

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
Klinik für Orthopädie
Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**"Expression von Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2)
während der Knochenentwicklung, der physiologischen
Knochenheilung und der durch systemisch appliziertes
Wachstumshormon (GH) stimulierten Knochenheilung"**

zur Erlangung der akademischen Grads
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Cem Yetimoglu

aus Lindau/Bodensee

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. H.-J. Bail
2. Prof. Dr. med. A. Seekamp
3. Prof. Dr. med. U. Stöckle

Datum der Promotion: 07. Dezember 2007

"Erst die wissenschaftliche Auseinandersetzung mit der Frage, was die individuelle Wirklichkeit eines Menschen für seine Gesundheit und Krankheit bedeutet, macht Medizin zu Humanmedizin und zu einer Wissenschaft vom Menschen."

Thure von Uexküll

*Allen meinen Lieben,
insbesondere Lucy und Fernanda*

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Entstehung und Wachstum von Knochen	2
1.2 Osteogenese während der Fraktur- bzw. Knochenheilung	4
1.3 Botenstoffe der Osteogenese	7
1.3.1 Wachstumshormon (Growth Hormone, GH)	8
1.3.1.1 GH und Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I)	8
1.3.1.2 GH in der Frakturheilung	9
1.3.2 Lokale Wachstumsfaktoren	10
1.3.3 Bone Morphogenetic Protein (BMP)	10
1.3.3.1 BMP-2 während der Entwicklung	11
1.3.3.2 BMP-2 während der Fraktur- und Knochenheilung	11
1.3.3.3 BMP-2 <i>in vitro</i>	12
1.3.3.4 BMP-2 zur Stimulation der Frakturheilung	13
1.4 Arbeitshypothese	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Versuchstiere	15
2.2 Tierhaltung	15
2.3 Osteotomiemodell	15
2.4 Operatives Vorgehen	16
2.4.1 Material	16
2.4.2 Geräte	17

2.4.3	Narkose und Vorbereitung	18
2.4.4	Operationstechnik	18
2.4.5	Gruppeneinteilung	19
2.4.6	Wachstumshormon (GH)	19
2.5	Untersuchungen der Tiere	20
2.5.1	Material	20
2.5.2	Geräte	20
2.5.3	Durchführung	20
2.6	Euthanasie	21
2.6.1	Material	21
2.6.2	Geräte	21
2.6.3	Durchführung	21
2.7	Technik der Fixierung, Dekalzifizierung und Einbettung und Anfertigung der Paraffinschnitte	21
2.7.1	Material	21
2.7.2	Geräte	22
2.7.3	Durchführung	22
2.8	Technik der In Situ Hybridisierung	22
2.8.1	Material	22
2.8.2	Geräte	24
2.8.3	Durchführung	25
2.9	Immunhistologische Technik	30

2.9.1	Material	30
2.9.2	Geräte	31
2.9.3	Durchführung	31
2.10	Auswertung der durchgeführten Untersuchungen	33
2.10.1	Geräte und Durchführung	33
2.10.2	Statistik	34
3	Ergebnisse	35
3.1	BMP-2 Expression am 11. Tag der postnatalen Knochenentwicklung	35
3.1.1	Histologische Färbung mit Alcianblau (HAB)	35
3.1.2	In Situ Hybridisierung (ISH)	36
3.1.3	Immunhistologie (IHC)	39
3.2	BMP-2-Expression in der physiologischen versus durch GH stimulierten Knochenheilung	42
3.2.1	7 Tage nach der Operation	43
3.2.1.1	Histologische Färbung mit Alcianblau (HAB)	43
3.2.1.2	In Situ Hybridisierung (ISH)	46
3.2.1.3	Immunhistologie (IHC)	48
3.2.2	14 Tage nach der Operation	50
3.2.2.1	Histologische Färbung mit Alcianblau (HAB)	50
3.2.2.2	In Situ Hybridisierung (ISH)	52
3.2.2.3	Immunhistologie IHC	53
3.2.3	21 Tage nach der Operation	55

3.2.3.1	Histologische Färbung mit Alcianblau (HAB)	55
3.2.3.2	In Situ Hybridisierung (ISH)	56
3.2.3.3	Immunhistologie (ICH)	58
3.3	Osteoklasten	59
3.4	Auswertung	59
4	Diskussion	63
4.1	Arbeitshypothese	63
4.2	Methoden	65
4.3	BMP-2 während der Entwicklung	67
4.4	Zusammenfassung und Ausblick.	69
	Literaturverzeichnis	71
	Danksagung	79
	Lebenslauf	80
	Vortrag	81
	Eidesstattliche Erklärung	82

Abkürzungen

ABC	Avidin – Biotin – Complex
AP	Alkalische Phosphatase
BG	Bindegewebe
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMPR	Bone Morphogenetic Protein Receptor
Dig-UTP	Digoxigenin markierte Uridin 5-Phosphat Nukleotide
cDNA	copy Desoxiribonucleid Acid
CLU	Zell-Cluster
DNA	Desoxiribonucleid Acid
EDTA	Ethylene Diamine Teraacetic Acid
EO	enchondrale Ossifikation
FGF	Fibroblast Growth Faktor
GE	Gefäßanschnitt
GG	Granulationsgewebe
GK	Geflechtknochen
GH	Growth Hormon
HAB	Histologische Übersichtsfärbung mit Alcianblau
hGH	human Growth Hormon
IGF	Insulin-like Growth Factor
ISH	In Situ Hybridisierung
ICH	Immunhistochemie
Kch	Knochengewebe
Kno	Knorpelgewebe
KO	Kortikalis
mRNA	messenger Ribonucleid Acid
MQ	Makrophage
OKL	Osteoklast
OP	Osteogenetic Protein
OST	Osteotomiespalt
PCR	Polimerase Chain Reaktion
PDGF	Platelate Derived Growth Factor
PO	periostaler Bereich
rF	residueller Freiraum
RT	Raumtemperatur
SSRE	Sher Stress Responsive Element
TGF	Transforming Growth Factor

1. Einleitung

Weltweit werden mehr als 2.2 Millionen Knochentransplantationen im Jahr durchgeführt. Auto- und Allografts werden nach Blutbestandteilen als zweithäufigstes Transplantat verwendet (Fox 1992). Indikationen sind knöcherne Substanzverluste, wie z.B. nach resezierenden Verfahren bei Knochentumoren oder Frakturen bei Osteoporosepatienten. Aufgrund ihrer hohen biologischen Wertigkeit wird als Knochenersatz Spongiosa implantiert bzw. transplantiert. Autologe Spongiosa erfordert jedoch einen zusätzlichen Eingriff. Allografts haben eine begrenzte Verfügbarkeit. Keramik und Kunststoffimplantate verfügen über keine Bioaktivität. Alle Behandlungen können zu Komplikationen wie Infektionen führen.

Seit Ende der 80er Jahre werden Wachstumshormon (Growth Hormone, GH) und Bone Morphogenetic Protein (BMP) rekombinant hergestellt. Beide Substanzen können die Regeneration von Knochengewebe stimulieren. Therapiekonzepte für eine systemische Anwendung von Wachstumshormon und einer lokalen Anwendung von BMP sind in der Entwicklung.

Die systemische Applikation von Wachstumshormon stimuliert die Osteogenese durch eine Beschleunigung der Zellteilung von Osteoblasten, Osteozyten und Chondrozyten. Im Rahmen einer experimentellen Studie an der Charité zu Berlin zeigte die systemische Zufuhr von Wachstumshormon einen positiven Effekt auf die Knochenheilung während der Distractionsosteogenese am Minischwein (*Raschke 2000, Bail 2002, Kolbeck 2003*).

Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) wird in der Europäischen Union seit 2003 als Arzneistoff unter dem Handelsnamen Dibotermis α für die Behandlung von offenen Tibia-Schaftfrakturen angeboten. Es handelt sich um eine lokale Applikation: eine Matrix aus Rinderkollagen wird mit einer BMP-2 Lösung getränkt und während der Operation direkt in die Fraktur implantiert. Für Dibotermis α wurde ein positiver Effekt auf die Heilung im Rahmen einer Phase II Studie (BESTT) nachgewiesen (*Govender et al. 2002*).

Diese neuen Therapieansätze beschleunigen die Fraktur- bzw. die Knochenheilung. Indikationen zur Spongiosatransplantation und eine gewisse Entnahmemorbidity sollen damit verringert werden. Langwierige Komplikationen wie z.B. Infektionen, die zudem Kosten verursachen, sollen vermieden werden.

1.1 Entstehung und Wachstum von Knochen

Die Entwicklung des Skelettes von Vertebraten beginnt in der ersten Woche nach der Befruchtung. Beim Menschen ist am Ende der achten Embryonalwoche ein Modell des Knochengerüsts als Knorpelgewebe angelegt. Im weiteren Verlauf entsteht um die Röhrenknochen eine periostale Knochenmanschette. Ossifikationskerne werden in der Epiphyse angelegt, die postnatal vollständig verknöchern. Das Knochenwachstum beim Menschen ist in der Regel um das 21. Lebensjahr beendet (Abbildung 1a-g).

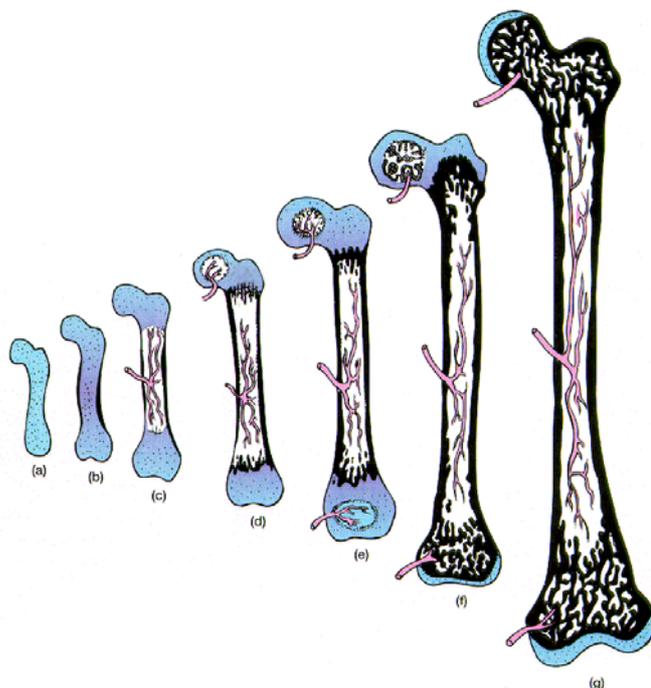


Abbildung 1: Genesis von Röhrenknochen. (a) hyalines Knorpelgerüst, (b) periostale Knochenmanschette, (c) Einsprossung von Gefäßen, (d) Ossifikation weitet sich auf die Knochenenden hin aus, (e) & (f) Formation von sekundären Knochenkernen in den Epiphysen; (g) entwickelter Knochen

Aus : www.wfu.edu/~rossma/bio320/320embryology2.ppt

Mesenchymale Stammzellen

Das Skelett entsteht im wesentlichen aus drei mesenchymalen Stammzellpopulationen. Aus Zellen der kranialen Neuralleiste werden die Schädelknochen gebildet. Zellen des paraaxialen Mesoderm bilden die so genannten Somiten, aus denen die Wirbelsäule hervorgeht. Aus dem Mesoderm der Leibeswand formieren sich durch laterale Ausstülpungen, den so genannten Extremitätenknospen, die Extremitätenknochen.

