Vergleichende funktionelle, zell- und molekularbiologische Untersuchung eines vom komplexen regionalen Schmerzsyndrom (CRPS) befallenen Amputats der oberen Extremität

Inauguraldissertation

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

> Vorgelegt von Langer, Stina Maria aus Waldbröl

> > Gießen 2021

Aus dem Fachbereich der Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen Aus dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Gutachterin: Prof. Dr. Katrin S. Lips

Gutachter: Prof. Dr. Hagen Huttner

Tag der Disputation: 08.12.2021

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Grundlagen des Knochenstoffwechsels	1
1.2 Anatomie der Hand	7
1.3 Complex Regional Pain Syndrome (CRPS)	9
1.1.1 Definition und geschichtlicher Hintergrund	9
1.1.2 Klinische Anzeichen	10
1.1.3 Diagnostik	12
1.1.4 Pathophysiologie	14
1.1.5 Therapieansätze	15
1.4 Osteoimmunologie	19
1.5 Zielsetzung der Arbeit	21
2. Material und Methoden	23
2.1 Histologische Probenaufarbeitung	23
2.1.1 Schnitt- und Schliffherstellung	23
2.1.2 Übersichtsfärbungen	25
2.1.3 Enzymhistochemie	27
2.1.4 Immunhistochemie	27
2.1.5 Fotomikroskopie	28
2.2 Histomorphometrie	29
2.3 Transmissions-Elektronen Mikroskopie (TEM)	31
2.4 Fibroblastenzellkultur - funktionelle Assays	32
2.4.1 Kultivierung der Fibroblasten	32
2.4.2 Aussäen der Fibroblasten	34
2.4.3 Funktioneller Vitalitätsassay (MTT-Test)	34
2.4.4 IL-6-Assay	35
2.4.5 Nicht-parametrische Tests	36
2.5 Molekularbiologische Untersuchungen	37
2.5.1 RNA-Isolierung	37
2.5.2 cDNA-Synthese	38
2.5.3 Etablierung der realtime Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	39
2.5.8 Durchführung der realtime PCR	43
3. Ergebnisse	45
3.1 Histologie	45
3.1.1 Hämatoxylin-Eosin	45
3.1.2 Kossa van Gieson	48
3.1.3 Tartrat resistente saure Phosphatase (TRAP)	49
3.1.4 Alkalische Phosphatase (ALP)	50
3.1.5 Markierung des Aktin-Zytoskeletts glatter Muskelzellen (ASMA)	51
3.2 Histomorphometrie	53
3.3 Transmissions-Elektronen Mikroskopie (TEM)	57
3.4 Fibroblastenzellkultur	61

3.4 Funktioneller Vitalitätsassay (MTT-Test)	65
3.5 IL-6 Assay	67
3.6 Quantitative realtime PCR	70
4. Diskussion	76
4.1 Verwendete Untersuchungsmethoden	77
4.2 Einfluss des CRPS auf den Knochen	78
4.2.1 Mikroarchitektonische Veränderungen	78
4.2.2 Bewertung von Knochenhomöostase, Zell- und Gefäßaufkommen	80
4.2.3 Morphologische Veränderungen der Zellen	82
4.3 Einfluss des CRPS auf den Gelenkknorpel	83
4.4 Auswirkung des CRPS auf die Genexpression im Knochen	84
4.5 Ausblick	85
5. Zusammenfassung	88
	00
6. Summary	
6. Summary7. Verzeichnisse	
6. Summary7. Verzeichnisse	92 92
 6. Summary 7. Verzeichnisse	
 6. Summary 7. Verzeichnisse	
 6. Summary 7. Verzeichnisse 7.1 Abkürzungsverzeichnis 7.2 Abbildungsverzeichnis 7.3 Tabellenverzeichnis 7.4 Literaturverzeichnis 	
 6. Summary	
 6. Summary 7. Verzeichnisse 7.1 Abkürzungsverzeichnis 7.2 Abbildungsverzeichnis 7.3 Tabellenverzeichnis 7.4 Literaturverzeichnis 9. Publikationen 9.1 Poster 	
 6. Summary 7. Verzeichnisse	

1. Einleitung

Der Knochen nimmt eine vielseitige und wichtige Rolle im menschlichen Körper ein und steht ständig im komplexen Kontakt zu vielen anderen Organsystemen. Zum einen wird durch unser knöchernes Skelett Bewegung ermöglicht und das weichere Gewebe wird geschützt und unterstützt. Zum anderen fungiert Knochengewebe als Calcium- und Phosphatspeicher und beinhaltet das Blut bildende Knochenmark. Wie alle anderen Organsysteme des Körpers, unterliegt auch die Knochenhomöostase vielzähligen Einflussfaktoren, und kann vor allem durch chronische, schädigende Prozesse aus dem Gleichgewicht geraten (Florencio-Silva et al., 2015). Da die kontinuierliche Reorganisation des Knochens einen wichtigen Grundstein für zahlreiche elementare, physiologische Prozesse darstellt, kann eine Beeinträchtigung dieser Gewebshomöostase weitreichende Konsequenzen haben. Um einen besseren Einblick in dieses dynamische System erlangen zu können, sollen zunächst die Grundlagen des Knochenstoffwechsels, sowie die Anatomie der Hand kurz erläutert werden. Auf Basis des aktuellen Forschungsstandes soll das Krankheitsbild des komplexen regionalen Schmerzsyndroms (complex regional pain syndrome - CRPS), einschließlich der Therapieoptionen und Erklärungsansätze für die zugrundeliegende Pathophysiologie der Krankheit aufgeschlüsselt werden. Des Weiteren werden die größten Einflussfaktoren des Immunsystems die Knochenhomöostase, speziell auf bei chronischen Entzündungsprozessen, dargestellt.

1.1 Grundlagen des Knochenstoffwechsels

Um sich den aktuellen Belastungsumständen immer optimal anpassen zu können, befindet Knochengewebe sich im kontinuierlichen Umbauprozess. Zu den Akteuren dieser dynamischen Knochenhomöostase gehören zum einen Botenstoffe, die sowohl lokal (z.B. Wachstumsfaktoren/Cytokine), als auch systemisch (z.B. Schilddrüsen - / Nebenschilddrüsen- / Sexualhormone) zwischen Körper und Knochen vermitteln. Zum anderen spielen verschiedene Knochenzellen die Rolle der ausführenden Kraft, um die körpereigenen Signale in Knochenauf- oder Knochenabbau umzusetzen (Florencio-Silva et al., 2015) (Eriksen, 2010). Entsteht an einer beliebigen Stelle dieses Systems ein Ungleichgewicht, kann dies in Erkrankungen des knöchernen Skeletts resultieren. Molekulare Mechanismen, wie Cytokine, Hormone und Wachstumsfaktoren, versuchen einer Dysbalance entgegen zu wirken, indem sie die Knochenhomöostase jeglicher Veränderung anpassen, die beispielsweise durch Alter, Geschlecht, postmenopausale Hormonumstellung, diverse Medikamente oder das körperliche Aktivitätsniveau entstehen kann (Lange et al., 2013).

Knochengewebe ist ein wesentlicher Bestandteil des Bewegungsapparates. Es ist mineralisiertes Bindegewebe, welches durch die Einlagerung von Calciumsalzen und deren Verkalkung Stabilität erzeugt und damit ideal als Stützgewebe fungiert. Unter kontinuierlicher Belastung herrscht ein reger Stoffumsatz, denn dann ist das Gewebe reich durchblutet, bei geringem Gebrauch des Bewegungsapparates atrophiert der Knochen jedoch. Histologisch wird die Knochenstruktur in kompakten Knochen (Substantia corticalis) und spongiösen Knochen (Substantia spongiosa) unterteilt. Kompakter Knochen stellt als Außenschale ein solides Grundgerüst dar, im Inneren des Skelettknochens befindet sich hingegen ein verzweigtes Gerüst spongiöser Knochenbälkchen (Trabekel) (Welsch & Deller, 2010). Eriksen (2010) erläutert, dass beide Knochenstrukturen auf mikroskopischer Ebene keineswegs statisch sind, da sie sich unter normalen Umständen kontinuierlich in Reparatur befinden und jeder kleinste Mikrodefekt sofort ausgebessert wird.

Das Grundgerüst der Knochenhomöostase wird durch drei Untergruppen der Knochenzellen gebildet. Die Gruppe der Osteoklasten übernimmt dabei den Knochenabbau, Osteoblasten wiederum den Knochenaufbau. Osteocyten machen eine dritte Gruppe aus, welche eine weiter differenzierte Form der Osteoblasten darstellen und zwischen den beiden anderen Gruppen als Koordinator agieren, indem sie ständig mechanosensorisch aktiv sind. Die Anpassungsfähigkeit des Knochens ist erst durch eine enge Interaktion dieser drei Knochenzelltypen gegeben. Ein solcher Umbau der Knochenmatrix erfordert zunächst eine Resorption von beschädigtem Material. Darauf folgt eine Umkehrphase, wonach die Neoformierung von Knochenmatrix beginnen kann (Florencio-Silva et al., 2015). Initiiert wird solch ein Umbau, sobald die in der Knochenmatrix verankerten Osteocyten Mikrodefekte im umliegenden Gewebe wahrnehmen (Sims & Gooi, 2008). Dieser Zelltyp entwickelt sich aus den knochenaufbauenden Osteoblasten, welche sich selbst in der Knochenmatrix einmauern und anschließend ihr ausdifferenziertes Stadium als Osteocyt erreichen. Innerhalb des knöchernen Gewebes können sie optimal Druckveränderungen wahrnehmen und diese Informationen anschließend über kleine Knochenkanälchen (Canaliculi) an die übrigen Knochenzellen weitergeben (Welsch & Deller, 2010). Mikrodefekte in der

Knochenmatrix lösen eine Apoptose der umliegenden Osteocyten aus, welches wiederum eine Knochenumbau-vermittelnde Signalkaskade anstößt (siehe Abb. 1). So können Osteocyten durch die apoptotisch vermittelte Freisetzung von Prostaglandinen und Cytokinen den nötigen Anreiz liefern, um die, von Osteoblasten vermittelte, Ausdifferenzierung von resorbierenden Osteoklasten in Gang zu setzen. Auch lokale Faktoren, wie beispielsweise Interleukin (IL) -11, Oncostatin M (OSM) oder Prostaglandin-E₂ (PGE2) regen die Osteoblasten zur Stimulation der Osteoklasten an (Sims & Gooi, 2008). Knochenabbauende Zellen entstammen der gleichen myeloischen Zellreihe wie Monozyten oder Makrophagen. Es sind mehrkernige Riesenzellen, die an der Knochenoberfläche zum Synzytium verschmelzen und sich dort weiter zu Osteoklasten differenzieren. In aktivierter Form liegen sie in sogenannten Howship-Lakunen angeheftet am Knochen, sodass ein abgegrenztes Kompartiment für die Matrixresorption entsteht. Über eine gefältelte Zellmembran (ruffled border) werden Protonen in dieses Kompartiment sezerniert. Das saure Millieu löst die Calciumsalze auf und begünstigt den Abbau von Kollagen durch Hydrolasen (Welsch & Deller, 2010). Die Osteoklastogenese wird vor allem durch Osteoblasten gesteuert, welche das Schlüsselmolekül receptor activator of NF-KB ligand (RANKL) für die Differenzierung der Osteoklasten auf der Oberfläche tragen und den stimulierenden Botenstoff Macrophage Colony Stimulating Factor (MCSF) produzieren. Erst wenn RANKL an den dazugehörigen, von Osteoklasten exprimierten Plasmamembranrezeptor receptor activator of NF-KB (RANK) bindet, wird die Osteoklastenbildung fortgesetzt (Neumann & Schett, 2007). Die Osteoklasten-Vorläuferzellen werden über eine vielschichtige interzelluläre Kommunikation von Osteoblasten, Saumzellen, Osteocyten und der Knochenmatrix (z. B. über Lockstoffe wie Osteocalcin oder Kollagen-1-Fragmenten) zu einer Stelle mit Mikrodefekten gelockt (Malone et al., 1982). Die Bindung an eine Knochenoberfläche macht sie schließlich zu resorbierenden Osteoklasten, woraufhin der Knochenabbau beginnt (Sims & Gooi, 2008). Dieser Prozess unterliegt dem Einfluss zahlreicher Mediatoren; Osteoklasten werden, abgesehen vom Einfluss der übrigen Knochenzellen, insbesondere von Immunzellen und Zellen des hämatopoetischen Systems mitkontrolliert (Charles & Aliprantis, 2014).



Abbildung 1: Der Knochenstoffwechsel – Resorptionsphase

- (A) Ein Knochendefekt ruft die Apoptose der umliegenden Osteocyten (OC) hervor, wodurch Prostaglandine (PG) und Cytokine (CK) freigesetzt werden, welches nicht gebundene Osteoblasten (OB) stimuliert. Diese bilden daraufhin RANKL aus und setzen MCSF-1 frei, welches die Osteoklasten-Vorläuferzellen (OK-VZ) zur Differenzierung aktiviert. Lokale Faktoren (Osteocalcin und Kollagin-1-F) locken die OK-VZ zum Knochendefekt. SZ = Saumzelle
- (B) Mehrere aktivierte OK-VZ fusionieren zu Osteoklasten (OK) und werden in ihrem Wirken durch verschiedenste körpereigene Systeme beeinflusst. Bei einer Stimulation zum Knochenabbau erfolgt die Ausbildung einer ruffled border und einer Howship-Lakune (HL), in welche H⁺-Ionen sezerniert werden.

Ist das zu erneuernde Gewebe resorbiert worden, tritt die Umkehrphase des Umbauprozesses ein, in welcher die Knochenoberfläche für den Wiederaufbau von Knochenmatrix modifiziert wird. Im letzten Schritt des Umbaus werden Osteoblasten, entstanden aus mesenchymalen Stammzellen, zur entsprechenden Oberfläche gelockt, um den Knochendefekt aufzufüllen. Der Lockruf an die knochenaufbauenden Zellen geschieht einerseits durch die Osteoklasten, die Signalstoffe wie Cardiotrophin (CT) -1 produzieren (Walker et al., 2008) (siehe Abb. 2). Zum Anderen setzt der Knochenabbau Faktoren frei, welche durch die Osteoblasten selbst während des Knochenaufbaus in der Matrix eingebettet wurden und nun als freie Faktoren wiedererkannt werden können, so z.B. Wachstumsfaktoren wie Insulin-like Growth Factor (IGF) oder Fibroblast Growth Factor (FGF). Die Osteoblasten verständigen sich untereinander über gap junctions und sezernieren Osteoid in Richtung Knochenmatrix. Osteocyten können außerdem über eine Sklerostin-Produktion einen Einfluss auf den Knochenaufbau nehmen. Ist die Neoformierung von Knochenmatrix abgeschlossen, differenzieren sich Osteoblasten entweder zu Osteocyten oder Saumzellen (bone lining cells) weiter (Sims & Gooi, 2008). Saumzellen bedecken den Teil der Knochenoberfläche, an dem gerade weder Resorption noch Neoformierung von Knochenmatrix stattfindet, ihre Funktion ist jedoch nicht vollständig erforscht. Vermutet wird eine Helferfunktion bei der Vermittlung zwischen Osteoklasten und Osteoblasten, da sie RANKL produzieren, sobald sie kleinste Defekte in der Knochenmatrix detektieren und somit die Differenzierung der Osteoklasten fördern. Daneben spielen sie eine entscheidende Rolle beim Knochenumbau, indem sich überflüssige Knochenmatrix entfernen und damit die Knochenabbau-Lakunen für die Osteoklasten sowohl vor- als auch nachbereiten (Everts et al., 2002)(Sims & Gooi, 2008). Wenn kein Abbau stattfinden soll, verhindern sie zusätzlich einen direkten Kontakt zwischen Knochensubstanz und Osteoklasten (Florencio-Silva et al., 2015).



Abbildung 2: Der Knochenstoffwechsel – Umkehr- und Neoformierungsphase

- (A) In der Umkehrphase werden durch beim Knochenabbau freigesetztes Insulin-like Growth Factor (IGF) und Fibroblast Growth Factor (FGF), sowie von Osteoklasten (OK) sezerniertes Cardiotrophin-1 Osteoblasten (OB) angelockt. OC = Osteocyten, SZ = Saumzellen
- (B) Die Neoformierungsphase ist gekennzeichnet vom Aufbau neuer Knochensubstanz durch die Osteoblasten (OB). Anschließend ist eine Weiterdifferenzierung der OB zu Osteocyten (OC) oder zu Saumzellen (SZ) möglich. Gehemmt wird die Neoformierung durch Sklerostin, welches von den OC sezerniert wird.

1.2 Anatomie der Hand

Die Hand ist ein sehr wichtiges Körperteil für den Erhalt der menschlichen Selbstständigkeit. Vor allem als Greifwerkzeug ermöglichen die Hände eine Interaktion mit der Umwelt. Auch in der Sprache und der zwischenmenschlichen Kommunikation spielen die Hände eine entscheidende Rolle, wie etwa in der Fähigkeit zu Schreiben oder die Körpersprache maßgeblich zu bestimmen. Selbst der kleinste Ausfall in der Beweglichkeit der Hand erzeugt einen gravierenden Unterschied in der Bewältigung des Alltags. Kein anderes Körperteil des Menschen besteht aus so vielen Knochen und gelenkigen Verbindungen wie die Hand, was die benötigte Feinmotorik ermöglicht.

Das proximale Handgelenk, Articulatio (Art.) radiocarpalis, stellt eine funktionell wichtige Verbindung zwischen Unterarm und Handwurzel (Carpus) dar. Der Unterarm setzt sich aus den Knochen Radius und Ulna zusammen, während die Handwurzel aus insgesamt acht Knochen besteht, welche sich jeweils zur Hälfte in eine proximale und eine distale Reihe aufteilen. Zur proximalen Reihe gehören das Os scaphoideum, das Os lunatum, das Os triquetrum und das Os pisiforme, welche mit Radius und Ulna im Radiocarpalgelenk artikulieren. Im ulnaren Kompartiment des Gelenks zählt außerdem ein knorpeliger Discus articularis (Discus ulnocarpalis) dazu. Die distale Handwurzel wird aus Os hamatum, Os capitatum, Os trapezoideum und Os trapezium gebildet. Zwischen proximaler und distaler Handwurzelreihe befindet sich das distale Handgelenk, Art. mediocarpalis, welches weniger beweglich ist als das proximale Handgelenk. Durch die palmar konkave Wölbung der Handwurzelknochenreihen wird der Karpalkanal (Sulcus carpi) gebildet, durch den insgesamt zehn Beugersehnen und der Nervus medianus zur motorischen und sensorischen Versorgung der Hand verlaufen. In der Mittelhand (Metacarpus) verläuft die Ausbildung der fünf Fingerstrahlen mit den langgestreckten Ossa metacarpi I-V, beginnend mit dem Daumen auf radialer Seite der Hand. Die gelenkige Verbindung zwischen Handwurzel und Mittelhand bildet jeweils ein Art. carpometacarpalis. An die Mittelhand schließt der frei bewegliche Teil der Hand, die Finger (Digiti I-V), schließlich an. Jeder Finger besteht aus drei Knochen, dem Phalanx proximalis, medialis und distalis. Einzig der Daumen weist lediglich den Phalanx proximalis und distalis auf, der mediale Teil fehlt. Der Übergang von der Mittelhand auf die Finger wird von den Artt. metacarpophalangeales gebildet. Zwischen den Phalangen

sorgen proximale und distale Artt. interphalangeales für die nötige Beweglichkeit (Schünke et al., 2011).



Abbildung 3: Gelenke der Hand, Ansicht von dorsal

Abbildung modifiziert nach Schünke et al. (2011).



Abbildung 4: Knöcherne Anatomie der Hand, Ansicht von ventral

Abbildung modifiziert nach Schünke et al. (2011).

1.3 Complex Regional Pain Syndrome (CRPS)

1.1.1 Definition und geschichtlicher Hintergrund

Das komplexe regionale Schmerzsyndrom (CRPS) beschreibt den chronischen Zustand regionaler (nicht dermatom- oder nervbezogen), neuropathischer Schmerzen (spontan oder durch Trauma, wie z.B. Distorsion/Quetschung/Fraktur/Operation, bedingt), welche weder im proportionalen Zusammenhang zu einem Auslöser, noch in einem physiologischen Ausmaß verlaufen. Der distale Teil der betroffenen Extremität zeigt dabei sensorische, motorische, sudomotorische, vasomotorisch ödematöse und trophische

Veränderungen auf, welche keiner normalen Entzündungsreaktion zuzuordnen sind (Scholz et al., 2019). Die historische Entwicklung des CRPS basiert auf der 1864 erstmalig stattgefundenen Beschreibung einer Kausalgie-Häufung durch Schusswunden, die Silas Weir Mitchell im Amerikanischen Bürgerkrieg bei Soldaten beobachtete. Ein Meilenstein wurde anschließend 1900 durch den deutschen Arzt Paul Sudeck gesetzt, welcher die Bezeichnung "Morbus Sudeck" prägte und mit Hilfe von Röntgenbildern Knochenatrophien in Folge von Trauma oder Infektion der oberen Extremität beschreiben konnte. Auch Rene Leriche nahm Einfluss auf die Geschichte der Krankheit, 1917 vertrat er die Hypothese, dass das sympathische Nervensystem eine Schlüsselrolle bei der Krankheitsentstehung spiele, woraus sich der Terminus "reflex sympathetic dystrophy" (RSD) entwickelte. Die 1973 gegründete International Association for the Study of Pain (IASP) setzte schließlich 1994 den heute noch international geltenden Begriff des "complex regional pain syndrome (CRPS)" fest und versucht seither stetig, die diagnostischen Möglichkeiten zu verbessern und die klinischen Kriterien weiter zu spezifizieren (Iolascon et al., 2015). Das Syndrom wird in zwei Subtypen aufgeteilt; Typ I beschreibt das Auftreten von CRPS nach jeglicher Art von Trauma der Extremitäten ohne offensichtliche Nervenläsion (frühere Bezeichnung: RSD), wohingegen Typ II mit Residuen einer Nervenverletzung assoziiert ist (frühere Bezeichnung: Kausalgie) (Scholz et al., 2019). Die Unterscheidung in Typ I und II wird aber nur noch selten getroffen, da der Ausschluss einer nervalen Schädigung nur über die Elektrophysiologie möglich ist, welches dem CRPS-Patienten große Schmerzen bereitet und letztendlich keinerlei Konsequenzen für die Therapiemaßnahmen hat (Harden et al., 2013). Das CRPS kann in jedem Lebensalter auftreten, die häufigsten Patienten sind jedoch weiblich (60-81%) und befinden sich in den mittleren Lebensdekaden (30-50 Jahre). Eine Erkrankung der oberen Extremität (44-61%) kommt hierbei etwas häufiger vor als die der unteren Extremität (39-51%) (Allen et al., 1999)(Sandroni et al., 2003).

1.1.2 Klinische Anzeichen

Die akute Form des CRPS ist durch ein posttraumatisch exazerbiertes charakterisiert Inflammationsgeschehen und geht mit typischen lokalen Entzündungszeichen einher. Dabei kommt es zu abnormer Vaskularisierung, welche in Temperatur- und Farbveränderungen der Haut resultiert und Ödeme erzeugt. Charakteristisch ist vor allem ein sympathisch vermittelter, brennender und kontinuierlicher Schmerz. Dieser kann sich zu einem regionalen Schmerzsyndrom mit heftigen Spontanschmerzen ausbreiten. Dazu gehören häufig taktil, thermisch, bewegungs- oder stressinduzierte Hyperalgesie (übermäßiges Empfinden von Schmerzreiz) und Allodynie (schmerzhaftes Empfinden von normalem Reiz). Das Bewegungsausmaß und die Gelenkmobilität können eingeschränkt sein, welches Anzeichen von Schwäche, Tremor und Dystonie einschließen kann. Vermehrtes oder vermindertes Schwitzen, sowie ein erhöhtes oder verändertes Nagel- und Haarwachstum der betroffenen Extremität können auftreten. Eine trockenere Hautbeschaffenheit gehört ebenfalls zu den möglichen dystrophischen Veränderungen.



Abbildung 5: Extremität mit CRPS

Inflammationszustand eines von CRPS betroffenen Unterarms im akuten Stadium, mit den typischen Entzündungszeichen und einer schmerzbedingten Schonhaltung der rechten Hand. (Verwendung der Bilder mit freundlicher Genehmigung der Patientin)

Die Krankheit kann im weiteren Fortschritt aus einem dystrophischen Stadium in ein atrophisches übergehen: der Schmerz ist nicht mehr konkret lokalisierbar, es kommt zu irreversiblen Gewebsatrophien und einem völligen Funktionsverlust der Extremität. Mit andauerndem Krankheitsverlauf geht die betroffene Extremität in den meisten Fällen (60%) in ein kaltes Stadium über (Ghai & Dureja, 2004)(Borchers & Gershwin, 2014). Je länger die Krankheit andauert, desto stärker nehmen auch neuroplastische Veränderungen des zentralen Nervensystems (ZNS) zu (Lewis & Schweinhardt, 2012). Ausgelöst durch eine Minderbenutzung der schmerzempfindlichen Extremität soll es beispielsweise zu einer kortikalen Reorganisation mit abnehmender Repräsentation des betroffenen Körperteils kommen. Es resultiert ein zunehmender Verlust feinmotorischer Fähigkeiten und eine verminderte Beweglichkeit (Juottonen et al., 2002). Hinzu kommen Symptome, die einem Neglect ähneln, sodass der Patient zunehmend Abstand von der betroffenen Extremität nimmt und der motorische Funktionsverlust damit immer weiter fortschreitet (Galer & Jensen, 1999). Selten ist der proximale Teil der Extremität mit betroffen und nur in wenigen Fällen breiten sich die neuropathischen Schmerzen zu anderen Extremitäten aus (Scholz et al., 2019).

