


Abbildung 34: Datenauswertung der Osteokalzin (OC) PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4 (500pg/ml), zu dem Messzeitpunkt (Timepoint): D14 (nach 14 Tagen). Es zeigt sich das alle Zytokine in der Konzentration C4 zu einem Anstieg der mRNA Expression im Vergleich zu Kontrollgruppe führen.

4.4.3 Osteopontin

4.4.3.1 Osteopontin – IL-1 β

IL-1 β führt 24 Stunden nach Stimulation in niedriger Konzentration, C2 (10pg/ml) zu einer geringen Abnahme der mRNA-Expression für Osteopontin. In hoher Konzentration, C4 (500pg/ml), kommt es zu einem Anstieg der Expression.

Im zeitlichen Verlauf verursacht IL-1 β nach 14 Tagen niedrig und hoch konzentriert eine vermehrte Expression. Niedrig konzentriert ist der Anstieg höher als hoch konzentriert.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 35)

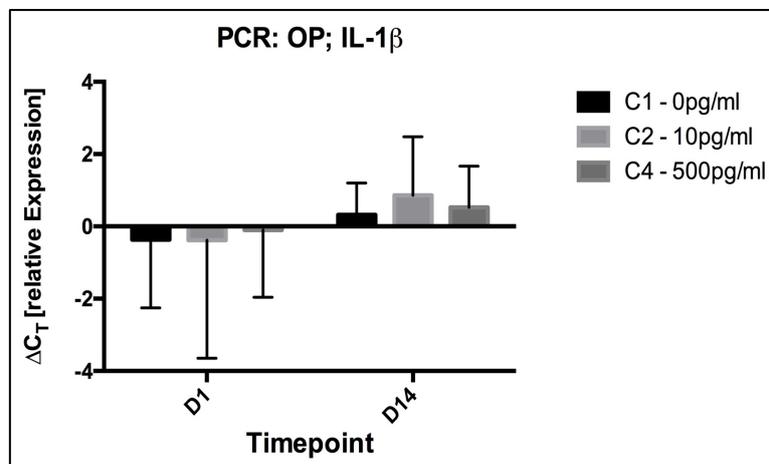


Abbildung 35: Datenauswertung des IL-1 β Osteopontin (OP) PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4(500pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Die Konzentration C4 führt an beiden Messzeitpunkten zu einer gesteigerten mRNA Expression. Die Konzentrationen C2 führt an D1 zu einer verminderten und an D14 zu einer gesteigerten mRNA Expression.

4.4.3.2 Osteopontin – IL-6

IL-6 führt 24 Stunden nach der Stimulation niedrig konzentriert zu einer vermehrten mRNA-Expression. Hoch konzentriert kommt es zu einem Abfall der Expression.

Im zeitlichen Verlauf verursacht IL-6 nach 14 Tagen niedrig und hoch konzentriert eine verminderte mRNA-Expression. Hochkonzentriert, C4 (500pg/ml) ist der Abfall im verglichen mit der Kontrollgruppe C1 (0pg/ml) stärker als niedrig konzentriert.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 36)

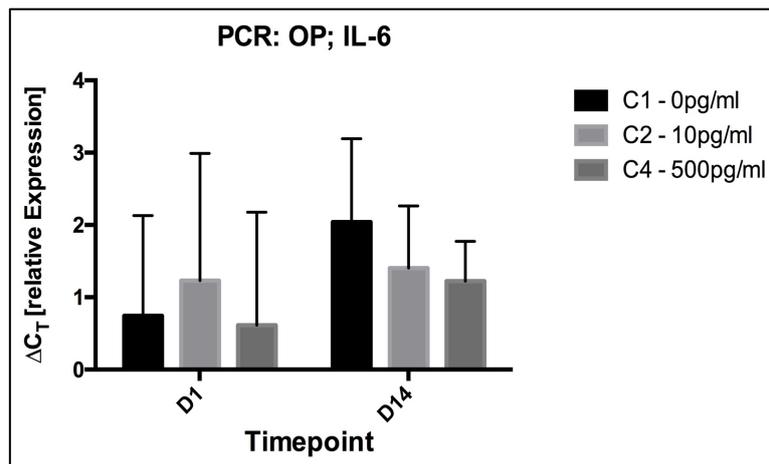


Abbildung 36: Datenauswertung des IL-6 Osteopontin (OP) PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4(500pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Die Konzentration C4 führt an beiden Messzeitpunkten zu einer gesteigerten mRNA Expression. Die Konzentrationen C2 führt an D1 zu einer gesteigerten und an D14 zu einer verminderten mRNA Expression. Die Konzentration C4 führt an beiden Messzeitpunkten zu einer verminderten mRNA Expression.

4.4.3.3 Osteopontin – IL-10

IL-10 führt 24 Stunden nach der Stimulation niedrig konzentriert zu einer verminderten mRNA-Expression. Hoch konzentriert führt es wiederum zu einer leichten Steigerung der Expression.

Im zeitlichen Verlauf ändert sich die Beobachtung und nach 14 Tagen verursacht IL-10 niedrig konzentriert einen Anstieg der mRNA-Expression. Hoch konzentriert kommt es jedoch zu einem leichten Abfall.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 37)

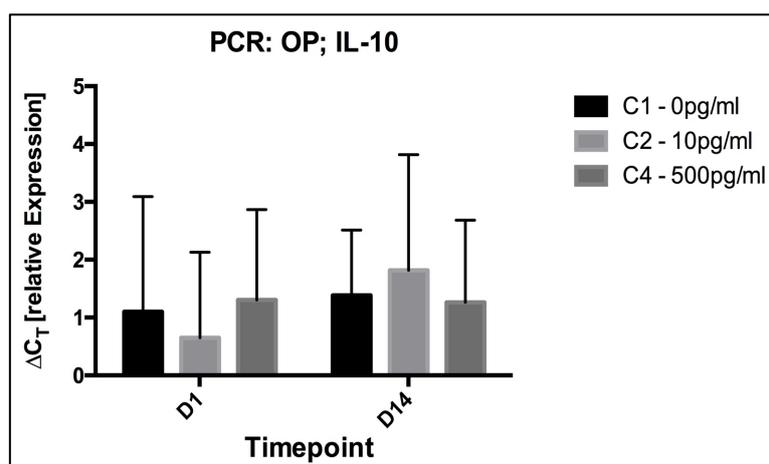


Abbildung 37: Datenauswertung des IL-10 Osteopontin (OP) PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4(500pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Die Konzentration C4 führt an beiden Messzeitpunkten zu einer gesteigerten mRNA Expression. Die Konzentrationen C2 führt an D1 zu einer verminderten und an D14 zu einer gesteigerten mRNA Expression. Die Konzentrationen C4 führt an D1 zu einer gesteigerten und an D14 zu einer verminderten mRNA Expression.

4.4.3.4 Osteopontin – TNF- α

TNF- α führt 24 Stunden nach der Stimulation niedrig konzentriert zu einem starken Anstieg der Osteopontin mRNA-Expression. Hoch konzentriert kommt es zu einem starken Abfall. Der Unterschied zwischen der hoch und niedrig konzentrierten Probe ist signifikant ($p < 0,05$).

Im zeitlichen Verlauf verursacht TNF- α nach 14 Tagen jedoch in beiden Konzentrationen eine Expressionsabnahme. Hoch konzentriert ist der Abfall stärker als niedrig konzentriert. Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 38)

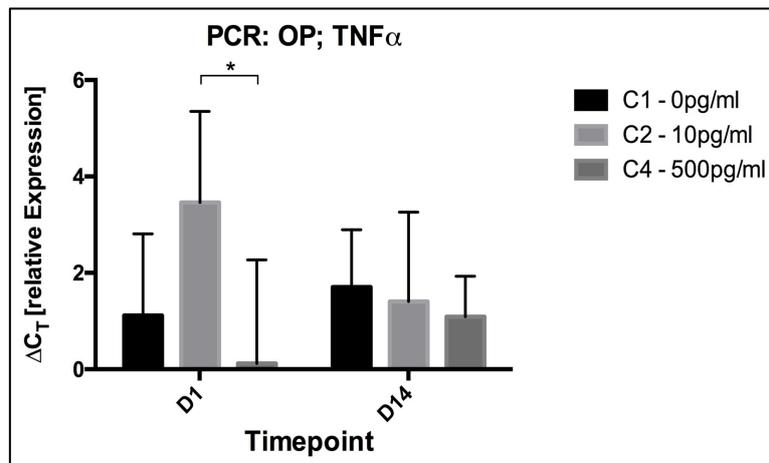


Abbildung 38: Datenauswertung des TNF- α Osteopontin (OP) PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4(500pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Die Konzentration C4 führt an beiden Messzeitpunkten zu einer gesteigerten mRNA Expression. Die Konzentration C2 führt an D1 zu einer gesteigerten und an D14 zu einer verminderten mRNA Expression. An D1 ist die mRNA Expression signifikant (* $p < 0,05$) höher als bei der Konzentration C4. Die Konzentration C4 führt an beiden Messzeitpunkten zu einer verminderten mRNA Expression.

4.4.3.5 Osteopontin – Intrazytokinärer Vergleich

Vergleicht man alle Zytokine in der niedrigen Konzentration C2 (10pg/ml) miteinander, so zeigt sich nach 24 Stunden die höchste mRNA – Expression bei TNF- α , gefolgt von IL-6, IL10, und IL-1 β . Die Differenz zwischen TNF- α und IL-1 β ist einfach signifikant ($p < 0,05$).