Migration, Kondensation, Differenzierung

Mesenchymale Stammzellen sind zunächst pluripotent. Durch Migration wandern sie an jene Stellen im Embryo, an denen sich die Elemente des Skeletts formieren. Lokale Wachstumsfaktoren aus dem epithelialen Mesenchym leiten die Kondensation der Zellen ein. Darauf folgt die Differenzierung in Chondrozyten und Osteoblasten (*Hall 2000*).

Intramembranöse Ossifikation

Eine „direkte“ Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Osteoblasten erfolgt in Regionen der zukünftigen Schädelknochen und der Claviculae. Osteoblasten synthetisieren die organischen Bestandteile der extrazellulären Matrix. Diese setzt sich hauptsächlich aus dem Kollagen Typ I und den nicht kollagenen Proteinen Osteonectin, -calcin, -pontin und Sialprotein zusammen. Der anorganische Anteil der Matrix wird aus Hydroxyapatit gebildet.

Chondrale Ossifikation

Teile des Skeletts werden zunächst „indirekt“ durch die Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten angelegt. Das Knorpelgewebe wird fetal und postnatal durch die „chondrale Ossifikation“ und somit „sekundär“ durch Knochen und Knochenmark ersetzt.

Wachstum

Ort des Längenwachstums von Röhrenknochen sind die Epiphysen (Abbildung 2). Chondrozyten proliferieren kontinuierlich und wachsen in die Metaphyse ein. Mit zunehmendem Reifegrad hypertrophieren und degenerieren sie. Gleichzeitig wachsen Osteoblasten in das aufgelöste Knorpelsyntizium ein und synthetisieren Matrixproteine. Mit dem Nachlassen der Mitoseaktivität der Chondrozyten verknöchert die Epiphyse.

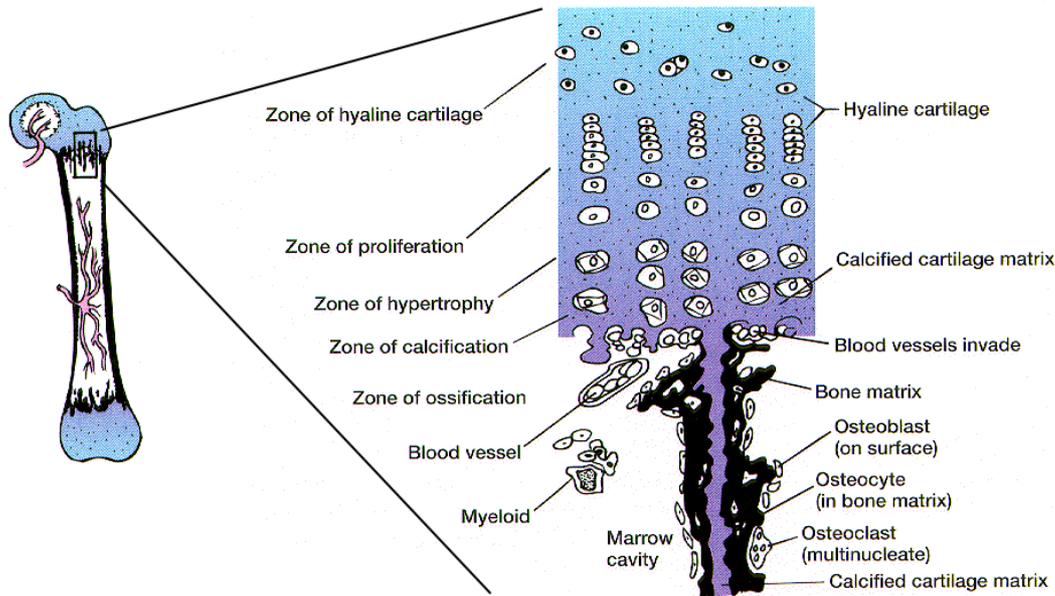


Abbildung 2: Chondrale Ossifikation in der Epi- und Metaphyse
 Aus : www.wfu.edu/~rossma/bio320/320embryology2.ppt

Knochen kann an Breite und Durchmesser nach Beendigung des Längenwachstums noch zunehmen. Ausgehend vom Periost erzeugen Osteoblasten Knochen und verstärken den kortikalen Umfang. Gleichzeitig bauen Osteoklasten endostal Knochensubstanz ab. Somit nimmt der Durchmesser der Kortikalis zu. Die Knochenhomöostase bleibt jedoch auf Grund der Osteoblasten- / Osteoklastenaktivität im Gleichgewicht.

Längen- und Breitenwachstum werden endogen von lokalen und systemischen Wachstumsfaktoren reguliert. Weitere Faktoren wie Muskelaktivität, mechanische Beanspruchung und Körpergewicht beeinflussen hauptsächlich das Breitenwachstum.

1.2 Osteogenese während der Fraktur- bzw. Knochenheilung

Eine Fraktur wird als Diskontinuität des Knochens definiert. Als häufigste Läsion des Knochens liegt ihr meistens eine physikalische Krafteinwirkung zu Grunde. Durch eine Osteotomie wird die Diskontinuität des Knochens künstlich herbeigeführt. Die Wiederherstellung der Integrität wird in diesem Fall nicht Fraktur- sondern Knochenheilung genannt. Bei einer Verletzung ist Knochengewebe in der Lage, sich durch

die Bildung von gleichwertigem Knochen zu regenerieren. Der Ablauf einer Fraktur-, Knochenheilung lässt sich vereinfacht in vier Stadien wiedergeben.

A. *Hämatom:*

Durch die Ruptur der Gefäße des Knochens, des Periosts und der umgebenden Weichteile entsteht ein Hämatom. Es umfasst den endostalen und periostalen Raum, breitet sich entlang der Cortices aus, und dehnt sich je nach Ausmaß des Schadens im umliegenden Gewebe aus. Durch die Gerinnung zum Koagel sistiert die Blutung.

B. *Inflammative Reaktion*

Bereits eine Stunde nach der Verletzung ist die Genexpression von lokalen Entzündungsmediatoren, den Interleukinen, im Hämatom nachweisbar (*Bartmeyer 2004*). Interleukine werden von beschädigten Zellen und Thrombozyten sezerniert, um chemotaktisch Zellen der monozytären und granulozytären Reihe anzuziehen. Granula der Mastzellen setzen vasoaktive Zytokine, Heparin und Histamin frei. Es kommt zu einer Erhöhung der Permeabilität der lokalen Gefäße und zu einer Invasion neuer Blutgefäße. Monozyten bzw. Makrophagen infiltrieren das Blutkoagel und zersetzen es durch Phagozytose in ein fibrinöses Granulationgewebe (*Bolander 1992*). Osteogene Zellen werden innerhalb von 48 Stunden periostal rekrutiert (*Nakahara 1990, Bolander 1992*). Spätestens nach sieben Tagen formiert sich ein organisierter, "weicher Kallus" (*Barnes 1999*) (Abbildung 3a).

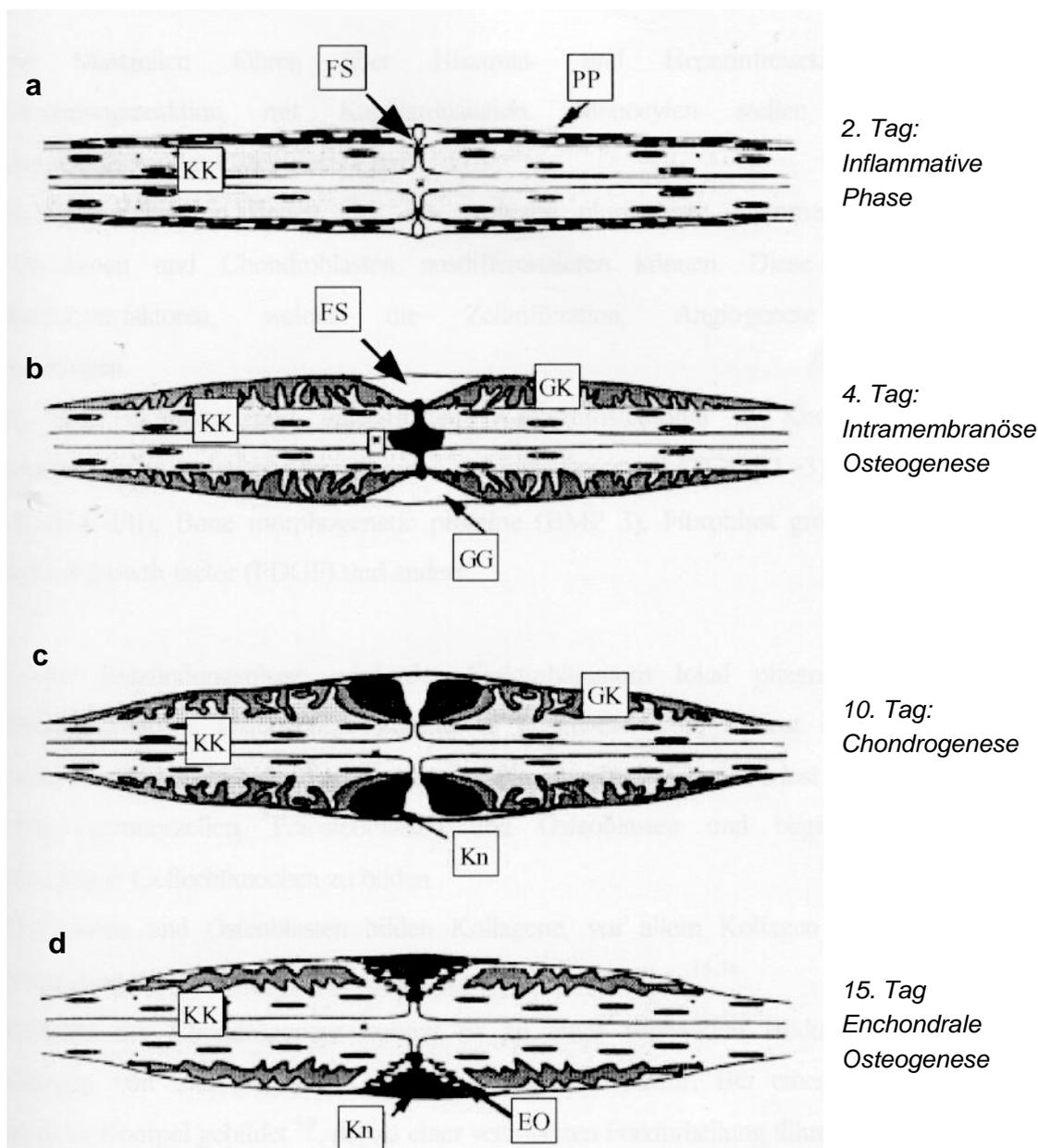
C. *Mesenchymale Zellen, Migration, Kondensation, Differenzierung*

Die Proliferation der mesenchymalen Zellen ist bereits 3 Tage nach einer Fraktur nachweisbar und erreicht ihren Höhepunkt am 6. – 10. Tag (*Iwaki 1997*). Gleichzeitig wandern die Zellen in Richtung Frakturspalt (*Bostrom 1995*) und kondensieren dort. Bereits am 14. Tag haben sich die mesenchymalen Zellen in chondrozytäre oder osteoblastäre Zelllinien differenziert (*Bolander 1992, Barnes 1999*).

