

**Histologisches Scoring zur Untersuchung prophylaktischer
Effekte von extrazellulären Oligonukleotiden auf die
Entstehung einer Implantat-assoziierten Osteomyelitis**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanbiologie
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Stötzel, Sabine
aus Lahn-Gießen

Gießen 2018

Aus der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-und Wiederherstellungschirurgie,
Experimentelle Unfallchirurgie,
unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Christian Heiß,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Katrin S. Lips
2. Gutachter: Prof. Dr. Tina Trenczek

Tag der Disputation: 13.08.2019

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1

1.1 Osteomyelitis: 1

1.1.1 Klassifizierung einer Osteomyelitis: 2

1.1.2 Ätiologie: 3

1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild: 4

1.1.4 Histologie: 4

1.1.5 Erregerspektrum: 5

1.2 Posttraumatische / postoperative Osteomyelitis: 5

1.2.1 Implantat-assoziierte Infektionen: 6

1.2.2 Klinisches Erscheinungsbild: 7

1.2.3 Erregerspektrum: 8

1.2.4 Therapie der Implantat-assoziierten Osteomyelitis: 8

1.3 Osteomyelitis im Tiermodell: 9

1.3.1 Osteomyelitische Tiermodelle: 9

1.3.2 Verwendete Bakterien und -Konzentrationen: 10

1.4 Cytosin-Phosphat-Guanin Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN): 10

1.4.1 CpG-ODN als Immunstimulanz: 11

2. Zielsetzung: 12

3. Material und Methoden 13

3.1 Experimentelles Design 13

3.1.1 Tiermodell: 14

3.1.2 Bakterienstamm: 14

3.1.3 Synthetische CpG ODNs: 15

3.1.4 Versuchsdurchführung: 15

3.1.5 Euthanasie und Probenentnahme: 16

3.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM) 17

3.2.1 Fixierung:	17
3.2.2 Trocknung und Beschichtung:	18
3.2.3 Abbildung der Proben mit dem REM:	19
3.3 Probenpräparation für die Histologie	19
3.3.1 Fixierung und Entkalkung:	19
3.3.2 Paraffineinbettung:	20
3.3.3 Schnittherstellung:	21
3.4 Histologie.....	21
3.4.1 Toluidinblau Färbung:	21
3.4.2 Gram-Färbung:.....	22
3.4.3 TRAP-Enzymhistochemie:	23
3.4.4 Movat Pentachrom Färbung:.....	24
3.5 Auswertung.....	26
3.5.1 Semiquantitative Auswertung:.....	26
3.5.1.1 Auswertung der histologischen Standardfärbungen:.....	26
3.5.1.2 Auswertung der TRAP Enzymhistochemie:	28
3.5.1.3 Auswertung der Gram-Färbung:	30
3.5.1.4 Bewertung der histologischen Kriterien/“Scoring“:	31
3.5.1.5 Beurteilung der Schnittqualität:.....	32
3.5.2 Bildbearbeitung und Histomorphometrie:	32
3.5.2.1 Histomorphometrie:	33
3.6 Statistische Auswertung:	34
4. Ergebnisse	35
4.1 Toluidinblau Färbung: erhöhter Knochenumbau und häufiger Bakterien sowie neutrophile Granulozyten drei Tage nach OP	35
4.2 Movat Pentachrom Färbung: erhöhter Knochenumbau drei Tage nach der OP	44

4.3 TRAP Enzymhistochemie: eine präoperative, lokale Applikation von ODNs führt zu erhöhten Osteoklastenzahlen am trabekulären Knochen am dritten Tag nach der OP	54
4.4 Gram-Färbung: Bakterien verbleiben nicht am Ort ihrer Applikation sondern kontaminieren den Markraum	62
4.5 Verteilung der Häufigkeiten auf die Schnittqualität: Die Bewertung ist unabhängig von der Schnittqualität	69
4.6 Scoring: Die Operation mit Infektion löst eine akute Osteomyelitis aus	73
4.7 Histomorphometrie: mehr knorpelige Anteile und weniger ossifizierter sowie nicht-mineralisierter Knochen nach präoperativer lokaler Behandlung	75
4.8 Rasterelektronenmikroskopie: keine Unterschiede bei der bakteriellen Belastung auf den Implantaten	78
4.9 Mikrobiologie: die Keimzahlen auf den Implantaten zeigen starke Schwankungen innerhalb der Gruppen	79
5. Diskussion.....	81
5.1 Präklinische Tiermodelle können humane Osteomyelitiden begrenzt abbilden.....	81
5.2 Eine frühe Osteomyelitis kann rein histologisch nachgewiesen werden.....	82
5.3 Das Potential zur Chronifizierung ist bereits in der akuten Phase einer Osteomyelitis erkennbar	83
5.4 Eine präoperative CpG-ODN Applikation kann das Immunsystem aktivieren aber eine entstehende Osteomyelitis nicht verhindern	84
5.5 Schlussfolgerung	89
6. Zusammenfassung	91
7. Summary:.....	92
8. Verzeichnisse:	93
I. Liste der Abbildungen:	93
II. Liste der Tabellen	96
III. Chemikalienliste:	97
IV. Abkürzungsverzeichnis:	99
9. Literaturliste	101

Anhang.....	112
Scoring Tabelle Toluidinblau Färbung.....	112
Scoring Tabelle Movat Pentachrom Färbung.....	114
Scoring Tabelle Gram-Färbung.....	116
Scoring Tabelle TRAP-Färbung.....	118
Erklärung zur Dissertation	120
Danksagung.....	121

1. Einleitung

1.1 Osteomyelitis:

Entzündungen des Knochens waren als Krankheitsbild schon im alten Ägypten (Edwin Smith Papyrus von 2500 v. Chr.) und in der Antike (Hippokrates) bekannt. Der Begriff Osteomyelitis wurde von dem französischen Chirurgen Edouard Chassaignac im Jahre 1852 geprägt. Er beschrieb die Krankheit erstmals als einen inflammatorischen Prozess, der von Mikroorganismen verursacht und von einer Zerstörung des Knochens begleitet wird [24; 34]. Im deutschen Sprachgebrauch wird zwischen einer Osteomyelitis, welche als Knochenmarksentzündung definiert ist, und einer Ostitis (Synonym: Osteitis) unterschieden, welche eine entzündliche Erkrankung der Knochensubstanz beschreibt [113]. Sowohl die Osteomyelitis als infektiöse Entzündung des Knochenmarks wie auch die Osteitis (Knochenentzündung) können auf andere Bereiche des Knochens übergreifen [112]. Daher werden mittlerweile die Begriffe Osteomyelitis und Osteitis in der Medizin parallel beziehungsweise synonym verwendet, da in der Mehrheit der Fälle nicht nur das Knochenmark sondern auch andere Bestandteile des Knochens betroffen sind [112; 128].

Im klinischen Bereich wird eine Osteomyelitis in akut, subakut und chronisch unterteilt und diese Einteilung basiert auf der Zeitspanne zwischen dem initialen Ereignis (z.B.: Verletzung oder Operation) und der Diagnose. Wird eine Osteomyelitis innerhalb von zwei Wochen diagnostiziert, wird sie als akut eingestuft. Erfolgt die Diagnose innerhalb eines Monats, handelt es sich um eine subakute Osteomyelitis und erfolgt die Diagnose erst nach Monaten, wird die Osteomyelitis als chronisch eingestuft [19; 68]. Akute Entzündungen im Knochen kommen als postoperative Osteitis [51] oder hämatogene Osteomyelitis bei präpubertären Jugendlichen [49; 68] vor. Im Gegensatz zur postoperativen oder posttraumatischen Osteomyelitis, bei der eine Knocheninfektion durch eine Verletzung des Knochens oder des Weichgewebes verursacht wird [102; 137], werden bei der hämatogenen Osteomyelitis Bakterien über den Blutkreislauf in den Knochen eingetragen [8; 106]. Beide Varianten der akuten Osteomyelitis sind klinisch durch lokale Entzündungsreaktionen (Rötung, Schwellung, Funktionseinschränkung) gekennzeichnet und können bei ausbleibender oder nicht erfolgreicher Therapie chronisch werden [106; 132]. In den Industrieländern ist die postoperative oder posttraumatische Osteomyelitis mit 80% die häufigste Form und 10-30% der akuten Fälle entwickeln einen chronischen Verlauf [52]. Die chronische Osteomyelitis zeigt klinisch ein variables Erscheinungsbild und ist durch Rötung, Schwellung und Wärmeentwicklung des umliegenden Weichgewebes, Fieber und/oder Schmerzen gekennzeichnet [1; 95]. Nekrotische

Knochenareale und Sequester können mittels radiologischer bildgebender Verfahren erkannt werden. Diese sind neben der klinischen Untersuchung für die Diagnose einer Osteomyelitis essentiell [48; 67; 83; 101]. Prinzipiell kann jeder Knochen eine Osteomyelitis entwickeln. Tibia und Femur sind jedoch die Knochen, welche am häufigsten von einer Osteomyelitis betroffen sind [82].

1.1.1 Klassifizierung einer Osteomyelitis:

Eine einheitliche Klassifizierung für Osteomyelitiden existiert bisher nicht und die im klinischen Bereich am häufigsten verwendeten Klassifikationen sind die von Waldvogel [132-134] und Cierny/Mader [27-28]. Bei Waldvogel erfolgt die Einteilung einer Osteomyelitis nach deren Dauer (akut oder chronisch) und der Infektionsquelle (hämatogen, vaskuläre Insuffizienz oder „contiguous“ also aus benachbartem Gewebe übergreifend). Direkte bakterielle Kontaminationen des Knochens oder des Markraumes, wie sie beispielsweise bei offenen Frakturen vorkommen können, werden hierbei nicht berücksichtigt. Bei der Cierny-Mader Klassifizierung erfolgt die Einteilung aufgrund anatomischer, klinischer und radiologischer Aspekte. Hierbei werden die lokale Ausbreitung (Abbildung 1) und der Gesundheitszustand der Patienten (gesund oder pathologisch verändert) berücksichtigt. Eine Berücksichtigung der Infektionsdauer erfolgt bei dieser Klassifizierung nicht.

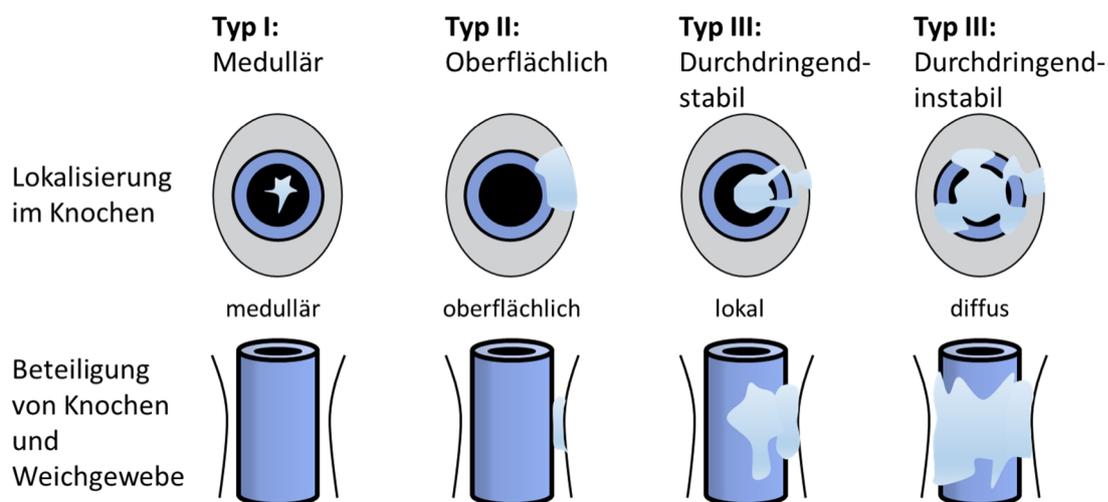


Abbildung 1: Cierny-Mader Klassifizierung des osteomyelitischen Knochens. Modifiziert nach Cierny et al. 2003 [28]

Romanò et al. (2011) verglich 10 Klassifizierungsschemata für Knochen- und Gelenkinfektionen [105] und von Hotchen et al. (2017) wurden 13 Schemata zu Klassifizierung der Osteomyelitis von langen Röhrenknochen verglichen [53]. In diesen systematischen Reviews wird eine große Bandbreite von Variablen zur Klassifizierung einer Osteomyelitis aufgeführt. Einige der verwendeten Variablen wie beispielsweise der Gesundheitszustand oder die Art der Knochendefekte sowie die Abdeckung des Defektes mit Weichgewebe werden zu Prognosezwecken oder zur Planung der operativen Nachsorge verwendet. Andere Variablen, wie zum Beispiel die Ätiopathogenese, haben eine rein deskriptive Funktion. Aus heutiger Sicht zählen die Intensität der Knochenbeteiligung, die Keimart und deren Antibiotikaresistenzen, die Notwendigkeit des Wundverschlusses mit Weichgewebe sowie der Gesundheitszustand der Patienten zu den wichtigen Variablen, welche in ein klinisches Klassifizierungsschema der Osteomyelitis eingeschlossen werden sollten.

1.1.2 Ätiologie:

Prinzipiell lassen sich die initialen Faktoren für die Entstehung einer Osteomyelitis in drei Hauptkategorien einteilen [17; 53; 105] welche auch schon bei Waldvogel zugrunde liegen [132-134]. Hämatogen: eine bakterielle Infektion gelangt über den Blutkreislauf in den Knochen und verursacht dort eine Entzündung. Infektiös: eine primäre Entzündung des Kochens nach einer Verletzung/dem Einsetzen einer Prothese oder eine sekundäre Infektion, bei der eine Entzündung des Weichgewebes auf den Knochen übergreift. Vaskulär: eine Entzündung der unteren Extremitäten sekundär zu einer vaskulären Erkrankung wie beispielsweise Diabetes oder Arteriosklerose. Penetrierende Verletzungen und intraoperative Infektionen sind die Hauptursachen für die Entstehung einer primären Osteomyelitis. Ein Übergreifen einer Infektion vom Weichgewebe auf den Knochen ist bei Patienten mit schweren vaskulären Erkrankungen weit verbreitet [17]. Bei Kelly erfolgt die Klassifizierung nach hämatogener Osteomyelitis, Osteomyelitis bei vereinigten Frakturen („fracture union“) oder bei nicht vereinigten Frakturen („fracture non-union“) und postoperativer Osteomyelitis ohne Faktur [61]. Implantat-assoziierte Infektionen haben einen großen Anteil an den Knochen- und Gelenkinfektionen [78; 104].

1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild:

Bei einer Osteomyelitis zeigen nicht alle Patienten ein krankheitstypisches Erscheinungsbild mit Schmerzen und Fieber, welches nur in 85 % der Fälle auftritt. Beim Blutbild können die Leukozytenzahl und der Wert für das C-reaktive Protein (CRP) trotz einer Osteomyelitis unauffällig sein [1]. Die typischen Anzeichen einer akuten Osteomyelitis sind Fieber auch mit Schüttelfrost, Schwellung und Rötung über dem betroffenen Knochenareal sowie Bewegungseinschränkungen [10; 105]. Greift eine Entzündung vom umliegenden Weichgewebe auf den Knochen über, sind die Krankheitssymptome meist lokale Knochen- und Gelenkschmerzen, Rötung, Schwellung und Fistelbildung im Bereich der Wunde. In der akuten Phase können Anzeichen einer Bakteriämie (Fieber, Schüttelfrost, nächtliche Schweißausbrüche) auftreten, welche allerdings in der chronischen Phase fehlen [17]. Bei den chronischen Osteomyelitiden zeigen sich radiologisch Veränderungen wie Fistelbildung, Knochenläsionen und Sequesterbildung am Knochen. Chronische Schmerzen mit Bewegungseinschränkungen, Abszess und Fistelbildung sind ebenfalls typische Symptome. Bei den Laborparametern ist die Erythrozytensedimentationsrate erhöht während die Leukozytenzahl unauffällig bleibt [17; 105; 128].

1.1.4 Histologie:

Die histologische Diagnostik bei Verdacht auf eine Osteomyelitis erfolgt entweder anhand von Punktaten der Flüssigkeitsansammlung oder intraoperativ entnommenen Biopsien.

Eine akute Osteomyelitis präsentiert sich als eitrige Entzündung mit Ödembildung, vaskulärer Kongestion und einer Thrombose der kleinen Blutgefäße. Avitale Knochenareale und Sequester können als Folge von Frakturen und bei Verletzungen der medullären und periostealen Blutgefäße entstehen [36]. Ansammlungen polymorph-kerniger Leukozyten und ein erhöhtes Vorkommen von Osteoklasten werden in frühen Läsionen beobachtet [13]. Bei etablierten Infektionen bildet sich fibrotisches Gewebe, welches das Granulationsgewebe und die Sequester umschließt [17].

Bei einer chronischen Osteomyelitis zeigen sich pathologische Veränderungen in Form von nekrotischem Knochengewebe, Ansammlungen von polymorphonukleären Leukozyten, hohe Lymphozytenzahlen sowie die Anwesenheit von Histiozyten und gelegentlich auch Plasmazellen. Im Bereich der Infektion sind die Osteoblastenzahlen erhöht und es bildet sich

neuer Knochen an vitalen Fragmenten des Periost und des Endost. Endostale Knochenneubildung kann übermäßig ausgeprägt sein und den Markkanal füllen. Nach erfolgreicher Bekämpfung der Osteomyelitis durch das Immunsystem oder durch chirurgische Intervention wird der entstandene Hohlraum besonders bei Kindern schnell wieder mit neu gebildetem Knochen geschlossen. Bei adulten Patienten kann der Hohlraum im Knochen auch bestehen bleiben oder mit fibrotischem Gewebe gefüllt werden, welches durch eine Fistelöffnung mit der Hautoberfläche verbunden ist [17; 26].

1.1.5 Erregerspektrum:

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) ist sowohl bei der hämatogenen wie auch bei der sekundären, chronischen oder Implantat-assoziierten Osteomyelitis der am häufigsten nachgewiesene Erreger [9; 82; 105]. Neben *S. aureus* kann eine Vielzahl von Keimen eine chronische oder Implantat-assoziierte Osteomyelitis verursachen. So können *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus* Spezies, *Salmonella* Spezies, *Serratia marescens*, oder *Escherichia coli* ebenfalls Osteomyelitiden auslösen [68; 105]. In seltenen Fällen können auch Pilzinfektionen mit beispielsweise *Aspergillus* Spezies oder *Candida albicans* eine Osteomyelitis verursachen [68].

1.2 Posttraumatische / postoperative Osteomyelitis:

Traumata bergen ein großes Potential für die Entstehung einer Osteomyelitis. Hierbei können lokale und systemische Faktoren deren Entstehung und Chronifizierung begünstigen (Abbildung 2). Die Wahrscheinlichkeit nach einer geschlossenen Fraktur eine Osteomyelitis zu bekommen, liegt bei 0,5 %, bei einer offenen Fraktur bei 2,6 % und im Falle einer Femurosteosynthese nach Fraktur bei 3,37 % [35; 50]. Bei unfallbedingten Weichgewebeverletzungen oder offenen Frakturen werden die Wundgebiete häufig mit Bakterien aus der Umwelt kontaminiert. So kann es trotz sorgfältiger chirurgischer Versorgung zu Entzündungsreaktionen kommen, die dann auf das Knochengewebe übergreifen und zu einer Osteomyelitis führen können [91]. Hierbei wird die Etablierung einer Osteomyelitis durch die metallischen Implantate begünstigt, welche zur Stabilisierung der traumatischen Frakturen verwendet werden [26; 119]. Da diese Art der Implantate meist nach Ausheilung der Fraktur entfernt werden, kann eine vollständige Heilung der Osteomyelitis nach der

Implantatentfernung erreicht werden. Implantat-assoziierte Infektionen können auch bei Gelenkprothesen auftreten und deren Therapie ist komplex sowie kostenintensiv, da eine Entfernung des Implantates zum vorübergehenden Funktionsverlust bis hin zur dauerhaften Beeinträchtigung der betroffenen Extremität führt [33]. Die infektionsauslösende Bakterienart kann zu zusätzlichen Komplikationen führen, da einige Keime wie beispielsweise *S. aureus* in der Lage sind Biofilme zu bilden [46; 84]. Innerhalb dieser Biofilme sind die Bakterien vor den systemischen oder lokalen Antibiotika geschützt und können nach Ruhephasen in denen die Osteomyelitis als geheilt erscheint zu einem erneuten Ausbrechen einer Infektion führen [6].

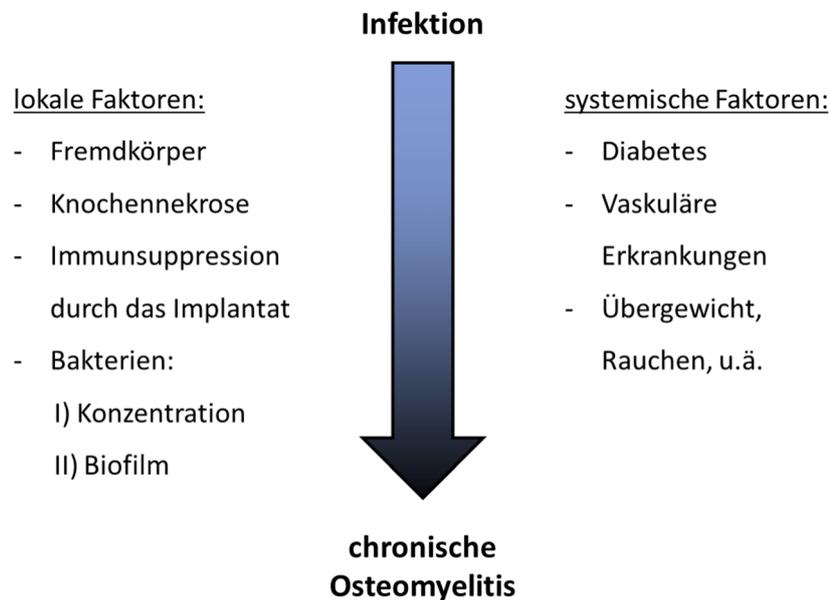


Abbildung 2: Lokale und systemische Faktoren können die Entwicklung von einer Infektion zu einer chronischen Osteomyelitis begünstigen. Modifiziert nach Ciampolini und Harding 2000 [26]

1.2.1 Implantat-assoziierte Infektionen:

Implantat-assoziierte Infektionen können nach chirurgischer Frakturversorgung mit Marknägeln und Osteosyntheseplatten oder nach einem Gelenkersatz als postoperative Komplikationen auftreten. Hierbei zählen periprothetische Infektionen zu den schwerwiegenden Erkrankungen und haben eine ungünstigere Heilungsprognose als beispielsweise Mammakarzinome [142]. Die Infektionsrate beim Gelenkersatz liegt zwischen 1 % (Hüfte und Schulter) und 2-3 % (Knie, Ellenbogen und Sprunggelenk) [99]. Die

Infektionsrate bei Osteosyntheseoperationen liegt in einem vergleichbaren Bereich und beträgt bei der Versorgung von Femurfrakturen beispielsweise ca. 3,4 % [35]. Bei offenen Frakturen hohen Schweregrades beträgt die Osteomyelitishäufigkeit bis zu 43 % [23].

Eine Implantat-assoziierte Osteomyelitis kann aufgrund ihrer Entstehung in perioperativ, exogen oder hämatogen eingeteilt werden [129]. Hierbei erfolgt die Infektion beispielsweise durch eine Punktion, ausgehend vom umliegenden infizierten Weichgewebes oder durch die Übertragung von Infektionen der Haut oder des Urogenitaltraktes [73]. Häufig erfolgt auch eine Einteilung nach dem Zeitintervall, das zwischen der erfolgten Osteosynthese und der Diagnose vergangen ist. Hierbei wird zwischen einer frühen (innerhalb der ersten zwei Wochen), einer verspäteten (zwischen der dritten und zehnten Woche) und einer späten (nach der 10. Woche) Osteomyelitis unterschieden [68]. Von Romano et al. [105] wurde eine Unterteilung der Implantat-assoziierten Osteomyelitis in stabile Osteosynthese mit Kallusbildung, stabile Osteosynthese mit reduzierter Kallusbildung und instabile Osteosynthese ohne Kallusbildung angewendet. Die Knochenstabilität sowie die feste Verankerung (oder Lockerung) des Implantates ist aus Sicht der Chirurgen ebenfalls ein wichtiges Kriterium bei der Beurteilung einer Implantat-assoziierten Osteomyelitis [141]. Bei der Beurteilung nach Matthews [75] gilt eine Implantat-assoziierte Infektion als diagnostiziert, wenn eines der fünf Kriterien erfüllt ist: intraoperativer Nachweis von Eiter, Gelenkfistel, histopathologischer Nachweis einer akuten Infektion, identischer Bakterienstamm in zwei Biopsien oder Punktaten oder eine positive Zytologie. Eine erhöhte Leukozytenzahl und mehr als 80 % neutrophile Granulozyten im Punktat werden ebenfalls als Infektionsbeweis anerkannt [81; 109].

1.2.2 Klinisches Erscheinungsbild:

Eine frühe Implantat-assoziierte Osteomyelitis präsentiert sich klinisch mit den typischen Anzeichen einer Wundinfektion wie anhaltendes Fieber und lokalen Schmerzen, Rötung, Schwellung sowie Wundheilungsstörungen im operierten Bereich. Anhaltende Schmerzen mit leichtem Fieber, mechanischer Instabilität und Fistelbildung sind Anzeichen einer verspäteten Osteomyelitis. Nicht verheilte Knochenenden, lokale Schmerzen, Wundheilungsstörung und Anzeichen einer Entzündung oder Sepsis sind charakteristisch für eine Spätinfektion [77; 88; 106; 129]. Die frühen Anzeichen einer Implantat-assoziierten Osteomyelitis unterscheiden sich im Anfangsstadium nicht von den allgemeinen Anzeichen einer Infektion. Eine Beteiligung des Knochengewebes kann zu diesem Zeitpunkt radiologisch noch nicht nachgewiesen werden.

Wird eine akute Osteomyelitis nicht erkannt oder nicht vollständig austherapiert, kann sie chronisch werden. Die Chronifizierung kann direkt offensichtlich sein oder nach einer Ruhephase mit einer vermeintlichen Heilung nach Jahren (oder Jahrzehnten) wieder klinisch auffällig werden. Knochenläsionen und Sequester lassen sich dann bei der chronischen Osteomyelitis radiologisch zwischen Implantat und Knochen darstellen [128].

1.2.3 Erregerspektrum:

S. aureus und Koagulase-negative Staphylokokken sind die Erreger, welche am häufigsten bei Implantat-assoziierten Infektionen nachgewiesen werden. Gram-negative Bazillen oder *Streptococcus* Spezies konnten ebenfalls gefunden werden. Im Gegensatz zu infizierten Gelenksprothesen sind bei Implantat-assoziierten Osteomyelitiden Mischinfektionen häufiger [7; 69; 106].

1.2.4 Therapie der Implantat-assoziierten Osteomyelitis:

Das Therapieziel bei einer diagnostizierten Osteomyelitis ist die Beseitigung des Infektes sowie im Bedarfsfall die Rekonstruktion des Knochens und des umliegenden Weichgewebes [128]. Wie schon beschrieben ist das Erscheinungsbild bei einer Osteomyelitis variabel und daher muss jede Therapie individuell geplant und auf den jeweiligen Patientenstatus angepasst werden. Hierzu muss die Ausbreitung der Infektion, die Stabilität des Knochens und der Gesundheitszustand des Patienten beurteilt werden [27-28]. Biopsien oder Abstriche aus dem infizierten (Knochen-)Areal sollten zur Keim- und Resistenzbestimmung mikrobiologisch analysiert und die Antibiotikawahl darauf abgestimmt werden [9]. Eine Implantat-assoziierte Osteomyelitis kann durch Antibiotika alleine nicht erfolgreich therapiert werden. Eine radikale Entfernung des entzündeten Knochen- und Weichgewebes ist notwendig [128]. Nur bei ganz frühen und lokal sehr begrenzten Osteomyelitiden kann ein Titanimplantat im oder am Knochen verbleiben. In allen andern Fällen ist eine Entfernung des Implantates notwendig [51]. Müssen größere Knochenareale zur Therapie entfernt werden oder ist der Knochen nach der Implantatentfernung instabil, können Fixateure externe verwendet werden, um eine stabile Situation für die Heilung zu erreichen [110]. Eine oder mehrere Operationen in Folge sind je nach Schweregrad der Osteomyelitis notwendig, um ein infektfreies und funktionales Ergebnis zu erreichen [68].

Intraoperativ kann eine sorgfältige Wundreinigung, das Entfernen aller avitalen Knochenbereiche und eine adäquate Wundabdeckung mit vitalem Weichgewebe (auch in Form von körpereigenen Transplantaten) das Risiko für die Entstehung einer Osteomyelitis verringern [17]. Ein intramedulläres Implantat sollte daher bei der Stabilisierung von infiziertem und partiell avitalem Knochengewebe vermieden werden, weil dies die Entstehung einer Osteomyelitis begünstigen würde [38]. Antibiosen (systemisch und lokal) verringern die Infektrate und sie sollten auf die Situation angepasst eingesetzt werden. So kann beispielsweise auch bei geschlossenen Frakturen eine intravenöse Antibiotikatherapie das Infektionsrisiko herabsetzen, wenn sie schon 30 Minuten vor Beginn der Operation (Hautschnitt) beginnt [29].

1.3 Osteomyelitis im Tiermodell:

Bei der Entwicklung neuer Medikamente, Therapien oder Implantate sind Tiermodelle der Schritt zwischen den Verträglichkeitstest und dem Einsatz im Menschen [45]. Daher müssen solche Tiermodelle den pathologischen Zustand so genau wie möglich simulieren, denn nur so können die Ergebnisse aus den Tierversuchen später auch auf den Menschen übertragen werden. Eine wichtige Rolle spielen Tierversuche auch bei der Charakterisierung von Krankheiten und der Entwicklung prophylaktischer Behandlungen [98].

1.3.1 Osteomyelitische Tiermodelle:

Da das Tiermodell die klinische Situation im Patienten simulieren oder zur Grundlagenforschung dienen soll, gibt es kein universelles, perfektes Tiermodell der Osteomyelitis und das verwendete Tiermodell muss passend zur Fragestellung gewählt werden. Im Tiermodell können akute und chronische Osteomyelitiden simuliert werden. Bei Modellen zur akuten Osteomyelitis wird der Knochen eröffnet und die Bakterien in den verletzten Knochen appliziert [16; 125]. Bei gewünschten chronischen Verlaufsformen können unter anderem Chemikalien zugegeben werden, um eine Osteomyelitis zu etablieren [140]. Metallische Implantate oder deren Fragmente können ebenfalls die Etablierung einer Osteomyelitis begünstigen [5]. Bei intramedullären Implantaten führt eine Kontamination des eröffneten Knochens vor dem Einsetzen des Implantates zuverlässig zur Entstehung einer chronischen Osteomyelitis [12; 44; 70].

Bisher wurden Modelle zur Etablierung einer Osteomyelitis in Kaninchen [5; 80; 85], Ratten [2; 16; 125; 140], Mäusen [70; 121; 139], Schafen [124; 136], Hunden [41; 55], Ziegen [135], Schweinen [58], Meerschweinchen [40] und sogar Hühnern [36] beschrieben. Nagetiermodelle werden aufgrund ihrer Größe und der relativ geringen Haltungskosten häufig für Grundlagenforschungen und bei Versuchsreihen mit benötigten hohen Probenzahlen verwendet. Schafe, Ziegen und Schweine haben Knochen, welche in Größe und Belastbarkeit denen der Menschen entsprechen und werden daher bei komplexeren und praxisnahen Versuchen eingesetzt. Dennoch zeigt sich mittlerweile ein Trend auch Rattenmodelle für Untersuchungen zur Frakturheilung und -Therapie bei systemischen Knochenerkrankungen und bei Studien über Implantat-assoziierte Infektionen zu verwenden [96; 103; 119].

1.3.2 Verwendete Bakterien und -Konzentrationen:

Die verwendeten Bakterienkonzentrationen variieren zwischen den Versuchen und Tierarten. Eine Osteomyelitis wird in den meisten Tiermodellen durch eine Infektion mit *S. aureus* ausgelöst. In Kaninchenmodellen werden Konzentrationen zwischen 40 und 2×10^8 koloniebildende Bakterien („colony forming units“ = CFU) verwendet, um eine Osteomyelitis auszulösen [5; 80]. Bei Rattenmodellen lag die benötigte initiale Bakterienkonzentration im Bereich von 10^2 bis $1,8 \times 10^8$ CFU [44; 70] und bei Mäusen zwischen 10^2 und 10^6 CFU [93; 131]. Höhere Konzentrationen 10^9 CFU werden bei Hunden [41] und Schafen [136] verwendet und bei Schweinen werden sogar Konzentrationen von 10^{10} CFU initial eingesetzt [43]. *S. aureus* ist der bevorzugte Keim zur Osteomyelitisinduktion in Tiermodellen, aber auch andere Bakterien wie beispielsweise *Staphylococcus epidermis*, *Pseudomonas aeruginosa* oder *Escherichia coli* oder Bakterienkombinationen können im Tierversuch eingesetzt werden um eine Osteomyelitis auszulösen [98].

1.4 Cytosin-Phosphat-Guanin Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN):

Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG) Oligodesoxynukleotide (ODN) sind unmethylierte Nukleinsäuresequenzen, welche charakteristisch für bakterielle DNA sind [65]. Es ist bekannt, dass CpG-ODNs die angeborene sowie die erworbene Immunität von Wirbeltieren stimuliert und die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen anregen kann [65; 60]. Die Modulation des Immunsystems durch CpG-ODN erfolgt über die Aktivierung des Toll-like Rezeptors 9 (TLR-9) [66]. In experimentellen Modellen zu Allergien, viralen

Infektionen und Krebserkrankungen wurde das immunogene Potential von CpG-ODNs erfolgreich eingesetzt [32; 63; 74]. Die Wirksamkeit der CpG-ODN gegen eine Vielzahl an Pathogenen und mögliche Anwendungsgebiete wie beispielsweise als Zusatz („Booster“) bei Impfstoffen wurden in klinischen Studien untersucht [64-65].

1.4.1 CpG-ODN als Immunstimulanz:

Das immunstimulierende Potential von CpG-ODN wurde schon in Fischen und Säugetieren untersucht [97]. In Fischen (*Lates calcarifer*) konnte eine intraperitoneale Applikation von CpG-ODN das angeborene Immunsystem stimulieren und damit die den Schutz vor *Streptococcus iniae* Infektionen erhöhen [62]. In Ratten und Mäusen konnte bisher gezeigt werden, dass eine Immunstimulation durch TLR-9 Agonisten wie CpG-28 die Tumorabstoßung induzieren kann. Initial ist hierbei die Stimulierung des angeborenen wie auch des adaptive Immunsystem. Besonders aussichtsreich ist die Injektion der CpG-ODNs direkt in den Tumor [20-21]. Im Mausmodell konnten CpG-ODNs die Überlebensrate bei Leberkarzinomen erhöhen und dabei das Tumorwachstum hemmen [57]. CpG-ODN können Mäuse vor einem tödlichen akuten Schock schützen und bei Verletzungen den Wundverschluss beschleunigen [108; 138]. Neugeborene Fohlen haben zu bestimmten Entwicklungszeitpunkten immunologische Defizite und sind anfälliger für Infektionen. CpG-ODN Applikationen konnten bei Fohlen das Immunsystem stärken und hatten das Potential sie vor Infektionen schützen [30]. Auch bei Implantatinfektionen gibt es erste Untersuchungen im Tiermodell, welche eine immunstimulierende Wirkung der CpG-ODN in der frühen Phase einer Implantat-assoziierten Infektion nahelegen [114]. Das heilungsfördernde Potential der CpG-ODN besteht daher nicht nur in der Anwendung bei einer bestehenden Infektion oder Erkrankung. Eine prophylaktische Applikation (intraperitoneal oder intramuskulär) könnte das Immunsystem voraktivieren und dadurch die Entstehung einer Infektion verhindern oder deren Schweregrad abmildern.

2. Zielsetzung:

Osteomyelitiden sind eine gefürchtete Komplikation bei der chirurgischen Frakturversorgung und bei dem Einsatz von Gelenkprothesen. Die Diagnose einer frühen Osteomyelitis ist eine klinische Herausforderung genauso wie die Therapie einer chronischen, bakteriellen Osteomyelitis. Eine unentdeckte oder nicht erfolgreich therapierte Osteomyelitis führt zu starken Einschränkungen für den Patienten und kann neben dem Funktionsverlust der betroffenen Gliedmaßen auch zu deren Amputation führen.

CpG-ODN sind für Bakterien charakteristische DNA-Motive, die bei einer Infektion vom Wirtsorganismus als fremd erkannt werden und dadurch das Immunsystem aktivieren können. Daraus ergibt sich für diese Arbeit folgende Fragestellung:

Haben präoperativ applizierte CpG-ODN das Potential, die Entstehung einer Osteomyelitis zu hemmen oder zu verhindern?

Zur Klärung dieser Fragestellung sollte in der vorliegenden Arbeit ein semiquantitatives Scoring-System zur Erkennung von Varianzen beim Knochenumbau und von zellulären Veränderungen im Knochenmark bei Implantat-assoziierten Infektionen entwickelt werden. Das neu entwickelte Scoring-System soll die Diagnose einer akuten Osteomyelitis ermöglichen und soll spezifisch genug sein, um das Potential zur Chronifizierung einer Osteomyelitis darzustellen.

Der Einfluss der präoperativ applizierten CpG-ODN auf die Entstehung einer Osteomyelitis soll mit diesem Scoring-System beurteilt werden.

3. Material und Methoden

3.1 Experimentelles Design

54 männliche Sprague-Dawley Ratten wurden zufällig einer von drei Versuchsgruppen zugeteilt. Gruppe 1: Positivkontrolle mit PBS, Gruppe 2 mit CpG-ODN (Cytosin-Phosphat-Guanin (CpG) Oligodesoxynukleotide (ODN); für Bakterien charakteristische Nukleinsäuresequenz) oder Gruppe 3 mit negativ ODN (neg. ODN ohne die für Bakterien charakteristische Abfolge der Nukleinsäuren Cytosin und Guanin). Die Behandlung erfolgte entsprechend der Gruppenzuteilung als intramuskuläre Injektion drei Tage vor der geplanten Operation (Abbildung 3).

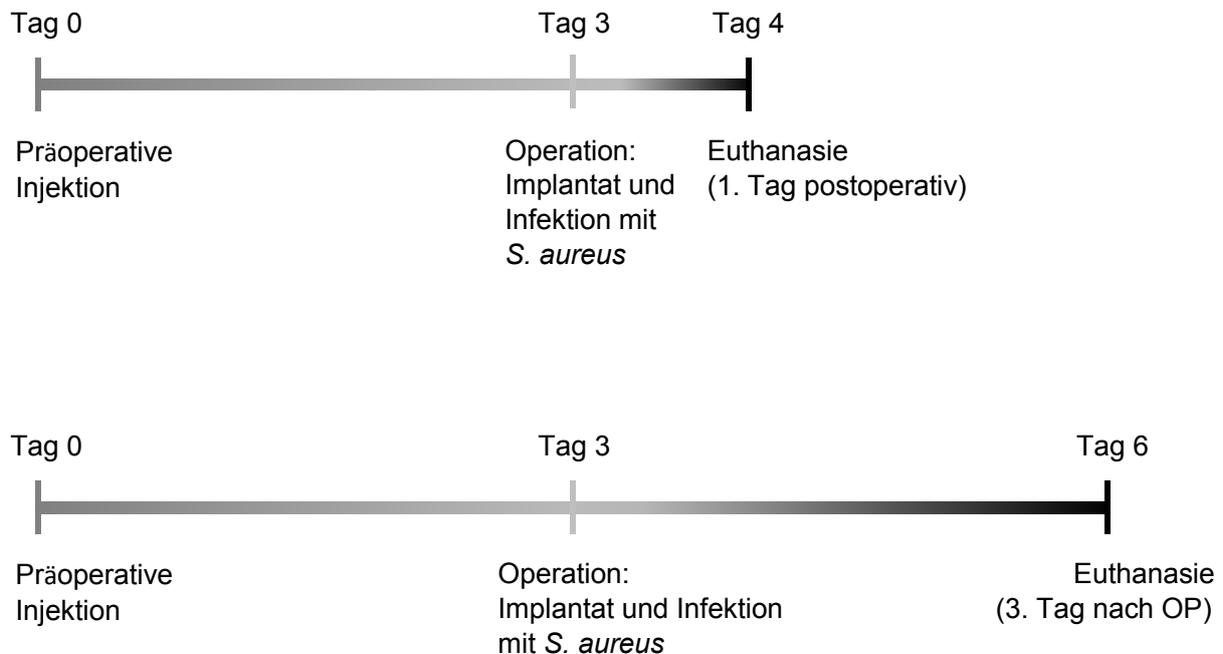


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs mit präoperativer Injektion (PBS; 500 µg CpG-ODN oder 500 µg negativ ODN), dem Operationszeitpunkt und dem Euthanasiezeitpunkt (4 oder 6 Tage nach CpG-Applikation).

Während der Operation wurde ein Marknagel von proximal in die Tibia eingebracht und eine Infektion durch die Zugabe von *S. aureus* simuliert. Der potentiell protektive Effekt einer präoperativen CpG-Gabe wurde histologisch und mikrobiologisch untersucht. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte und nicht operierte Tibiae der kontralateralen Seite.

Tabelle 1: Tabellarische Übersicht der Versuchsgruppen und der Analysemethoden

Methoden	Positivkontrolle PBS + Infektion		500 µg CpG ODN + Infektion		500 µg neg. ODN + Infektion		Negativkontrolle ohne Infektion	
	Tag 4	Tag 6	Tag 4	Tag 6	Tag 4	Tag 6	Tag 4	Tag 6
Proben (insgesamt)	9	9	9	9	9	9	3	3
Mikrobiologie Implantat	6	6	6	6	6	6	0	0
Mikrobiologie Knochenmark	9	9	9	9	9	9	0	0
REM Implantat	3	3	3	3	3	3	0	0
Einbettung Paraffin (entkalkt)	9	9	9	9	9	9	3	3
Histologie	9	9	9	9	9	9	3	3
Histomorphometrie	9	9	9	9	9	9	3	3

3.1.1 Tiermodell:

Männliche Sprague Dawley Ratten im Alter von 12 Wochen mit einem Gewicht von circa 300g wurden bei Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und unter standardisierten Bedingungen (Futter und Wasser *ad libitum*; 12 h Hell-/Dunkelzyklus; 22° C; 40-60 % Luftfeuchtigkeit; Sterilraum) mit einer Besatzdichte von 2 Ratten pro Käfig (Typ 4 mit Gitterdeckel) eingestallt. Das Tierversuchsvorhaben wurde vor Beginn von der Tierschutzkommission geprüft und vom Regierungspräsidium Gießen genehmigt (Aktenzeichen: V54-19 c 20 15 h 01 GI 20/28 Nr. 20/2013 vom 11.06.2013).