1.1.3 Diagnostik

Da die Diagnose des CRPS rein klinisch gestellt wird, ist es wichtig die Symptomatik und ihren Verlauf im Blick zu behalten. Die standardisierten Diagnosekriterien für das CRPS werden von der IASP vorgegeben und wurden 2010 als überarbeitete "Budapest Kriterien" veröffentlicht. Für die Diagnosestellung eines CRPS sind demnach folgende Punkte maßgebend:

- 1. Kontinuierlicher Schmerz, disproportional zu jeglichen Auslösern
- Der Patient muss von mindestens einem Symptom in drei der vier folgenden Kategorien berichten:
 - Sensorisch: Hyperalgesie und/oder Allodynie
 - Vasomotorisch: Temperaturasymmetrie der Extremitäten und/oder Hautfarben-Änderung/-Asymmetrie
 - Sudomotorisch/Ödeme: Ödeme und/oder Veränderungen/Asymmetrie im Schwitzverhalten
 - Motorisch/trophisch: Einschränkung der Bewegungsgrade und/oder Bewegungseinschränkungen durch Schwäche/Tremor/Dystonie und/oder trophische Veränderungen (Haarwuchs/Nägel/Haut)
- 3. Das Vorhandensein von mindestens einem Symptom in zwei oder mehr der folgenden Kategorien muss zum Zeitpunkt der Evaluierung nachzuweisen sein:

- Sensorisch: Nachweis von Hyperalgesie (anhand eines Nadelstichs) und/oder Allodynie (auf leichte Berührung/tiefen somatischen Druck/Gelenkbewegungen)
- Vasomotorisch: Nachweis von Temperatur-Asymmetrie und/oder Hautfarben-Veränderung/-Asymmetrie
- Sudomotorisch/Ödeme: Nachweis von Ödemen und/oder Veränderungen/Asymmetrie im Schwitzverhalten
- Motorisch/trophisch: Nachweis von Einschränkung der Bewegungsgrade und/oder Bewegungseinschränkungen durch Schwäche/Tremor/Dystonie und/oder trophische Veränderungen (Haarwuchs/Nägel/Haut)
- 4. Es wird keine andere Diagnose gefunden, welche die beschriebenen Symptome besser erklären könnte (Harden et al., 2010)

Die Diagnosestellung erfordert darüber hinaus keine spezifische Diagnostik. Die Wahrscheinlichkeit für die Entwicklung eines CRPS nach distaler Radiusfraktur steigt, wenn nach einwöchiger konservativer Behandlung immer noch ein Schmerz von >/= 5 (auf einer Skala bis 10) angegeben wird. Bei zweifelhaften Fällen kann zusätzlich mit einer Reihe von Untersuchungen die sympathische Funktion evaluiert werden. Dazu gehört die Scanning-Laser-Doppler-Flowmetrie zur Blutfluss-Überprüfung, Thermographie und Messung der sudomotorischen Funktion. Zum Ausschluss von Differentialdiagnosen werden häufig Bildgebungsverfahren wie die MRT (Magnetresonanztomographie), PET (Positronen-Emissions-Tomographie) und SPECT (single photon emission computed tomography) angewandt. Als diagnostisches Mittel kann zusätzlich eine 3-Phasen-Skelettszintigraphie durchgeführt werden. Diese Methode wird vor allem in der Frühphase angewandt. Wie Paul Sudeck bereits 1900 demonstrierte, können in der Spätphase charakteristische skelettale Veränderungen im Röntgenbild festgestellt werden. Beide Verfahren sind allerdings nicht spezifisch genug, um zur Diagnosesicherung beizutragen (Borchers & Gershwin, 2014). Zur Quantifizierung der klinischen Kriterien können auch Hauttemperatur-Messungen von betroffener und nicht betroffener Extremitäten des Patienten vorgenommen werden, in den meisten Fällen zeigt sich eine Seiten-Asymmetrie von über 1°C (Scholz et al., 2019). Labordiagnostisch scheint Osteoprotegerin einen möglichen Biomarker zur Bestätigung der Diagnose darzustellen (Krämer et al., 2014). Außerdem zeigt sich während der akuten Phase des CRPS ein proinflammatorisches Cytokinprofil, wohingegen nach 6 Monaten mit analgestischer Behandlung kaum noch Unterschiede zum Cytokin-Spiegel der Normalbevölkerung zu finden sind (Lenz et al., 2013).

1.1.4 Pathophysiologie

Die Pathologie des CRPS ist bisher ungeklärt. Dem CRPS geht jedoch fast immer ein Trauma wie Frakturen, Verstauchungen, Beschädigung der Bänder oder operative Eingriffe oder aber Krankheitsgeschichten mit lokalen Infektionen, Schlaganfall oder Myokardinfarkt voraus (de Mos et al., 2008)(Veldman et al., 1993). Ein solches Trauma führt zum Anstieg der Entzündungsmediatoren, sowohl peripher als auch zentral. Das andauernde Inflammationsgeschehen steigert die Empfindlichkeit der Nociceptoren und die zentrale Sensibilisierung begünstigt die Entwicklung von Hyperalgesie und Allodynie (Reddi & Curran, 2014). Eine Wechselwirkung aus gestörter Sympathikusfunktion, damit einhergehender Hypoxie im Gewebe und folglich langanhaltenden Schmerzreizen, welche wiederum die Erregbarkeit des Nervensystems erhöhen und die Reizschwellen herabsetzen, entsteht (Borchers & Gershwin, 2014). Längerfristig kommt es zur kortikalen Reorganisation mit einer verminderten Repräsentation der betroffenen Extremität, sowohl im somatosensorischen Cortex, als auch im motorischen Cortex. Durch die Hyperreagibilität der peripheren nociceptiven Neurone ist die erhöhte sensible Stimulation und durch die resultierende zentrale Minderrepresentation ist die verminderte motorische Aktivierung zu erklären. Es ist nicht eindeutig, ob die zentrale Sensibilisierung und die kortikale Reorganisation bereits vor der Entstehung des CRPS vorhanden sind und diese mit begünstigen, oder ob sie als Folge daraus entstehen (Borchers & Gershwin, 2014). Bei der Entwicklung des Syndroms spielt die unnormal erhöhte inflammatorische Reaktion eine entscheidende Rolle in der akuten Phase des CRPS. Proinflammatorische Cytokine, wie z.B. TNF (Tumornekrosefaktor) -α oder IL-6, sind in vielen Fällen vermehrt in der betroffenen Extremität vorzufinden (Scholz et al., 2019)(Birklein et al., 2014). Auch die klinischen Symptome einer Entzündungsreaktion, wie eine erhöhte Vaskularisierung mit Ödemen, Temperaturerhöhung und Rötung, kommen vermehrt zum Vorschein. Dies sind Anzeichen einer autonomischen Dysfunktion, mit einer verminderten, sympathisch vermittelten Vasokonstriktion (Wasner et al., 2001). Vor allem während der akuten Phase wird von einer maßgeblichen Beteiligung des sympathischen Nervensystems bei der Schmerzentwicklung ausgegangen, da häufig eine Erleichterung der Schmerzen beobachtet werden konnte, wenn die sympathische Innervation blockiert ist (Schattschneider et al., 2006). Hier spielt vor allem die sympathische Innervation der tiefen somatischen Strukturen, wie Muskel, Knochen, Gelenke und Bänder, eine Rolle (Borchers & Gershwin, 2014). In einem Rattenmodell konnte die Bedeutung der neurogenen Inflammation für die Entstehung des CRPS nachgewiesen werden, da die Expression des Substanz P (SP) Neurokinin (NK) 1 Rezeptors bei CRPS ansteigt und die SP-evozierte Ödembildung gesteigert auslösbar ist (Wei et al., 2009). Es wird vermutet, dass SP ein Mediator der inflammatorischen Kaskade des CRPS ist, da das Schmerzempfinden und die Regulation der Entzündungsproteine davon abhängig ist (Kingery, 2010). Eine länger andauernde Immobilisierung, häufig im Rahmen einer therapeutischen Maßnahme nach einem Trauma, geht dem CRPS in den meisten Fällen voraus und ist mit einer Verschlechterung der Symptome assoziiert (Borchers & Gershwin, 2014). Bei mechanischer Minderbelastung wird physiologischerweise die Osteogenese gehemmt, beispielsweise durch das Glykoprotein Sklerostin, welches vor allem von den Osteocyten sezerniert wird (Galea et al., 2017). Auch psychologische Faktoren sind in diesem Fall entscheidend, da ängstlichere Persönlichkeiten eine schmerzhafte Aktivierung der betroffenen Extremität eher vermeiden möchten, welches wiederum zu einem immer weiter voranschreitenden Funktionsverlust führt und das Krankheitsgeschehen fördert (Reddi & Curran, 2014). Bei einer Chronifizierung des CRPS geht die betroffene Extremität häufig in einen "kalten" Zustand über. Höchstwahrscheinlich entsteht dabei eine Hypersensibilisierung gegenüber Katecholaminen mit vermehrter Expression von α -Adrenoceptoren und anschließender gesteigerter Vasokonstriktion. So kommt es zu Hypoxie-Zuständen und Ischämien in den tiefen somatischen Strukturen (Borchers & Gershwin, 2014). Autoimmunität scheint auch eine Rolle bei der Entstehung des CRPS zu spielen, da Betroffene signifikant erhöhte Spiegel antinuklearer Antikörper aufweisen (33%) (Dirckx et al., 2015). Des Weiteren gibt es Anhaltspunkte einer genetischen Prädisposition, sodass eine vererbliche Risikobelastung für das Auftreten von CRPS denkbar ist (de Rooij et al., 2009)(van Rooijen et al., 2012).

1.1.5 Therapieansätze

Nach der Diagnosestellung ist eine ausführliche Aufklärung über die Erkrankung an den Betroffenen und sein engstes soziales Umfeld zum besseren Verständnis der vorherrschenden Prozesse dringend notwendig. Die Therapie des CRPS basiert vor allem auf früher Aktivierung, Schmerzreduktion und Psychoedukation (Goebel et al., 2019).

Die vom CRPS betroffene Extremität sollte keinesfalls ruhiggestellt werden, sofortige physio- und ergotherapeutische Maßnahmen können entscheidend für den Erhalt des Funktionsniveaus und die Minderung der Schmerzentwicklung sein. Dazu gehören vor allem die Spiegeltherapie und die Lateralitätserkennung, im Sinne von Graded Motor Imagery, sowie Graded Exposure mit psycho- und physiotherapeutischen Anteilen zum Abbau von Ängsten (Birklein et al., 2018). Mit diesen Methoden können die Mechanismen durchbrochen werden, welche im Gehirn eine Verknüpfung zwischen der Aktivierung der betroffenen Extremität und einer gesteigerten Schmerzwahrnehmung herstellen (Cossins et al., 2013). Beispielsweise soll sensomotorisches Home-Training das Schmerzempfinden deutlich reduzieren, da durch kontinuierliche, aktive Verbesserung der taktilen Geschicklichkeit, die kortikale Kartierung verändert werden kann, sodass das Schmerzempfinden in der betroffenen Extremität abnimmt. Allerdings muss diese Methode noch ausführlicher getestet werden (Flor, 2017). Auch Anwendungen wie thermales Biofeedback und autogene Entspannung scheinen einen vielversprechenden Effekt auf die Schmerzeindämmung zu haben (Harden et al., 2013). Neueste therapeutische Versuche mit minimalinvasiver Hochfrequenz-Stimulation der peripheren Nerven (wireless peripheral nerve stimulation, WPNS) zeigen erste Erfolge und Schmerzlinderung bei den Probanden (Herschkowitz & Kubias, 2019). Als Prävention einer Chronifizierung der Schmerzen ist eine rasche und adäquate Analgesie entscheidend. Eine Schmerzreduktion kann häufig medikamentös herbeigeführt werden, entsprechend den Therapieschemata für chronische neuropathische Schmerzen. Die einmalige Ketamindauerinfusion über wenige Tage ist eine mögliche Therapieoption bei sonstiger Therapieresistenz. Bei chronischen, sonst unbehandelbaren Schmerzzuständen können zudem Anwendungen wie spinal chord stimulation (SCS) oder eine Spinalganglien-Stimulation, auch Dorsal Root Ganglion (DRG)-Stimulation genannt, an der Lendenwirbelsäule bei Fällen mit betroffener unterer Extremität unterstützend wirken. Ein weiteres invasives Therapieverfahren bei CRPS-bedingter Dystonie stellt die intrathekale Applikation von Baclofen dar (Rijn et al., 2009). Eine repetitive transkranielle Magnetstimulation (rTMS) des Motorcortex findet bisher nur in speziellen Zentren Anwendung und eignet sich nicht als Dauertherapie (Picarelli et al., 2010). Medikamente wie Bisphosphonate scheinen im frühen Stadium des CRPS Typ I vielversprechend, da sie Knochenschmerzen reduzieren und damit zu einer erhöhten Funktionalität der Extremität beitragen (Giusti & Bianchi, 2015). Es lassen sich auch Evidenzen für *non-steroidal anti-inflammatory drugs* (NSAIDs), Steroide und Opioide finden, jedoch nicht für Immunglobuline. Die aktuelle deutsche Leitlinie schlägt die Anwendung von Glukokortikoiden ausschließlich bei einem akuten posttraumatischentzündlichem CRPS vor (Birklein et al., 2018). Da chronische Schmerzzustände die psychische Verfassung deutlich beeinflussen und sich viele neurochemische Leitungsbahnen der Schmerz- und der Stimmungsmodulation überschneiden, haben Antidepressiva in der Vergangenheit viel Anwendung beim chronischen CRPS gefunden (Resmini et al., 2015). Die Richtlinien für das klinische Management von CRPS-Patienten sind 2018 durch die Deutsche Gesellschaft für Neurologie festgelegt worden und schlagen folgenden Algorithymus vor (Birklein et al., 2018):



Abbildung 6: Therapieschema des CRPS (nach der Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie)

Das Prinzip des Algorithmus besteht aus der kontinuierlichen Beobachtung der klinischen Symptomatik, der Schmerzentwicklung und der Funktionalität der entprechenden Extremität. Grundlage für die Ausführung dieses Therapieschemas ist die gestaffelte Anbindung an unterschiedlich spezialisierte Zentren. Als Ergänzung zu den jeweiligen nationalen Leitlinien wurden 2019 durch die *European Pain Federation task force* 17

Standards verfasst, welche eine internationale Homogenität in der klinischen Diagnostik und Therapie schaffen sollen (Goebel et al., 2019). In diesen ist vorgesehen, dass eine spezialisierte medizinische Einrichtung, beispielsweise eine Schmerzklinik, zuständig werden muss, sofern innerhalb einer zweimonatigen Behandlung keine eindeutige Schmerzreduktion und kein eindeutiger Funktionsgewinn vermerkbar wird. Komplikationen bei unzureichenden therapeutischen Maßnahmen stellen die Atrophie, der Funktionsverlust und Schwäche der betroffenen Extremität, sowie permanente trophische Veränderungen des Knochens, der Gelenke und Muskeln dar. Auch Medikamentenmissbrauch, sowie -abhängigkeit die durch chronische Schmerzsymptomatik und damit einhergehende Depressionen mit Suizidalität gehören zu den Risiken des CRPS.

1.4 Osteoimmunologie

Dass Knochenzellen nicht nur stumpf Knochensubstanz auf- und abbauen, sondern auch in enger Zusammenarbeit mit dem Immunsystem stehen, ist inzwischen bekannt und wird durch den Begriff Osteoimmunologie zusammengefasst. Wie komplex die Kommunikation der zwei Systeme wirklich ist, kann allerdings nur angenommen werden. Fest steht, dass eine Dysbalance des einen Systems negativ auf das andere wirkt und umgekehrt, da beide Systeme die gleichen Mediatoren (Cytokine und Transkriptionsfaktoren) teilen (Ginaldi & De Martinis, 2016). Im folgenden Kapitel sollen grundlegende Einflüsse des Immunsystems auf die Knochenhomöostase skizziert werden. Dass es bisher keine effektive Therapie gegen chronische Entzündungen gibt, stellt sich als äußerst problematisch dar, da ein chronischer Inflammations-Zustand unweigerlich zur Gewebsdegeneration führt. Auch Knochengewebe ist von dieser Beeinflussung betroffen, da die Knochenzellen sehr sensibel auf äußere Umstände reagieren und die Knochenhomöostase in hohem Maße von den Signalen der Entzündungsmediatoren abhängt. Organismen, in denen chronische Entzündungszustände herrschen, weisen ein geschwächtes knöchernes Skelettsystem auf. Damit steigt das Risiko für traumatische, sowie nichttraumatische Frakturen (Bernstein et al., 2000). In der Bruneck Studie von 2006 wird deutlich, dass ein minimaler Anstieg des ultrasensitiven Entzündungsmarkers C-reaktives Protein (CRP) auf über 3 mg/l, im Vergleich zu Individuen mit einem CRP < 1 mg/l, bereits eine 8-fache Erhöhung des Frakturrisikos ausmacht (Schett et al., 2006). Eine entscheidende Rolle spielen dabei vor allem proinflammatorische Zytokine wie TNF, IL-1, IL-6 und IL-17. TNF induziert die Osteoklastenbildung, IL-1 induziert die RANK-Expression, IL-6 stimuliert die RANKL-Expression, und IL-17 triggert sowohl die IL-1, als auch die IL-6 Expression, womit all diese Entzündungsmediatoren essentielle Mediatoren der Knochenresorption durch Osteoklasten darstellen (Lange et al., 2005)(Lee et al., 2006)(Wong et al., 2006)(Kotake et al., 1999). Osteoklasten gehören zur Klasse der Makrophagen, welche als Vertreter des Immunsystems unbrauchbares Gewebe oder Zellen aus dem Körper entfernen. Durch die enge Verwandtschaft passen sie ihre Funktion den Signalen des Körpers an und nehmen im Inflammationsgeschehen eine aktive Rolle ein. RANKL, das Schlüssel-Cytokin bei der Osteoklasten-Aktivierung, fördert deren Differenzierung aus Vorläuferzellen und reguliert ihre Aktivität. Dieses Cytokin kann auf der Oberfläche verschiedenster Zellen, wie zum Beispiel den immunmodulatorischen CD4+ T-Helfer Zellen, exprimiert sein, wodurch die Osteoklastogenese stimuliert wird (Miyasaka & Takatsu, 2016). Das Immunsystem nimmt vor allem durch die Gruppe der T-Lymphozyten Einfluss auf den Knochenumbau, sowohl in physiologischen, als auch in pathologischen Verhältnissen. Aktivierte T-Lymphozyten produzieren im Rahmen eines pathologischen Prozesses Cytokine, welche die Knochenresorption durch die Osteoklasten weiter antreiben (Ginaldi & De Martinis, 2016). Der im Blut befindliche Lipidmediator Sphingosin-1-Phosphat (S1P) kontrolliert die Osteoklastenmigration vom Knochenmark zum Knochengewebe. Ein gesteigerter Einfluss von inflammatorischen Cytokinen, wie beispielsweise IL-6, fördert die Expression der S1P-Rezeptoren, wodurch die Wirkung von S1P verstärkt wird und die Knochenresorption ansteigt (Tanaka et al., 2014). Hinzu kommen die Signale der Neuropeptide, wie beispielsweise Substanz P, welches jedoch nicht nur indirekt eine Rolle für den Knochenmetabolismus durch eine Verstärkung der entzündlichen Reaktion spielt, sondern auch eine direkte Wirkung auf die am Knochenmetabolismus beteiligten Zellen, und damit die Beschaffenheit des Knochens, aufweist. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass Substanz P sowohl die Proliferation von Osteoblasten, als auch von Osteoklasten verstärkt, zudem fördert es eine synoviale Hyperplasie und Hypertrophie (Li et al., 2020). Die genaue Interaktion ist noch nicht gänzlich erforscht, entzündliche Prozesse mit folglicher Interaktion zwischen dem Immunsystem, dem Nervensystem und der Knochenhomöostase scheinen insgesamt aber eher eine Abnahme der Knochenmatrix zu begünstigen. Noch wichtiger ist die Rolle der Substanz P für entzündliche Geschehen im Bereich von Gelenken, wo ebenfalls ein kataboler Effekt des Neuropeptids auf den Gelenkknorpel nachgewiesen ist (Li et al., 2020).

Weitere Überlegungen verweisen auf die Möglichkeit, dass Autoantikörper möglicherweise den Verlust an Knochensubstanz triggern, lange bevor es zu einem Entzündungsgeschehen kommt. Dies wird zur Zeit am Krankheitsbild der rheumatoiden Arthritis erforscht, bei der ein Nachweis von anticitrullinierten Protein/Peptid-Antikörpern (ACPAs) mit einem erhöhten Knochenschaden einhergeht (Kleyer & Schett, 2014).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Da sowohl die chronische Entzündung an sich, als auch ein chronisches Schmerzleiden mit einhergehender Immobilität deutliche Auswirkungen auf die Knochenhomöostase haben, sehen sich Betroffene des CRPS mit drastischen Konsequenzen für die jeweilige Extremität konfrontiert. Eine Beeinträchtigung des Bewegungsapparats durch die ständige Stresssituation des Inflammationsgeschehens ist unumstritten. Welchen Einfluss die Chronifizierung konkret auf das knöcherne Gewebe hat, ist jedoch nicht vollständig geklärt. Auf dieser Basis ergeben sich folgende Fragestellungen:

- Welche Auswirkungen hat der chronisch pathologische Zustand des CRPS auf die Mikroarchitektur des Knochens?
- 2. Wie verändert das CRPS das Zell- und Gefäßaufkommen, sowie die Knochenhomöostase insgesamt?
- 3. Sind morphologische Auffälligkeiten von Osteoblasten, Osteocyten und Osteoklasten erkennbar?
- 4. Welchen Einfluss übt das CRPS auf die Morphologie und Lebensfähigkeit von Fibroblasten aus?
- 5. Wie ist die Genexpression der Knochenzellen durch das CRPS beeinträchtigt?

Informationen zur Bearbeitung dieser Fragestellungen sollen durch die Untersuchung eines vom CRPS betroffenen, amputierten Unterarms gesammelt werden. Es wurden sowohl Knochenschnitte und –schliffe hergestellt, als auch synoviale Fibroblasten kultiviert. Da die technische Visualisierung zellulärer Vorgänge im Knochen eines lebenden Menschen sehr schwierig ist, stellt ein Einblick in das amputierte Material eine exklusive Möglichkeit dar, die Krankheitsvorgänge des chronischen Geschehens auf mikroskopischer Ebene zu untersuchen. Die heutigen Therapieansätze des CRPS sind immer noch wage, was teilweise in einer nicht endenden Krankheitsgeschichte resultiert. Eine Aufschlüsselung des pathologischen Geschehens auf Ebene der Knochenzellen, verspricht ein verbessertes Krankheitsverständnis zu ermöglichen. Die so generierten Erkenntnisse können als Grundlage für das Überdenken alter-, sowie die Findung neuer Therapieoptionen dienen.

2. Material und Methoden

2.1 Histologische Probenaufarbeitung

Als Grundlage dieser Arbeit dient das knöcherne Gewebe einer ab dem distalen Unterarm amputierten, rechten oberen Extremität einer, zu diesem Zeitpunkt, 54-jährigen weiblichen Patientin. Die Amputation erfolgte als letzte therapeutische Option eines sehr ausgeprägten, chronifizierten Zustandes des CRPS. Aufgrund eines symptomatischen Karpaltunnelsyndroms wurde an der beschriebenen Extremität im Jahr 2002 eine operative Faszienspaltung vorgenommen. Vier Monate später wurde bei nicht beherrschbaren Schmerzen und nach erfolgloser Rezidiv-Operation die Diagnose eines "Sudeck Syndroms" durch den Neurologen gestellt, welches sich anschließend über eine Dauer von fast 14 Jahren chronifizierte. Die Patientin stimmte vor der Amputation einer Forschungsfreigabe des Amputats zu.

Die Knochenproben wurden bei der Amputation steril entnommen und auf Eis gekühlt ins Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Universität Gießen geliefert, wo eine Differenzierung des Gewebes in möglichst viele verschiedene Knochenscheiben vorgenommen werden konnte. So entstanden Einzelproben von vier Gelenkstrukturen der Hand, neun knöchernen Bestandteilen der Hand und des Unterarms, sowie der Anschnitt einer synovialen Membran. Anhand einer Knochenbiopsie wurde ebenfalls knöchernes Material einer weiteren von CRPS befallenen Extremität gewonnen. Die Biopsie wurde im Rahmen eines geplanten operativen Eingriffs einer anderen CPRS-Patientin möglich, da einem solchen Vorgehen vorab zugestimmt wurde. Alle im Folgenden beschriebenen Versuche erfolgten mit der Genehmigung der Ethik-Kommission Gießen (25.06.14, AZ: 117/14).

2.1.1 Schnitt- und Schliffherstellung

Das Zersägen der Einzelproben erfolgte mit dem Exakt-Trennschleifsystem (EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland). Die so entstandenen Knochenscheiben wurden in 4% neutraler phosphatgepufferter Paraformaldehydlösung (PFA, Merck, Darmstadt, Deutschland) für 24 Stunden fixiert. Anschließend wurden die Proben insgesamt sechsmal innerhalb von zwei Tagen mit 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer (pH 7,2-7,4) gespült. Die Proben wurden gekühlt gelagert und zwischen den Spülvorgängen auf einen Rüttler gestellt. Nach Ausspülen aller Rückstände konnten die Proben in Einbettungskapseln umgelagert werden.