14 Tage nach der Stimulation liegt die höchste Expression bei IL-10, gefolgt von TNF- α , IL-6 und IL-1 β . Bei IL-1 β , IL-6 und IL-10 kommt es im zeitlichen Verlauf zu einem Anstieg der Expression. Allein die mRNA-Expression von TNF- α ist nach 14 Tagen geringer. (Abbildung 39)

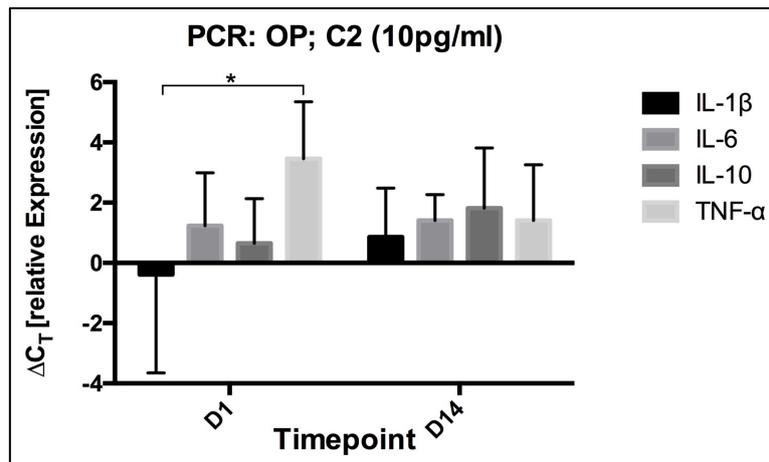


Abbildung 39: Datenauswertung der Osteopontin (OP) PCR Tests in der einzelnen Konzentration: C2 (10pg/ml), zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Es zeigt sich bei IL-1 β , IL-6 und IL-10 ein mRNA Anstieg im zeitlichen Verlauf. An D1 (nach 24h) zeigt TNF- α eine signifikant (* $p < 0.05$) höhere mRNA Expression als IL-1 β . Bei TNF- α kommt es im Verlauf zu einem Abfall der mRNA-Expression.

Vergleicht man alle Zytokine in der hohen Konzentration C4 (500pg/ml) miteinander, so zeigt sich nach 24 Stunden die höchste mRNA Expression bei IL-10, gefolgt von IL-6, TNF- α und IL-1 β .

14 Tage nach der Stimulation liegt die höchste mRNA-Expression weiterhin bei IL-10, gefolgt von IL-6, TNF- α und IL-1 β . Die Differenzen zwischen den Zytokinen sind nun jedoch um einiges geringer. (Abbildung 40)

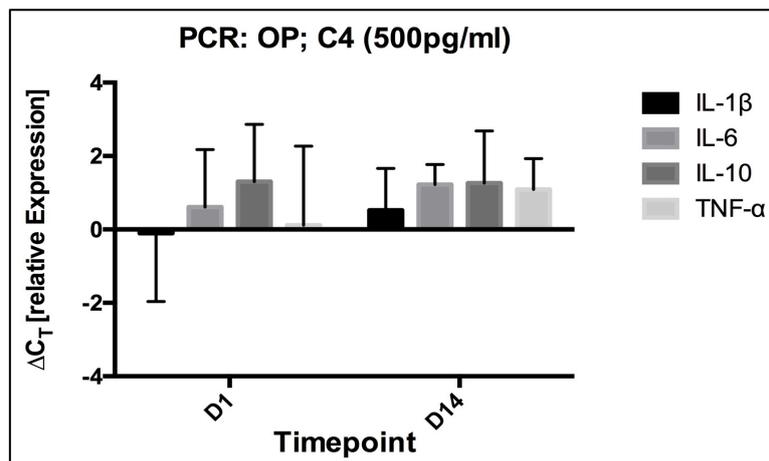


Abbildung 40: Datenauswertung der Osteopontin (OP) PCR Tests in der einzelnen Konzentration: C4 (500pg/ml), zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Es zeigt sich bei IL-1 β , IL-6 und TNF- α ein mRNA Anstieg im zeitlichen Verlauf. Bei IL-10 kommt es im Verlauf zu einem minimalen Abfall der mRNA-Expression.

Vergleicht man alle Zytokine in allen Konzentration 24 Stunden nach Stimulation miteinander, so zeigt sich, dass es bei den niedrig konzentrierten Zytokinen IL-6 und

TNF- α zu einer vermehren mRNA Expression kommt. IL-10 und IL-1 β führen in niedriger Konzentration zu einer Expressionsabnahme. Der starke Expressionsanstieg von TNF- α ist signifikant ($p < 0,05$) höher im Vergleich zum Expressionsabfall bei IL-1 β .

Hochkonzentriert zeigt sich ein komplett inverses Bild. IL-6 und TNF- α führen zu einer Abnahme, IL-10 und IL-1 β zu einer Zunahme der Expression. Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 41)

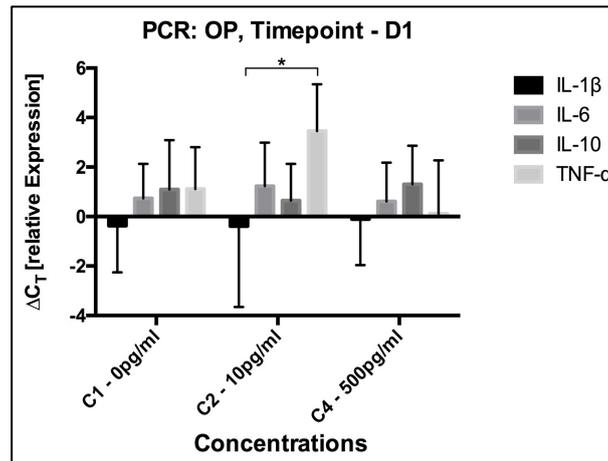


Abbildung 41: Datenauswertung der Osteopontin (OP) PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4 (500pg/ml), zu dem Messzeitpunkt (Timepoint): D1 (nach 24h). IL-6 und TNF- α führen in der Konzentration C2 zu einem Anstieg der mRNA Expression, IL-10 und IL-1 β zu einem Abfall. Der Anstieg von TNF- α ist signifikant (* $p < 0.05$) höher als der Abfall von IL-1 β . Hochkonzentriert zeigt sich ein inverses Bild. IL-10 und IL-1 β führen zu einem Anstieg der mRNA Expression, IL-6 und TNF- α zu einem Abfall.

Führt man denselben Vergleich nach 14 Tagen durch, so zeigt sich, dass IL-10 und IL-1 β niedrig konzentriert zu einer vermehrten mRNA-Expression und IL-6 und TNF- α in niedriger Konzentration zu einem Expressionsverlust führen.

Hochkonzentriert kommt es nur bei IL-1 β zu einem geringen Expressionsanstieg. IL-6, IL-10 und TNF- α führen hochkonzentriert zu einer verminderten mRNA-Expression. (Abbildung 42)

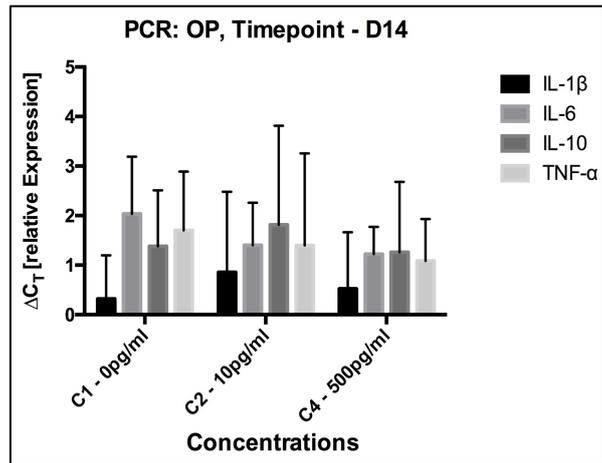


Abbildung 42: Datenauswertung der Osteopontin (OP) PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4 (500pg/ml), zu dem Messzeitpunkt (Timepoint): D14 (nach 14 Tagen). IL-1 β und IL-10 führen in der Konzentration C2 zu einem Anstieg der mRNA Expression, IL-6 und TNF- α zu einem Abfall. In der Konzentration C4 kommt es nur bei IL-1 β zu einem Anstieg der mRNA.

4.4.4. RunX2

4.4.4.1 RunX2 – IL-1 β

IL-1 β führt 24 Stunden nach Stimulation in niedriger Konzentration, C2 (10pg/ml) zu einem dezenten Anstieg der mRNA-Expression für RunX2. In hoher Konzentration, C4 (500pg/ml), kommt es zu einem Expressionsabfall.

Im zeitlichen Verlauf verursacht IL-1 β nach 14 Tagen in beiden Konzentrationen einen leichten Anstieg der Expression. Hoch konzentriert ist der Anstieg minimal höher.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 43)

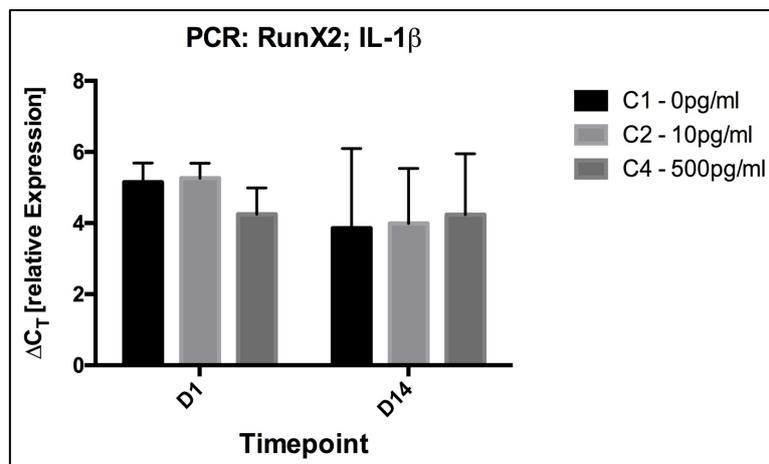


Abbildung 43: Datenauswertung des IL-1 β RunX2 PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4(500pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Die Konzentration C2 führt an beiden Messzeitpunkten zu einer gesteigerten mRNA Expression. Die Konzentrationen C4 führt an D1 zu einer verminderten und an D14 zu einer gesteigerten mRNA Expression.

4.4.4.2 RunX2 – IL-6

IL-6 führt 24 Stunden nach der Stimulation in hoher und niedriger Konzentration zu einem dezenten Abfall der mRNA-Expression. Dieser ist bei der niedrig konzentrierten Probe stärker.