3.1.2 Bakterienstamm:

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) Stamm EDCC 5055 (DSM Nr. 28763; Eugen Domann Culture Collection, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Gießen, Deutschland)

Die Konzentration von 10⁵ CFU/20 µl PBS wurde basierend auf dem Vorversuch zur Infektionsrate bei einem intramedullären Tibiaimplantat in der Ratte gewählt.

3.1.3 Synthetische CpG ODNs:

Die synthetischen Polypeptide wurden von Invivogen (San Diego, Californien, USA) hergestellt und aufgereinigt. Folgende Polypeptide wurden verwendet:

ODN1826 (Sequenz: 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3') für die CpG-ODN Versuchsgruppe und ODN 2138 (Sequenz: 5'-TCC ATG AGC TTC CTG AGC TT-3') für die negativ ODN Versuchsgruppe (neg. ODN).

3.1.4 Versuchsdurchführung:

Zu Versuchsbeginn wurde jede Ratte gewogen und einer von drei Gruppen sowie einem von zwei Euthanasiezeitpunkten zugeteilt. Den Tieren der Gruppe 1 (Positivkontrolle) wurden 100 µl einfach konzentriertes PBS, den Tieren aus Gruppe 2 (CpG-ODN) wurden 500 µg / 100 µl CpG-ODN in PBS und den Tieren aus Gruppe 3 (neg. ODN) wurden 500 µg / 100 µl negativ ODN in PBS intramuskulär in den *Musculus tibialis anterior* injiziert.

Drei Tage nach der Vorbehandlung (Injektion durch Herrn Dr. S. Sethi) erfolgte die Operation unter sterilen Bedingungen. Die Operation der Tiere wurde von Herrn Dr. med U. Thormann (Klinik für Unfall- Hand- und Wiederherstellungschirurgie, JLU-Gießen) durchgeführt. Vor Operationsbeginn wurden die Ratten per Inhalationsnarkose mit Isofluran 5% bei 600 ml / min Sauerstoff narkotisiert. Nach dem Einsetzen der Narkose wurde das linke Hinterbein der Ratten rasiert und die Ratten auf den Operationstisch (mit einer Wärmematte unter dem Lagerungsbereich) überführt. Der rasierte Bereich wurde mit Braunol® desinfiziert. Mit einem sterilen OP-Lochtuch wurde der OP-Tisch soweit abgedeckt, dass nur der OP-Bereich um das linke Rattenknie frei blieb. Es erfolgte ein 1,5 cm langer Hautschnitt cranial über dem Knie. Die Patella wurde disloziert und die Gelenkkapsel eröffnet. Mit einem Handbohrer wurde die proximale Tibiagelenksfläche durchbohrt und der Markraum eröffnet. Als Marknagel wurde eine gelbe Gauge-Kanüle (20 G) von proximal in den Tibiamarkraum eingebracht. Die Kanüle wurde so in der Länge gekürzt, dass sie in voller Länge im Markraum war ohne dass das Ende in das Kniegelenk überstand. 10^5 CFU/20 µl PBS *S. aureus* wurden im Bereich des proximalen Implantatendes appliziert. Die Gelenkkapsel wurde verschlossen, die Patella wurde reponiert und die Haut subkutan und oberflächlich verschlossen. Die Gabe von Schmerzmitteln erfolgte postoperativ nach Bedarf, so dass die Ratten das operierte Bein belasteten.

Die postoperative Beobachtung sowie das Scoring der Tiere erfolgte den Tierschutzkriterien entsprechend durch Dr. U. Thormann.

3.1.5 Euthanasie und Probenentnahme:

Die Euthanasie mit Entnahme der Tibiae erfolgte an Tag vier oder sechs nach Versuchsstart. Hierzu wurden die Ratten zuerst mit Isofluran narkotisiert und die eigentliche Tötung erfolgte mittels CO₂. Nach dem Tod des Tieres wurde das Hinterbein großflächig rasiert (Abbildung 4A) und mit Braunol[®] desinfiziert. Unter sterilen Bedingungen wurde die Haut über dem Knie entfernt (Abbildung 4B). Muskeln und Bänder wurden im Knie und an der Ferse durchtrennt. Die Tibia wurde entnommen und das umgebende Weichgewebe entfernt (Abbildung 4C). Anschließend wurde der Marknagel aus der Tibia entfernt (Abbildung 4D) und entweder für die Untersuchung im Rasterelektronenmikroskop fixiert oder für die Keimzahlbestimmung der am Implantat anheftenden Bakterien auf Agarplatten ausgerollt (Abbildung 4E). Nach Implantatentfernung wurden die Tibiae längs gespalten (Abbildung 4F) und eine Hälfte wurde für die Histologie fixiert während bei der anderen Hälfte der Markrauminhalt entnommen wurde. Die Keimzahlbestimmung des Markrauminhaltes erfolgte im Labor der medizinischen Mikrobiologie. Von jeder Gruppe und von beiden Zeitpunkten wurde zusätzlich je eine Tibia aus dem kontralateralen Bein für die Histologie als Negativkontrolle entnommen.

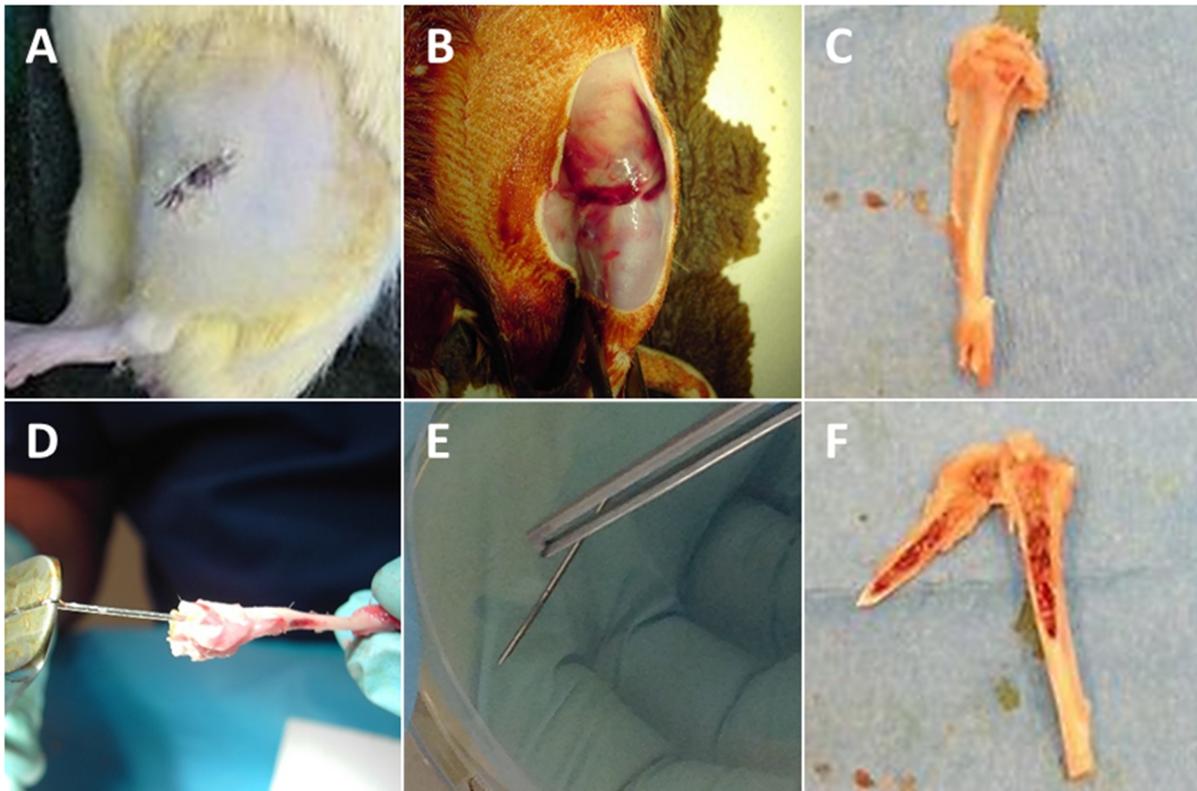


Abbildung 4: Probenentnahme nach der Euthanasie (A) gut verheilte Wunde zum Zeitpunkt der Euthanasie. (B) Blick auf das Weichgewebe im OP-Gebiet. (C) Entnommene Tibia vom Weichgewebe befreit. (D) Entfernung des Marknagels. (E) Ausrollen des Marknagels auf einer Agarplatte. (F) Gespaltene Tibia für die Histologie und Mikrobiologie.

3.2 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

3.2.1 Fixierung:

Tabelle 2: Herstellung der Fixierlösung für die Rasterelektronenmikroskopie

Lösung	
0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 7,2 – 7,4	Lösung 1: 27,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (MW 137,99) auf 1 l Aqua bidest Lösung 2: 35,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (MW 177,99; Fa. Merck, Nr. 1.06580) auf 1 l Aqua bidest Lösung 1 mit Lösung 2 (460 ml Lösung 1 mit 1540 ml Lösung 2) mischen und den pH-Wert mit Lösung 1 einstellen => 0,2 M Na-Phosphatpuffer Den 0,2 M Na-Phosphatpuffer im Verhältnis 1 : 1 mit Aqua bidest mischen
2,5 % Glutardialdehydlösung	10 ml 25 % Glutardialdehydlösung in 90 ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,2 - 7,4, s.o.) lösen
1 % Saccharose	danach 1 g / 100 ml Saccharose in 2,5 % Glutardialdehydlösung lösen

Die Proben wurden in der Fixierlösung und auf Eis transportiert. Die Fixierung erfolgte für 24 Stunden bei 4° C. Nach der Fixierung wurden die Proben insgesamt sechsmal mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer (pH 7,2 – 7,4) gespült.

3.2.2 Trocknung und Beschichtung:

Nach der Fixierung wurden die Marknägel nach folgendem Protokoll entwässert:

1. 30 % Ethanol p.a. für 15 Minuten
2. 50 % Ethanol p.a. für 15 Minuten
3. 70 % Ethanol p.a. für 15 Minuten
4. 80 % Ethanol p.a. für 15 Minuten
5. 96 % Ethanol p.a. für 15 Minuten
6. zweimal 100 % Ethanol p.a. für 15 Minuten

In 70 % Ethanol p.a. konnten die Proben für bis zu 14 Tage bei 4° C ohne Beeinträchtigung aufbewahrt werden.

Im Anschluss an die Entwässerung wurden die Marknägel mit Hilfe einer sterilen Zange in Stücke von etwa 1 cm Länge zerteilt und zuerst in die Probenkörbchen und anschließend in die kritische-Punkt-Trocknung EM CPD300 Critical Point Drying Apparatus (Firma Leica Mikrosystems GmbH, Wien, Österreich) überführt. Bei der kritischen Punkt-Trocknung wurde der Alkohol in der Probe durch flüssiges CO₂ ersetzt, welches bei 31° C und 73,8 bar von der flüssigen in die gasförmige Phase übergang und so die Probe ohne Materialschädigung trocknete.

Nach der kritischen Punkt-Trocknung mussten die trockenen, biologischen Proben zur Untersuchung im REM mit einer dünnen Schicht aus elektrisch leitenden Edelmetallen (Gold/Palladium [Au/Pd 80/20]) überzogen werden. Die Marknägel wurden hierzu mittels beidseitig klebender und leitfähiger Tabs (Fa. Plano, Wetzlar, Deutschland; Nr. G3347) auf die Probenhalter (Fa. Plano, Nr. G301) aufgeklebt und in den Sputter Coater SC7640 (Fa. VG Microtech, Uckfield, East Sussex, GB) mit angeschlossener Argon (Fa. Praxair, F50 P300, Nr. 645519) Zufuhr und Rotationspumpe (Edwards RV5; Fa. Boc Edwards, Crawley, West Sussex, GB) eingesetzt. Die Marknägel wurden für 220 Sekunden bei 20 mA „Plasma Current“ und 1,5 kV beschichtet.

3.2.3 Abbildung der Proben mit dem REM:

Die Abbildung der Marknägel erfolgte mit dem Rasterelektronenmikroskop LEO 1530 (Fa. Zeiss, Wetzlar, Deutschland) unter Verwendung des BSE-Detektors (Backscattered Elektron/Rückstreuelektronen). Der BSE-Detektor eignete sich gut für die Darstellung der Materialkontraste (Bakterien auf dem metallischen Implantat), wobei die Topographie nur gering abgebildet werden konnte. Ab einer Vergrößerung von 10000 waren die Bakterien gut erkennbar.

3.3 Probenpräparation für die Histologie

3.3.1 Fixierung und Entkalkung:

Tabelle 3: Herstellung der Fixierlösung für die Paraffineinbettung

Lösung	
8 % Paraformaldehyd (PFA)	400 g PFA in 4600 ml 75° C heißes Aqua dest. einrühren bis sich das PFA gelöst hat tropfenweise 10 N NaOH zugeben bis die Lösung klar ist mit Aqua dest. auf 5 l auffüllen und nach dem Abkühlen filtrieren
0,2 M Na-Phosphatpuffer pH 7,2 – 7,4	Lösung 1: 27,6 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (MW 137,99) auf 1 l Aqua bidest Lösung 2: 35,6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (MW 177,99) auf 1 l Aqua bidest Lösung 1 mit Lösung 2 (460 ml mit 1540 ml) mischen und den pH-Wert mit Lösung 1 einstellen
4 % PFA in 0,1 M Na-Phosphatpuffer pH 7,2 – 7,4	500 ml 8 % PFA-Lösung und 500ml 0,2 M Na-Phosphatpuffer mischen

Nach der Entnahme der Tibiae wurden die Proben für 48 Stunden bei 4° C fixiert und im Anschluss daran insgesamt sechsmal für je fünf Minuten mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer gespült. Zur Entkalkung der Tibiae wurden die Knochenproben einzeln in Einbettungskassetten umgebettet.

Tabelle 4: Herstellung der Entkalkungslösung

Feststoff	
3,4 % TRIS pH 7,0 - 7,4	17 g TRIS abwiegen
10 % EDTA pH 7,4	50 g EDTA (Titriplex-III) abwiegen zusammen mit TRIS in 500 ml Aqua dest. auflösen den pH-Wert mit 10 N NaOH auf 7,0 - 7,4 einstellen und rühren bis sich beide Substanzen gelöst haben (EDTA löst sich erst ab pH 7,0)

Während der Entkalkung standen die Proben bei Raumtemperatur auf dem Schüttler und die TRIS/EDTA-Entkalkungslösung wurde alle zwei Tage gewechselt. Die Entkalkungsdauer richtete sich nach der Probengröße und war abgeschlossen wenn die Knochen eine gummiartige Konsistenz erreicht hatten. Nach der Entkalkung wurden die Proben für eine Stunde unter fließendem Leitungswasser gespült. Anschließend wurden die Proben in 70 % EtOH (Ethanol, vergällt; in Aqua dest.) bis zur Einbettung aufbewahrt.

3.3.2 Paraffineinbettung:

Die Einbettung erfolgte mit dem Leica Paraffin Einbettautomat TP1050 (Programm für Proben ab 70% Alkohol nach der Fixierung mit Formalin/Paraformaldehyd).

Tabelle 5: Übersicht der automatisierten Schritte

Lösung	Schritt	Dauer [Minuten]	Temperatur	Druck / Vakuum	Entleerung [Sekunden]	Rühren
70 % EtOH	1	30	RT	ja	120	an
70 % EtOH	2	120	RT	ja	120	an
80 % EtOH	3	150	RT	ja	120	an
96 % EtOH	4	120	RT	ja	120	an
100 % EtOH	5	180	RT	ja	120	an
100 % EtOH	6	180	RT	ja	120	an
100 % EtOH	7	180	RT	ja	120	an
Xylol	8	60	RT	ja	120	an

Xylol	9	45	RT	ja	120	an
Xylol	10	45	RT	ja	120	an
Paraffin	Left	40	58°C	ja	120	an
Paraffin	Middle	40	58°C	ja	120	an
Paraffin	right	40	58°C	ja	120	an

Druck und Vakuum: Die Kammer wird für 90 Sekunden auf -70 kPa evakuiert, 30 Sekunden belüftet, für 90 Sekunden auf einen Druck von 35 kPa gebracht und wieder 30 Sekunden belüftet. Dieser Zyklus wird alle 4 Minuten wiederholt.

Das Ausbetten der Präparate erfolgte von Hand an der Leica Paraffinausgießstation am nächsten Tag. Hierbei wurde darauf geachtet, dass alle Tibiae mit der offenen Markraumseite nach unten eingegossen wurden.

3.3.3 Schnittherstellung:

Die Paraffinblöcke mit den Tibiae wurden vorgekühlt (48 Stunden bei 4° C) auf dem Rotationsmikrotom (Thermo Scientific HM355S, Dreieich, Deutschland) in 5 µm dicke Schnitte geschnitten. Die Schnitte trockneten kurz bei Raumtemperatur danach für 24 Stunden bei 37° C im Brutschrank. Anschließend konnten die Schnitte für die Histologie gefärbt werden.

3.4 Histologie

3.4.1 Toluidinblau Färbung:

Bei der Toluidinblau Färbung handelt es sich um eine metachromatische Färbung, wodurch unterschiedliche (zelluläre) Strukturen verschiedene Farben haben können, obwohl nur ein Farbstoff verwendet wird. Mineralisierte Knochenmatrix ist ungefärbt bis blassblau, Knorpelmatrix und Mastzellgranula sind rotviolett und Kollagenfasern, Zellen, Zellkerne sowie Osteoid sind blau.

Tabelle 6: Präparation der Lösung für die Toluidinblau Färbung

Lösung	
Lösung A	8 g Natrium-Tetraborat (Borax) und 8 g Toluidinblau O in 800 ml Aqua dest. lösen (15 Minuten auf dem Magnetrührer)
Lösung B	2 g Pyronin G in 200 ml Aqua dest. lösen (15 Minuten auf dem Magnetrührer)
gebrauchsfertige Färbelösung	Lösung A und Lösung B mischen und 1 zu 1 mit Aqua dest. verdünnen, anschließend zweimal filtrieren

Färbeprotokoll:

1. Entparaffinieren mit Xylol für 2 x 5 Minuten
2. Rehydrieren mit der absteigenden Alkoholreihe (100 %; 96 %; 70 %) für je 5 Minuten
3. Waschen mit Aqua dest. für 2 x 5 Minuten
4. Färben mit der gebrauchsfertigen Färbelösung für 90 Sekunden
5. mit Aqua dest. abspülen
6. Differenzieren/Dehydrieren mit der aufsteigenden Alkoholreihe (70 %; 96 %; 100 %) für je 5 Minuten
7. Xylol für 2 x 5 Minuten
8. Eindeckeln mit DePex

3.4.2 Gram-Färbung:

Die Gram-Färbung dient zum Nachweis von Bakterien und es können grampositive von gramnegativen Bakterien unterschieden werden. *S. aureus* zählt zu den grampositiven Bakterien und wird dunkelblau angefärbt. Mineralisierte Knochenmatrix erscheint in der Gram-Färbung blassrosa und Zellkerne sowie Knorpelmatrix erscheinen rosarot.

Für die Gram-Färbung wurde von der Fa. Merck (Darmstadt, Deutschland) das Kit: Gram-Color modifiziert (Nr. 1.01603.0001) verwendet.

Tabelle 7: Präparation der Lösungen für die Gram-Färbung

Lösung	
Reagenz 1	Reagenz 1a (Kristallviolettlösung) und Reagenz 1b (Natriumhydrogencarbonatlösung) im Verhältnis 1 zu 1 mischen
Reagenz 4	Reagenz 4 (Fuchsinlösung) im Verhältnis 1 zu 2 mit Aqua dest. Verdünnen
Entfärbelösung	Aceton und Ethanol im Verhältnis 1 zu 1 mischen

Färbeprotokoll:

1. Entparaffinieren mit Xylol für 2 x 5 Minuten
2. Rehydrieren mit der absteigenden Alkoholreihe (100 %; 96 %; 70 %) für je 5 Minuten
3. Waschen mit Aqua dest. für 2 x 5 Minuten
4. Färben mit Reagenz 1 für 30 Sekunden
5. Abspülen mit Aqua dest.
6. Färben mit Reagenz 2 (Lugols Lösung) für 1 Minute
7. Proben in Entfärbelösung schwenken bis keine Schlieren mehr zu sehen sind
8. Abspülen mit Aqua dest.
9. Reagenz 4 für 30 Sekunden
10. Waschen für 3 x 5 Minuten
11. Trocknen bei 50° C im Brutschrank für 2 Stunden
12. kurz in Xylol eintauchen und anschließend mit DePex eindeckeln

3.4.3 TRAP-Enzymhistochemie:

Die Tartrat resistente saure Phosphatase (TRAP) ist ein Enzym, welches ausschließlich von aktiv phagozytierenden Zellen wie Osteoklasten und Chondroklasten aber auch Makrophagen oder Riesenzellen sezerniert wird. Daher wird es als ein histologischer Marker für diese Zellarten eingesetzt. TRAP-positive Zellen erscheinen hierbei als intensiv rot gefärbte Zellen. Mehrkernige TRAP-positive Zellen, die an der Knochenoberfläche aufliegen, wurden als Osteoklasten identifiziert.

Tabelle 8: Präparation der Lösungen für die TRAP-Enzymhistochemie

Lösung	
0,1 M Na-Acetatpuffer pH 5,2	82,03 g/l Natriumacetat in Aqua dest. lösen, mit 25 % HCL auf pH 5,2 einstellen (Stammlösung; 1 M) Stammlösung 1 zu 9 mit Aqua dest. verdünnen
Substrat-Lösung 1	35 mg Naphtol-AS-TR-Phosphat in 125 µl N-N-Dimethylformamid lösen
Substrat-Lösung 2	2a: 57,5 mg di-Natriumtartrat-Dihydrat in 1 ml Na-Acetatpuffer lösen 2b: 35 mg Echtrotsalzin 1 ml Na-Acetatpuffer lösen Erst 2a und dann 2b in 23 ml vorgelegtem Na-Acetatpuffer lösen
Substratlösung (gebrauchsfertig)	Substrat-Lösung 1 in Substrat-Lösung 2 pipettieren und mischen Lösung vor Gebrauch über einen Spritzenfilter geben
Shandon Instant-Hämatoxylin	Teil A und Teil B in 1 l Aqua dest. einrühren und mischen

	Hämatoxylin-Lösung im Verhältnis 1 plus 3 mit Aqua dest. mischen und vor Gebrauch filtrieren
Kaisers-Glyceringelatine	Kurz vor Gebrauch im Wasserbad verflüssigen

Färbeprotokoll:

1. Entparaffinieren mit Xylol für 2 x 5 Minuten
2. Rehydrieren mit der absteigenden Alkoholreihe (100 %; 96 %; 70 %) für je 5 Minuten
3. Waschen mit Aqua dest. für 2 x 5 Minuten
4. 0,1 M Na-Acetatpuffer für 10 Minuten
5. Färben mit der Substratlösung für 45 Minuten bei 37° C im Brutschrank (feuchte Kammer)
6. Färbelösung vorsichtig abklopfen
7. Spülen in Aqua dest. 3 x 5 Minuten
8. Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 1 Minute
9. Spülen mit Aqua dest. für 1 Minute
10. Bläuen mit fließendem Leitungswasser für 10 Minuten
11. Spülen mit Aqua dest. für 5 Minuten und anschließend eindeckeln mit Kaisers Glyceringelatine

3.4.4 Movat Pentachrom Färbung:

Bei der Movat Pentachrom Färbung werden fünf Farbstoffe (Alcianblau, Weigert's Eisen-hämatoxylin, Brilliant-Crocein, Säurefuchsin und Safran) kombiniert und ermöglicht daher die Darstellung verschiedener Gewebeelemente am gleichen histologischen Schnitt. Hierbei zeigt sich folgendes Farbspektrum in den histologischen Schnitten:

- mineralisierter Knochen: dunkelgelb
- mineralisiertes Knorpelgewebe: blau-grün
- Osteoid: dunkelrot
- kollagenes Bindegewebe: hellgelb
- elastische Fasern: rot
- Muskulatur: rot
- Zellkerne: blau-schwarz
- Zytoplasma: rötlich
- saure Glukosaminoglykane: leuchtend hellblau

Tabelle 9: Präparation der Lösungen für die Movat Pentachrom Färbung

Lösungen	
Alcianblau	gebrauchsfertige Lösung
Alkalischer Ethanol pH > 8	20 ml 25 % Ammoniaklösung (Ammonium Hydroxid) mit 180 ml 96 % Ethanol mischen
Hämatoxylin	Weigert's Hämatoxylinlösung A und Hämatoxylinlösung B im Verhältnis 1 zu 1 mischen
Brilliant-Crocein	0,1 g Brilliant-Crocein R in 99,5 ml Aqua dest. lösen, 0,5 ml Essigsäure zugeben und anschließend filtrieren
Säurefuchsin	0,1 g Säurefuchsin in 99,5 ml Aqua dest. lösen, 0,5 ml Essigsäure zugeben und vor Gebrauch filtrieren
Phosphomolybdänsäure	5 g Phosphomolybdänsäure in 100 ml Aqua dest. lösen und anschließend filtrieren
Saffron du Gatinais (Safran)	6 g Saffron du Gatinais in 100 ml 100 %-igem Ethanol lösen, bei 50° C für 48 Stunden im Wärmeschrank inkubieren und vor Gebrauch filtrieren

Färbeprotokoll:

1. Entparaffinieren mit Xylol für 2 x 5 Minuten
2. Rehydrieren mit der absteigenden Alkoholreihe (100 %; 96 %; 70 %) für je 5 Minuten
3. Waschen mit Aqua dest. für 2 x 5 Minuten
4. Färben mit Alcianblau für 10 Minuten
5. Spülen mit Leitungswasser für 5 Minuten
6. Stabilisieren in alkalischem Ethanol für 60 Minuten
7. Spülen unter fließendem Leitungswasser für 10 Minuten
8. Waschen in Aqua dest. (kurz eintauchen)
9. Färben mit Hämatoxylin für 10 Minuten
10. Spülen in Aqua dest.
11. Leitungswasser für 15 Minuten
12. Färben mit Brilliant-Crocein-Säurefuchsin für 12,5 Minuten
13. Differenzieren mit 0,5 % Essigsäure für 3 Minuten
14. Differenzieren mit 5% Phosphomolybdänsäure für 20 Minuten
15. Spülen mit 0,5 % Essigsäure für 2 Minuten
16. 100 % Ethanol 3 x 5 Minuten
17. Färben mit Safran du Gatinais für 60 Minuten
18. 100 % Ethanol 3 x 2 Minuten
19. Xylol 2x 5 Minuten, anschließend eindecken mit DePex

3.5 Auswertung

3.5.1 Semiquantitative Auswertung:

Die semiquantitative Auswertung der gefärbten Tibiapräparate erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Die Betrachtung der Präparate erfolgte mit einem 20er und/oder einem 40er Objektiv. Hierbei wurde jedes Präparat Blickfeld für Blickfeld rasterförmig untersucht und bezüglich knöcherner und/oder zellulärer Parameter bewertet.

3.5.1.1 Auswertung der histologischen Standardfärbungen:

Die Auswertung erfolgte bei den Toluidinblau und den Movat Pentachrom gefärbten Schnitten nach folgenden Kriterien bezüglich der knöchernen und zellulären Begebenheiten in den Präparaten:

- (a) Knochenabbau: Destruktive Prozesse am Knochen ließen sich als Osteoklastenlakunen in Form von Resorptionszonen („Fraßspuren“) identifizieren (Abbildung 5A und 6A).
- (b) Knochenaufbau: Die neu gebildete Knochenfläche/Osteoid war farblich zu erkennen (Abbildung 5B und 6B).
- (c) Immunzellen: Polymorphkernige Granulozyten konnten anhand ihrer charakteristischen Kernform identifiziert werden (Abbildung 5C und 6C).
- (d) Bakterien: Ansammlungen (Cluster) von Bakterien wurden aufgrund ihrer Größe und dem hauptsächlich aus Nukleinsäure bestehenden Zellinhalt lokalisiert (Abbildung 5C und 6C).
- (e) Hämatom: Durch die Operation und Entnahmeprozedur verursachte Einblutungen konnten als interzelluläre Erythrozytenansammlungen im Markraum bestimmt werden (Abbildung 5D und 6D).

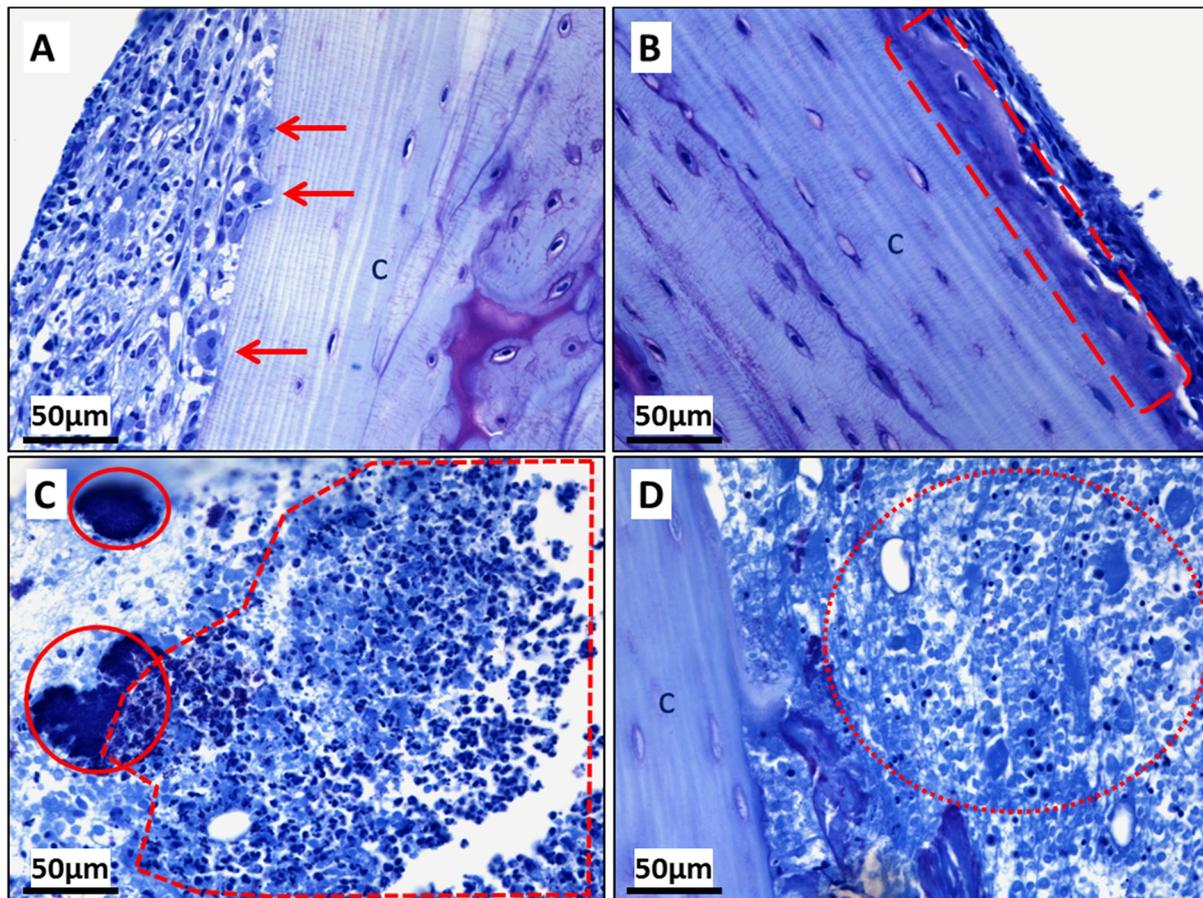


Abbildung 5: Bewertungskriterien mit der Toluidinblau Färbung. (A) Die Pfeile zeigen auf Osteoklasten und Osteoklastenlakunen am kortikalen Knochen („c“). (B) Der neu gebildete Knochen ist mit der gestrichelten Linie markiert. (C) Im Markraum sind die Bakteriencluster eingekreist und mit der gestrichelten Linie sind Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten markiert. (D) Im Markraum ist ein Hämatom (gepunktet eingekreist) erkennbar.

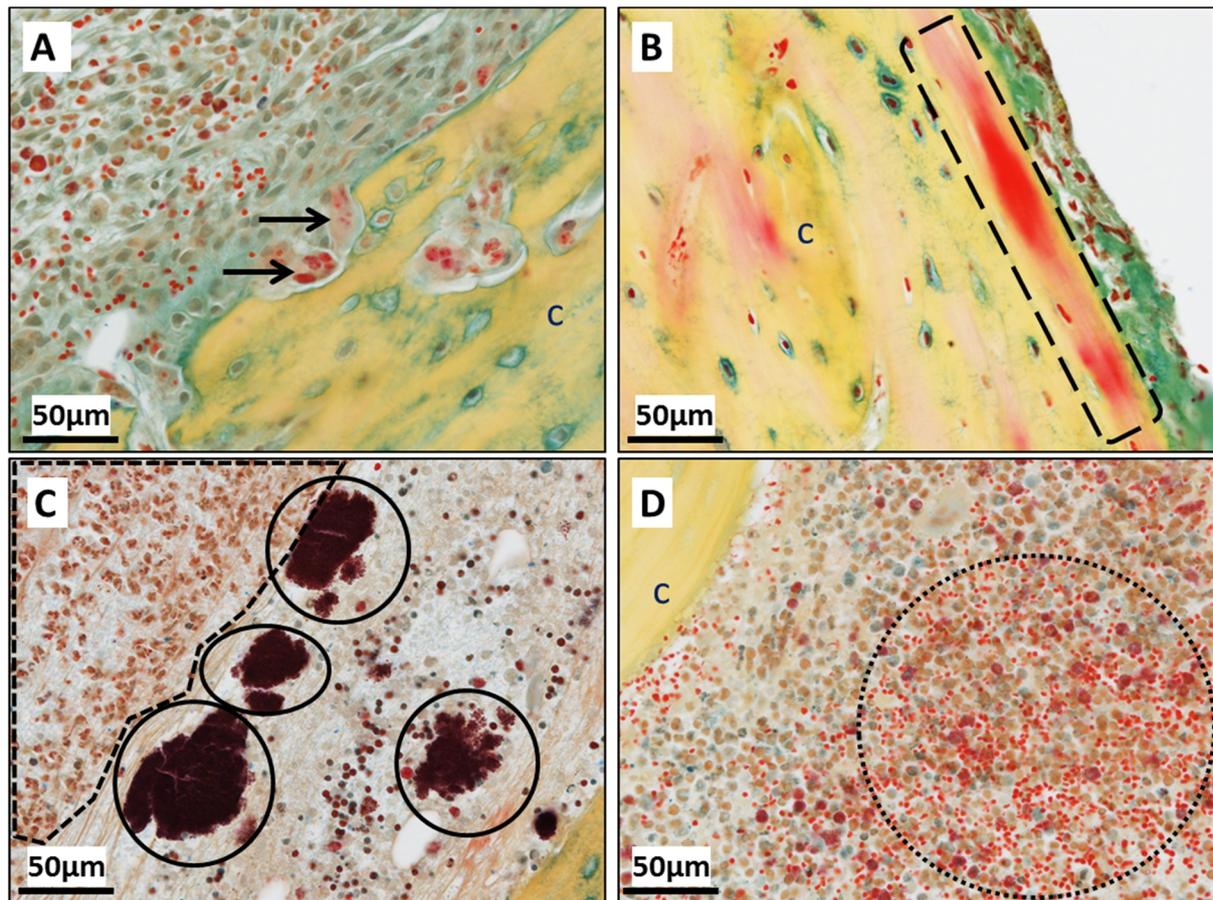


Abbildung 6: Bewertungskriterien mit der Movat Pentachrom Färbung. (A) Die Pfeile zeigen auf Osteoklasten und Osteoklastenlakunen am kortikalen Knochen („c“). (B) Der neu gebildete Knochen (Osteoid in rot) ist mit der gestrichelten Linie markiert. (C) Im Markraum sind die Bakteriencluster eingekreist und mit der gestrichelten Linie sind Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten markiert. (D) Im Markraum ist ein Hämatom (gepunktet eingekreist) erkennbar.

3.5.1.2 Auswertung der TRAP Enzymhistochemie:

TRAP-positive Zellen sind intensiv rot gefärbt und werden als Osteoklasten identifiziert, wenn sie dem Knochen anliegen und zwei oder mehr Zellkerne aufweisen.

Die Auswertung der TRAP Enzymhistochemie erfolgte nach folgenden Kriterien:

- (a) Corticalis: TRAP positive Zellen, die am kortikalen Knochenbereich der Probe anliegen (Abbildung 7A).
- (b) Wachstumsfuge: Positiv gefärbte Zellen im Bereich der Wachstumsfuge (Abbildung 7B).

(c) Trabekel: An Trabekeln anliegende, positiv gefärbte Zellen (Abbildung 7C).

(d) Sequester: TRAP positive Zellen, welche an Knochensequestern anliegen (Abbildung 7D).

(e) Frei im Markraum vorkommende TRAP positiv gefärbte Zellen (Abbildung 7D).

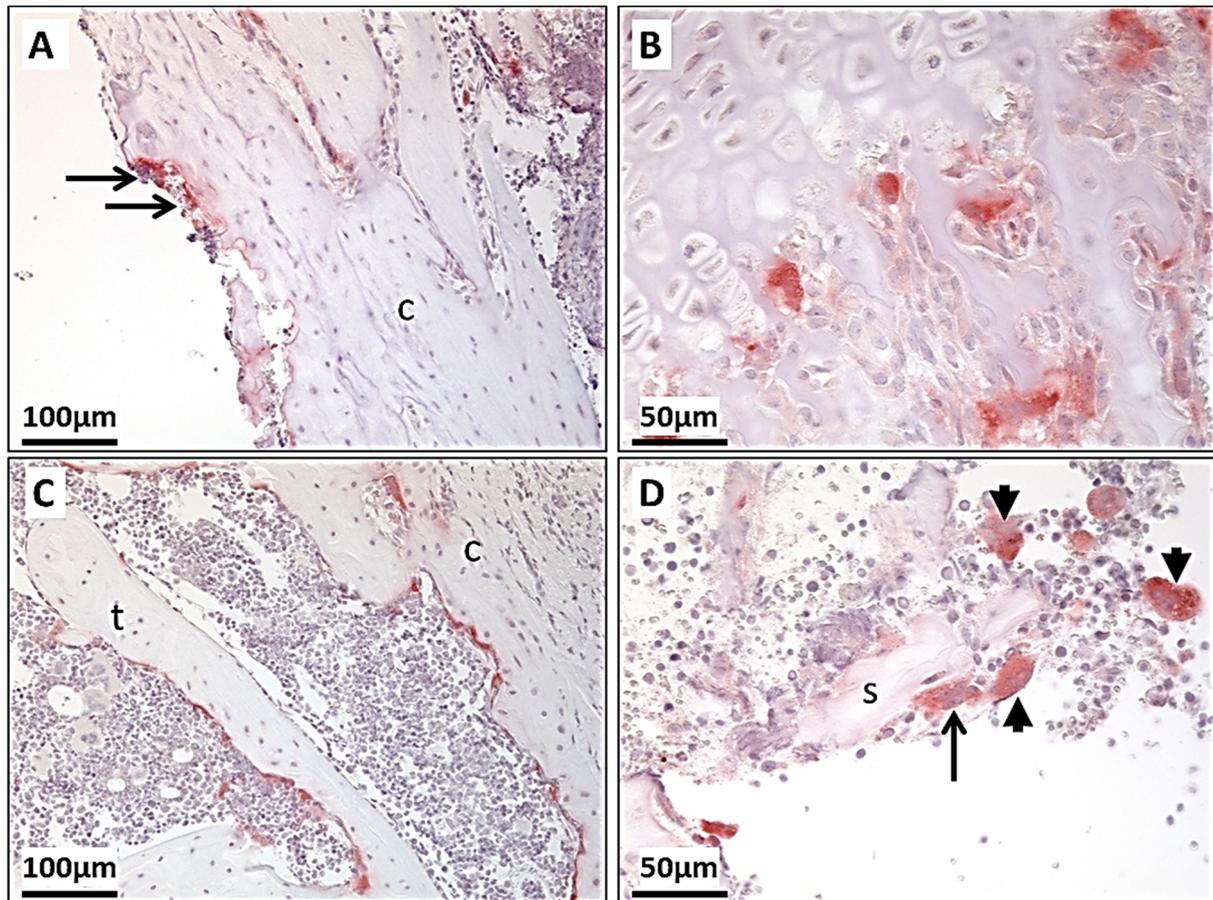


Abbildung 7: Bewertungskriterien bei der TRAP Enzymhistochemie. (A) Die Pfeile zeigen auf Osteoklasten, welche am kortikalen Knochen („c“) anliegen. (B) TRAP-positive Zellen im Bereich der Wachstumsfuge. (C) An einem Trabekeln („t“) sitzende Osteoklasten. (D) Der Pfeil zeigt auf einen Osteoklasten, welcher an einem Knochenfragment („s“ = Sequester) anliegt und frei im Markraum befindliche TRAP-positive Zellen (durch Pfeilspitzen markiert).

3.5.1.3 Auswertung der Gram-Färbung:

Gram-positive Bakterien wie *S. aureus* erscheinen blau-schwarz und sind als Cluster schon bei geringeren Vergrößerungen leicht zu erkennen.

Bei der Auswertung der Gram-Färbung wurden folgende Kriterien bewertet:

- (a) Knorpel (Cluster): Ansammlungen von Bakterien im Bereich des Gelenkknorpels und der Wachstumsfuge (Abbildung 8A).
- (b) Knorpel (einzeln): Im Bereich des Gelenkknorpels und der Wachstumsfuge einzeln vorkommende Bakterien (Abbildung 8B).
- (c) Markraum (Cluster): Ansammlungen von Bakterien im Markraum (Abbildung 8C).
- (d) Markraum (einzeln): Im Markraum einzeln liegende Bakterien (Abbildung 8D).