2.1.1.1 Paraffin-Schnitte

Zur Einbettung in Paraffin mussten die Knochenpräparate zunächst in einer 10% igen Ethylendiamintetraessigsäure-Lösung (EDTA, Merck) entkalkt und anschließend für eine Stunde unter Leitungswasser gespült werden. Dieses Vorgehen ist notwendig, um das organische Material, wie Kollagen, Zellen und Gefäße sichtbar zu machen. Die apparative Dehydration wurde von einem Paraffin-Einbettautomat (Leica Mikrosysteme, TP1050, Wetzlar, Deutschland) durch einen Wechsel zwischen Agitation und Vakuum übernommen. In der Kammer lief dabei in 4 Minuten-Intervallen der gleiche Zyklus aus einem Druck von 35 kPa, anschließender Belüftung, einer Evakuierung von – 70 kPa und wiederholter Belüftung ab. Die Proben wurden währenddessen gerührt. Die Proben befanden sich zunächst bei Raumtemperatur zwischen zwei und drei Stunden in den jeweiligen Stufen der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96%, 3x 100%). Um den Alkohol anschließend aus dem Gewebe zu entfernen, verweilten die Proben jeweils einmal für eine Stunde und zweimal für 45 Minuten in Xylol (VWR, Fontenay-sous-Bois, Frankreich). Es folgten drei Stufen bei 58 °C für je 40 Minuten in flüssigem Paraffin, um die Proben entsprechend einzubetten. Nach Aushärten der Paraffinblöcke wurden 3-4 µm dicke Schnitte mit Hilfe des Rotationsmikrotoms Leica RM 2155 (Leica Mikrosysteme) angefertigt. Diese konnten auf saubere Objektträger gezogen werden, welche anschließend über Nacht bei 37 °C getrocknet wurden.

2.1.1.2 Technovit 9100-Schliffe

Zur Herstellung von Schliffen wurden einige Knochenproben in Technovit 9100 (Kulzer, Wehrheim, Deutschland) eingebettet. Diese Technik unterstützt vor allem die Sichtbarkeit der Verteilung und Anordnung des kalziumreichen anorganischen Materials. Begonnen wurde ebenfalls mit einer Fixierung und sechsfacher Spülung der Proben gemäß der obigen Beschreibung. Die anschließende Entwässerung wurde auch hier mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (2x 70%, 80%, 96%, 4-5x 100%) vorgenommen und lief bei Raumtemperatur auf einem Rüttler ab. Als Intermedium diente hier Xylol (VWR). In Abhängigkeit der Größe verblieben die Proben zwischen zwei und vier Tagen in der jeweiligen Alkohollösung. Pro Schritt wurde drei bis viermal pro Tag für zehn Minuten ein Vakuum von -200 mbar erzeugt. Folgend der Gebrauchsinformation für Technovit 9100 wurden die dehydrierten Proben in die Präinfiltrationslösungen 1, 2 und 3 (5/5/4 Tage) und anschließend in eine Infiltrationslösung (11 Tage) gelegt. Die infiltrierten Proben wurden in vorgekühlten Einbettförmchen platziert, mit Polymerisationsgemisch (neun Volumenteile Stammlösung A + ein Volumenteil Stammlösung B, mit Komponenten) übergossen und für fünf bis zehn Minuten bei – 200 mbar im Exikator evakuiert. Die Polymerisation der von Luft abgedichteten Proben ist daraufhin für zwei Tage bei -4 °C abgelaufen. Anschließend konnten die Proben bei Rückerlangung von Raumtemperatur aus den Formen gedrückt und zurechtgesägt werden. Die Knochenproben wurden auf Plexiglas-Objektträgern fixiert und mit der Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath und Breuner weiterbearbeitet (Donath & Breuner, 1982). Getrennt wurden die Objektträger dabei mit Hilfe der Punktkontakt-Technologie des Trennschleifsystems (EXAKT) und geschliffen wurden die Proben im Mikroschleifsystem (400 CS, EXAKT).

2.1.2 Übersichtsfärbungen

2.1.2.1 Hämatoxylin-Eosin

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) dient in der Mikroskopie als Übersichtsfärbung. Zunächst mussten die Paraffinschnitte für die Färbung entparaffiniert und rehydriert werden. Dazu erfolgte eine zweifache Inkubation im Xylolbad (VWR) für jeweils fünf Minuten und eine Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) für ebenfalls jeweils fünf Minuten. Schließlich wurden die Objektträger für mindestens 30 Sekunden in destilliertes Wasser (Aqua dest) gestellt und somit abschließend für die Färbung vorbereitet.

Zur Kernfärbung wurde eine 3,5-minütige Inkubation mit Mayers Hämalaunlösung (Shandon Inc, Pittsburgh, PA, USA) durchgeführt und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült. Um die Kernfärbung zu bläuen verweilten die Objektträger zehn Minuten lang in einer Küvette unter fließendem Leitungswasser und wurden anschließend mit Aqua dest abgespült. Für die nachfolgende hellrote Bindegewebsfärbung erfolgte eine Inkubation in 1%iger Eosinlösung (Eosin G, gelblich, Merck) für 55 Sekunden. Die Lösung wurde mit destilliertem Wasser abgespült. Anschließend wurden die Objektträger für jeweils fünf Minuten in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) und zweifach in Xylol (VWR) inkubiert. Daraufhin konnten die Schnitte mit DePex (Serva, Heidelberg, Deutschland) eingedeckelt werden.

2.1.2.2 Kossa van Gieson

Da die Kossa-Färbung elementares Silber in mineralisiertem Gewebe entstehen lässt, wurde dieses Verfahren für die Knochenschliffe verwendet. Zunächst wurden die Objektträger für 2 x 30 Minuten in Monoethanolamin entplastet und anschließend für jeweils fünf Minuten in den Stationen der absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70%) inkubiert. Die Proben standen dabei stets auf einem Schüttler. Auf diesem folgte eine fünfminütige Rehydrierung in destilliertem Wasser. Die Schliffe wurden für zehn Minuten in 3% iger Silbernitratlösung (3 g Silbernitrat in 100 ml destilliertem Wasser) (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) im Dunkeln inkubiert und folgend dreimal für jeweils zwei Minuten in destilliertem Wasser gereinigt. In einer Küvette erfolgte anschließend die Inkubation in 10% iger Natriumcarbonat-Lösung (10 g Natriumcarbonat in 25 ml Formaldehyd 37 % und 100 ml Aqua dest) (Merck) für zwei Minuten, ein zehnminütiges Abspülen unter fließendem Leitungswasser und schließlich eine Inkubation in 5% iger Natriumthiosulfat-Lösung (5 g Natriumthiosulfat in 100 ml Aqua dest) (Merck), die auf die Proben pipettiert wurde und diese nach einer Inkubation von fünf Minuten fixiert hat. Um die Reaktion zu stoppen wurden die Schliffe zweimal für jeweils zwei Minuten in destilliertes Wasser getaucht. Die Anfärbung der Kerne und Mitochondrien wurde in einer Küvette bei einer Inkubationszeit von fünf Minuten mit Methylgrün (1g Methylgrün in 100 ml Aqua dest und 25 ml Ethylalkohol) (Vector/Linaris, Wertheim, Deutschland) durchgeführt. Danach folgte ein kurzes Eintauchen in Aqua dest, eine zehnminütige Reinigung in Leitungswasser und eine dreifache Reinigung für jeweils zwei Minuten in destilliertem Wasser. Es wurde weiterhin mit Weigerts Eisenhämatoxylin-Lösung (Merck) für 6 Minuten durch aufpipettieren gegengefärbt, wodurch eine blauschwarze Kernfärbung herbeigeführt wurde. Nach einer zehnminütigen Reinigung in Leitungswasser wurden mit der Pikrofuchsin-Lösung nach van Gieson (Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland) durch fünf Minuten Inkubationszeit das Muskelgewebe gelb und die Kollagenfasern des Bindegewebes rot gefärbt. Schließlich wurden die Objektträger zwei bis dreimal für wenige Sekunden in 96% igen Alkohol und dann einmalig in 100% igen Alkohol getaucht, und zweimal für fünf Minuten in Xylol (VWR) inkubiert. Eingedeckelt wurden die gefärbten Proben mit DePex (Serva).

2.1.3 Enzymhistochemie

2.1.3.1 Tartrat resistente saure Phosphatase (TRAP)

Die Schnitte wurden zu Beginn in der bereits beschriebenen Vorgehensweise entparaffiniert (siehe Kapitel 2.1.2.1) und anschließend für zehn Minuten in 0,1 M Natrium-Acetatpuffer (pH 5,2) (Merck) gespült. Die Färbung erfolgte mit einer Mischung aus einer ersten Färbelösung, bestehend aus 35 mg Naphthol-AS-TR-Phosphat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und 125 μ l N-N-Dimethylformamid (Sigma-Aldrich), sowie einer zweiten Färbelösung, zusammengesetzt aus 57,5 mg Na-Tartrat (Merck), 35 mg Echtrotsalz (Fast Red TR salt, Aldrich, Milwaukee, WI, USA) und 25 ml 0,1 M Natrium-Acetatpuffer (pH 5,2) (Merck). Die Inkubation erfolgte für eine Stunde in einer feuchten, dunklen Kammer bei 37 °C. Es wurde dreifach mit Aqua dest gespült und eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin (Shandon Inc) 1+3 in zweifach destilliertem Wasser (Bidest), Inkubationszeit 60 Sekunden, durchgeführt. Nach kurzem Spülen in Aqua dest, sowie einem Nachbläuen für zehn Minuten in Leitungswasser konnten die Schnitte mit Kaisers Glyceringelatine (Merck) eingedeckelt werden.

2.1.3.2 Alkalische Phosphatase (ALP)

Nach der Entparaffinierung der Schnitte wurden diese für 10 Minuten in 0,1 M Tris-Puffer (pH 9,4) (Trizma Base, Sigma-Aldrich) gespült. Zur Detektion des Enzyms Alkalische Phosphatase folgte die Färbung durch ein filtriertes Phosphatase-Substrat, bestehend aus dem Substrat 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat (BCIP) (KPL, Gaithersburg, MD, USA) und Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT) (KPL). Die Inkubationsdauer betrug zwei Stunden bei 37 °C in einer feuchten und abgedunkelten Kammer. Nach dreimaligem Spülen mit Aqua dest für jeweils fünf Minuten folgte die Gegenfärbung mit Kernechtrot-Aluminiumsulfat (Roth, Karlsruhe, Deutschland) bei einer Inkubationszeit von zehn Minuten. Abschließend wurden die Schnitte dreifach mit Aqua dest gespült, in der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) und Xylol (VWR) entwässert, sowie mit Eukitt (Sigma-Aldrich) eingedeckelt.

2.1.4 Immunhistochemie

2.1.4.1 Markierung des Aktin-Zytoskeletts glatter Muskelzellen (ASMA)

Für die immunchemische Färbung des *Alpha smooth muscle-actin* (ASMA) wurde die Avidin-Biotin-Methode angewandt, bei der ein Avidin-Biotin-Enzymkomplex (ABC) mit einem biotinylierten Sekundärantikörper reagiert, um die gesuchten Strukturen zu

markieren. Zunächst wurden die Paraffinschnitte durch zweifache, fünfminütige Xylolbäder (VWR) entparaffiniert und anschließend durch zehn Minuten in technischem Aceton (Sigma-Aldrich), sowie zehn Minuten in technischem Aceton gemischt mit Waschpuffer entwässert. Der Waschpuffer bestand aus gleichen Anteilen Tris-NaCl Puffer (TBS, pH 7,4) (Roth) und 0,025% Triton-X 100 (Merck). Nach zweifachen, fünfminütigen Spülvorgängen in Waschpuffer konnte die Blockierung der endogenen Peroxidase gestartet werden. Dafür wurden die Schnitte für fünf Minuten bei Raumtemperatur in einem Gemisch aus Waschpuffer und 3% H2O2 inkubiert und anschließend zweimal für jeweils fünf Minuten in reinen Waschpuffer gestellt. Nun konnte der unkonjugierte Primär-Antikörper (AK) gegen ASMA (Dako, Wiesentheid, Deutschland), gelöst in hintergrundreduzierendem Verdünnungspuffer (Dako), mit einer Verdünnung von 1:1000 über Nacht bei 4 °C auf den Schnitten inkubieren. Anschließend erfolgte ein dreifaches Spülen in Waschpuffer für jeweils fünf Minuten. Die Inkubation mit dem sekundären AK wurde für dreißig Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde ein biotinylierter Sekundär-AK Pferd anti-Maus (Vector, Burlingame, CA, USA) genutzt, welcher zuerst mit dem Faktor 1:150 in 1% Rinderserumalbumin in TBS verdünnt und schließlich mit 1:8 Teilen Humanserum gemischt wurde. Erneut wurde zweifach für fünf Minuten in Waschpuffer gespült. Zur Erzielung einer Farbreaktion wurde für dreißig Minuten bei Raumtemperatur mit einem Avidin-Biotin-Komplex/Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRP) Gemisch (Vectastain Elite ABC, Vector) inkubiert. Es folgte ein zweifaches Spülen in Waschpuffer für jeweils fünf Minuten, ein einmaliges Spülen in Aqua dest und eine fünfminütige Inkubation in Nova Red (Substrat-Kit für Peroxidase, Vector) bei Raumtemperatur. Daraufhin wurden die Schnitte mit Bidest und dreifach für fünf Minuten in Aqua dest gespült und mit Hämatoxylin (Shandon Inc) 1+3 in Bidest für 60 Sekunden gegengefärbt. Zum Nachbläuen wurde mit Aqua dest gespült, zehn Minuten in Leitungswasser inkubiert und wieder mit Aqua dest gespült, wonach jeweils fünfminütig in aufsteigender Alkoholreihe (70%, 96%, 100%) und Xylol (VWR) inkubiert wurde. Abschließend wurden die Schnitte mit DePex (Serva) eingedeckelt.

2.1.5 Fotomikroskopie

Alle histologischen Proben wurden unter einem Fotomikroskop (Axiophot-2) bei unterschiedlicher Vergrößerung (2,5-, 5-, 10-, 20-, 40-fach) betrachtet. Vereinzelte Stellen wurden dabei fotografiert. Alle Bilder wurden als TIF-Datei mit einer Auflösung von 150 Pixel/Zoll gespeichert. Zur Erstellung von Übersichtsaufnahmen wurde jeder Schnitt mit überlappenden Einzelbildern in 2,5-facher Vergrößerung abfotografiert und durch das Bildbearbeitungsprogramm Adobe Photoshop CC 2015 (Adobe Inc., San José, CA, USA) zu Gesamtbildern zusammengesetzt.

2.2 Histomorphometrie

Zur histomorphometrischen Auswertung wurde in den Übersichtsbildern der HE-Färbung die relative Knochenmasse und das Kortikalisvolumen, sowie deren Breite bestimmt. In den Bildern der TRAP-Färbung konnte wiederum die relative Anzahl von Osteoklasten, sowie mit Hilfe der ALP-Färbung die relative Anzahl der Osteoblasten festgestellt werden. Die errechneten Anteile dienten dem quantitativen Vergleich zwischen proximalen und distalen Knochenabschnitten der von CRPS befallenen Extremität. Um einen Anhaltspunkt für die anschließenden Messungen zu erlangen, musste zunächst die region of interest (ROI) in allen Bildern festgelegt werden. Mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms Adobe Photoshop konnten die ausgewählten Flächen berechnet und farblich markiert werden (siehe Abb. 7). Zur Berechnung des Trabekelund Kortikalisanteils diente die gesamte, von kortikalem Knochen eingeschlossene Fläche als Bezugsgröße und damit als ROI, ohne jedoch die Kortikalis selbst miteinzubeziehen. In Bezug auf die relative Osteoblasten- und Osteoklastenanzahl diente die spongiöse Knochenfläche der Trabekel als ROI. Dazu zählten nur Trabekel, die in keinem Kontakt zur Kortikalis standen. Als Grundlage für die Berechnungungen wurde in den HE-Schnitten die Fläche des ROI als tissue volume (TV) festgelegt und in mm² gemessen. Zur Ermittlung der relativen Knochenmasse wurde außerdem die zusammengelegte Fläche aller im ROI befindlichen Knochentrabekel als bone volume (BV) definiert. Zur Ermittlung des relativen Kortikalisanteils wurde gleichermaßen das Volumen des kortikalen Knochens als cortical volume (CV) definiert. Pro Schnitt wurden sechs Messungen der Kortikalisbreite an unterschiedlichen, gleichmäßig verteilten Stellen vorgenommen, um daraus einen Mittelwert berechnen zu können. Die gesammelten Werte wurden in das Datenverarbeitungsprogramm Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) übertragen. Weiterhin wurden die Flächenwerte der verschiedenen Knochenschnitte, sowohl für das BV, als auch für das CV miteinander vergleichbar gemacht und im Dreisatz auf das gleiche TV umgerechnet. So entstanden für jeden Schnitt neue, vergleichbare Werte, welche mit bone area (BAr), *cortical area* (CAr) und *tissue area* (TAr) bezeichnet wurden. Schließlich war es möglich, diese Flächen für jeden Schnitt miteinander ins Verhältnis zu setzen und proximale Anteile mit distalen Anteilen zu vergleichen. Durch den Quotienten von BAr/TAr, sowie CAr/TAr konnten die prozentualen Anteile des spongiösen und des kortikalen Knochen von der gesamten ROI berechnet und mithilfe von Excel graphisch aufgeführt werden. Die Mittelwerte der Kortikalisbreite wurden ebenfalls mittels Excel in einen Graphen übertragen.



Abbildung 7: Vorgehensweise der histomorphometrischen Auswertung

Beispiel einer HE-Färbung des Os metacarpus des Ringfingers (A). Dazu wurde erst die ROI ausgewählt, blau markiert und vermessen (B). Anschließend wurde die Fläche der spongiösen Knochentrabekel innerhalb der ROI ausgewertet (C).

Für die Auswertung der Osteoklasten- und Osteoblastenanteile dienten die Anteile der spongiösen Knochentrabekel als ROI, nicht jedoch die kortikalen Anteile der Knochenschnitte (siehe Abb. 8). Sowohl in der TRAP-, als auch in der ALP-Färbung wurden die einzelnen Trabekel eines Schnittes bei Photoshop manuell umfahren, um die Trabekeloberfläche (*bone surface*, BS) zu bestimmen. Zur Quantifizierung der Osteoklastenanzahl in den TRAP-Schnitten wurden die Trabekeloberflächen mit einer 100fachen Vergrößerung im Mikroskop abgefahren, um die Anzahl der aktiven Zellen zu bestimmen. Die durch die Färbung sichtbar gemachten Zellen mussten als Zeichen ihrer Aktivität in Verbindung zur Trabekeloberfläche stehen und durften nicht davon gelöst sein. Zusätzlich wurden nur Zellen gewertet, die mindestens drei Zellkerne besaßen. Die Auswertung der Osteoblastenaktivität geschah über eine Messung der anteiligen Trabekeloberfläche, welche von Zellen besetzt war, die ein ALP-positives Färbeverhalten aufwiesen. Alle ermittelten Werte wurden im Dreisatz auf eine vergleichbare Trabekeloberfläche umgerechnet, um so die prozentualen Anteile berechnen zu können und in einen Graph zu übertragen.



Abbildung 8: Auswahl der ROI

Eine beispielhafte Berechnung des relativen Osteoklastenanteils durch Bestimmung der ROI und Markierung in blau in der TRAP-Färbung des Os capitatum der Handwurzel.

2.3 Transmissions-Elektronen Mikroskopie (TEM)

Auf Basis von Ultradünnschnitten (60-80 nm) dient die Anwendung der TEM der Beurteilung der Feinstruktur des Gewebes. Vorbereitend dazu wurden mithilfe der unterschiedlichen Färbungen der histologischen Schnitte Stellen ausgesucht, an welchen ein vergleichsweise hohes Zellaufkommen zu herrschen schien; es wurde eine ca. 2 mm dicke Probe der distalen Ulna in Epon (Serva) eingebettet. Zuvor erfolgten zwei Fixationsschritte: Zu Beginn mit Yellow-Fix (2% PFA mit 2% Glutaraldehyd und 0,02% Pikrinsäure) und folgend mit 1% Osmiumtetroxidlösung (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz). Mithilfe eines Diamantmessers in einem Ultramikrotom (Ultracut, Reichert-Jung, Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) konnten daraufhin Semi-Dünnschnitte mit einer Dicke von 0,5 μm hergestellt werden, welche auf Glasobjektträger überführt und auf einer Streckplatte bei 80 °C getrocknet wurden. Es erfolgte eine Schnellfärbung auf der Heizplatte für wenige Sekunden mit 1,25% igem Toluidinblau (Waldeck, Münster, Deutschland) und mit 1% igem di-Natriumtetraborat (Merck) in Bidest. Lichtmikroskopisch konnten auf den hergestellten Semidünnschnitten vielversprechende Bereiche identifiziert werden, sodass diese ausgewählt und mit einem Diamantmesser zu Ultra-Dünnschnitten verarbeitet wurden. Die Schnitte wurden mit einer Öse auf Kupfer-Netzen platziert und im Ultrastainer (LKB Bromma, Carlsberg System, Schweden) mit Uranylacetat und Bleicitrat zur Kontrastierung gefärbt. Schließlich konnten die Schnitte im Transmissionselektronenmikroskop (LEO, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) betrachtet und mithilfe einer Kamera (CCD-Camera, TRS, Albert Tröndle, München, Deutschland) fotografiert werden.

2.4 Fibroblastenzellkultur - funktionelle Assays

Bei der operativen Amputation der von CRPS befallenen Extremität konnten jeweils drei Proben synovialer Fibroblasten von sechs verschiedenen gelenkigen Lokalisationen des Unterarms und der Hand gesichert werden. Dem Labor für experimentelle Unfallchirurgie lagen außerdem humane Fibroblasten drei gesunder Spender vor, welche im Rahmen operativer Routine-Eingriffe gewonnen werden konnten und in den vorliegenden Versuchen als Kontrolle dienten. Die Zellen wurden in -80 °C kaltem flüssigen Stickstoff in Kryo-Röhrchen mit 10% igem fetalem Kälberserum (FKS-Gold, Gibco/Life Technologies, Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland) als Nährmedium und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, ATCC, LGC Standards, Middlesex, UK) als Frostschutz aufbewahrt.

2.4.1 Kultivierung der Fibroblasten

Die Kultivierung der von den unterschiedlichen Stellen gewonnenen Zellen wurde insgesamt zweimal durchgeführt. Dafür mussten die Kryo-Röhrchen in der warmen Hand wieder aufgetaut, in ein Falcon mit jeweils 15 ml warmem Nährmedium überführt und für fünf Minuten bei 1200 n/min⁻¹ zentrifugiert werden. Der Überstand, inklusive toxischem DMSO, wurde abgegossen. Es wurden 7 ml frisches Medium hinzugefügt und die Zellsuspension wurde in Zellkulturflaschen (Greiner, Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) umgefüllt. Das Medium bestand aus *Dulbecco`s Modified Eagle Medium* (DMEM, *high glucose, GlutaMAX Supplement*) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) und enthielt zu 20% FKS-Gold (Gibco) und zu 1% Penicillin-Streptomycin (PIS) (Life Technologies) als Zusatz. Anschließend wurden die Zellflaschen in den Brutschrank gelegt, sodass bei optimalen Umgebungsbedingungen (37 °C und 6% Stickstoff) ein homogener Zellrasen auf dem Flaschenboden entstehen konnte.


Abbildung 9: Homogener Zellrasen kultivierter Fibroblasten am Beispiel einer gesunden Kontrolle

Alle zwei bis fünf Tage wurde das Wachstum der Zellen unter dem Mikroskop überprüft. Zusätzlich wurde das alte Medium durch frisches, 37 °C warmes Medium erneuert. Bei vollständiger Konfluenz wurden die Zellen gesplittet und auf drei weitere Zellkulturflaschen verteilt. Die gesunden Kontrollen, sowie die Fibroblasten der am weitesten distal gelegenen Entnahmestelle konnten bereits nach zwei Tagen gesplittet werden. Die restlichen Zellen konnten nach elf Tagen gesplittet werden. Zum Splitten müssen die Zellen passagiert werden. Dazu wurde das Medium zunächst abgegossen und der Zellrasen mit 10 ml 1% phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) (Life Technologies) gespült. Durch die Zugabe von 1 ml 0,05% - Trypsin-EDTA (Life Technologies) wurden die Zellverbände durch zunehmende Spaltung der Adhärenzproteine gelöst. Nach einer Einwirkzeit von wenigen Minuten unter regelmäßiger mikroskopischer Überprüfung wurde die Reaktion durch Zugabe von DMEM (mit 20% FKS-Gold und 1% PIS) gestoppt, woraufhin die Zellen mithilfe einer Pipette vom Flaschenboden gespült wurden. Anschließend wurde die entstandene Zellsuspension auf drei neue Zellkulturflaschen verteilt, jede neue Passage wurde auf insgesamt 7 ml Inhalt mit Medium aufgefüllt und im Brutschrank gelagert. Da einige Zellreihen schneller wuchsen als andere, wurden einige Zellen zwischenzeitlich eingefroren. Dazu wurden die Zellverbände mit Trypsin gelöst, die Reaktion mit Nährmedium gestoppt und die entstandene Zellsuspension in einem Falcon zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes konnten die Zellen in FBS Gold mit DMSO in Kryo-Röhrchen eingefroren werden. Aus jeder Zelllinie standen letztlich Fibroblasten aus dreifacher Passage zur Verfügung. Die unterschiedlichen Morphologien der Zellen konnten unter dem Mikroskop (Axiovert 10, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) beobachtet und zudem mithilfe einer Kamera (Oligochrome, TILL Photonics, Kaufbeuren, Deutschland) fotographisch festgehalten werden.