D. *Chondrogenese und Ossifikation*

Stehen die Frakturrenden dicht (< 0,5mm) und stabil fixiert zueinander, so führt dies durch eine Unterbindung von Scherkräften zu einer intramembranösen Ossifikation. Ist ein großer Frakturspalt zu überbrücken oder wirken Scherkräfte auf die Kortikalisenden, wird vorrangig eine chondrale Ossifikation induziert (*Le 2001, Culliane*

2002). Aufgrund der minimalen Vaskularität von Knorpel nimmt der indirekte Ossifikationsmodus mehr Zeit in Anspruch (Abbildung 3c-d).



KK = Kortikalis; GK = Geflechtknochen; FS=Frakturspalt; Kn=Knorpel; EO=enchondrale Ossifikation; PP=periostale Proliferation; GG=Granulationsgewebe

Abbildung 3: Histologischer Ablauf der Frakturheilung nach Joyce et al. (1991)

Die Darstellungen beziehen sich sowohl auf die intramembranöse als auch auf die chondrale Ossifikation. Unter biomechanisch stabilen Bedingungen, z. B. durch einen Fixateur externe, würde man vorrangig eine intramembranöse Ossifikation beobachten, wobei der Ossifikationsmodus auch von der Distanz der Frakturenden abhängt. Da es sich um dynamische Prozesse handelt, sind die Übergänge von einer Phase in die darauf folgende fließend. Diese Tatsache erlaubt die Zuordnung synchroner Phänomene in verschiedenen Stadien der Heilung.

1.3 Botenstoffe der Osteogenese

Das postnatale Wachstum von Knochen wird wesentlich durch die endokrine Sekretion von Wachstumshormon stimuliert. Dieser Effekt wird auch über einen weiteren Botenstoff vermittelt, dem Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I) (Ernst 1988).

Bestimmte lokale Mediatoren (= Zytokine) werden als Morphogene zusammengefasst. Sie beeinflussen die Osteogenese sowohl während der Entwicklung als auch während der Knochenheilung. Ein bekanntes Beispiel dieser Morphogene ist die Gruppe der Transforming Growth Faktor- β -Superfamilie (TGF- β -Superfamilie). Zu dieser Superfamilie gehören die auto- und parakrin wirkenden Bone Morphogenetic Proteins (BMP) (Abbildung 4).

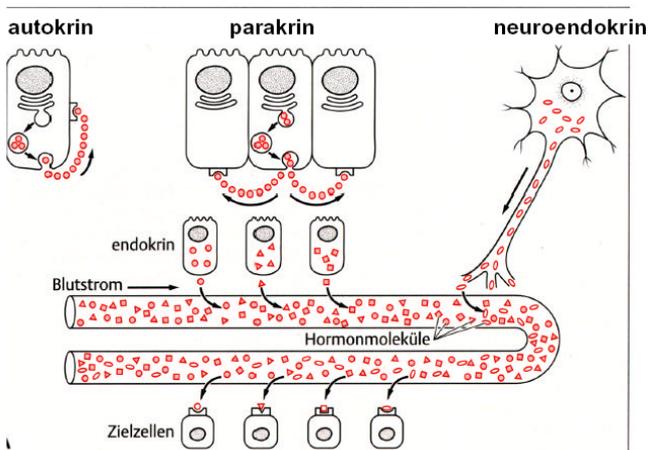


Abbildung 4: systemische und lokale Hormone

Zelluläre Mediatoren (= Zytokine) werden als Botenstoffe definiert, die in diversen Zelltypen pleotrop synthetisiert werden. Sie entfalten ihre Wirkung zunächst autokrin, d. h. in der produzierenden Zelle. Sie können sich gleichzeitig durch Diffusion im Interzellularraum verbreiten und wirken lokal parakrin, d. h. auf benachbarte Zellen.

„Klassische Hormone“ sind Botenstoffe, die in speziellen Drüsen oder durch Neurosekretion produziert werden. Sie entfalten ihre systemische Wirkungsweise durch Ausschüttung in den Blutkreislauf und somit endokrin.

Aus: www.biologie.uni-regensburg.de/Zoologie/Neumann/pdf/Hormone.pdf

IGF-I und BMP werden auch als Wachstumsfaktoren bezeichnet. Experimente an Zellkulturen zeigen, dass sowohl die Zufuhr von GH als auch von IGF-I die Expression von BMP-2/4 mRNA quantitativ steigert (Li 1988). Aufgrund dieser Ergebnisse ist ein Zusammenhang zwischen BMP und dem osteogenen Einfluss von GH und IGF-I vorstellbar. GH würde somit seine Wirkung *in vitro* zusätzlich durch die Aktivierung von BMP entfalten.

1.3.1 Wachstumshormon (Growth Hormone, GH)

Synonyme für das Wachstumshormon sind Growth Hormone (GH) und somatotropes Hormon (STH). Das Wachstumshormon ist ein Polypeptid, das im Hypophysenvorderlappen (HVL) gebildet und gespeichert wird. Seine Ausschüttung wird durch den Somatotropin-Releasing-Faktor (SRF = GRH, GRF) u. Somatostatin ausgelöst. Es hat eine anabole Wirkung auf verschiedene Gewebe wie Knochen, Sehnen, Muskel (*Florini 1996*), Leber und Niere (*Feld 1996*).

Die physiologische Wirkung von GH beruht auf einer Beschleunigung der Zellteilung in der Proliferationszone der Wachstumsfuge (*Kember 1978*). Aus der angeregten Zellvermehrung resultiert eine gesteigerte longitudinale Expansion, welche für Röhrenknochen maßgebend ist. Ebenso werden Knochenmasse (*Harris 1969*), kortikale Knochenformation (*Schiltz 1992*), kortikales Knochenwachstum (*Martinez 1996*) und trabekuläres Knochenvolumen (*Wight 1995*) von GH beeinflusst. Diesen Einfluss auf das Wachstum des Knochengewebes erklärt Isaksson als "direkten GH-Effekt" (*Isaksson 1982*). Wie bereits erwähnt, wird ein Anteil des GH-Effekts dem IGF-I zugeschrieben.

1.3.1.1 GH und Insulin-Like Growth Factor-I (IGF-I)

Ende der 1950er Jahre wurde der sogenannte „Sulfation Factor“ entdeckt. Er fiel durch seine Mediatorfunktion bei der Aufnahme von Schwefel in Chondrozyten auf (*Salomon 1958*) und wurde später Somatomedin genannt. Zwei Jahrzehnte später erfolgte die Isolierung von Polypeptiden mit insulinähnlicher Wirkung (*Rinderknecht 1978*). Sie wurden als „Insulin-Like Growth Factor-I & -II“ (IGF-I & -II) bezeichnet. In der Folge stellte sich heraus, dass der „Sulfation Factor“ mit dem IGF-I strukturidentisch ist.

Gemäß der Somatomedin Hypothese von Daughaday aus den 70er Jahren, veranlasst GH die Produktion von IGF-I in der Leber sowie dessen Freisetzung. Das freigesetzte IGF-I bewirkt endokrin die Proliferation von Chondrozyten in der Epiphyse und hat anabole Wirkung auf verschiedene Gewebe (*Daughaday 1972, 77*), was als "indirekter GH-Effekt" bezeichnet wird.

Der nachgewiesene „indirekte GH-Effekt“ steht in einem scheinbaren Widerspruch mit dem von Isaksson postulierten „direkten GH-Effekt“. Isaksson wies durch eine

lokale GH-Injektion in die Wachstumsfuge von hypophysenektomierten Ratten einen proliferativ-expansiven und somit „direkten GH-Effekt“ (*Isaksson 1982*) nach.

Green erhärtete 1985 in einem *in vitro* Experiment den „direkten GH-Effekt“ und bestätigt ebenso den „indirekten GH-Effekt“. Das Wachstumshormon begünstigt die Differenzierung von mesenchymalen Zellen. Es kann nicht durch IGF-I ersetzt werden. Das Wachstumshormon veranlasst die Freisetzung von IGF-I. IGF-I fördert die Vermehrung von bereits differenzierten Zelltypen. Beide Wachstumsfaktoren begünstigen eine Zellteilung: GH die von undifferenzierten Zellen und IGF-I die von bereits differenzierten Zellen. Green beschreibt diesen Synergieeffekt aus dem Zusammenspiel von direktem und indirektem GH-Effekt in seiner Theorie vom „Dualen Effektor“ (*Green 1985*).

Die Ergebnisse der Untersuchungen von GH- bzw IGF-I-spezifischen Rezeptoren sowie von Bindungsproteinen, der Genexpression und einer rückgekoppelten Wechselbeziehung zwischen den beiden Substanzen bestätigten die Theorie vom Dualen Effektor (*Lindahl 1987, Isaksson 1987, Nilsson 1987, Leung 1987, Carlsson 1991*). Darüberhinaus konnte eine lokale IGF-I Produktion in diversen Geweben *in vivo* (*D'Ercole 1984*) und osteoblastenähnlichen Zellen *in vitro* (*Ernst 1988*) nachgewiesen werden.

1.3.1.2 GH in der Frakturheilung

Die Wirkung von Hormonen aus der Hypophyse weckte bereits in den 30er Jahren das Interesse einer therapeutischen Nutzbarkeit in der Knochen- und Frakturheilung. Studien aus der experimentellen Orthopädie und Unfallchirurgie bestätigten einen stimulierenden GH-Effekt (*Pankratiew 1932, Silberberg 1935, Cordebar 1956, Koskinen 1959, Mühlbach 1967, Ashton 1983, Bak 1991-93, Nielsen 1991*). Dem stehen Studien gegenüber, die keinen GH-Effekt nachweisen konnten (*Boeminghaus 1933, Shepanek 1953, Harris 1975, Tylkowski 1976, Carpenter 1992*). Ein Vergleich der Ergebnisse von verschiedenen Studien wird erschwert durch Unterschiede bei der Auswahl des artspezifischen GHs, der Versuchstiere, der Applikationsweise und der Dosierung von GH sowie durch die Pluralität der Fraktur- bzw. Knochendefektmodelle und aufgrund der uneinheitlichen Methoden der Auswertung. Ergebnisse von Studien aus unserer Arbeitsgruppe belegen einen beschleunigenden Effekt einer systemischen GH-Zufuhr während der Distractionsosteogenese am Minischwein sowohl für die intramembranöse, als auch für die enchondrale Ossifika-

tion (Bail 2002, Kolbeck 2003, Raschke 1999, 2001). Weiterführende Analysen bestätigen den stimulierenden Effekt einer systemischen GH-Zufuhr an einem Frakturmodell der Ratte. In einem Versuch wurde die systemische GH-Gabe einer lokalen Applikation von IGF-I und TGF- β sowie der Kombination aus systemischer GH- und lokaler IGF-I/TGF- β -Zufuhr gegenübergestellt. Die systemische und die lokale Applikation zeigten jeweils für sich einen stimulierenden Effekt, die Kombination der beiden Applikationsmodi zeigte keinen Vorteil (Schmidmaier 2002).