Im zeitlichen Verlauf verursacht IL-6 ebenfalls in beiden Konzentrationen einen Expressionsabfall. Hier ist er jedoch bei der hoch konzentrierten Probe ausgeprägter.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 44)

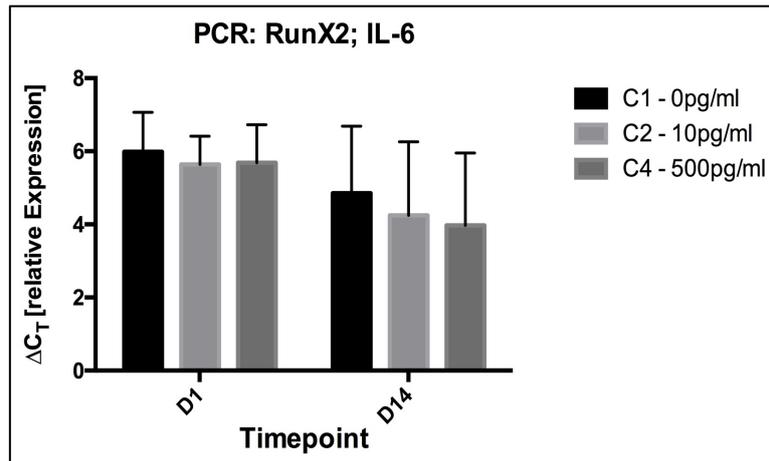


Abbildung 44: Datenauswertung des IL-6 RunX2 PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4(500pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Die Konzentrationen C2 und C4 führen an beiden Messzeitpunkten zu einer verminderten mRNA Expression. An D14 ist diese bei C4 stärker als bei C2.

4.4.4.3 RunX2 – IL-10

IL-10 führt 24 Stunden nach der Stimulation niedrig konzentriert zu einer dezent verminderten mRNA-Expression. Hoch konzentriert führt es hingegen zu einem leichten Expressionsanstieg.

Im zeitlichen Verlauf zeigt verursacht IL-10 nach 14 Tagen in beiden Konzentrationen einem mRNA-Expressionsabfall. Dieser ist bei der niedrig konzentrierten Probe ausgeprägter.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 45)

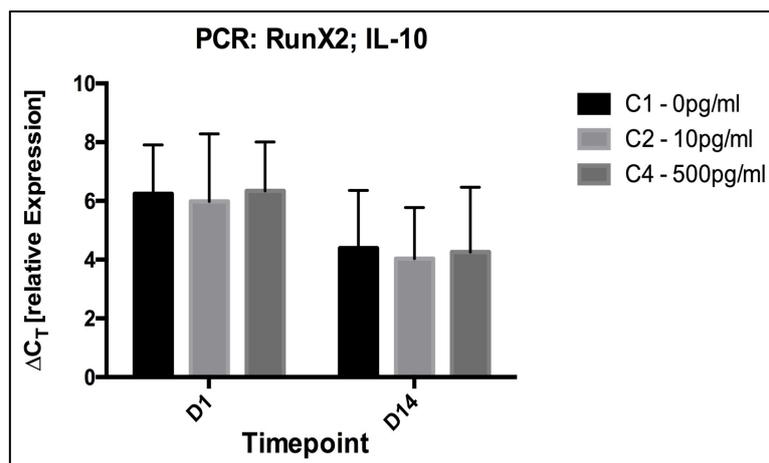


Abbildung 45: Datenauswertung des IL-10 RunX2 PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4(500pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Die Konzentration C2 führt an beiden Messzeitpunkten zu einer verminderten mRNA Expression. Die Konzentrationen C4 führt an D1 zu einer minimal gesteigerten und an D14 zu einer minimal verminderten mRNA Expression.

4.4.4.4 RunX2 – TNF- α

TNF- α führt 24 Stunden nach der Stimulation niedrig konzentriert zu einem Anstieg der mRNA-Expression. Hoch konzentriert kommt es zu einem dezenten Expressionsabfall.

Im zeitlichen Verlauf verursacht TNF- α nach 14 Tagen in beiden Konzentrationen eine Expressionsabnahme. Diese ist bei der hoch konzentrierten Probe ausgeprägter.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 46)

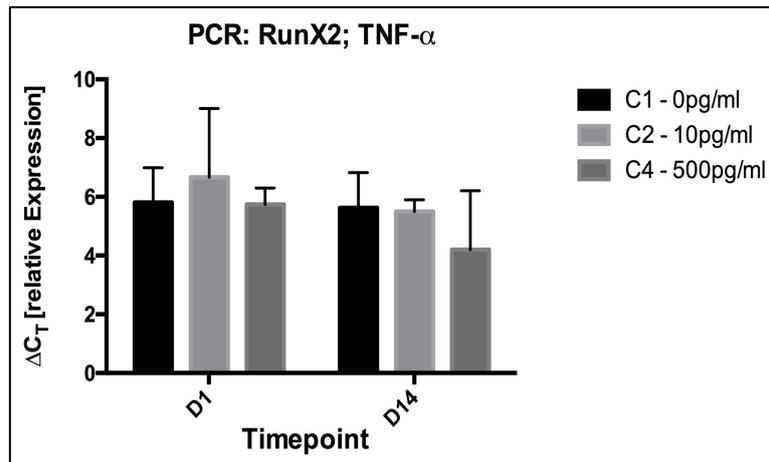


Abbildung 46: Datenauswertung des TNF- α RunX2 PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4(500pg/ml), sowie zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Die Konzentration C2 führt an D1 zu einer gesteigerten und an D14 zu einer minimal verminderten mRNA Expression. Die Konzentration C4 führt an beiden Messzeitpunkten zu einer verminderten mRNA Expression.

4.4.4.5 RunX2 – Intrazytokinärer Vergleich:

Vergleicht man alle Zytokine in niedriger Konzentration, C2 (10pg/ml), miteinander, so zeigt sich nach 24 Stunden die höchste Expression bei TNF- α , gefolgt von IL-10, IL-6 und IL-1 β .

14 Tage nach der Stimulation liegt die höchste Expression weiterhin bei TNF- α , gefolgt von IL-6, IL-1 β und IL-10.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 47)

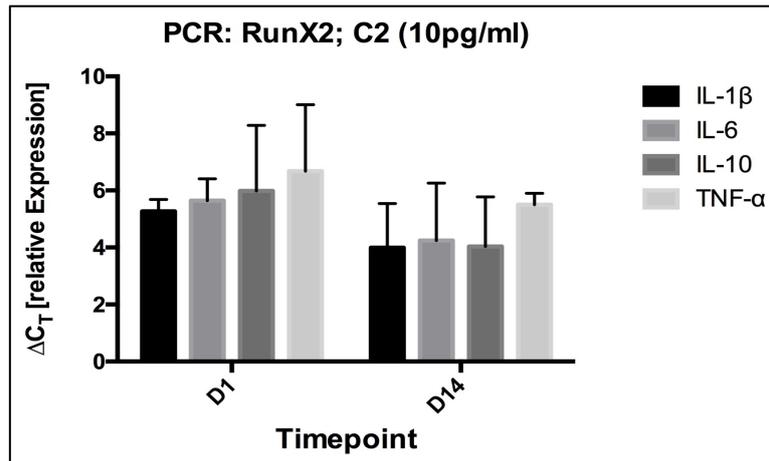


Abbildung 47: Datenauswertung der RunX2 PCR Tests in der einzelnen Konzentration: C2 (10pg/ml), zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Bei allen Zytokinen kommt es im zeitlichen Verlauf zu einer verminderten mRNA Expression.

Vergleicht man alle Zytokine in hoher Konzentration, C4 (500pg/ml), miteinander, so zeigt sich nach 24 Stunden die höchste mRNA-Expression bei IL-10, gefolgt von TNF- α , IL-6 und IL-1 β .

14 Tage nach der Stimulation liegt die höchste Expression weiterhin bei IL-10, gefolgt von IL-1 β , TNF- α und IL-6.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 48)

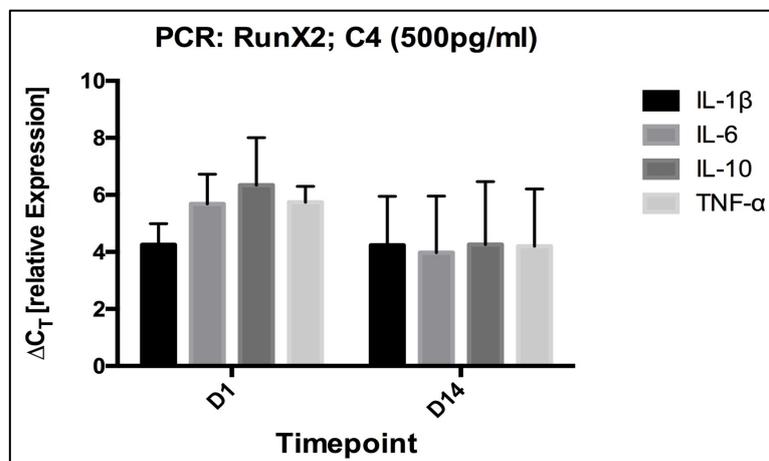


Abbildung 48: Datenauswertung der RunX2 PCR Tests in der einzelnen Konzentration: C4 (500pg/ml), zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Timepoints): D1 (nach 24h), D14 (nach 14 Tagen). Bei allen Zytokinen kommt es im zeitlichen Verlauf zu einer verminderten mRNA Expression.

Vergleicht man alle Zytokine in allen Konzentrationen 24 Stunden nach der Stimulation miteinander, so zeigt sich, dass es bei den niedrig konzentrierten Zytokinen IL-1 β und TNF- α zu einer vermehrten mRNA-Expression kommt. IL-6 und IL-10 führen in niedriger Konzentration zu einer Expressionsabnahme.