2.4.2 Aussäen der Fibroblasten

Nach ausreichender Konfluenz der dritten Passage aller Zellreihen, wurden diese unter sterilen Bedingungen in 96- (Greiner) und 48-Well-Zellkulturplatten (Corning Inc., Corning, NY, USA) ausgesät. Um die Wells mit einer bestimmten Zellzahl befüllen zu können, musste die Zelldichte im Suspensat mittels eines Casy TT (Roche Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland) festgestellt werden. Das Prinzip des Casy basiert auf elektrischen Pulsen, die durch jeden passierenden Partikel in der Messkapillare erzeugt und als "Count" gemessen werden. Außerdem kann das Casy auf Basis von Zellmembran-Veränderungen tote Zellen erkennen. Aus der daraus folgenden Angabe in viable/ml konnte das Volumen der zu untersuchenden Zellsuspension errechnet werden, um von allen Zellreihen gleiche Mengen vitaler Zellen miteinander vergleichen zu können. Da nur interne Vergleiche innerhalb eines Spenders im Vergleich zu gesunden Kontrollen vorgenommen werden konnten, wurden parallele Zellkulturen für den Test verwendet. In die Wells der 96-Well-Zellkulturplatte wurden jeweils 4x10.000, 4x15.000 und 4x20.000 Zellen jeder Zellreihe in Nährmedium ausgesät. Bei ausreichender Zellmenge wurden teilweise zusätzlich 4x15.000 Zellen in einer 48-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Die gleichmäßige Verteilung wurde unter dem Mikroskop sichergestellt. Schließlich wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank inkubiert.

2.4.3 Funktioneller Vitalitätsassay (MTT-Test)

Das Prinzip dieses funktionellen Assays beruht auf dem Nachweis einer Farbstoffreduktion, welche durch die Enzyme vitaler und stoffwechselaktiver Zellen umgesetzt wird. Dabei wird gelbes, wasserlösliches 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolliumbromid (MTT) in violettes, wasserunlösliches Formazan umgewandelt. Die Farbreaktion liefert damit Aufschluss über die Stoffwechselaktivität der Zellen und es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen der Farbintensität des Formazans und der Anzahl vital aktiver Zellen. Zur Durchführung des Tests wurde die MTT-Lösung (5 mg/ml Thiazolylblau (Sigma-Aldrich) in PBS) im Verhältnis 1:10 in jedes Well mit Zellkulturmedium pipettiert. Es wurde unter sterilen Verhältnissen und im abgedunkelten Raum gearbeitet. Es folgte eine dreistündige Inkubation bei 37 °C. Das Medium wurde vorsichtig abgesaugt und anschließend das gleiche Volumen an Lysispuffer (0,04N HCL in 2-Propanol) hinzugefügt. Die Wells wurden für zehn Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Durch Abschaben der Zellen mithilfe einer Pipette, konnte die Zellsuspension in kleine Reaktionsgefäße überführt und für fünf Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute (*revolutions per minute*, rpm) zentrifugiert werden. Aus dem Überstand konnten schließlich in dreifacher Bestimmung je 200 μl auf eine 96-Wellplatte pipettiert werden. Hinzu kam eine dreifache Blank-Kontrolle aus Lysispuffer. Es folgte die kolorimetrische Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 570 nm/630 nm.

2.4.4 IL-6-Assay

Bei diesem Immunoassay kann über Enzym-gekoppelte Reaktionsteilnehmer die Quantität des humanen Zytokins Interleukin (IL)-6 gemessen werden. Die Untersuchung des Überstandes der Fibroblastenzellkulturen im Nährmedium ermöglichte einen Einblick in die IL-6 Produktion an den verschiedenen Entnahmestellen. Im sogenannten Sandwich-Verfahren wird eine Mikrotiterplatte mit einem an IL-6 bindenden Antikörper (AK) beschichtet und die zu untersuchende Flüssigkeit wird hinzugegeben, sodass im ersten Reaktionsschritt freies IL-6 an den AK bindet und ein Komplex daraus entsteht. Im zweiten Reaktionsschritt bindet ein sekundärer Antikörper an den gesamten Komplex, welcher zusätzlich mit einem Enzym markiert ist, sodass durch Messung der Enzymaktivität Rückschlüsse auf das Vorkommen von IL-6 gezogen werden können.

Zu Beginn des Tests wurde der gesuchte AK (*capture antibody, mouse anti-human IL-6*) (DuoSet ELISA Development Systems, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) mit einer Konzentration von 1:180 in 1% igem PBS gelöst und je 100 μl in die Wells einer 96-Wellplatte pipettiert. Die versiegelte Platte inkubierte über Nacht bei Raumtemperatur. Am nächsten Tag waren die AK fest an den Boden der Wells gebunden, sodass der Überstand verworfen werden konnte. Unter Versiegelung wurde nochmals für eine Stunde mit 300 μl Verdünnungspuffer (Kit-Komponente) pro Well bei Raumtemperatur inkubiert, bevor jeweils 100 μl des verdünnten Überstandes der Fibroblastenzellkulturen zur zweistündigen Inkubation hinzugegeben wurde. Die Proben wurden sowohl im Verhältnis 1:1 verdünnt, als auch im Verhältnis 1:9. Zur späteren

Auswertung wurden zusätzlich sieben Standards in absteigenden Konzentrationen zwischen 600 und 9,4 pg/ml mit inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer konnte im zweiten Reaktionsschritt jeweils 100 μl des sekundären, biotinylierten AK (detection antibody, goat anti-human IL-6) in einem Verhältnis von 1:180 mit dem Verdünnungspuffer für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubieren, sodass der Sandwich-Komplex entstehen konnte. Im Anschluss an erneutes, dreimaliges Spülen mit Waschpuffer wurde die Wellplatte nach Zugabe von 100 μl Streptavidin-HRP pro Well für 20 Minuten bei Raumtemperatur in einem abgedunkelten Bereich inkubiert. Die Wells wurden wieder dreifach gewaschen und zur Überprüfung der Enzymreaktion mit jeweils 100 µl einer mit Peroxidase reaktiven Lösung (substrate solution) beimpft. In Abhängigkeit zum Vorhandensein von humanem IL-6 in den Wells entstand eine leicht bläuliche Farbreaktion. Nach zwanzigminütiger Inkubation bei Raumtemperatur und in einer versiegelten Platte, wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 50 μl Stopplösung (Kit-Komponente) abgebrochen und das Ergebnis bei 450 nm gemessen. Anhand einer durch die sieben mitbearbeiteten Standards erstellten Standardkurve konnte die Aussagekraft der Ergebnisse überprüft werden.

2.4.5 Nicht-parametrische Tests

Die gesammelten Ergebnisse des MTT- und des Immunoassays wurden aufgrund der geringen Stichprobengröße durch nicht-parametrische Tests mithilfe der Software IBM SPSS Statistics (Version 20) ausgewertet. Der U-Test von Mann und Whitney (Wilcoxon-Rangsummen-Test) dient der Erkennung signifikanter Unterschiede zwischen den Medianen zweier unabhängiger Stichproben X und Y. Dazu werden alle Stichprobenwerte n_1 (Umfang von X) und n_2 (Umfang von Y) in eine gemeinsame Rangfolge gebracht und die Summe der Rangzahlen (R_1 und R_2) berechnet. Schließlich ist das Signifikanzniveau α der U-Werte entscheidend:

$$U_1 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_1 \cdot (n_1 + 1)}{2} - R_1$$
$$U_2 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_2 \cdot (n_2 + 1)}{2} - R_2$$

Im vorliegenden Fall bezeichneten die Stichproben X und Y jeweils eine Entnahmestelle an der von CRPS befallenen Extremität und die Stichprobenwerte n_1 und n_2 die jeweiligen Ergebnisse der Assays. Es lagen jeweils sechs Vitalitätsbestimmungen der Fibroblasten einer Entnahmestelle vor. Zusätzlich wurde eine "Varianzanalyse" zur Überprüfung der Abweichungen aller Stichproben (H-Test von Kruskal-Wallis) durchgeführt. Somit konnte festgestellt werden, ob alle voneinander unabhängigen Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen oder signifikante Unterschiede bestehen. Untersucht wurden die Ergebnisse der Fibroblasten der von CRPS befallenen Extremität, im übergeordneten Vergleich mit allen Werten der gesunden Kontrollen. Außerdem wurden die Fibroblastenzellkulturen der verschiedenen Entnahmestellen der von CRPS befallenen Extremität verglichen, um Tendenzen der proximalen oder distalen Anteile zu erkennen. Die Signifikanzniveaus wurden in den graphischen Darstellungen mit Sternen markiert und unterscheiden sich wie folgt; $p \le 0.05$ gilt mit einem Stern als statistisch signifikant, $p \le 0.01$ mit zwei Sternen als hochsignifikant und $p \le 0.001$ mit drei Sternen als höchst signifikant.

2.5 Molekularbiologische Untersuchungen

Die Genexpression spezifischer Mediatoren des Knochenstoffwechsels, des Inflammationsgeschehens, sowie des Nervensystems kann mithilfe einer Quantifizierung von cDNA, welche durch eine Polymerase-Kettenreaktion vervielfältigt wird, nachgewiesen werden. Dazu wurde zum einen aus sieben verschiedenen knöchernen Anteilen des Amputats der von CRPS betroffenen Extremität RNA gewonnen. Zum anderen war die RNA aus einer Knochenbiopsie einer weiteren, von CPRS befallenen Extremität einer vergleichbaren Patientin als Kontrolle gedacht und wurde anfangs in die Versuche mit einbezogen.

2.5.1 RNA-Isolierung

Die Isolierung der RNA aus den Knochenproben wurde mittels RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) vorgenommen. Vorbereitend wurden die Proben mit einem Porzellan Mörser gemahlen und dabei ständig durch flüssigen Stickstoff gekühlt. Anschließend wurden die Zellen lysiert, damit RNA frei werden konnte. Dazu wurde 1 ml Quiazol pro 100 mg Gewebe hinzugegeben und mithilfe einer Schwingmühle (1 Kugel, 6 Minuten, Frequenz 30/s) homogenisiert. Es folgte eine Inkubation für fünf Minuten bei Raumtemperatur. Das flüssige Homogenat konnte anschließend in ein Reaktionsgefäß überführt werden. Für die Extraktion der RNA wurden pro 1 ml Quiazol 200 μ l Chloroform (Chloroform 99%, Sigma-Aldrich) hinzugegeben, das geschlossene Reaktionsgefäß für ungefähr 15 Sekunden stark geschüttelt und für zwei bis drei Minuten inkubiert. Durch 15-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm in einer vorgekühlten Zentrifuge (4°C) entstand eine obere wässrige Phase, die RNA enthält. Diese musste vorsichtig abpipettiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt werden, ohne dabei mit der DNA-enthaltenden Interphase kontaminiert zu werden. Das gleiche Volumen an 70% igem Ethanol wurde unter die RNA-haltige wässrige Phase gemischt und maximal 700 μ l der Probe wurde auf ein RNeasy Mini Spin Column aufgetragen. Es folgten einige Waschschritte nach Protokoll des Kits. Schließlich wurden die Waschpuffer abzentrifugiert, sodass die reine RNA vorlag. Diese wurde mit 30 μ l RNase-freiem Wasser eluiert und lag nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur gelöst vor. Nach einminütiger Zentrifugation bei 8000 rpm und Raumtemperatur konnte die reine RNA zur Lagerung bei -80 °C eingefroren werden.

Zur Bestimmung des RNA-Gehalts wurden mit der in RNase-freiem Wasser gelösten RNA, Messungen mit dem Nano Drop (Peqlab, Erlangen, Deutschland) durchgeführt. Nach Messung der optischen Dichte von 1 μ l RNase-freiem Wasser bei 260 und 280 nm als Referenz, wurde jeweils 1 μ l der Proben aufgetragen und das Elutionsvolumen [μ l], die Konzentration [ng/ μ l], sowie das Verhältnis der Messungen bei unterschiedlichen Wellenlängen [A₂₆₀/A₂₈₀] bestimmt. Die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm lieferte Aufschluss über die RNA-Konzentration, welche anhand des Lambert-Beer`schen Gesetztes berechnet wurde. Die Reinheit der Proben wurde mithilfe des Quotienten der Absorptionswerte bei 260 nm und dem Absorptionsmaximum bei 280 nm ermittelt. Bei dieser Messung zeigen Werte von 1,8 bis 2,2 [A₂₆₀/A₂₈₀] einen ausreichenden Reinheitsgrad für eine anschließende cDNA-Synthese an. Die Werte aller Proben wurden innerhalb dieses Intervalls gemessen.

Zur Überprüfung der RNA-Integrität wurde eine automatisierte Elektrophorese mithilfe des Agilent 2100 Bioanalyzer Systems (Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland) vorgenommen. Die standardisierte Analyse wurde jeweils mit 1 μ l RNA nach Angaben des Sets durchgeführt, Agilent lieferte als Ergebnis eine RNA Integritäts-Nummer (RIN) pro Probe. In diesem definierten numerischen System kann die RIN einen Wert zwischen 1 und 10 betragen, wobei 10 die bestmögliche Qualität darstellt.

2.5.2 cDNA-Synthese

Zur Umschreibung der isolierten RNA in *complementary* DNA (cDNA), wurde eine Reverse Transkription mithilfe des QuantiTect *Reverse Transcription Kit* (Qiagen) durchgeführt. Es wurde jeweils ein Ansatz mit und ohne das Enzym reverse Transkriptase durchgeführt (RT-plus / RT-minus), sodass überprüft werden konnte, ob die genomische DNA (gDNA) vollständig eliminiert wurde. Zunächst wurden alle Komponenten bei Raumtemperatur aufgetaut. Nur die Quantiscript RT wurde bei -20 °C belassen. Nach Kit-Anleitung wurden für den RT-plus Mix 7,7 µl RT Primer Mix, 30,8 µl Quantiscript RT Puffer und 7,7 µl Quantiscript RT angesetzt. Der RT-minus Mix setzte sich aus 3,85 µl RT Primer Mix und 15,4 µl Quantiscript RT Puffer zusammen. Statt der RT wurden 3,85 µl RNase-freies Wasser hinzugegeben. Anschließend wurden die Proben vorbereitet, indem 3 µl gDNA Wipeout Puffer aus dem Kit zu 0,75 µg isolierter RNA hinzugegeben und mit RNase-freiem Wasser zu einem Endvolumen von 21 µl aufgefüllt wurden. Um gDNA zu eliminieren wurden diese Mischungen kurz mit der Pipette gemischt, anzentrifugiert und für fünf Minuten bei 42 °C im Thermocycler (TC 3000 Techne, Bibby Scientific, Cole-Parmer, Staffordshire, UK) inkubiert. Anschließend erfolgte die sofortige Lagerung auf Eis. In jeweils neuen Reaktionsgefäßen wurden zu 14 µl der RNA-Mischung 6 µl RT-plus Mix hinzugegeben. Außerdem wurden 3 µl RT-minus Mix mit 7 µl der RNA-Mischung als Kontrolle vermischt. Darauf folgte eine erneute Inkubation bei 42 °C für 30 Minuten, in denen die Umschreibung von RNA in DNA durch die Reverse Transkriptase katalysiert wurde. Durch ein Erhitzen auf 95 °C für drei Minuten wurden die Enzyme inaktiviert. Nicht sofort verwendete cDNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

2.5.3 Etablierung der *realtime* Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Primer der Zielgene des Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und IL-6 als Signalstoffe des Immunsystems, des SOST-Gens für Sklerostin als Osteoneogenese-Marker, des muskarinischen Rezeptors Typ 2 (M2-R) als Marker des cholinergen Systems, des Tachykinin 1 Rezeptors (TACR1), welcher mitunter den Substanz P Rezeptor als Marker der Schmerzwahrnehmung mit einschließt und des beta-Mikroglobulin (B2M) als Referenz-Gen, mussten zunächst Standards für die Etablierung der *realtime* PCR hergestellt werden. Für die Primer der Zielgene für Cathepsin K (CtsK) und ALP, als Knochenhomöostase-Marker, sowie der *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) als Nervenwachstumsfaktor lagen bereits PCR-Protokolle vor. Als Überprüfung des PCR-Produkts wurde zunächst eine qualitative PCR mithilfe des AmpliTaq Gold Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) und cDNA aus gesunden, humanen Knochenproben durchgeführt. Zur Untersuchung von TNF- α , Sklerostin und des M2-Rezeptors wurde ein Mastermix aus 13,75 µl PCR Puffer II (10x), 11 µl MgCl₂ (25 mM), 3,44 µl Desoxyribonukleosidtriphospaten (dNTPs) (10 mM), 0,69 µl AmpliTaq Gold Polymerase und 100 µl Aqua ad injectabilia hergestellt. Jeweils 23,4 µl des Mastermix wurden mit 1 µl cDNA, sowie 0,625 µl Primer (*forward* und *reverse*, 20 µM) versetzt. Im Fall der Primer für TACR1 und IL-6 wurden jeweils 1 µl cDNA und 0,625 µl Primer (*forward* und *reverse*, 20 µM) mit einem Mastermix aus 2,5 µl PCR Puffer II (10x), 2 µl MgCl₂ (25 mM), 0,625 µl dNTPs (10 mM), 0,125 µl AmpliTaq Gold Polymerase und 25 µl Aqua ad injectabilia vermischt. Die PCR wurde mit 12 Minuten bei 95 °C gestartet, anschließend folgten 40 Zyklen aus jeweils zehn Sekunden bei 95 °C, 60 Sekunden bei der *Annealing* Temperatur, 60 Sekunden bei 72 °C und ein Zyklus für sieben Minuten bei 72 °C, bis sich das Gerät schließlich auf 4 °C abkühlte.

Humane Primer	Sequenz (5'-3')	Produktlänge [bp]	Genbank Zugangsnummer
IL-6	cag aca gcc act cac ctc ttc gcc cag tgg aca ggt ttc tg	579	NM_000600
M2-R	agg caa ctg gag cga aac c gtc act gct ggg cat gtt g	985	NM_001006630.1
SOST	ggt aca cac agc ctt ccg tg cgg tcc cga agt cct tga gc	515	NM_025237.2
TACR1	ttc tgg tga acc tgg cct tc ttt cca gcc cct cat agt cg	798	NM_015727.2
TNF	gag cac tga aag cat gat ccg tga tgg cag aga gga ggt tg	518	NM_000594.3

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Primersequenzen zur Etablierung der realtime PCR

IL-6 = *Interleukin 6, M2-R* = *muskarinischer Typ 2 Rezeptor, SOST* = *Sklerostin, TACR1* = *Tachykinin 1 Rezeptor, TNF* = *Tumornekrosefaktor*

Zur Überprüfung der Spezifität wurden die Produkte der RT-PCR gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde mit 0,2 g Agarose (Roth) in 20 ml Tris Acetat EDTA (TAE) Puffer hergestellt. Der Puffer war eine Lösung aus 20 g Trisaminomethan, 245 g Tris-Base (Sigma-Aldrich), 57,1 ml Essigsäure (Merck), 100 ml 0,5 M EDTA (Invitrogen) und Bidest. Anschließend wurden 4 μ l der PCR-Produkte mit 1 μ l Ladepuffer (5Prime, Hamburg, Deutschland) gemischt und in die Geltaschen geladen. Nach Anlage einer

Spannung zwischen 80 mV und 120 mV wurde die sichtbare Auftrennung der DNA-Fragmente abgewartet. Durch Anfärben (SYBRgreen, Sigma-Aldrich) und mithilfe eines standardisierten DNA-Markers (100 bp, DNA-Ladder, Invitrogen) konnte unter UV-Licht kontrolliert werden, ob die Produktgröße den normalen Basenpaarlängen entsprach. Die Negativkontrolle (RT-) lieferte zusätzlich Aufschluss über die angestrebte Reinheit der Proben. Einige PCR-Produkte wurden daraufhin für die anschließenden Versuche aufgereinigt. Im Fall von TNF- α und SOST geschah dies mithilfe des QIAquick PCR-Purification-Kit (Qiagen). Damit von TACR1 und M2-R garantiert reine PCR-Produkte vorhanden waren, wurden die DNA Fragmente aus dem Gel ausgeschnitten und mithilfe des PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen) nach Anleitung des Herstellers gereinigt. Im Lightcycler (Roche) wurde mit dem SYBR Green Reagenz (Roche und Quantifast) eine Etablierung der realtime RT-PCR über Standardreihen durchgeführt. Da zunächst nicht genügend cDNA für die Durchführung einer realtime RT-PCR vorlag, wurden PCR-Produkte der cDNA als Template genutzt. Diese wurden mithilfe einer nested PCR gewonnen, bei welcher die Amplifikation eines spezifischen Produkts ohne das Auftreten unerwünschter Nebenprodukte abläuft. Dabei werden nach Bindung von Oligonukleotiden außerhalb des gewünschten Bereichs Prä-Fragmente amplifiziert, sodass im nächsten Schritt durch die Bindung von Oligonukleotiden innerhalb des gewünschten Bereichs an zwei cDNA-Doppelsträngen das spezifische Produkt ampflifiziert werden kann (siehe Abb. 10).



Abbildung 10: Ablauf der nested PCR

Gezeigt sind zwei aufeinanderfolgende Amplifikationen zur Vervielfältigung des gewünschten PCR-Fragments innerhalb der senkrechten Linien.

Um jeweils fünf Verdünnungsstufen pro *Template* herzustellen, wurden diese im Verhältnis 1:10 mit H₂O verdünnt. Die nun vorliegenden Mischungen wurden wiederum im Verhältnis 1:10 verdünnt, bis eine Verdünnung von 1:10000 erreicht wurde. Als Negativkontrolle wurde reines H₂O eingesetzt. Durch Zugabe von Mastermix, Primer und Aqua dest zum *Template* wurde in Doppelbestimmung jeder Verdünnungsstufe eine *realtime* PCR im Lightcycler vorgenommen und PCR-Protokolle erstellt (siehe Tab. 2). Zum einen wurde die Schmelzkurve genutzt, um zu eruieren ob andere PCR-Produkte ampflifiziert wurden. Zum anderen konnte die Effizienz der PCR anhand der CP (*crossing point*) -Werte der Verdünnungsstufen abgelesen werden. Abschließend kühlt das Gerät auf 4°C ab.

Humane Primer	PCR-Protokoll	Mastermix	Menge Primer (20µM)	Menge Aqua [µl]
ALP	10` 95°C <u>40x:</u> 5`` 95 °C 5`` 58 °C 5`` 72 °C	2 μl, 5x-Mastermix, Roche	0,4	3,6
BDNF	5` 95°C <u>40x:</u> 10`` 95 °C 30`` 60 °C	5 μl, 2x-Mastermix, Quantifast	0,2	0,8
B2M	10` 95°C <u>40x:</u> 5`` 95 °C 5`` 59 °C 5`` 72 °C	2 μl, 5x-Mastermix, Roche	0,2	3,8
CtsK	10` 95°C <u>40x:</u> 5`` 95 °C 5`` 60 °C 5`` 72 °C	2 μl, 5x-Mastermix, Roche	0,2	3,8
IL-6	5` 95°C <u>40x:</u> 10`` 95 °C 30`` 60 °C	5 μl, 2x-Mastermix, Quantifast	0,2	0,8
M2-R	10` 95°C <u>40x:</u> 5`` 95 °C 5`` 60 °C 5`` 72 °C	2 μl, 5x-Mastermix, Roche	0,2	5,8
SOST	5` 95°C <u>40x:</u> 10`` 95 °C 30`` 60 °C	5 μl, 2x-Mastermix, Quantifast	0,1	0,9
TACR1	5` 95°C <u>40x:</u> 10`` 95 °C 30`` 60 °C	5 μl, 2x-Mastermix, Quantifast	0,2	1,8

TNF	5` 95°C <u>40x:</u> 10`` 95 °C 30`` 60 °C	5 μl, 2x-Mastermix, Quantifast	0,2	0,8
-----	--	-----------------------------------	-----	-----

Tabelle 2: Auflistung der PCR-Protokolle

ALP = Alkalische Phosphatase, BDNF = Brain-Derived Neurotrophic Factor, B2M = Beta-Mikroglobulin, CtsK = Cathepsin K, IL-6 = Interleukin 6, M2-R = muskanrinischer Typ 2 Rezeptor, SOST = Sklerostin, TACR1 = Tachykinin 1 Rezeptor, TNF = Tumornekrosefaktor

2.5.8 Durchführung der realtime PCR

Die *realtime* PCR wurde für jeden Primer mit der extrahierten cDNA durchgeführt. Dies erfolgte jeweils in doppelter Kontrolle mit cDNA aus dem RT-plus Mix. Als Negativkontrolle diente reines Wasser. Die *realtime* PCR wurde nach dem PCR-Protokoll des jeweiligen Primers (siehe Tab. 2) mit einer Verdünnung der cDNA von 1:6 und einer cDNA-Menge von 4 µl (Ausnahme: TACR1, cDNA-Menge 3 µl) durchgeführt. Für den Primer von Cathepsin K (CtsK) wurde beispielsweise pro Probe 2 µl eines 5x-Mastermix von Roche mit 0,2 µl des Primers und 3,8 µl Aqua dest gemischt und die PCR mit einer Denaturierung für zehn Minuten bei 95 °C, sowie anschließend 40 Zyklen mit jeweils fünf Sekunden bei 95 °C, bei einer *Annealing* Temperatur von 60 °C und 72 °C durchgeführt. Nachfolgend sind die verwendeten Primer mit ihren spezifischen Basenpaaren und Genbank Zugangsnummern aufgelistet:

Humane Primer	Sequenz (5'-3')	Produktlänge [bp]	Genbank Zugangsnummer
ALP	acc gag ata caa gca ctc cc tcc tgt tca gct cgt act gc	125	NM_000478
BDNF	cta cga gac caa gtg caa tcc gta cga ctg ggt agt tcg gc	100	NM_001143812.1
B2M	tct ctc ttt ctg gcc tgg ag caa ctt caa tgt cgg atg ga	135	NM_004048.2
CtsK	gcg ata atc tga acc atg cg ttg ttt ccc cag ttt tct ccc	103	NM_000396.3
IL-6	atg agg aga ctt gcc tgg tga a gct ctg gct tgt tcc tca cta	106	NM_000600
M2-R	taa agt caa ccg cca cct cc aca cac cac agg tcc caa ag	145	NM_001006630.1
SOST	gga gct gga gaa caa caa gac cca tcg gtc acg tag cgg	132	NM_025237.2

TACR1	ggc cag agc atc cga aca ag ata gcc aat cac cag cag gg	92	NM_015727.2
TNF	cca ggg acc tct ctc taa tca gc gct tgt cac tcg ggg ttc g	72	NM_000594.3

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Primersequenzen zur Durchführung der realtime PCR

ALP = Alkalische Phosphatase, BDNF = Brain-Derived Neurotrophic Factor, B2M = Beta-Mikroglobulin, CtsK = Cathepsin K, IL-6 = Interleukin 6, M2-R = muskanrinischer Typ 2 Rezeptor, SOST = Sklerostin, TACR1 = Tachykinin 1 Rezeptor, TNF = Tumornekrosefaktor.