1.3.2 Lokale Wachstumsfaktoren

Während der Entwicklung des Skeletts und der Frakturheilung sind lokale Wachstumsfaktoren beteiligt (Reddi 1994, Loveridge 1993, Barnes 1999). Neben den Wachstumsfaktoren „Fibroblast Growth Factors“ (FGF) und „Platelet Derived Growth Factors“ (PDGF) sind besonders die Proteine der „Transforming Growth Factor- β “-Superfamilie (TGF- β -Superfamilie) aufgrund ihrer osteogenen Potenz in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. Diese Superfamilie umfasst nicht nur die TGF- β -Isoformen, sondern auch eine Vielzahl von weiteren Peptiden, darunter die „Bone Morphogenetic Proteins“ (BMP) (Kingsley 1994).

1.3.2.1 Bone Morphogenetic Protein (BMP)

Die Bone Morphogenetic Proteins (BMP) wurden in den 1960er Jahren von Marshall R. Urist entdeckt. Er injizierte entmineralisiertes Knochenpulver in Muskelgewebe von Kaninchen. Das Ergebnis war eine ektope Knochenneubildung. Urist gelang es schließlich knochenbildende Proteine zu isolieren, die er BMP nannte (Urist 1965).

Ende der 1980er ermöglichte die Klonierung (Rosen 1989, Wozney 1988) und die rekombinante Herstellung der BMPs Experimente zur Struktur und Funktionsweise. BMP ist aufgrund seiner genetischen Homologie Teil der TGF- β -Superfamilie. Man unterscheidet mindestens 15 verschiedene BMP-Proteine (Hogan 1996; Reddi 1997; Hoffman 2001). Einige BMPs haben synonyme Bezeichnungen. Das Synonym für das BMP-3 ist beispielsweise Osteogenin. BMP-7 und BMP-8 werden Osteogenetic Proteins (OP-1 und OP-2) genannt. BMP werden Rezeptoren zugeordnet (BMPR). Sie heißen Typ-IA-, Typ-IB- und Typ-II-Rezeptoren. Letztendlich nehmen BMPs Einfluss auf die Expression von Transkriptionsfaktoren (Heldin 1997).

Während der Entwicklung des Skeletts ist BMP als Morphogen an der Modellierung des embryonalen Knorpelgerüsts und der Entstehung der Extremitäten beteiligt (*Lyons 1990, Wozney 1992 Francis 1994, Yi 2000*). Analysen der verschiedenen Phasen der Skelettogenese zeigen eine wichtige Funktion von BMP während der Kondensation von mesenchymalen Zellen und ihrer Differenzierung in Chondrozyten und Osteoblasten (*Hall 2000*).

Während der Frakturheilung konnte den BMPs eine lokale osteogene und osteoinduktive Aktivität nachgewiesen werden. Sie rekrutieren pluripotente Stammzellen, die daraufhin über die chondrozytäre und die osteoblastäre Zelldifferenzierung ossifizieren (*Bostrom 1995*). Als mögliche Quellen für mesenchymale Zellen gilt das Periost (*Nakase 1994*) und das endostale Markstroma (*Jaiswal 1997, Bianco 2001, Sekiya 2002*). Ebenso kommt angrenzendes Muskelgewebe als Quelle in Betracht, worauf das Pionierexperiment von Urist (*Urist 1995*) hindeutet.

1.3.2.2 BMP-2 während der Entwicklung

Lokale Morphogene wie BMP-2 sind während der embryonalen Entwicklung wesentlich an der Regulierung der Proliferation und Kondensation von mesenchymalen Zellen beteiligt. BMPs wirken auf die Expression von Transskriptionsfaktoren wie den "Hox-, Sax- und Pax-Genen". Diese rufen eine Differenzierung der Zellen und damit die Bildung von unterschiedlichen Geweben hervor (*Hall 2000*).

BMP-2 verfügt darüber hinaus über einen negativen "Feedback"-Mechanismus. Es löst die Expression eines Antagonisten, dem Noggin, aus (*Gazzero 1998*). Noggin ist ein extrazelluläres Matrix-Protein, das eine bremsende Wirkung auf die Zellvermehrung von Osteoklasten hat (*Gazzero 1998*). Die Bildung von Knorpelgewebe und von Gelenken wird durch Noggin beeinflusst (*Brunet 1998, Gong 1999*).

1.3.2.3 BMP-2 während der Fraktur- und Knochenheilung

1985 ermöglichten die immunhistochemischen Experimente von Bostrom die Beschreibung eines Verteilungsmusters von BMP-2 und -4 während der Frakturheilung. Daraus geht hervor, dass alle Zelltypen die an der Osteogenese beteiligt sind, BMP-2 bzw. BMP-4 exprimieren. Während der intramembranösen Heilung zeigten periostale Zellen in der Nähe des Frakturspaltes und den neugebildeten Knochen umsäumende Osteoblasten ein immunhistochemisches Signal. Während der chondralen Ossifikation zeigten mesenchymale Zellen, chondrozytäre Vorläufer und

Chondrozyten ein positives Signal für BMP-2 und BMP-4. Der Nachweis von BMP verringerte sich mit der Zunahme der Verknöcherung auf beiden Ossifikationswegen (*Bostrom 1985*).

Es gibt verschiedene Hypothesen über die Herkunft der BMPs. Nakase geht davon aus, dass sie zum Zeitpunkt der Fraktur aus der extrazellulären Matrix freigesetzt werden, und daher Zellen in unmittelbarer Umgebung des Frakturspaltes rekrutieren (*Nakase 1994*).

Rosen geht davon aus, dass im Knochen ansässige Osteoblasten die BMPs synthetisieren. Die Freisetzung wird dabei durch inflammative Zytokine provoziert, die an der Frakturheilung beteiligt sind (*Rosen et al 2002*).

Auch während der Distraktionsosteogenese ist BMP nachweisbar. Es ist davon auszugehen, dass es hierbei eine wichtige Mediatorfunktion einnimmt. Unter der Wirkung von mechanischer Zugbelastung konnte eine starke Zunahme der Expression von BMP-2 und -4 mRNA beobachtet werden (*Sato 1999*).

1.3.2.4 BMP-2 *in vitro*

Bestätigende und weiterführende Ergebnisse konnten durch Experimente *in vitro* mit rekombinatem BMP-2 (rBMP-2) erzielt werden. Exogenes rBMP-2 induzierte die Differenzierung von mesenchymalen Zellen unter Anderem in osteoblastäre und chondrozytäre Zellen (*Katagiri 1990, Wang 1993*). In osteoblastären Vorläuferzellen, Osteoblasten und Knochenmarkszellen stimulierte rBMP-2 die Aktivität der alkalischen Phosphatase sowie die Synthese von Kollagen und Osteocalcin (*Yamaguchi 1991, Takuwa 1991, Thies 1992*). Rekombinates BMP-2 regte Osteoblasten zur Proliferation an, stimulierte die endogene BMP-2 mRNA Expression und die BMP-2 Genpromoter Aktivität (*Harris 1995*). BMP-2 konnte Myoblasten in osteoblastäre Zellen zur Differenzierung anregen (*Katagiri 1994*), steigerte die Expression von weiteren BMPs und die Expression von extrazellulären Matrixproteinen (*Chen 1997, Nakashima 1994*). BMP-2 veranlasste durch Chemotaxis Osteoblasten zur Migration (*Lind 1996*). Darüber hinaus stimulierte es die Expression von IGF-I (*Canalis 1994*), IL-6 und TGF- β (*Zheng 1994*) in Osteoblasten. Aktuelle Ergebnisse zeigen ferner, dass inflammatorische Zytokine wie IL-1 und TNF- α die Expression von BMP-2 in Chondrozyten steigern (*Fukui 2003*).

BMP-2 zählt somit zu den am genauesten erforschten und zu den potentesten osteoinduktiven Molekülen während der Entwicklung, Frakturheilung, Knochenheilung, Distraktionsosteogenese und *in vitro* (Riley 1996, Wozney 1990, Gamer & Rosen 2000, Yamaguchi 1996, Gazzero 1998, Rawadi 2003, Cheng 2003, Peng 2003, Sun 2004).

1.3.2.5 BMP-2 zur Stimulation der Frakturheilung

Neben BMP-7 (Ronga 2006) konnte BMP-2 seine Wirksamkeit in einer Phase-II-Studie unter Beweis stellen (Govender *et al.* 2002). Die Indikation beschränkt sich bislang auf den klinischen Einsatz bei offenen Tibiaschaftfrakturen. In der Europäischen Union ist humanes, rekombinant hergestelltes BMP-2 als Implantations-Kit „Dibotermine α “ zugelassen. In der Anwendung wird eine Matrix aus Rinderkollagen mit einer BMP-2 Lösung getränkt und in die Fraktur implantiert. BMP-2 setzt an der Oberfläche von Mesenchymzellen an, regt dabei diese zur Differenzierung in knochenbildende Zelltypen an und erfüllt somit eine osteoinduktive Funktion. Bereits differenzierte Zellen werden zur Knochenneubildung angeregt. In ihrer Funktion als Trägermaterial begünstigt die Kollagen-Matrix das Einwachsen von Knochenzellen und verfügt dadurch über eine osteokonduktive Eigenschaft.

In einer prospektiven, kontrollierten und randomisierten Studie mit 450 Patienten (BESTT) heilte ein offener Schienbeinbruch signifikant schneller, wenn nach der operativen Standardbehandlung Dibotermine α implantiert wurde. Durch diese Behandlung war ein zweiter Eingriff zur Förderung der Frakturheilung signifikant seltener nötig. Zudem traten weniger Infektionen auf und die Wunde heilte deutlich schneller. Diese Behandlungsmethode war bei Frakturen unterschiedlicher Schweregrade wirksam (Govender *et al.*, 2002).

1.4 Arbeitshypothese

BMP, IGF-I und GH sind drei unterschiedliche Botenstoffe, die sich in einer Gemeinsamkeit entsprechen: es sind stark osteoanabol wirkende Substanzen. Experimente an Zellkulturen zeigen, dass sowohl die Zufuhr von GH als auch die von IGF-I die Expression von BMP-2 und BMP-4 mRNA quantitativ um ein Vielfaches steigern. Als Resultat der vermehrten mRNA konnte mittels Western Blotting ebenso eine Zunahme der Proteinexpression von BMPs beobachtet werden. Aufgrund die-

ser Ergebnisse ist ein Zusammenhang zwischen BMPs und dem osteogenen Einfluss von GH und IGF-I vorstellbar. GH entfaltet seine Wirkung *in vitro* in einer weiteren Wirkungskaskade über BMP (Li 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand eines Osteotomiemodells mittels eines „Fixateur externe“ die Bedingungen einer weitgehend intramembranösen Ossifikation geschaffen. Hierzu wurden folgende Fragestellungen untersucht:

- Ist eine Wirkung von einer systemischen GH-Zufuhr auf die lokale BMP-2-Synthese *in vivo* quantifizierbar?
- Kann durch eine systemische GH-Zufuhr eine Steigerung der lokalen BMP-2-Expression *in vivo* erreicht werden?
- Welche Unterschiede können in der BMP-2-Expression zwischen einer GH-stimulierten und einer Kontroll-Bedingung beschrieben werden?