Hochkonzentriert kommt es nur durch das Zytokin IL-10 zu einem Anstieg der mRNA-Expression. Die Zytokine IL-1 β , IL-6 und IL-10 führen zu einem Expressionsabfall.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 49)

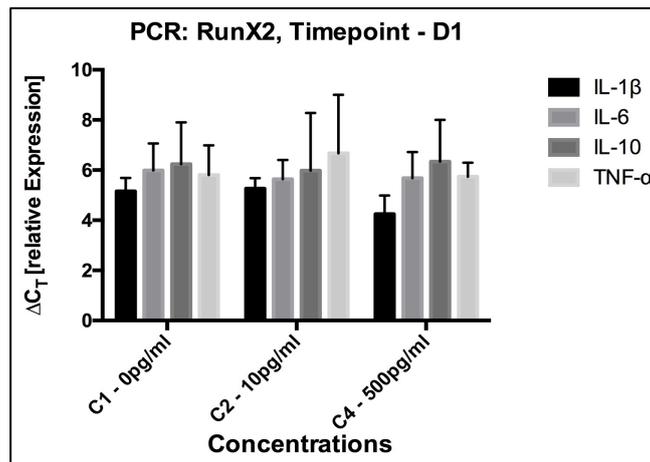


Abbildung 49: Datenauswertung der RunX2 PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4 (500pg/ml), zu dem Messzeitpunkt (Timepoint): D1 (nach 24h). In der Konzentration C2 führen IL-1 β und TNF- α zu einer Steigerung, IL-6 und IL-10 zu einer Verminderung der mRNA Expression. In der Konzentration C4 kommt es nur bei IL-10 zu einer gesteigerten mRNA Expression.

Führt man denselben Vergleich nach 14 Tagen durch, so zeigt sich, dass in niedriger Konzentration nur bei dem Zytokin IL-1 β zu einem mRNA-Expressionsanstieg kommt.

IL-6, IL-10 und TNF- α führen niedrig konzentriert zu einem Expressionsverlust.

Hochkonzentriert zeigt sich dasselbe Bild. Nur das Zytokin IL-1 β führt zu einem Expressionsanstieg.

Es liegen keine signifikanten Unterschiede vor. (Abbildung 50)

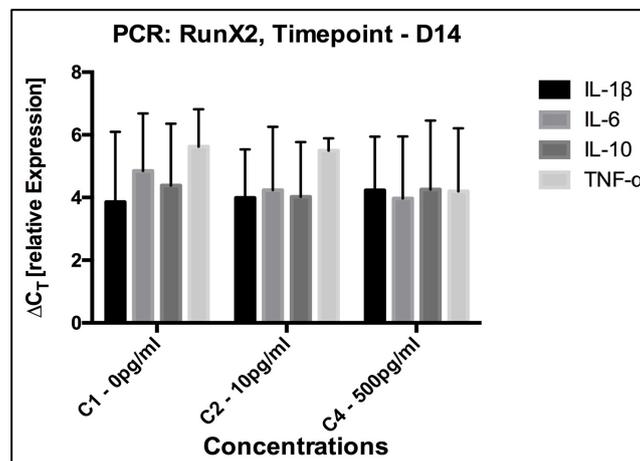


Abbildung 50: Datenauswertung der RunX2 PCR Tests in den einzelnen Konzentrationen: C1 (0pg/ml), C2(10pg/ml), C4 (500pg/ml), zu dem Messzeitpunkt (Timepoint): D1 (nach 24h). In beiden Konzentrationen C2 und C4 kommt es nur bei IL-1 β zu einem Anstieg der mRNA Expression. IL-6, IL-10 und TNF- α führen zu einer Verminderten mRNA Expression.

5. Diskussion

Mit der hier vorliegenden Studie über die Auswirkung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen auf primäre Osteoblasten, erfolgte erstmalig die Untersuchung des Einflusses von Zytokinen in Konzentrationen, wie sie bei polytraumatisierten Patienten vorliegen, auf Osteoblasten. Es ist aus bereits vorliegenden Studien bekannt, dass es bei schwerverletzten Patienten zu einer verlängerten Heilungsdauer bei Frakturen kommt. (L. E. Claes et al., 2012; Hayda et al., 1998; Karladani et al., 2001; Kolar et al., 2011) Aktuell nimmt man an, dass eine komplexe Immunantwort hierfür verantwortlich ist. Diese kennzeichnet sich durch eine verstärkte Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen, einer Chemokin Ausschüttung, die Komplementaktivierung und die Überaktivierung von PMNs. (Keel & Trentz, 2005) In dieser Studie wurde der Einfluss der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α , sowie des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 in fünf unterschiedlichen Konzentrationen auf primäre Osteoblasten untersucht. Die dadurch gewonnenen Daten zeigen, dass sowohl pro- und antiinflammatorische Zytokine in hoher Konzentration, zytotoxisch für Osteoblasten sind und einen negativen Einfluss auf deren Reifungsprozess haben.

Bei der Arbeit wurde darauf geachtet auf bereits etablierte und anerkannte Testverfahren (MTT, ALP, LDH, PCR) zurückzugreifen. Dadurch ist es gewährleistet die Ergebnisse mit internationalen Daten zu vergleichen. Um ein statistisch aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten wurden immer 4 Proben untersucht.

Es ist bereits beschrieben worden, dass es bei polytraumatisierten Patienten zu einer verlängerten Knochenheilungsdauer kommt. (Bhandari et al., 2003; Karladani et al., 2001) Ein Grund für diese verlangsamte Knochenheilung ist die überflutende posttraumatische Entzündungsreaktion, welche durch endogene Alarmsignale getriggert wird. (Bastian et al., 2011; L. E. Claes et al., 2012)

Gegenwärtige Literatur zeigt bereits deutlich den wichtigen Einfluss von Zytokinen auf die Knochenheilung. (L. E. Claes et al., 2012; L. C. Gerstenfeld et al., 2003; Phillips, 2005; Yang et al., 2007) Die meisten Arbeiten untersuchten jedoch den Einfluss von Zytokinen auf Osteoklasten und Osteozyten. (L. C. Gerstenfeld et al., 2003) Mit dieser

Arbeit gelingt nun ein Einblick über den Einfluss von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen auf Osteoblasten.

Die Ergebnisse dieser Arbeit widerlegen den schon bekannten Wissensstand, dass Zytokine einen beträchtlichen Einfluss auf die Osteoblastogenese haben.

Die vorliegende Studie zeigt, dass die pro- und antiinflammatorische Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10 und TNF- α in hohen Konzentrationen, wie sie bei polytraumatisierten Patienten vorliegen, zytotoxisch für Osteoblasten sind und sich negativ auf deren Reifungsprozess auswirken. Dies bestärkt die Arbeiten von Bastian et al. und Pape et al.. (Bastian et al., 2011; Pape et al., 2010)

Die Ergebnisse des MTT-Tests zeigen sehr eindrucksvoll die zytotoxische Wirkung und die Abnahme der Zellviabilität bei hohen Zytokinkonzentrationen. Es ist jedoch bemerkenswert, dass sowohl die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α , sowie das antiinflammatorische Zytokin IL-10 niedrig konzentriert, in den Konzentrationen C2 (10pg/ml) und C3 (100pg/ml), einen positiv stimulierenden Einfluss auf Osteoblasten haben. Kon et al. nahm bereits an, dass TNF- α und IL-1 β eine wichtige Rolle in niedriger Konzentration beim bone remodelling haben. (Kon et al., 2001) Weitere Studien mit TNF- α und IL-6 Knockout-Mäusen zeigten auch, dass es durch die komplette Eliminierung von Zytokinen zu einer deutlichen Verlangsamung der Knochenheilung kommt. (Claes et al. 1992; Philipps 2005; Gerstenfeld et al 2003) Dies verdeutlicht auch die Wichtigkeit der Zytokine in Bezug auf die osteogene Differenzierung von Zellen.

IL-6 ist ein sehr gut erforschtes Zytokin, das einen großen Einfluss auf die Knochenmasse hat. Besonders die hier untersuchte signifikant höhere Zellviabilität von Osteoblasten in niedrigen Konzentrationen (C2 (10pg/ml), C3 (100pg/ml)) zeigt den deutlich positiven Einfluss von IL-6 auf die osteoblastäre Differenzierung. Yang et al. zeigte bereits, dass IL-6^{-/-} Knockout Mäuse eine erniedrigte Osteoblastenzahl und eine verzögerte Knochenheilung haben. (Yang et al., 2007) De Benedetti zeigte wiederum, dass es durch eine chronische Überexpression von IL-6 zu einer Verstärkung der Knochenresorption kommt. (De Benedetti et al., 2006) Die Ergebnisse bisheriger in vivo Experimente liefern noch keine absolute Klarheit darüber, ob IL-6 anabolisch oder katabolisch auf die Osteogenese wirkt. Die hier gezeigten Ergebnisse

geben jedoch Grund zur Annahme, dass es niedrig konzentriert eine anabolische Wirkung auf Osteoblasten hat. Bestärkt wird dies auch durch die Arbeit von Kaiser et al.. (Kaiser et al., 2018) Hier wird gezeigt, dass es durch die pharmakologische Inhibierung von IL-6 zu einer verbesserten Knochenheilung nach schweren Traumata kommt. (Kaiser et al., 2018)

Das antiinflammatorische Zytokin IL-10 wird als wichtiger Regulator der Homöostase und von entzündlichen Reaktionen gesehen. (Al-Rasheed et al., 2004; Carmody et al., 2002; Lee et al., 2009) Vor allem besitzt es die Fähigkeit die Synthese von proinflammatorischen Zytokinen zu mindern. Ebenso gilt es als potenter Inhibitor der Osteoklasten. (Owens et al., 1996) Die hier erzielten Ergebnisse zeigen, dass IL-10 alleine betrachtet in niedriger Konzentration einen durchaus positiven Einfluss auf Osteoblasten hat. In Zusammenschau mit der Arbeit von Dresner-Pollak et al., die zeigt, dass es bei IL-10^{-/-} Knockoutmäusen zu einer deutlichen Verlangsamung der Knochenheilung kommt, wird die positive Wirkung noch einmal bestärkt. (Dresner-Pollak et al., 2004) Es gibt jedoch, noch keine Daten darüber, wie sich die positive Wirkung von IL-10 im Zusammenspiel mit den proinflammatorischen Zytokinen auswirkt. Womöglich führt die interzytokine Wechselwirkung zu ganz anderen Ergebnissen.