Es folgten Analysen der Schmelzkurven, bei welchen die spezifischen CP-Werte als Parameter für die Template Menge ermittelt werden konnten. Im Vergleich mit den CP-Werten des Referenz-Gens B2M konnten die $-\Delta$ CP-Werte (- (CP_{Zielgen} – CP_{Referenzgen})) der einzelnen Proben ermittelt werden, welche als Grundlage für die graphische Darstellung dienten.

3. Ergebnisse

3.1 Histologie

Um einen besseren Überblick über die Knochenstruktur, die metabolischen Prozesse und die Versorgung des Knochens zu erlangen, wurden sowohl histologische, enzymhistochemische und immunhistochemische Färbungen der Knochenschnitte des CRPS-Amputats durchgeführt und ausgewertet. Alle Ergebnisse zusammengefasst ergeben einen Einblick in die pathologischen Prozesse, die während der Chronifizierung des CRPS im Gewebe stattgefunden haben. Bereits bei der makroskopischen Betrachtung der Knochenschnitte fiel eine reduzierte Knochenmasse und schwammige Gewebekonsistenz auf.

3.1.1 Hämatoxylin-Eosin

Bei dieser Übersichtsfärbung wurden basophile Strukturen, wie Zellkerne, durch das Hämalaun blau und acidophile Strukturen, wie Kollagen, durch das Eosin rot gefärbt. In den mikroskopischen Bildern der HE-Färbung ist auffällig, dass die Knochenquerschnitte verhältnismäßig leer erscheinen. Sowohl Spongiosa als auch Substantia compacta sind deutlich reduziert vorhanden. Die rarefizierten Knochentrabekel und die Kortikalis sind wenig vernetzt und teilweise sehr schmal. Insgesamt ergibt sich ein instabiles Gesamtbild mit einer gestörten Knochenmikroarchitektur, sowohl proximal und direkt am Ursprungsort des Schmerzsyndroms (Abb. 11), als auch in den distalen Abschnitten der Extremität (Abb. 12). Es lassen sich keine tendenziellen Unterschiede von proximal nach distal erkennen.



Abbildung 11: HE-Färbungen der proximalen Extremität Anschnitte von (A) Ulna distal, (B) Radius distal, (C) Os capitatum und (D, E) Metacarpus proximal.



Abbildung 12: HE-Färbungen der distalen Extremität Anschnitte von (A, B) Phalanx proximal, (C) Phalanx medial und (D) Phalanx distal.

Das Übersichtsbild der Gelenkstruktur eines Fingers (Abb. 13) bestätigt das Bild von rarefizierter Knochensubstanz. Erkennbare knorpelige Anteile des Gelenks erscheinen mikroskopisch unauffällig.



Abbildung 13: HE-Färbung des Articulatio interphalangealis distalis

Zwischen den beiden, mit Pfeilen (\rightarrow) markierten knorpeligen Gelenkflächen ist der Gelenkspalt erkennbar (eingerahmter Bereich).

3.1.2 Kossa van Gieson

Bei der Kossa van Gieson Färbung werden Kalziumionen sichtbar gemacht. Mineralisierter Knochen erscheint somit schwarz. Zur weiteren Orientierung wird Muskelgewebe gelb, die Kollagenfasern des Bindegewebes rot und die Zellkerne grün angefärbt. Die Übersichtsbilder dienen vor allem der genaueren Betrachtung der Knochenstruktur, besonders der Kortikalis. Da das knöcherne Gebilde insgesamt instabil wirkt, verstärkt dies den Eindruck, dass der Anteil von mineralisiertem Gewebe stark verringert ist. Die Substantia compacta der Kortikalis fällt durch Diskontinuität und schwankende Ausprägung in ihrer Breite auf. Sie ist auffallend dünn, teilweise scheint sie gänzlich zu fehlen. In allen Schnitten sind die Knochentrabekel sehr dünn. Ähnlich einem osteoporotischen Erscheinungsbild fehlen Verbindungen und Verzweigungen der Trabekel.



Abbildung 14: Kossa van Gieson Färbung

(A) Ulna, (B) Radius, (C) Phalanx proximal und (D) Phalanx distal.

3.1.3 Tartrat resistente saure Phosphatase (TRAP)

Bei der Anfärbung der Tartrat-resistenten sauren Phosphatase wird die Zelllinie der Monozyten, also ein- und mehrkerninge Makrophagen, sichtbar gemacht. Darunter auch die Gewebsmakrophagen des Knochens, die Osteoklasten, welche als einzige monozytäre Zellen direkt am Knochentrabekel lokalisiert sind. Allerdings können nur wenige der angefärbten Zellen in den Knochenschnitten als Osteoklasten gewertet werden, da diese häufig von den Trabekeln gelöst vorkommen oder aber weniger als drei gefärbte Kerne besitzen, welche beide als wichtige Kriterien zur Identifikation der Osteoklasten verwendet wurden. Das Osteoklastenaufkommen erscheint in den vorliegenden Proben vermindert zu sein, da teilweise kaum Osteoklasten an den Knochentrabekeln zu finden sind. Das Zellaufkommen an der Kortikalis erscheint größer als an den Trabekeln.



C

Abbildung 15: TRAP-Färbung

Osteoklasten (\rightarrow) am Endost der Kortikalis (**KO**) und an Knochentrabekeln (**TB**) bei Phalanx medial (A). Phalanx proximal (B, C) mit Osteoklasten (\rightarrow) am Periost der Kortikalis (**KO**), sowie eine Nahaufnahme einzelner Zellen mit ruffled border (**RB**) und Howship-Lakune (**HL**).

3.1.4 Alkalische Phosphatase (ALP)

Das Enzym alkalische Phosphatase befindet sich in der Plasmamembran der Matrixvesikel, welche von den Osteoblasten freigesetzt werden, um Hydroxylapatit im Knochen einbauen zu können. Somit ist die alkalische Phosphatase ein Marker für den Aufbau von neuer mineralisierter Knochensubstanz. Nur Osteoblasten die aktiv an der Knochensynthese teilnehmen, setzen alkalische Phosphatase frei. Diese Zellen erscheinen in der Färbung dunkelblau. In den vorliegenden Knochenschnitten treten zwar blau gefärbte Bereiche auf, welche allerdings nicht zwingend Hinweise auf Zellfärbungen geben, da die Vesikel auch frei im Gewebe vorkommen können. Insgesamt ist wenig alkalische Phosphatase angefärbt worden, es scheint nur wenig Neuaufbau von Knochengewebe zu bestehen. Die Zahl der erkennbaren aktiven Zellen ist gering, nur wenige Trabekel sind von angefärbten Osteoblasten besetzt.



Abbildung 16: ALP-Färbung

Osteoblasten (\rightarrow) an den Knochentrabekeln (**TB**), sowie am Endost der Kortikalis (**KO**) von Metacarpus proximal (A, B), Phalanx medial (C) und Ulna distal (D).

3.1.5 Markierung des Aktin-Zytoskeletts glatter Muskelzellen (ASMA)

Bei dieser Färbemethode wird die Protein-Struktur glatter Muskelzellen durch die Bildung von Antigen-Antikörper-Komplexen dargestellt, welche im Falle der Knochenschnitte vor allem in den Gefäßen vorkommen. Die Verteilung der Gefäße erscheint je nach Anschnitt sehr unterschiedlich; im Anschnitt der Ulna sind beispielsweise sehr viele kleine Gefäße erkennbar. Im Radius ist ein großes versorgendes Gefäß mit angeschnitten (Abb. 17).



Abbildung 17: ASMA-Färbung

Großes versorgendes Gefäß im Schnitt des Radius (A), viele kleinere Gefäße zwischen den Knochentrabekeln im Schnitt der Ulna (B).

Alle anderen Schnitte erscheinen als nur sehr schwach durchblutet. Nur wenige Strukturen sind überhaupt angefärbt. Vergleicht man die Bilder gleicher Vergrößerung der Synovialmembran und der Ulna, so fällt auf, dass wenige glatte Muskelzellen in den Wänden der knochenversorgenden Gefäße vorhanden sind und diese dadurch ausgedünnt wirken, wohingegen die Blutgefäße der Synovia hypertroph wirken.



A

Abbildung 18: ASMA-Färbung

Anschnitt der Membrana synovialis (A) mit starken Versorgungsgefäßen, sowie der Ulna (B) mit nur schwach erkennbaren Gefäßwänden.

3.2 Histomorphometrie

Um die Knochendichte und den Knochenstoffwechsel quantifizieren zu können, wurde im Anschluss an die Färbungen eine histomorphometrische Auswertung vorgenommen. Da von den jeweiligen Abschnitten der oberen Extremität unterschiedlich viele Knochenschnitte vorlagen, wurde jede Messung als eigenständiger Wert in die Auswertung mit aufgenommen. Die Unterschiede zwischen proximalen und distalen Knochenabschnitten wurden graphisch festgehalten, die Anzahl der Daten in Abhängigkeit der vorliegenden Knochenschnitte. Die relative Knochendichte des spongiösen Knochens (BV/TV ≜ BAr/TAr) scheint von proximal nach distal abzunehmen, wobei einige Schwankungen zu verzeichnen sind, welche keine endgültige Schlussfolgerung zulassen. Dennoch ist die Tendenz ersichtlich, da das prozentuale Aufkommen der Trabekel in Unterarm und Handwurzel im Vergleich zu Mittelhand und Fingerknochen teilweise mehr als doppelt so hoch ausfällt (Abb. 19). Der Mittelwert aller prozentualen Anteile liegt bei 8,9 %. Der Vergleich einzelner Fingerstrahlen von Mittelhand bis Fingerspitze zeigt keine eindeutige Tendenz. Auch der Vergleich proximaler und distaler Anteile war in diesem Fall uneinheitlich (Abb. 20).



Abbildung 19: Prozentuales Trabekelaufkommen

Das Verhältnis der Fläche aller Knochentrabekel (bone area, **BAr**) zur gesamten ROI (tissue area, **TAr**). Vergleich von proximalen und distalen Abschnitten der Extremität, mit zwei Messungen des Unterarms, eine Messung der Handwurzel, sechs Messungen der Mittelhand und fünf Messungen der Finger.



Abbildung 20: Prozentuales Trabekelaufkommen

Das Verhältnis der Fläche aller Knochentrabekel (bone area, **BAr**) zur gesamten ROI (tissue area, **TAr**). Vergleich einzelner Fingerstrahlen mit proximalen (prox.), medialen (med.), sowie distalen (dist.) Anteilen.

Durch Messung des relativen Kortikalisanteils und der mittleren Kortikalisbreite, wurde auch der kortikale Knochen histomorphometrisch berücksichtigt. Zum einen erfolgte dafür eine Gegenüberstellung von Kortikalisvolumen im Verhältnis zum Volumen des ROI (CV/TV \triangleq CAr/TAr) (Abb. 21). Diese Auswertung zeigte keine eindeutigen Tendenzen von proximal zu distal. Die distalen Abschnitte erreichten jedoch im Vergleich zu den proximalen Abschnitten höhere Werte. Der höchste Kortikalisanteil wurde im Phalanx medialis mit einem Wert von 7,9 % gemessen. Der Mittelwert aller Ergebnisse lag bei 1,94 %. Zum anderen wurde die mittlere Kortikalisbreite in den einzelnen Knochenschnitten verglichen (Abb. 22). Dabei verhielten sich alle Abschnitte der gesamten Extremität ähnlich. Innerhalb von Mittelhand und Fingern zeigten sich jedoch zudem Schwankungen einzelner Schnitte. Die geringste Breite kam im Phalanx distalis mit 0,07 mm vor. Die größte Kortikalisbreite zeigte sich im Metacarpus distalis mit 0,35 mm. Der Mittelwert aller Proben betrug 0,173 mm.



Abbildung 21: Prozentuales Kortikalisvolumen

Das Verhältnis der Fläche des kortikalen Knochens (cortical area, **CAr**) zur gesamten ROI (tissue area, **TAr**). Vergleich proximal nach distal, mit drei Messungen des Unterarms, einer Messung der Handwurzel, drei Messungen der Mittelhand und vier Messungen der Finger.



Abbildung 22: Mittlere Kortikalisbreite

Abschnitte von proximal nach distal, mit Durchschnittwerts-Messungen dreier Anschnitte des Unterarms, eines der Handwurzel, drei der Mittelhand und vier der Finger.

Der Knochenstoffwechsel wurde durch die relative Anzahl von Osteoblasten und Osteoklasten quantifiziert, indem im Fall der Osteoblasten die von Zellen besiedelte Strecke, sowie im Fall der Osteoklasten die absolute Zahl aktiver Zellen mit der Trabekeloberfläche (*bone surface*, BS) ins Verhältnis gesetzt wurde (Abb. 23, 24). Auffallend ist, dass die relative Anzahl am Knochenstoffwechsel beteiligter Zellen von proximal zu distal bis zur Mittelhand verhältnismäßig abfällt. Im Os capitatum ist sowohl die geringste Osteoblasten-, als auch die niedrigste Osteoklastendichte zu finden. Anschließend steigt in beiden Graphen das Verhältnis der Zellzahlen zur Trabekeloberfläche weiter distal an. Die vorhandenen Anschnitte der Gelenke flossen nicht in die Auswertung ein, da hier wenige bis keine knochenhomöostatisch wirksamen Zellen zu finden waren.



Abbildung 23: Relative Osteoblastendichte, von proximal nach distal

Dazu wurden die Osteoblastenanzahl (**OBA**) mit der Trabekeloberfläche (bone surface, **BS**) ins Verhältnis zueinander gesetzt.



Abbildung 24: Relative Osteoklastendichte, von proximal nach distal

Dazu wurden die Osteoklastenanzahl (**OKA**) mit der Trabekeloberfläche (bone surface, **BS**) ins Verhältnis zueinander gesetzt.

3.3 Transmissions-Elektronen Mikroskopie (TEM)

Die Mikroskopie von Ultra-Dünnschnitten hat gezeigt, dass viele Zellen des Knochengewebes tot oder geschwächt aussehen, was das Gesamtbild von untergehendem Gewebe festigt. Die mineralisierte Knochensubstanz scheint nur spärlich von Saumzellen (SZ) überzogen zu sein. Diese enthalten zum Teil große Vakuolen und sind auffallend klein. Zwischen den Knochentrabekeln sind außerdem viele Fettvakuolen vorzufinden.



A Abbildung 25: Darstellung der Saumzellen im TEM Saumzellen (→) anliegend am Osteoid (OI) der Knochentrabekel und eine Fettvakuole (F). (B) zeigt eine Saumzelle (SZ) in höherer Vergrößerung.

Alle Osteocyten wirken beeinträchtigt. Die wenigen Zellorganellen erscheinen geschrumpft. Die Zellkerne (Nukleus) sind eingestülpt und liegen in Kernlakunen frei. Die Kanalikulies wirken nicht mehr aktiv. Teilweise sind die Osteocytenlakunen von frei liegendem Mineral in der Knochenmatrix umgeben.



A B Abbildung 26: Darstellung der Osteocyten im TEM

Osteocyten (**OC**) eingebettet in mineralisierter Knochenmatrix (**mKM**) und mit verformtem Nukleus (**N**). In (A) ist eine verstärkte Zellwand, sowie der Rest eines Kanalikulus (**K**) erkennbar. In (B) zeigen Pfeile (\rightarrow) auf freiliegendes Mineral.

Die vorliegenden Aufnahmen von Osteoblasten zeigen ebenfalls überwiegend geschädigte Zellen. Die Zellmembran macht einen diskontinuierlichen Eindruck, da die Zelle auszulaufen scheint.



Abbildung 27: Darstellung der Osteoblasten im TEM Osteoblasten (**OB**), die sich in Osteoid (**OI**) einmauern und damit ein frühes Stadium von Osteocyten darstellen. Überrest eines Kanalikulus (\rightarrow).



Abbildung 28: Darstellung der Osteoblasten im TEM

Am Osteoid (**OI**) anliegende Osteoblasten (**OB**) mit zerstörtem Zytoplasma, dazu ein nicht mehr vernetzter Osteocyt (**OC**) mit ebenfalls kaputtem Zytoplasma.

Die Blutgefäße zwischen den Knochentrabekeln befinden sich hauptsächlich in schlechtem Zustand. Das Endothel ist insgesamt dünn und es bestehen große Lücken zwischen den einzelnen Endothelzellen, wodurch eine geschwächte Wandstruktur erkennbar ist.



Abbildung 29: Darstellung der Blutgefäße im TEM

Zwischen den Knochentrabekeln liegende Kapillaren (KP), die Gefäßwand ist deutlich fenestriert (\rightarrow) zwischen den einzelnen Endothelzellen (EZ).

3.4 Fibroblastenzellkultur

Um die knorpeligen Strukturen der von CRPS befallenen Gelenke besser beurteilen zu können, wurde anhand einer Zellkultur synovialer Fibroblasten das Wachstumsverhalten, das morphologische Erscheinungsbild und das Verhalten in funktionellen Tests überprüft. Dabei zeigen sich große Unterschiede zwischen den einzelnen Proben. Rein mikroskopisch fiel auf, dass die Zellen der gesunden Kontrollen eher klein waren und damit mehr Zellen pro cm² vorlagen (Abb. 32). Die Fibroblasten des Amputats wirkten hingegen hypertroph (Abb. 30, 31). Durch die Hypertrophie war der spindelförmige Zellaufbau nicht mehr klar erkennbar und die einzelnen Zellen waren nur schwer voneinander abzugrenzen.



В

A



Abbildung 30: Kultivierte synoviale Fibroblasten (20.000 Zellen/cm²)

Art. radiocarpalis (A, B) und Art. mediocarpalis (C, D). Einzelne Zellkerne (\rightarrow) sind zu erkennen.



Abbildung 31: Kultivierte synoviale Fibroblasten (20.000 Zellen/cm²) Art. carpometacarpalis (A, B), Art. metacarpophalangealis II (C, D) und Art. interphalangealis distalis II (E, F). Zellkerne (\rightarrow) sind vereinzelt erkennbar.



Abbildung 32: Kultivierte synoviale Fibroblasten (20.000 Zellen/cm²) Drei gesunde Kontrollen in niedriger (A, C, E) und hoher Vergrößerung (B, D, F). Einzelne Zellkerne (\rightarrow) sind deutlich erkennbar.

Es konnte identifiziert werden, welche der synovialen Fibroblasten den gesunden Zellen morphologisch am nächsten kamen. Die Fibroblasten des am weitesten distal gelegenen Gelenks, dem Fingerendgelenk (Art. interphalangealis distalis II) kamen den gesunden Fibroblasten auf sowohl morphologisch als auch Basis der Reproduktionsgeschwindigkeit am nächsten. Es folgten die Fibroblasten des Mittelhandgelenks (Art. carpometacarpalis), die Handwurzelgelenke (Art. mediocarpalis und Art. radiocarpalis) und schließlich das Fingergrundgelenk (Art. metacarpophalangealis II), wo die Zellkörper sehr groß erschienen. Die morphologischen Eigenschaften sind nachfolgend tabellarisch zusammengefasst.

Probe	Mittlerer Durchmesser	Anzahl Zellen pro Foto
	Zelle	bei 10x Vergrößerung
Art. radiocarpalis	50 µm	12
Art. mediocarpalis	50 µm	15
Art. carpometacarpalis	40 µm	20
Art. metacarpophal. II	ca. 100 µm	Kaum einzelne Zellen
		erkennbar
Art. interphal. distalis II	35 µm	38
Gesunde synoviale	35 µm	36
Fibroblasten - Kontrolle 1		
Gesunde synoviale	35 µm	58
Fibroblasten - Kontrolle 2		
Gesunde synoviale	35 µm	53
Fibroblasten - Kontrolle 3		

Tabelle 4: Vergleichende Messungen zur Morphologie der kultivierten synovialen Fibroblasten

Gegenüberstellung der Proben von proximal nach distal, Vergleich von Fotoaufnahmen bei 10x Vergrößerung und 20.000 Zellen/cm².

Als Vorbereitung für den MTT-Test wurde die exakte Anzahl vitaler Zellen im Casy bestimmt. Die nachfolgende Tabelle stellt die Messungen zwei Tage vor Durchführung des MTT-Tests dar.

Probe	Anteil lebensfähiger Zellen
Art. radiocarpalis	75 %
Art. mediocarpalis	68,5 %
Art. carpometacarpalis	45,3 %
Art. metacarpophal. II	47 %
Art. interphal. distalis II	70 %
Gesunde synoviale	87,52 %
Fibroblasten - Kontrolle 1	
Gesunde synoviale	92,34 %
Fibroblasten - Kontrolle 2	
Gesunde synoviale	79,89 %
Fibroblasten - Kontrolle 3	

Tabelle 5: Zellvitalitäts-Messung der synovialen Fibroblasten aller Zellkulturen

3.4 Funktioneller Vitalitätsassay (MTT-Test)

Durch die Messung von Farbsignalen, die bei Metabolisierungsprozessen entstehen, konnte festgestellt werden, welche Zellen stoffwechselaktiv und damit vital sind. Die anteilige Vitalität der einzelnen Zellkulturen wurde gemessen und tabellarisch festgehalten (Tab. 6). Außerdem wurde der Median, sowie der Mittelwert berechnet.

	Vitalität [%]		
Probe	Median	Mittelwert, Standardabweichung	
Art. radiocarpalis	55	54 +/- 13	
Art. mediocarpalis	83	83 +/- 7	
Art. carpometacarpalis	30	33 +/- 9	
Art. metacarpophalangealis	15	16 +/- 7	
Art. interphalangealis dist.	56	64 +/- 13	
Gesunde Kontrollen	88	105 +/- 57	

Tabelle 6: Zellvitalität der synovialen Fibroblasten

Anordnung der Proben von proximal nach distal, mit gesunden Kontrollen. Angabe von Median und Mittelwert. Im übergeordneten Vergleich zeigte sich die Zellvitalität des Amputats im Kontrast zu den gesunden Zellproben deutlich eingeschränkt. So verwiesen die zusammengefassten Werte beider Gruppen auf einen hochsignifikanten Zusammenhang (p<0,001) (Abb. 33). Die Gegenüberstellung der Fibroblastenkulturen untereinander machte weitere Zusammenhänge deutlich: Der Vergleich zwischen Fingergrundgelenk (Art. metacarpophalangealis) und den gesunden Kontrollproben war hoch signifikant (p<0,001) (Abb. 34). Weitere signifikante Zusammenhänge bestanden zwischen den gesunden Kontrollproben und dem Mittelhandgelenk (Art. carpometacarpalis) (p=0,006), und zwischen Handwurzelgelenk (Art. metacarpophalangealis) (p=0,002).



Abbildung 33: Vergleich beider Proben-Gruppen im MTT-Test CRPS - Mittelwert der Vitalität der Fibroblasten des Amputats, K - Mittelwert der $Vitalität der gesunden Kontrollen, *** = <math>p \le 0,001$ (höchst signifikant).



Abbildung 34: Vergleich aller CRPS-Proben mit den gesunden Kontrollen im MTT-Test

Anordnung der CRPS-Proben von proximal nach distal. Markierung der Zusammenhänge mit $** = p \le 0,01$ (hochsignifikant) und $*** = p \le 0,001$ (höchst signifikant). 1- Art. radiocarpalis, 2- Art. mediocarpalis, 3- Art. carpometacarpalis, 4- Art. metacarpophalangealis, 5- Art. interphalangealis distalis, K – Mittelwert der gesunden Kontrollen.

3.5 IL-6 Assay

Das regulatorische Cytokin IL-6 spielt vor allem bei Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle und nimmt darunter Einfluss auf die Knochenhomöostase. Die IL-6 Produktion der einzelnen Zellkulturen konnte durch optische Dichtemessungen bei 450 nm quantifiziert werden. Die ermittelten Werte wurden tabellarisch festgehalten (Tab. 7). Zusätzlich wurden die Mediane, sowie die Mittelwerte berechnet.