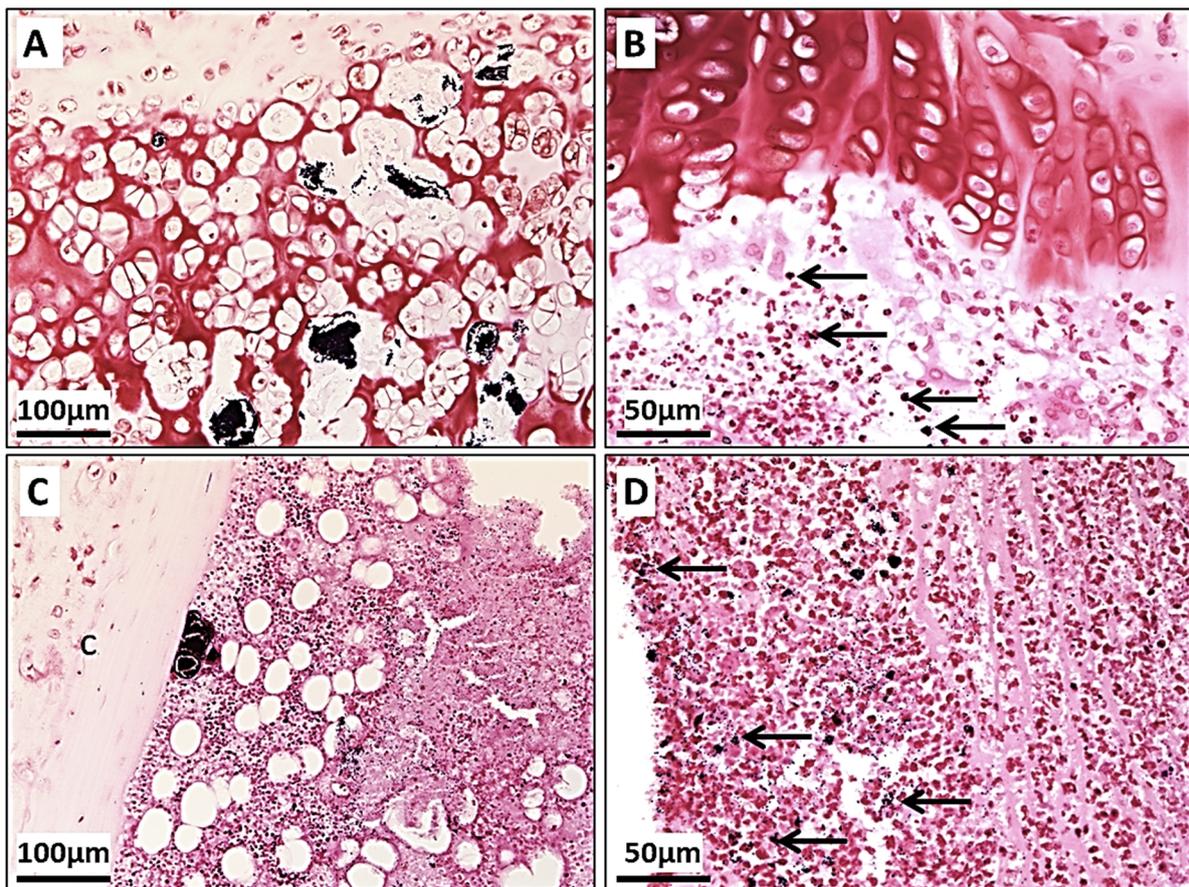


Abbildung 8: Bewertungskriterien bei der Gram-Färbung. (A) Cluster von Bakterien sind als schwarze Flecken dorsal des Gelenkknorpels erkennbar. (B) Die Pfeile deuten auf einzeln liegende Bakterien distal der proximalen Wachstumsfuge. (C) Ein Bakteriencluster an der Grenzfläche zwischen Corticalis („c“) und Markraum. (D) Einzeln liegende Bakterien im Markraum sind mit Pfeilen markiert.

3.5.1.4 Bewertung der histologischen Kriterien/“Scoring“:

Jedem Kriterium wurde abhängig von seiner Häufigkeit im Präparat ein Wert/“Score“ zwischen „0“ und „4“ zugewiesen.

„0“ = kein Vorkommen des Parameters im Präparat

„1“ = wenig und lokal begrenzt

„2“ = mittel und/oder an einigen Stellen im Präparat

„3“ = viel und lokal begrenzt

„4“ = viel und im gesamten Präparat

Die in den Negativkontrollen ermittelten Werte dienten als Referenzwerte für den Normalzustand, da diese Proben keiner Vorbehandlung oder Operation ausgesetzt waren. Alle Proben der vorbehandelten Gruppen und der Negativkontrollen wurden auf die gleiche Art entnommen und präpariert und konnten daher vergleichend bewertet werden.

Für eine individuelle Beurteilung der einzelnen Proben wurden die Werte jedes Kriteriums mit dem Maximalwert der Negativkontrollen verglichen. Hämatom, Granulozyten und Bakterien Scores oberhalb der Normalwerte wurden als Anzeichen für eine Osteomyelitis gewertet. Bei der Gram-Färbung wurden die Werte für die Bakterienhäufigkeit pro Probe addiert, um sie mit den Werten von der Toluidinblau und Movat Pentachrom Färbung beim individuellen Scoring vergleichen zu können.

Identische Werte für den Knochenaufbau und den Knochenabbau wurden als ausbalancierter, physiologischer Knochenmetabolismus gewertet. Osteoklasten-häufigkeiten oberhalb der Normalwerte an Sequestern, den Trabekeln, der Corticalis oder frei im Markraum wurden als Anzeichen für osteolytische Prozesse interpretiert.

Für jeden Wert eines Kriteriums oberhalb der Normalwerte wurde ein Punkt für diese Probe vergeben. Erhielt eine Probe bei den Kriterien Granulozyten, Hämatom und Bakterien zwei oder mehr Punkte (von drei möglichen Punkten), wurde dies als eine akute Osteomyelitis bewertet.

Ein nicht ausbalancierter Knochenmetabolismus sowie Werte oberhalb der Normalwerte bei der TRAP-Enzymhistochemie wurden ebenfalls mit jeweils einem Punkt bewertet. Punkte für diese beiden Kriterien (zusätzlich zu den oben genannten) wurden als sich etablierende akute Osteomyelitis mit dem Potential zur chronischen Osteomyelitis bewertet.

3.5.1.5 Beurteilung der Schnittqualität:

Da es sich bei den Schnitten um Serienschritte handelte, erfolgte die Beurteilung der Schnittqualität exemplarisch an den Movat Pentachrom gefärbten Schnitten. Hierbei wurden die besten Schnitte mit „1“ und die schlechtesten Schnitte mit „4“ bewertet. Eine Schnittqualität von „1“ wurde an vollständige Schnitte vergeben, wenn der Gelenksknorpel, die Wachstumsfuge, der Markraum mit seinem zellulären Inhalt und beide Corticalisäste differenziert zu erkennen waren. Die Bewertung von „2“ wurde an Schnitte vergeben, die von der Probengröße im Vergleich zu Schnitten der Qualität „1“ reduziert waren und wenn kleine Teile der Corticalisäste oder des Markrauminhaltes im Präparat fehlten. Gelenkknorpel, Wachstumsfuge, kortikaler Knochen und Markraum (mit zellulärem Inhalt) waren differenziert zu erkennen. Mit einer „3“ wurden Schnitte bewertet, die deutlich in der Präparatgröße reduziert waren und bei denen Teile der Gelenksfläche, der Wachstumsfuge, des Markraumes oder der kortikalen Knochenbereiche (auch in Kombination) nicht im Präparat erkennbar waren. Eine Bewertung von „4“ erhielten Schnitte, welche stark fragmentiert waren, keine Gelenksfläche oder Wachstumsfuge erkennen ließen und in denen sich noch kortikaler Knochen erkennen ließ. Der Markraumbereich war noch erkennbar aber der zelluläre Markrauminhalt war nur partiell erhalten.

3.5.2 Bildbearbeitung und Histomorphometrie:

Für die histomorphometrische Auswertung wurden zuerst alle Movat Pentachrom gefärbten Präparate mit dem Leica Fotomikroskop DM5500B (mit Smartpanel StP6000, Kamera Leica DCF 7000T und der Software „Leica Application Suite X – LAS X“) mit dem 5er Objektiv fotografiert. Diese Übersichtsaufnahmen wurden mit den Funktionen „Tilscan“ und „Mosaik Merge“ aufgenommen. Die Software fotografierte so den manuell markierten Bereich und setzte anschließend die aufgenommenen Einzelbilder automatisch zu einem Gesamtbild zusammen (Abbildung 9A). Alle Aufnahmen wurden als „.tif“-Datei exportiert.

Da bei der Movat Pentachrom Färbung die Muskulatur und das Osteoid rot angefärbt wurden, musste von Hand der muskuläre Anteil aus den Bildern entfernt werden. Färbeartefakte im Hintergrund oder im Markraum wurden ebenfalls entfernt, da auch sie das Ergebnis der Berechnung verfälschen konnten. Dies geschah mit der Radiergummi-Funktion von Adobe Photoshop CS6. Durch zuschneiden der Bilder (ebenfalls in Photoshop) wurde der

Hintergrundanteil der aufgenommenen Bilder verringert (Abbildung 9B), was eine schnellere Berechnung bei der Histomorphometrie ermöglichte.

3.5.2.1 Histomorphometrie:

Die halbautomatisierte Histomorphometrie wurde mittels ImageJ (Version 1.47) und der Funktionen (Makros) „trainable Weka segmentation“ und „Weka stats automatisch“ durchgeführt. Hierzu wurde das zu berechnende Bild aufgrund seiner Gesamtgröße in Einzelbilder unterteilt (Abbildung 9C; 6 Bilder pro Spalte und 5 pro Zeile). Anhand eines Bildes wurde der „Classifier trainiert“. Hierzu werden die unterschiedlichen Bereiche im Bild (Hintergrund, mineralisierter Knochen („total ossified tissue“ = TOT), Knorpel („total cartilage tissue“ = TCT) und nicht-mineralisierte Matrix von Hand markiert und den entsprechenden Kategorien zugeteilt. Der „Classifier“ analysiert das Bild aufgrund dieser markierten Kategorien und wandelt das klassifizierte Bild in ein Falschfarbenbild um (Abbildung 9D). Bevor der „trainierte Classifier“ auf alle Bilder angewendet werden konnte, wurde überprüft, ob das Programm richtig arbeitet und die Klassifizierung den Zuordnungen im Originalbild entspricht. Nach der Umwandlung aller Ausgangsbilder in Falschfarben-Teilbilder wurde der Anteil der Pixel für jede Kategorie mit „Weka Stats“ berechnet.

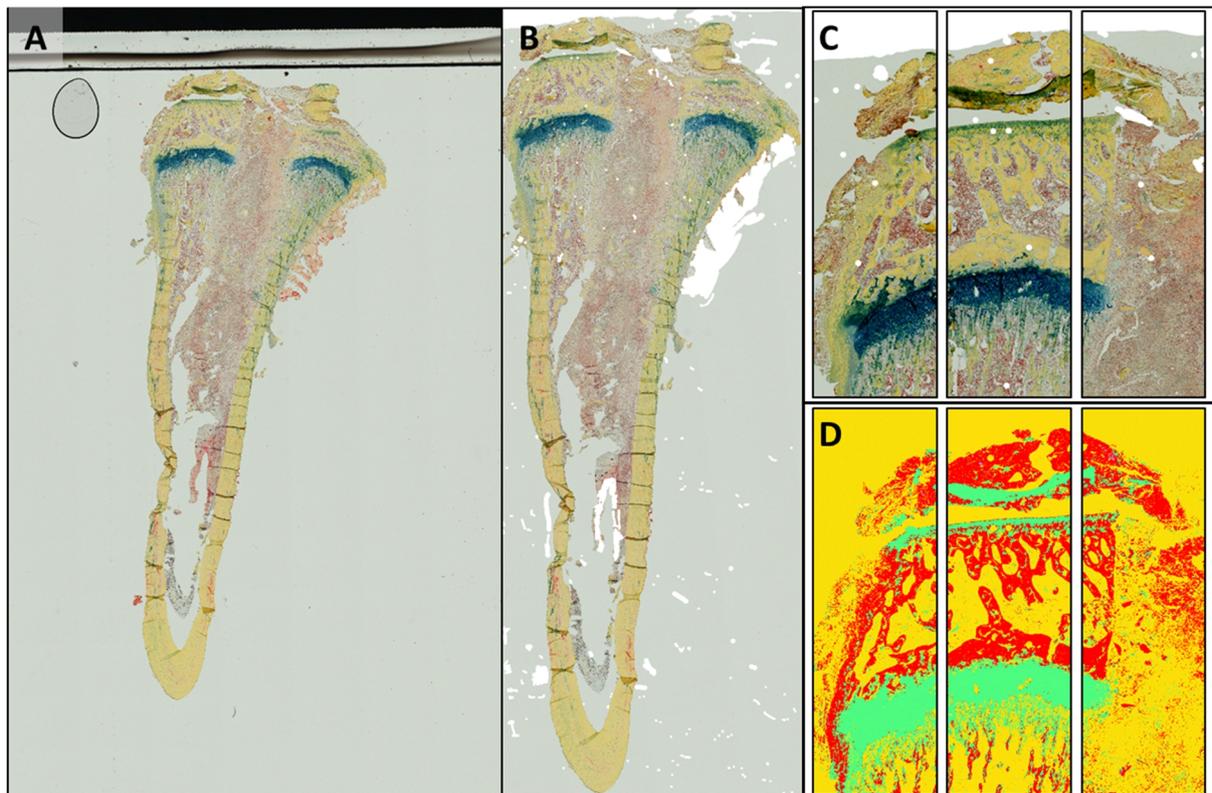


Abbildung 9: Bildpräparation für die Histomorphometrie. (A) Original Übersichtsaufnahme, (B) zugeschnittenes Bild nach der Entfernung der muskulären Anteile und Artefakte in der Aufnahme, (C) 3 von 30 Teilbildern vor Klassifizierung und (D) die gleichen Teilbilder nach automatisierter Klassifizierung (Falschfarnebilder).

3.6 Statistische Auswertung:

Die ausgegebenen Werte konnten in Excel (Microsoft Office 2013) zur Organisation der Daten exportiert und anschließend in IBM SPSS Statistics 21 zur statistischen Auswertung übertragen werden. Berechnet wurde der prozentuale Anteil an TOT, TCT und nicht-mineralisierter Matrix an der Gesamtfläche des Präparates (ohne Hintergrund). Mit der Funktion Frequenzanalyse wurden die Daten auf Normalverteilung überprüft. Der Kuskall-Wallis Test zeigte signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen und Zeitpunkten ($p \leq 0,05$). Da die Daten nicht normalverteilt waren, erfolgte die weitere statistische Auswertung in Form des Mann-Whitney-U-Tests für den Vergleich der Mittelwerte zwischen den Gruppen und Zeitpunkten. Signifikanzen wurden mit $p \leq 0,05$ und Tendenzen mit $p \leq 0,07$ identifiziert. Die grafische Darstellung erfolgte als Balkendiagramme der Mittelwerte mit Fehlerbalken (± 1 SEM).

4. Ergebnisse

4.1 Toluidinblau Färbung: erhöhter Knochenumbau und häufiger Bakterien sowie neutrophile Granulozyten drei Tage nach OP

Unter physiologischen Bedingungen ist der Knochenumbau (Aufbau und Abbau) im Gleichgewicht. Störungen dieses Gleichgewichtes sind Zeichen für Erkrankungen wie zum Beispiel übermäßiger Knochenabbau bei Osteoporose oder kortikale Auflagerungen bei chronischer Osteomyelitis. Ansammlungen von Immunzellen oder das Vorhandensein von Bakterien sind Zeichen für eine bestehende Infektion. Die Anwesenheit von Hämatom(en) ist ein Hinweis auf eine vorangegangene Verletzung. Mit der Toluidinblau Färbung konnte histologisch der Knochenaufbau, der Knochenabbau, Ansammlungen von Bakterien und Granulozyten sowie das Vorhandensein eines Hämatoms beurteilt werden (Abbildungen 10; 11 und 13). Hierbei zeigte sich ein erhöhter Knochenumbau, und häufigeres Auftreten von Granulozyten und Bakterien drei Tage nach Infektion/OP im Vergleich zur Negativkontrolle (Abbildungen 12 und 14).

Bei insgesamt zwei Proben aus Gruppe 1 (je eine von Tag 4 und Tag 6) und einer Negativkontrolle von Tag 4 konnte nur der Knochenaufbau und Knochenabbau am Präparat beurteilt werden, da der Markraum nicht in ausreichender Fläche angeschnitten war. Bei einer Probe aus Gruppe 3 (neg. ODN; Tag 4) musste die Beurteilung auf die Bakterien, die Granulozyten und das Hämatom beschränkt werden, da der knöcherne Bereich nur partiell und ungleichmäßig angeschnitten war.

Knochenabbau:

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatten acht Proben einen Wert von „2“ (mittel/an einigen Stellen“) und eine Probe einen Wert von „3“ („viel aber lokal begrenzt“) bezüglich des Knochenabbaus. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten drei Proben einen Wert von „2“ und sechs Proben einen Wert von „3“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hat eine Probe einen Wert von „1“ („wenig/lokal begrenzt“), vier Proben einen Wert von „2“ und drei Proben einen Wert von „3“. Die Negativkontrolle (K) hatte einmal den Wert „1“ und zweimal den Wert „2“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle waren bei allen drei Versuchsgruppen häufiger höhere Werte für den Knochenabbau zu erkennen. Die höchsten Werte traten bei Gruppe 2 auf, gefolgt von Gruppe 3 und Gruppe 1, welche von den Versuchsgruppen den geringsten Wert hatte.

Am dritten Tag nach der OP hatten zwei Proben der Positivkontrolle (Gruppe 1) einen Wert von „2“ und sieben Proben einen Wert von „3“ bezüglich des Knochenabbaus. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten acht Proben einen Wert von „3“ und eine Probe einen Wert von „4“ („viel im gesamten Präparat“). Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatte eine Probe den Wert von „2“ und acht Proben einen Wert von „3“. Die Negativkontrolle (K) hatte bei allen drei Proben einen Wert von „2“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle mit den geringsten Werten bezüglich des Knochenabbaus, zeigten die Gruppen 1 und 3 höhere Werte und der intensivste Knochenabbau war bei Gruppe 2 zu finden.

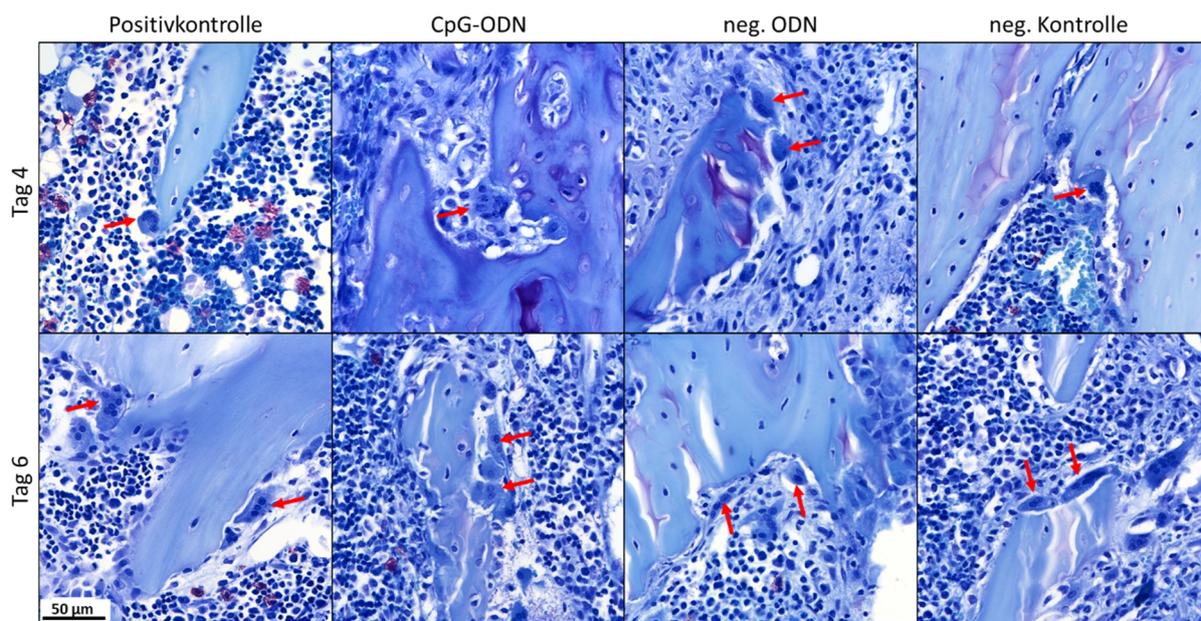


Abbildung 10: Beispielfotografien für katabole Prozesse am Knochen mit der Toluidinblau Färbung. Die Pfeile zeigen auf Osteoklasten und dieser Zelltyp war in allen Gruppen sowie zu beiden Zeitpunkten zu finden.

Beim Vergleich zwischen den Gruppen und Zeitpunkten zeigte sich am ersten postoperativen Tag innerhalb der Gruppen weniger Knochenabbau als am dritten Tag nach der OP. Die niedrigsten Werte waren bei den Negativkontrollen und bei Gruppe 1 an Tag 4 zu finden. Von Gruppe 3 über Gruppe 2 (beide an Tag 4) zu Gruppe 1 und Gruppe 3 (beide an Tag 6) stiegen die Werte an. Am häufigsten war der Knochenabbau bei Gruppe 2 an Tag 6 (Abbildung 12A).

Knochenaufbau:

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatten alle Proben einen Wert von „2“ („mittel/an einigen Stellen“) bezüglich des Knochenaufbaus. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten fünf Proben einen Wert von „2“ und vier Proben einen Wert von „3“ („viel aber lokal begrenzt“). Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatte eine Proben einen Wert von „1“ („wenig und lokal begrenzt“), fünf Proben einen Wert von „2“ und zwei Proben einen Wert von „3“. Die Negativkontrolle (K) hatte einmal den Wert „1“ und zweimal den Wert „2“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigten die Versuchsgruppen höhere Werte bezüglich des Knochenaufbaus. Die höchsten Werte waren bei Gruppe 2 zu finden. Bei Gruppe 3 waren der Knochenaufbau weniger stark und Gruppe 1 zeigte den geringsten Werte im Vergleich der Versuchsgruppen.

Am dritten Tag nach der OP hatten fünf Proben der Positivkontrolle (Gruppe 1) einen Wert von „2“ und vier Proben einen Wert von „3“ bezüglich des Knochenaufbaus. In Gruppe 2 (500 µg CpG) haben alle Proben einen Wert von „3“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) haben zwei Proben einen Wert von „2“ und sieben Proben einen Wert von „3“. Die Negativkontrolle (K) hatte bei allen drei Proben einen Wert von „2“.

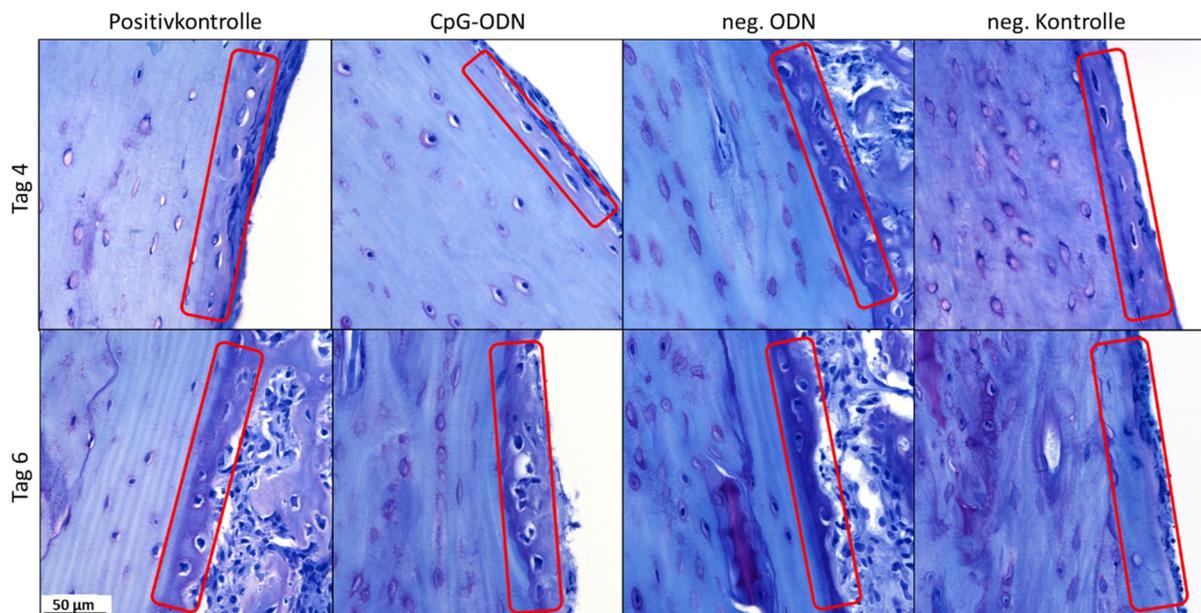


Abbildung 11: Beispielfotografien für anabole Prozesse am Knochen mit der Toluidinblau Färbung. Neu gebildeter Knochen ist rot umrandet und in allen Gruppen sowie zu beiden Zeitpunkten zu finden.

Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigten die Versuchsgruppen höhere Werte bezüglich des Knochenaufbaus. Die höchsten Werte waren bei Gruppe 2 zu finden, gefolgt von Gruppe 3 und Gruppe 2 mit den geringsten Werten für den Knochenaufbau.

Beim Vergleich zwischen den Gruppen und den Zeitpunkten zeigten die Negativkontrollen (Tag 4 und Tag 6) und die Gruppe 1 an Tag 4 die niedrigsten Werte für den Knochenaufbau. Prinzipiell war drei Tage nach der OP bei allen Gruppen mehr Knochenaufbau zu beobachten als am ersten postoperativen Tag. Zunehmender Knochenaufbau war bei Gruppe 3 an Tag 4 gefolgt von Gruppe 1 an Tag 6 und Gruppe 2 an Tag 4 zu Gruppe 2 an Tag 4 und Gruppe 3 an Tag 6 zu beobachten. Die höchsten Werte für den Knochenaufbau wurden in Gruppe 2 an Tag 6 erreicht (Abbildung 12B).

Die anabolen und katabolen Prozesse im Knochen (Abbildungen 12A und B) zeigten sich bei den Negativkontrollen und bei der CpG-vorbehandelten Gruppe am ersten Tag nach der OP ausbalanciert. Am ersten postoperativen Tag zeigten sich bei Gruppe 1 und zwei sowie an beiden Zeitpunkten bei Gruppe 3 annähernd ausbalancierte Verhältnisse mit einer leichten Verschiebung zugunsten des Knochenabbaus. Bei der Positivkontrolle zeigte sich drei Tage nach der OP ein Ungleichgewicht mit häufiger auftretendem Knochenabbau als Knochenaufbau.

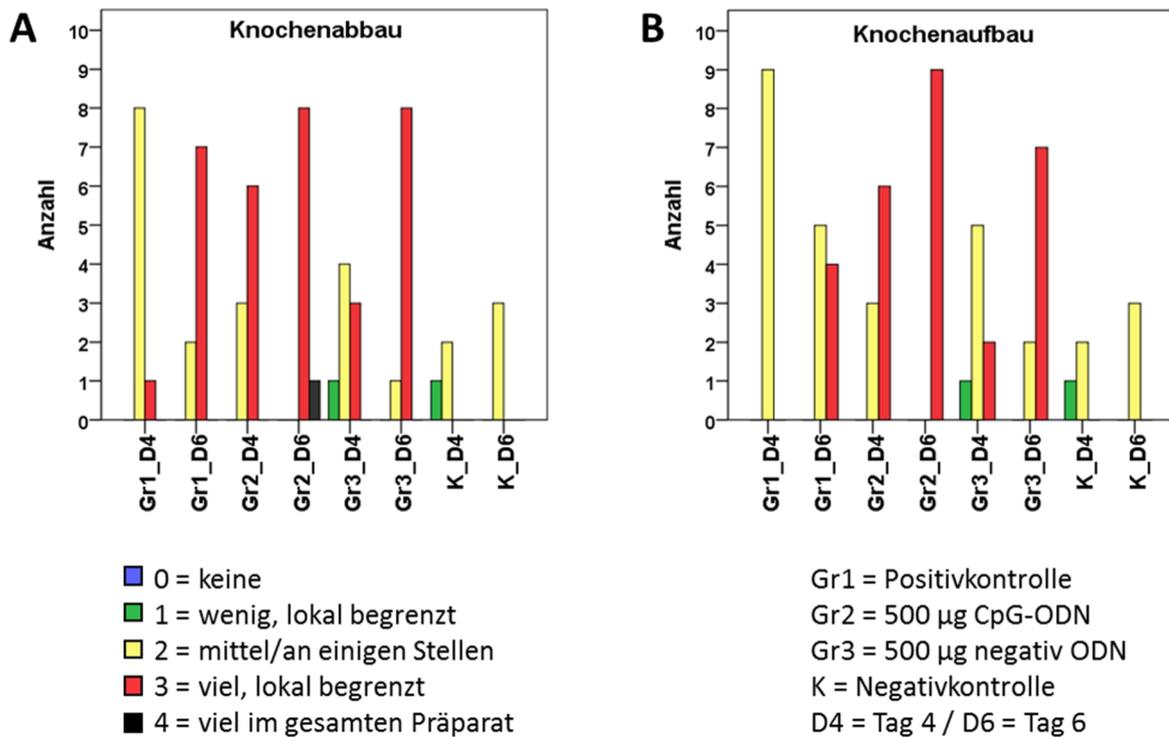


Abbildung 12: Gegenüberstellung der Gruppen bezüglich der untersuchten knöchernen Parameter (Toluidinblau). (A+B) Anabole und katabole Prozesse im Knochen waren an Tag 6 häufiger als an Tag 4. In den vorbehandelten Gruppen war der Knochenabbau häufiger als der Knochenaufbau.

Granulozyten:

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatte eine Probe einen Wert von „1“ („wenig/lokal begrenzt“), vier Proben hatten einen Wert von „2“ („mittel/an einigen Stellen“) und drei Proben hatten einen Wert von „3“ („viel aber lokal begrenzt“) bezüglich der Ansammlungen von Granulozyten im Präparat. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatte eine Probe einen Wert von „1“, fünf Proben hatten einen Wert von „2“ und drei Proben hatten einen Wert von „3“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatte eine Probe einen Wert von „1“, sechs Proben hatten einen Wert von „2“ und zwei Proben hatten einen Wert von „3“. Die Proben der Negativkontrolle (K) hatten einen Wert von „0“ („keine“).

Im Vergleich zur Negativkontrolle waren in allen vorbehandelten Gruppen Ansammlungen neutrophiler Granulozyten zu finden. Von den vorbehandelten Gruppen enthielt die negativ ODN Gruppe weniger häufig neutrophile Granulozyten als die Positivkontrolle oder die CpG-ODN Gruppe.

Am dritten Tag nach der OP hatten sieben Proben der Positivkontrolle (Gruppe 1) einen Wert von „3“ und eine Probe hatte einen Wert von „4“ bezüglich der Ansammlungen von Granulozyten. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten drei Proben einen Wert von „2“, vier Proben einen Wert von „3“ und zwei Proben einen Wert von „4“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten ebenfalls drei Proben einen Wert von „2“, vier Proben einen Wert von „3“ und zwei Proben einen Wert von „4“. Zwei Proben der Negativkontrolle (K) hatten einen Wert von „0“ und eine Probe hatte einen Wert von „1“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle, welche keine oder nur wenig Granulozyten-ansammlungen enthielten, war die Häufigkeit von Granulozyten in allen andern Gruppen erhöht. Die Gruppen 2 und 3 enthielten gleich häufig Granulozyten und deren Häufigkeit wurde in Gruppe 1 noch überschritten.

Beim Vergleich zwischen den Gruppen und Zeitpunkten waren in den Proben am ersten postoperativen Tag prinzipiell weniger häufig Ansammlungen von Granulozyten enthalten als in den Proben vom dritten Tag nach der OP. Nach den Negativkontrollen enthielten die Proben aus Gruppe 3 an Tag 4 die wenigsten Granulozyten. Danach folgten Gruppe 1 und 2 (beide an Tag 4) mit vergleichbar vielen Granulozyten. Die Gruppen 2 und 3 (an Tag 6) zeigten identisch viele Granulozyten und deren Häufigkeit wurde nur von Gruppe 1 an Tag 6 überschritten (Abbildung 14A).

Bakterien:

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatte je eine Probe den Wert „0“ („keine“) und „1“ („wenig/lokal begrenzt“), drei Proben den Wert von „2“ („mittel/an einigen Stellen“) und ebenfalls drei Proben den Wert von „3“ („viel aber lokal begrenzt“) bezüglich des Vorkommens von Bakterien(-Clustern) im Präparat. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatte eine Probe einen Wert von „1“, zwei Proben hatten einen Wert von „2“ und sechs Proben hatten einen Wert von „3“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten zwei Proben einen Wert von „0“, vier Proben einen Wert von „2“ und drei Proben einen Wert von „3“. Alle drei Proben der Negativkontrolle waren bakteriell unbelastet und hatten einen Wert von „0“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle, in welcher keine Bakterien nachgewiesen werden konnten, waren die Versuchsgruppen in ähnlichem Maße mit Bakterien belastet. Die geringste Belastung war bei der negativ ODN Gruppe zu finden. Die Positivkontrollen und CpG-ODN Proben enthielten häufiger Bakteriencluster.

Am dritten Tag nach der OP hatte eine Probe der Positivkontrolle (Gruppe 1) einen Wert von „1“, vier Proben hatten einen Wert von „3“ und drei Proben einen Wert von „4“ („viel und im gesamten Präparat“) bezüglich des Vorkommens von Bakterien(-Clustern). In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten jeweils drei Proben den Wert von „2“, „3“ beziehungsweise „4“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatte jeweils eine Probe den Wert von „1“ beziehungsweise „2“, vier Proben hatten einen Wert von „3“ und drei Proben einen Wert von „4“. Zwei Proben der Negativkontrolle (K) waren unbelastet mit einem Wert von „0“ und eine Probe hatte einen Wert von „1“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle waren alle vorbehandelten und operierten Gruppen an Tag 6 häufiger mit Bakterien belastet. Die Häufigkeit von Bakterienclustern war bei allen drei vorbehandelten Gruppen annähernd gleich.

Beim Vergleich zwischen den Gruppen und Zeitpunkten zeigten die Proben am ersten postoperativen Tag eine geringere Belastung mit Bakterien als die Proben drei Tage nach der OP. Die Negativkontrollen waren nicht oder bei einer Probe nur wenig belastet. Proben aus Gruppe 1 und 3 (beide an Tag 4) waren ebenfalls frei von Bakterien und diese Gruppen zeigten damit die geringste Belastung bei den Versuchsgruppen. Gruppe 2 war am ersten postoperativen Tag am stärksten belastet. Am häufigsten waren Bakterien bei den PBS, CpG-ODN und negativ ODN vorbehandelten Gruppen an Tag 6 zu finden, wobei diese drei Gruppen ähnliche Häufigkeiten von Bakterien zeigten (Abbildung 14B).

Hämatom:

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatte eine Probe einen Wert von „2“ („mittel/an einigen Stellen“), zwei Proben hatten einen Wert von „3“ („viel aber lokal begrenzt“) und fünf Proben hatten einen Wert von „4“ („viel im gesamten Präparat“) bezüglich der Präsenz eines Hämatoms im Präparat. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatte eine Probe einen Wert von „2“, fünf Proben hatten einen Wert von „3“ und drei Proben hatten einen Wert von „4“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatte eine Probe einen Wert von „1“ („wenig/lokal begrenzt“), zwei Proben hatten einen Wert von „2“, fünf Proben hatten einen Wert von „3“ und eine Probe hatte einen Wert von „4“. Die Proben der Negativkontrolle (K) hatten einen Wert von „1“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle, welche nur wenig und lokal begrenzt Hämatom enthielt, waren alle anderen Gruppen häufiger und intensiver mit Hämatom durchsetzt. Die geringste Häufigkeit von Hämatomen war in Gruppe 3 und die größte Häufigkeit in Gruppe 1 zu finden.

Am dritten Tag nach der OP hatten jeweils vier Proben der Positivkontrolle (Gruppe 1) einen Wert von „3“ oder „4“ bezüglich der Präsenz eines Hämatoms im Präparat. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten vier Proben einen Wert von „3“ und fünf Proben einen Wert von „4“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatte eine Probe einen Wert von „2“, fünf Proben hatten einen Wert von „3“ und drei Proben hatten einen Wert von „4“. Zwei Proben der Negativkontrolle hatten einen Wert von „0“ und eine Probe hatte einen Wert von „3“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle enthielten alle Gruppen häufiger Hämatome, wobei in Gruppe 3 weniger Hämatom als in Gruppe 1 zu erkennen war. Die größte Häufigkeit an Hämatom war in Gruppe 2 zu finden. Von den vorbehandelten Gruppen enthielt die Gruppe 3 (neg. ODN) an Tag 4 die geringste Häufigkeit an Hämatom. Die Proben aus Gruppe 3 an Tag 6 und Gruppe 2 an Tag 4 zeigten identische Häufigkeiten der Hämatome. Noch häufiger waren Hämatome an beiden Zeitpunkten in den Positivkontrollen enthalten und die größte Häufigkeit von Hämatomen war in der CpG-ODN Gruppe an Tag 4 zu finden (Abbildung 14C).

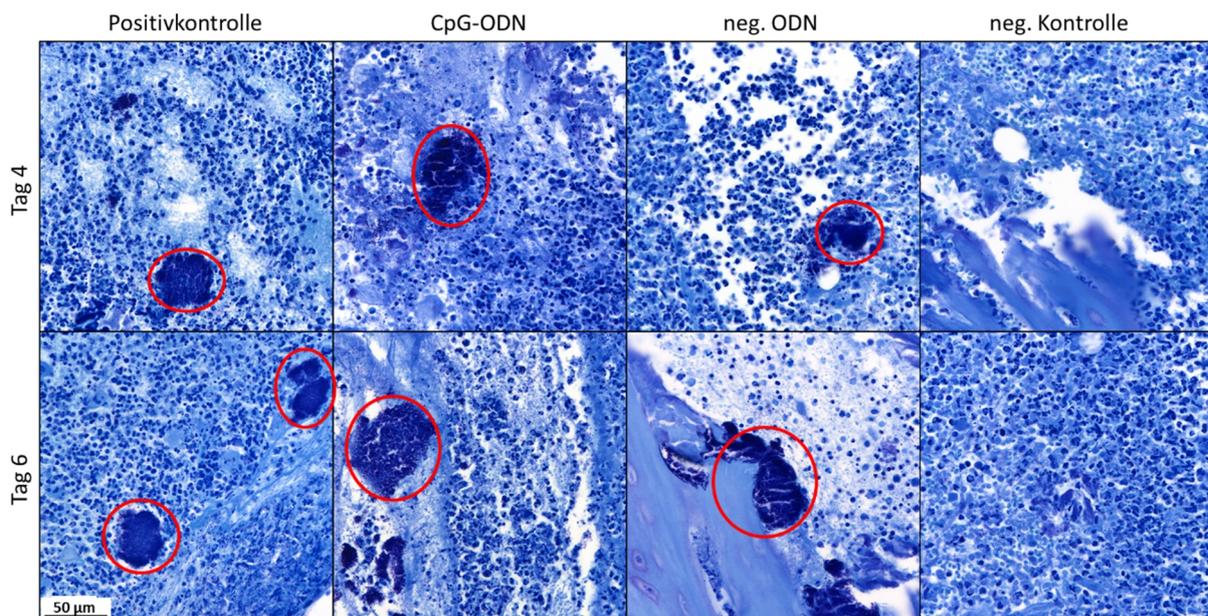


Abbildung 13: Beispielbilder für die zellulären Parameter mit der Toluidinblau Färbung. Bakteriencluster sind rot umkreist und waren in allen vorbehandelten Gruppen und zu beiden Zeitpunkten zu finden. Ansammlungen neutrophiler Granulozyten waren häufig neben Bakterienclustern lokalisieren. Hämatome waren in allen Gruppen (auch in den Negativkontrollen) erkennbar.

Bei der Beurteilung der zelluläre Parameter (Abbildung 14) zeigte sich, dass in den Proben ohne Bakteriencluster auch keine Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten enthielten.

Proben mit einer größeren Häufigkeit von Bakterien (alle vorbehandelten und operierten Gruppen an Tag 6) enthielten auch häufiger neutrophile Granulozyten. Die Positivkontrolle wie auch die CpG-vorbehandelte Gruppe zeigten einen Tag nach der OP sowohl eine mittlere Häufigkeit von Bakterien wie auch Granulozyten. Von den vorbehandelten Gruppen enthielt die negativ ODN-Gruppe am ersten postoperativen Tag am seltensten Hämatom, Granulozyten und Bakterien sowie niedrige Werte für den Knochenmetabolismus. Hierdurch wurde ein positiver Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von Bakterienclustern und Ansammlungen neutrophiler Granulozyten als Reaktion auf die Behandlungsprozedur erkennbar. Das Immunsystem reagierte mit der Infiltration von neutrophilen Granulozyten in den Markraum, um die beginnende bakterielle Infektion zu bekämpfen. Die Entstehung eines Hämatoms ließ sich durch die mechanische Manipulation während der Behandlungs- und Entnahmeprozedur erklären, da auch die unbehandelten Negativkontrollen wenn auch geringer stark ausgeprägte Hämatome enthielten.