Zum besseren Verständnis der lokalen Funktion von BMP erfolgte zunächst die Darstellung der BMP-2-Expression in der postnatalen Skelettentwicklung. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Prozesse der embryonalen Skelettentwicklung sich während der Frakturheilung wiederholen. Hieraus ergab sich folgende Fragestellung:

- Welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede gibt es zwischen dem postnatalen Expressionsmuster und dem Expressionsmuster, während der Knochenheilung von BMP-2?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden mit ausgewachsenen, weiblichen Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 320-360 g durchgeführt. Das Längenwachstum der Extremitäten war bei diesen Tieren abgeschlossen. Ratten sind neben Mäusen die am häufigsten verwendeten Tiere für molekularbiologische Untersuchungen im Zusammenhang mit GH, IGF-I und BMP. Bereits vorliegende Erkenntnisse anderer Forschungsgruppen können bei der Konzeption des eigenen Projektes berücksichtigt werden. Für die Versuche zur postnatalen Skelettentwicklung standen bereits in Paraffin eingebettete Präparate aus einer vorangegangenen Pilot-Studie zur Verfügung.

2.2 Tierhaltung

Maximal fünf Ratten wurden in einem 15 x 20 x 30 cm großen Käfigen gehalten. Die Käfige wurden wöchentlich gereinigt und mit Kleintierstreu ausgelegt. Neben der täglichen GH- bzw. Placebo-Applikation, wurde eine Wunddesinfektion durchgeführt, um mögliche Infektionen am Fixateur externe zu vermeiden.

Die Durchführung der Tierversuche wurde vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt [Tierversuchsnr.: G 231/99].

2.3 Osteotomiemodell



Abbildung 5: Fixateur externe (2,8cm) am Femur der Ratte (3,5cm)

Die Knochenheilung wurde in einem neu entwickelten standardisierten Modell untersucht. Ein Fixateur externe gewährleistete mechanisch stabile Verhältnisse. Am linken Femur des Versuchstiers wurde eine Osteotomie durchgeführt und ein definierter Spalt von 1 mm gesetzt. Das Fixationsverfahren wurde mittels Fixateur externe in Modellen der Distractionsosteogenese und einem Modell der Knochendecktheilung an der Ratte bereits durchgeführt (Sato 1998).

2.4 Operatives Vorgehen

2.4.1 Material

Masken- und Intraperitonealnarkose

- Chlor-2,2,2-trifluorethyldifluormethylether (Isoluran) Forene®; (Abott GmbH, Wiesbaden, Deutschland)
- Ketaminhydrochlorid Ketavet® (Pharmacia & Upjohn GmbH, Wien, Österreich)
- Xylacinhydrochlorid, Xylacin 2% (Medistar® Arzneimittelvertrieb GmbH, Holzwickende, Deutschland)

Blutentnahme

- Heparinnatrium, Liquemin® N25 000 000 (Roche, Grenzach, Whylen, Deutschland)
- Hämatokrit-Kapillaren 75mm / 60 u]
- Serumröhrchen (Numbrecht, Elsenroth, Deutschland)
- Blutbildröhrchen (Numbrecht, Elsenroth, Deutschland) Eppendorf caps, 1,5 ml

Sonstiges

- Lidocainhydrochlorid, Xylocain® Gel 2% (Astra GmbH, Wedel, Deutschland)
- Thioglykolsäure, Pilca® (Enthaarungscreme) (Schwarzkopf & Henkel, Düsseldorf, Deutschland)
- Ethanol 100%, Softasept® N (BI Braun, Melsungen, Deutschland)
- Dexpanthenol, Panthenol-Augensalbe (Jenapharm, Bibrach/Riss, Deutschland)
- Kaliumchlorid 14,9 % (B. Braun, Melsungen, Deutschland)
- Natriumchlorid 0,9% (B. Braun, Melsungen, Deutschland)
- 1 ml Einmalspritzen
- Sterile Einmalhandschuhe
- Mundschutz
- Sterile Kompressen
- Steriles OP-Tuch

- Sprühpflaster
- Braunes Pflaster, Leukoplast® (Beiersdorf, Hamburg, Deutschland)
- Edding: schwarz, blau, rot zur Markierung bzw. Nummerierung der Versuchstiere

- **OP- Besteck**

- Einmal-Skalpell No: 15
- Hautfaden 4-0, Prolene®, nichtresorbierbar (Ethicon, Norderstedt, Deutschland)
- 1,0 mm Kirschnerdraht aus Stahl, Gewinde tragend
- Kirschnerdrathalter
- Drahtzange, Schere, Nadelhalter, Pinzette
- Fixateur externe (2,8 cm Länge)
- 2x Schrauben
- Kreuzschraubenzieher
- Haken
- Stumpfe Sonde
- Hobby-Bohrer (Bauhaus, Berlin, Deutschland)
- Bohraufsatz, Bohrer, 1,0 mm Durchmesser (Bauhaus, Berlin, Deutschland)
- Bohraufsatz, Diamantsägeblatt, 6 mm Durchmesser, 0,3 mm Dicke (Bauhaus, Berlin, Deutschland)
- Osteotomieschablone

Röntgen

- (Sterling Diagnostic Imaging Inc., Newark, USA)
- Röntgenkassette Cronex Cassete Quanta Detail 24 x 30 cm (Fa. Du Pont de Nemours, Bad Homburg, Deutschland)
- Röntgenzahlen
- Röntgentreppchen aus Aluminium
- Pflaster
- Entwicklerlösung

2.4.2 Geräte

- Narkosegerät (Artec Typ Vet, Stephan GmbH, Medizintechnik Gnadenbach, Deutschland)
- Schlauchsystem, 2 L Plastikgefäß (durchsichtig), Spritzenmaske
- Waage: Kilomat - Präzisionswaage (Satorius, Deutschland)
- Röntgengerät Siemens Röntgenstrahler Model No.: 6077379 X037E (Siemens, Deutschland)
- Elektrorasierer

2.4.3 Narkose und Vorbereitung

Präoperativ wurde das Versuchstier durch Inhalationsnarkose (O_2 : 0,2l/min, Stickstoff: 1,5 l/min, Isofluran: 5 Vol.%) sediert. Anschließend wurde eine ausreichend tiefe Narkose durch die intraperitoneale Injektion von Xyalzin und Ketavet entsprechend dem Körpergewicht des Tieres erzielt (Ketaminhydrochlorid 80 mg/kg, Xylacinhydrochlorid 12 mg/kg).

Das Operationsfeld wurde mit Ethanol desinfiziert. Nach der Gewichtsbestimmung wurden retrobulbär 1,5 ml Blut abgenommen (siehe Untersuchungen 2.5.3).

Zunächst erfolgte eine Rasur des linken Hinterbeines des Versuchstieres mit einem Elektrorasierer. Anschließend wurden die restlichen Haare im Oberschenkelbereich mit Pilca Enthaarungscreme entfernt. Vor einer rechtsseitigen Lagerung auf einer sterilen Unterlage wurde das linke Bein mit einem Hautdesinfektionsmittel desinfiziert.

2.4.4 Operationstechnik

Nach einem lateralen Hautschnitt über die gesamte Länge des tastbaren Verlaufs des Femurs erfolgte ein stumpfes Vorpräparieren bis zur Darstellung des Oberschenkelknochens zwischen der Flexor- und Extensorenloge. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Weichteile und das Periost geschont wurden. Der Fixateur externe wurde durch vier gewindeträgende Kirschnerdrähte (Pins) am Femur befestigt. Dazu wurde zunächst mit einem Bohrer der proximale Pinkanal gebohrt. Durch den Pinkanal wurde ein Pin mittels Kirschnerdrahthalter im kleinen Trochanter des Femurs befestigt. Die Montage des Fixateurs erlaubte nun eine visuelle Kontrolle der Lage und eine Markierung der distalen Pininsertionsstelle. Nach der Bohrung des distalen Pinkanals wurde der entsprechende Pin eingebracht. Die Fixateurschrauben wurden angezogen, um die beiden medialen Pinkanäle zu bohren und wieder gelockert, um die entsprechenden mittleren Pins einzubringen. Beim Eindrehen der Pins wurde darauf geachtet, dass die von dem proximalen Pin vorgegebene Achse eingehalten wurde. Der Fixateur externe wurde in Höhe einer Fixateurbreite festgestellt und die überstehenden Pindrähte wurden knapp über dem Fixateur externe mit der Zange abgekniffen. Vor dem Anbringen der standardisierten Osteotomieschablone, wurde ein Haken eingesetzt, um die Weichteile an der Osteotomiestelle in Schaftmitte fernzuhalten. Es folgte die Osteotomie mit einem Diamantsägeblatt und die Kontrolle über die Vollständigkeit der Knochendurchtrennung mit der stumpfen Son-

de. Das Operationsgebiet wurde gespült, die Haut mit 4.0 nicht resorbierbarem Nahtmaterial in Einzelknopftechnik zugenäht. Abschließend wurde die Hautnaht desinfiziert und mit einem Sprühpflasterverband versorgt.

2.4.5 Gruppeneinteilung

Eine Gruppe von 18 Versuchstiere wurde während der Heilungsphase durch die systemische Applikation von GH stimuliert. Eine zweite Gruppe von 18 Versuchstiere erhielt die systemische Gabe von NaCl. Die Femora beider Gruppen wurden am 7., 14. bzw. 21. Tag nach der Operation (n je = 6) entnommen.

	7. Tag	14. Tag	21. Tag	Gesamt
GH-Gruppe	n = 6	n = 6	n = 6	n = 18
Kontroll-Gruppe	n = 6	n = 6	n = 6	n = 18

Zur Bestimmung des BMP Verteilungsmusters während der postnatalen Skelettentwicklung standen Präparate 11 Tage alter Ratten (n=3) zur Verfügung.

2.4.6 Wachstumshormon (GH)

Es wurde ein rekombinantes, humanes Wachstumshormon (hGH) (Novo Nordik, Dänemark) verwendet.

Jedes Tier der systemischen Wachstumshormongruppe erhielt 3 mg pro Kilogramm Körpergewicht in zwei Gaben pro Tag. Der Kontroll-Gruppe wurde die entsprechende Menge isotone Kochsalzlösung (Friesenius, Bad Homburg) appliziert.

Das GH-Trockenpulver wurde in Mengen zu 100 mg aliquotiert und in sterilen Gefäßen aufbewahrt. Dazu wurde zunächst 10 mM Phosphatpuffer durch das Mischen von 0.56 ml Braun 0.6 mM Natriumphosphat und 32.74 ml Braun isotoner NaCl Lösung hergestellt. Anschließend wurde das GH-Trockenpulver in 33.3 ml Phosphatpuffer gelöst, so dass eine Konzentration von 3 mg pro ml entstand. Die Spritzen wurden entsprechend nach Gewichtsklassen aufgezogen, wobei 1 ml Spritzen verwendet wurden. Diese erlaubten eine Diskriminierung bis 0.01 ml.

Das Wachstumshormon bzw. Natriumchlorid wurde den Tieren täglich zwischen 8.00 und 10.00 Uhr morgens und 16.00 und 18.00 Uhr nachmittags subcutan in den Nacken appliziert.