Der Einfluss von TNF- α auf Osteoklasten ist bereits ausgiebig und gut untersucht. TNF- α gilt als wichtiger Mediator der Osteoklastogenese. (Bertolini et al., 1986; Kimble et al., 1997) Die Arbeit von Gerstenfeld et al. zeigt, dass es durch eine Eliminierung von TNF- α zu einer verzögerten Knochenheilung kommt. (L. C. Gerstenfeld et al., 2003) Der Einfluss auf Osteoblasten ist hingegen noch nicht so ausführlich erforscht. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass es zwar zu keiner Steigerung der Osteoblastenviabilität kommt, jedoch zu einer Verstärkung der osteogenen Differenzierung der Osteoblasten. Dem gegenüber zeigt die Studie von Zhou et al. das TNF- α zu einer Aktivierung von p38 führt und dadurch die Differenzierung von Knochenzellen inhibiert. (Zhou et al., 2006) Inwiefern die verstärkte osteogene Differenzierung sich auf die Knochenheilung auswirkt bedarf noch genaueren Untersuchungen.

Lin et al. beschreibt 2010 erstmalig den positiven Einfluss von kurzzeitiger Exposition von IL-1 β auf Osteoblasten. (Lin et al., 2010) Weiters wird auch der negative Einfluss der langzeitigen Exposition gezeigt. Hier erfolgte die Untersuchung von IL-1 β in einer Konzentration von 1 ng/ml. Olmedo et al. zeigte außerdem, dass es durch die Behandlung mit exogenem IL-1 β zu einer Steigerung der Osteoblastenzahl kommt. (Olmedo et al., 1999) Dies bekräftigt auch die hier vorliegenden Ergebnisse. IL-1 β führt in niedrigen Konzentrationen zum stärksten Anstieg der Zellviabilität im Vergleich mit den anderen untersuchten Zytokinen. Vor allem führt das proinflammatorische Zytokin darüber hinaus noch zum stärksten ALP-Anstieg, somit zur stärksten osteogenen Differenzierung. Diese Erkenntnisse sollten in Zukunft noch weiter untersucht werden und lassen eine vielversprechende Wirkung von IL-1 β auf die Osteogenese erwarten.

Eine Schwäche der Untersuchung liegt in der kurzen Zytokin-Stimulationsdauer der Osteoblasten. Es sollten weitere Untersuchungen erfolgen mit Langzeitstimulationen. Weiters muss bei den Ergebnissen berücksichtigt werden, dass jedes Zytokin nur einzeln untersucht wurde. Es bestehen jedoch zahlreiche interzytokinäre Wechselwirkungen, welche nicht außer Acht gelassen werden dürfen. Ebenso darf man nicht vergessen, dass der Einfluss der Zytokine sich nicht nur auf Osteoblasten beschränkt. Es sollte in zukünftigen Studien der Einfluss der Zytokine auf alle Knochenzellen untersucht werden. Hierdurch könnte auch herausgefunden werden auf welche Knochenzelle die größte Wirkung besteht und in wie weit diese Knochenzelle die anderen beeinflusst.

Die vorliegende Arbeit bietet neue Erkenntnisse und tieferen Einblick in die Wirkung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen auf Osteoblasten. Die Ergebnisse widerlegen die zytotoxische Wirkung von hohen Zytokinkonzentrationen auf Osteoblasten und zeigen gleichzeitig die durchaus fördernde und positive Wirkung der Zytokine in niedrigen Konzentrationen.

6. Ausblick

Zusammenfassend zeigt die vorliegende Studie das pro- und antiinflammatorische Zytokine in relevanten Konzentrationen, wie sie bei polytraumatisierten Patienten vorhanden sind, zytotoxisch für Osteoblasten sind und sich negativ auf ihren osteogenen Reifungsprozess auswirken. Sie führen zu einer verminderten Zellviabilität von Osteoblasten und einem verminderten osteogenen Differenzierungspotential.

Geringe Zytokinkonzentrationen, vor allem von IL-1 β und TNF- α , führen zu einer deutlich gesteigerten osteogenen Aktivität von Osteoblasten. In geringer Konzentration führen die Zytokine zu einer vermehrten Zellviabilität, einer vermehrten osteogenen Differenzierung und auch zu einer gesteigerten Proteinsynthese auf genetischer Ebene.

Es ist davon auszugehen, dass die hohe Fehlheilungsrate bei Frakturen von Schwerverletzten auf den negativen Einfluss von hohen Zytokinkonzentrationen auf die Osteogenese zurückzuführen ist. Aus diesem Grund sollten weitere Studien folgen bei der eine lokale Modifizierung von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinkonzentrationen erfolgt. Das besondere Augenmerk sollte hier auf den Einfluss von niedrigen Zytokinkonzentrationen auf die Osteogenese und vor allem auf die Frakturheilung gelegt werden. Besonders von dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β lässt sich hier eine vielversprechende Wirkung erwarten.

7. Zusammenfassung

Eine der häufigsten Komplikationen bei polytraumatisierten Patienten stellt weiterhin die verlangsamte und insuffiziente Knochenbruchheilung dar. Ein Polytrauma führt zu einer massiven Immunreaktion mit der Ausschüttung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen. Arbeiten konnten bereits zeigen, dass dies einen starken Einfluss auf die Osteogenese und die osteogene Differenzierung hat. Ziel der vorliegenden Studie ist es den Einfluss von proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokinen, in Konzentrationen wie sie bei polytraumatisierten Patienten vorliegen, auf Präosteoblasten zu untersuchen. Hierdurch sollen neue Erkenntnisse über die Knochenheilung bei schwerverletzten Patienten gewonnen werden

Es erfolgte die Stimulation von, aus Knochenpräparaten gewonnenen, humanen Osteoblasten mit den pro- und antiinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , IL-6, IL-10 und TNF- α in 5 Unterschiedlichen Konzentrationen ((C1=0pg/ml, C2=10pg/ml, C3=100pg/ml, C4=500pg/ml, C5=1000pg/ml). Anschließend wurde ein MTT, ALP und LDH – Test durchgeführt sowie eine PCR für die für die Osteogenese essentiellen Proteine Osteokalzin, Osteopontin, RunX2 und Kollagen (Col1 α 1).

Die vorliegende Studie zeigt, dass die pro- und antiinflammatorische Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-10 und TNF- α in hohen Konzentrationen, wie sie bei polytraumatisierten Patienten vorliegen, zytotoxisch für Osteoblasten sind und sich negativ auf deren Reifungsprozess auswirken.

Die Ergebnisse des MTT-Tests zeigen sehr eindrucksvoll die zytotoxische Wirkung und die Abnahme der Zellviabilität bei hohen Zytokinkonzentrationen.

Es ist jedoch bemerkenswert, dass sowohl die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α , sowie das antiinflammatorische Zytokin IL-10 niedrig konzentriert, in den Konzentrationen 10pg/ml und 100pg/ml, einen positiv stimulierenden Einfluss auf Osteoblasten haben. Es kommt bei allen untersuchten Zytokinen in niedrigen Konzentrationen zu einem Anstieg der Zellviabilität, wie man Anhand der MTT-Test Ergebnisse sieht.

Besonderes Augenmerk sollte hier auf das proinflammatorische Zytokin IL-1 β gelegt werden. IL-1 β führt in niedrig konzentriert zum größten Anstieg der Zellviabilität. Betrachtet man nun auch die ALP-Test Ergebnisse, so zeigt sich auch hier die höchste ALP-Aktivität unter den niedrig konzentrierten Zytokinen bei IL-1 β . Daraus lässt sich schließen, dass IL-1 β niedrig konzentriert sowohl einen positiv stimulierenden Einfluss auf die Osteblastenviabilität als auch auf deren osteogene Reifung hat.

Der ALP-Test verdeutlicht die zytotoxische Wirkung der hochkonzentrierten Zytokine. Besonders das proinflammatorische Zytokin TNF- α und das antiinflammatorische Zytokin IL-10 führen zu einer Inhibierung der osteogenen Differenzierung von Osteoblasten. Somit führen hohe Zytokinkonzentrationen, die wie bei Schwerverletzten vorhanden sind, nicht nur zu einer verminderten Zellviabilität, sondern auch noch zu einem Verlust des osteogenen Differenzierungspotential.

Die ALP-Testergebnisse von niedrig konzentrierten Zytokinen widerlegen wiederum den positiv stimulierenden Einfluss, der bereits bei durch den MTT-Test ersichtlich ist. Sowohl die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α , als auch das antiinflammatorische Zytokin IL-10 führen in niedriger Konzentration zu einem Anstieg der ALP-Aktivität, sprich einer vermehrten osteogenen Differenzierung.

In Zusammenschau der ALP und MTT-Test Ergebnisse, lässt sich die Behauptung aufstellen, dass sowohl proinflammatorische und antiinflammatorische Zytokine in niedrigen Konzentrationen einen durchaus positiven, stimulierenden Einfluss auf Osteoblasten und ihren osteogenen Reifungsprozess haben. Hohe Zytokinkonzentrationen, wie bei schwerverletzten Patienten führen jedoch zu einem nicht unbeachtlichen Abfall der Zellviabilität und Inhibierung der osteogenen Differenzierung von Osteoblasten.

Die Ergebnisse der PCR zeigen, dass hohe Zytokinkonzentrationen wie sie bei polytraumatisierten Patienten zu finden sind, auf transkriptioneller Ebenen zu einer weitgehend verminderten Expression der für die Osteogenese essenzieller Proteine Osteopontin, Osteokalzin, Kollagen und RunX2 führen.

Es kommt nur bei zwei Zytokinen in hoher Konzentration nach 14 Tagen zu einer vermehrten mRNA Expression. Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β führt in hoher Konzentration, 400pg/ml, zu einer Steigerung der mRNA bei Osteopontin, Kollagen

und RunX2. Ebenso führt das antiinflammatorische Zytokin IL-10 in hoher Konzentration nach 14 Tagen zu einer Steigerung der mRNA Expression bei Kollagen. Die Zytokine IL-6 und TNF- α bewirken in hoher Konzentration bei allen getesteten Proteinen nach 14 Tagen eine verminderte mRNA Expression.