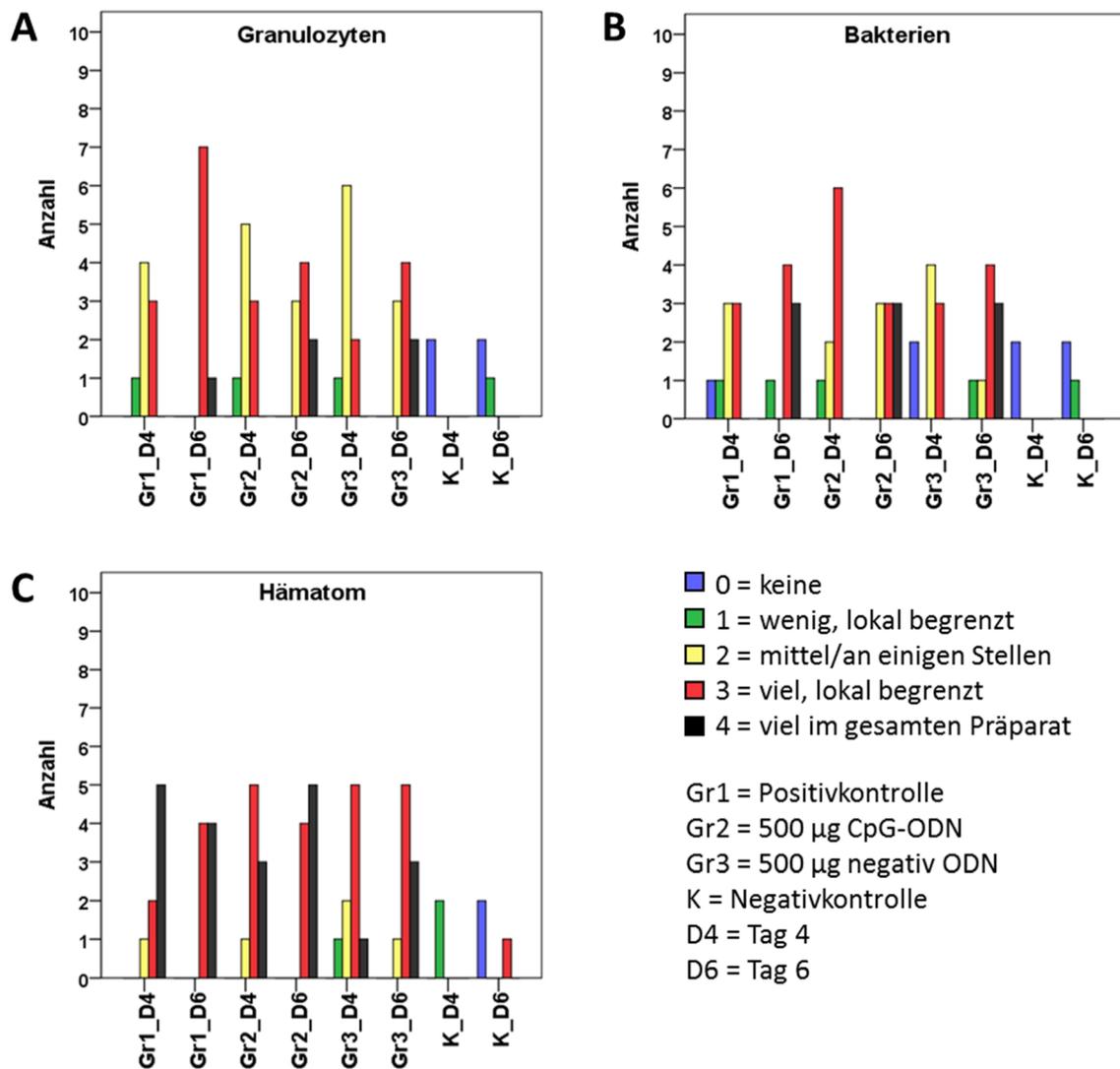


Abbildung 14: Gegenüberstellung der Gruppen bezüglich der untersuchten zellulären Parameter (Toluidinblau). Bei den zellulären Parametern waren die Häufigkeiten bei (A) den Granulozyten und (B) den Bakterien an Tag 6 gegenüber Tag 4 erhöht. Gruppen, welche häufiger Bakterien enthielten, zeigten auch größere Häufigkeiten bei den Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten. (C) In den Negativkontrollen waren die Hämatome weniger häufig als in den vorbehandelten und operierten Gruppen.

4.2 Movat Pentachrom Färbung: erhöhter Knochenumbau drei Tage nach der OP

Mit der Movat Pentachrom Färbung konnten mineralisierte von nicht-mineralisierten Knochenarealen unterschieden werden. Der Knochenaufbau, der Knochenabbau, die Häufigkeiten von Bakterienclustern und Ansammlungen neutrophiler Granulozyten sowie das

Vorhandensein eines Hämatoms konnte ebenfalls beurteilt werden (Abbildungen 15; 16 und 18). Hierbei zeigte sich der Knochenumbau am dritten Tag nach der OP/Infektion bei allen Versuchsgruppen erhöht. Bei der CpG-ODN und der negativ ODN-Gruppe war der Knochenumbau nicht ausgeglichen und es wurde häufiger Knochen abgebaut als aufgebaut (Abbildung 17). Die Häufigkeit von Bakterienclustern war bei der CpG-Gruppe drei Tage nach der OP stark erhöht und diese Gruppe enthielt zu diesem Zeitpunkt auch am häufigsten Bakterien (Abbildung 19).

Ein Schnitt aus Gruppe 3 an Tag 6 konnte bezüglich des Knochenaufbaus- und -Abbaus nicht beurteilt werden.

Knochenabbau:

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatten sieben Proben einen Wert von „2“ („mittel/an einigen Stellen“) und zwei Proben hatten einen Wert von „3“ („viel aber lokal begrenzt“) bezüglich des Knochenabbaus. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten vier Proben einen Wert von „2“ und fünf Proben hatten einen Wert von „3“ bezüglich des Knochenabbaus. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten jeweils vier Proben einen Wert von „2“ beziehungsweise „3“. Die Negativkontrolle (K) hatte Werte von „1“ („wenig/lokal begrenzt“), „2“ beziehungsweise „3“ bei jeweils einer Probe.

Im Vergleich zur Negativkontrolle war in den anderen Gruppen mehr Knochenabbau zu beobachten. Am wenigsten Knochenabbau war bei Gruppe 1 gefolgt von Gruppe 3 und am häufigsten in Gruppe 2 zu finden.

Am dritten Tag nach der OP hatten drei Proben der Positivkontrolle (Gruppe 1) einen Wert von „2“ und sechs Proben hatten einen Wert von „3“ bezüglich des Knochenabbaus. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten vier Proben einen Wert von „2“ und fünf Proben hatten einen Wert von „3“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten zwei Proben einen Wert von „2“ und sieben Proben hatten einen Wert von „3“. Die Negativkontrolle hatte bei allen Proben einen Wert von „2“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle war in den vorbehandelten Proben häufiger Knochenabbau zu beobachten. Die Positivkontrolle und die CpG-ODN Gruppe zeigten identische Werte und bei der negativ ODN Gruppe war der Knochenabbau am häufigsten zu beobachten.

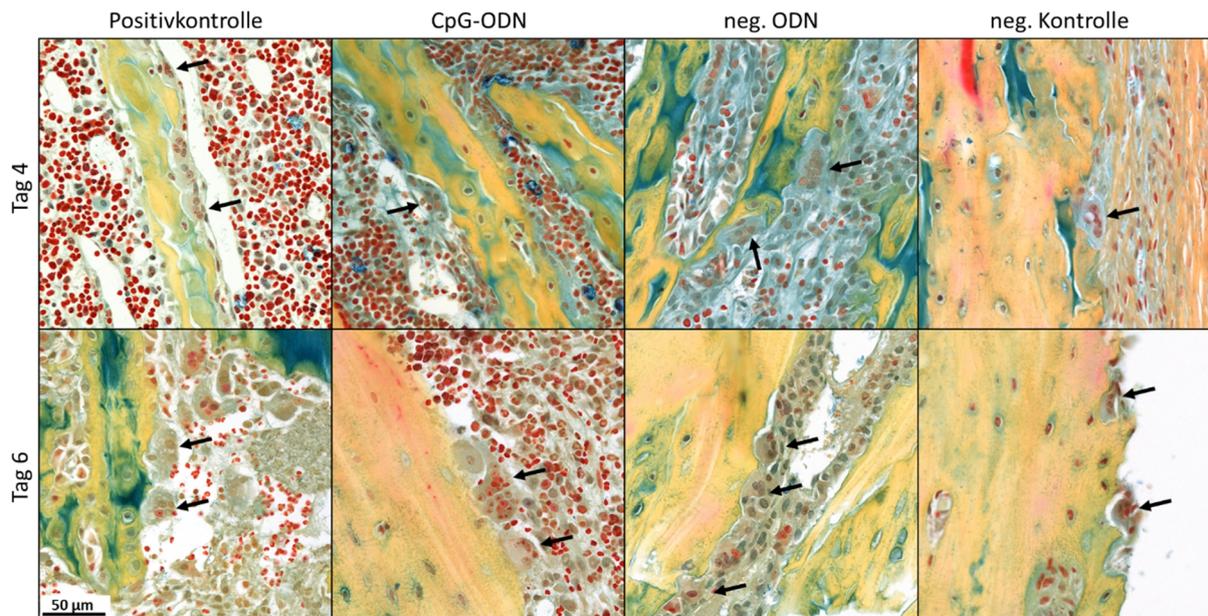


Abbildung 15: Beispielbilder für katabole Prozesse am Knochen mit der Movat Pentachrom Färbung. Die Pfeile zeigen auf Osteoklasten und dieser Zelltyp war in allen Gruppen sowie zu beiden Zeitpunkten zu finden.

Beim Vergleich zwischen den Gruppen und Zeitpunkten waren die geringsten Häufigkeiten für den Knochenabbau bei den Negativkontrollen zu finden. Knochenabbau war häufiger in Gruppe 1 (an Tag 4) gefolgt von Gruppe 3 und Gruppe 2 (beide ebenfalls an Tag 4) zu finden. Die Gruppen 1 und 2 zeigten an Tag 6 identische, höhere Werte bezüglich der Häufigkeit des Knochenaufbaus. In Gruppe 2 an Tag 4 zeigten sich die zweithöchsten Häufigkeiten und am häufigsten war der Knochenabbau in Gruppe 3 am dritten Tag nach der OP (Abbildung 17A).

Knochenaufbau:

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatten sieben Proben einen Wert von „2“ („mittel/an einigen Stellen“) und zwei Proben einen Wert von „3“ („viel aber lokal begrenzt“) bezüglich des Knochenaufbaus. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten fünf Proben einen Wert von „2“ und vier Proben hatten einen Wert von „3“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten fünf Proben einen Wert von „2“ und drei Proben einen Wert von „3“. Die Negativkontrolle (K) hatte Werte von „1“ („wenig/lokal begrenzt“), „2“ beziehungsweise „3“ bei jeweils einer Probe.

Im Vergleich zur Negativkontrolle waren bei allen Versuchsgruppen höhere Werte bezüglich des Knochenaufbaus zu erkennen. Die höchsten Werte waren bei Gruppe 2 zu finden, während der Knochenaufbau bei Gruppe 3 weniger häufig war. Gruppe 1 zeigte von den vorbehandelten Gruppen am wenigsten Knochenaufbau.

Am dritten Tag nach der OP hatten drei Proben der Positivkontrolle (Gruppe 1) einen Wert von „2“ und sechs Proben hatten einen Wert von „3“. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatte eine Probe einen Wert von „2“ und acht Proben hatten einen Wert von „3“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten drei Proben einen Wert von „2“ und sechs Proben hatten einen Wert von „3“. Die Negativkontrolle hatte bei allen Proben einen Wert von „2“.

Bei der Negativkontrolle waren die Werte für den Knochenaufbau geringer als in den anderen Gruppen. Die höchsten Werte waren bei Gruppe 2 zu finden. Die Gruppen 1 und 3 zeigten identische Werte.

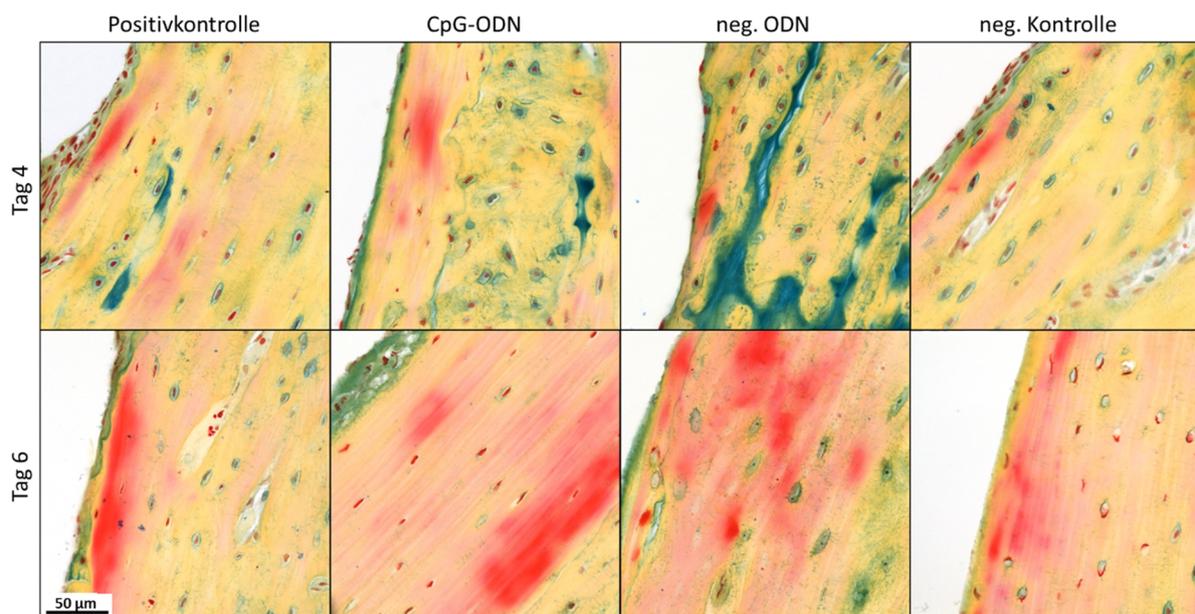


Abbildung 16: Beispielbilder für anabole Prozesse am Knochen mit der Movat Pentachrom Färbung. Neu gebildeter Knochen ist als rot gefärbte Areale zu erkennen und in allen Gruppen sowie zu beiden Zeitpunkten zu finden.

Beim Vergleich zwischen den Gruppen und den Zeitpunkten zeigten die Negativkontrollen den geringsten Knochenaufbau. An Tag 6 war der Knochenaufbau im Vergleich zum früheren Zeitpunkt bei allen Versuchsgruppen häufiger. Am häufigsten war neu gebildeter Knochen bei Gruppe 2 an Tag 6 zu finden. Weniger häufig fand die Knochenneubildung bei den Gruppen 3 (Tag 6) und Gruppe 1 (Tag 6) (beide mit identischen Werten) statt und nahm bei den Gruppen

2 und 3 an Tag 4 an Häufigkeit weiter ab. Von den Versuchsgruppen zeigte Gruppe 1 an Tag 4 die geringste Häufigkeiten beim Knochenaufbau (Abbildung 17B).

Die katabolen und anabolen Prozesse im Knochen zeigten sich bei den Negativkontrollen und den Positivkontrollen zu beiden Zeitpunkten ausbalanciert. Bei der CpG-vorbehandelten Gruppe dominierte am ersten postoperativen Tag der Knochenabbau, während drei Tage nach der OP der Knochenaufbau überwog. Auch bei der negativ ODN Gruppe waren die anabolen und katabolen Prozesse annähernd ausbalanciert, jedoch war eine leichte Tendenz zu häufigerem Knochenabbau zu erkennen (Abbildung 17).

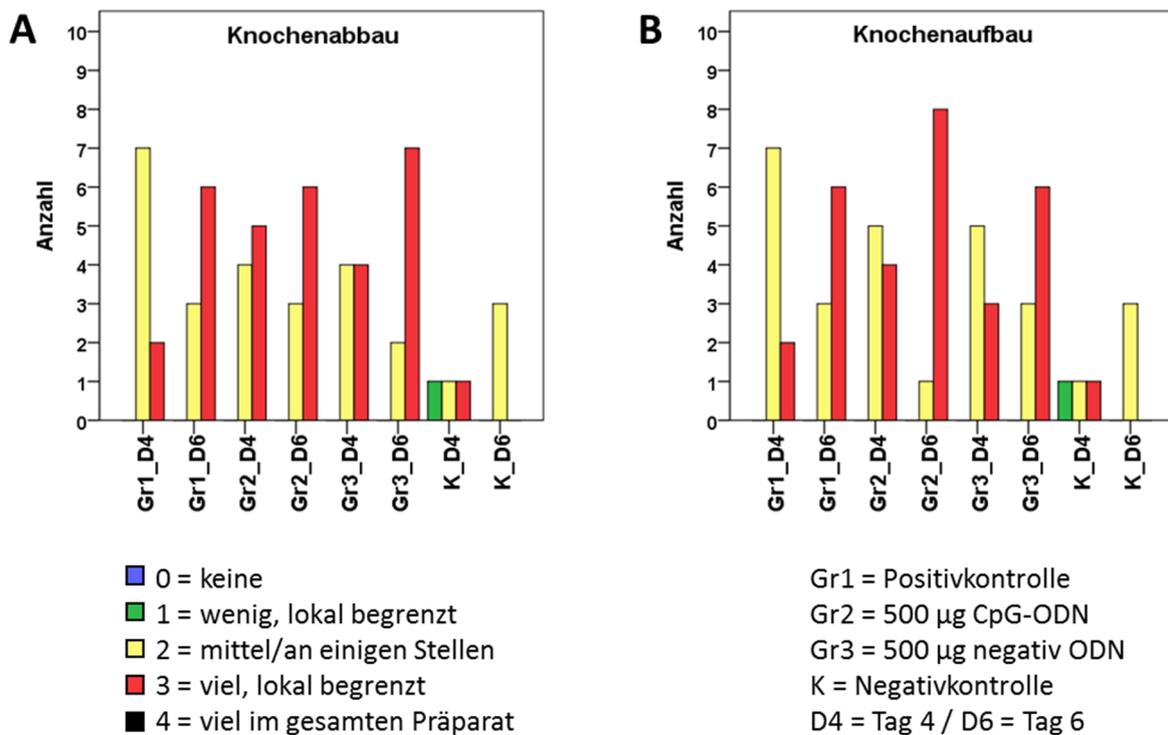


Abbildung 17: Gegenüberstellung der Gruppen bezüglich der untersuchten knöchernen Parameter (Movat Pentachrom Färbung). (A+B) Anabole und katabole Prozesse im Knochen waren bei den Kontrollen ausbalanciert und an Tag 6 bei den vorbehandelten Gruppen häufiger als an Tag 4. An Tag 4 war der Knochenabbau bei der CpG-ODN und der negativ ODN Gruppe häufiger während an Tag 6 in der CpG-ODN Gruppe der Knochenaufbau häufiger war.

Granulozyten:

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatten fünf Proben einen Wert von „2“ („mittel/an einigen Stellen“) und vier Proben hatten einen Wert von „3“ („viel

aber lokal begrenzt“) bezüglich der Ansammlungen von Granulozyten im Präparat. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatte eine Probe den Wert von „1“ („wenig/lokal begrenzt“), und jeweils vier Proben hatten einen Wert von „2“ beziehungsweise „3“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten vier Proben einen Wert von „1“, drei Proben hatten einen Wert von „2“ und zwei Proben hatten einen Wert von „3“. Die Negativkontrolle (K) hatte bei allen Proben einen Wert von „1“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle waren Ansammlungen von Granulozyten häufiger in allen vorbehandelten Gruppen zu finden. Die größte Häufigkeit von neutrophilen Granulozyten war in der Positivkontrolle zu finden. Die CpG-ODN und die negativ ODN Gruppen enthielten weniger häufig Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten im Vergleich zur Positivkontrolle.

Am dritten Tag nach der OP hatten jeweils zwei Proben der Positivkontrolle (Gruppe 1) einen Wert von „1“ oder „2“ und fünf Proben hatten einen Wert von „3“ bezüglich der Ansammlungen von Granulozyten im Präparat. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten zwei Proben einen Wert von „2“, sechs Proben hatten einen Wert von „3“ und eine Probe hatte den Wert „4“ („viel im gesamten Präparat“). Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten drei Proben einen Wert von „2“ und sechs Proben hatten einen Wert von „3“. Die Negativkontrolle (K) hatte bei zwei Proben einen Wert von „0“ („keine“) und eine Probe hatte einen Wert von „1“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle mit zwei Proben ohne Ansammlungen von Granulozyten, war deren Häufigkeit in den anderen Gruppen erhöht. Am häufigsten waren Ansammlungen neutrophiler Granulozyten in der CpG-ODN Gruppe zu finden. Bei der negativ ODN Gruppe sowie bei der Positivkontrolle war die Granulozytenansammlungen weniger häufig als in der Positivkontrolle.

Beim Vergleich zwischen den Gruppen und Zeitpunkten waren Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten am seltensten bei den Negativkontrollen zu finden. Von den vorbehandelten Gruppen enthielt negativ ODN Gruppe an Tag 4 die wenigsten Granulozyten gefolgt von Gruppe 1 an beiden Zeitpunkten und Gruppe 2 an Tag 4. In Gruppe 3 an Tag 6 fanden sich die zweithöchsten Werte und die größte Häufigkeit von Granulozytenansammlungen waren in der CpG-ODN Gruppe an Tag 6 zu finden (Abbildung 19A).

Bakterien:

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatte eine Probe den Wert „1“ („wenig/lokal begrenzt“), drei Proben hatten den Wert von „2“ („mittel/an einigen Stellen“), vier Proben hatten einen Wert von „3“ („viel aber lokal begrenzt“) und eine Probe hatte einen Wert von „4“ („viel im gesamten Präparat“) bezüglich des Vorkommens von Bakterien(-Clustern) im Präparat. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten zwei Proben einen Wert von „2“, sechs Proben hatten einen Wert von „3“ und eine Probe hatte einen Wert von „4“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatte eine Probe einen Wert von „0“ („keine“), fünf Proben hatten einen Wert von „2“, zwei Proben hatten einen Wert von „3“ und eine Probe hatte einen Wert von „4“. Die Negativkontrolle war bei allen Proben mit einem Wert von „0“ bakteriell nicht belastet.

Im Vergleich zur bakterienfreien Negativkontrolle waren in allen vorbehandelten Gruppen Bakterien zu finden. Die geringste Häufigkeit von Bakterien fand sich in Gruppe 3, gefolgt von Gruppe 1 und bei Gruppe 2 waren häufigsten Bakterien zu finden.

Am dritten Tag nach der OP hatten drei Proben der Positivkontrolle (Gruppe 1) einen Wert von „2“, fünf Proben hatten einen Wert von „3“ und eine Probe hatte einen Wert von „4“ bezüglich des Vorkommens von Bakterien(-Clustern) im Präparat. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatte jeweils eine Probe einen Wert von „2“ beziehungsweise „3“ und sieben Proben hatten einen Wert von „4“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatte eine Probe den Wert von „2“, sieben Proben hatten einen Wert von „3“ und eine Probe hatte den Wert „4“. Die Negativkontrolle war bei allen Proben mit einem Wert von „0“ bakteriell nicht belastet.

Im Vergleich zur unbelasteten Negativkontrolle fanden sich häufiger Bakterien in den vorbehandelten Gruppen. Hierbei zeigte sich in Gruppe 1 die geringste Häufigkeit von Bakterien, während in Gruppe 3 mehr Proben häufiger mit Bakterien kontaminiert waren. Die größte Häufigkeit von Bakterien war in Gruppe 2 (CpG-ODN) zu finden.

Bei dem Vergleich zwischen den Gruppen und Zeitpunkten zeigten die Gruppen 3 und 1 (beide an Tag 4) nach den Negativkontrollen die geringste Häufigkeit von Bakterien. Mit ansteigender Tendenz zeigten die Gruppen 1 an Tag 6, die Gruppe 2 an Tag 4 und die Gruppe 3 an Tag 6 häufiger Bakterien. Die größte Häufigkeit bezüglich der Bakterien war in der CpG-ODN Gruppe 2 an Tag 6 zu finden. Prinzipiell war die Menge an Bakterien drei Tage nach der OP häufiger als am ersten postoperativen Tag (Abbildung 19B).

Hämatom:

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatten zwei Proben einen Wert von „2“ („mittel/an einigen Stellen“), sechs Proben hatten einen Wert von „3“ („viel aber lokal begrenzt“) und eine Probe hatte einen Wert von „4“ („viel im gesamten Präparat“) bezüglich der Präsenz eines Hämatoms im Präparat. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten zwei Proben einen Wert von „2“, vier Proben einen Wert von „3“ und drei Proben einen Wert von „4“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatte eine Probe den Wert „2“, sechs Proben hatten einen Wert von „3“ und eine Probe hatte den Wert „4“. Die Negativkontrolle (K) hatte bei einer Probe den Wert „2“ und zwei Proben hatten einen Wert von „3“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle war das Hämatom in den Versuchsgruppen stärker ausgeprägt. Bei der negativ ODN Gruppe waren Hämatome am häufigsten zu finden. Die CpG-ODN Gruppe enthielt weniger Hämatom und bei der Positivkontrolle war das Hämatom verglichen mit den anderen Versuchsgruppen am geringsten ausgeprägt.

Am dritten Tag nach der OP hatte eine Probe der Positivkontrolle (Gruppe 1) einen Wert von „2“ und jeweils vier Proben hatten einen Wert von „3“ beziehungsweise „4“ bezüglich der Präsenz eines Hämatoms im Präparat. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten sieben Proben einen Wert von „3“ und zwei Proben einen Wert von „4“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten zwei Proben einen Wert von „2“, sechs Proben hatten einen Wert von „3“ und eine Probe hatte den Wert „4“. Die Negativkontrolle (K) hatte bei jeweils einer Probe den Wert von „0“ („keine“), „2“ beziehungsweise „4“.

Bei der CpG-ODN Gruppe war das Hämatom am stärksten ausgeprägt. Die Häufigkeit des Hämatoms war bei der negativ ODN Gruppe (Gruppe 3) und bei der Positivkontrolle Gruppe 1) geringer. Die Negativkontrolle zeigte die niedrigste Häufigkeit an Hämatomen.

Beim Vergleich zwischen den Gruppen und Zeitpunkten enthielten die Negativkontrollen am seltensten Hämatome. Die Positivkontrolle an Tag 4 und die negativ ODN Gruppe an Tag 6 enthielten Hämatome mit identischen Häufigkeiten. Zunehmende Häufigkeiten von Hämatom in den Proben waren von Gruppe 2 an Tag 4 über Gruppe 3 ebenfalls an Tag 4 hin zur Gruppe 2 an Tag 6 zu beobachten. Am häufigsten waren Hämatome in der CpG-ODN Gruppe am dritten Tag nach der OP enthalten (Abbildung 19C).

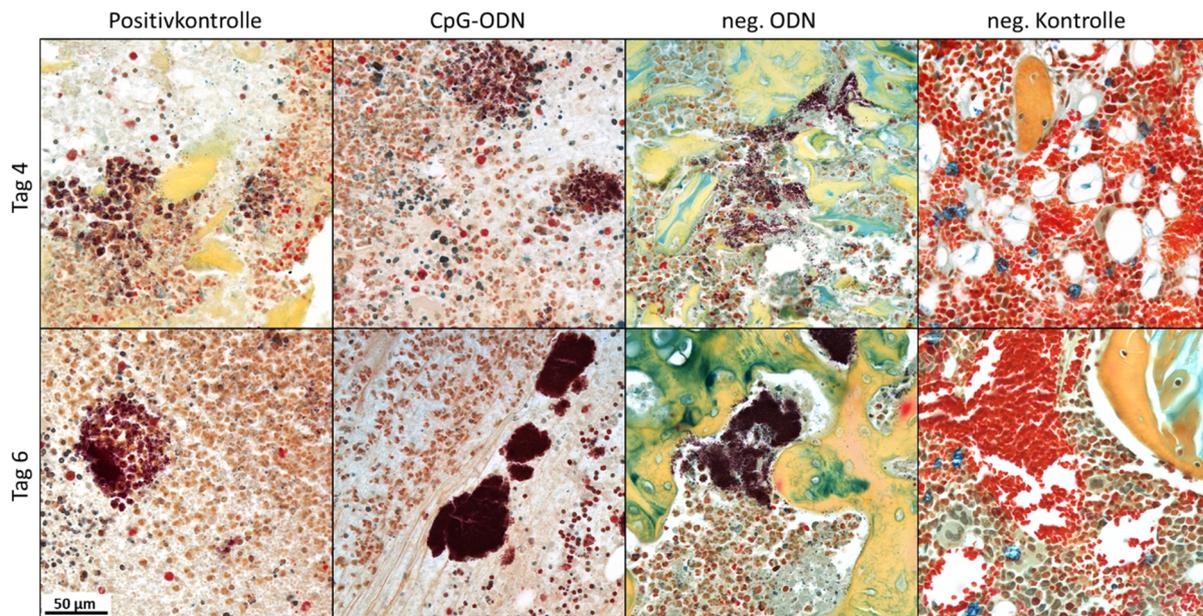


Abbildung 18: Beispielfotografien für die zellulären Parameter mit der Movat Pentachrom Färbung. Bakteriencluster sind als violett bis schwarze Areale zu erkennen und waren in allen vorbehandelten Gruppen und zu beiden Zeitpunkten zu finden. Ansammlungen neutrophiler Granulozyten (bräunliche Zellen) waren häufig neben Bakterienclustern lokalisier. Hämatome waren in allen Gruppen (auch in den Negativkontrollen) als Ansammlungen rot gefärbter und kernloser Zellen erkennbar.

Bei der Bewertung der zellulären Parametern enthielt die CpG-ODN vorbehandelte Gruppe an Tag 6 am häufigsten Ansammlungen von Bakterien, neutrophilen Granulozyten und Hämatome (Abbildung 19). Drei Tage nach der OP enthielten die Proben der negativ ODN Gruppe mit großer Häufigkeit Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten sowie häufig Bakteriencluster. Die Gruppen mit einer mittleren Häufigkeit bei der Keimbelastung (die Positivkontrollen an beiden Tagen und die CpG-ODN Gruppe an Tag 4) zeigten auch mittlere Werte bei der Häufigkeit von Granulozytenansammlungen. Gruppen, die selten Granulozyten enthielten wie die Negativkontrollen und die negativ ODN-Gruppe an Tag 4, zeigten auch eine geringere Häufigkeiten bei den Bakterienclustern. So zeigte sich bei der Movat Pentachrom Färbung ebenfalls ein positiver Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von Bakterienclustern und den Ansammlungen neutrophiler Granulozyten. Da auch die Negativkontrollen teilweise stark ausgeprägte Hämatome enthielten, ließ sich dies durch die mechanische Belastung bei der Operations- und Entnahmeprozedur erklären.

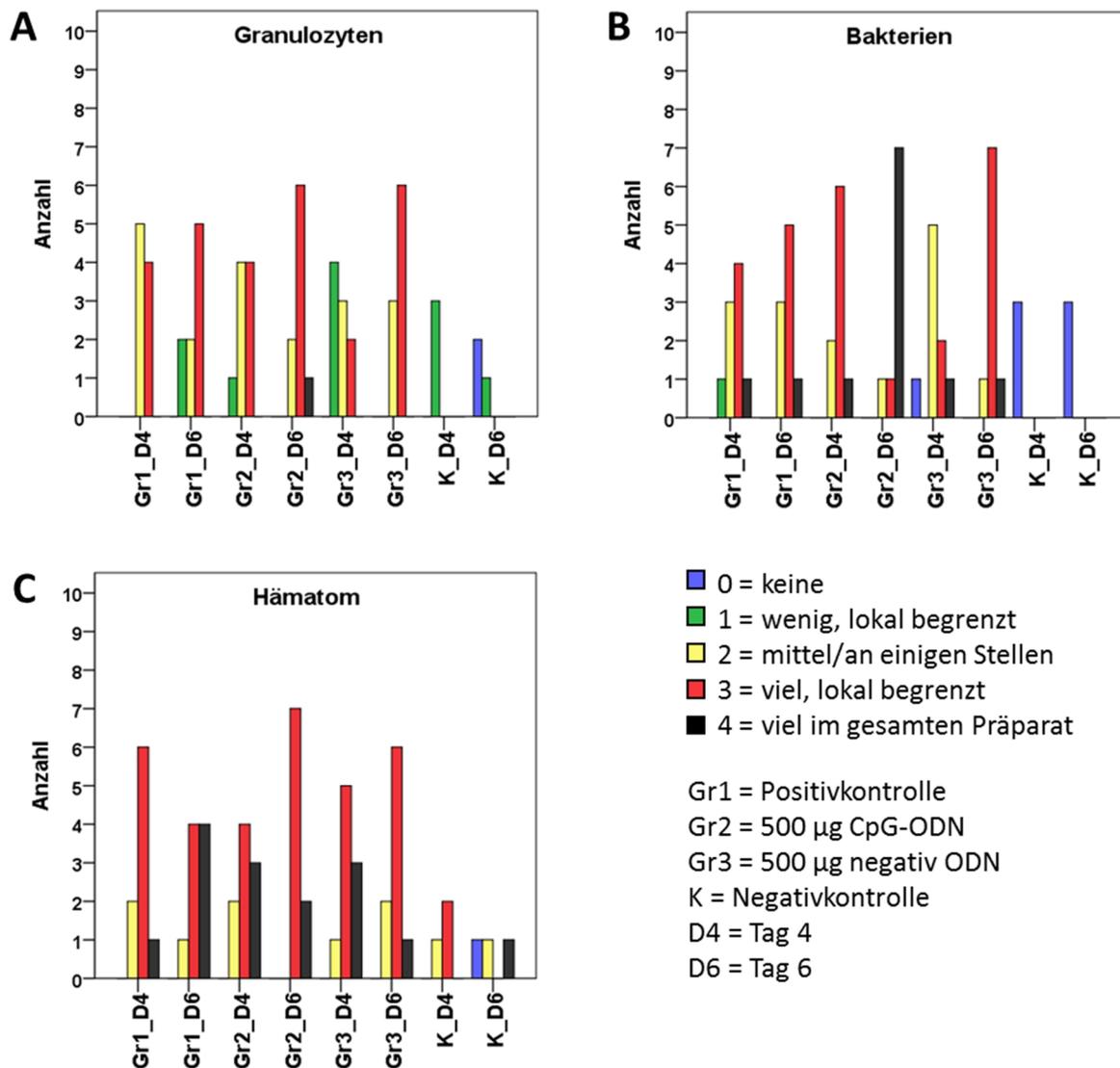


Abbildung 19: Gegenüberstellung der Gruppen bezüglich der untersuchten zellulären Parameter (Movat Pentachrom Färbung). Bei den zellulären Parametern waren die Häufigkeiten (A) der Ansammlungen neutrophiler und (B) von Bakteriencluster an Tag 6 erhöht. Hierbei zeigte sich, dass bei einem häufigeren Vorkommen von Bakterien auch Ansammlungen von neutrophilen Granulozyten häufiger sind (Gruppe 2 Tag 6).

Beim Vergleich der Toluidinblau mit der Movat Pentachrom Färbung zeigten sich bei der Beurteilung der anabolen und katabolen Prozesse wie auch bei den zellulären Parametern vergleichbare Werte oder zumindest ähnliche Muster mit häufigerem Knochenmetabolismus an Tag 6. Lediglich bei der Positivkontrolle am dritten Tag nach der OP zeigte sich zwischen beiden Färbungen ein konträres Muster mit der Tendenz zu häufigerem Knochenaufbau bei Toluidinblau während der Knochenmetabolismus mit der Movat Pentachrom Färbung

ausbalanciert erschien. An Tag 6 bei der CpG-ODN vorbehandelten Gruppe zeigte sich ebenfalls eine Differenz zwischen beiden Färbungen mit der häufigerem Knochenaufbau in der Movat Pentachrom Färbung während mit der Toluidinblau Färbung der Knochenabbau tendenziell häufiger war. Alle fünf Parameter waren in beiden Färbungen gut zu beurteilen. Die Ansammlungen von Granulozyten waren bei der Toluidinblau Färbung leichter zu beurteilen als bei der Movat Pentachrom Färbung, bei welcher die Bakteriencluster leichter zu erkennen waren. Ein positiver Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von Bakterienclustern und Ansammlungen neutrophiler Granulozyten im Markraum sowie Osteoklastenlakunen waren mit beiden Färbungen zu erkennen. Zur Bestimmung der aktiven Osteoklasten wurde jedoch eine spezialisierte Färbung (TRAP Enzymhistochemie) benötigt.

4.3 TRAP Enzymhistochemie: eine präoperative, lokale Applikation von ODNs führt zu erhöhten Osteoklastenzahlen am trabekulären Knochen am dritten Tag nach der OP

Osteoklasten sind die phagozytotisch aktiven Zellen, die maßgeblich an einem gesteigerten Knochen turnover und an der Beseitigung von Knochensequestern beteiligt sind. Viele Osteoklasten können daher ein Zeichen für einen gesteigerten oder gestörten Knochenmetabolismus sowie ein Hinweis auf eine Verletzung des Knochens sein. TRAP-positive Zellen waren an der Corticalis, an Sequestern, an Trabekeln, im Bereich der Wachstumsfuge und frei im Markraum zu finden (Abbildungen 20 und 21). Mit der TRAP Enzymhistochemie wurden Osteoklasten (mehrkernige TRAP-positive Zellen, an Knochen anliegend) nachgewiesen.

In insgesamt elf Präparaten (aus allen Gruppen) war die Wachstumsfuge nicht mit angeschnitten.

Trabekel:

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatten alle Proben einen Wert von „3“ („viel aber lokal begrenzt“) bezüglich der Anzahl der TRAP-positiven Zellen an den Trabekeln. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatte eine Probe einen Wert von „1“ („wenig/lokal begrenzt“), fünf Proben hatten einen Wert von „2“ („mittel/an einigen Stellen“) und drei Proben

hatten einen Wert von „3“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten fünf Proben einen Wert von „2“ und vier Proben hatten einen Wert von „4“ („viel im gesamten Präparat“). Bei der Negativkontrolle (K) hatten zwei Proben einen Wert von „2“ und eine Probe hatte einen Wert von „3“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle (öfter ein Wert von „2“ als „3“) hatte Positivkontrolle höhere Werte (nur „3“). Die negativ ODN Gruppe hatte vergleichbare Werte, während bei der CpG-ODN Gruppe die Werte niedriger waren.

Am dritten Tag nach der OP hatten drei Proben der Positivkontrolle (Gruppe 1) einen Wert von „2“ und sechs Proben hatten einen Wert von „3“ bezüglich der Anzahl der TRAP-positiven Zellen an den Trabekeln. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten sechs Proben einen Wert von „2“, zwei Proben einen Wert von „3“ und eine Probe hatte einen Wert von „4“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten drei Proben einen Wert von „2“, fünf Proben einen Wert von „3“ und eine Probe hatte einen Wert von „4“. Alle Proben der Negativkontrolle hatten einen Wert von „3“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle (nur Wert „3“) hatte Positivkontrolle niedrigere Werte („2“ und „3“) während bei der CpG-ODN und der negativ ODN Gruppe neben niedrigeren Werten auch je eine Probe einen höheren Wert von „4“ hatte.

Beim Vergleich zwischen den Zeitpunkten und Gruppen hatte die CpG-ODN Gruppe an Tag 4 am seltensten Osteoklasten an den Trabekeln. Drei Tage nach der OP zeigten sich bei negativ ODN Gruppe am häufigsten Osteoklasten. Bei der CpG-ODN Gruppe zeigte sich an Tag 6 ein uneinheitliches Muster mit den meisten Proben des Wertes „2“ aber auch einer Probe mit dem Wert „4“. Die Positivkontrolle an Tag 4 enthielt häufiger Osteoklasten an den Trabekeln als die Negativkontrolle. Die Häufigkeiten von Osteoklasten an den Trabekeln befinden sich bei der Positivkontrolle an Tag 6 und der negativ ODN Gruppe an Tag 4 im Bereich der entsprechenden Negativkontrollen (Abbildung 21A).

Corticalis:

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatten acht Proben einen Wert von „3“ („viel aber lokal begrenzt“) und eine Probe hatte einen Wert von „4“ („viel im gesamten Präparat“) bezüglich der Anzahl der TRAP-positiven Zellen im Bereich der Corticalis. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten zwei Proben einen Wert von „2“ („mittel/an einigen Stellen“) und sieben Proben einen Wert von „3“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten sechs

Proben einen Wert von „2“ und drei Proben einen Wert von „3“. Eine Probe der Negativkontrolle (K) hatte einen Wert von „2“ und zwei Proben hatten einen Wert von „3“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigte die CpG-ODN Gruppe ein ähnliches Verteilungsmuster (mehr Proben mit dem Wert „3“ als mit „2“). Bei der Positivkontrolle waren die Werte höher („3“ und einmal „4“) während bei negativ ODN Gruppe die Werte niedriger waren (öfter „2“ als „3“).

Am dritten Tag nach der OP hatten fünf Proben der Positivkontrolle (Gruppe 1) einen Wert von „2“ und vier Proben einen Wert von „3“ bezüglich der Anzahl der TRAP-positiven Zellen im Bereich der Corticalis. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten zwei Proben einen Wert von „1“ („wenig/lokal begrenzt“), fünf Proben einen Wert von „2“ und zwei Proben einen Wert von „3“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten sieben Proben einen Wert von „2“ und zwei Proben einen Wert von „3“. Eine Probe der Negativkontrolle (K) hatte einen Wert von „2“ und zwei Proben hatten einen Wert von „3“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle (mehr Proben mit dem Wert „3“ als mit „2“) hatten alle anderen Gruppen häufiger niedrigere Werte (öfter „2“ als „3“). Bei CpG-ODN Gruppe wurden zwei Proben nur mit „1“ bewertet und hatten damit am seltensten Osteoklasten am kortikalen Knochen.