2.5 Untersuchungen der Tiere

2.5.1 Material

Siehe operatives Vorgehen 2.4

2.5.2 Geräte

Siehe operatives Vorgehen 2.4

2.5.3 Durchführung

Die Versuchstiere wurden präoperativ (Tag 0), sowie je nach Gruppe an den Tagen 7, 14, 21 bzw. am Tag der Tötung gewogen. Blut wurde entnommen und das linke Hinterbein in 2 Ebenen geröntgt.

Zunächst wurde das Versuchstier durch Inhalationsnarkose (siehe Narkose und Vorbereitung 2.4.3) sediert. Hierzu wurde es in einen verschließbaren, durchsichtigen Behälter gesetzt. Das Narkosegemisch wurde eingeleitet.

Das Versuchstier wurde gewogen. Über eine Inhalationsmaske konnte die Anästhesie während der Untersuchung aufrecht gehalten werden. Der retrobulbäre Venenplexus wurde mit einer heparinisierten Glaskapillare punktiert. Es wurden ca. 1,5 ml Blut entnommen.

Am Ende der Untersuchung wurde das linke Bein der anästhesierten Ratte in zwei Ebenen (posterior/anterior und lateral) geröntgt. Für die laterale Aufnahme wurde die Ratte auf den Bauch gelegt. Das operierte Bein wurde abduziert und in Außenrotationsstellung mit einem Pflaster fixiert. Für die posterior/anteriore Aufnahme wurde das Bein um 90° gedreht, so dass die Längsachse senkrecht zur Röntgenplatte stand. Eine Fixierung erfolgte durch ein Pflaster. Die Röntgenaufnahmen wurden mit 55 kV und 2,2 mAs vorgenommen. Der Abstand zur Platte betrug 60 cm.

2.6 Euthanasie

2.6.1 Material

Siehe operatives Vorgehen 2.4

2.6.2 Geräte

Siehe operatives Vorhegen 2.4

2.6.3 Durchführung

Nach abschließender Untersuchung wurden die Tiere am 7., 14. und 21. Tag durch eine intrakardiale Kaliumchlorid-Injektion (1,5 ml K₂CO₃) in Narkose (siehe Kap. 2.4.3 Narkose und Vorbereitung) getötet. Der Fixateur externe wurde entfernt. Das linke Femur wurde im Knie- und Hüftgelenk exartikuliert. Das Femur wurde frei präpariert, wobei auf die Schonung des Periost geachtet wurde.

2.7 Technik der Fixierung, Dekalzifizierung und Einbettung und Anfertigung der Paraffinschnitte

2.7.1 Material

Fixierlösung

- Formol (Formaldehyd) 36% (Merk, Darmstadt, Deutschland), Fertige Lsg. 10%
- Ethylalkohol 100% (Herbeta, Berlin, Deutschland)
- Barbitol – Natrium – Puffer, pH 7,4 / 0,1 M (Apotheke Charité, Berlin, Deutschland)
- Glukose (Merk, Darmstadt, Deutschland)
- Entkalker: 0,36 M EDTA, gepuffert (Herbeta, Berlin, Deutschland)

Sonstiges

- Skalpell
- Pinsel
- Tissue – Tek, Mega – Cassette (Sakura Fintek, Torrana, USA)
- Gläser
- Paraffin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
- Objektträger (Menzel, Deutschland)

2.7.2 Geräte

- Einbettungsmaschine (Leica, Solms, Deutschland)
- Mikrotom (Leica, Solms, Deutschland)
- Rüttler (Karl Knecht GmbH, Sondheim, Deutschland)

2.7.3 Durchführung

Unmittelbar nach Explantation wurde das linke Femur in ein Gewebekästchen gelegt. Das Gewebekästchen wurde beschriftet und zwei Tage bei Raumtemperatur (RT) in einer formaldehydhaltigen Fixierlösung fixiert. Anschließend wurde das Femur für 14 Tage bei RT in EDTA dekalzifiziert, um die mineralischen Bestandteile des Knochens zu entfernen. Danach wurde das entkalzifizierte Femur in Paraffin achsengerecht eingebettet. Am Mikrotom wurden Serienschnitte in Sagittal-Ebene angefertigt, auf Objektträger aufgebracht und mit fortlaufender Nummer versehen. Die aufgezogenen Schnitte wurden im Brutschrank bei 37°C getrocknet. Anschließend wurden die In Situ Hybridisierungs bzw. immunhistologischen Versuche durchgeführt.

2.8 Technik der In Situ Hybridisierung

2.8.1 Material

Kopierte Desoxynucleinsäure (cDNA) – Sequenzen

- BMP-2 kodierend, Länge 0,386 Kb., plasmidgebunden, kloniert in pBluescript K(-) [100] (Prof. Shintaro Nomura, Abt. für Pathologie, Universität Osaka, Japan)

Polymerase Chain Reaktion (PCR) amplifizierte cDNA

Die BMP-2 kodierenden cDNA-Sequenzen werden mittels PCRs amplifiziert, um sie in ausreichender Menge für die Transkription verfügbar zu machen.

- cDNA – Sequenzen, BMP-2
- Nucleotid – Puffer Mix: Desoxynucleosidtriphosphate Set, PCR Grade (Roche, Deutschland)
- Thermo Pol Buffer (New England Biolabs, USA)
- Primer T3, T7 (Metabion, Deutschland)
- Vent DNA – Polymerase [2,000 U/ml] (New England Biolabs, USA)
- Phenol – Chloroform (Gibco BRL, England)
- Lithium – Chlorid (Merck, Deutschland)
- H₂O dest., hergestellt in QPAK – Aufbereitungsanlage (Millipore, USA)
- EtOH (Merck, Deutschland)
- Agarose (Gibco BRL, England)
- DNA – Längenstandard, 0,07-12,2 kbp (Boehringer Ingelheim, Deutschland)
- Ethidiumbromid (Fluka Biochemika, Schweiz)
- PCR – Tubes, 0,5 ml (Eppendorf, Deutschland)

In mRNA transkribierte cDNA

Die amplifizierte cDNA wurde in mRNA transkribiert, um sie für die In Situ Hybridisierung verfügbar zu machen. Es wurde Digoxigenin markierte RNA hergestellt.

- PCR – cDNA – Produkte von BMP-2
- DigUTP- RNA Labeling Mix (10x) (Roche, Deutschland)
- T3, T7 RNA-Polymerasen (Roche, Deutschland)
- Transkriptionspuffer (Roche, Deutschland)
- 0,5 M EDTA pH=8,0 (Gibco BRL, England)
- 4 M LiCl (Merck, Deutschland)
- EtOH (Merck, Deutschland)
- DEPC (Diethyl-Pyrocyanat) (Sigma, Deutschland)
- H₂O des., QPAK – Aufbereitungsanlage (Millipore, USA)
- Wasserbad, Haake P21, (Hanke, Deutschland)

In Situ Hybridisierung

Durch die In Situ Hybridisierung wurde die endogene BMP-2-RNA-Expression im Gewebe nachgewiesen.

- Digoxigenin markierte RNA – Sonden, BMP-2
- Xylol (Merck, Deutschland)
- EtOH (Merck, Deutschland)
- H₂O dest, QPAK – Aufbereitungsanlage (Millipore, USA), autoklaviert
- HCl (Merck, Deutschland)

- PBS (Phosphate Buffered Saline), (Merck, Deutschland)
- Triton-X (Sigma, Deutschland)
- Proteinase K (Merck, Deutschland), 37°C
- Tris-HCl pH=7,4 (Sigma, Deutschland)
- 0,5 M EDTA pH=8,0 (Gibco BRL, England)
- TE (Tris-HCl pH=7,4, 0,5 M EDTA pH=8,0, ad 200 ml autoklav. H₂O bidest.)
- Glycin (Sigma, Deutschland)
- Paraformaldehyd (PFA), (Baker, Holland)
- TEA (Triethanolamin), (Merck, Deutschland)
- Essigsäureanhydrid, (Merck, Deutschland)
- 20x SSC (Sodiumchloride-Sodium Citrate), (Sigma, Deutschland)
- Formamid, deionisiert (Sigma, Deutschland)
- 50x Denhardt's (Sigma, Deutschland)
- Hering Sperma DNA (10mg / ml), (Roche, Deutschland)
- 5 M NaCl (Merck, Deutschland)
- 2 M DTT (DiThioTriethol), (Sigma, Deutschland)
- 3 M Na-Acetat, pH 5,2, (Sigma, Deutschland)
- Dextransulfat (Sigma, Deutschland)
- RNase T1 (2µl/ 100ml = 2U/ ml), (Roche, Deutschland), 37°C
- mBM, modifiziertes Blocking Medium (Roche, Deutschland)
- Rinderalbumin (Fluka, Deutschland)
- Anti-Dig-AP (Anti-Digoxigenin-Antikörper-AP, Fab-Fragmente), Roche, Deutschland)
- Levamisole (Sigma, Deutschland)
- NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid), (Roche, Deutschland)
- BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indol-phosphat,4-Toluidin-Salz) (Boehringer Ingelheim, Deutschland)
- Glycerin Gelatine, Kaisers (Merck, Deutschland)
- Deckgläser, Hybri - Slips (New England Biolabs, USA)
- Deckgläser (Menzel-Glaser, Deutschland)

2.8.2 Geräte

- PCR – Gerät, PTC – 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, USA)
- pH-Meter, Microprocessor ph 537 (WTW, Deutschland)
- Feinwaage, 2024 MP (Sartorius, Deutschland)
- Inkubationsofen (Heraeus, Deutschland)
- Durchlichtmikroskop (Leica, Deutschland)

2.8.3 Durchführung

PCR

Die für die Transkription BMP-2 kodierte cDNA lag in plasmidgebundenen Sequenzen vor. Die cDNA-Sequenzen wurden durch PCR amplifiziert, um sie für die Transkriptionen in ausreichender Menge verfügbar zu machen.

Für die PCRs wurde ein Reaktionsansatz in PCR-Tubes vorbereitet, der sich aus dem jeweiligen Plasmid (2µl), dem Nucleotid-Puffer Mix (10µl), der Vent-DNA-Polymerase (2µl 1:10 verdünnt in autokl. H₂O bidest. = 0,2 U/µl) und den vektor-spezifischen Primern (je 2µl) zusammensetzte. Der Ansatz wurde mit autoklav. H₂O bidest. auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt.

Die mit Reaktionsansatz gefüllten PCR-Tubes wurden in das PCR-Gerät gestellt und das für die jeweiligen Proben spezielle PCR-Programm gestartet. Dabei wurden im ersten Zyklus, in einer ersten, längeren DNA-Denaturierung (10 Min. bei 95°) die DNA-Basenpaarungen gelöst und anschließend 30 PCR Zyklen durchlaufen, bei jeweils einer kürzeren DNA-Denaturierungsphase (30 Sek. bei 95°C) .

Nach der cDNA-Denaturierung folgte die Hybridisierung von Primern mit der Matrizen-cDNA. Es wurden die Primer T3 und T7 ($T_H = 64^\circ$) eingesetzt.

Den letzten Zyklusschritt stellte die DNA-Synthese-Phase dar (angesetzte Dauer = 1 min. zur Replikation von 1 Kb DNA-Sequenz (s 30 Sek./ 0,5 Kb). Dabei bindete die Vent-DNA-Polymerase an die Primer und replizierte die gewünschten cDNA-Abschnitte, so dass das entstandene PCR-Produkt aus der vervielfältigten cDNA und den Plasmid eigenen Transkriptionspromotoren bestand. Nach Abschluss der Synthese-Phase begann der nächste PCR-Zyklus mit einer Denaturierung.