	Optische Dichte	IL-6 [pg/ml]
Probe	Median	Mittelwert, Standardabweichung
Art. radiocarpalis	2165	2191 +/- 106
Art. mediocarpalis	2141	2163 +/- 234
Art. carpometacarpalis	963	1029 +/- 175
Art. metacarpophalangealis	2110	2010 +/- 303
Art. interphalangealis dist.	576	579 +/- 63
Gesunde Kontrollen	508	436 +/- 199

Tabelle 7: Optische Dichtemessung zur Quantifizierung der IL-6 Produktion der synovialen Fibroblasten

Anordnung von proximal nach distal, mit gesunden Kontrollen. Angabe von Median und Mittelwert.

Im Vergleich zu den Fibroblasten von gesunden Spendern zeigte sich im IL-6 Immunoassay ein hochsignifikanter Anstieg der IL-6 Produktion bei synovialen Fibroblasten der von CRPS befallenen Gelenke (p<0,001) (Abb. 35). Auch der Vergleich der Zellen des Amputats untereinander brachte signifikante Zusammenhänge der IL-6 Produktion ein (Abb. 36). Die beiden Handwurzelgelenke (Art. radiocarpalis, Art. mediocarpalis) stehen in einem hochsignifikanten Zusammenhang zu den gesunden Kontrollproben (jeweils p<0,001). Auch der Vergleich des Fingergrundgelenks (Art. metacarpophalangealis) weist eine hohe Signifikanz mit den gesunden Kontrollen auf (p=0,001). Das am weitesten distal gelegene Gelenk, das Fingerendgelenk (Art. interphalangealis distalis), korreliert ebenfalls signifikant mit den Handwurzelgelenken und dem Fingergrundgelenk, mit den Werten p=0,025 (Art. radiocarpalis), p=0,018 (Art. mediocarpalis) und p=0,048 (Art. metacarpophalangealis).


Abbildung 35: Vergleich beider Proben-Gruppen im IL-6 Immunoassay CRPS – Mittelwert des IL-6 Gehalts der Fibroblasten des Amputats, K – Mittelwert des IL-6 Gehalts der gesunden Kontrollen, *** = $p \le 0,001$ (höchst signifikant).



Abbildung 36: Vergleich aller CRPS-Proben mit den gesunden Kontrollen in der IL-6 Produktion

Anordnung von proximal nach distal, Markierung der Zusammenhänge mit $* = p \le 0.05$ (signifikant) und $*** = p \le 0.001$ (höchst signifikant). 1- Art. radiocarpalis, 2- Art. mediocarpalis, 3- Art. carpometacarpalis, 4- Art. metacarpophalangealis, 5- Art. interphalangealis distalis, K – Mittelwert der gesunden Kontrollen.

3.6 Quantitative realtime PCR

Mithilfe einer quantitativen PCR in Echtzeit kann eine schnelle Vervielfältigung von cDNA ermöglicht werden. Dazu musste RNA aus dem Amputat und den Knochenbiopsien der Kontrollpatienten extrahiert werden, um diese anschließend durch Reverse Transkription in cDNA umzuschreiben. Als Eignungstest der RNA für die cDNA-Synthese, wurde diese zunächst auf eine ausreichende Reinheit überprüft. Die getesteten Proben der aus dem Amputat extrahierten RNA zeigten RIN-Werte zwischen 6.20 und 7.50 auf. Die aus der Knochenbiopsie der Kontrollpatienten extrahierte RNA erreichte mit einer RIN von 3.60 deutlich niedrigere Werte. Obwohl keine der Proben eine optimale Reinheit mit einem maximalen RIN-Wert von 10 erreichen konnte, wurde die internen Vergleiche im Vordergrund stehen sollten und sich die jeweiligen RIN-Werte ähnlich verhielten. Aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurde jedoch die bioptisch gewonnene Knochenprobe der Kontrollpatientin, da die extrahierte RNA einen zu niedrigen RIN-Wert im Vergleich zu den Amputat-Proben aufwies.

Die aus RNA umgeschriebene cDNA der sieben Knochenproben des Amputats wurde mithilfe der quantitativen PCR in Echtzeit vervielfältigt. Durch eine Markierung mit fluoreszierendem Farbstoff konnte die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgen. Getestet wurden sowohl Inflammations-Mediatoren wie IL-6 oder TNF- α , sowie Marker der Knochenhomöostase, darunter Cathepsin K für die Osteoklastenaktivität, ALP für die Osteoblastenaktivität und Sklerostin als Marker der Osteozyten. Außerdem wurde das Vorkommen von BDNF, einem Nervenwachstumsfaktor und des Substanz P-Rezeptors, als Marker der neurogenen Schmerzwahrnehmung getestet. Um einen Vergleich der Expression zwischen proximalen und distalen Abschnitten der von CRPS befallenen Extremität vorzunehmen, wurden die Ergebnisse in der Graphik von den am nächsten gelegenen Abschnitten der Extremität zum Stamm bis zu den am weitesten davon entfernten aufgeführt. Zunächst wurden die proximale Ulna und der distale Radius als Unterarm aufgelistet, anschließend das Os capitatum als Handwurzel, dann der Metacarpus distalis als Mittelhand und zuletzt die proximalen, medialen und distalen Anteile des Mittelfingers. Das $-\Delta$ (-(CP_{Zielgen} – CP_{Referenzgen})) der CP-Werte dient als

Auswertungsgrundlage. Da die Templatemenge sinkt, je höher der Δ CP-Wert ist, ist die Exprimierung als höher zu werten, je weniger negativ der Wert ist.

Die Ergebnisse der inflammatorischen Mediatoren zeigen uneinheitliche Verteilungen: Die mRNA des Cytokins IL-6 scheint in den Fingern und in der Handwurzel am höchsten und in Unterarm und Mittelhand am niedrigsten exprimiert zu werden (Abb. 37). Wohingegen die mRNA des TNF- α invers in der Mittelhand am höchsten und in der Handwurzel am niedrigsten exprimiert wird (Abb. 38). Tendenziell zeigen die Ergebnisse jedoch, dass die Entzündungsparameter in den distalen Bereichen der Hand im Vergleich zu den proximalen Abschnitten vermehrt exprimiert werden.



Abbildung 37: Real-time RT-PCR des inflammatorischen Mediators IL-6



Abbildung 38: Real-time RT-PCR des inflammatorischen Mediators TNF- α

Bei der Bestimmung der Marker für die Knochenhomöostase waren keine eindeutigen Tendenzen zu erkennen. Die mRNA von Sklerostin und ALP schien im direkten Vergleich insgesamt weniger exprimiert zu sein, als die von Cathepsin K. Der Osteoklastenmarker Cathepsin K zeigt vor allem in der proximalen Ulna und im proximalen Phalanx eine hohe Templatemenge, wohingegen der distale Radius und der mediale Phalanx im Vergleich die geringste Templatemenge aufweisen, sodass keine eindeutigen Schlussfolgerungen getroffen werden können (Abb. 39). Der Osteoblastenmarker ALP wird in Unterarm, Handwurzel und Mittelhand am wenigsten exprimiert, analog dazu wird der Gegenspieler Sklerostin in diesen Bereichen tendentiell am meisten exprimiert (Abb. 40, 41).



Abbildung 39: Real-time PCR von Cathepsin K als metabolischem Marker



Abbildung 40: Real-time PCR von ALP als metabolischem Marker



Abbildung 41: Real-time PCR von Sklerostin als metabolischem Marker

Die Marker für die Verknüpfung zwischen Nervensystem und Knochen, BDNF und Substanz-P Rezeptor zeigen keine augenscheinlichen Tendenzen von proximal zu distal. Die Expression beider Marker scheint sich im Vergleich zur Referenz ähnlich zu verhalten: Die $-\Delta$ CP-Werte schwanken um einen Wert von -10. Die höchste Expression von BDNF ist im proximalen Phalanx zu vermerken, die niedrigste hingegen im medialen Phalanx (Abb. 42). Der Substanz-P Rezeptor wird im proximalen Phalanx und im Os capitatum der Handwurzel vergleichsmäßig am meisten exprimiert, im medialen Phalanx am wenigsten (Abb. 43).



Abbildung 42: Realtime PCR von BDNF als Marker für das Nervensystem



Abbildung 43: Realtime PCR des Substanz P-Rezeptors als Marker für das Nervensystem

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit ist es, einen vielschichtigen Einblick in das Geschehen während der Chronifizierung eines CRPS zu erlangen. Um das Verständnis des Schmerzsyndroms auf Ebene des Knochen- und Knorpelgewebes zu vertiefen, diente amputiertes Gewebe einer von CRPS befallenen oberen Extremität als Grundlage. Die Diagnose war zum Zeitpunkt der Amputation seit 14 Jahren bekannt. Außerdem wurde Kontrollmaterial in Form einer Knochenbiopsie einer vergleichbaren CRPS-Patientin, sowie Fibroblasten gesunder humaner Spender verwendet. Es konnten histologische, histomorphometrische, sowie molekularbiologische Untersuchungen des Knochengewebes vorgenommen werden. Außerdem wurden Experimente mit kultivierten synovialen Fibroblasten durchgeführt. Je mehr Wissen wir über dieses Syndrom erlangen, desto klarer wird die Komplexität der Entstehung desselben, sowie die Komplexität des notwendigen klinischen Managements: "Our knowledge has expanded in an exponential fashion to include musculoskeletal, immune, autoimmune, central and peripheral nervous system and autonomous nervous system dysfunction, all of which increase the complexity of its clinical management." (Stanton-Hicks, 2019). Die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung eines chronischen Schmerzsyndroms in Folge eines Extremitätentraumas beträgt bei Anwendung der Kriterien von Harden et al. zur Diagnosesicherung 7 % (Beerthuizen et al., 2012). In einer Studie von 2003 wurde eine jährliche Inzidenz von 0,0055 % (5,5/100.000/Jahr) festgestellt, in einer Studie aus 2007 wiederum eine Inzidenz von 0,0262 % pro Jahr und in einer Studie aus 2018 eine Inzidenz von 0,029 % pro Jahr (Sandroni et al., 2003)(de Mos et al., 2007)(Kim et al., 2018). Letztere Studie konnte eine steigende Inzidenz des CRPS Typ I seit 2011 nachweisen: "There was no significant change in the annual number of patients from 2011 to 2015, but the incidence of CRPS type I was increased while that of CRPS type II was decreased each year."

Das Vorkommen eines chronischen, therapieresistenten CRPS ist wiederum viel geringer. Prozentuale Angaben in der Literatur sind hier jedoch sehr schwankend, da unterschiedliche diagnostische Kriterien angewandt werden (Bean et al., 2014). Nur in Fällen eines chronifizierten CRPS kann die Entscheidung zur therapeutischen Amputation auf Wunsch des Patienten durch ein multiprofessionelles Team gefällt werden. Voraussetzungen dafür sind die lang anhaltende Krankheitsgeschichte eines nachgewiesenen CRPS, sowie ein Nichtansprechen auf alle empfohlenen Maßnahmen der Leitlinien (Schrier et al., 2018). Die Entscheidung zur Amputation wird nicht

leichtfertig gefällt: Diese therapeutische Option bleibt kontrovers diskutiert, da ein Überwiegen der Vorteile gegenüber den Nachteilen nicht eindeutig ist (Bodde et al., 2011). Dies macht deutlich, wie einmalig die Möglichkeit ist, einen Einblick in das Geschehen einer von CRPS betroffenen Extremität auf mikroskopischer, zell- und molekularbiologischer Ebene zu erlangen. Die Rarität dieser Möglichkeit ließ ausschließlich die alleinige Untersuchung eines Exemplars zu, da keine Gelegenheit für übergreifende Vergleiche gegeben waren. Mit einer Probenzahl von n=1 war nur eine Beschreibung der gewonnenen Ergebnisse, sowie der internen Vergleiche von proximal und distal entnommenen Proben möglich. Im Folgenden wird die Anwendung der erfolgten Methoden argumentiert, in Anlehnung an bereits existierende Erkenntnisse verteidigt und sowohl neue als auch bestehende Ergebnisse zusammengeführt.

4.1 Verwendete Untersuchungsmethoden

Der Transport der Proben erfolgte vorschriftsgemäß und auf schnellstem Wege in das Labor für experimentelle Unfallchirurgie. Zum Zeitpunkt der sofort anschließenden Bearbeitung befand sich das Knochengewebe in einem sehr weichen und instabilen Zustand, was die Präparation für die Schnitt- und Schliffherstellung erschwerte. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Bearbeitung des fragilen Gewebes weitere Schäden entstanden sind. Die histomorphometrische Auswertung wurde durch die geringe Stichprobengröße erschwert. Es konnten lediglich Vergleiche zwischen den jeweiligen Knochenproben einer Patientin vorgenommen werden, um Tendenzen innerhalb der proximalen und distalen Abschnitte der Extremität festzustellen. Eine einheitliche Bezugsgröße machte die Ergebnisse vergleichbar. Auch die TEM konnte nur stichprobenartige Bilder liefern, sodass diese lediglich der Beschreibung der zu sehenden Feinstrukturen diente, jedoch keine statistische, vergleichende Auswertung zuließ. Die aus der amputierten Extremität entnehmbare Menge synovialer Fibroblasten war begrenzt und die entsprechenden Zellen sehr fragil. Um eine ausreichende Zellzahl zu erlangen mussten in einigen Fällen mehrere Passagen zur Kultivierung durchgeführt werden. Zur Durchführung des Vitalitäts- und des IL-6 Assays wurde eine höhere Integrität der Messung erzielt, indem die reale Probenanzahl durch eine Mehrfachbestimmung der einzelnen Proben deutlich vergrößert werden konnte. Jede Probe wurde dreifach und jeweils in Doppelbestimmung ausgewertet, um das Ergebnis valider zu gestalten. Zum Vergleich dienten drei unterschiedliche Proben von synovialen Fibroblasten gesunder humaner Spender, welche unter exakt den gleichen Bedingungen kultiviert und getestet wurden, wie die Fibroblasten des Amputats. Um die Ergebnisse des durchgeführten Experiments besser geltend zu machen, wurden auch hier interne Vergleiche zwischen proximalen und distalen Entnahmestellen der Proben vorgenommen und jeweils mit den gesunden Kontrollen gegenübergestellt. Es ist nicht auszuschließen, dass die Zellen durch die Entnahme, die Konservierung und die Bearbeitung beschädigt worden sind und somit Einfluss auf die Forschungsergebnisse genommen wurden. Aufgrund der geringen Probenzahl konnte der beschriebene Durchlauf der Experimente allerdings nur einmal durchgeführt und mögliche Fehlerquellen damit nicht vollständig ausgeschlossen werden. Als Grundlage für die molekularbiologischen Untersuchungen des Knochengewebes diente RNA aus sieben verschiedenen Knochenproben des Amputats, welche wieder interne Vergleiche der proximalen und distalen Anteile erlaubten. Die Reinheit der Proben entsprach nicht dem Optimum, war aber untereinander vergleichbar. Trotzdem kann eine mangelnde Reinheit sich in der Aussagekraft der Ergebnisse widerspiegeln. Da die gewonnene cDNA-Menge nicht für die Durchführung der realtime PCR ausreichte, wurden PCR-Produkte der cDNA als Templates zur Durchführung der Experimente genutzt und eine nested PCR vorgenommen. Die Validität der Ergebnisse wurde durch die Messung der Expression eines Referenz-Gens überprüft, welches in allen Proben vergleichbare Messwerte lieferte. Somit konnten die Ergebnisse intern ausgewertet werden, wenn auch hier wieder n=1 galt.

4.2 Einfluss des CRPS auf den Knochen

4.2.1 Mikroarchitektonische Veränderungen

In der Übersicht aller histologisch ermittelter Aufnahmen ergibt sich das Bild einer gestörten Mikroarchitektur mit dezimiertem Trabekel- und Zellaufkommen, sowie insgesamt reduziertem Knochengewebe. Die Chronifizierung des CRPS erzeugt eine schmerzbedingte Minderbelastung der betroffenen Extremität und damit eine reduzierte mechanische Beanspruchung des Knochens. Wie ein Rattenmodell mit Botox-induzierter Muskelparalyse einer Extremität zeigen konnte, tritt bei Minderbelastung eine sofortige Reduktion des Knochenvolumens durch Verminderung der Anzahl, der Dicke und der Dichte der spongiösen Knochentrabekel ein (Gatti et al., 2019). Weiterhin hat das Modell gezeigt, dass die Stärke der kortikalen Schicht, sowie die Dichte der vorhandenen Osteozytenlakunen reduziert wird und die Porösität der Gefäße zunimmt. Dies resultiert

schließlich in einer Abnahme des Knochengewebes. Neuste Untersuchungen aus Bochum mittels ultraschallbasierter Knochendichtemessung konnten zudem zeigen, dass die Mineralisierungsdichte des Knochens bei CRPS Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden, sowie zu Probanden mit unilateralen Schmerzsyndromen anderer Ursache, abnimmt (Bazika-Gerasch et al., 2019). Dabei scheint sowohl der lokale-, als auch der systemische Knochenstoffwechsel betroffen zu sein, wobei die Knochendichte im akuten Stadium des CRPS als niedriger gemessen werden konnte als im chronischen Stadium. Somit ist die Reduktion von Knochensubstanz im Verlauf eines CRPS nicht alleinig auf die Inaktivität der betroffenen Extremität zurückzuführen. Sie wird zusätzlich durch die pathologischen Mechanismen des Schmerzsyndroms hervorgerufen. Im Falle einer pädiatrischen 11-jährigen Patientin konnte eine generalisierte Osteopenie in der von CRPS betroffenen Extremität mithilfe von high-resolution peripheral quantitative computed tomography (HR-pQCT) festgestellt werden, welche sich im Verlauf einer Bisphosphonat-Therapie parallel zur Schmerzentwicklung messbar besserte (Simm et al., 2010). Dadurch wird der offensichtliche Zusammenhang zwischen der Aktivität des Schmerzsyndroms und einem herabgesetzten Knochenstoffwechsel in der betroffenen Extremität deutlich. Mithilfe von HR-pQCT konnte bei 14 CRPS-Patientinnen die betroffene Extremität der unbetroffenen, gesunden Extremität gegenübergestellt werden (Oehler et al., 2019). Dabei wurde eine herabgesetzte Breite und Mineralisierungsdichte der Kortikalis, sowie ein insgesamt reduziertes Knochenvolumen in der vom Schmerzsyndrom befallenen Extremität festgestellt. Die Aussage dieser Studie deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse der Studie auf Untersuchungen distaler Tibiafrakturen basiert und somit die untere Extremität, und nicht wie in der vorliegenden Arbeit, die obere Extremität betrachtet wurde. Der Mittelwert der Kortikalisbreite in der von CRPS betroffenen Extremität betrug bei den 14 untersuchten Frauen 0,72 mm (gesunde Extremität: 0,81 Der Mittelwert der histologisch ermittelten Kortikalisbreite mm). aller Knochenabschnitte des hier untersuchten Amputats betrug 0,17 mm (< 0,72 mm). Neben der Kortikalisbreite ließ sich aus den Studienergebnissen außerdem der Mittelwert des relativen Knochenvolumens (BV/TV) mit einem Mittelwert von 10 % ablesen. In der histomorphometrisch durchgeführten Bestimmung des prozentualen Knochenvolumens (BA/TA) der hier vorliegenden Extremität konnte ein Mittelwert von lediglich 8,9 % festgestellt werden. Auch diese Messung liegt damit deutlich niedriger als in der Studie von 2018 (Oehler et al., 2019). In der histomorphometrischen Gegenüberstellung der einzelnen Knochenabschnitte schien das prozentuale Trabekelaufkommen zudem von proximal nach distal geringer zu werden. Der pathologische Zustand des CRPS in der Extremität scheint die distalen Anteile somit stärker zu beeinträchtigen. Eine weitere Einordnung der histomophometrisch ermittelten Ergebnisse kann anhand des Vergleichs zu einer finnischen Studie vorgenommen werden, bei welcher der Schenkelhals des Oberschenkelknochens von 20 weiblichen Körperspendern ohne medizinisch relevante Vorgeschichte im Alter zwischen 18 und 82 Jahren entnommen wurde, um unter anderem das prozentuale Kortikalisvolumen (CA/TA) und die mittlere Kortikalisbreite zu berechnen. Im Alter ≤ 50 betrug das prozentuale Kortikalisvolumen 23,3 % und die mittlere Kortikalisbreite 1,6 mm, in der Altersgruppe > 50 wurde ein Kortikalisanteil von 17,3 % und eine mittlere Kortikalisbreite von 1,2 mm gemessen (Tong et al., 2015). In den Berechnungen des von CRPS befallenen Amputats lag der höchste Kortikalisanteil bei ca. 7,9 %, der Mittelwert aller untersuchten Knochenproben lag bei 1,94 % und damit um das zehnfache geringer als der errechnete Mittelwert der finnischen Untersuchungen. Auch die Kortikalisbreite fiel mit einem Maximalwert von 0,35 mm in der vorliegenden Arbeit deutlich niedriger und mit einem Mittelwert von 0,173 mm, um den Faktor acht gemindert, gegenüber den Ergebnissen der gesunden finnischen Spenderinnen aus. Trotz dieses aussagekräftigen Vergleichs, muss mit in Betracht gezogen werden, dass die gesunden Knochen von einer sehr stark beanspruchten Lokalisation, dem Femurhals, stammen, die Kortikalisbreite unterschiedlicher Knochen schwankt und die Vergleichbarkeit der Werte damit erschwert ist.

4.2.2 Bewertung von Knochenhomöostase, Zell- und Gefäßaufkommen

Der Knochenstoffwechsel wurde durch die Berechnung der relativen Osteoblasten- sowie Osteoklastendichte quantifiziert. Auffallend war in beiden Messungen, dass das niedrigste Zellaufkommen in der Handwurzel zu sehen war und dass die Zellzahlen sowohl in die proximale als auch in die distale Richtung von dort aus anstiegen. Ein solches Bild lässt vermuten, dass am Ausgangsort des CRPS, in diesem Fall die Handwurzelregion auf Höhe des Karpaltunnels, die schlechtesten Bedingungen für die Zellen des Knochenstoffwechsels herrschen und sich diese mit zunehmender Entfernung von dort bessern. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Erkenntnissen, dass akute Entzündungsreaktionen des Schmerzsyndroms vor allem lokal stattfinden und sich nicht systemisch ausbreiten (Krämer et al., 2011). In anderen Studien geht man aufgrund von Messungen leicht erhöhter Deoxypyridinoline (DPD)-Spiegel im Urin von einer gesteigerten Knochenresorption als Ursache für die gestörte Mikroarchitektur bei CRPS aus (Oehler et al., 2019). Die histologischen Untersuchungen der Osteoklasten in den Knochenabschnitten des Amputats konnten diese These nicht unterstützen, da insgesamt nur wenige aktive Zellen vorhanden zu sein schienen. Die Vitalität der Zellen hängt andererseits genauso mit der Chronifizierung der Krankheit, der vermehrten Inaktivität, sowie einer beeinträchtigten Blutversorgung zusammen. Weiterhin spricht gegen die These der erhöhten Knochenresorption des CRPS, dass der Ausgangsort des Schmerzsyndroms, welches in diesem Fall die Handwurzel ist, sowohl eine verhältnismäßig niedrige Osteoklastendichte, als auch ein verhältnismäßig hohes Trabekelaufkommen aufweist. Die histologische Betrachtung der Gefäßversorgung des betroffenen Knochens zeigt in den distalen Abschnitten der Extremität ein geringes Gefäßaufkommen. In den proximalen Abschnitten, in diesem Fall die Ulna, sind viele kleine Gefäße mit dünnen und porösen Gefäßwänden zu sehen. Die herabgesetzte Blutversorgung der distalen Abschnitte ist zum einen durch die langjährige Inaktivität der Extremität, sowie zum anderen durch die Chronifizierung des Schmerzsyndroms zu erklären. Das hohe Aufkommen vieler kleiner Gefäße mit hoher Permeabilität in den proximalen, das Entzündungsgebiet versorgenden Abschnitten ist durch die andauernde, chronische Entzündung zu erklären. Die Hauptblutversorgung wird jahrelang am Zentrum der Entzündung stattgefunden haben, sodass alle Abschnitte dahinter möglicherweise unterversorgt geblieben sind. Bisherige Studien konnten über die transkutane Messung der Sauerstoffsättigung nachweisen, dass eine Hypoxie in den tiefen Gewebeschichten der von CRPS betroffenen Extremität besteht (Bellingham et al., 2014). Die Chronifizierung des Schmerzsyndroms scheint mit einem vaskulären Umbau einherzugehen, was die gestörte Mikrozirkulation als Teil der Pathogenese erklärt. Lang andauernder oxidativer Stress und ein chronisches Entzündungsgeschehen sind zum einen Schlüsselmechanismen bei der Entstehung von endothelialer Dysfunktion und zum anderen bereits als ausschlaggebende Faktoren für den Untergang von Chondrozyten bei der Arthrose nachgewiesen worden (Marchev et al., 2017). Dieser Effekt lässt sich unter anderem durch die Beeinträchtigung von Reparationsmechanismen auf zellulärer Ebene erklären. Ebenso kann der Knochenmetabolismus durch oxidativen Stress stark verändert werden. Somit scheint es plausibel, dass während der Chronifizierung des CRPS das knöcherne Gewebe vor allem aufgrund einer pathologischen Sauerstoffunterversorgung an Stabilität verliert und sich die somit induzierte Knochenatrophie mit einem zunehmendem Untergang aller an der Knochenhomöostase beteiligten Zellen erklären lässt.