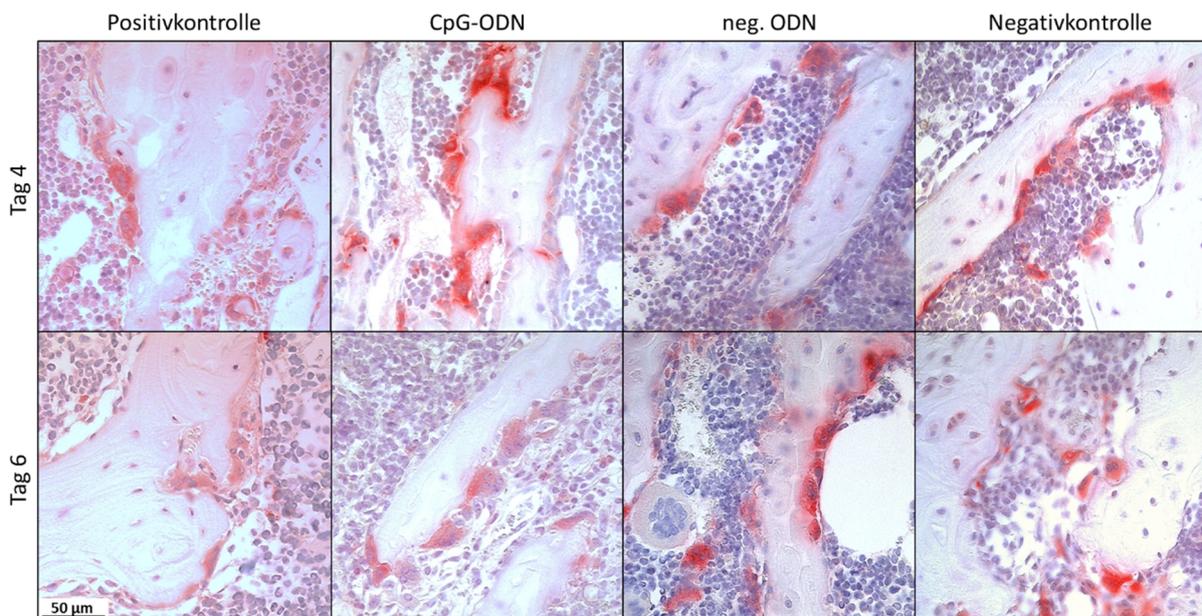


Abbildung 20: Beispielfotografien für TRAP-positive Zellen an Trabekeln und kortikalem Knochen anliegend. TRAP-positive Zellen (rot), welche direkt am Knochen anliegen, wurden als Osteoklasten gewertet und waren in allen Gruppen sowie zu beiden Zeitpunkten zu finden.

Beim Vergleich zwischen den Zeitpunkten und Gruppen hatte Positivkontrolle am ersten postoperativen Tag am häufigsten Osteoklasten am kortikalen Knochen und enthielt damit häufiger Osteoklasten in diesem Bereich als die Negativkontrolle (Abbildung 21B). Die CpG-ODN Gruppe am dritten Tag nach der OP erhielt auch im Vergleich zur Negativkontrolle die niedrigsten Werte bezüglich der Osteoklastenhäufigkeit am kortikalen Knochen. Die Negativkontrollen, die negativ ODN Gruppe zu beiden Zeitpunkten sowie die Positivkontrolle an Tag 6 und die CpG-ODN Gruppe an Tag 4 zeigten mittlere Häufigkeiten von Osteoklasten am kortikalen Knochen.

Wachstumsfuge:

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatten alle Proben einen Wert von „4“ („viel im gesamten Präparat“) bezüglich der Anzahl der TRAP-positiven Zellen im Bereich der Wachstumsfuge. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten zwei Proben einen Wert von „3“ („viel aber lokal begrenzt“) und sechs Proben einen Wert von „4“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten drei Proben einen Wert von „3“ und vier Proben einen Wert von „4“. Alle Proben der Negativkontrolle (K) hatten einen Wert von „4“.

Am dritten Tag nach der OP hatten zwei Proben der Positivkontrolle (Gruppe 1) einen Wert von „3“ und sechs Proben einen Wert von „4“ bezüglich der Anzahl der TRAP-positiven Zellen im Bereich der Wachstumsfuge. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten zwei Proben einen Wert von „3“ und fünf Proben einen Wert von „4“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten drei Proben einen Wert von „3“ und vier Proben einen Wert von „4“. Eine Probe der Negativkontrolle (K) hatte einen Wert von „3“ und zwei Proben hatten einen Wert von „4“.

Im Bereich der Wachstumsfuge zeigten sich bei allen Gruppen und zu beiden Zeitpunkten (Tag 4 und Tag 6) die größten Häufigkeiten von TRAP-positiven Zellen ohne Unterschiede bei den Häufigkeiten im Vergleich zu den Negativkontrollen (Abbildung 21C).

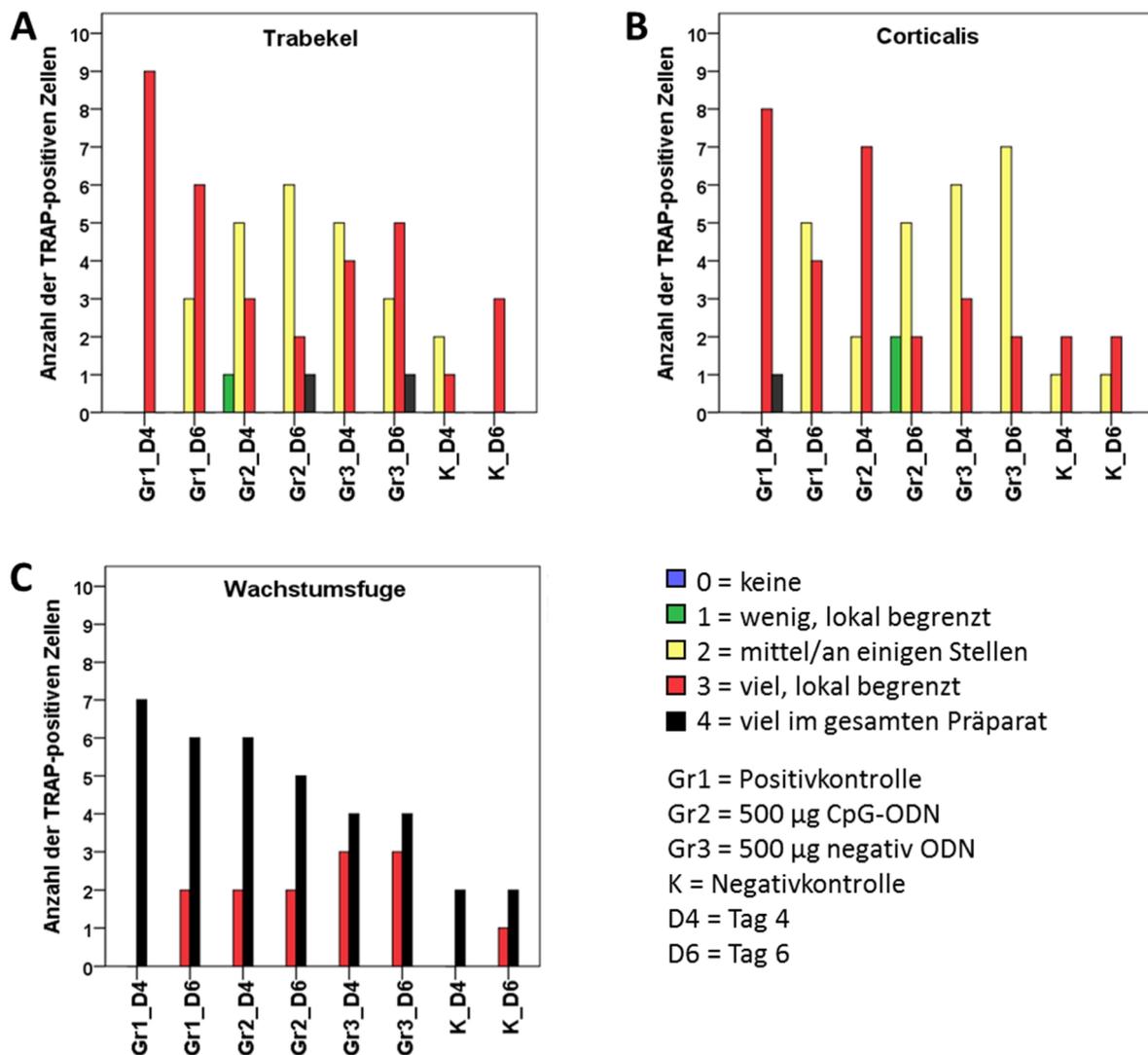


Abbildung 21: Darstellung der TRAP-positiven Zellen am vitalen, mineralisierten Knochen. (A+B) An den Trabekeln und der Corticalis fanden sich weniger häufige Osteoklasten als (C) TRAP-positive Zellen im Bereich der Wachstumsfuge. Von Tag 4 zu Tag 6 nimmt die Osteoklastenhäufigkeit (A) in der Positivkontrolle zu während sie bei den ODN Gruppen abnimmt. (B) Die Osteoklastenhäufigkeit an der Corticalis nimmt in allen operierten Gruppen von Tag 4 zu Tag 6 ab.

Frei im Markraum:

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatten zwei Proben einen Wert von „0“ („keine“) und sieben Proben einen Wert von „1“ („wenig/lokal begrenzt“) bezüglich der frei im Markraum vorhandenen TRAP-positiven Zellen. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten zwei Proben einen Wert von „0“, sechs Proben einen Wert von „1“ und eine Probe

hatte einen Wert von „2“ („mittel/an einigen Stellen“). Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten drei Proben einen Wert von „0“ und sechs Proben hatten einen Wert von „1“. Die Negativkontrolle (K) hatte bei zwei Proben einen Wert von „0“ und bei einer Probe einen Wert von „1“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle fanden sich bei allen anderen Gruppen häufiger TRAP-positive Zellen frei im Markraum (Abbildung 22).

Am dritten Tag nach der OP hatte eine Probe der Positivkontrolle einen Wert von „0“, drei Proben hatten einen Wert von „1“ und fünf Proben hatten einen Wert von „2“ bezüglich der frei im Markraum vorhandenen TRAP-positiven Zellen. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten zwei Proben einen Wert von „1“ und sieben Proben hatten einen Wert von „2“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten zwei Proben einen Wert von „1“, fünf Proben einen Wert von „2“ und zwei Proben hatten einen Wert von „3“ („viel aber lokal begrenzt“). Die Negativkontrolle (K) hatte bei allen Proben einen Wert von „1“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle hatten alle drei Versuchsgruppen häufiger TRAP-positiven Zellen frei im Markraum. Eine Probe der CpG-ODN Gruppe hatte einen geringeren Wert als die Negativkontrolle.

Beim Vergleich zwischen den Zeitpunkten und Gruppen hatten die Negativkontrollen, die Positivkontrolle und die CpG-ODN Gruppe am ersten postoperativen Tag die geringsten Häufigkeiten von TRAP-positiven Zellen frei im Markraum. Am häufigsten waren frei im Markraum vorkommende positive Zellen bei der negativ ODN Gruppe am dritten Tag nach der OP zu finden (Abbildung 23A).

Sequester:

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatte eine Probe den Wert „0“ („keine“), sieben Proben hatten einen Wert von „1“ („wenig/lokal begrenzt“) und eine Probe hatte einen Wert von „2“ („mittel/an einigen Stellen“) bezüglich der Anzahl an TRAP-positiven Zellen an Knochensequestern. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten drei Proben einen Wert von „0“, fünf Proben einen Wert von „1“ und eine Probe hatte einen Wert von „2“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten drei Proben einen Wert von „0“, fünf Proben hatten einen Wert von „1“ und eine Probe hatte einen Wert von „2“. Alle Proben der Negativkontrolle hatten einen Wert von „0“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle, bei der keine Osteoklasten an den Knochensequestern zu finden waren, hatten alle vorbehandelten Gruppen häufiger Osteoklasten an den Sequestern (Abbildung 22) und es zeigten sich identische Verteilungsmuster bei der Osteoklastenhäufigkeit an Sequestern in der CpG-ODN und der negativ ODN Gruppe.

Am dritten Tag nach der OP hatte eine Probe der Positivkontrolle (Gruppe 1) einen Wert von „0“, sieben Proben hatten einen Wert von „2“ und eine Probe hatte einen Wert von „3“ („viel aber lokal begrenzt“) bezüglich der Anzahl an TRAP-positiven Zellen an Knochensequestern. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten sechs Proben einen Wert von „1“, zwei Proben einen Wert von „2“ und eine Probe hatte einen Wert von „3“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatte je eine Probe einen Wert von „0“ beziehungsweise „1“, fünf Proben hatten einen Wert von „2“ und zwei Proben hatten einen Wert von „3“. Zwei Proben der Negativkontrolle hatten einen Wert von „0“ und eine Probe hatte einen Wert von „1“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle hatten alle vorbehandelten Gruppen mit Werten von „2“ beziehungsweise „3“ häufiger Osteoklasten an Knochensequestern. Am Häufigsten waren die Osteoklasten bei Gruppe 3 (neg. ODN), gefolgt von Gruppe 1 (Positivkontrolle) und Gruppe 2 (CpG-ODN).

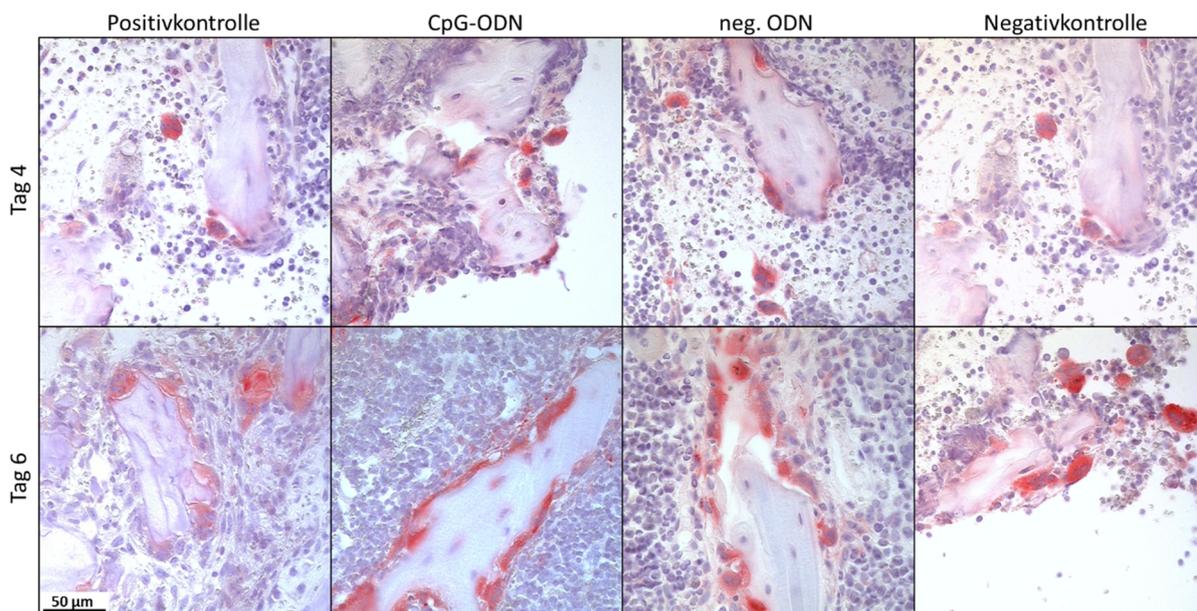


Abbildung 22: Beispielbilder für TRAP-positive Zellen an Sequestern und frei im Markraum. TRAP-positive Zellen (rot), welche direkt am Knochensequestern anliegen, wurden als Osteoklasten gewertet und waren, ebenso wie frei im Markraum vorkommende TRAP-positive Zellen, in allen Gruppen sowie zu beiden Zeitpunkten zu finden.

Beim Vergleich zwischen den Zeitpunkten und zwischen den Gruppen waren am ersten postoperativen Tag prinzipiell seltener Osteoklasten an Sequestern zu finden als drei Tage nach der OP. Nach den Negativkontrollen enthielten die vorbehandelten Gruppen an Tag 4 häufiger Osteoklasten. Am ersten postoperativen Tag waren bei der Positivkontrolle häufig Osteoklasten als bei den ODN Gruppen zu finden. An Tag 6 waren in der CpG-ODN Gruppe weniger häufig Osteoklasten an den Sequestern zu finden als in der Positivkontrolle. Die negativ ODN Gruppe enthielt an Tag 6 und auch insgesamt am häufigsten Osteoklasten an den Sequestern (Abbildung 23B).

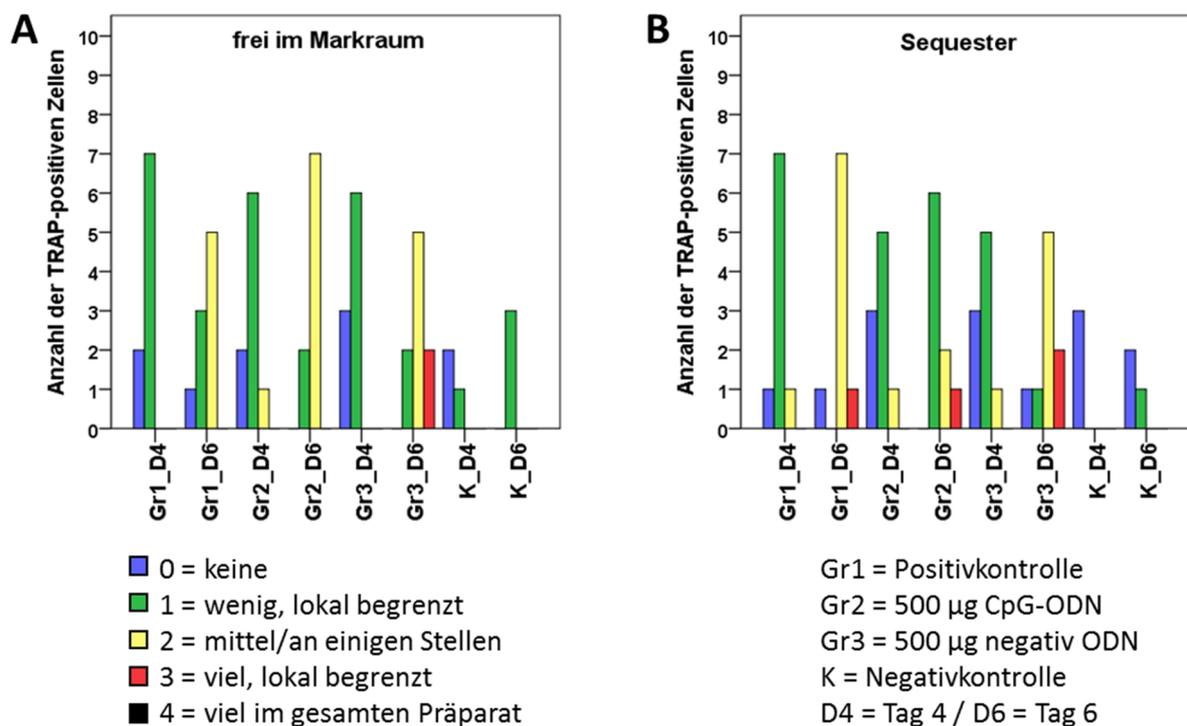


Abbildung 23: Darstellung der TRAP-positiven Zellen im Markraum. An Tag 6 waren (A) frei im Markraum und (B) an den Sequestern im Markraum häufiger TRAP-positive Zellen zu finden als an Tag 4. TRAP-positive Zellen waren im Markraum und an den Sequestern zu beiden Zeitpunkten häufiger als in den Negativkontrollen.

Im Bereich der Wachstumsfuge waren die TRAP-positiven Zellen bei allen Gruppen am häufigsten zu finden (Abbildung 21C). An den Trabekeln und dem kortikalen Knochen war bei allen Gruppen und zu beiden Zeitpunkten die Menge an positiven Zellen größer als an den Sequestern oder frei im Markraum. Gruppen mit mittel bis vielen TRAP-positiven Zellen an Knochensequestern enthielten tendenziell auch mehr positive Zellen frei im Markraum (Abbildungen 21 und 23). Mit der Toluidinblau und der Movat Pentachrom Färbung waren

Zunahmen in der Häufigkeit des Knochenabbaus vom frühen zum späten Zeitpunkt in den vorbehandelten und operierten Gruppen zu erkennen (Abbildungen 12A und 17A). Frei im Markraum und an den Sequestern war dieser Effekt auch beider Häufigkeit von TRAP-positiven Zellen zu beobachten (Abbildung 23 A und B). Allerdings nahm die Osteoklastenhäufigkeit am kortikalen Knochen bei allen vorbehandelten und operierten Knochen vom frühen zum späteren Zeitpunkt ab (Abbildung 21B). An den Trabekeln zeigte sich eine Zunahme der Osteoklastenhäufigkeit bei den ODN vorbehandelten Gruppen während in der Positivkontrolle die Osteoklastenhäufigkeit vom frühen zum späteren Zeitpunkt abnimmt (Abbildung 21A).

Gruppen (ODN Vorbehandlung und Euthanasie an Tag 6), welche in der Toluidinblau und der Movat Pentachrom Färbung hohe Werte und Häufigkeiten erreichten, zeigten auch häufiger Osteoklasten am trabekulären Knochen, an Knochensequestern und TRAP-positive Zellen frei im Markraum. Am kortikalen Knochen zeigte sich jedoch ein konträres Bild, da hier die Häufigkeit der Osteoklasten von Tag 4 zu Tag 6 abnahm. Dies deutete auf einen stärkeren Einfluss der Behandlung im Bereich der Trabekel hin.

4.4 Gram-Färbung: Bakterien verbleiben nicht am Ort ihrer Applikation sondern kontaminieren den Markraum

Die intraoperative Kontamination mit *S. aureus* erfolgte lokal im Bereich des Gelenkknorpels der proximalen Tibia und simulierte eine infizierte meta-/epiphysäre Frakturversorgung mittels intramedullärem Nagel. Mit der Gram-Färbung konnten nicht nur Cluster sondern auch einzelne Gram-positive *S. aureus* in den histologischen Präparaten nachgewiesen werden. *S. aureus* Cluster und einzeln liegende Bakterien konnten im Bereich der knorpeligen Knochenanteile (Wachstumsfuge und Gelenkknorpel) und/oder im Markraum nachgewiesen werden (Abbildungen 24 und 25). Die initial gesetzte bakterielle Infektion blieb nicht lokal begrenzt sondern breitete sich über den Markraum aus.

Bei insgesamt neun Proben aus allen Gruppen waren die knorpeligen Anteile im Präparat nicht mit angeschnitten und konnten daher nicht beurteilt werden.

Knorpel (Cluster):

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatten zwei Proben einen Wert von „0“ („keine“), eine Probe hatte einen Wert von „1“ („wenig/lokal begrenzt“), drei Proben hatten einen Wert von „2“ („mittel/an einigen Stellen“) und je eine Probe hatte einen Wert von „3“ („viel aber lokal begrenzt“) beziehungsweise „4“ („viel im gesamten Präparat“) bezüglich der Anzahl der Bakterien-Cluster im Bereich der Wachstumsfuge und des Gelenkknorpels. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten sechs Probeneinen Wert von „0“ und je eine Probe hatte einen Wert von „2“ beziehungsweise „3“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten zwei Proben einen Wert von „0“, weitere zwei Proben einen Wert von „1“ und je eine Probe hatte einen Wert von „2“, „3“ beziehungsweise „4“. Die Negativkontrolle war bei allen Proben mit einem Wert von „0“ frei von Bakterien.

Im Vergleich zur Negativkontrolle, welche frei von Bakterien war, enthielt die Positivkontrolle (Gruppe 1) am häufigsten Bakteriencluster im Bereich der knorpeligen Knochenanteile. Die Gruppe 3 (neg. ODN) war vergleichbar häufig mit Bakterienclustern belastet, während in Gruppe 2 (CpG-ODN) seltener Bakteriencluster zu finden waren.

Am dritten Tag nach der OP hatten drei Proben der Positivkontrolle (Gruppe 1) einen Wert von „0“, vier Proben hatten einen Wert von „1“ und eine Probe hatte einen Wert von „4“ bezüglich der Anzahl der Bakterien-Cluster im Bereich der Wachstumsfuge und des Gelenkknorpels. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten sechs Proben einen Wert von „0“ und drei Proben hatten einen Wert von „1“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten fünf Proben einen Wert von „0“ und je eine Probe hatte einen Wert von „1“ beziehungsweise „2“. Die Negativkontrolle war bei allen Proben mit einem Wert von „0“ frei von Bakterien.

Im Vergleich zur unbelasteten Negativkontrolle war die negativ ODN Gruppe am seltensten mit Bakterienclustern belastet. In der CpG-ODN Gruppe waren maximal „wenig“ Bakteriencluster in den Proben während bei der Positivkontrolle eine Probe sogar einen Wert von „4“ erhielt.

Beim Vergleich zwischen den Zeitpunkten und den Gruppen zeigten ausgenommen der Negativkontrollen die Proben der vorbehandelten Gruppen an Tag 6 eine geringere Häufigkeit von Bakterienclustern als an Tag 4. Die wenigsten Cluster waren bei den Gruppen 3 (Tag 6) und Gruppe 2 (Tag4) zu finden. Mit zunehmender Häufigkeit von Bakterienclustern im Knorpel folgten die CpG-ODN Gruppe (Tag 6) dann die Positivkontrolle (Tag 4) und die negativ ODN

Gruppe ebenfalls an Tag 4. Am häufigsten war die Positivkontrolle an Tag 4 belastet (Abbildung 26A).

Knorpel (einzeln):

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatten zwei Proben den Wert „0“ („keine“), drei Proben hatten einen Wert von „1“ („wenig/lokalbegrenzt“) und je eine Probe hatte einen Wert von „2“ („mittel/an einigen Stellen“), „3“ („viel aber lokal begrenzt“) beziehungsweise „4“ („viel im gesamten Präparat“) bezüglich der Anzahl der einzeln im Bereich der Wachstumsfuge und des Gelenkknorpels vorliegenden Bakterien. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten fünf Proben einen Wert von „0“ und je eine Probe hatte einen Wert von „1“, „2“ beziehungsweise „3“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten drei Proben einen Wert von „1“, zwei Proben hatten einen Wert von „2“ und je eine Probe hatte einen Wert von „3“ beziehungsweise „4“. Die Negativkontrolle hatte bei zwei Proben einen Wert von „0“ und eine Probe hatte einen Wert von „1“.

Im Vergleich zur Negativkontrolle, die außer bei einer Probe (mit einem Wert von „1“) unbelastet war, zeigten alle vorbehandelten und operierten Proben häufiger einzelnen *S. aureus* im Bereich der Knorpel. Die Proben aus der CpG-ODN Gruppe (Gruppe 2) enthielten im Vergleich weniger häufig Bakterien als die Positivkontrolle und die negativ ODN Gruppe (Gruppe 3), welche am ersten postoperativen Tag am häufigsten Bakterien enthielt.

Am dritten Tag nach der OP hatte eine Probe der Positivkontrolle (Gruppe 1) einen Wert von „0“, sechs Proben hatten einen Wert von „1“ und eine Probe hatte einen Wert von „4“ bezüglich der Anzahl der einzeln im Bereich der Wachstumsfuge und des Gelenkknorpels vorliegenden Bakterien. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten zwei Proben einen Wert von „0“ und fünf Proben hatten einen Wert von „1“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten fünf Proben einen Wert von „0“ und je eine Probe hatte einen Wert von „1“ beziehungsweise „2“. Die Negativkontrolle war bei allen Proben mit einem Wert von „0“ frei von Bakterien.

Im Vergleich zur unbelasteten Negativkontrolle enthielten alle Versuchsgruppen häufiger einzeln liegende Bakterien. An Tag 6 hatte die Positivkontrolle die häufigste Keimbelastung, gefolgt von der CpG-ODN Gruppe und der negativ ODN Gruppe.

Beim Vergleich zwischen den Gruppen und den Zeitpunkten war die Bakterien im Bereich der Knorpel am häufigsten bei der negativ ODN Gruppe und bei der Positivkontrolle an Tag 4 zu

finden. Die Positivkontrolle war an Tag 6 ebenfalls häufiger mit Bakterien belastet (eine Probe erreichte den Maximalwert „4“). Am seltensten waren einzelnen Bakterien neben den Negativkontrollen (Tag 6 und Tag 4) bei der negativ ODN Gruppe an Tag 6 gefolgt von der CpG-ODN Gruppe an Tag 6 und der CpG-ODN Gruppe an Tag 4 zu finden (Abbildung 26B).

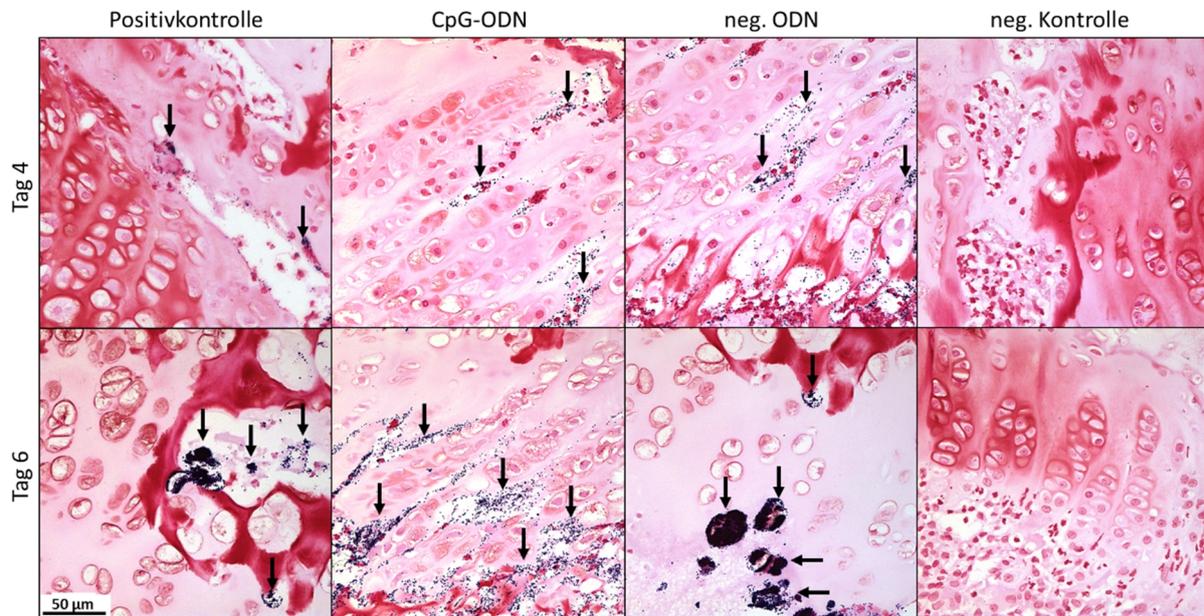


Abbildung 24: Beispielbilder für den Bakteriennachweis mittels Gram-Färbung. Bakterien sind als blau-schwarze Punkte zu erkennen und mit Pfeilen markiert. Alle Bilder zeigen Ausschnitte der Wachstumsfuge. Im Bereich der Wachstumsfuge und der Gelenkknorpel (nicht abgebildet) waren Bakterien in allen vorbehandelten Gruppen sowie zu beiden Zeitpunkten zu erkennen.

Markraum (Cluster):

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatte eine Probe einen Wert von „0“ („keine“), drei Proben hatten einen Wert von „1“ („wenig/lokal begrenzt“), vier Proben hatten einen Wert von „2“ („mittel/an einigen Stellen“) und eine Probe hatte einen Wert von „3“ („viel aber lokal begrenzt“) bezüglich der Anzahl der Bakteriencluster im Markraum. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatte je eine Probe einen Wert von „0“ beziehungsweise „1“, zwei Proben hatten einen Wert von „2“, vier Proben hatten einen Wert von „3“ und eine Probe hatte einen Wert von „4“ („viel im gesamten Präparat“). Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten zwei Proben einen Wert von „1“, weiter zwei Proben hatten einen Wert von „2“ und fünf Proben hatten einen Wert von „3“. Die Negativkontrolle war bei allen Proben mit einem Wert von „0“ frei von Bakterien.

Im Vergleich zur unbelasteten Negativkontrolle enthielten alle anderen Gruppen Bakteriencluster im Markraum. Die Positivkontrolle enthielt von den vorbehandelten Gruppen am seltensten Bakterienclustern im Markraum während die CpG-ODN und die negativ ODN Gruppe vergleichbar häufig belastet waren.

Am dritten Tag nach der OP hatten bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) zwei Proben einen Wert von „2“, sechs Proben hatten einen Wert von „3“ und eine Probe hatte einen Wert von „4“ bezüglich der Anzahl der Bakterien-Cluster im Markraum. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten vier Proben einen Wert von „3“ und fünf Proben hatten einen Wert von „4“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatte eine Probe den Wert „2“, sieben Proben hatten einen Wert von „3“ und eine Probe hatte einen Wert von „4“. Die Negativkontrolle war bei allen Proben mit einem Wert von „0“ frei von Bakterien.

Im Vergleich zur Negativkontrolle, welche keine Bakteriencluster im Markraum enthielt, waren alle Proben der vorbehandelten Gruppen mit Bakterien belastet. Die häufigste Belastung mit Clustern von Bakterien war bei der CpG-ODN Gruppe (gefolgt von der negativ ODN Gruppe und der Positivkontrolle) zu finden.

Beim Vergleich zwischen den Gruppen und den Zeitpunkten waren nur die Negativkontrollen zu beiden Zeitpunkten und je eine Probe aus der Positivkontrolle und der CpG-ODN Gruppe (am ersten Tag nach der OP) frei von Bakterienclustern im Markraum (Abbildung 25). Die Häufigkeit von Bakterienclustern war einen Tag nach der OP geringer als drei Tage nach der OP. Die Positivkontrolle zeigte die geringste bakterielle Belastung während die ODN Gruppen an Tag 4 häufiger belastet waren aber untereinander vergleichbare Werte hatten. Die Häufigkeit von Bakterienclustern nahm über die Positivkontrolle (Tag 6) zur negativ ODN Gruppe (Tag 6) zu und die Gruppe mit den häufigsten Bakterienclustern im Markraum war CpG-ODN Gruppe an Tag 6 (Abbildung 26C).

Markraum (einzeln):

Bei der Positivkontrolle (Gruppe 1) am ersten postoperativen Tag hatten zwei Proben einen Wert von „1“ („wenig/lokal begrenzt“), weitere zwei Proben hatten einen Wert von „2“ („mittel/an einigen Stellen“), vier Proben hatten einen Wert von „3“ („viel aber lokal begrenzt“) und eine Probe hatte einen Wert von „4“ („viel im gesamten Präparat“) bezüglich der Anzahl der einzeln im Markraum vorliegenden Bakterien. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten zwei Proben einen Wert von „1“, eine Probe hatte einen Wert von „2“, fünf Proben hatten einen Wert

von „3“ und eine Probe hatte einen Wert von „4“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatten zwei Proben einen Wert von „2“, vier Proben hatten einen Wert von „3“ und drei Proben hatten einen Wert von „4“. Die Negativkontrolle war bei allen Proben mit einem Wert von „0“ frei von Bakterien.

Im Vergleich zur Negativkontrolle waren alle Proben am ersten postoperativen Tag mit einzeln im Markraum liegenden Bakterien belastet (Abbildung 25). Die Positivkontrolle war hierbei noch am seltensten belastet und negativ ODN Gruppe enthielt die am häufigsten einzeln liegende Bakterien im Markraum.

Am dritten Tag nach der OP hatte eine Probe der Positivkontrolle (Gruppe 1) einen Wert von „2“, sechs Proben hatten einen Wert von „3“ und zwei Proben hatten einen Wert von „4“. In Gruppe 2 (500 µg CpG) hatten vier Proben einen Wert von „3“ und fünf Proben hatten einen Wert von „4“. Bei Gruppe 3 (neg. ODN) hatte eine Probe einen Wert von „2“, fünf Proben hatten einen Wert von „3“ und drei Proben hatten einen Wert von „4“. Die Negativkontrolle war bei allen Proben mit einem Wert von „0“ frei von Bakterien.

Im Vergleich zu den Proben aus den Versuchsgruppen war nur die Negativkontrolle nicht mit einzelnen Bakterien im Markraum belastet (Abbildung 25). Am häufigsten waren Bakterien in der CpG-ODN Gruppe zu finden. Die ODN vorbehandelten Gruppen 2 waren vergleichbar häufig mit Bakterien belastet, wobei deren Häufigkeit in der CpG-ODN Gruppe etwas geringer war.

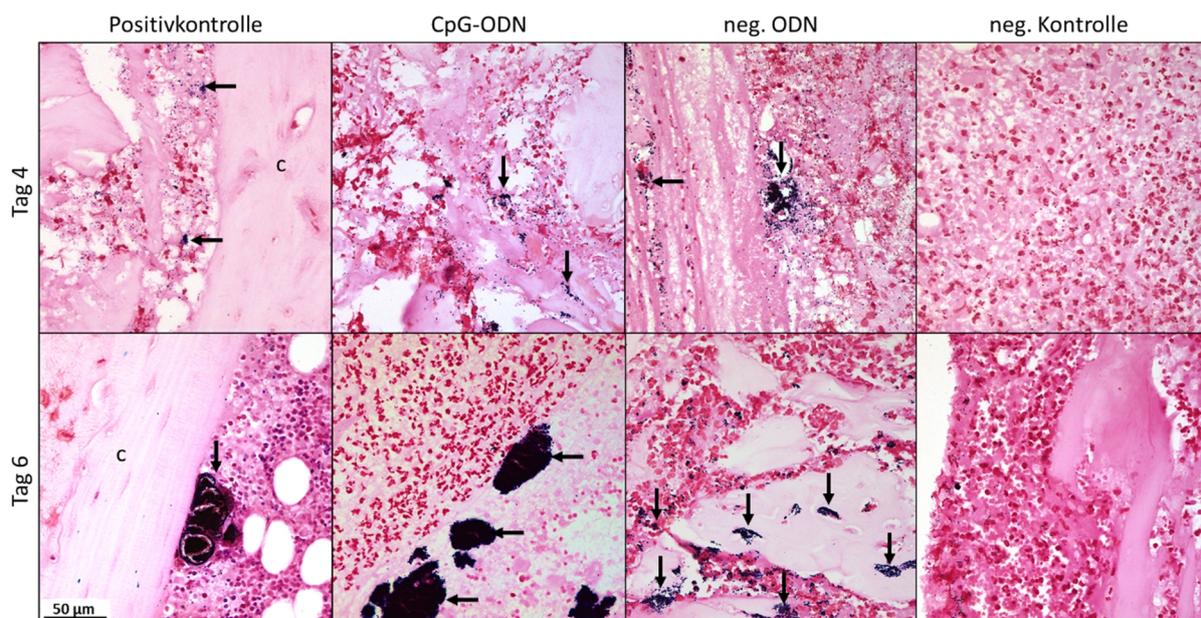


Abbildung 25: Beispielfotografien für den Bakteriennachweis mittels Gram-Färbung im Markraum. Bakterien sind als blau-schwarze Punkte zu erkennen und mit Pfeilen markiert. Bakterien waren im Markraum bei allen vorbehandelten Gruppen sowie zu beiden Zeitpunkten zu erkennen.

Beim Vergleich zwischen den Gruppen und Zeitpunkten war bei der CpG-ODN Gruppe an Tag 6 einzeln im Markraum liegenden Bakterien am häufigsten zu finden. Die Belastung mit Bakterien ist bei Gruppe 3 (neg. ODN) an Tag 6 geringer als an Tag 4. Eine weitere Abnahme der bakteriellen Häufigkeit ist bei der Positivkontrolle an Tag 6 zu erkennen. An Tag 4 waren die Positivkontrollen weniger häufig mit Bakterien belastet als an Tag 6. Am seltensten waren einzelnen Bakterien im Markraum war bei Gruppe 2 (CpG-ODN) an Tag 4 zu finden, während sich in den Negativkontrollen keine Bakterien im Markraum zeigten (Abbildung 26D).

Im Bereich des Gelenkknorpels und der Wachstumsfuge waren prinzipiell seltener Cluster und einzeln liegende Bakterien zu erkennen als im Markraum. Die Bakterien waren im Bereich der Gelenkknorpel und der Wachstumsfuge bei den vorbehandelten Gruppen an Tag 4 häufiger als an Tag 6 während im Markraum die Bakterienhäufigkeit an Tag 6 höher ist als an Tag 4 (Abbildung 26). Dies deutete auf eine Etablierung der Infektion im Markraum. Bei der Häufigkeitsverteilung der Bakterien auf die Gruppen und Zeitpunkte, zeigten sich vergleichbare Häufigkeiten pro Gruppe und Zeitpunkt zwischen einzeln liegenden und als Cluster vorkommenden Bakterien sowohl im Markraum wie auch im Bereich der Knorpel.

Beim Vergleich der Häufigkeiten von Bakterienclustern welche mit der Gram-Färbung pro Gruppe und Zeitpunkt nachgewiesen werden konnten und der Häufigkeiten von Bakterien, die mit der Movat Pentachrom oder der Toluidinblau Färbung gefunden wurden, zeigten sich Übereinstimmungen bei den Gruppen mit einer häufigeren bakteriellen Belastung der vorbehandelten Gruppen an Tag 6. Die Gesamthäufigkeit von Bakterien pro Gruppe und Tag war bei der Gram-Färbung erhöht, da hier auch die einzeln liegenden Bakterien erkannt wurden.