Es jedoch beachtenswert, dass das antiinflammatorische Zytokin IL-10 in den ersten 24 Stunden hoch konzentriert zu einem Anstieg der mRNA Expression führt. Auch das proinflammatorische Zytokin IL-1 β bewirkt hoch konzentriert in den ersten 24 Stunden eine vermehrte mRNA Expression für Osteopontin und Osteokalzin. TNF- α führt in hoher Konzentrationen nach 24 Stunden zu einem Expressionsanstieg bei Osteokalzin und Osteopontin. IL-6 bewirkt hochkonzentriert einzig bei Osteokalzin einen Anstieg der mRNA-Expression in den ersten 24 Stunden.

Senkt man die Zytokinkonzentrationen, so zeigen die PCR-Ergebnisse, dass die proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α sowie das antiinflammatorische Zytokin IL-10 nach 14 Tagen zu einer vermehrten Expression der mRNA einzelner Proteine führt.

Niedrig konzentriertes IL-1 β führt nach 14 Tagen zu einer gesteigerten mRNA-Expression von Osteopontin und RunX2, TNF- α die von Osteokalzin. IL-10 bewirkt in niedriger Konzentration nach 14 Tagen die mRNA-Expression von Osteopontin und Kollagen. Das proinflammatorische IL-6 führt im zeitlichen Verlauf zu keiner Steigerung der mRNA bei den untersuchten Proteinen.

Niedrige Zytokinkonzentrationen führen auch zu frühzeitigen Veränderungen auf genetischer Ebene. Das proinflammatorische Zytokin IL-1 β führt in niedriger Konzentration nach 24 Stunden zu einer Steigerung der mRNA-Expression von Osteokalzin, Kollagen und RunX2. TNF- α bewirkt sogar frühzeitig eine Expressionssteigerung der mRNA bei allen getesteten Proteinen, Kollagen, Osteokalzin, Osteopontin und RunX2. IL-10 führt in den ersten 24 Stunden niedrig konzentriert zu einer Steigerung der mRNA Expression von Osteokalzin. Das antiinflammatorische Zytokin IL-6 steigert in den ersten 24 Stunden die mRNA Expression von Osteokalzin und Osteopontin.

Anhand der PCR-Ergebnisse kann man von einer vielversprechenden positiven Wirkung der niedrig konzentrierten Zytokinen auf die, für die Osteogenese

essenziellen, Proteine ausgehen. Besonderes Augenmerk sollte man hier auf das proinflammatorische Zytokin IL-1 β legen.

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	PCR-Master-Mix Zusammensetzung
Tabelle 2:	PCR-Primer-Sequenzen

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Bestandteile der Knochengrundsubstanz
Abbildung 2:	Differenzierung der mesenchymalen Stammzelle
Abbildung 3:	Schematische Darstellung der Entwicklung der Osteoblastenlinie
Abbildung 4:	Datenauswertung LDH Test - IL-1 β
Abbildung 5:	Datenauswertung LDH Test - IL-6
Abbildung 6:	Datenauswertung LDH Test - IL-10
Abbildung 7:	Datenauswertung LDH Test - TNF- α
Abbildung 8:	Intrazytokinärer Vergleich – LDH Test
Abbildung 9:	Datenauswertung MTT Test - IL-1 β
Abbildung 10:	Datenauswertung MTT Test - IL-6
Abbildung 11:	Datenauswertung MTT Test - IL-10
Abbildung 12:	Datenauswertung MTT Test - TNF- α
Abbildung 13:	Intrazytokinärer Vergleich – MTT Test
Abbildung 14:	Datenauswertung ALP Test - IL-1 β
Abbildung 15:	Datenauswertung ALP Test - IL-6
Abbildung 16:	Datenauswertung ALP Test - IL-10
Abbildung 17:	Datenauswertung ALP Test - TNF- α
Abbildung 18:	Intrazytokinärer Vergleich – ALP Test
Abbildung 19:	Datenauswertung PCR Coll1 α 1 - IL-1 β
Abbildung 20:	Datenauswertung PCR Coll1 α 1 - IL-6
Abbildung 21:	Datenauswertung PCR Coll1 α 1 - IL-10
Abbildung 22:	Datenauswertung PCR Coll1 α 1 - TNF- α
Abbildung 23:	Intrazytokinärer Vergleich PCR Coll1 α 1 – C2
Abbildung 24:	Intrazytokinärer Vergleich PCR Coll1 α 1 – C4
Abbildung 25:	Intrazytokinärer Vergleich PCR Coll1 α 1 – D1
Abbildung 26:	Intrazytokinärer Vergleich PCR Coll1 α 1 – D14
Abbildung 27:	Datenauswertung PCR OC - IL-1 β
Abbildung 28:	Datenauswertung PCR OC - IL-6
Abbildung 29:	Datenauswertung PCR OC - IL-10
Abbildung 30:	Datenauswertung PCR OC - TNF- α
Abbildung 31:	Intrazytokinärer Vergleich PCR OC – C2
Abbildung 32:	Intrazytokinärer Vergleich PCR OC – C4
Abbildung 33:	Intrazytokinärer Vergleich PCR OC – D1
Abbildung 34:	Intrazytokinärer Vergleich PCR OC – D14
Abbildung 35:	Datenauswertung PCR OP - IL-1 β
Abbildung 36:	Datenauswertung PCR OP - IL-6
Abbildung 37:	Datenauswertung PCR OP - IL-10
Abbildung 38:	Datenauswertung PCR OP - TNF- α
Abbildung 39:	Intrazytokinärer Vergleich PCR OP – C2
Abbildung 40:	Intrazytokinärer Vergleich PCR OP – C4
Abbildung 41:	Intrazytokinärer Vergleich PCR OP – D1

-
- Abbildung 42: Intrazytokinärer Vergleich PCR OP – D14
Abbildung 43: Datenauswertung PCR RunX2 - IL-1 β
Abbildung 44: Datenauswertung PCR RunX2 - IL-6
Abbildung 45: Datenauswertung PCR RunX2 - IL-10
Abbildung 46: Datenauswertung PCR RunX2 - TNF- α
Abbildung 47: Intrazytokinärer Vergleich PCR RunX2 – C2
Abbildung 48: Intrazytokinärer Vergleich PCR RunX2 – C4
Abbildung 49: Intrazytokinärer Vergleich PCR RunX2 – D1
Abbildung 50: Intrazytokinärer Vergleich PCR RunX2 – D14

10. Literaturverzeichnis

- Aggarwal, B. (2000). Tumour necrosis factors receptor associated signalling molecules and their role in activation of apoptosis, JNK and NF- κ B. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 59(Suppl 1), i6–i16.
- Aho, A. J. (1966). Electron microscopic and histological observations on fracture repair in young and old rats. *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica*, Suppl 184:1-95.
- Ai-Aql, Z. S., Alagl, A. S., Graves, D. T., Gerstenfeld, L. C., & Einhorn, T. A. (2008). Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. *Journal of Dental Research*, 87(2), 107–118.
- Al-Rasheed, A., Scheerens, H., Srivastava, A. K., Rennick, D. M., & Tatakis, D. N. (2004). Accelerated alveolar bone loss in mice lacking interleukin-10: Late onset. *Journal of Periodontal Research*, 39(3), 194–198.
- Altman, G. H., Horan, R. L., Martin, I., Farhadi, J., Stark, P. R. H., Volloch, V., Richmond, J. C., Vunjak-Novakovic, G., & Kaplan, D. L. (2002). Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 16(2), 270–272.
- Aubin, J. E. (1998). Advances in the osteoblast lineage. *Biochem Cell Biol* 76: 899-910 (Vol. 76).
- Aubin, J. E. (1998). Bone stem cells. *Journal of Cellular Biochemistry. Supplement*, 30–31, 73–82.
- Aubin, J. E., & Triffitt, J. T. (2002). Chapter 4—Mesenchymal Stem Cells and Osteoblast Differentiation. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & G. A. Rodan (Eds.), *Principles of Bone Biology (Second Edition)* (pp. 59–81). Academic Press.

-
- Baker, S. P., O'Neill, B., Haddon, W., & Long, W. B. (1974). The injury severity score: A method for describing patients with multiple injuries and evaluating emergency care. *The Journal of Trauma*, *14*(3), 187–196.
- Bakker, A. D., Kulkarni, R. N., Klein-Nulend, J., & Lems, W. F. (2014). IL-6 alters osteocyte signaling toward osteoblasts but not osteoclasts. *Journal of Dental Research*, *93*(4), 394–399.
- Bassett, C. A., & Herrmann, I. (1961). Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissues in vitro. *Nature*, *190*, 460–461.
- Bastian, O., Pillay, J., Alblas, J., Leenen, L., Koenderman, L., & Blokhuis, T. (2011). Systemic inflammation and fracture healing. *Journal of Leukocyte Biology*, *89*(5), 669–673.
- Bennett, J. H., Joyner, C. J., Triffitt, J. T., & Owen, M. E. (1991). Adipocytic cells cultured from marrow have osteogenic potential. *Journal of Cell Science*, *99* (Pt 1), 131–139.
- Beresford, J. N., Bennett, J. H., Devlin, C., Leboy, P. S., & Owen, M. E. (1992). Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures. *Journal of Cell Science*, *102* (Pt 2), 341–351.
- Bertolini, D. R., Nedwin, G. E., Bringman, T. S., Smith, D. D., & Mundy, G. R. (1986). Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature*, *319*(6053), 516–518.
- Bhandari, M., Tornetta, P., Sprague, S., Najibi, S., Petrisor, B., Griffith, L., & Guyatt, G. H. (2003). Predictors of reoperation following operative management of fractures of the tibial shaft. *Journal of Orthopaedic Trauma*, *17*(5), 353–361.