Nach Beendigung der 30 Zyklen wurde die cDNA zuerst mittels Phenol-Chloroform extrahiert (cDNA Ansatz / Chloroform = 1:1). Die Ausfällung erfolgte mit 4 M LiCl und 100% EtOH (über Nacht bei -20°C). Der Überstand wurde durch Zentrifugation mit 70% EtOH aufgereinigt. Das entstandene cDNA-Pellet wurde nach Lufttrocknung in 25 µl autoklaviertes H₂O bidest. aufgenommen. Zur Kontrolle wurde eine Agarosegel Elektrophorese der generierten cDNA durchgeführt.

RNA – Sonden

Die *in vitro* Transkription der PCR-Produkte erfolgt mit Digoxigenin markiertem Substrat (Dig-UTP-RNA). Als Nachweissonde wurde eine „anti-sense“(a-s)-RNA, als Negativkontrollsonde eine „sense“-RNA-Sonde angesetzt.

Für BMP-2 wird die T3 RNA-Polymerase als „anti-sense“-Sonde, die T7 RNA-Polymerase wird als „sense“-Sonde verwendet.

Zur Transkription wurde die cDNA in autoklavierten Eppendorf-Cups angesetzt:

- 2 µl des PCR-Produktes
- 12 µl DEPC- H₂O
- 2 µl Transkriptionspuffer
- 2 µl der jeweiligen RNA-Polymerase
- 2 µl Dig – UTP – Labeling – Mix (Digoxigenin markierte Uridin 5-Phosphat Nukleotide)

Die Transkription der cDNA in die RNA-Sonde erfolgte im Wasserbad, 2 h bei 37°C.

Die Reaktion wurde mit 0.5 M EDTA; 3 M NaAc und 100% EtOH abgestoppt und die RNA über Nacht (bei -20°C) ausgefällt. Der Überstand wurde mit 80% EtOH (-20°C) zentrifugiert und aufgereinigt. Es wurde wiederum der Überstand abpipettiert und nach Lufttrocknung in 50 µl autoklaviertem H₂O dest. aufgenommen.

Zur Kontrolle wurde eine Agarosegel Elektrophorese durchgeführt.

In Situ Hybridisierung

Schritt 1: Entparaffinierung und Rehydrierung

Die Schnitte wurden 30 min. im Inkubationofen (55°C) erwärmt, in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert:

- | | |
|--------------|-------------|
| - Xylol, | → 2x 10 min |
| - 100% EtOH, | → 2x 5 min |
| - 96% EtOH, | → 1x 5 min |
| - 80% EtOH, | → 1x 5 min |
| - 70% EtOH, | → 1x 5 min |
| - Aqua dest. | → 2x 5 min |

Schritt 2: Deproteinierung:

- | | |
|--------------|-------------|
| - 0,2 M HCl, | → 1x 20 min |
|--------------|-------------|

Waschschrift:

- | | |
|-----------|------------|
| - 1x PBS, | → 2x 5 min |
|-----------|------------|

Schritt 3: Permeabilisierung:

- 0,3% Triton X-100 in 1x PBS, → 1x 15 min

Waschschritt:

- 1x PBS, → 3 x 5 min

Schritt 4: Deproteinierung:

- 5 µg/µl Proteinase K in 1x TE (bei 37°C) , → 1x 30 min

Schritt 5: Abstoppen

- 0,2% Glycin in H₂O, → 1x 5 min

Waschschritt:

- 1x PBS, → 2x 5 min

Schritt 6: Nachfixieren

- PFA (bei 4°C), → 1x 15 min

Waschschritt:

- 1x PBS, → 3 x 5 min

Schritt 7: Acetylieren:

- 0,1 M TEA pH 8,0 mit 750 µl / 200 ml Essigsäureanhydrid, → 2x 5 min

Waschschritt:

- 2x SSC, → 2x 5 min

Schritt 8: Prähybridisierung:

- Prähybridmix:
 1 ml 20x SSC,
 5 ml Formamid, deion.,
 4 ml H₂O bidest., autoklav.,
 bei 55°C, → 1x 30 min

Schritt 9: Hybridisierung:

- Grundmix 10 ml:
 2 ml Tris-HCl pH=7,5
 200 µl 0,5 M EDTA pH=8,0
 2 ml 50x Denhardt's,
 2 ml t-RNA (25 mg / ml)
 2ml Dextransulfat
 1 ml Hering Sperma DNA

2,8 ml DPEC - H₂O dest.

- 2 M DTT – Mix: 3,09 g DTT (2M DDT)
33,3 µl 3M Na-Acetat, pH 5,2
ad 10 ml H₂O bidest
- Dextransulfat – Lsg: 1 g Dextransulfat 2 g H₂O

(Grundmix, 2 M DTT – Mix und Dextransulfat – Lsg wurden vorbereitet, aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch eingefroren)

- Hybridmix: z.B. für 1000 µl Gesamtvolumen:
500 µl deionisiertes Formamid (1/2 des Gesamtvolumens)
10 µl BMP – 2 Sonde (1/100 des Gesamtvolumens)
erhitzen auf 100°C, → 3 min
kühlen auf Eis, → 5 min
100 µl Grundmix (1/10 des Gesamtvolumens)
66,7 µl 5 M NaCl (1/15 des Gesamtvolumens)
100 µl DTT (1/10 des Gesamtvolumens)
200 µl Dextransulfat (1/5 des Gesamtvolumens)
3,3 µl H₂O (ad Gesamtvolumen)
(vortexen und anschließend zentrifugieren)
Die Schnitte wurden mit Hybrid – Mix und
Hybri-Slips bedeckt.
Inkubation: bei 55°C, → 14-16h

Waschschritt:

- die Hybri – Slips wurden vorsichtig in 1x SSC, bei 47°C,
abgewaschen → 1x 30 min
- 1x SSC, bei 47°C → 1x 30 min
- 1x SSC / 50% Formamid, deion., bei 47°C → 1x 30 min
- 0,5 SSC / 50% Formamid, deion., bei 47°C → 1x 30 min
- 0,1 SSC, bei 47°C → 1x 30 min

Schritt 10: RNase Behandlung:

Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, erfolgte eine Behandlung mit dem RNase – Mix:

- 25 ml 20x SSC
- 500 µl EDTA
- ad 250 ml H₂O bidest., autoklav
- erwärmen auf 37°C
- 1,4 µl RNase T1 (2U/ ml)
- Inkubation: bei 37°C → 15 min

Waschschritt:

- 0,1 SSC, bei 47°C → 1x 30 min
- 2x SSC, RT → 1x 10 min
- Puffer 1, RT, → 1x 5 min

(P1: 100mM Tris HCl, 150mM NaCl, ad H₂O bidest. pH=7,5)

Schritt 11: Blocken

- Mit modifiziertem Blocking Medium Puffer 2

(Puffer 2: 2 g mBm, 1 g Rinder Albumin ad 200 H₂O bidest)

Schritt 12: Detektion:

- Anti-Dig-AP, 1: 750, bei 4°C → Über Nacht

Waschschritt:

- Puffer 1, RT → 2x 10min
- Puffer 3, RT → 2x 10min

(Puffer 3: 25mM Tris HCl, 5ml 5M NaCl, 12,5ml 1M MgCl₂, ad 250 H₂O bidest.)

Schritt 13: Entwicklung:

- Mit Entwicklungspuffer bei RT, bis Eintreten der Färbereaktion.

(Entwicklungspuffer: 2,5 mg Levamisol in 10ml Puffer 3, 35µl NBT, 35µl X-Phosphat)

Schritt 14: Die Reaktion wird gestoppt:

- 2x Puffer 4

(Puffer 4: 100mM Tris- HCl, 1mM EDTA pH 8,0, ad H₂O dest.)

Waschschritt:

- 2x PBS
- H₂O dest

Kerngegenfärbung mit Methylgrün

- Methylgrün → 1x 4 min
- H₂O dest. → 2x 8min

Eindecklen mit Glyceringelantine

2.9 Immunhistologische Technik

2.9.1 Material

Immunhistologische Färbung

TRIS – HCL - Puffer (TBS), pH 8,2 (5 L):

- Sigma Trizma HCLT 33g (Sigma, Deutschland)
- Sigma Trizma Base 4,5g (Sigma, Deutschland)
- NaCl 43,9g
- NaOH (2N) ca 35ml

Primärantikörper

- Polyklonaler Goat (Ziege) anti – BMP-2 IgG, (sc-6895, Santa Cruz, USA), 1:100

Sekundärantikörper

- Sekundärer Antikörper (biotinyliert), Rabbit antiGoat, rat-adsorbed (Vector, Burlingame, USA)

Emzymatische Markierung

- Vecastain – ABC - Alkalische Phosphatase (AP) - Standard-Kit (für 5 ml Tris-Puffer), (Vector, Burlingame, USA)
- Blockingsolution:
Rabbit (Normalserum)
- ABC - Solution :
Reagenz A
Reagenz B

Farbmarkierung

- Färbelösung AP, (DAKO, Hamburg, Deutschland)
- Tris - Puffer (DAKO, Hamburg, Deutschland)

Kerngegenfärbung

- Methyl - Grün (Merck, Darmstadt, Deutschland)

Sonstiges

- Aqua dest
- Verdünnungsreihe Xylol und Alkohol:
- Xylol 100%
- 100% Alkohol
- 96% Alkohol

- 80% Alkohol
- 70% Alkohol
- Aqua dest
- Erlenmeyerkolben, 5 L
- Glasgefäße
- Objektträger-Schiffchen
- Eppendorf- Pipetten : 10µl, 100µl, 200 ul, 1000µl
- Feuchtkammer
- Kleenex
- Pinzette
- Edding (schwarz)
- Pipetten-Spitzen, blau, gelb, kristall
- Eppendorf - Caps, 1,5ml
- Reagenz - Röhrchen 10ml
- Fettstift
- Parafilm M, (American National Can, Chicago, USA)
- Sterile Filter
- Spritzen, 10ml
- Kanülen, Nr. 20
- Alufolie
- Deckgläschen, 24 x 60, (Menzel, Deutschland)
- Glycerin Gelatine, Kaisers (Merck, Deutschland)

2.9.2 Geräte

- pH-Meter pH 320, (WTW, Weilheim, Deutschland)
- geeichte Präzisionswaage (Sartorius. Göttingen, Deutschland)
- Mixer (Heidolph, Deutschland)
- Rüttler (Karl Knecht GmbI I, Sondheim. Deutschland)
- Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland)
- Trockenschrank
- Kühlschränk

2.9.3 Durchführung

Gebrauchslösungen

Puffer:

- TBS: Tris (0,1 M Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan), HCL (0,15 M NaCL, pH8,2)

Normalserum:

- 5 ml Puffer
- 100 µl Normalserum

Biotinylierter Sekundärantikörper:

- 5 ml Puffer
- 100 µl Sek. Antikörper
- 100 µl Normalserum

ABC - Alkalische Phosphatase - Komplex :

- 5 ml Puffer
- 50 µl Reagenz A
- 50 µl Reagenz B

Vor Gebrauch standen die Lösungen 30 Minuten bei Raumtemperatur, um die optimale Reaktionstemperatur zu erlangen und die Avidin-Biotin-Komplexbildung einzugehen.