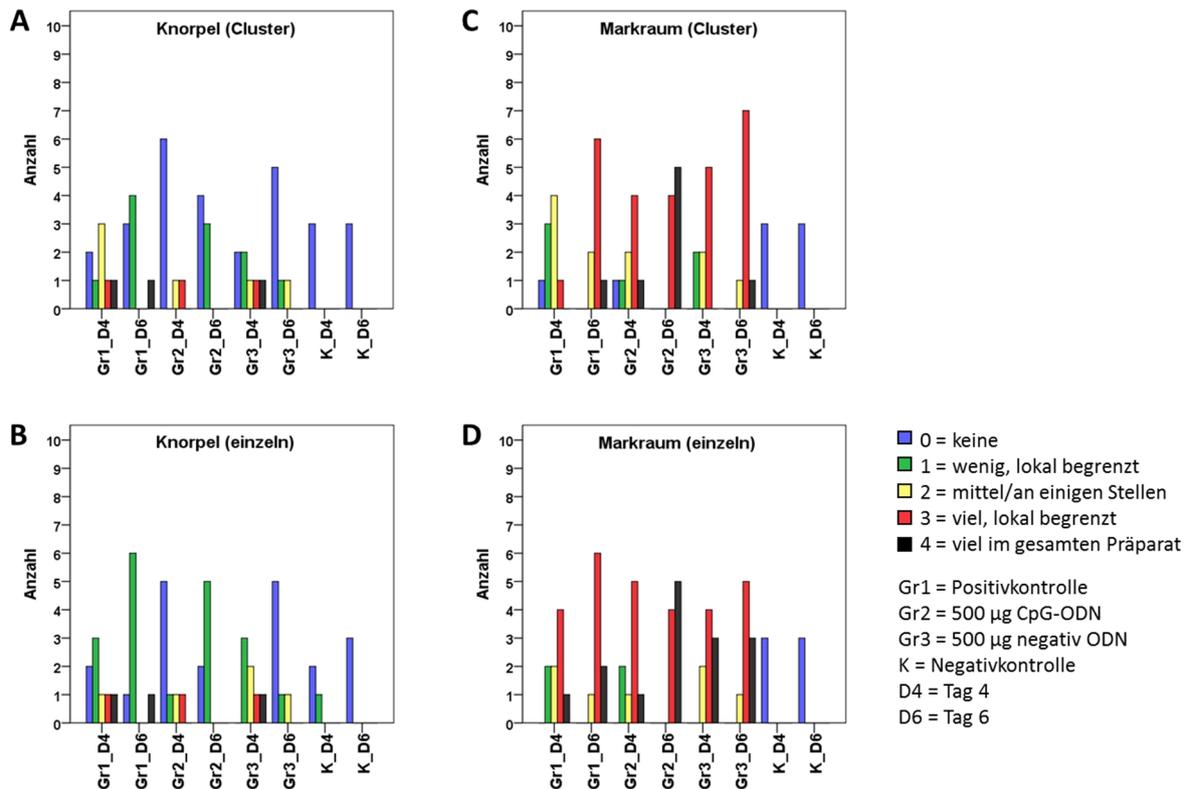


Abbildung 26: Darstellung der als Cluster oder einzeln vorkommenden Bakterien nach Arealen. (C+D) Im Markraum konnten häufiger Bakterien als (A+B) im Bereich der Knorpel nachgewiesen werden. (B+D) Die Häufigkeiten von einzeln liegenden Bakterien war gleichwertig bis leicht erhöht gegenüber (A+C) dem Vorkommen von Bakterienclustern. Bei allen vorbehandelten und operierten Gruppen kommen Bakterien an Tag 6 im Markraum häufiger vor als an Tag 4.

4.5 Verteilung der Häufigkeiten auf die Schnittqualität: Die Bewertung ist unabhängig von der Schnittqualität

Die Tibiae dieses Versuches wurden nach der Euthanasie und Explantation längs gespalten. Dadurch konnten parallel zu den histologischen auch mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt werden. Allerdings ergab sich daraus auch folgendes Problem: nicht alle Tibiae konnten perfekt halbiert werden und es gab unterschiedlich große Tibiafragmente. Daher wurde im Anschluss an die Einbettung und Schnittherstellung auch die Qualität der Schnitte nach folgenden Kriterien beurteilt.

Bei Schnitten einer sehr guten Qualität waren proximal die Wachstumsfuge und das Kniegelenk zu erkennen, der Markraum war mit Knochenmark gefüllt und von kortikalem Knochen eingerahmt. Schnitte mit einer guten Qualität ließen ebenfalls die proximale Gelenksfläche und die Wachstumsfuge erkennen, der kortikale Knochen war jedoch nicht auf beiden Seiten komplett angeschnitten und der Markraum war nicht vollständig mit Knochenmark gefüllt. Als mittlerer Qualität wurden Schnitte mit Fragmenten bewertet, die noch teilweise die proximale Gelenksfläche und Wachstumsfuge erkennen ließen. Der Markraum war teilweise mit Knochenmark gefüllt und der kortikale Knochen war zumindest einseitig zu erkennen. Schnitte schlechter Qualität ließen keine Wachstumsfuge und keine Gelenksfläche erkennen und enthielten hauptsächlich kortikalen Knochen mit nur wenig Knochenmark im Markraum.

Die Anzahl an sehr guten (17 Stück), guten (19 Stück) und der Schnitte mittlerer Qualität (17 bzw. 18 Stück) war auf einem vergleichbaren Niveau. Schnitte mit schlechter Qualität (6 Stück) waren die Ausnahme. Bei dem Vergleich der Bewertung bezüglich eines Parameters zeigten sich unabhängig von der Schnittqualität vergleichbare Verteilungsmuster (Abbildung 27).

Knochenaufbau:

Bezüglich des Knochenaufbaus hatten bei sehr guter Schnittqualität acht Proben einen Wert von „2“ und neun Proben einen Wert von „3“. Bei guter Schnittqualität hatten 10 Proben einen Wert von „2“ und neun Proben einen Wert von „3“. Eine Probe hatte den Wert „1“, sechs Proben hatten einen Wert von „2“ und zehn Proben hatten einen Wert von „3“ bei einer mittleren Schnittqualität. Bei schlechter Schnittqualität hatten vier Proben einen Wert von „2“ und zwei Proben hatten einen Wert von „3“ (Abbildung 27A).

Knochenabbau:

Bezüglich des Knochenabbaus hatten bei sehr guter Schnittqualität acht Proben einen Wert von „2“ und neun Proben einen Wert von „3“. Bei guter Schnittqualität hatten 10 Proben einen Wert von „2“ und neun Proben einen Wert von „3“. Eine Probe hatte den Wert „1“, fünf Proben hatten einen Wert von „2“ und elf Proben hatten einen Wert von „3“ bei einer mittleren Schnittqualität. Bei schlechter Schnittqualität hatten vier Proben einen Wert von „2“ und zwei Proben hatten einen Wert von „3“ (Abbildung 27B).

Granulozyten:

Bezüglich der Anwesenheit von Granulozyten im Präparat hatte bei sehr guter Schnittqualität eine Probe den Wert „0“, zwei Proben hatten einen Wert von „1“, fünf Proben hatten einen Wert von „2“ und neun Proben hatten einen Wert von „3“. Bei guter Schnittqualität hatten drei Proben einen Wert von „1“, fünf Proben hatten einen Wert von „2“, zehn Proben hatten einen Wert von „3“ und eine Probe hatte den Wert „4“. Eine Probe hatte den Wert „0“, fünf Proben hatten einen Wert von „1“, sieben Proben hatten einen Wert von „2“ und fünf Proben hatten einen Wert von „3“ bei mittlerer Schnittqualität. Bei schlechter Schnittqualität hatte eine Probe den Wert „1“, zwei Proben hatten einen Wert von „2“ und drei Proben hatten einen Wert von „3“ (Abbildung 27D).

Bakterien:

Bezüglich des Vorkommens von Bakterien(-Clustern) im Präparat hatten bei sehr guter Schnittqualität drei Proben einen Wert von „0“, eine Probe hatte den Wert „2“, sieben Proben hatten einen Wert von „3“ und sechs Proben hatten einen Wert von „4“. Bei guter Schnittqualität hatte eine Probe den Wert „1“, sechs Proben hatten einen Wert von „2“, acht Proben hatten einen Wert von „3“ und vier Proben hatten einen Wert von „4“. Vier Proben hatten einen Wert von „0“, sechs einen Wert von „2“, sieben einen Wert von „3“ und eine Probe hatte den Wert „4“ bei mittlerer Schnittqualität. Bei schlechter Schnittqualität hatten zwei Proben einen Wert von „2“, drei Proben hatten einen Wert von „3“ und eine Probe hatte den Wert „4“ (Abbildung 27E).

Hämatom:

Bezüglich der Präsenz eines Hämatoms im Präparat hatten bei sehr guter Schnittqualität drei Proben einen Wert von „2“, zehn Proben einen Wert von „3“ und vier Proben einen Wert von „4“. Bei guter Schnittqualität hatten zwei Proben einen Wert von „2“, zwölf Proben einen Wert von „3“ und vier Proben einen Wert von „4“. Eine Probe hatte den Wert „0“, drei Proben hatten einen Wert von „2“, zehn Proben hatten einen Wert von „3“ und vier Proben hatten einen Wert von „4“ bei mittlerer Schnittqualität. Bei schlechter Schnittqualität hatten jeweils zwei Proben einen Wert von „2“, „3“ beziehungsweise „4“ (Abbildung 27C).

Bei keinem der bewerteten Parameter (Knochenaufbau, Knochenabbau, Hämatom, Ansammlungen von Granulozyten und Bakterien) zeigten sich die guten oder sehr guten Schnitte besser oder schlechter bewertet als die Schnitte von mittlerer oder schlechter Qualität.

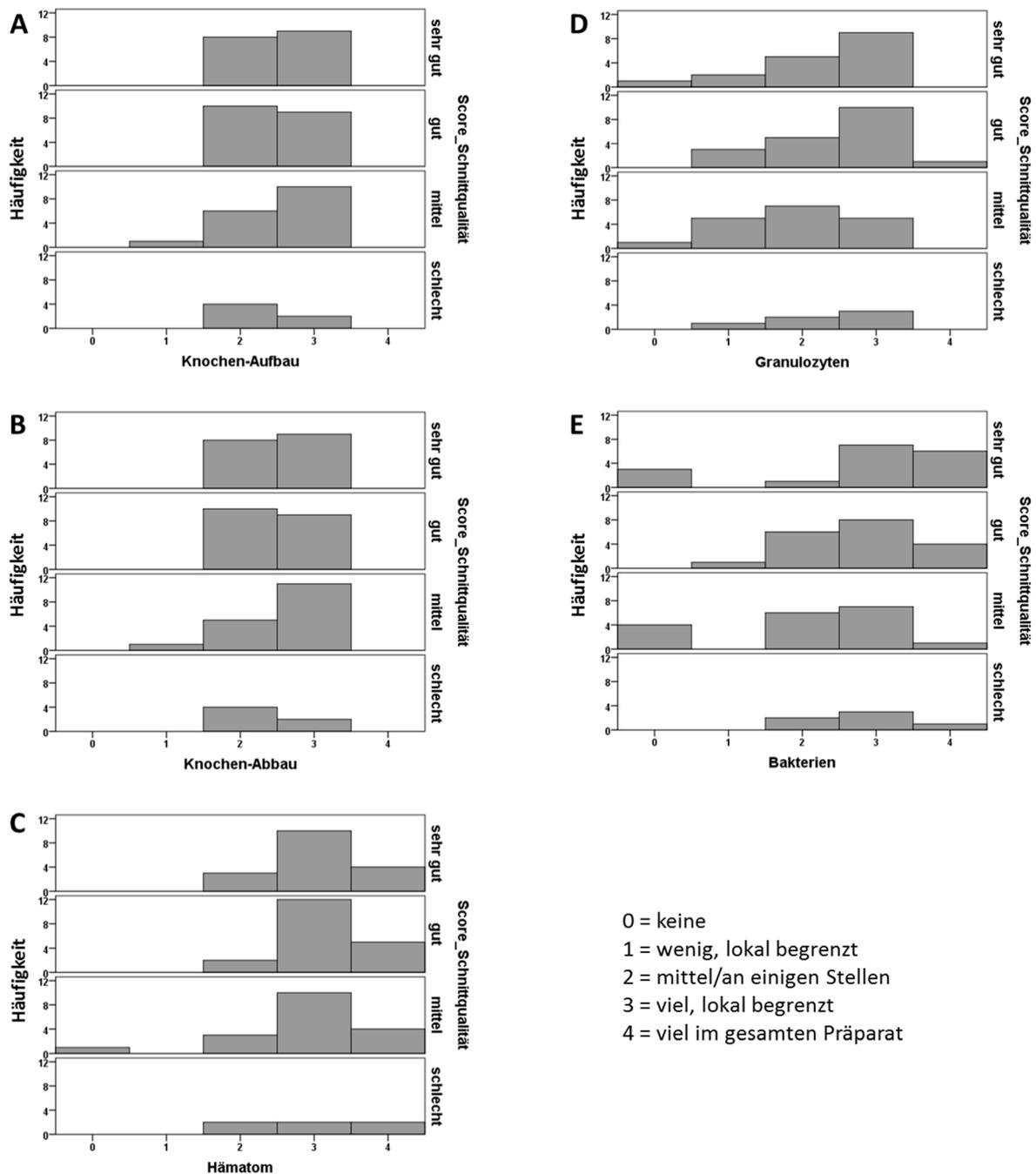


Abbildung 27: Darstellung der Bewertungskriterien in Bezug zur Schnittqualität. Es besteht kein Zusammenhang zwischen der Schnittqualität und der semi-quantitativen Bewertung der einzelnen Parameter. Die Bandbreite der Bewertung ist von sehr guter bis schlechter Schnittqualität vergleichbar. Daher konnten auch Tibiae, welche bei der Präparation nicht optimal geteilt wurden, in die Auswertung eingeschlossen werden.

4.6 Scoring: Die Operation mit Infektion löst eine akute Osteomyelitis aus

Akute Osteomyelitis:

Die Kombinationen aus der Toluidinblau mit der Gram-Färbung und der Movat Pentachrom mit der Gram-Färbung ermöglichte die Beurteilung wie häufig neutrophile Granulozyten, Hämatome und Bakterien in den einzelnen Proben vorkamen und erhöhte bei der Toluidinblau Färbung die Sensitivität des Scorings. Bakterien und neutrophile Granulozyten waren in allen Proben der operierten und infizierten Proben zu finden und sind charakteristisch für eine frühe Entzündung. Da Hämatome ein Bestandteil der frühen Immunreaktion sind, wurden sie in die Bewertung mit eingeschlossen. Bezüglich der Bakterien, Hämatome und Granulozyten musste der Score bei zwei dieser drei Kriterien über denen der Negativkontrollen liegen, um bezüglich einer frühen akuten Osteomyelitis positiv gewertet zu werden. In der CpG ODN vorbehandelten Gruppe an Tag 6 waren alle Proben Osteomyelitis-positiv während an Tag 4 nur 8 Proben positiv waren. In den Positivkontrollen waren an Tag 4 mit Movat Pentachrom alle Proben und bei Toluidinblau in Kombination mit der Gram-Färbung 8 Proben Osteomyelitis-positiv. Bei den mit negativ ODN vorbehandelten Tieren waren alle Proben an Tag 6 Osteomyelitis-positiv, während an Tag 4 mit Movat Pentachrom 5 Proben und mit Toluidinblau 7 Proben als positiv bewertet wurden (Abbildung 28).

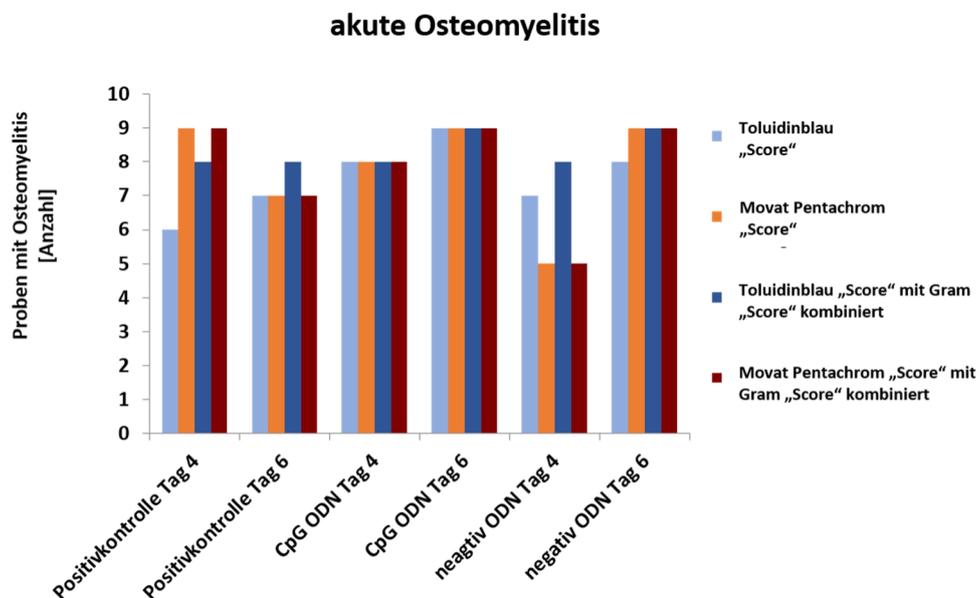


Abbildung 28: In allen Gruppen und zu beiden Zeitpunkten entwickelten mindestens 50 % der Tiere eine akute Osteomyelitis. Die Kombination der Toluidin Blau mit der Gram-Färbung

erhöht die Sensitivität des Scorings. Gegenüberstellung der Färbungen (einzeln oder kombiniert) und der Anzahl der als positiv gewerteten Proben (nach Gruppen und Zeitpunkten).

Potentiell chronische Osteomyelitis:

Besteht eine Osteomyelitis über einen längeren Zeitraum, kommt es am Ende der akuten Phase zu einem pathologischen Knochenmetabolismus. Dieser führt dann in der chronischen Phase zur Lyse von Knochensubstanz und zur Ausbildung von Knochenläsionen. Daher wurden beim Osteomyelitis-Scoring der Knochenaufbau und der Knochenabbau schon in den Standardfärbungen mit bewertet. Hierbei zeigte sich, ob der Knochenmetabolismus innerhalb einer Probe ausbalanciert war. Mit der TRAP-Enzymhistochemie konnten aktive Osteoklasten nachgewiesen und durch die Negativkontrollen konnte ein Normwert festgesetzt werden. Ein nicht ausbalancierter Knochenmetabolismus (in den Standardfärbungen) und ein Osteoklastenscore (TRAP-Enzymhistochemie) oberhalb des Normalwertes wurden als Zeichen einer etablierten Osteomyelitis gewertet, die das Potential zur Chronifizierung hatte. Mit der Toluidinblau Färbung zeigten je eine Probe der Positivkontrolle und der negativ ODN Gruppe an Tag 4 einen nicht ausbalancierten Knochenmetabolismus. An Tag 6 war der Knochenmetabolismus in je einer Probe der CpG-ODN und der negativ ODN nicht ausbalanciert, während dies bei drei Proben der Positivkontrolle der Fall war. Mit der Movat Pentachrom Färbung war in der Positivkontrolle an Tag 4 ein ausbalancierter Knochenmetabolismus erkennbar, während in der CpG-ODN Gruppe eine Probe und in der negativ ODN Gruppe zwei Proben einen nicht ausbalancierten Knochenmetabolismus zeigten. An Tag 6 zeigten je zwei Proben der Positivkontrolle und der CpG-ODN Gruppe sowie eine Probe aus der negativ ODN Gruppe einen nicht ausbalancierten Knochenstoffwechsel. Osteoklastenhäufigkeiten oberhalb der Normalwerte waren an Tag 4 nur in je zwei Proben aus der Positivkontrolle und der CpG-ODN Gruppe sowie in einer Probe aus der negativ ODN Gruppe zu finden. An Tag 6 waren bei je acht Proben der Positivkontrolle und der CpG-ODN Gruppe sowie bei sieben Proben der negativ ODN Gruppe die Osteoklastenhäufigkeit oberhalb der Normalwerte und können daher als Osteomyelitis-positiv mit dem Potential zur chronischen Osteomyelitis gewertet werden (Abbildung 29).

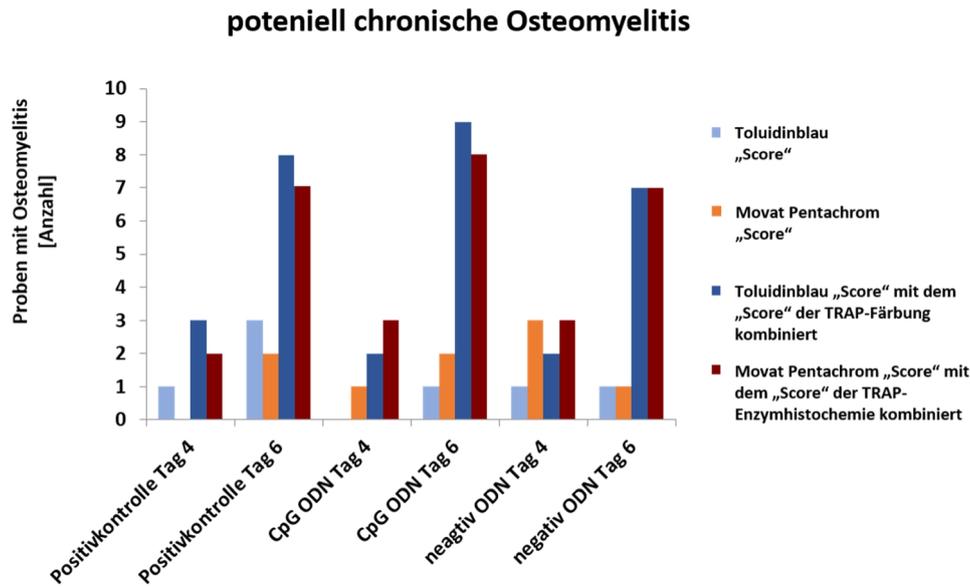


Abbildung 29: Die Kombination aus Standardfärbungen und TRAP-Enzymhistochemie kann das Potential zur Chronifizierung einer Osteomyelitis aufzeigen. An Tag 6 sind in allen Gruppen mehr aktive Osteoklasten zu finden. Häufigere katabole Prozesse sind ein Zeichen für eine beginnende Knochenlyse, welche für eine chronische Osteomyelitis charakteristisch ist. Gegenüberstellung der Färbungen (einzeln oder kombiniert) und der Anzahl der als positiv gewerteten Proben (nach Gruppen und Zeitpunkten).

4.7 Histomorphometrie: mehr knorpelige Anteile und weniger ossifizierter sowie nicht-mineralisierter Knochen nach präoperativer lokaler Behandlung

Die histomorphometrische Auswertung erfolgte bezüglich der drei Parameter „Total Ossified Tissue“ (TOT; ossifizierter Knochen), „Total Cartilage Tissue“ (TCT; Knorpel) und „nicht-mineralisiert“ als prozentuale Angabe bezogen auf die Gesamtfläche des Präparates. Erhöhte Anteile von knorpeligen Knochenarealen zusammen mit einer Abnahme an ossifizierten Knochen konnte als Hinweis auf eine verringerte Knochenqualität gewertet werden (Abbildung 30). Eine Abnahme an nicht-mineralisiertem Knochen spiegelte weniger Osteoid und damit weniger Knochenneubildung wider.

ossifizierter Knochen:

Der prozentuale Anteil von TOT war in der Negativkontrolle am dritten Tag nach der OP mit 67,83 % signifikant ($p = 0,009$) höher als in Gruppe 1 (Positivkontrolle) an Tag drei nach der OP (47,45 %) und war gegenüber Gruppe 3 (neg. ODN) zum gleichen Zeitpunkt (52,93 %) ebenfalls erhöht ($p = 0,05$). Die Negativkontrolle am dritten Tag nach der OP zeigte im Vergleich zu Gruppe 3 (500 µg CpG; 46,36 %) tendenziell erhöhte Werte (67,83 %; $p = 0,064$). Gruppeninterne Unterschiede zwischen den Zeitpunkten oder Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen zeigten sich nicht (Abbildung 30A).

knorpelige Knochenanteile:

Der prozentuale Anteil an TCT war bei der Negativkontrolle an Tag drei nach der OP mit 30,18 % signifikant ($p = 0,009$) niedriger als in Gruppe 1 (Positivkontrolle; 51,29 %) und Gruppe 2 (500 µg CpG) mit 52,55 % zum gleichen Zeitpunkt ($p = 0,036$). Gegenüber der Gruppe 3 (neg. ODN; 45,81 %) zeigte die Negativkontrolle an Tag drei nach OP einen ebenfalls tendenziell verringerten Wert ($p = 0,063$). Gruppeninterne Unterschiede zwischen den Zeitpunkten oder Unterschiede zwischen den behandelten Gruppen zeigten sich nicht (Abbildung 30B).

nicht-mineralisierter Knochen:

Der prozentuale Anteil an nicht-mineralisierter Knochenmatrix unterschied sich sowohl zwischen den Gruppen wie auch gruppenintern zwischen den Zeitpunkten. Die Positivkontrolle zeigte am ersten postoperativen Tag mit 0,54 % signifikant ($p = 0,021$) niedrigere Werte als am dritten Tag nach der OP (1,25 %). Auch bei der Negativkontrolle schien sich ein Unterschied zwischen dem frühen (0,49 %) und dem späten Zeitpunkt (1,99 %) erkennen zu lassen mit niedrigeren Werten am ersten postoperativen Tag, der sich statistisch jedoch nicht beweisen ließ ($p \leq 0,1$). Die Negativkontrolle an Tag drei nach der OP erweckte den Eindruck mit 1,99 % tendenziell höhere Werte im Vergleich zur Positivkontrolle (Gruppe 1) mit 1,25 % und zu Gruppe 2 (500 µg CpG) mit 1,08 % zu haben, was statistische jedoch ebenfalls nicht belegbar war ($p \leq 0,1$). Gruppe 3 (neg. ODN) mit 1,16 % zeigte tendenziell erhöhte Werte ($p = 0,068$) am ersten postoperativen Tag gegenüber der Positivkontrolle (Gruppe 1) mit 0,54 % (Abbildung 30C).

An Tag 4 zeigten sich weder beim ossifizierten noch beim knorpeligen oder nicht-mineralisierten Knochenanteil Unterschiede zwischen den Gruppen. Daher war die Knochenqualität an Tag 4 durch die Vorbehandlung und die Operation mit Infektion noch nicht beeinflusst. An Tag 6 waren Einflüsse der Vorbehandlung und der Operation mit Infektion auf die Knochenqualität erkennbar. Im Vergleich zu der Negativkontrolle war der Anteil an ossifiziertem und nicht-mineralisierten Knochen in den vorbehandelten und operierten Gruppen verringert und der knorpelige Knochenanteil war in diesen Gruppen im Vergleich zur Negativkontrolle erhöht. Die Knochenqualität war in den vorbehandelten und operierten Gruppen also verringert und es wurde weniger neuer Knochen gebildet.

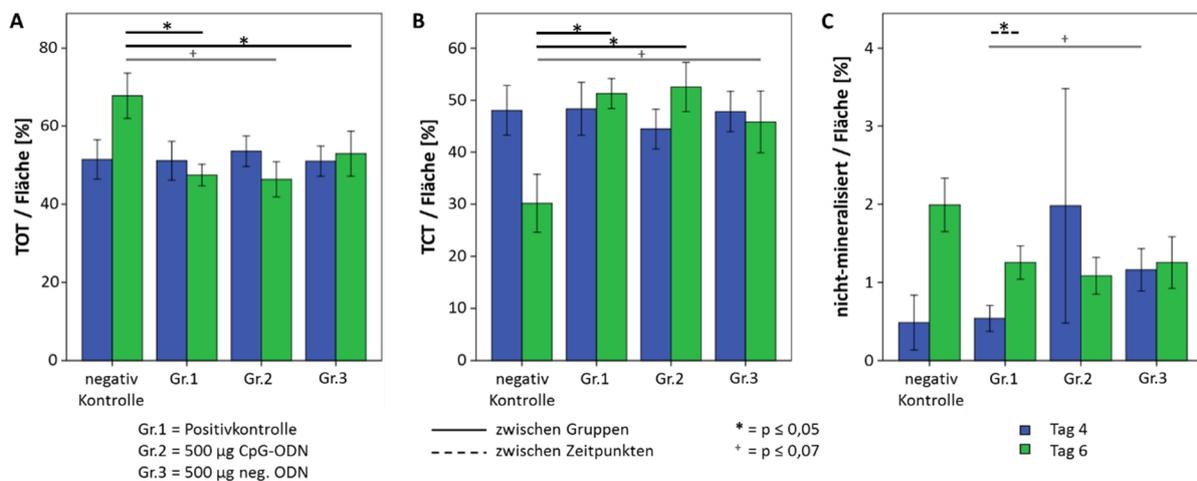


Abbildung 30: Einfluss der Vorbehandlung und Operation auf die Knochenqualität. (A) Die Vorbehandlung reduziert den TOT-Anteil (ossifizierter Knochen) an Tag 6, während (B) der Anteil an TCT (knorpelige Knochenanteile) im Vergleich zur Negativkontrolle erhöht ist. (C) Der nicht-mineralisierte Anteil ist an Tag 4 in der Positivkontrolle niedriger als in der negativ ODN Gruppe während er an Tag 6 in der Negativkontrolle höher ist als in der Positivkontrolle und der CpG-ODN Gruppe.

An Tag 6 war der Anteil an ossifiziertem und nicht-mineralisiertem Knochen bei den vorbehandelten und operierten Gruppen im Vergleich zur Negativkontrolle verringert, während der knorpelige Anteil im Knochen in den vorbehandelten und operierten Gruppen erhöht war. Die Häufigkeit der Osteoklasten nahm am kortikalen Knochen bei allen vorbehandelten und operierten Gruppen zu diesem Zeitpunkt ab. Die Abnahme von mineralisiertem Knochen bei einer verringerten Osteoklastenhäufigkeit ließ sich mit einer erhöhten Osteoklastenaktivität erklären. An den Trabekeln verringerte sich die Häufigkeit der Osteoklasten an Tag 6 nur bei der Positivkontrolle, während deren Häufigkeit in der CpG-ODN und der negativ ODN Gruppe

zunahm. Dies deutete eine Osteoklasten stimulierende Wirkung der applizierten ODNs an. Die Kombination der Ergebnisse aus der Histomorphometrie mit den Häufigkeitsverteilung der semi-quantitativen Auswertung ließen auf eine negative Beeinflussung der Knochenqualität und -Quantität durch die Vorbehandlung und die Operation mit Infektion schließen.

4.8 Rasterelektronenmikroskopie: keine Unterschiede bei der bakteriellen Belastung auf den Implantaten

Bakterien konnten auf allen untersuchten Implantaten gefunden werden. Hierbei zeigte sich die Verteilung der Bakterien uneinheitlich auf den Implantaten und unabhängig von der Vorbehandlung (PBS, CpG-ODN oder neg. ODN). Die Bakterien waren bei allen Gruppen hauptsächlich als lose oder dichte Ansammlungen auf den Marknägeln zu finden. Biofilme, welche von *S. aureus* gebildet werden können, wurden auf den Marknägeln nicht gefunden. Rein deskriptiv bewertet, waren alle Implantate in einem vergleichbaren Maß mit Bakterien belastet (Abbildung 31).

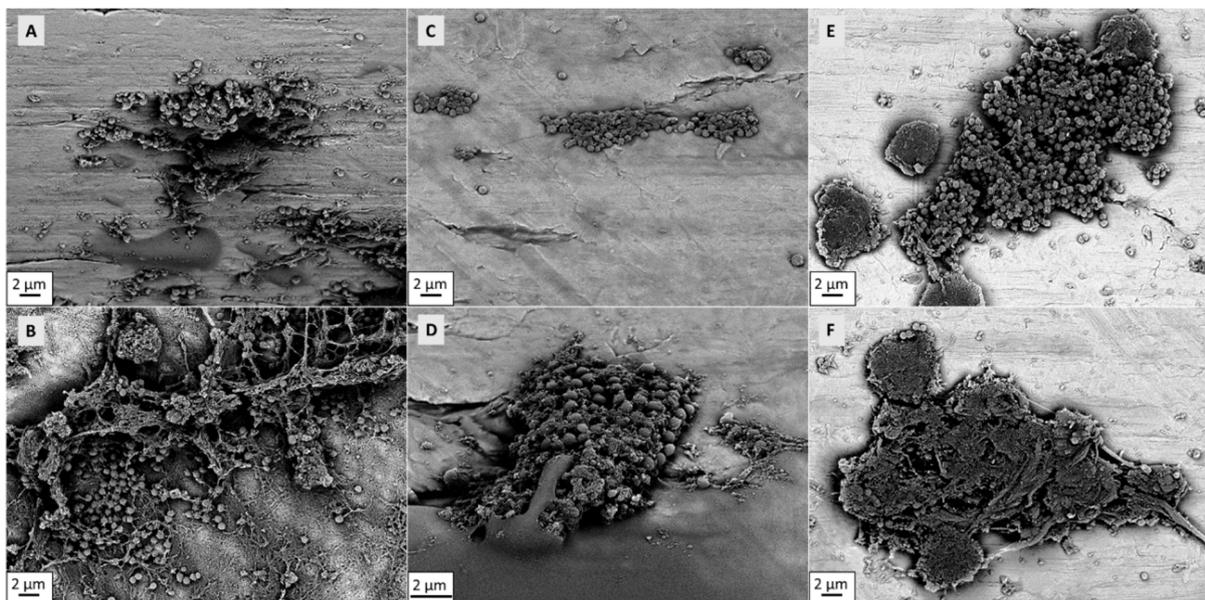


Abbildung 31: REM-Abbildung der am Marknagel anheftenden Bakterien. (A+B) Positivkontrolle, (C+D) Vorbehandlung mit 500 µg CpG und (E+F) Vorbehandlung mit negativ ODN. Alle Proben zeigten einen vergleichbaren bakteriellen Besatz mit einer inhomogenen Verteilung der Bakterien auf den Implantaten.

Diese inhomogene Verteilung der Bakterien auf den Implantaten spiegelte sich auch in einer inhomogenen Verteilung der Bakterien im Markraum (bei der Auswertung der Toluidinblau, Movat Pentachrom und der Gram-Färbung) wider.

4.9 Mikrobiologie: die Keimzahlen auf den Implantaten zeigen starke Schwankungen innerhalb der Gruppen

Die mikrobiologische Untersuchung der Marknägel und die Keimzahlbestimmung im Markraum erfolgten durch Dr. Walid Mohamed (Institut für Mikrobiologie, JLU-Gießen) in Form von Ausrolltests auf Standardagarplatten. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Kolonien zur Keimzahlbestimmung auf den Implantaten ausgezählt.

Am ersten postoperativen Tag war die höchste Keimbelastung in der negativ ODN Gruppe mit 2×10^6 CFUs auf dem Implantat zu finden. Der zweithöchste Wert von $1,5 \times 10^6$ CFUs wurde in der Positivkontrolle erreicht. Die niedrigsten Werte wurden auf Implantaten der Positivkontrolle und der CpG-ODN Gruppe erreicht. Werte zwischen $0,5$ und $0,7 \times 10^6$ CFUs wurden auf Implantaten aller drei Gruppen gefunden. Die Keimbelastung [CFU/Implantat] schwankte innerhalb der Gruppen. Tendenziell war einen Tag nach der OP/Infektion die Keimbelastung in der CpG-ODN Gruppe geringer als in den anderen Gruppen (Abbildung 32A).

Drei Tage nach der OP war die höchste Keimbelastung mit 4×10^6 CFUs auf dem Implantat in der Positivkontrolle zu finden. Der zweithöchste Wert mit 2×10^6 CFUs wurde in der CpG-ODN Gruppe gefunden. Zu diesem Zeitpunkt zeigten beide ODN vorbehandelten Gruppen tendenziell eine verringerte Keimbelastung gegenüber der Positivkontrolle (Abbildung 32B).

Zu beiden Zeitpunkten zeigten sich gruppenintern große Schwankungen bei der Keimbelastung auf den Implantaten. Die maximale Belastung war an Tag 6 doppelt so hoch wie an Tag 4.

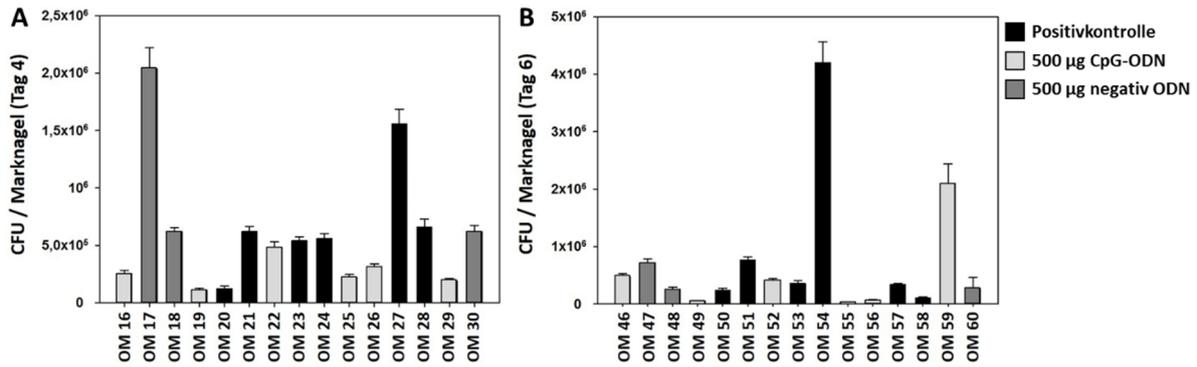


Abbildung 32: Individuelle Keimbelastung auf den Implantaten einen oder drei Tage nach der OP/Infektion. (A) In der Positivkontrolle und der negativ ODN Gruppe waren die Keimbelastung auf den Implantaten an Tag 4 tendenziell höher als in der CpG-ODN Gruppe. (B) An Tag 6 waren die höchsten Keimbelastungen bei der Positivkontrolle und bei der CpG-ODN Gruppe zu finden. (CFU = koloniebildende Einheiten; OM = Ohrmarke/individuelle Tiernummer)

Bei der mikrobiologischen Keimzahlbestimmung auf den Implantaten zeigten sich innerhalb der Gruppen deutliche Schwankungen. In der Histologie zeigte sich bei allen drei Färbungen, welche sich zur Bestimmung der Bakterienhäufigkeit eigneten, ebenfalls starke Varianzen innerhalb der Gruppen (Abbildungen 14B, 19B und 26C+D). Die höhere Keimbelastung auf den Implantaten an Tag 6, welche sich in der mikrobiologischen Untersuchung im Vergleich zu Tag 4 zeigte, war auch in der Histologie (Toluidinblau, Movat Pentachrom und Gram-Färbung) bei der Häufigkeit der Bakterien im Markraum zu erkennen. Die histologische Häufigkeitsbestimmung der Bakterien zeigte daher übereinstimmende Ergebnisse mit der Keimzahlbestimmung aus der Mikrobiologie.

5. Diskussion

Die Diagnose einer Osteomyelitis gestaltet sich bisweilen sehr schwierig, da je nach Krankheitsverlauf die radiologischen Untersuchungen unauffällig und die mikrobiologische Diagnostik negativ sein kann. In dieser Studie wird daher ein verbessertes „Scoring“-System für die Diagnose einer Osteomyelitis vorgestellt. Hierbei erfolgt die Beurteilung rein histologisch und basierend auf den pathologischen Veränderungen, welche für eine akute Osteomyelitis charakteristisch sind. Die Besonderheit dieses „Scoring“-Systems besteht in der frühen Detektion einer potentiell chronischen Osteomyelitis während der akuten Phase. Durch die Analyse der mineralisierten und nicht-mineralisierten Knochenanteile bietet sich in dieser Studie ein Ansatz zum Verständnis der Zusammenhänge zwischen zellulären und Knochenmatrix-Veränderungen bei einer Osteomyelitis. Dabei liegt ein Fokus auf dem Zusammenhang zwischen dem mineralisierten Knochen und dem Hämatom (später auch dem Granulationsgewebe), welches in Folge der mechanischen Verletzungen bei der Marknagel-implantation und der Infektion gebildet wird.

5.1 Präklinische Tiermodelle können humane Osteomyelitiden begrenzt abbilden

Grundlagenforschung zur Pathogenese von Osteomyelitiden sowie Untersuchungen zu neuartigen Therapieansätzen oder prophylaktischen Behandlungen zur Vermeidung einer Osteomyelitis können leider nur an *in vivo* Tiermodellen durchgeführt werden. Solche präklinischen Untersuchungen sind gesetzlich für die Entwicklung neuer Therapieansätze vorgeschrieben. Hierbei sind nach den Tierschutzgesetzen und den ethischen Ansprüchen die „niedrigste“ Tierart zu wählen und der Versuch so zu planen, dass die Belastung für die Tiere im Versuch dem 3-R Prinzip folgt und möglichst gering ist. Kaninchen und Ratten sind für Versuche zur Ätiologie oder Therapie von Osteomyelitiden die mit Abstand am häufigsten verwendeten Tierarten [98]. Daher ist das verwendete Rattenmodell der Implantat-assoziierten Osteomyelitis mit einem intramedullären Implantat und einer Infektion mit *S. aureus* ein bereits etabliertes und akzeptiertes präklinisches Modell [37; 44; 70-71], an dem die Wirkung präoperativ applizierter Oligodesoxynukleotide untersucht werden konnte.

In den präklinischen Tiermodellen erfolgt die Diagnose einer Osteomyelitis makroskopisch [100; 115], klinisch (radiologisch und Serumparameter), mikrobiologisch und histologisch [98]. Bei Studien mit histologischen Analysen von Knochenproben werden immunologische Reaktionen, das Auftreten von Bakterien und Sequestern, sowie Knochen- und

Weichgewebeveränderungen evaluiert [55; 92; 127]. Das in dieser Arbeit vorgestellte „Scoring“-System beruht ebenfalls hauptsächlich auf histologischen Analysen, die von den mikrobiologischen Untersuchungen gestützt werden, da keine klinischen Parameter (Radiologie, Serumanalyse) durchgeführt wurden. Im Vergleich zu vorangegangenen Arbeiten mit histologischem „Scoring“ [55; 92; 127] ermöglicht die Evaluierung der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten, Bakterien, Hämatomen und einer ausbalancierten beziehungsweise nicht ausbalancierten Knochenumbaurate eine frühe Osteomyelitis (mit Potential zur chronischen Osteomyelitis) zu erkennen. Im Gegensatz zu präklinischen Modellen ist eine histologische Diagnose einer Osteomyelitis im klinischen Bereich unwahrscheinlich, da dort radiologische und mikrobiologische Untersuchungen sowie die Patientenanamnese im Vordergrund stehen. Dennoch wurde das in dieser Arbeit vorgestellte „Scoring“-System bewusst einfach gehalten so, dass es auf andere Tiermodelle beziehungsweise Versuchsreihen übertragen werden könnte.