-
- Bogoch, E., Gschwend, N., Rahn, B., Moran, E., & Perren, S. (1993a). Healing of cancellous bone osteotomy in rabbits--Part I: Regulation of bone volume and the regional acceleratory phenomenon in normal bone. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 11(2), 285–291.
- Bogoch, E., Gschwend, N., Rahn, B., Moran, E., & Perren, S. (1993b). Healing of cancellous bone osteotomy in rabbits--Part II: Local reversal of arthritis-induced osteopenia after osteotomy. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 11(2), 292–298.
- Buckwalter, J. A., Glimcher, M. J., Cooper, R. R., & Recker, R. (1996). Bone biology. II: Formation, form, modeling, remodeling, and regulation of cell function. *Instructional Course Lectures*, 45, 387–399.
- Burger, E. H., Boonekamp, P. M., & Nijweide, P. J. (1986). Osteoblast and osteoclast precursors in primary cultures of calvarial bone cells. *The Anatomical Record*, 214(1), 32–40.
- Candeliere, G. A., Liu, F., & Aubin, J. E. (2001). Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires. *Bone*, 28(4), 351–361.
- Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 9(5), 641–650.
- Caplan, A. I., & Bruder, S. P. (2001). Mesenchymal stem cells: Building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine*, 7(6), 259–264.
- Carmody, E. E., Schwarz, E. M., Puzas, J. E., Rosier, R. N., & O’Keefe, R. J. (2002). Viral interleukin-10 gene inhibition of inflammation, osteoclastogenesis, and bone resorption in response to titanium particles. *Arthritis and Rheumatism*, 46(5), 1298–1308.

-
- Cho, T.-J., Gerstenfeld, L. C., & Einhorn, T. A. (2002). Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 17(3), 513–520.
- Claes, L. E., Augat, P., Suger, G., & Wilke, H. J. (1997). Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 15(4), 577–584.
- Claes, L. E., & Heigele, C. A. (1999). Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing. *Journal of Biomechanics*, 32(3), 255–266.
- Claes, L. E., Grass, R., Schmickal, T., Kisse, B., Eggers, C., Gerngross, H., Mutschler, W., Arand, M., Wintermeyer, T., & Wentzensen, A. (2002). Monitoring and healing analysis of 100 tibial shaft fractures. *Langenbeck's Archives of Surgery*, 387(3–4), 146–152.
- Claes, L. E., Eckert-Hübner, K., & Augat, P. (2002). The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 20(5), 1099–1105.
- Claes, L. E., Maurer-Klein, N., Henke, T., Gerngross, H., Melnyk, M., & Augat, P. (2006). Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 24(6), 1178–1185.
- Claes, L. E., Recknagel, S., & Ignatius, A. (2012). Fracture healing under healthy and inflammatory conditions. *Nature Reviews. Rheumatology*, 8(3), 133–143.

-
- Cottrell, J., & O'Connor, J. P. (2010). Effect of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs on Bone Healing. *Pharmaceuticals*, 3(5), 1668–1693.
- De Benedetti, F., Rucci, N., Del Fattore, A., Peruzzi, B., Paro, R., Longo, M., Vivarelli, M., Muratori, F., Berni, S., Ballanti, P., Ferrari, S., & Teti, A. (2006). Impaired skeletal development in interleukin-6-transgenic mice: A model for the impact of chronic inflammation on the growing skeletal system. *Arthritis and Rheumatism*, 54(11), 3551–3563.
- Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU), & Sektion Intensiv- & Notfallmedizin, Schwerverletztenversorgung (NIS) und AUC - Akademie der Unfallchirurgie GmbH. *TraumaRegister DGU® 2017*.
- Diarra, D., Stolina, M., Polzer, K., Zwerina, J., Ominsky, M. S., Dwyer, D., Korb, A., Smolen, J., Hoffmann, M., Scheinecker, C., van der Heide, D., Landewe, R., Lacey, D., Richards, W. G., & Schett, G. (2007). Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. *Nature Medicine*, 13(2), 156–163.
- Ding, J., Ghali, O., Lencel, P., Broux, O., Chauveau, C., Devedjian, J. C., Hardouin, P., & Magne, D. (2009). TNF-alpha and IL-1beta inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. *Life Sciences*, 84(15–16), 499–504.
- Dresner-Pollak, R., Gelb, N., Rachmilewitz, D., Karmeli, F., & Weinreb, M. (2004). Interleukin 10-deficient mice develop osteopenia, decreased bone formation, and mechanical fragility of long bones. *Gastroenterology*, 127(3), 792–801.
- Ducy, P. (2000). Cbfa1: A molecular switch in osteoblast biology. *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists*, 219(4), 461–471.
- Ducy, P., Zhang, R., Geoffroy, V., Ridall, A. L., & Karsenty, G. (1997). Osf2/Cbfa1: A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell*, 89(5), 747–754.

-
- Duda, G. N., Mandruzzato, F., Heller, M., Kassi, J.-P., Khodadadyan, C., & Haas, N. P. (2002). Mechanical conditions in the internal stabilization of proximal tibial defects. *Clinical Biomechanics (Bristol, Avon)*, 17(1), 64–72.
- Duda, G. N., Sollmann, M., Sporrer, S., Hoffmann, J. E., Kassi, J. P., Khodadadyan, C., & Raschke, M. (2002). Interfragmentary Motion in Tibial Osteotomies Stabilized with Ring Fixators. *Clinical Orthopaedic Related Research*, 396, 163-172.
- Einhorn, T. A. (1998). The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 355 Suppl, 7-21.
- Einhorn, T. A. (2005). The science of fracture healing. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 19(10 Suppl), 4-6.
- Embryonic Development of Bone and Regulation of Intramembranous and Endochondral Bone Formation*. (n.d.). ResearchGate.
- Falconi, D., Oizumi, K., & Aubin, J. E. (2007). Leukemia inhibitory factor influences the fate choice of mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 25(2), 305–312.
- Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., & Frolova, G. P. (1968). Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 6(2), 230–247.
- Gegenbaur, C., (1864). *Jenaische Zeitschrift für Medizin und Naturwissenschaft*. Verlag von Wilhelm Engelmann, 1, 343.

-
- Gerstenfeld, L. C., Cho, T. J., Kon, T., Aizawa, T., Tsay, A., Fitch, J., Barnes, G. L., Graves, D. T., & Einhorn, T. A. (2003). Impaired fracture healing in the absence of TNF-alpha signaling: The role of TNF-alpha in endochondral cartilage resorption. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 18(9), 1584–1592.
- Gerstenfeld, L. C., Cullinane, D. M., Barnes, G. L., Graves, D. T., & Einhorn, T. A. (2003). Fracture healing as a post-natal developmental process: Molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 88(5), 873–884.
- Gilbert, L., He, X., Farmer, P., Rubin, J., Drissi, H., Wijnen, A. J. van, Lian, J. B., Stein, G. S., & Nanes, M. S. (2002). Expression of the Osteoblast Differentiation Factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2 α A) Is Inhibited by Tumor Necrosis Factor- α . *Journal of Biological Chemistry*, 277(4), 2695–2701.
- Glass, G. E., Chan, J. K., Freidin, A., Feldmann, M., Horwood, N. J., & Nanchahal, J. (2011). TNF-alpha promotes fracture repair by augmenting the recruitment and differentiation of muscle-derived stromal cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(4), 1585–1590.
- Göktürk, E., Turgut, A., Bayçu, C., Günal, I., Seber, S., & Gülbas, Z. (1995). Oxygen-free radicals impair fracture healing in rats. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, 66(5), 473–475.
- Griensven, M. van. (2014). Zytokine als Marker bei Polytrauma. *Der Unfallchirurg*, 117(8), 699–702.
- Grøgaard, B., Gerdin, B., & Reikerås, O. (1990). The polymorphonuclear leukocyte: Has it a role in fracture healing? *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 109(5), 268–271.

-
- Grundnes, O., & Reikeraas, O. (2000). Effects of macrophage activation on bone healing. *Journal of Orthopaedic Science: Official Journal of the Japanese Orthopaedic Association*, 5(3), 243–247.
- Hayda, R. A., Brighton, C. T., & Esterhai, J. L. (1998). Pathophysiology of delayed healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 355 Suppl, S31-40.
- Heng, B. C., Cao, T., Stanton, L. W., Robson, P., & Olsen, B. (2004). Strategies for directing the differentiation of stem cells into the osteogenic lineage in vitro. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 19(9), 1379–1394.
- Histing, T., Holstein, J. H., Garcia, P., Matthys, R., Kristen, A., Claes, L. E., Menger, M. D., & Pohlemann, T. (2009). Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 27(9), 1152–1156.
- Houri-Haddad, Y., Soskolne, W. A., Halabi, A., & Shapira, L. (2007). IL-10 gene transfer attenuates *P. gingivalis*-induced inflammation. *Journal of Dental Research*, 86(6), 560–564.
- Hughes, F. J., & Howells, G. L. (1993). Interleukin-6 inhibits bone formation in vitro. *Bone and Mineral*, 21(1), 21–28.
- Kaiser, K., Prystaz, K., Vikman, A., Haffner-Luntzer, M., Bergdolt, S., Strauss, G., Waetzig, G. H., Rose-John, S., & Ignatius, A. (2018). Pharmacological inhibition of IL-6 trans-signaling improves compromised fracture healing after severe trauma. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 391(5), 523–536.
- Karaplis, C. A. (2002). Embryonic Development of Bone and Regulation of Intramembranous and Endochondral Bone Formation. In *Principles of Bone Biology*, 1:33-58.

-
- Karladani, A. H., Granhed, H., Kärrholm, J., & Styf, J. (2001). The influence of fracture etiology and type on fracture healing: A review of 104 consecutive tibial shaft fractures. *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, 121(6), 325–328.
- Kayal, R. A., Tsatsas, D., Bauer, M. A., Allen, B., Al-Sebaei, M. O., Kakar, S., Leone, C. W., Morgan, E. F., Gerstenfeld, L. C., Einhorn, T. A., & Graves, D. T. (2007). Diminished bone formation during diabetic fracture healing is related to the premature resorption of cartilage associated with increased osteoclast activity. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 22(4), 560–568.
- Keel, M., & Trentz, O. (2005). Pathophysiology of polytrauma. *Injury*, 36(6), 691–709.
- Kimble, R. B., Bain, S., & Pacifici, R. (1997). The Functional Block of TNF but Not of IL-6 Prevents Bone Loss in Ovariectomized Mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 12(6), 935–941.
- Kolar, P., Gaber, T., Perka, C., Duda, G. N., & Buttgerit, F. (2011). Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 469(11), 3118–3126.
- Kolar, P., Schmidt-Bleek, K., Schell, H., Gaber, T., Toben, D., Schmidmaier, G., Perka, C., Buttgerit, F., & Duda, G. N. (2010). The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Engineering. Part B, Reviews*, 16(4), 427–434.
- Komori, T., Yagi, H., Nomura, S., Yamaguchi, A., Sasaki, K., Deguchi, K., Shimizu, Y., Bronson, R. T., Gao, Y. H., Inada, M., Sato, M., Okamoto, R., Kitamura, Y., Yoshiki, S., & Kishimoto, T. (1997). Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell*, 89(5), 755–764.