4.2.3 Morphologische Veränderungen der Zellen

Bei genauerer Betrachtung der Morphologie von Saumzellen, Osteocyten und Osteoblasten konnten kaum intakte Zellen vorgefunden werden. Alle Zelltypen erweckten den Eindruck geschädigter Organismen. Als Kriterien für die morphologische Bewertung wurden die Größe der Zelle, die Zahl und Größe der Zellorganellen, die Morphologie des Zellkerns, sowie die Kontinuität der Zellmembran betrachtet. Die Saumzellen sind durch eine insgesamt verminderte Zellgröße, größere Vakuolen, sowie ein vermindertes Vorkommen auf der Knochenoberfläche aufgefallen. Innerhalb des Osteoids wurden Osteocyten vorgefunden, deren Zellkerne keine runde Form aufwiesen und deren Zellorganellen geschrumpft waren. Das frei liegende Mineral um diese Zellen könnte sowohl ein Zeichen für eine Mineralisierung als auch für eine Entmineralisierung sein. Die fotografierten Osteoblasten sind teilweise durch eine geschädigte Zellmembran und zerstörtes Zytoplasma, sowie die fehlende typische kubische Form aufgefallen. Ein fehlendes lakulär-kanalikuläres Netzwerk lässt die interzelluläre Kommunikation erlöschen. wodurch eine wichtige Grundlage für das Fortbestehen der Knochenhomöostase verschwindet. Die Wände der erkennbaren Blutgefäße wirkten dünn und porös, was mit den Erkenntnissen der histologischen Untersuchungen einhergeht. Die verstärkte Fenestrierung der Blutgefäße geht vermutlich mit einem Fortbestehen der erhöhten Permeabilität einher und lässt somit durch konstanten Austritt von Mediatoren ein Fortbestehen der entzündlichen Prozesse zu. Die konstante Entzündung bewirkt eine Abnahme der Knochendichte bis die Knochenhomöostase mehr und mehr zum Erliegen kommt. Die veränderte Morphologie der osteogenen Zellreihe deutet auf einen ablaufenden Apoptose-Prozess hin. Die weiterführende Forschung muss hier klären, welche Mechanismen eine solche Zellschädigung hervorrufen. Annehmbar ist eine Zellschädigung als Folge von Hypoxie oder auf Basis eines programmierten Zelltods durch intrinsische oder extrinsische Faktoren. Oxidativer Stress ist beispielsweise Auslöser für Autophagozytose in Osteoblasten und Osteocyten und wird als zelluläre Antwort auf Stress- und Entzündungszustände diskutiert (Yang et al., 2014). Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, könnte die Autophagozytose-Aktivität von Knochenzellen aus Extremitäten mit CRPS mithilfe von TEM, Immunhistochemie und realtime PCR weiter eruiert werden.

4.3 Einfluss des CRPS auf den Gelenkknorpel

Bei der reinen mikroskopischen Betrachtung der kultivierten synovialen Fibroblasten konnte festgestellt werden, dass die Zellen des CRPS-Amputats im Vergleich zu den gesunden Kontrollzellen ein hypertrophes Erscheinungsbild aufwiesen. Eine synoviale Hypertrophie ist ein frühes Erkennungszeichen der Arthrose, welche durch entzündliche Zustände der Gelenke charakterisiert ist und mit zunehmender Degeneration des Gelenkknorpels einhergeht. Es ist vorstellbar, dass der chronische Krankheitszustand des CRPS exogene Faktoren hervorbringt, welche eine synoviale Hypertrophie begünstigen. Beispielsweise wurde nachgewiesen, dass eine vermehrte Sekretion von Substanz P zu einer Hypertrophie der synovialen Membran führt (Matayoshi et al., 2005). Dies würde die erkannten Unterschiede der Zellmorphologien des CRPS-Amputats erklären, da die jeweiligen Zellen den Entzündungsund Schmerzvermittlungsmediatoren unterschiedliche stark ausgesetzt sind. So erscheinen die synovialen Fibroblasten des am weitesten vom Ursprungsort des CRPS entfernten Gelenks den gesunden Kontrollzellen am ähnlichsten und die synovialen Fibroblasten rund um den Karpaltunnel erscheinen hyperplastisch. Der Vitalitätsassay verdeutlicht, dass die synovialen Fibroblasten durch den chronischen Krankheitszustand stark geschwächt sind. Sie schnitten im Vergleich zu den gesunden Kontrollen höchst signifikant schlechter ab. Im Einzelvergleich herrschten besonders hohe Signifikanzen zwischen den gesunden Kontrollen und den Gelenken der Mittelhand. Die Handwurzel schnitt vergleichsweise gut ab, weshalb sich eine Übertragung der zuvor aufgestellten Theorie hier als schwierig gestaltet. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass die Qualität der gewonnenen Zellen Einfluss auf das Testergebnis nimmt. Diese Fehlerquelle kann jedoch nur durch eine höhere Probandenanzahl ausgeschlossen werden. Die Produktion des Entzündungsparameters IL-6 bei den synovialen Fibroblasten des CRPS-Amputats im Vergleich zu den gesunden Kontrollzellen war signifikant gesteigert. Auch im chronifizierten Stadium der Erkrankung scheint der Entzündungsstatus anzudauern. Im internen Vergleich ist eine deutliche Tendenz erkennbar, da sich die IL-6 Produktion schrittweise normalisiert, je weiter distal das untersuchte Gelenk liegt. So zeigen die Gelenke um die Handwurzel eine höchst signifikante Korrelation zu den gesunden Kontrollen und eine signifikante Korrelation zum distalen Fingergelenk, welches dem Wert der gesunden Zellen sehr nahekommt. Der Entzündungszustand scheint somit vom Ursprungsort des CRPS auszugehen und schwächt sich mit zunehmendem Abstand ab. Dies ist eine mögliche Erklärung für die gleiche Tendenz der veränderten Morphologie der Fibroblasten.

4.4 Auswirkung des CRPS auf die Genexpression im Knochen

Die realtime PCR lieferte Erkenntnisse zur Expression verschiedener Marker im Knochengewebe. In Bezug auf den Inflammationszustand wurde die Expression von IL-6 und TNF- α untersucht. In beiden Fällen zeigten die distalen Abschnitte der Extremität eine höhere Expression als die proximalen Abschnitte. Vergleicht man also jeweils die beiden, vom Ursprungsort des CRPS entferntesten Lokalisationen, scheinen die Finger deutlich mehr im chronischen Krankheitszustand involviert zu sein als der Unterarm. Die höchsten Werte für IL-6 finden sich in der Handwurzel, die größte Expression von TNF- α in der Mittelhand. Dies zeigt eine symmetrische Tendenz zum synovialen Gewebe, da die höchste Entzündungsaktivität auf die Region um den Karpaltunnel konzentriert ist. Bei der Beurteilung der Knochenhomöostase war auffällig, dass die geringste Expression des Osteoblasten-Markers ALP in Handwurzel und Mittelhand vorzufinden war, was einen herabgesetzten Knochenaufbau in diesen Bereichen mit anatomischer Nähe zum Karpaltunnel vermuten lässt. Es wurde deutlich, dass die höchste Sklerostin-Expression ebenfalls im Bereich von Mittelhand, Handwurzel und distalem Radius vorlag und nach distal und proximal abfiel. Da Sklerostin negativ auf die Knochenneubildung wirkt und die Expression beispielsweise in alterndem Knochen ansteigt, wäre dies ein weiterer Hinweis auf die gesteigerte Knochenatrophie in dem von CRPS betroffenen knöchernen Gewebe (Thompson et al., 2016). Außerdem wirkt sich eine gesteigerte Entzündungsaktivität negativ auf den Knochenaufbau aus. Der Knochenabbau konnte durch die Expression von Cathepsin K dargestellt werden, welche eine uneinheitliche Verteilung zeigte. In diesem Fall kann somit weder von einer gesteigerten noch von einer herabgesetzten Osteoklastenaktivität in einem bestimmten Bereich der Extremität ausgegangen werden. Die neuronale Schmerzwahrnehmung scheint in allen Bereichen der Extremität gleich ausgeprägt zu sein. Bei der Expression von BDNF und dem Substanz P-Rezeptor sind keine unterschiedlichen Tendenzen innerhalb der Proben der amputierten Extremität erkennbar, welches vermutlich durch das bereits deutlich chronifizierte Stadium der Erkrankung zu erklären ist. Ein Vergleich der Expression im akuten Stadium des CRPS zum chronischen Stadium zeigt, dass eine Signalvermittlung durch Substanz P lokal vor allem in den ersten Wochen nach Trauma eine Rolle spielt.

Auf lange Sicht sinken die gemessen Neuropeptid-Konzentrationen in den peripheren Nerven und in der Haut der betroffenen Extremität wieder auf den Normwert ab. Eine Rolle auf lange Sicht spielt die Substanz P vor allem im zentralen Nevensystem, wo auch noch im chronischen Stadium des CRPS eine erhöhte Konzentration festgestellt werden konnte (Wei et al., 2016). BDNF wird in Folge von Nervenschäden ausgeschüttet und unterstützt den natürlichen Heilungsprozess dieser, zusätzlich zu diesem naheliegendem Effekt konnte als Nebeneffekt eine positive Auswirkung auf den Knochenumbau, durch Aktivierung der Osteoblastendifferenzierung, festgestellt werden (Ida-Yonemochi et al., 2017). Im chronischen Stadium scheint auch dieser Mediator daher lokal eine geringe Rolle zu spielen, wodurch sich die wenig aussagekräftigen Messwerte des vorliegenden Experiments ergeben.

4.5 Ausblick

Mit der Absicht, den Einfluss einer Chronifizierung des CRPS auf das knöcherne Gewebe zu verdeutlichen, soll die vorliegende Arbeit die Auswirkungen auf funktioneller, zellund molekularbiologischer Ebene darlegen. Die durchgeführten Untersuchungen gewährten einmalige Einblicke und lieferten ein besseres Verständnis der noch wenig erforschten Pathogenese des CRPS. Es wurde deutlich, dass die Mikroarchitektur der gesamten von CRPS betroffenen Extremität stark geschwächt ist und ein sehr geringes Zellaufkommen aufweist. Der instabile Eindruck wurde durch eine stark verminderte Ausprägung des kortikalen Knochens unterstützt. Ein proinflammatorischer Status steigert die Knochenresorption. Bei einer Chronifizierung mit Übergang in das kalte Inflammations-Stadium geht die gesteigerte Knochenresorption jedoch in eine voranschreitende Knochenatrophie über. Bedingt durch die Inaktivität der betroffenen Extremität, aber auch durch den Krankheitsprozess an sich, nimmt die Porösität der Gefäße zu, welches durch den möglichen Austritt von Entzündungsmediatoren die Entzündungsreaktion weiter vorantreibt. Die zunehmende endotheliale Dysfunktion distal des Entzündungszentrums führt zu verminderter Blutzufuhr und verstärkt so den Untergang osteogener Zellen und eine Mangelnde Neuzufuhr an osteogenen Vorläuferzellen. Durch die histomorphometrische Gegenüberstellung der einzelnen Knochenabschnitte konnte ein prozentual abfallendes Trabekelaufkommen von proximal nach distal gezeigt werden, was einen zunehmenden Untergang der Knochenmatrix in die körperstammentfernte Richtung vermuten lässt. Außerdem verfestigt sich die Annahme, dass die Knochenatrophie vom Ursprungsort des traumatischen Vorereignisses ausgeht, da hier die lokale Entzüdungsaktivität am höchsten erscheint. Dieses Bild zeichnet sich sowohl in der Histomorphometrie, als auch in den funktionellen Tests der Fibroblasten ab. Ausgelöst durch verschlechterte Stoffwechselbedingungen und lokalen oxidativen Stress, verschlechtert sich die Morphologie und die Leistung der Zellen des Knorpel- und Knochengewebes. Im chronischen Stadium lässt eine rückläufige interzelluläre Kommunikation, sowie ein Mangel an systemischen und mechanischen Reizen die Knochenhomöostase langsam erlöschen.

Diese Erkenntnisse müssen in der therapeutischen Planung zur Behandlung des CRPS Beachtung finden. Die Chronifizierung stellt nicht nur für den klinischen Zustand und die Remissionschancen des Patienten einen stark negativen Faktor dar, sondern betrifft auch den Knochenstatus der entsprechenden Extremität. Die Bisphosphonat-Therapie nimmt durch eine Verminderung von Osteolyse im akuten Stadium eine entscheidende Rolle ein und kann den Fortschritt des CRPS und eine damit einhergehende Osteopenie möglicherweise verhindern. Das Verhindern von Osteolyse ist ein wichtiger therapeutischer Bestandteil, allerdings erscheint das knochenabbauende System ohnehin zu geschwächt, um für den Rückgang des Knochengewebes beim chronischen CRPS verantwortlich gemacht werden zu können. Möglicherweise müssten mehr Therapieoptionen zur Stärkung aller zur Knochenhomöostase gehörigen Mediatoren gefunden werden. Ein wesentlich entscheidender Faktor scheint das Zusammenspiel von Immunsystem und Knochenhomöostase zu sein, da eine Eindämmung der chronischen Entzündung den Untergang von Knochengewebe verhindern könnte. Neuere Erkenntnisse in der Forschung zur rheumatoiden Arthritis und in der Krebsforschung haben Erfolge in der Therapie mit monoklonalen Antikörpern gezeigt. So sollen diese Antikörper das frühe Fortschreiten der Entzündungsreaktion eindämmen indem sie gegen entscheidende Mediatoren wirken, so zum Beispiel Tocilizumab gegen IL-6 oder Infliximab, sowie Adalimumab gegen TNF- α (Guder et al., 2020). Weiterhin hat die Osteoporose-Forschung Antikörper wie Romosozumab hervorgebracht, die durch eine Neutralisierung des Botenstoffs Sklerostin dessen Hemmung der Knochenbildung verhindert und die Knochendichte stärkt (Miyauchi et al., 2019). Mit solchen Therapiemöglichkeiten könnte an anderer Stelle angesetzt werden und den negativen Effekten der lokalen Entzündung auf die Knochenhomöostase eventuell entgegengewirkt werden. Die vorliegenden Experimente haben eine erhöhte Expression von Sklerostin mRNA, sowie von mRNA der Entzündungsmediatoren im Bereich des Ursprungstraumas gezeigt, sodass von einem therapeutischen Effekt dieser Antikörper in der frühen

Behandlung des CRPS auszugehen ist. Die Anwendung lokaler Therapiemaßnamen zur Eindämmung des Entzündungsgeschehens und Stärkung der Knochenhomöostase am Ausgangspunkt des CRPS könnte zukünftig weitere Optionen neben den bereits bestehenden systemischen Therapiemaßnahmen bieten. Wie bereits in der Einleitung angedeutet, sollte das Vorkommen von ACPAs weitere Beachtung finden, da diese beispielsweise bereits eine Rolle als prognostischer Faktor bei der Entwicklung einer rheumatoiden Arthritis einnehmen und diese ein mögliches Ziel bei einer frühen antiinflammatorischen Therapie darstellen könnten (Gross et al., 2009) (Guder et al., 2020). Eine möglichst frühzeitige Diagnosestellung mit sofortigem Therapiebeginn stellt bereits einen der wichtigsten prognostischen Faktoren für die weitere Entwicklung eines CRPS dar. Auch die Untersuchungen dieser Arbeit zeigen, dass ein chronisches CRPS wenig Angriffsfläche für therapeutische Maßnahmen bietet. Für zukünftige Studien ist die weitere Bewertung aller untersuchten Faktoren in größeren Probenzahlen notwendig, um die hier gefundenen Ergebnisse und darauf basierenden Schlussfolgerungen weiter zu bewerten. Auch der forcierte Vergleich mit gesunden Kontrollen vergleichbarer Patientengruppen unterstützt die Evaluation der zukünftigen Forschung.

5. Zusammenfassung

Das CRPS stellt ein vielschichtiges Krankheitsbild dar: es beginnt mit einem posttraumatisch exazerbierten Inflammationsgeschehen und kann in einigen Fällen durch Atrophien und chronische Schmerzzustände zu einem völligen Funktionsverlust der betroffenen Extremität führen. Da das Knochengewebe physiologischerweise einer kontinuierlichen, systemisch angepassten Reorganisation unterliegt, kann die Knochenhomöostase bei Belastungsumständen schnell in Dysbalance geraten. Chronische Entzündungszustände führen unweigerlich zur Degeneration von Knochengewebe, indem der Knochenabbau gefördert wird. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss einer Chronifizierung des CRPS auf das zum knöchernen Skelett gehörigen Gewebe zu konkretisieren. Dabei wurde speziell die Mirkoarchitektur des Knochens, das Zell- und Gefäßaufkommen, die Morphologie der Knochenzellen, die Morphologie und Vitalität der Fibroblasten, sowie die Genexpression der Knochenzellen berücksichtigt. Unterschiede von proximalen zu distalen Anteilen der Extremität wurden mit einbezogen.

Anhand einer von CRPS betroffenen, amputierten oberen Extremität konnten Knochenschnitte und -schliffe hergestellt und synoviale Fibroblasten kultiviert werden. Außerdem wurde mRNA aus dem knöchernen Gewebe des Amputats extrahiert. Es wurden Übersichts-, enzymhistochemische- und immunhistochemische Färbungen der Schnitte und Schliffe vorgenommen, um diese histomorphometrisch auswerten zu können. Die Morphologie der Knochenzellen wurde mittels TEM begutachtet. Auf Basis einer Kultivierung von synovialen Fibroblasten konnten ein funktioneller Vitatitätsassay (MTT-Test), sowie ein IL-6-Assay durchgeführt werden. Die Auswertung fand mithilfe des Wilcoxon-Rangsummen-Tests und des H-Tests von Kruskal-Wallis, als nicht-parametrische Testverfahren statt. Die Genexpression von Entzündungs- und nervalen Schmerzmediatoren, sowie Mediatoren der Knochenhomöostase konnte mittels *realtime* PCR nachgewiesen werden. Für einige Primer musste die *realtime* PCR vorab mit Standards etabliert werden.

Es zeigten sich rarefizierte Knochentrabekel, eine geschmälerte und diskontinuierliche Kortikalis, ein verringertes Osteoklasten- und Osteoblastenaufkommen, sowie eine schwache Knochendurchblutung. Das Vorkommen knochenhomöostatisch wirksamer Zellen verhielt sich in Richtung Ursprungsort des Traumas gleichermaßen von proximal und distal aus absteigend. Genauso stieg die IL-6 Produktion der synovialen Fibroblasten

in Richtung Traumaursprung von proximal und distal aus an. Alle Knochenzellen wirkten geschädigt und inaktiv, es fanden sich kaum Hinweise auf eine interzelluläre Kommunikation. Die Blutgefäßwände waren porös und ausgedünnt, die Vitalität der synovialen Fibroblasten war deutlich eingeschränkt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Knochenhomöostase durch das CRPS einer chronischen Entzündungsreaktion zum Opfer fällt und ihr damit jegliche Bestehensgrundlage genommen wird. Der Untergang des Knochengewebes im chronischen Stadium des CRPS ist demnach nicht mehr auf eine gesteigerte Osteolyse zurückzuführen, sondern auf einen Gewebezerfall. Alles, was die Homöostase des skelettalen Systems am Leben erhält, mechanische Reize, die Zufuhr systemischer Mediatoren über das Blut, die interzelluläre Kommunikation, wird lokalisiert eingestellt. Die Entzündungsreaktion scheint sich vom Ursprungsort des Traumas nach distal auszubreiten, welches einen lokal begrenzten generalisierten Zelluntergang nach sich zieht.

6. Summary

CRPS describes a multilayered clinical picture: it starts with a posttraumatic exacerbated inflammatory proceeding and can develop into a total loss of function of the affected limb through atrophy and chronic pain. Bone tissue physiologically underlies a continuous reorganization, which is adapted to systemic factors. Conditions of stress can easily bring imbalance to bone homeostasis. A chronic condition of inflammation inevitably leads to degeneration of bone tissue, by supporting degradation. The aim of the thesis was to concretize the impact of a chronified CRPS on the tissue belonging to the osseous skeleton. Thereby especially the microarchitecture of the bone, the emerge of cells and vessels, the morphology of bone cells, the morphology and viability of fibroblasts, as well as the gene expression of bone cells was considered. Differences between proximal and distal parts of the extremity were taken into account.

By means of an amputated upper limb, which was affected by CRPS, histological slides could be established, RNA could be gained and synovial fibroblasts could be cultivated. Overviewstaining, histochemical staining of enzymes and immunohistochemical staining were performed with the histological slides, to evaluate them histomorphometrically. The morphology of the bone cells was examined by TEM. On the basis of a cultivation of synovial fibroblasts, a functional analysis of cell viability (MTT-assay) and an IL-6 assay were executed. The results were evaluated with the aid of the Wilcoxon-Rangsummen-Test and the H-Test by Kruskal-Wallis, both non-parametric tests. The gene expression of proinflammatory- and pain-related mediators, as well as mediators of bone homeostasis could be proved by realtime PCR. For some primers, the realtime PCR had to be established through standards in advance.

It appeared to show rarified trabecular bone, a narrowed and discontinuous cortical bone, a reduced emerge of osteoclasts and osteoblasts, furthermore an insufficient perfusion of the bone. The appearance of cells participating in bone homeostasis decreased, both from proximal and distal towards the place of traumatic origin. At the same time, the IL-6 production of synovial fibroblasts increased from proximal and distal towards the place of traumatic origin. All bone cells seemed damaged and inactive, there was nearly no evidence for intercellular communication. The blood vessels were in a bad condition, the cell activity of the synovial fibroblasts was clearly restricted. To sum up, bone homeostasis falls victim to a chronic inflammatory reaction through CRPS und thereby loses any basis for existence. According to that, the decline of bone tissue in the chronic stadium of CRPS cannot be led back to an increased osteolysis anymore, but to a decay of tissue. Everything that keeps the homeostasis of the skeletal system alive, like mechanic stimuli, the supply with systemic mediators through the blood or intercellular communication, is abandoned. The inflammatory reaction seems to spread from the origin of trauma to distal of it and causes a locally restricted generalized decline of cells.

7. Verzeichnisse

7.1 Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin-Biotin-Enzymkomplex
ACh	Acetylcholin
ACPA	Anticitrullinierte Protein/Peptid-Antikörper
AK	Antikörper
ALP	Alkalische Phosphatase
Art.	Articulatio
ASMA	Alpha Smooth Muscle-Actin
BAr	Bone Area
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BS	Bone Surface
BV	Bone Volume
B2M	Beta-Mikroglobulin
CAr	Cortical Area
cDNA	Complementary Desoxyribonucleic Acid
СК	Cytokine
СР	Crossing Point
CRP	C-reaktives Protein
CRPS	Complex Regional Pain Syndrome / Komplexes Regionales
	Schmerzsyndrom
CT	Cardiotrophin
CV	Cortical Volume
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphospate
DPD	Deoxypyridinoline
DRG	Dorsal Root Ganglion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EZ	Endothelzelle
F	Fettvakuole

FGF	Fibroblast Growth Factor
FKS	Fetales Kälberserum
gDNA	Genomische DNA
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HL	Howship-Lakune
HR-pQCT	High-Resolution Peripheral Quantitative Computed
	Tomography
IASP	International Association for the Study of Pain
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
K	Kanalikulie
КО	Kortikalis
KP	Kapillare
Μ	Molar
mm	Millimeter
MCSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
mKM	Mineralisierte Knochenmatrix
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
M2-R	Muskarinischer Rezeptor Typ 2
Ν	Nukleus
Na	Natrium
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
NK	Neurokinin
nm	Nanometer
NSAID	Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug
OB	Osteoblast
OBA	Osteoblastenanteil
OC	Osteocyt
OI	Osteoid
OK	Osteoklast
OKA	Osteoklastenanzahl
OK-VZ	Osteoklasten-Vorläuferzellen

OSM	Oncostatin M
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehydlösung
PG	Prostaglandine
PGE2	Prostaglandin-E ₂
PIS	Portion Pen Strept
RANK	Receptor Activator of NF-KB
RANKL	Receptor Activator of NF-kB Ligand
RB	Ruffled Border
ROI	Region Of Interest
RPM	Revolutions Per Minute
RT	Reverse Transkriptase
rTMS	Repetitive Transcranial Magnetic Stimulation
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction / Reverse
	Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
S	Sekunde
SCS	Spinal Chord Stimulation
SP	Substanz P
SPECT	Single Photon Emission Computed Tomography
SZ	Saumzelle (bone lining cell)
TB	Trabekel
TBS	Tris-NaCl-Puffer
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAP	Tartrate-Resistant Acid Phosphatase / Tartrat-Resistente Saure
	Phosphatase
TV	Tissue Volume
WPNS	Wireless Peripheral Nerve Stimulation
ZNS	Zentrales Nervensystem
μm	Mikrometer

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Knochenstoffwechsel – Resorptionsphase	4
Abbildung 2: Der Knochenstoffwechsel – Umkehr- und Neoformierungsphase	6
Abbildung 3: Gelenke der Hand, Ansicht von dorsal	8
Abbildung 4: Knöcherne Anatomie der Hand, Ansicht von ventral	9
Abbildung 5: Extremität mit CRPS	11
Abbildung 6: Therapieschema des CRPS (nach der Leitlinie der Deutschen Gesel	lschaft
für Neurologie)	18
Abbildung 7: Vorgehensweise der histomorphometrischen Auswertung	30
Abbildung 8: Auswahl der ROI	31
Abbildung 9: Homogener Zellrasen kultivierter Fibroblasten am Beispiel einer	
gesunden Kontrolle	33
Abbildung 10: Ablauf der nested PCR	41
Abbildung 11: HE-Färbungen der proximalen Extremität	46
Abbildung 12: HE-Färbungen der distalen Extremität	47
Abbildung 13: HE-Färbung des Articulatio interphalangealis distalis	47
Abbildung 14: Kossa van Gieson Färbung	49
Abbildung 15: TRAP-Färbung	50
Abbildung 16: ALP-Färbung	51
Abbildung 17: ASMA-Färbung	52
Abbildung 18: ASMA-Färbung	52
Abbildung 19: Prozentuales Trabekelaufkommen	53
Abbildung 20: Prozentuales Trabekelaufkommen	54
Abbildung 21: Prozentuales Kortikalisvolumen	55
Abbildung 22: Mittlere Kortikalisbreite	55
Abbildung 23: Relative Osteoblastendichte, von proximal nach distal	56
Abbildung 24: Relative Osteoklastendichte, von proximal nach distal	57
Abbildung 25: Darstellung der Saumzellen im TEM	58
Abbildung 26: Darstellung der Osteocyten im TEM	58
Abbildung 27: Darstellung der Osteoblasten im TEM	59
Abbildung 28: Darstellung der Osteoblasten im TEM	60
Abbildung 29: Darstellung der Blutgefäße im TEM	60
Abbildung 30: Kultivierte synoviale Fibroblasten (20.000 Zellen/cm ²)	61
Abbildung 31: Kultivierte synoviale Fibroblasten (20.000 Zellen/cm ²)	62