5.2 Eine frühe Osteomyelitis kann rein histologisch nachgewiesen werden

Eine frühe, akute Osteomyelitis ist durch entzündliche Prozesse im Knochenmark gekennzeichnet und entsteht innerhalb von zwei Wochen nach einer bakteriellen Infektion. Bleibt die akute Entzündung im Knochen unbehandelt, kann sich eine chronische Osteomyelitis entwickeln. Bei chronischen Verlaufsformen weitet sich die Entzündung auf den mineralisierten Knochen und das umliegende Weichgewebe aus. Als Symptome kommen die Zerstörung des Knochens (verminderter Knochenqualität und –Masse) mit Sequester- und Abszessbildung hinzu. Bei der Analyse der Knochenproben wurden die wichtigsten Parameter einer beginnenden bakteriellen Osteomyelitis (Infiltration von neutrophilen Granulozyten und die Anwesenheit von Bakterien), die Häufigkeit des Hämatoms im Markraum und die Knochenqualität sowie der Knochenmetabolismus, welcher bei chronischen Verlaufsformen gestört ist, beurteilt. Hierbei konnte eine frühe akute Osteomyelitis mit der Kombination von histologischen Methoden nachgewiesen werden. Die in der klinischen Osteomyelitisdiagnostik wichtige Mikrobiologie wurde parallel durchgeführt, bestätigte die histologischen Bewertungen und belegte eine bestehende Infektion mit *S. aureus*. Allerdings lieferte sie keine zusätzlichen Erkenntnisse, so dass in dieser Versuchsreihe eine akute Osteomyelitis sogar mit rein histologischen Methoden diagnostiziert werden konnte. Daher ist in prä-klinischen

Modellen die Histologie parallel zur Mikrobiologie eine geeignete Methode, um ein Übergreifen einer Infektion auf den Knochen und damit eine Osteomyelitis zu bestätigen.

5.3 Das Potential zur Chronifizierung ist bereits in der akuten Phase einer Osteomyelitis erkennbar

Anzeichen einer akuten Osteomyelitis waren bereits bei der Bewertung der Standard-färbungen in Proben aus jeder operierten Versuchsgruppe zu finden. Die Kombination der Standardfärbungen mit einem spezifischen, histologischen Bakteriennachweis konnte die Sensitivität für die Erkennung einer frühen akuten Osteomyelitis verbessern (Abbildung 28). Für eine positive Bewertung bezüglich einer Osteomyelitis mussten zwei der drei zellulären Kriterien (neutrophile Granulozyten, Bakterien und Hämatom) oberhalb der „Scores“ aus den Negativkontrollen liegen. Die Granulozytenhäufigkeit wurde auch schon in anderen Bewertungssystemen für eine aktive Osteomyelitis verwendet, ebenso wie die Unterteilung in „keine“, „wenig“, „mittel“ und „schwer“ [13; 119; 127]. Eine Festlegung von Normalwerten anhand von Negativkontrollen erfolgte bei diesen Systemen allerdings nicht, da sie auf Biopsien von Patienten beruhen [13; 39; 79; 90; 119]. Im Gegensatz zu einer aktuellen Studie über infizierte Knieersatzimplantate in der Ratte [119] waren in der hier vorgestellten Versuchsreihe nicht alle unbehandelten Proben im „Scoring“ unauffällig. Daher wurden die Höchstwerte der einzelnen Kriterien in den unbehandelten Kontrollen als Mindestwerte bei den behandelten Proben angenommen. Dieser musste überschritten werden, um als für eine Osteomyelitis positives Ereignis gewertet zu werden. Im untersuchten Rattenmodell zeigten sich bei der histologischen Auswertung jedoch unterschiedliche lokale Ausprägungen der Kategorie „schwer“, welche in den bekannten Bewertungssystemen nicht berücksichtigt werden. Deshalb wurde hier der Begriff „schwer“ durch „viel“ ersetzt und durch eine Angabe zur Lokalisation „lokal begrenzt“ oder „im gesamten Präparat“ ergänzt. Diese lokale Komponente zeigte sich auch bei der Bakterienhäufigkeit, welche zwar in der Klinik über die mikrobiologische Keimart- und Keimzahlbestimmung zur Diagnose einer Osteomyelitis verwendet wird, aber in den histologischen Bewertungen weitestgehend unberücksichtigt bleibt [2; 26; 54; 72; 127]. Die Anwesenheit eines Hämatoms wurde bisher bei der Diagnose einer akuten Osteomyelitis nicht berücksichtigt. Da Hämatome jedoch die Heilung und den Knochenmetabolismus beeinflussen können [47; 89; 126], kann der Einschluss dieses Kriteriums in die histologische

Osteomyelitisdiagnose vorteilhaft für die diagnostische Sensitivität bei einer frühen akuten Osteomyelitis sein.

Die Sensitivität der Beurteilung konnte auch dadurch erhöht werden, dass das eingeführte Punktesystem, welches einen Punkt für jeden Score oberhalb des Normalwertes der Negativkontrolle vorsieht, eine Addition der einzelnen histologischen Kriterien ermöglicht. Hierdurch ließen sich ein nicht ausbalancierter Knochenmetabolismus aus den Standardfärbungen und die Osteoklastenhäufigkeit aus der Enzymhistochemie mit der schon diagnostizierten akuten Osteomyelitis kombinieren. Eine Veränderung des Knochenmetabolismus oder der Osteoklastenhäufigkeit zusammen mit den Anzeichen einer akuten Osteomyelitis wurden als Hinweis auf ein Übergreifen der Infektion auf den mineralisierten Knochen gewertet. Ein Übergreifen einer Infektion vom umgebenden Weichgewebe oder aus dem Markraum auf den mineralisierten Knochen kann zu einer chronischen Osteomyelitis führen, welche unter anderem durch Knochenläsionen charakterisiert ist. Schon drei Tage nach der Operation mit Infektion gab es Proben, die sowohl eine akute Osteomyelitis entwickelt hatten wie auch häufiger Osteoklasten enthielten und damit potentiell einen chronischen Verlauf der Osteomyelitis entwickeln könnten (Abbildung 29). Das in dieser Versuchsreihe verwendete Scoring bietet einen großen Fortschritt bei der Beurteilung einer frühen Osteomyelitis, da schon drei Tage nach einer Infektion das Potential zur Entwicklung einer chronischen Osteomyelitis erkannt werden konnte.

5.4 Eine präoperative CpG-ODN Applikation kann das Immunsystem aktivieren aber eine entstehende Osteomyelitis nicht verhindern

Nach einer Verletzung sind die Bildung eines Hämatoms sowie die Aktivierung des angeborenen Immunsystems die initialen Schritte der Wundheilung [89] und 24 Stunden nach einer Verletzung des Knochens erhöhen sich die anti-inflammatorischen Signale [111]. Daher kann die Bildung eines Hämatoms als ein kritischer Schritt bei der Heilung angesehen werden. Wird im Zuge einer chirurgischen Frakturversorgung das initiale Hämatom entfernt, kommt es daher zu einer gestörten Heilung mit einer verzögerten Bildung von Geflechtknochen [126]. In allen vorbehandelten und operierten Gruppen und zu beiden Zeitpunkten waren Hämatome im Markraum der Proben zu finden. Dies erklärt sich durch das operative Einbringen des Marknagels in den Tibiamarkraum, da hierbei Blutgefäße im Markraum verletzt werden. Im Versuch variiert die Menge an Hämatom auch in den Negativkontrollen von „kein“ bis „viel“

und kann daher von der Entnahmeprozedur mit Längsspaltung der Tibiae verursacht worden sein. Da Hämatome in allen vorbehandelten und operierten Proben aber nicht in jeder Negativkontrolle enthalten waren, sollte dieser Parameter bei der histologischen Bewertung einer beginnenden Osteomyelitis berücksichtigt werden. Obwohl sich im Versuch kein Grenzwert für die Häufigkeit eines Hämatoms in der Probe ermitteln ließ, ist sein heilungsfördernder Aspekt gut belegt [89; 111; 126] Bei Verletzungen des Knochens dient das entstandene Hämatom nicht nur dem Anlocken von Immunzellen, sondern das Hämatom zeigt auch ein osteogenes Potential [47]. Das mit dem Hämatom gebildete Fibrinnetzwerk dient der Migration und Proliferation der osteogenen und chondrogenen Vorläuferzellen [14]. Die Zunahme des Knochenaufbaus vom frühen zum späten Zeitpunkt kann das osteogene Potential des Hämatoms widerspiegeln, da bei allen vorbehandelten und operierten Gruppen zum frühen Zeitpunkt auch „viel“ Hämatom im Markraum vorhanden war.

Nach einer Verletzung wandern zuerst die neutrophilen Granulozyten gefolgt von den Makrophagen in das Hämatom ein [4; 25] und dienen als Teil der angeborenen Immunität der Zerstörung von körperfremden Mikroorganismen. Die neutrophilen Granulozyten können eine bakterielle Infektion nicht nur durch die Phagozytose von Bakterien bekämpfen sondern durch die Bildung extrazellulärer Fasernetzwerke (NETs) die Ausweitung einer bakteriellen Infektion begrenzen [15]. Neutrophile Granulozyten waren in den unbehandelten Kontrollen „keine“ oder „wenig/lokal begrenzt“ zu finden und diese Häufigkeiten können daher als Sollwert für den nicht pathologisch veränderten Knochen angenommen werden. Bei den vorbehandelten, operierten und infizierten Gruppen lagen nur 3 beziehungsweise 7 Proben (bei der Toluidinblau bzw. Movat Pentachrom Färbung) innerhalb dieses Sollwertes während alle anderen Proben häufiger („mittel“ bis „viel und im gesamten Präparat“) neutrophile Granulozyten enthielten. Das vermehrte Auftreten von neutrophilen Granulozyten, welche körperfremde Moleküle und Pathogene beseitigen, kann als frühe Reaktion des Immunsystems auf die Infektion mit *S. aureus* gewertet werden [42; 107]. Diese Annahme konnte mit den histologischen Färbungen (Toluidinblau, Movat Pentachrom und Gram-Färbung) bestätigt werden. Denn hier zeigte sich kein einziges Präparat aus den vorbehandelten und operierten Gruppen gleichzeitig frei von Bakterienclustern und Ansammlungen neutrophiler Granulozyten. Durch die Gram-Färbung wurde deutlich, dass außer den Negativkontrollen jedes Präparat mit *S. aureus* infiziert war. Histologisch sind diese beiden Parameter (Keimbelastung und Gewebeeinfiltration mit Leukozyten) charakteristisch für die Frühphase einer Infektion [13; 15] und können daher als

zuverlässige Parameter für die histologische Identifizierung einer beginnenden oder akuten Osteomyelitis verwendet werden [13; 17; 68; 127].

Obwohl bei allen vorbehandelten, operierten und infizierten Gruppen die Häufigkeit der neutrophilen Granulozytenansammlungen von Tag 4 zu Tag 6 zunahm, zeigte sich auch eine Zunahme der Bakterienhäufigkeit im Markraum über diesen Zeitraum. Einerseits ist es vom Immunsystem zu erwarten, dass bei einer größeren Häufigkeit von Bakterien auch mehr Immunzellen aktiviert werden um diese Infektion zu bekämpfen [31]. Andererseits könnte dieses gehäufte Auftreten neutrophiler Granulozyten auch ein Hinweis darauf sein, dass im Versuch das Immunsystem der Ratten mit der initialen Menge an Bakterien von 10^5 CFU überfordert war. In einem Kaninchenmodell zur Implantatinfektion war schon eine Menge von 50 Keimen ausreichend, um eine Infektion auszulösen [122] und in anderen Versuchen zu Infektionen von Implantaten im Rattenmodell führten initiale Keimzahlen von 10^3 CFU zu einer verzögerten Heilung [114]. Außerdem kann die Anwesenheit eines Implantates die polymorphonukleären neutrophile Granulozyten lokal negativ beeinflussen und deren Fähigkeit Bakterien zu phagozytieren verringern [26]. Diese beiden Aspekte sprechen daher für eine Überforderung des Immunsystems bei der eingesetzten hohen initialen Keimbelastung. Können akute Infektionen nicht durch das Immunsystem und gegebenenfalls mit der Unterstützung durch Antibiotika beseitigt werden, entwickeln sich chronische Verlaufsformen [18; 26; 86]. Da in allen Proben aus den vorbehandelten, operierten und infizierten Gruppen aktive entzündliche Prozesse und damit eine beginnende akute Osteomyelitis sowie eine Zunahme der Bakterienhäufigkeit vom frühen zum späten Euthanasiezeitpunkt zu erkennen waren, wäre eine Chronifizierung der Osteomyelitis bei längerer Versuchsdauer (Standzeit der Tiere) zu erwarten. Neben der potentiellen Chronifizierung der Osteomyelitis verschleiert die sehr hohe initiale Keimbelastung wahrscheinlich das protektive Potential der präoperativen CpG-ODN Applikation, so dass trotz einer Voraktivierung des Immunsystems am ersten Tag nach der OP in allen Gruppen weniger Granulozyten und Bakterien zu finden sind als drei Tage nach der OP.

CpG-ODN sind charakteristisch für bakterielle oder virale DNA und werden durch den Toll-like Rezeptor 9 (TLR 9) als nicht körpereigen erkannt. Synthetische CpG-ODN können die Immunantwort auf Bakterien oder Viren in höheren Säugetieren stimulieren [22; 59]. Im Versuch war die Bakterienhäufigkeit im Markraum bei allen vorbehandelten, operierten und infizierten Gruppen an Tag 6 verglichen mit Tag 4 erhöht. Am häufigsten wurden Bakterien sogar bei der CpG-ODN vorbehandelten Gruppe an Tag 6 gefunden. Dieses Ergebnis zeigte

sich in der Movat Pentachrom wie auch in der Gram-Färbung und steht damit im Kontrast zur Literatur, welche eine stimulierende Wirkung der CpG-ODNs auf das Immunsystem und eine Reduzierung der Keimzahlen belegt [22; 59; 114; 130]. Mit der Toluidinblau Färbung ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Art der Vorbehandlung (PBS, CpG-ODN oder negativ ODN) und der Bakterienhäufigkeit im Markraum darstellen. Die protektive Wirkung applizierter CpG-ODN auf die Häufigkeit von Bakterien im Markraum oder auf den Implantaten konnte in diesem Versuch nicht bestätigt werden, da sich die maximale Keimbelastung neben der Histologie auch bei den mikrobiologischen Ergebnissen in der CpG-ODN Gruppe an Tag 6 zeigte.

In einer klinischen Studie (Phase-2) entwickelten mit CpG-ODN behandelte Patienten häufiger Fieber und Hämatome [130]. Im Versuch konnte bei keiner der mit ODN vorbehandelten Gruppe ein vermehrtes Auftreten von Fieber nach der Vorbehandlung oder beim postoperativen Scoring der Tiere festgestellt werden. Jedoch war bei allen vorbehandelten Gruppen zu beiden Zeitpunkten das Hämatom häufiger vorhanden als in den Negativkontrollen. In Übereinstimmung damit zeigten sich Hämatome in der Toluidinblau Färbung am häufigsten an Tag 6 in der CpG-ODN vorbehandelten Gruppe. Im Gegensatz dazu waren Hämatome mit der Movat Pentachrom Färbung am häufigsten in der Positivkontrolle (PBS-Vorbehandlung) ebenfalls an Tag 6 zu finden. Da Hämatome mit beiden Färbungen sehr häufig zu beiden Zeitpunkten und in allen operierten Gruppen zu finden waren, lässt dies darauf schließen, dass die Operationsprozedur (mit Eröffnung des Markraumes und Einbringen des Marknagels) einen stärkeren Einfluss auf die Entstehung eines Hämatoms hat als die präoperative Applikation von CpG-ODN. Jedoch ist die Entstehung eines Hämatoms kein wirklich negativer Aspekt, da das Hämatom heilungsfördernde Eigenschaften hat [89; 126]. In Kombination mit dem (durch die OP entstandenen) Hämatom bewirkt die präoperative Behandlung eine lokale Stimulierung des Immunsystems, da in allen vorbehandelten Gruppen häufiger Granulozyten zu finden waren als in den kontralateralen Negativkontrollen. Dennoch zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Art der Vorbehandlung (PBS, CpG-ODN oder negativ ODN) und der Häufigkeit von neutrophilen Granulozyten. Dies lässt sich dadurch erklären, dass TLR 9 nicht nur körperfremde sondern auch körpereigene extrazelluläre DNA erkennen, welche als Folge von Verletzungen freigesetzt wird [56]. Daher könnten die Vorbehandlung (intramuskuläre Injektion) und die damit einhergehende Verletzung des Gewebes als Stimulus den Effekt der präoperativ applizierten CpG-Motive überlagern. Oder die Menge an intraoperativ applizierten Bakterien war mit 10^5 CFU zu hoch gewählt, um noch effektiv vom Immunsystem der Ratten

kontrolliert werden zu können, da alle Proben der Versuchsgruppen mit Bakterien im Markraum belastet waren. Im Rattenmodell zur Implantat-assoziierten Osteomyelitis konnten intraoperativ applizierte *S. aureus* schon in Konzentrationen von 10^3 CFU reproduzierbar eine Osteomyelitis auslösen und bei Konzentrationen über 10^4 CFU verursachten sie eine schwere Osteomyelitis [119].

Unter physiologischen Bedingungen sind Knochenabbau und –Aufbau im Gleichgewicht und nur unter pathologischen Bedingungen wie beispielsweise bei einer Osteomyelitis ist dieses Gleichgewicht verschoben [94]. Proinflammatorische Zytokine oder bakterielle Bestandteile (wie beispielsweise das *S. aureus* Protein A) können diese Balance ebenfalls stören [123]. Bakterien wie *S. aureus* können sowohl mit den Osteoblasten [118] als auch mit den Osteoklasten [11] interagieren und dadurch den Knochenmetabolismus beeinflussen. Eine Infektion mit *S. aureus* kann auch auf die Osteoblasten übergreifen, deren Apoptose auslösen und in Kombination mit einer gesteigerten Resorptionsrate durch Osteoklasten zu einem vermehrten Knochenabbau führen [76]. Bei einer Infektion mit *S. aureus* kann also nicht nur das Immunsystem sondern auch der Knochenabbau stimuliert werden. So zeigten alle vorbehandelten, operierten und infizierten Gruppen ein häufigeres Auftreten von Bakterien im Markraum und häufiger Osteoklasten an Sequestern sowie einen verringerten Anteil an ossifiziertem Knochen.

Im Gegensatz zu den unbehandelten Kontrolltibiae waren Osteoklasten bei den Positivkontrollen (nur mit PBS vorbehandelt) an Tag 4 im Bereich des kortikalen und trabekulären Knochens häufiger zu finden. In den ODN vorbehandelten Versuchsgruppen war eine mit der Positivkontrolle vergleichbare Häufigkeit beim Auftreten von Osteoklasten zu erwarten. Jedoch zeigten sich trotz vergleichbarer bakterieller Belastung in den ODN vorbehandelten Gruppen an Tag 4 weniger häufig Osteoklasten an den Trabekeln und dem kortikalen Knochen als in der Positivkontrolle. Dies spricht für einen positiven Effekt der Vorbehandlung mit ODNs auf den Knochenmetabolismus zum früheren Zeitpunkt, da CpG-ODNs die Aktivität von RANKL in Osteoklastenvorläuferzellen hemmen können [117].

CpG-ODNs können den Knochenmetabolismus auch direkt beeinflussen, weil sie die Osteoklastogenese stimulieren [3] und die Osteoblastendifferenzierung hemmen können [87]. Die Häufigkeit von Osteoklasten nimmt am kortikalen Knochen bei allen Versuchsgruppen vom frühen zum späten Zeitpunkt ab. An den Trabekeln sind die Osteoklasten nur in der Positivkontrolle weniger häufig zu finden, während in der CpG-ODN und der mit negativ ODN

vorbehandelten Gruppe deren Häufigkeit an Tag 6 zunimmt. Dies spricht für eine Osteoklasten stimulierende Wirkung der präoperativ applizierten CpG-ODNs zum späteren Zeitpunkt, da CpG-ODNs die Osteoklastogenese in RANKL vorstimulierten Zellen stark anregen [117].

Der Knochenumbau war in den vorbehandelten Gruppen im Vergleich zu den Negativkontrollen an beiden Zeitpunkten erhöht. In der Histologie erscheinen die anabolen und katabolen Prozesse im Knochen ausbalanciert, aber in der Histomorphometrie ist drei Tage nach der OP und Infektion eine Abnahme an mineralisiertem Knochen zu erkennen (Abbildung 30A). Dies spricht für eine Abnahme der Knochenqualität. Zusammen mit der Tatsache, dass die ODN vorbehandelten Gruppen zu diesem Zeitpunkt die größte Menge an Osteoklasten an den Trabekeln aufweisen, lässt dies auf eine Beeinflussung des Knochenmetabolismus durch die Infektion schließen. Bei einer längeren Standzeit der Tiere wäre mit der Entwicklung einer chronischen Osteomyelitis zu rechnen, bei der es zur Lyse von Knochenarealen und dem umliegenden Weichgewebe käme [120].

In diesem Versuch zeigten im Vergleich zu den Negativkontrollen alle vorbehandelten Proben Anzeichen einer frühen akuten Osteomyelitis (Ansammlungen von Bakterien und neutrophilen Granulozyten im Markraum) und einen veränderten Knochenmetabolismus drei Tage nach der Operation mit Infektion. Anzeichen für eine chronische Osteomyelitis mit einer Ausweitung der Infektion auf den kortikalen Knochen waren noch nicht zu finden und aufgrund der gewählten frühen Zeitpunkte (einen bzw. drei Tage nach OP und Infektion) auch nicht zu erwarten.

5.5 Schlussfolgerung

In dieser Versuchsreihe konnte eine präoperative CpG ODN Applikation die Entstehung einer akuten Osteomyelitis nicht verhindern. Die Kombination aus Operation mit intramedullärem Implantat und Infektion konnte am ersten postoperativen Tag in 8 von 9 Tieren und am dritten postoperativen Tag in allen Tieren eine akute Osteomyelitis auslösen, welche durch das histologische Scoring nachgewiesen werden konnte. Daher könnte sich dieses Tiermodell für weiter präklinische Untersuchungen zur akuten Osteomyelitis eignen. Im Gegensatz zu einer chronischen Osteomyelitis, welche klinisch durch eine Lyse von Knochen- und dem umliegenden Weichgewebe mit Abszessbildung gekennzeichnet ist, kann eine beginnende

Osteomyelitis nicht durch radiologische bildgebende Methoden diagnostisch bestätigt werden. Besonders für eine frühe oder akute Osteomyelitis gibt es aktuell keine einheitliche Definition, welche im klinischen Bereich Verwendung findet [17; 105]. Auch wenn eine Anwendung des beschriebenen histologischen Scorings im klinischen Bereich eher unwahrscheinlich ist, denn hierzu fehlen Behandlungsempfehlungen und die Entnahme von Biopsien ist meist medizinisch nicht induziert, könnte eine Anwendbarkeit in der präklinischen Forschung vorstellbar sein. Hier wäre eine Anwendung bei Studien zu präventiven Therapeutika gegen die Entstehung einer postoperativen Osteomyelitis denkbar, da sich mit dem beschriebenen Scoring schon nach wenigen Tagen das Potential für eine Chronifizierung einer Osteomyelitis erkennen lässt.

Die CpG-ODNs konnten in dieser Versuchsreihe ihr immunstimulierendes Potential nicht beweisen, da durch die Applikation von physiologischer Kochsalzlösung (in der Positivkontrolle) Zellen beschädigt, Nukleinsäuren freigesetzt und dadurch das Immunsystem aktiviert wurde. Aber dennoch wäre eine prä- oder intraoperative Anwendung von CpG-ODN bei immunsupprimierten Tiermodellen (und später auch in Patienten) in Kombination mit beschichteten Implantaten denkbar. In einer solchen Kombination könnte das Immunsystem über die CpG-ODNs stimuliert werden, während die Implantatbeschichtung antibakteriell, antiadhäsiv für Bakterien oder osteoinduktiv sein könnte.

Der Zusammenhang zwischen strukturellen Änderungen in der Knochenmatrix und den zellulären Komponenten bei einer frühen akuten Osteomyelitis konnte in dieser Versuchsreihe beginnend untersucht und ansatzweise belegt werden. Eingehendere Untersuchungen in diese Richtung erscheinen aussichtsreich und könnten in einem angepassten Versuchsdesign genauer untersucht werden. Es ist vorstellbar, dass sich auch auf der Zellebene regulatorische Unterschiede bei der Regulation des Knochenstoffwechsels bei einer akuten Osteomyelitis entdecken lassen. In Kombination mit dem hier vorgestellten angepassten „Scoring“ wäre dann eine akute Osteomyelitis sowie deren Entwicklung zu einer chronischen Verlaufsform bereits an intraoperativ entnommenen Knochenfragmenten aus der chirurgischen Erstversorgung denkbar. Die Behandlung und Implantate könnten somit individuell angepasst werden bevor es zu einem schweren chronischen Verlauf einer Osteomyelitis kommt.

6. Zusammenfassung

Osteomyelitiden sind Entzündungen des Knochenmarks und damit schwer zu diagnostizieren. Tritt eine Osteomyelitis in Kombination mit einem intramedullären Implantat auf, ist sie schwierig zu therapieren und häufig muss dabei das Implantat entfernt und nach der Heilung ersetzt werden. Daher stehen neue Therapiemethoden und Implantate im Fokus der Forschung zu Implantat-assoziierten Infektionen. Ein vielversprechender Ansatz wurde in diesem Projekt durch die präoperative Applikation von Cytosin-Phosphat-Guanosin Oligodesoxynukleotiden (CpG-ODN) verfolgt. CpG-ODN sind unmethylierte DNA-Motive, welche eine immunstimulierende Wirkung und dadurch einen protektiven Effekt gegenüber bakteriellen Infektionen haben können.

Ziel dieser Versuchsreihe war die Entwicklung eines neuen (histologischen) Scoring-Systems zur Diagnose einer Osteomyelitis sowie histologische Untersuchungen zur Wirksamkeit von präoperativ applizierten CpG-ODN gegen die Etablierung einer Infektion.

Eine präoperative intramuskuläre Applikation von CpG-ODNs konnte im Rattenmodell dieser Versuchsreihe eine Infektion nicht verhindern. In allen vorbehandelten Versuchsgruppen konnte eine Operation mit intramedullärem Tibia-Implantat und einer bakteriellen Infektion von 10^5 CFU Anzeichen einer akuten Osteomyelitis (Gewebeinfiltration mit neutrophilen Granulozyten und Bakterien) sowie einen veränderten Knochenmetabolismus auslösen. Dieser führte drei Tage nach der Operation zu weniger mineralisiertem Knochen bei mehr knorpeligen sowie nicht-mineralisierten Knochenanteilen in den Versuchsgruppen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe. Trotz einem häufigeren Vorkommen von Osteoklasten im Markraum der Versuchsgruppen konnte kein Übergreifen der Infektion auf den kortikalen Knochen nachgewiesen werden und damit zeigten sich keine Anzeichen einer chronischen Osteomyelitis. Allerdings konnte eine zunehmende Häufigkeit der Bakterien und der neutrophilen Granulozyten von ersten zum dritten postoperativen Tag beobachtet werden. Dies belegt, dass trotz einer Voraktivierung das Immunsystem der Ratten die Infektion nicht eindämmen konnte. Die zunehmende Bakterien- und Osteoklastenhäufigkeit im Markraum zusammen mit einem nicht ausbalancierten Knochenmetabolismus in einigen Proben drei Tage nach der Infektion war ein Hinweis auf eine potentielle Entwicklung zu einer chronischen Osteomyelitis. Mit dem angewendeten histologischen Scoring-System konnte nicht nur eine akute Osteomyelitis diagnostiziert werden, sondern es ließen sich auch früh (drei Tag nach der Operation) Anzeichen eines gestörten Knochenumbaus erkennen und in Zusammenhang mit einer potentiell chronischen Osteomyelitis bringen.

7. Summary:

Osteomyelitis is inflammation of the bone marrow and therefore difficult to diagnose. If osteomyelitis occurs in combination with an intramedullary implant, it is difficult to treat, and mostly the implant needs to be removed and replaced after healing. Therefore, new therapeutic methods and implants are the focus of current research on implant-associated infections. A promising approach was followed in this project by the preoperative application of cytosine-phosphate guanosine oligodeoxynucleotides (CpG-ODN). CpG ODNs are non-methylated DNA motifs which may have an immunostimulating effect and thereby a protective effect against bacterial infections.

The aim of this study was the development of a new histological scoring system for the diagnosis of osteomyelitis as well as histological studies on the efficiency of preoperatively applied CpG-ODN against the establishment of an infection.

Preoperative intramuscular administration of CpG ODNs did not prevent infection in the used rat model. In all pretreated animals, the surgery with an intramedullary tibia implant and a bacterial infection of 10^5 CFU originated signs of acute osteomyelitis (tissue infiltration with neutrophilic granulocytes and bacteria) and altered bone metabolism. This resulted in less mineralized bone three days after surgery with more cartilaginous and non-mineralized bone fractions in the experimental groups compared to the untreated control group. Despite a more frequent occurrence of osteoclasts in the medullary cavity of the experimental groups, no infection spreading to the cortical bone could be detected and thus no signs of chronic osteomyelitis were detected. However, an increasing frequency of the bacteria and the neutrophilic granulocytes was observed from the first compared to the third postoperative day. This demonstrates that despite a pre-activation, the immune system of the rats could not control the infection. The increasing bacterial and osteoclastic frequency in the medullary cavity combined with an unbalanced bone metabolism in some samples three days after infection indicated a potential development to chronic osteomyelitis. The histological scoring system was not only used to diagnose acute osteomyelitis, additionally early signs of disturbed bone remodeling were identified three days after surgery and linked to potentially chronic osteomyelitis.

8. Verzeichnisse

I. Liste der Abbildungen:	Seite
Abbildung 1: Cierny-Mader Klassifizierung des osteomyelitischen Knochens.....	2
Abbildung 2: Lokale und systemische Faktoren können die Entwicklung von einer Infektion zu einer chronischen Osteomyelitis begünstigen.....	6
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs.....	13
Abbildung 4: Probenentnahme nach der Euthanasie.....	17
Abbildung 5: Bewertungskriterien mit der Toluidinblau Färbung.....	27
Abbildung 6: Bewertungskriterien mit der Movat Pentachrom Färbung.....	28
Abbildung 7: Bewertungskriterien bei der TRAP Enzymhistochemie.....	29
Abbildung 8: Bewertungskriterien bei der Gram-Färbung.....	30
Abbildung 9: Bildpräparation für die Histomorphometrie.....	34
Abbildung 10: Beispielbilder für katabole Prozesse am Knochen mit der Toluidinblau Färbung.....	36
Abbildung 11: Beispielbilder für anabole Prozesse am Knochen mit der Toluidinblau Färbung.....	37
Abbildung 12: Gegenüberstellung der Gruppen bezüglich der untersuchten knöchernen Parameter (Toluidinblau).....	39
Abbildung 13: Beispielbilder für die zellulären Parameter mit der Toluidinblau Färbung.....	42
Abbildung 14: Gegenüberstellung der Gruppen bezüglich der untersuchten zellulären Parameter (Toluidinblau).....	44
Abbildung 15: Beispielbilder für katabole Prozesse am Knochen mit der Movat Pentachrom Färbung.....	46

Abbildung 16: Beispielbilder für anabole Prozesse am Knochen mit der Movat Pentachrom Färbung.....	47
Abbildung 17: Gegenüberstellung der Gruppen bezüglich der untersuchten knöchernen Parameter (Movat Pentachrom Färbung).....	48
Abbildung 18: Beispielbilder für die zellulären Parameter mit der Movat Pentachrom Färbung.....	52
Abbildung 19: Gegenüberstellung der Gruppen bezüglich der untersuchten zellulären Parameter (Movat Pentachrom Färbung).....	53
Abbildung 20: Beispielbilder für TRAP-positive Zellen an Trabekeln und kortikalem Knochen anliegend.....	56
Abbildung 21: Darstellung der TRAP-positiven Zellen am vitalen, mineralisierten Knochen.....	58
Abbildung 22: Beispielbilder für TRAP-positive Zellen an Sequestern und frei im Markraum.....	60
Abbildung 23: Darstellung der TRAP-positiven Zellen im Markraum.....	61
Abbildung 24: Beispielbilder für den Bakteriennachweis mittels Gram-Färbung.....	65
Abbildung 25: Beispielbilder für den Bakteriennachweis mittels Gram-Färbung im Markraum.....	67
Abbildung 26: Darstellung der als Cluster oder einzeln vorkommenden Bakterien nach Arealen.....	69
Abbildung 27: Darstellung der Bewertungskriterien in Bezug zur Schnittqualität.....	72
Abbildung 28: In allen Gruppen und zu beiden Zeitpunkten entwickelten mindestens 50 % der Tiere eine akute Osteomyelitis.....	73
Abbildung 29: Die Kombination aus Standardfärbungen und TRAP-Enzymhistochemie kann das Potential zur Chronifizierung einer Osteomyelitis aufzeigen.....	75

Abbildung 30: Einfluss der Vorbehandlung und Operation auf die
Knochenqualität.....77

Abbildung 31: REM-Abbildung der am Marknagel anheftenden Bakterien.....78

Abbildung 32: Individuelle Keimbelastung auf den Implantaten einen oder drei
Tage nach der OP/Infektion.....80

II. Liste der Tabellen:	Seite
Tabelle 1: Tabellarische Übersicht der Versuchsgruppen und der Analysemethoden.....	14
Tabelle 2: Herstellung der Fixierlösung für die Rasterelektronenmikroskopie.....	17
Tabelle 3: Herstellung der Fixierlösung für die Paraffineinbettung.....	19
Tabelle 4: Herstellung der Entkalkungslösung (für die Paraffineinbettung).....	20
Tabelle 5: Übersicht der automatisierten Schritte (bei der Paraffineinbettung).....	20
Tabelle 6: Präparation der Lösung für die Toluidinblau Färbung.....	22
Tabelle 7: Präparation der Lösungen für die Gram-Färbung.....	22
Tabelle 8: Präparation der Lösungen für die TRAP-Enzymhistochemie.....	23
Tabelle 9: Präparation der Lösungen für die Movat Pentachrom Färbung.....	25

III. Chemikalienliste:

Aceton: Stockmeier Chemie (Bielefeld, Deutschland), Nr. 1000450929000

Alzianblau: Chroma-Waldeck GmbH + Co. KG (Münster, Deutschland), Nr.2c-005

Ammoniumhydroxid: Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Nr. P093.1

Braunol: Braun (Melsungen, Deutschland)

Brilliant-Crocein: Chroma-Waldeck GmbH + Co. KG (Münster, Deutschland), Nr. 1B-109

Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat: Merck (Darmstadt, Deutschland), Nr. 1.06580

di-Natriumtartrat-Dihydrat: Merck (Darmstadt, Deutschland), Nr. 1.06663

DePex: Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland)

Echtrotsalz: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland), Nr. 36881

Ethanol: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland) oder Stockmeier Chemie (Bielefeld, Deutschland), Nr. 1001043227002

Ethanol p.a.: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland), Nr. 4621

Essigsäure: Merck (Darmstadt, Deutschland), Nr. 1.00063

Glutardialdehyd (Lösung): Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Nr. 3778

Gram-Color modifiziert: Merck (Darmstadt, Deutschland)

Kaisers-Glyceringelatine: Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Nr. 6474

N-N-Dimethylformamid: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland), Nr. D4551

Naphtol-AS-TR-Phosphat: Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Deutschland), Nr. N6125

Natriumacetat: Merck (Darmstadt, Deutschland), Nr. 1.062680

Natriumdihydrogenphosphat-Hydrat: Merck (Darmstadt, Deutschland), Nr. 1.06346

Natrium-Tetraborat (Borax): Merck (Darmstadt, Deutschland), Nr. 1.06306

ODN1826: Invivogen (San Diego, Kalifornien, USA)

ODN2138: Invivogen (San Diego, Kalifornien, USA)

Paraformaldehyd (PFA): Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Nr. 0335

Phosphomolybdänsäure: Merck (Darmstadt, Deutschland), Nr. 1.00583

Pyronin G: Certistain Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland), Nr. 107518

Saccharose: Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Nr. 4621

Saffron du Gatinais (Safran): Chroma-Waldeck GmbH + Co. KG (Münster, Deutschland),
Nr. 5A-394

Säurefuchsin: Chroma-Waldeck GmbH + Co. KG (Münster, Deutschland), Nr. 1B-525

Shandon Instant-Hämatoxylin: Thermo Fisher Scientific GmbH (Dreieich, Deutschland),
Nr. 6765015

Toluidinblau: Chroma-Waldeck GmbH + Co. KG (Münster, Deutschland), Nr. 1B-481

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS): Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe,
Deutschland), Nr. 4855.2

Titriplex-III (EDTA): Merck (Darmstadt, Deutschland), Nr. 1.08418

Weigert's Hämatoxylinlösung (A): Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland),
Nr. X906

Weigert's Hämatoxylinlösung (B): Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland),
Nr. X907

Xylol: Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Nr. 9713

IV. Abkürzungsverzeichnis:

Aqua bidest	doppelt destilliertes Wasser
Aqua dest.	destilliertes Wasser
° C	Grad Celsius
CFU	koloniebildende Bakterien (Colony Forming Units)
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CpG-ODN	Cytosin-Phosphat-Guanosin (CpG) Oligodesoxynukleotide (ODN); für Bakterien charakteristische Aminosäuresequenz
D	Tag
EDTA	Titriplex-III
G	Gauge
g	Gramm
Gr1	Gruppe 1 (Positivkontrolle mit PBS Vorbehandlung)
Gr2	Gruppe 2 (Vorbehandlung mit CpG-ODN)
Gr3	Gruppe 3 (Vorbehandlung mit CpG negativen ODN (neg. ODN))
HCl	Salzsäure
K	Negativkontrolle (ohne Vorbehandlung)
kPa	Kilo-Pascal
l	Liter
M	Mol / molar
ml	Milliliter

μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
μm	Mikrometer
MW	Molekulargewicht
N	Normal
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	Natriumdihydrogenphosphat-Hydrat
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaOH	Natronlauge
neg. ODN	Oligodesoxynukleotide (ODN) ohne die für Bakterien charakteristische Aminosäuresequenz
OP	Operation (chirurgische Maßnahme)
p	Signifikanzwert
p.a.	analyserein (pro analysi)
PBS	physiologische Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)
RT	Raumtemperatur (22-23° C)
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylokokkus aureus</i>
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
TCT	Knorpelgewebe (total cartilage tissue)
TOT	mineralisiertes Knochengewebe (total ossified tissue)
TRAP phosphatase)	Tartrat resistente saure Phosphatase (tartrate resistant acid phosphatase)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

9. Literaturliste

- 1 Abe E, Yen K, Okada K: Pyogenic vertebral osteomyelitis presenting as a single spinal compression fracture: a case report and review of the literature. *Spinal Cord*, 2000; 38:639-644
- 2 Alt V, Lips KS, Henkenbehrens C, Muhrer D, Oliveira Cavalcanti MC, Sommer U, Thormann U, Szalay G, Heiss C, Pavlidis T, Domann E, Schnettler R: A new animal model for implant-related infected non-unions after intramedullary fixation of the tibia in rats with fluorescent in situ hybridization of bacteria in bone infection. *Bone*, 2011; 48:1146-1153
- 3 Amcheslavsky A, Hemmi H, Akira S, Bar-Shavit Z: Differential contribution of osteoclast- and osteoblast-lineage cells to CpG-oligodeoxynucleotide (CpG-ODN) modulation of osteoclastogenesis. *J. Bone Miner. Res.* 2005; 20: 1692-1699
- 4 Andrew JG, Andrew SM, Freemont AJ, Marsh DR: Inflammatory cells in normal fracture healing. *Acta Orthop Scand.* 1994; 65: 462-466
- 5 Andriole VT, Nagel DA, Southwick WO: A paradigm for human chronic osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Am*, 1973; 55:1511-1515
- 6 Anwar H, Dasgupta MK, Costerton JW: Testing the susceptibility of bacteria in biofilms to antibacterial agents. *Antimicrob Agents Chemother.* 1990; 34:2043-2046
- 7 Arciola CR, An YH, Campoccia D, Donati ME, Montanaro L: Etiology of implant orthopedic infections: a survey on 1027 clinical isolates. *Int J Artif Organs.* 2005; 28:1091-100
- 8 Aynesworth KH: The diagnosis and treatment of acute osteomyelitis of the head and neck of the femur. *The American Journal of Surgery*, 1932; 12(1):80-84
- 9 Bamberger DM: Osteomyelitis. *Postgraduate Medicine*, 1993; 94:5,177-184
- 10 Beronius M, Bergman B, Anderson R: Vertebral osteomyelitis in Goteborg, Sweden: a retrospective study of patients during 1990-1995. *Scand J Infect Dis*, 2001; 33:527-557
- 11 Bertelli AM, Delpino MV, Lattar S, Giai C, Llana MN, Sanjuan N, Cassat JE, Sordelli D, Gomez MI: Staphylococcus aureus protein A enhances osteoclastogenesis via TNFR1 and EGFR signaling. *Biochimica et Biophysica acta (BBA)*. 2016; 1862: 1975-1983
- 12 Bisland SK, Chien C, Wilson BC, Burch S: Pre-clinical in vitro and in vivo studies to examine the potential use of photodynamic therapy in the treatment of osteomyelitis. *Photochem Photobiol Sci.* 2006; 5:31-38
- 13 Björkstén B, Boquist L: Histopathological aspects of chronic recurrent multifocal osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Br.* 1980; 62(3): 376-80

- 14 Brighton CT: The biology of fracture repair. *Instr Course Lect.* 1984; 33: 60-82
- 15 Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A: Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004; 303(5663): 1532-5
- 16 Burch S, Bisland SK, Bogaards A, Yee AJ, Whyne CM, Finkelstein JA, Wilson BC: Photodynamic therapy for the treatment of vertebral metastases in a rat model of human breast carcinoma. *J Orthop Res.* 2005; 23:995-1003
- 17 Calhoun JH, Manring MM, Shirliff M: Osteomyelitis of the long bones. *Semin Plast Surg.* 2009; 23: 59-72
- 18 Caputo GM, Cavanagh PR, Ulbrecht JS, Gibbons GW, Karchmer AW: Assessment and management of foot diseases in patients with diabetes. *N Eng J Med.* 1994; 331: 854-60
- 19 Carek PJ, Dickerson LM, Sack JL: Diagnosis and management of osteomyelitis. *Am Fam Physican,* 2001; 63(12):2431-2420
- 20 Carpentier AF, Chen L, Maltonti F, Delattre JY: Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice. *Cancer Res,* 1999; 59:5429-32
- 21 Carpentier AF, Xie J, Mokhtari K, Delattre JY: Successful treatment of intracranial gliomas in rat by oligodeoxynucleotides containing CpG motifs. *Clin Cancer Res,* 2000; 6:2469-73
- 22 Carrington AC, Scombes CJ: A review of CpGs and their relevance to aquaculture. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2006; 112: 87-101
- 23 Carsenti-Etesse H, Doyon F, Desplaces N, Gagey O, Tancrede C, Pradier C, Dunais B, Ballamonica P: Epidemiology of bacterial infection during management of open leg fractures. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 1999; 18:315-23
- 24 Chassaignac E: De l'osteomyelite. *Bull Mem Soc Chir,* 1852; 431-436
- 25 Chung R, Cool JC, Scherer MA, Foster BK, Xian CJ: Roles of neutrophil-mediated inflammatory response in the bony repair of injured growth plate cartilage in young rats. *Leukoc Biol.* 2006; 80: 1272-1280
- 26 Ciampolini J, Harding KG: Pathophysiology of chronic bacterial osteomyelitis. Why do antibiotics fail so often?: *Postgrad Med J.* 2000; 76: 479-483
- 27 Cierny G, Mader JT: Adult chronic osteomyelitis. *Orthopedics,* 1984; 7(10):1557-64
- 28 Cierny G, Mader JT, Penninck JJ: A clinical staging system for adult osteomyelitis. *Clin Orthop Relat Res,* 2003; 414:7-24
- 29 Classen DC, Evans RS, Pestotnik SL, Horn SD, Menlove RL, Burke JP: The timing of prophylactic administration of antibiotics and the risk of surgical-wound infection. *N Engl J Med.* 1992; 326:281-86