-
- Kon, T., Cho, T. J., Aizawa, T., Yamazaki, M., Nooh, N., Graves, D., Gerstenfeld, L. C., & Einhorn, T. A. (2001). Expression of osteoprotegerin, receptor activator of NF-kappaB ligand (osteoprotegerin ligand) and related proinflammatory cytokines during fracture healing. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 16(6), 1004–1014.
- Krum, S. A., Chang, J., Miranda-Carboni, G., & Wang, C.-Y. (2010). Novel functions for NFkB: Inhibition of bone formation. *Nature Reviews. Rheumatology*, 6(10), 607–611.
- Lee, S. F., Andrian, E., Rowland, E., & Marquez, I. C. (2009). Immune Response and Alveolar Bone Resorption in a Mouse Model of *Treponema denticola* Infection. *Infection and Immunity*, 77(2), 694–698.
- Lin, F.-H., Chang, J. B., McGuire, M. H., Yee, J. A., & Brigman, B. E. (2010). Biphasic effects of interleukin-1 β on osteoblast differentiation in vitro. *Journal of Orthopaedic Research*, 28(7), 958–964.
- Lu, Z., Wang, G., Dunstan, C. R., & Zreiqat, H. (2012). Short-term exposure to tumor necrosis factor-alpha enables human osteoblasts to direct adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into osteogenic differentiation. *Stem Cells and Development*, 21(13), 2420–2429.
- Maniatopoulos, C., Sodek, J., & Melcher, A. H. (1988). Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell and Tissue Research*, 254(2), 317–330.
- Marks Jr., S. C., & Odgren, P. R. (2002). Chapter 1—Structure and Development of the Skeleton. In J. P. Bilezikian, L. G. Raisz, & G. A. Rodan (Eds.), *Principles of Bone Biology (Second Edition)* (pp. 3–15). Academic Press.

-
- Marsell, R., & Einhorn, T. A. (2011). The biology of fracture healing. *Injury*, 42(6), 551–555.
- McKibbin, B. (1978). The biology of fracture healing in long bones. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 60-B(2), 150–162.
- Meisinger, C., Wildner, M., Stieber, J., Heier, M., Sangha, O., & Döring, A. (2002). Epidemiologie der Extremitätenfrakturen. *Der Orthopäde*, 31(1), 92–99.
- Mosser, D. M., & Zhang, X. (2008). Interleukin-10: New perspectives on an old cytokine. *Immunological Reviews*, 226, 205–218.
- Mow, V. C., & Huiskes, R. (2005). *Basic Orthopaedic Biomechanics & Mechanobiology*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Mundlos, S., Otto, F., Mundlos, C., Mulliken, J. B., Aylsworth, A. S., Albright, S., Lindhout, D., Cole, W. G., Henn, W., Knoll, J. H., Owen, M. J., Mertelsmann, R., Zabel, B. U., & Olsen, B. R. (1997). Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell*, 89(5), 773–779.
- Nakashima, K., Zhou, X., Kunkel, G., Zhang, Z., Deng, J. M., Behringer, R. R., & de Crombrughe, B. (2002). The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation. *Cell*, 108(1), 17–29.
- Nanes, M. S. (2003). Tumor necrosis factor-alpha: Molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology. *Gene*, 321, 1–15.
- Olmedo, M. L., Landry, P. S., Sadasivan, K. K., Albright, J. A., Meek, W. D., Routh, R., & Marino, A. A. (1999). Regulation of osteoblast levels during bone healing. *Journal of Orthopaedic Trauma*, 13(5), 356–362.

-
- Otto, F., Thornell, A. P., Crompton, T., Denzel, A., Gilmour, K. C., Rosewell, I. R., Stamp, G. W., Beddington, R. S., Mundlos, S., Olsen, B. R., Selby, P. B., & Owen, M. J. (1997). *Cbfa1*, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell*, *89*(5), 765–771.
- Owens, J. M., Gallagher, A. C., & Chambers, T. J. (1996). IL-10 modulates formation of osteoclasts in murine hemopoietic cultures. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, *157*(2), 936–940.
- Pape, H.-C., Marcucio, R., Humphrey, C., Colnot, C., Knobe, M., & Harvey, E. J. (2010). Trauma-induced inflammation and fracture healing. *Journal of Orthopaedic Trauma*, *24*(9), 522–525.
- Parfitt, A. M. (1994). Osteonal and hemi-osteonal remodeling: The spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *Journal of Cellular Biochemistry*, *55*(3), 273–286.
- Perren, S. M., & Claes, L. E.. *Fracture Management in AO Principles of Fracture Management (eds Rüedi, T.P. & Murphy, W.M.)*. Thieme-Verlag, Stuttgart-New York, 2000.
- Perren, S. M. (2002). Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: Choosing a new balance between stability and biology. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, *84*(8), 1093–1110.
- Phillips, A. M. (2005). Overview of the fracture healing cascade. *Injury*, *36 Suppl 3*, S5-7.
- Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., & Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, *284*(5411), 143–147.

-
- Raschke, M. J., Roßlenbroich, S., & Everding, J. (2017). Pseudarthrosen. *Trauma und Berufskrankheit*, 19(3), 255–259. <https://doi.org/10.1007/s10039-017-0312-4>
- Redlich, K., & Smolen, J. S. (2012). Inflammatory bone loss: Pathogenesis and therapeutic intervention. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 11(3), 234–250.
- Rhineland, F. W. (1974). Tibial blood supply in relation to fracture healing. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 105, 34–81.
- Rodan, G. A., & Harada, S. (1997). The missing bone. *Cell*, 89(5), 677–680.
- Rüedi, T. P., & Murphy, W. M. (2000). *AO Principles of Fracture Management*. Thieme.
- Rufo, A., Del Fattore, A., Capulli, M., Carvello, F., De Pasquale, L., Ferrari, S., Pierroz, D., Morandi, L., De Simone, M., Rucci, N., Bertini, E., Bianchi, M. L., De Benedetti, F., & Teti, A. (2011). Mechanisms inducing low bone density in Duchenne muscular dystrophy in mice and humans. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 26(8), 1891–1903.
- Sarmiento, A., & Loren, L. (1981). *Closed Functional Treatment of Fractures*. Springer, Berlin Heidelberg
- Schiebler, T. H. (2000). *Histologie*. Springer, Heidelberg.
- Schmidt-Bleek, K., Schell, H., Schulz, N., Hoff, P., Perka, C., Buttgerit, F., Volk, H.-D., Lienau, J., & Duda, G. N. (2012). Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. *Cell and Tissue Research*, 347(3), 567–573.
- Stein, G. S., Lian, J. B., Stein, J. L., Van Wijnen, A. J., & Montecino, M. (1996). Transcriptional control of osteoblast growth and differentiation. *Physiological Reviews*, 76(2), 593–629.

- Toben, D., Schroeder, I., El Khassawna, T., Mehta, M., Hoffmann, J.-E., Frisch, J.-T., Schell, H., Lienau, J., Serra, A., Radbruch, A., & Duda, G. N. (2011). Fracture healing is accelerated in the absence of the adaptive immune system. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 26(1), 113–124.
- Wakitani, S., Goto, T., Pineda, S. J., Young, R. G., Mansour, J. M., Caplan, A. I., & Goldberg, V. M. (1994). Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 76(4), 579–592.
- Walker, E. C., McGregor, N. E., Poulton, I. J., Solano, M., Pompolo, S., Fernandes, T. J., Constable, M. J., Nicholson, G. C., Zhang, J.-G., Nicola, N. A., Gillespie, M. T., Martin, T. J., & Sims, N. A. (2010). Oncostatin M promotes bone formation independently of resorption when signaling through leukemia inhibitory factor receptor in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(2), 582–592.
- Wallace, A., Cooney, T. E., Englund, R., & Lubahn, J. D. (2011). Effects of interleukin-6 ablation on fracture healing in mice. *Journal of Orthopaedic Research: Official Publication of the Orthopaedic Research Society*, 29(9), 1437–1442.
- Welsch, U.. (2010). *Lehrbuch Histologie* (3. Auflage). Elsevier.
- Willenegger, H., Perren, S. M., & Schenk, R. (1971). [Primary and secondary healing of bone fractures]. *Der Chirurg; Zeitschrift Für Alle Gebiete Der Operativen Medizin*, 42(6), 241–252.
- Wray, J. B. (1964). Acute changes in femoral arterial blood flow after closed tibial fractures in dogs. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 46, 1262–1268.
- Yamaguchi, A., Komori, T., & Suda, T. (2000). Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. *Endocrine Reviews*, 21(4), 393–411.

- Yang, X., Ricciardi, B. F., Hernandez-Soria, A., Shi, Y., Pleshko Camacho, N., & Bostrom, M. P. G. (2007). Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone*, *41*(6), 928–936.
- Zhang, Q., Chen, B., Yan, F., Guo, J., Zhu, X., Ma, S., & Yang, W. (2014). Interleukin-10 Inhibits Bone Resorption: A Potential Therapeutic Strategy in Periodontitis and Other Bone Loss Diseases. *BioMed Research International*, 2014.
- Zhang, S., Chan, M., & Aubin, J. E. (2006). Pleiotropic effects of the steroid hormone 1,25-dihydroxyvitamin D3 on the recruitment of mesenchymal lineage progenitors in fetal rat calvaria cell populations. *Journal of Molecular Endocrinology*, *36*(3), 425–433.
- Zhou, F. H., Foster, B. K., Zhou, X.-F., Cowin, A. J., & Xian, C. J. (2006). TNF- α Mediates p38 MAP Kinase Activation and Negatively Regulates Bone Formation at the Injured Growth Plate in Rats. *Journal of Bone and Mineral Research*, *21*(7), 1075–1088.