Abbildung 32: Kultivierte synoviale Fibroblasten (20.000 Zellen/cm ²)	63
Abbildung 33: Vergleich beider Proben-Gruppen im MTT-Test	66
Abbildung 34: Vergleich aller CRPS-Proben mit den gesunden Kontrollen im	MTT-Test
	67
Abbildung 35: Vergleich beider Proben-Gruppen im IL-6 Immunoassay	69
Abbildung 36: Vergleich aller CRPS-Proben mit den gesunden Kontrollen in a	ler IL-6
Produktion	_69
Abbildung 37: Real-time RT-PCR des inflammatorischen Mediators IL-6	71
Abbildung 38: Real-time RT-PCR des inflammatorischen Mediators TNF- α	72
Abbildung 39: Real-time PCR von Cathepsin K als metabolischem Marker	73
Abbildung 40: Real-time PCR von ALP als metabolischem Marker	73
Abbildung 41: Real-time PCR von Sklerostin als metabolischem Marker	74
Abbildung 42: Realtime PCR von BDNF als Marker für das Nervensystem	74
Abbildung 43: Realtime PCR des Substanz P-Rezeptors als Marker für das	
Nervensystem	75

7.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Primersequenzen zur Etablierung der realtime	е
PCR	_40
Tabelle 2: Auflistung der PCR-Protokolle	_43
Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Primersequenzen zur Durchführung der realt	ime
PCR	_44
Tabelle 4: Vergleichende Messungen zur Morphologie der kultivierten synovialen	
Fibroblasten	_64
Tabelle 5: Zellvitalitäts-Messung der synovialen Fibroblasten aller Zellkulturen	_65
Tabelle 6: Zellvitalität der synovialen Fibroblasten	_65
Tabelle 7: Optische Dichtemessung zur Quantifizierung der IL-6 Produktion der	
synovialen Fibroblasten	_68

- Allen, G., Galer, B. S., & Schwartz, L. (1999). Epidemiology of complex regional pain syndrome: A retrospective chart review of 134 patients. *Pain*, 80(3), 539–544.
- Bazika-Gerasch, B., Maier, C., Kumowski, N., Fiege, C., Kaisler, M., Vollert, J., & Dietrich, J. W. (2019). Compared to limb pain of other origin, ultrasonographic osteodensitometry reveals loss of bone density in complex regional pain syndrome. *Pain*, 160(6), 1261.
- Bean, D. J., Johnson, M. H., & Kydd, R. R. (2014). The Outcome of Complex Regional Pain Syndrome Type 1: A Systematic Review. *The Journal of Pain*, 15(7), 677– 690.
- Beerthuizen, A., Stronks, D., Spijker, A. van't, Yaksh, A., Hanraets, B., Klein, J., & Huygen, F. (2012). Demographic and medical parameters in the development of complex regional pain syndrome type 1 (CRPS1): Prospective study on 596 patients with a fracture. *Pain*, 153(6), 1187–1192.
- Bellingham, G. A., Smith, R. S., Morley-Forster, P., & Murkin, J. M. (2014). Use of near infrared spectroscopy to detect impaired tissue oxygen saturation in patients with complex regional pain syndrome type 1. *Canadian Journal of Anesthesia/Journal Canadien d'anesthésie*, 61(6), 563–570.
- Bernstein, C. N., Blanchard, J. F., Leslie, W., Wajda, A., & Yu, B. N. (2000). The incidence of fracture among patients with inflammatory bowel disease. A population-based cohort study. *Annals of Internal Medicine*, 133(10), 795–799.
- Birklein, F., Drummond, P. D., Li, W., Schlereth, T., Albrecht, N., Finch, P. M., Dawson, L. F., Clark, J. D., & Kingery, W. S. (2014). Activation of cutaneous immune responses in complex regional pain syndrome. *The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society*, 15(5), 485–495.
- Birklein F. et al. (2018). Diagnostik und Therapie komplexer regionaler Schmerzsyndrome (CRPS), S1-Leitlinie. *Deutsche Gesellschaft für Neurologie* (*Hrsg.*), Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. www.dgn.org/leitlinien
- Bodde, M., Dijkstra, P., Dunnen, W. den, & Geertzen, J. (2011). Therapy-Resistant Complex Regional Pain Syndrome Type I: To Amputate or Not? *The Journal of Bone & Joint Surgery*, 93(19), 1799–1805.
- Borchers, A. T., & Gershwin, M. E. (2014). Complex regional pain syndrome: A comprehensive and critical review. *Autoimmunity Reviews*, *13*(3), 242–265.

- Charles, J. F., & Aliprantis, A. O. (2014). Osteoclasts: More than 'bone eaters'. *Trends in molecular medicine*, *20*(8), 449–459.
- Cossins, L., Okell, R. W., Cameron, H., Simpson, B., Poole, H. M., & Goebel, A. (2013).
 Treatment of complex regional pain syndrome in adults: A systematic review of randomized controlled trials published from June 2000 to February 2012.
 European Journal of Pain, 17(2), 158–173.
- de Mos, M., de Bruijn, A. G. J., Huygen, F. J. P. M., Dieleman, J. P., Stricker, C. B. H.,
 & Sturkenboom, M. C. J. M. (2007). The incidence of complex regional pain syndrome: A population-based study. *Pain*, *129*(1), 12.
- de Mos, M., Huygen, F. J. P. M., Dieleman, J. P., Koopman, J. S. H. A., Stricker, B. H. C., & Sturkenboom, M. C. J. M. (2008). Medical history and the onset of complex regional pain syndrome (CRPS). *Pain*, 139(2), 458–466.
- de Rooij, A. M., de Mos, M., Sturkenboom, M. C. J. M., Marinus, J., van den Maagdenberg, A. M. J. M., & van Hilten, J. J. (2009). Familial occurrence of complex regional pain syndrome. *European Journal of Pain*, 13(2), 171–177.
- Dirckx, M., Schreurs, M. W. J., de Mos, M., Stronks, D. L., & Huygen, F. J. P. M. (2015). The prevalence of autoantibodies in complex regional pain syndrome type I. *Mediators of Inflammation*, 2015, 718201.
- Donath, K., & Breuner, G. (1982). A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) Technique. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 11(4), 318–326.
- Eriksen, E. F. (2010). Cellular mechanisms of bone remodeling. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 11(4), 219–227.
- Everts, V., Delaissé, J. M., Korper, W., Jansen, D. C., Tigchelaar-Gutter, W., Saftig, P., & Beertsen, W. (2002). The bone lining cell: Its role in cleaning Howship's lacunae and initiating bone formation. *Journal of Bone and Mineral Research: The Official Journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, 17(1), 77–90.
- Flor, H. (2017). Home training in sensorimotor discrimination reduces pain in complex regional pain syndrome (CRPS). *Scandinavian Journal of Pain*, 15(Supplement C), 113–114.
- Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. da S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of bone tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed Research International*, 2015, 1-17.

- Galea, G. L., Lanyon, L. E., & Price, J. S. (2017). Sclerostin's role in bone's adaptive response to mechanical loading. *Bone*, *96*, 38–44.
- Galer, B. S., & Jensen, M. (1999). Neglect-like symptoms in complex regional pain syndrome: Results of a self-administered survey. *Journal of Pain and Symptom Management*, 18(3), 213–217.
- Gatti, V., Ghobryal, B., Gelbs, M. J., Gerber, M. B., Doty, S. B., Cardoso, L., & Fritton, S. P. (2019). Botox-induced muscle paralysis alters intracortical porosity and osteocyte lacunar density in skeletally mature rats. *Journal of Orthopaedic Research*, 37(5), 1153–1163.
- Ghai, B., & Dureja, G. P. (2004). Complex regional pain syndrome: A review. *Journal of Postgraduate Medicine*, *50*(4), 300.
- Ginaldi, L., & De Martinis, M. (2016). Osteoimmunology and beyond. *Current Medicinal Chemistry*, 23(33), 3754–3774.
- Giusti, A., & Bianchi, G. (2015). Treatment of complex regional pain syndrome type I with bisphosphonates. *RMD Open*, *1*(Suppl 1), e000056.
- Goebel, A., Barker, C., Birklein, F., Brunner, F., Casale, R., Eccleston, C., Eisenberg, E., McCabe, C. S., Moseley, G. L., Perez, R., Perrot, S., Terkelsen, A., Thomassen, I., Zyluk, A., & Wells, C. (2019). Standards for the diagnosis and management of complex regional pain syndrome: Results of a European Pain Federation task force. *European Journal of Pain*, 23(4), 641–651.
- Gross, W. L., Moosig, F., & Lamprecht, P. (2009). Anti-citrullinated protein-peptide antibodies in rheumatoid arthritis. *Deutsches Aerzteblatt*, 106(10), 157-8.
- Guder, C., Gravius, S., Burger, C., Wirtz, D. C., & Schildberg, F. A. (2020). Osteoimmunology: A current update of the interplay between bone and the immune system. *Frontiers in Immunology*, 11, 58.
- Harden, N. R., Bruehl, S., Perez, R. S. G. M., Birklein, F., Marinus, J., Maihofner, C., Lubenow, T., Buvanendran, A., Mackey, S., Graciosa, J., Mogilevski, M., Ramsden, C., Chont, M., & Vatine, J.-J. (2010). Validation of proposed diagnostic criteria (the "Budapest Criteria") for complex regional pain syndrome. *Pain*, *150*(2), 268.
- Harden, R. N., Oaklander, A. L., Burton, A. W., Perez, R. S. G. M., Richardson, K., Swan, M., Barthel, J., Costa, B., Graciosa, J. R., & Bruehl, S. (2013). Complex regional pain syndrome: Practical diagnostic and treatment guidelines, 4th edition. *Pain Medicine*, 14(2), 180–229.

- Herschkowitz, D., & Kubias, J. (2019). A case report of wireless peripheral nerve stimulation for complex regional pain syndrome type-I of the upper extremity: 1 year follow up. *Scandinavian Journal of Pain, 19*(4), 829-835.
- Ida-Yonemochi, H., Yamada, Y., Yoshikawa, H., & Seo, K. (2017). Locally produced BDNF promotes sclerotic change in alveolar bone after nerve injury. *Plos one*, *12*(1), e0169201.
- Iolascon, G., de Sire, A., Moretti, A., & Gimigliano, F. (2015). Complex regional pain syndrome (CRPS) type I: Historical perspective and critical issues. *Clinical Cases* in Mineral and Bone Metabolism, 12(Suppl 1), 4–10.
- Juottonen, K., Gockel, M., Silén, T., Hurri, H., Hari, R., & Forss, N. (2002). Altered central sensorimotor processing in patients with complex regional pain syndrome. *Pain*, 98(3), 315.
- Kim, H., Lee, C.-H., Kim, S.-H., & Kim, Y.-D. (2018). Epidemiology of complex regional pain syndrome in Korea: An electronic population health data study. *Plos* one, 13(6), e0198147.
- Kingery, W. S. (2010). Role of neuropeptide, cytokine, and growth factor signaling in complex regional pain syndrome. *Pain Medicine (Malden, Mass.)*, 11(8), 1239– 1250.
- Kleyer, A., & Schett, G. (2014). Arthritis and bone loss: A hen and egg story. *Current Opinion in Rheumatology*, 26(1), 80–84.
- Kotake, S., Udagawa, N., Takahashi, N., Matsuzaki, K., Itoh, K., Ishiyama, S., Saito, S., Inoue, K., Kamatani, N., Gillespie, M. T., Martin, T. J., & Suda, T. (1999). IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *The Journal of Clinical Investigation*, 103(9), 1345–1352.
- Krämer, H., Eberle, T., Üçeyler, N., Wagner, I., Klonschinsky, T., Müller, L., Sommer, C., & Birklein, F. (2011). TNF-alpha in CRPS and 'normal' trauma – Significant differences between tissue and serum. *Pain*, 152(2), 285–290.
- Krämer, H. H., Hofbauer, L. C., Szalay, G., Breimhorst, M., Eberle, T., Zieschang, K., Rauner, M., Schlereth, T., Schreckenberger, M., & Birklein, F. (2014).
 Osteoprotegerin: A new biomarker for impaired bone metabolism in complex regional pain syndrome? *Pain*, 155(5), 889–895.
- Lange, U., Teichmann, J., Müller-Ladner, U., & Strunk, J. (2005). Increase in bone mineral density of patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF-α

antibody: A prospective open-label pilot study. *Rheumatology*, 44(12), 1546–1548.

- Lange, U., Teichmann, J., Schett, G., Neumann, E., & Müller-Ladner, U. (2013). Osteoimmunology: How inflammation influences bone metabolism. *Deutsche Medizinische Wochenschrift (1946)*, 138(37), 1845–1849.
- Lee, S.-K., Gardner, A. E., Kalinowski, J. F., Jastrzebski, S. L., & Lorenzo, J. A. (2006). RANKL-stimulated osteoclast-like cell formation in vitro is partially dependent on endogenous interleukin-1 production. *Bone*, 38(5), 678–685.
- Lenz, M., Uçeyler, N., Frettlöh, J., Höffken, O., Krumova, E. K., Lissek, S., Reinersmann,
 A., Sommer, C., Stude, P., Waaga-Gasser, A. M., Tegenthoff, M., & Maier, C.
 (2013). Local cytokine changes in complex regional pain syndrome type I (CRPS I) resolve after 6 months. *Pain*, *154*(10), 2142–2149.
- Lewis, J. S., & Schweinhardt, P. (2012). Perceptions of the painful body: The relationship between body perception disturbance, pain and tactile discrimination in complex regional pain syndrome. *European Journal of Pain (London, England)*, 16(9), 1320–1330.
- Li, F.-X.-Z., Xu, F., Lin, X., Wu, F., Zhong, J.-Y., Wang, Y., Guo, B., Zheng, M.-H., Shan, S.-K., & Yuan, L.-Q. (2020). The role of substance P in the regulation of bone and cartilage metabolic activity. *Frontiers in Endocrinology*, 11, 77.
- Malone, J. D., Teitelbaum, S. L., Griffin, G. L., Senior, R. M., Kahn, A. J. (1982). Recruitment of osteoclast precursors by purified bone matrix constituents. *The Journal of Cell Biology*, 92(1), 227–230.
- Marchev, A. S., Dimitrova, P. A., Burns, A. J., Kostov, R. V., Dinkova-Kostova, A. T., & Georgiev, M. I. (2017). Oxidative stress and chronic inflammation in osteoarthritis: Can NRF2 counteract these partners in crime? *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1401(1), 114–135.
- Matayoshi, T., Goto, T., Fukuhara, E., Takano, H., Kobayashi, S., & Takahashi, T. (2005). Neuropeptide substance P stimulates the formation of osteoclasts via synovial fibroblastic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 327(3), 756–764.
- Miyasaka, M. & Takatsu, K. (Hrsg.). Kikuta, J., Nishikawa, K., Ishii, M. (2016). Macrophage dynamics during bone resorption and chronic inflammation. *Chronic Inflammation, Mechanisms and Regulation (1)*. Springer Japan. 133-145.

- Miyauchi, A., Dinavahi, R. V., Crittenden, D. B., Yang, W., Maddox, J. C., Hamaya, E., Nakamura, Y., Libanati, C., Grauer, A., & Shimauchi, J. (2019). Increased bone mineral density for 1 year of romosozumab, vs placebo, followed by 2 years of denosumab in the Japanese subgroup of the pivotal FRAME trial and extension. *Archives of Osteoporosis*, 14(1), 59.
- Neumann, E., & Schett, G. (2007). Bone metabolism: Molecular mechanisms. *Zeitschrift für Rheumatologie*, 66(4), 286–289.
- Oehler, N., Rolvien, T., Schmidt, T., Butscheidt, S., Oheim, R., Barvencik, F., & Mussawy, H. (2019). Bone microstructure is significantly altered in CRPSaffected distal tibiae as detected by HR-pQCT: A retrospective cross-sectional study. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 37(4), 741–748.
- Picarelli, H., Teixeira, M. J., de Andrade, D. C., Myczkowski, M. L., Luvisotto, T. B., Yeng, L. T., Fonoff, E. T., Pridmore, S., & Marcolin, M. A. (2010). Repetitive transcranial magnetic stimulation is efficacious as an add-on to pharmacological therapy in complex regional pain syndrome (CRPS) Type I. *The Journal of Pain*, *11*(11), 1203–1210.
- Reddi, D., & Curran, N. (2014). Chronic pain after surgery: Pathophysiology, risk factors and prevention. *Postgraduate Medical Journal*, 90(1062), 222–227.
- Resmini, G., Ratti, C., Canton, G., Murena, L., Moretti, A., & Iolascon, G. (2015). Treatment of complex regional pain syndrome. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 12(Suppl 1), 26–30.
- Rijn, van M. A., Munts, A. G., Marinus, J., Voormolen, J. H. C., de Boer, K. S., Teepe-Twiss, I. M., van Dasselaar, N. T., Delhaas, E. M., & van Hilten, J. J. (2009). Intrathecal baclofen for dystonia of complex regional pain syndrome. *Pain*, *143*(1), 41–47.
- Sandroni, P., Benrud-Larson, L. M., McClelland, R. L., & Low, P. A. (2003). Complex regional pain syndrome type I: Incidence and prevalence in Olmsted county, a population-based study. *Pain*, 103(1–2), 199–207.
- Schattschneider, J., Binder, A., Siebrecht, D., Wasner, G., & Baron, R. (2006). Complex regional pain syndromes: The influence of cutaneous and deep somatic sympathetic innervation on pain. *The Clinical Journal of Pain*, 22(3), 240–244.
- Schett, G., Kiechl, S., Weger, S., Pederiva, A., Mayr, A., Petrangeli, M., Oberhollenzer, F., Lorenzini, R., Redlich, K., Axmann, R., Zwerina, J., & Willeit, J. (2006). High-

sensitivity C-reactive protein and risk of nontraumatic fractures in the Bruneck study. *Archives of Internal Medicine*, *166*(22), 2495–2501.

- Scholz, J, Finnerup, N. B., Attal, N., Aziz, Q., Baron, R. Bennett, M. I., Benoliel, R., Cohen, M., Cruccu, G., Davis, K. D., Evers, S., First, M., Giamberardinio, M. A., Hansson, P., Kaasa, S., Korwisi, B., Kosek, E., Lavand'homme, P., Nicholas, M., Nurmikko, T., Perrot, S., Raja, S. N., Rice, A. S. C., Rowbotham, M. C., Schug, S., Simpson, D. M., Smith, B. H., Svensson, P., Vlaeyen, J. W. S., Wang, S.-J., Barke, A., Rief, W., & Treede, R.-D. (2019). The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. *Pain, 160* (1), 53-59.
- Schrier, E., Dijkstra, P. U., Zeebregts, C. J., Wolff, A. P., & Geertzen, J. H. B. (2018). Decision making process for amputation in case of therapy resistant complex regional pain syndrome type-I in a Dutch specialist centre. *Medical Hypotheses*, 121, 15–20.
- Schünke, M., Schulte, E., Schumacher, U., Voll, M., & Wesker, K. (Hrsg.) (2011). Allgemeine Anatomie und Bewegungssystem: 182 Tabellen (3., überarb. und erw. Aufl). Thieme. 252-253.
- Simm, P. J., Briody, J., McQuade, M., & Munns, C. F. (2010). The successful use of pamidronate in an 11-year-old girl with complex regional pain syndrome: Response to treatment demonstrated by serial peripheral quantitative computerised tomographic scans. *Bone*, 46(4), 885–888.
- Sims, N. A., & Gooi, J. H. (2008). Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(5), 444–451.
- Stanton-Hicks, M. d'A. (2019). CRPS: What's in a name? Taxonomy, epidemiology, neurologic, immune and autoimmune considerations. *Regional Anesthesia & Pain Medicine*, 44(3), 376–387.
- Tanaka, K., Hashizume, M., Mihara, M., Yoshida, H., Suzuki, M., & Matsumoto, Y. (2014). Anti-interleukin-6 receptor antibody prevents systemic bone mass loss via reducing the number of osteoclast precursors in bone marrow in a collagen-induced arthritis model. *Clinical and Experimental Immunology*, 175(2), 172–180.
- Thompson, M. L., Jimenez-Andrade, J. M., & Mantyh, P. W. (2016). Sclerostin immunoreactivity increases in cortical bone osteocytes and decreases in articular

cartilage chondrocytes in aging mice. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 64(3), 179–189.

- Tong, X., Burton, I. S., Isaksson, H., Jurvelin, J. S., & Kröger, H. (2015). Cortical bone histomorphometry in male femoral neck: The investigation of age-association and regional differences. *Calcified Tissue International*, 96(4), 295–306.
- van Rooijen, D. E., Roelen, D. L., Verduijn, W., Haasnoot, G. W., Huygen, F. J. P. M., Perez, R. S. G. M., Claas, F. H. J., Marinus, J., van Hilten, J. J., & van den Maagdenberg, A. M. J. M. (2012). Genetic HLA associations in complex regional pain syndrome with and without dystonia. *The Journal of Pain: Official Journal* of the American Pain Society, 13(8), 784–789.
- Veldman, P. H., Reynen, H. M., Arntz, I. E., & Goris, R. J. (1993). Signs and symptoms of reflex sympathetic dystrophy: Prospective study of 829 patients. *Lancet* (London, England), 342(8878), 1012–1016.
- Walker, E. C., McGregor, N. E., Poulton, I. J., Pompolo, S., Allan, E. H., Quinn, J. M. W., Gillespie, M. T., Martin, T. J., & Sims, N. A. (2008). Cardiotrophin-1 is an osteoclast-derived stimulus of bone formation required for normal bone remodeling. *Journal of Bone and Mineral Research*, 23 (12), 2025-2032.
- Wasner, G., Schattschneider, J., Heckmann, K., Maier, C., & Baron, R. (2001). Vascular abnormalities in reflex sympathetic dystrophy (CRPS I): Mechanisms and diagnostic value. *Brain: A Journal of Neurology*, 124(Pt 3), 587–599.
- Wei, T., Guo, T.-Z., Li, W.-W., Kingery, W. S., & Clark, J. D. (2016). Acute versus chronic phase mechanisms in a rat model of CRPS. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 14.
- Wei, T., Li, W., Guo, T.-Z., Zhao, R., Wang, L., Clark, D. J., Oaklander, A. L., Schmelz, M., & Kingery, W. S. (2009). Post-junctional facilitation of substance P signaling in a tibia fracture rat model of complex regional pain syndrome type I. *Pain*, 144(3), 278–286.
- Welsch, U., & Deller, T. (Hrsg.) (2010). *Lehrbuch Histologie* (3. Aufl). Elsevier, Urban& Fischer. 108-120
- Wong, P. K. K., Quinn, J. M. W., Sims, N. A., van Nieuwenhuijze, A., Campbell, I. K., & Wicks, I. P. (2006). Interleukin-6 modulates production of T lymphocytederived cytokines in antigen-induced arthritis and drives inflammation-induced osteoclastogenesis. *Arthritis and Rheumatism*, 54(1), 158–168.
Yang, Y., Zheng, X., Li, B., Jiang, S., & Jiang, L. (2014). Increased activity of osteocyte autophagy in ovariectomized rats and its correlation with oxidative stress status and bone loss. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 451(1), 86–92.

9. Publikationen

9.1 Poster

Langer, S. M.; Beckmann, J.; Szalay, G.; Heiss, C.; Krämer, H. H.; Lips, K. S. (2015). Untersuchung von Knochen- und Gelenkproben der oberen Extremität einer CRPS (Complex Regional Pain Syndrom) -Patientin. *Von-Behring-Röntgen-Symposium 2015, Gießen.*

9. Ehrenwörtliche Erklärung

"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

10. Danksagung

Danke an...

... Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. C. Heiß, für die Möglichkeit der Anfertigung einer Doktorarbeit in der experimentellen Unfallchirurgie

... Prof. Dr. K. S. Lips, für die stets zuverlässige und motivierende Betreuung

... Prof. Dr. G. Szalay, für die engagierte Bereitstellung des Untersuchungsmaterials

... allen Mitarbeitern/innen und ehemaligen Mitarbeitern/innen des Labors für experimentelle Unfallchirurgie, darunter besonders Ida Oberst, Ivonne Bergen und Olga Dakischew, für die herzliche und geduldige Einarbeitung und Unterstützung

... die anonym bleibende CRPS-Patientin, ohne deren beispiellosen Einsatz für die Wissenschaft die vorliegende Forschungsarbeit nicht möglich gewesen wäre

... die vielen Menschen an meiner Seite, die mir den Rücken freigehalten haben und Motivation leisten konnten; meine Eltern, Geschwister, Großeltern und Freunde, sowie mein kritischer und gewissenhafter Korrektor, wodurch es immer wieder möglich wurde, neue Energie zu schöpfen