-
- 30 Cohen ND, Bourquin JR, Bordin A, Kuskie KR, Brake CN, Weaver KB, Liu M, Felipe MJB, Kogut MH: Intramuscular administration of a synthetic CpG-oligodeoxynucleotide modulates functional responses of neutrophils of neonatal foals. *PLoS ONE*, 2014; 9(10): e109865
- 31 Copeland S, Warren HS, Lowry SF, Calvano SE, Remick D: Acute Inflammatory Response to Endotoxin in Mice and Humans. *CLINICAL AND DIAGNOSTIC LABORATORY IMMUNOLOGY*. 2005; 12:60-67
- 32 Cooper CL, Davis HL, Morris ML, Efler SM, Adhami MA, Krieg AM, et al.: CpG 7909, an immunostimulatory TLR9 agonist oligodeoxynucleotide, as adjuvant to Engerix-B HBV vaccine in healthy adults: a double-blind phase I/II study. *J Clin Immunol*, 2004; 24(6):693-770
- 33 Darouiche RO: Treatment of infections associated with surgical implants. *N Engl J Med*. 2004; 350:1422-9
- 34 Dirschl DR, Almekinders L: Osteomyelitis: common causes and treatment recommendations. *Drugs*, 1993; 45:29-43
- 35 Ehrenberg JP: GAK. Fractuur statisticken. Tarolidine in treatment of experimental post-traumatic osteomyelitis. CIP Data Koninklijke Bibliotheken Den Haag, 1996
- 36 Emslie KR, Ozanne NR, Nade SM: Acute haematogenous osteomyelitis: an experimental model. *J Pathol*, 1983; 141:157-167
- 37 Eroz G, Oztuna V, Coskun B, Eskandari MM, Bayarslan C, Kaya A: Addition of fusidic acid impregnated bone cement to systemic teicoplanin therapy in the treatment of rat osteomyelitis. *Chemother*. 2004; 16:51-55
- 38 Evans RP, Nelson CL, Harrison BH: The effect of wound environment on the incidence of acute osteomyelitis. *ClinOrthop Relat Res*. 1993; 286:289-297
- 39 Fink B, Makowiak C, Fuerst M, Berger I, Schäfer P, Frommelt L. The value of synovial biopsy, joint aspiration and C-reactive protein in the diagnosis of late peri-prosthetic infection of total knee replacements. *J Bone Joint Surg Br*. 2008; 90(7):874-8
- 40 Fischer B, Vaudaux P, Magnin M, Mestikawy Y, Proctor RA, Lew DP, Vasey H: Novel animal model for studying the molecular mechanism of bacterial adhesion to bone-implanted metallic devices: role of fibronectin in *Staphylococcus aureus* adhesion. *J Orthop Res*. 1996; 14:914-920
- 41 Fitzgerald RH Jr: Experimental osteomyelitis: description of a canine model and the role of depot administration of antibiotics in the prevention and treatment of sepsis. *J Bone Joint Surg Am*. 1983; 65:371-380

- 42 Furze RC, Rankin SM: Neutrophil mobilization and clearance in the bone marrow. *Immunology*. 2008; 125: 281-288
- 43 Gaines RJ, DeMaio M, Peters D, Hasty J, Blanks J: Management of contaminated open fractures: a comparison of two types of irrigation in a porcine model. *J Trauma Care Surg*. 2012; 72:733-736
- 44 Garcia-Alvarez F, Navarro-Zorraquino M, Castro A, Grasa JM, Pastor , Monzon M , Martinez A, Garcia-Alvarez I, Castillo J, Lozano R: Effect of age on cytokine response in an experimental model of osteomyelitis. *Biogerontology*, 2009; 10:649-658
- 45 Greaves, A. Williams, M. Eve: First dose of potential new medicines to humans: how animals help. *Nat Rev Drug Discov*. 2004; 3:226–236
- 46 Gristina AG, Oga M, Webb LX, Hobgood CD: Adherent bacterial colonization in the pathogenesis of osteomyelitis. *Science*. 228:990-993, 1985
- 47 Grundnes O, Reikeras O. The importance of the hematoma for fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand*. 1993; 64: 340-342
- 48 Guhlmann A, Storck M, Kotzerke J, Moog F, Sunder-Plassmann L, Reske SN: Chronic osteomyelitis. Detection with FDG PET and correlation with histopathologic findings. *Radiology*, 1998; 206:749-754
- 49 Harik NS, Smeltzer MS: Management of acute hematogenous osteomyelitis in children. *Expert review of anti-infective therapy*, 2010; 8:175-181
- 50 Hedrich C, Frommelt L, Euler J: *Septische Knochen- und Gelenkchirurgie*. Springer Verlag, 2004. ISBN 3-540-21341-4
- 51 Hofmann G, Gonschorek O, Hofmann GO, Bühren V: Stabilisierungsverfahren bei Osteomyelitis. *Osteosy Inter*, 1997; 5:226-231
- 52 Hofmann G: *Chronische Osteomyelitis. Infektionen der Knochen und Gelenke*. München: Jena Urban & Fischer, 2004; 59-83
- 53 Hotchen AJ, McNally MA, Sendi P: The classification of long bone osteomyelitis: a systemic review of the literature. *J. Bone Joint Infect*. 2017; 2(4):167-174
- 54 Howard CB, Einhorn M, Dagan R, Yagupski P, Porat S: Fine needle bone biopsy to diagnose osteomyelitis. *J Bone Joint Surg Br*. 1994; 76:311-314
- 55 Huneault LM, Lussier B, Dubreuil P, Chouinard L, Desevaux C: Prevention and treatment of experimental osteomyelitis in dogs with ciprofloxacin-loaded crosslinked high amylose starch implants. *J Orthop Res*. 2004; 22:1351-1357
- 56 Ishii KJ, Akira S: Innate immune recognition of, and regulation by, DNA. *Trend Immunol*. 2006; 27: 525-532

-
- 57 Jia H, Zhao T, Zou D, Jia X, Gao J, Song X: Therapeutic injection of a C-type CpG ODN induced an antitumor immune response in C57/BL6 mice of orthotopically transplanted hepatocellular carcinoma. *Oncology Research*. 2016; 23:321-326
- 58 Johansen LK, Koch J, Frees D, Aalbaek B, Nielsen OL, Leifsson PS, Iburg TM, Svalastoga E, Buelund LE, Bjarnsholt T, Hoiby N, Jensen HE: Pathology and biofilm formation in a porcine model of staphylococcal osteomyelitis. *J Comp Pathol*. 2012; 147:343-353
- 59 Kang YJ, Kim KH: Immunotherapy with doxycycline and CpG-ODN 1668 for treatment of scuticociliatosis in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*. 2015; 435: 143.145, 2015
- 60 Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL: Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med*, 2007; 13(5):552-9
- 61 Kelly PJ: Infected nonunion of the femur and tibia. *Orthop Clin North Am*, 1984; 15:481-490
- 62 Kittichon U, Chirapongsatunkul N, Itami T, Tantikitti C: CpG ODN mimicking CpG rich region of myxosporean *Myxobolus supamattayai* stimulates innate immunity in Asian sea bass (*Lates calcarifer*) and defense against *Streptococcus iniae*. *Fish & Shellfish Immunology*, 2016; 58:116-124
- 63 Kline JN, Krieg AM: Toll-like receptor 9 activation with CpG oligodeoxynucleotides for asthma therapy. *Drug News Perspect*. 2008; 21(8):434-9, 2008
- 64 Klinman DM: Immunotherapeutic use of CpG oligodeoxynucleotides. *Nat Rev Immunol*, 2004; 4(4):249-58
- 65 Krieg AM: Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat rev Drug Discov*, 2006; 5(6):471-84
- 66 Krieg AM, Efler SM, Wittpoth M, Al Adhami MJ, Davis HL: Induction of systemic TH1-like innate immunity in normal volunteers following subcutaneous but not intravenous administration of CpG 7909, a synthetic B-class CpG oligodeoxynucleotide TLR9 agonist. *J Immunother*, 2004; 27:460-71
- 67 Lehovsky J: Pyogenic vertebral osteomyelitis/disc infection. *Baillieres Clin Rheumatol*, 1999; 13:59-75
- 68 Lew DP, Waldvogel FA: Osteomyelitis. *Lancet*, 2004; 364(9431):369-379, 2004
- 69 Lipsky BA, Weigt JA, Gupta V, Killian A, Peng MM: Skin, soft tissue, bone and joint infections in hospitalized patients: epidemiology and microbiological, clinical and economic outcomes. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007; 28:1290-8

-
- 70 Lucke M, Schmidmaier G, Sadoni S, Wildemann B, Schiller R, Haas NP, Raschke M: A new model of implant-related osteomyelitis in rats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2003; 67:593-602
- 71 Lucke M, Wildemann B, Sadoni S, Surke C, Schiller R, Stemberger A, Raschke M, Haas NP, Schmidmaier G: Systemic versus local application of gentamycin in prophylaxis of implant-related osteomyelitis in a rat model. *Bone.* 2005; 36:770-778
- 72 Mackowiak PA, Jones SR, Smith JW: Diagnostic value of sinus-tract cultures in chronic osteomyelitis. *JAMA.* 1978; 239:2772-2775
- 73 Maderazo EG et al.: Late infections of total joint prostheses. A review and recommendations for prevention. *Clin Orthop Relat Res.* 1988; (229):131-42
- 74 Manegold C, Gravenor D, Woytowicz D, Mezger J, Hirsh V, Albert G, et al.: Randomized phase II trial of a toll-like receptor 9 agonist oligodeoxynucleotide, PF-3512676, in combination with first-line taxane plus platinum chemotherapy for advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26(24):3979-86
- 75 Matthews PC, Berendt AR, McNally MA, Byren I: CLINICAL REVIEW-Diagnosis and management of prosthetic joint infection. *BMJ (CR)-print.* 2009; 338(7707):1378
- 76 McCall SH, Sahraei M, Young AB, Worley CS, Duncan JA, Ting JP, Marriott I: Osteoblasts express NLRP3, a nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat region containing receptor implicated in bacterially induced cell death. *J Bone Miner Res.* 2008; 23: 30-40
- 77 McNally M, Sendi P. Implant-associated osteomyelitis of long bones. In: Zimmerli W, editor. *Bone and Joint Infections: From Microbiology to Diagnostics and Treatment.* West-Sussex, UK: John Wiley & Sons, 2015: 303-23
- 78 Meani E, Romanò CL, Crosby L, Hofmann G: *Infection and local treatment in orthopaedic infections.* Springer, Heidelberg. 2007
- 79 Morawietz L, Tiddens O, Mueller M, Tohtz S, Gansukh T, Schroeder JH, Perka C, Krenn V. Twenty-three neutrophil granulocytes in 10 high-power fields is the best histopathological threshold to differentiate between aseptic and septic endoprosthesis loosening. *Histopathology.* 2009; 54(7):847-53
- 80 Moriarty TF, Campoccia D, Nees SK, Boure LP, Richards RG: In vivo evaluation of the effect of intramedullary nail microtopography on the development of local infection in rabbits. *Int J Artif Organs.* 2010; 33:667-675

-
- 81 Mühlhofer H, Gollwitzer PDH, Lenze F, Feihl S, Pohlig F, von Eisenhart-Rothe R, Schauwecker J.: Periprothetischer Infekt des Hüftgelenks. *Der Orthopäde*. 2015; 44(5):357–65
 - 82 Nadeema M, Nadeem S, Mahmoodb KT: Drug therapy in osteomyelitis. *Journal of pharmaceutical sciences and research*, 2010; 2(11).686-692
 - 83 Neugebauer C, Graf R: Gutachterliche Probleme bei der Beurteilung von Osteomyelitiden. *Orthopäde*, 33:603-613, 2004
 - 84 Nickel JC, Ruseska I, Wright JB, Costerton JW: Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimikrob Agents Chemother*. 1985; 27:619-624
 - 85 Norden CW: Experimental osteomyelitis. I. A description of the model. *J Infect Dis*. 1970; 122:410-418
 - 86 Norden C, Nelson JD, Mader JT, Calandra GB: Evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of infections of prosthetic hip joints. *Clin Infect Dis*. 1992; 15 (suppl 1): S177-81
 - 87 Nørgaard NN, Holien T, Jönsson S, Hella H, Espevik T, Sundan A, Standal T: CpG-oligodeoxynucleotide inhibits smad-dependent bone morphogenetic protein signaling: Effekts on myeloma cell apoptosis and *in vitro* osteoblastogenesis. *J Immunol*. 2010; 185: 3131-3139
 - 88 Ochsner PE, Sirkin MS, Trampuz A. Acute infection. In: Rüedi TP, Buckley RE, Moran CG, editors. *AO Principles of Fracture Management*, 2nd edn. Stuttgart and New York: Thieme, 2007: 520–40
 - 89 Opal SM: Phylogenetic and functional relationships between coagulation and the innate immune response. *Crit Care Med*. 2000; 28(9 Suppl): 77-80
 - 90 Pandey R, Drakoulakis E, Athanasou NA. An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues. *J Clin Pathol*. 1999; 52(2):118-23
 - 91 Papakostidis C, Kanakaris NK, Pretal J, Faour O, Morell DJ, Giannoudis PV: Prevalence of complications of open tibial shaft fractures stratified as per the Gustilo-Anderson classification. *Injury*. 2011; 42:1408-15
 - 92 Petty W, Spanier S, Schuster JJ, Silverthorne C: The influence of skeletal implants on incidence of infection. Experiments in a canine model. *J Bone Joint Surg Am*. 1985; 67:1236-1244
 - 93 Pribaz JR, Bernthal N, Billi F, Cho JS, Ramos RI, Guo Y, Cheung AL, Francis KP, Miller LS. Mouse model of chronic post-arthroplasty infection: noninvasive *in vivo*

- bioluminescence imaging to monitor bacterial burden for long-term study. *J Orthop Res.* 2012; 30:335-340
- 94 Rachner TD, Khosla S, Hofbauer L C: Osteoporosis: Now and the future. *The Lancet.* 2011; 377(9773) 1276-1287
- 95 Rathel LN, Stanley WC: Bone and joint infections. In Reese Betts' a practical approach to infectious diseases, 5th ed. Roberts FB, Stanley WC, Robert LP (editors). Lippincott Williams & Wilkins, 2003
- 96 Ray S, Thormann U, Eichelroth M, Budak M, Biehl C, Rupp M, Sommer U, El Khassawna T, Alagboso FI, Kampschulte M, Rohnke M, Henß A, Pepler K, Linke V, Quadbeck P, Voigt A, Stenger F, Karl D, Schnettler R, Heiss C, Lips KS, Alt V: Strontium and bisphosphonate coated iron foam scaffolds for osteoporotic fracture defect healing. *Biomaterials.* 2018; 157:1-16
- 97 Rebl A, Goldammer T, Seyfert HM: Toll-like receptor signaling in bony fish. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2010; 134:139-150
- 98 Reizer W, Hunter JG, O'Malley NT, Southgate RD, Schwarz EM, Kates SL: A systematic review of animal models for *Staphylococcus aureus* osteomyelitis. *Eur Cell Mater.* 2015; 27:196-212
- 99 Renz N, Trampuz A: Periprosthetische Infektionen. Aktueller Stand der Diagnostik und Therapie. *Orthopädie & Rheuma.* 18(6), 2015
- 100 Rissing JP, Buxton TB, Weinstein RS, Shockley RK: Model of experimental chronic osteomyelitis in rats. *Infect Immun.* 1985; 47:581-586
- 101 Robiller FC, Stumpe KD, Kossmann T, Weishaupt D, Bruder E, von Schulthess GK: Chronic osteomyelitis of the femur: value of PET imaging. *Eur Radiol,* 2000; 10:855-858
- 102 Roesgen M, Hierholzer G, Hax PM: Post-traumatic osteomyelitis. *Archives of orthopaedic and trauma surgery,* 1989; 108(1):1-9
- 103 Rohnke M, Pfitzenreuter S, Mogwitz B, Henß A, Thomas J, Bieberstein D, Gemming T, Otto SK, Ray S, Schumacher M, Gelinsky M, Alt V: Strontium release from Sr²⁺-loaded bone cements and dispersion in healthy and osteoporotic rat bone. *J Control Release.* 2017; 262:159-169
- 104 Romanò C: Infezioni osteo-articolari correlate all'impianto. Numero monografico de Lo Scalpello, 2009
- 105 Romanò CL, Romanò D, Logoluso N, Drago L: Bone and joint infections in adults: a comprehensive classification proposal. *Eur Orthop Traumatol,* 2011; 1:207-217

- 106 Roy M, Somerson JS, Conroy JL, Kerr KG: Pathophysiology and pathogenesis of osteomyelitis: a review of 14 cases. *Journal of Orthopaedic Surgery*, 2012; 13(2):240
- 107 Sadik CD, Kim ND, Luster AD: Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* 2011; 32: 452-460
- 108 Sato T, Yamamoto M, Shimosato T, Klinman DM: Accelerated wound healing mediated by activation of Toll-like receptor 9. *Wound Repair Regen.* 2010; 18(6):586-593
- 109 Schinsky MF, Della Valle CJ, Sporer SM, Paprosky WG: Perioperative testing for joint infection in patients undergoing revision total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* 2008; 90(9):1869–75
- 110 Schmidt HGK, Wurm M, Halder D, Grosser V: Verlängerungstechniken und Möglichkeiten des Segmenttransportes im Ringsystem nach Ilizarov. *Trauma und Berufskrankh.* 2002; 4:413-426
- 111 Schmidt-Bleek K, Shell H, Schulz N, Hoff P, Perka C, Buttgereit F, Volk HD, Lienau J, Duda GN: Inflammatory phase of bone healing initiates the regenerative healing cascade. *Cell Tissue Res.* 2012; 347(3): 567-573
- 112 Schneider U, Hierholzer G, Böhm H-J: Knochen- und Gelenkinfektionen. In: *Unfallchirurg.* 1996; 99(10):789–800
- 113 Scholze-Stubenrecht W: Duden: Die deutsche Rechtschreibung. Bd. 1. Mannheim: Dudenverlag, Bibliographisches Institut & F.A. Brockhaus. 2006
- 114 Sethi S, Thormann U, Sommer U, Stötzel S, Mohamed W, Schnettler R, Domann E, Chakraborty T, Alt V: Impact of prophylactic CpG oligodeoxynucleotide application on implant-associated *Staphylococcus aureus* bone infection. *Bone*, 2015; 78:194-202
- 115 Shandley S, Matthews KP, Cox J, Romano D, Abplanalp A, Kalns J: Hyperbaric oxygen therapy in a mouse model of implant-associated osteomyelitis. *J Orthop Res.* 2012; 30:203-208
- 116 Sheehy SH, Atkins BA, Bejon P, Byren I, Wyllie D, Athanasou NA, et al.:The microbiology of chronic osteomyelitis: prevalence of resistance to common empirical antimicrobial regimens. *J Infect.* 2010; 60:338-43
- 117 Shen Y, Feng Z, Lin C, Hou X, Wang X, wang J, Yu Y, Wang L, Sun X: An oligonucleotide that induces differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells to osteoblasts *in vitro* and reduces alveolar bone loss in rats with periodontitis. *Int. J. Mol.Sci.* 2012; 13:2877-2892
- 118 Shi S, Zhang X: Interaction of *Staphylococcus aureus* with osteoblasts (Review). *Exp Ther Med.* 2012; 3: 367

- 119 S e NH, Vendel Jensen N, Meinecke Nürnberg B, Lundroff Jensen A, Koch J, Seier Poulsen S, Pier G, Krogh Johansen H: A novel knee prosthesis model of implant-related osteomyelitis in rats. *Acta orthopaedica*. 2013; 84(1):92-97
- 120 Solagberu BA: A new classification of osteomyelitis for developing countries. *East Afr Med J*. 2003; 80(7):373-8
- 121 Sottnik JL, U'Ren LW, Thamm DH, Withrow SJ, Dow SW: Chronic bacterial osteomyelitis suppression of tumor growth requires innate immune responses. *Cancer Immunol Immunother*. 2010; 59:367-378
- 122 Southwood RT, Rice JL, Mc Donald PJ, et al.: Infection in experimental hip arthroplasties. *J Bone Joint Surg Br*. 1985; 67: 229-32
- 123 Steeve KT, Marc P, Sandrine T, Dominique H, Yannick F: IL-6, RANKL, TNF-alpha/ IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004; 15: 49-60
- 124 Stewart S, Barr S, Engiles J, Hickok NJ, Shapiro IM, Richardson DW, Parvizi J, Schaer TP: Vancomycin-modified implant surface inhibits biofilm formation and supports bone-healing in an infected osteotomy model in sheep: a proof-of-concept study. *J Bone Joint Surg Am*. 2012; 94:1406-1415
- 125 Subasi M, Kapukaya A, Kesemenli C, Kaya H, Sari I: Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on treatment of acute osteomyelitis. An experimental investigation in rats. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2001; 121:170-173
- 126 Tachibana T, Matsubara T, Mizuno K, Hirohata K: Enhancement of new bone formation by hematoma at fracture site. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi*. 1991; 65(5): 349-358
- 127 Tiemann A: Histopathological Osteomyelitis Evaluation Score (HOES) – an innovative approach to histopathological diagnostics and scoring of osteomyelitis. *GMS Interdisciplinary Plastic and Reconstructive Surgery DGPW*, Vol.3, 2014
- 128 Tiemann AH, Hofmann GO: Principles of the therapy of bone infections in adult extremities. *Strat Traum Limb Recon*, 2009; 4:57-64
- 129 Trampuz A, Zimmerli W: Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices. *Injury*. 2006; 37(Suppl 2):59-66
- 130 Ursu R, Carpentier A, Metellus P, Lubrano V, Laigle-Donadey F, Capelle L, Guyotat J, Langlois O, Bauchet L, Desseaux K, Tibi A, Chinot O, Lambert J, Carpentier AF: Intracerebral injection of CpG oligonucleotide for patients with *de novo* glioblastoma – A phase II multicentric, randomized study. *Eur J Cancer*. 2017; 73: 30-37

-
- 131 Varoga D, Wruck CJ, Tohidnezhad M, Brandenburg L, Paulsen F, Mentlein R, Seekamp A, Besch L, Pufe T: Osteoblasts participate in the innate immunity of the bone by producing human beta defensin-3. *Histochem Cell Biol.* 2009; 131:207-218
- 132 Waldvogel FA, Medoff G, Schwartz MN: Osteomyelitis: a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects (first of three). *N Engl J Med*, 1970; 282:198-206
- 133 Waldvogel FA, Medoff G, Swartz MN: Osteomyelitis – a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. (second of three). *N Engl J Med*, 1970; 282(5):260-266
- 134 Waldvogel FA, Medoff G, Swartz MN: Osteomyelitis – a review of clinical features, therapeutic considerations and unusual aspects. (third of three). *N Engl J Med*, 1970; 282(6):316-22
- 135 Wenke JC, Owens BD, Svoboda SJ, Brooks DE: Effectiveness of commercially-available antibiotic-impregnated implants. *J Bone Joint Surg Br.* 2006; 88:1102-1104
- 136 Willim DL, Haymond BS, Woodbury KL, Beck JP, Moore DE, Epperson RT, Bloebaum RD: Experimental model of biofilm implant-related osteomyelitis to test combination biomaterials using biofilms as initial inocula. *J Biomed Mater Res A.* 2012; 100:1888-1900
- 137 Wiley AM, Trueta J: The vascular anatomy of the spine and its relationship to polygenic vertebral osteomyelitis. *Bone & Joint Journal*, 1959; 41(4):796-809
- 138 Yamamoto Y, Sugimura R, Watanabe T, Shigemori S, Okajima T, Nigar S, M'Namai F, Sato T, Ogita T, Shimosato T: Class A CpG oligonucleotide priming rescues mice from septic shock via activation of platelet-activation factor acetylhydrolase. *Front. Immunol.* 2017; 8:1049
- 139 Yoshii T, Magara S, Miyai D, Kuroki E, Nishimura H, Furudo S, Komori: Inhibitory effect of roxithromycin on the local levels of bone-resorbing cytokines in an experimental model of murine osteomyelitis. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 50:289-292
- 140 Zak O, Zak F, Rich R, Tosch W, Kradolfer F, Scheld WM, Periti P, Gialdroni Grassi G: Experimental staphylococcal osteomyelitis in rats: Therapy with rifampin and claxacillin, alone or in combination. *Current Chemoerapy and Immunotherapy. American Society for Microbiology.* 1982; 973-974
- 141 Zimmerli W, Sendi P: Orthopaedic biofilm infections. *APMIS.* 2017; 125:353-364
- 142 Zmistowski B, Karam JA, Durinka JB, Casper DS, Parvizi J: Periprosthetic joint infections increases the risk of one-year mortality. *J Bone Joint Surg Am.* 2013; 95(24):2177-84

Anhang

Scoring Tabelle Toluidinblau Färbung

Gruppe	Tag	Toluidinblau Färbung				
		Immunzellen	Hämatom	Bakterien	Knochenabbau	Knochenaufbau
Positivkontrolle	1	2	4	2	2	2
Positivkontrolle	1	2	3	2	2	2
Positivkontrolle	1	2	4	3	2	2
Positivkontrolle	1	3	4	2	2	2
Positivkontrolle	1	-	-	-	2	2
Positivkontrolle	1	2	3	1	2	2
Positivkontrolle	1	1	2	0	3	2
Positivkontrolle	1	3	4	3	2	2
Positivkontrolle	1	3	4	3	2	2
Positivkontrolle	3	-	-	-	2	2
Positivkontrolle	3	3	3	1	3	3
Positivkontrolle	3	3	4	3	3	2
Positivkontrolle	3	3	4	4	3	2
Positivkontrolle	3	3	3	3	3	2
Positivkontrolle	3	3	3	3	2	2
Positivkontrolle	3	4	4	4	3	3
Positivkontrolle	3	3	3	3	3	3
Positivkontrolle	3	3	4	4	3	3
500µg CpG-ODN	1	1	2	1	3	3
500µg CpG-ODN	1	2	3	2	3	3
500µg CpG-ODN	1	2	4	2	3	3
500µg CpG-ODN	1	2	3	3	2	2
500µg CpG-ODN	1	2	3	3	3	3
500µg CpG-ODN	1	3	4	3	3	3
500µg CpG-ODN	1	2	3	3	2	2
500µg CpG-ODN	1	3	3	3	3	3
500µg CpG-ODN	1	3	4	3	2	2
500µg CpG-ODN	3	3	3	4	3	3
500µg CpG-ODN	3	2	4	2	3	3
500µg CpG-ODN	3	2	4	2	3	3
500µg CpG-ODN	3	4	4	4	3	3
500µg CpG-ODN	3	3	3	3	4	3
500µg CpG-ODN	3	2	4	3	3	3
500µg CpG-ODN	3	3	3	3	3	3
500µg CpG-ODN	3	3	3	2	3	3
500µg CpG-ODN	3	4	4	4	3	3
500µg neg. ODN	1	2	2	2	2	2
500µg neg. ODN	1	2	2	0	-	-
500µg neg. ODN	1	1	1	0	1	1

500µg neg. ODN	1	3	3	3	2	2
500µg neg. ODN	1	2	3	2	2	2
500µg neg. ODN	1	3	3	3	3	3
500µg neg. ODN	1	2	3	2	3	3
500µg neg. ODN	1	2	4	3	3	2
500µg neg. ODN	1	2	3	2	2	2
500µg neg. ODN	3	3	3	4	3	3
500µg neg. ODN	3	2	3	3	3	3
500µg neg. ODN	3	2	3	1	3	2
500µg neg. ODN	3	3	4	3	3	3
500µg neg. ODN	3	4	4	4	3	3
500µg neg. ODN	3	3	3	3	3	3
500µg neg. ODN	3	2	2	2	2	2
500µg neg. ODN	3	4	4	4	3	3
500µg neg. ODN	3	3	3	3	3	3
Negativkontrolle	1	-	-	-	2	2
Negativkontrolle	3	1	3	1	2	2
Negativkontrolle	1	0	1	0	1	1
Negativkontrolle	3	0	0	0	2	2
Negativkontrolle	1	0	1	0	2	2
Negativkontrolle	3	0	0	0	2	2

"0" = keine

"1" = wenig und lokal begrenzt

"2" = mittel / an einigen Stellen im Präparat

"3" = viel aber lokal begrenzt

"4" = viel und im gesamten Präparat

"-" = nicht ausreichend angeschnitten

Scoring Tabelle Movat Pentachrom Färbung

Gruppe	Tag	Movat Pentachrom Färbung				
		Immunzellen	Hämatom	Bakterien	Knochenabbau	Knochenaufbau
Positivkontrolle	1	2	3	2	2	2
Positivkontrolle	1	2	3	2	2	2
Positivkontrolle	1	2	3	3	2	2
Positivkontrolle	1	3	4	3	2	2
Positivkontrolle	1	2	2	2	2	2
Positivkontrolle	1	3	3	1	2	2
Positivkontrolle	1	2	2	3	3	3
Positivkontrolle	1	3	3	4	2	2
Positivkontrolle	1	3	3	3	3	3
Positivkontrolle	3	1	2	2	2	2
Positivkontrolle	3	1	3	2	3	3
Positivkontrolle	3	2	3	3	2	2
Positivkontrolle	3	3	4	3	3	3
Positivkontrolle	3	2	3	2	3	3
Positivkontrolle	3	3	3	3	3	2
Positivkontrolle	3	3	4	3	3	3
Positivkontrolle	3	3	4	4	2	3
Positivkontrolle	3	3	4	3	3	3
500µg CpG-ODN	1	1	2	2	3	3
500µg CpG-ODN	1	2	3	3	3	3
500µg CpG-ODN	1	2	4	2	3	3
500µg CpG-ODN	1	2	3	3	2	2
500µg CpG-ODN	1	2	2	3	2	2
500µg CpG-ODN	1	3	4	3	3	2
500µg CpG-ODN	1	3	3	3	2	2
500µg CpG-ODN	1	3	3	3	3	3
500µg CpG-ODN	1	3	4	4	2	2
500µg CpG-ODN	3	3	3	4	2	3
500µg CpG-ODN	3	2	3	2	3	3
500µg CpG-ODN	3	3	4	4	3	3
500µg CpG-ODN	3	4	4	4	3	3
500µg CpG-ODN	3	3	3	4	3	3
500µg CpG-ODN	3	2	3	3	3	3
500µg CpG-ODN	3	3	3	4	2	3
500µg CpG-ODN	3	3	3	4	2	2
500µg CpG-ODN	3	3	3	4	3	3
500µg neg. ODN	1	3	3	3	2	3
500µg neg. ODN	1	1	4	0	-	-
500µg neg. ODN	1	1	3	2	2	2
500µg neg. ODN	1	2	4	2	3	2
500µg neg. ODN	1	2	3	2	3	2

500µg neg. ODN	1	3	3	4	3	3
500µg neg. ODN	1	1	2	2	2	2
500µg neg. ODN	1	1	3	2	3	3
500µg neg. ODN	1	2	4	3	2	2
500µg neg. ODN	3	2	2	3	2	2
500µg neg. ODN	3	3	3	3	3	3
500µg neg. ODN	3	2	3	2	3	2
500µg neg. ODN	3	3	3	3	3	3
500µg neg. ODN	3	3	4	4	3	3
500µg neg. ODN	3	3	3	3	3	3
500µg neg. ODN	3	2	2	3	2	2
500µg neg. ODN	3	3	3	3	3	3
500µg neg. ODN	3	3	3	3	3	3
Negativkontrolle	1	1	2	0	1	1
Negativkontrolle	3	0	4	0	2	2
Negativkontrolle	1	1	3	0	2	2
Negativkontrolle	3	0	0	0	2	2
Negativkontrolle	1	1	3	0	3	3
Negativkontrolle	3	1	2	0	2	2

"0" = keine

"1" = wenig und lokal begrenzt

"2" = mittel / an einigen Stellen im Präparat

"3" = viel aber lokal begrenzt

"4" = viel und im gesamten Präparat

"-" = nicht ausreichend angeschnitten

Scoring Tabelle Gram-Färbung

Gruppe	Tag	Gram-Färbung			
		Knorpel (Cluster)	Markraum (Cluster)	Knorpel (einzeln)	Markraum (einzeln)
Positivkontrolle	1	2	0	0	2
Positivkontrolle	1	2	2	2	2
Positivkontrolle	1	3	1	3	1
Positivkontrolle	1	1	3	1	4
Positivkontrolle	1	-	2	-	3
Positivkontrolle	1	0	1	1	1
Positivkontrolle	1	2	1	1	3
Positivkontrolle	1	4	2	4	3
Positivkontrolle	1	0	2	0	3
Positivkontrolle	3	-	3	-	2
Positivkontrolle	3	0	2	1	3
Positivkontrolle	3	1	3	1	3
Positivkontrolle	3	0	3	1	3
Positivkontrolle	3	1	2	1	3
Positivkontrolle	3	1	3	1	3
Positivkontrolle	3	0	3	0	3
Positivkontrolle	3	4	3	4	4
Positivkontrolle	3	1	4	1	4
500µg CpG-ODN	1	0	1	0	1
500µg CpG-ODN	1	0	2	0	3
500µg CpG-ODN	1	3	2	3	2
500µg CpG-ODN	1	-	3	-	3
500µg CpG-ODN	1	0	3	0	3
500µg CpG-ODN	1	0	3	1	3
500µg CpG-ODN	1	2	0	2	1
500µg CpG-ODN	1	0	3	0	3
500µg CpG-ODN	1	0	4	0	4
500µg CpG-ODN	3	-	4	-	3
500µg CpG-ODN	3	0	3	0	3
500µg CpG-ODN	3	-	4	-	4
500µg CpG-ODN	3	1	4	1	4
500µg CpG-ODN	3	1	3	1	3
500µg CpG-ODN	3	0	3	1	4
500µg CpG-ODN	3	1	4	1	4
500µg CpG-ODN	3	0	3	0	3
500µg CpG-ODN	3	0	4	1	4
500µg neg. ODN	1	1	3	1	4
500µg neg. ODN	1	0	1	1	2
500µg neg. ODN	1	-	2	-	3
500µg neg. ODN	1	1	3	1	3

500µg neg. ODN	1	3	1	3	2
500µg neg. ODN	1	4	3	4	3
500µg neg. ODN	1	-	3	-	4
500µg neg. ODN	1	2	3	2	4
500µg neg. ODN	1	0	2	2	3
500µg neg. ODN	3	1	3	1	3
500µg neg. ODN	3	0	3	0	3
500µg neg. ODN	3	-	2	-	2
500µg neg. ODN	3	0	3	0	3
500µg neg. ODN	3	0	3	0	3
500µg neg. ODN	3	0	3	0	3
500µg neg. ODN	3	-	3	-	4
500µg neg. ODN	3	2	4	2	4
500µg neg. ODN	3	0	3	0	4
Negativkontrolle	1	0	0	0	0
Negativkontrolle	3	0	0	0	0
Negativkontrolle	1	0	0	0	0
Negativkontrolle	3	0	0	0	0
Negativkontrolle	1	0	0	1	0
Negativkontrolle	3	0	0	0	0

"0" = keine

"1" = wenig und lokal begrenzt

"2" = mittel / an einigen Stellen im Präparat

"3" = viel aber lokal begrenzt

"4" = viel und im gesamten Präparat

"-" = nicht ausreichend angeschnitten

Scoring Tabelle TRAP-Färbung

Gruppe	Tag	TRAP-Färbung				
		Wachstumsfuge	Trabekel	Sequester	frei im Markraum	Corticalis
Positivkontrolle	1	4	3	2	1	3
Positivkontrolle	1	4	3	1	0	3
Positivkontrolle	1	-	3	1	1	3
Positivkontrolle	1	4	3	1	1	4
Positivkontrolle	1	-	3	0	1	3
Positivkontrolle	1	4	3	1	1	3
Positivkontrolle	1	4	3	1	1	3
Positivkontrolle	1	4	3	1	0	3
Positivkontrolle	1	4	3	1	1	3
Positivkontrolle	3	-	3	0	0	3
Positivkontrolle	3	4	3	2	2	3
Positivkontrolle	3	3	2	2	2	3
Positivkontrolle	3	4	2	2	2	2
Positivkontrolle	3	4	3	2	2	3
Positivkontrolle	3	4	3	2	1	2
Positivkontrolle	3	4	3	2	1	2
Positivkontrolle	3	3	2	2	2	2
Positivkontrolle	3	4	3	3	1	2
500µg CpG-ODN	1	4	3	1	2	3
500µg CpG-ODN	1	4	2	2	1	3
500µg CpG-ODN	1	3	3	1	1	3
500µg CpG-ODN	1	-	1	0	0	2
500µg CpG-ODN	1	4	2	0	0	3
500µg CpG-ODN	1	4	2	0	1	2
500µg CpG-ODN	1	3	3	1	1	3
500µg CpG-ODN	1	4	2	1	1	3
500µg CpG-ODN	1	4	2	1	1	3
500µg CpG-ODN	3	-	2	1	2	2
500µg CpG-ODN	3	4	2	1	2	3
500µg CpG-ODN	3	-	2	2	2	2
500µg CpG-ODN	3	4	3	3	1	2
500µg CpG-ODN	3	3	3	1	2	1
500µg CpG-ODN	3	4	2	1	2	1
500µg CpG-ODN	3	4	2	1	2	2
500µg CpG-ODN	3	3	2	1	1	2
500µg CpG-ODN	3	4	4	2	2	3
500µg neg. ODN	1	4	3	1	1	3
500µg neg. ODN	1	4	3	1	1	3
500µg neg. ODN	1	-	2	1	1	2
500µg neg. ODN	1	4	3	2	1	3

500µg neg. ODN	1	3	2	1	1	2
500µg neg. ODN	1	4	3	1	1	2
500µg neg. ODN	1	-	2	0	0	2
500µg neg. ODN	1	3	2	0	0	2
500µg neg. ODN	1	3	2	0	0	2
500µg neg. ODN	3	3	3	0	1	2
500µg neg. ODN	3	4	3	1	1	2
500µg neg. ODN	3	-	2	2	2	2
500µg neg. ODN	3	4	3	3	3	2
500µg neg. ODN	3	4	4	3	3	3
500µg neg. ODN	3	4	3	2	2	2
500µg neg. ODN	3	-	3	2	2	3
500µg neg. ODN	3	3	2	2	2	2
500µg neg. ODN	3	3	2	2	2	2
Negativkontrolle	1	-	2	0	0	3
Negativkontrolle	3	4	3	0	1	3
Negativkontrolle	1	4	2	0	0	3
Negativkontrolle	3	4	3	0	1	3
Negativkontrolle	1	4	3	0	1	2
Negativkontrolle	3	3	3	1	1	2

"0" = keine

"1" = wenig und lokal begrenzt

"2" = mittel / an einigen Stellen im Präparat

"3" = viel aber lokal begrenzt

"4" = viel und im gesamten

Präparat

"-" = nicht ausreichend
angeschnitten

Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die mich unterstützt und so zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Zuerst möchte mich herzlich bei Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Heiß für die Möglichkeit bedanken meine Promotionsarbeit im Labor für experimentelle Unfallchirurgie an der JLU-Gießen durchführen zu können.

Dann möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Volker Alt für die Überlassung des Dissertationsthemas und seine Unterstützung bedanken

Für die Übernahme der Betreuung in der Endphase meiner Promotionsarbeit möchte ich Frau Prof. Dr. Katrin S. Lips herzlich danken.

Bei Herrn Dr. Ulrich Thormann bedanke ich mich für die Durchführung der Tier-OPs und Euthanasien und bei Herrn Dr. Valid Mohammed für die mikrobiologischen Ergebnisse, die er mir freundlicherweise (als Vergleichswerte zur Histologie) zur Verfügung gestellt hat.

Allen Mitarbeitern/Mitarbeiterinnen des Labors für experimentelle Unfallchirurgie möchte ich für die herzliche Aufnahme und die Unterstützung beim Erlernen neuer Methoden danken, wodurch die Arbeit im Labor wirklich Spaß gemacht hat.

Frau Dr. Ursula Sommer möchte ich für die Hilfe bei der Versuchsplanung, fürs Korrekturlesen und die Betreuung im Labor herzlich danken.

Ebenfalls fürs Korrekturlesen möchte ich mich bei Herrn Dr. Markus Rupp bedanken.

Einen großen und herzlichen Dank möchte ich an Herrn Dr. Thaqif El Khassawna für seine Unterstützung bei der Datenanalyse und der Schreibphase aussprechen. Danke für deine Denkanstöße und dafür, dass du dir immer für meine Fragen Zeit genommen hast.

Mein Dank geht ebenfalls an Deeksha Malhan und Sebastian Rosch, denn ohne euch wäre ich an ImageJ verzweifelt.

Frau Annette Stengel möchte ich ganz herzlich für ihre Hilfe bei den kleineren und größeren Schwierigkeiten im Laboralltag und ihre stets motivierenden Worte danken.

Meinen Freunden und meiner Familie möchte ich für ihre stets aufmunternden Worte danken.

Abschließend möchte ich noch meinem Freund danken: Vielen Dank, denn ohne deine Unterstützung, deine Geduld und dass du mich immer wieder motiviert hast, hätte ich es nicht geschafft.