Färbung

Die Färbung erfolgte nach modifizierter ABC - Methode (*Hsu 1981*), wobei Alkalische Phosphatase anstatt Peroxidase als gekoppeltes Enzym verwendet wurde.

Schnitte entparaffinieren und rehydrieren :

- 2x Xylol → je 10 min.
- 2x 100%Alkohol → je 2 min.
- 1x 96% Alkohol → je 2 min.
- 1x 80% Alkohol → je 2 min.
- 1x 70% Alkohol → je 2 min.
- 1x Aqua dest. → Kurz
- Spülen in Puffer, 2x

Immunhistologie**Schritt 1 Inkubation:**

- mit Normalserum bei Raumtemperatur (RT), → 20 min.

Schritt 2 Inkubation:

- mit Primärantikörper bei 4° C → über Nacht

Waschschritt:

- Spülen in Puffer, 2x

Schritt 3 Inkubation:

- mit biotinylierten Sekundärantikörper bei RT → 60 min

Waschschritt:

- Spülen in Puffer, 2x

Schritt 4 Inkubation:

- Inkubation mit ABC-AP-Komplex bei RT, → 50 min.

Waschschritt:

- Spülen in Puffer, 2x

Schritt 5 Inkubation:

- Inkubation mit AP-Substrat, visuelle Kontrolle unter dem Mikroskop, → ca. 2-10 min.

Waschschritt:

- Spülen in Puffer, 2x

Schritt 6 Kern-Gegenfärbung:

- Kern-Gegenfärbung mit Methyl-Grün, → 8 min

Waschschritt:

- 3x Spülen mit Aqua dest

Eindeckeln mit Glyceringelantine**2.10 Auswertung der durchgeführten Untersuchungen****2.10.1 Geräte und Durchführung**

Die Auswertung der Immunhistologie und der In Situ Hybridisierung der postnatalen Skelettentwicklung erfolgte deskriptiv am Mikroskop (Axioskop 2, Zeiss, Deutschland).

Die In Situ Hybridisierung der Knochenheilungsversuche wurde bildanalytisch ausgewertet. Das Mikroskop (DM RB, Leica, Deutschland) wurde über eine Kamera (3CCD Color Video Kamera, Sony, Japan) mit einem Rechner (Sony, Japan) verbunden. Die Messung erfolgte mit einem Makro (KS 400, Zeiss, Deutschland), welches für diese Anwendung modifiziert wurde. Das BMP-2-Signal wurde in definierten Regions of Interest (ROI) gemessen. Dabei wurden drei periostale und drei endostale Bereiche sowie der Osteotomiespalt jeweils für die fixateurnahe und fixateurferne Kortikalisseite als ROIs definiert. Das positive BMP-2-Signal wurde von

dem Programm erkannt und im Verhältnis zur gemessenen Fläche wiedergegeben. Es resultiert der Wert: BMP-2 positive Fläche [μm^2] / Gesamtfläche [μm^2].

2.10.2 Statistik

Zur Auswertung wurden deskriptive und varianzanalytische Verfahren verwendet. Die Wirkung der Faktoren Medikation, Zeit und Fixateur externe wurden durch eine drei faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Die Wirkung der Faktoren Medikation und Fixateur externe wurden isoliert zu den einzelnen Zeitpunkten durch eine zwei faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Für die Varianzanalysen wurden Post-Hoc-Tests nach Scheffé berechnet. Dieser stellt die Mittelwerte zu den jeweiligen Varianzanalysen im Paarvergleich dar. Das Signifikanzniveau wurde bei $p=0,05$ festgelegt.

Zur Berechnung der statistischen Daten wurde die SPSS Software (Version 11,0; SPSS Inc. Chicago, Illinois) verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 BMP-2 Expression am 11. Tag der postnatalen Knochenentwicklung

Im Folgenden wird die Knochenentwicklung am Beispiel des 11. Tages postnatal dargestellt. Die Ergebnisse der histologischen Übersichtsfärbung, die BMP-2 Genexpression und die BMP-2 Proteinexpression werden beschrieben.

Die Angaben beziehen sich auf Epi-, Meta- und Diaphyse von Femura in sagittaler Schnittebene.

3.1.1 Histologische Färbung mit Alcianblau (HAB)

Epiphyse und Metaphyse

Am 11. Tag postnatal ist der Übergangsbereich der Epi- zur Metaphyse durch eine aktive Wachstumsfuge (Abbildung 6) gekennzeichnet. "Ruhende" Chondrozyten reihen sich proximal in die Proliferationszone ein. Mit zunehmender Reife vergrößern sich die Zellen und wachsen säulenartig in die Metaphyse ein. Im metaphysären Bereich zeigen Knorpelzellen ein hypertrophiertes Karion (=Zelleib) und gehen in eine aufgelöste Knorpelmatrix über. Der endostale Markraum schließt sich distal an.

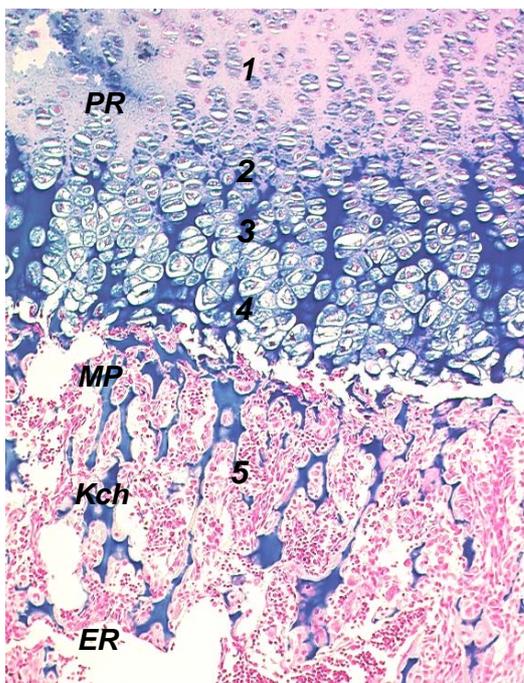


Abbildung 6: 100x,HAB, Epi-, Metaphyse, am 11. Tag postnatal: Ruhende Chondrozyten (1) reihen sich von proximal in die Proliferationszone (PR) ein und gehen in proliferierende Chondrozyten (2) über. Diese wachsen säulenartig als hypertrophierende Chondrozyten (3) in die Metaphyse (MP) ein und zeigen letztlich eine aufgelöste Knorpelmatrix (4). Distal befindet sich residuelle Knorpelmatrix im Übergang zu köchernen Strukturen (Kch). Erythrozyten (5) und blutbildende Zellen des endostalen Raums (ER) schließen sich distal an.

Diaphyse

Der diaphysäre Bereich ist durch eine unreife Kortikalis mit geflechtknochenähnlicher Struktur gekennzeichnet (Abbildung 7). Das Periost besteht aus zellreichem Gewebe. Zahlreiche mesenchymähnliche Fibrozyten des Periost umgeben "jungen" Knochen. Dieser besteht aus inselartigen, knöchernen Strukturen. Innerhalb des primitiven Knochens befinden sich plasmareiche Osteozyten. Die Knocheninseln werden von Osteoblasten umsäumt. Zwischen den knöchernen Strukturen befinden sich zellreiche höhlenartige Räume. Endostal umgeben zahlreiche Knochenmarkszellen eine sich im Aufbau befindende Kortikalis.

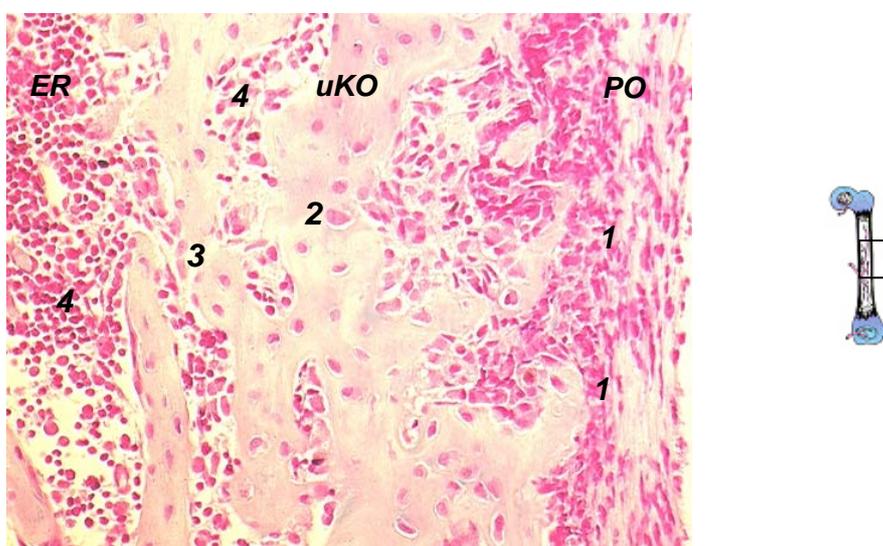


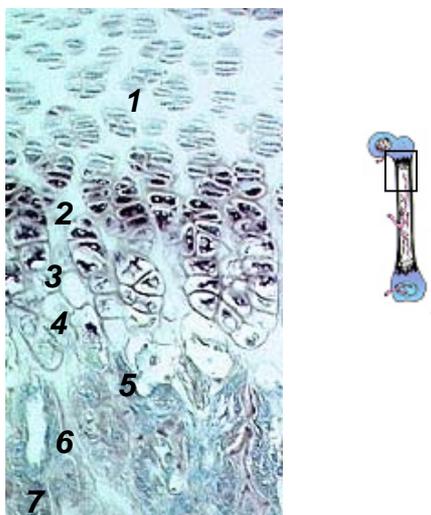
Abbildung 7: 200x, HAB, Diaphyse am 11. Tag postnatal: Zellreiches, breites Periost (**PO**) befindet sich an einer unreifen Kortikalis (**uKO**). Mesenchymähnliche Fibrozyten (**1**) umgeben primitive köcherne Strukturen. Plasmareiche Osteozyten (**2**) befinden sich innerhalb von Knocheninseln. Osteoblasten (**3**) umsäumen die Knocheninseln. Höhlenartige Zwischenräume beinhalten Erythrozyten und Knochenmarkszellen (**4**). Der Endostale Raum (**ER**) schließt sich mit Knochenmarkszellen (**4**) an.

3.1.2 In Situ Hybridisierung (ISH)

Epiphyse und Metaphyse

In der aktiven Wachstumsfuge ist die BMP-2 mRNA im Zytoplasma von Chondrozyten aller Stadien nachweisbar (Abbildung 8). Ruhende und proliferierende Zellen zeigen ein schwach bis moderat positives Signal. Die Färbung ist in reifenden Zellen stark positiv und nimmt mit zunehmender Degeneration der Chondrozyten ab. In der extrazellulären Knorpelmatrix ist kein Signal feststellbar. Eine schlierenartige Anfärbung fällt in der metaphysären Übergangszone der aufgelösten Knorpelmatrix bzw. der entstehenden

den Knochenmatrix auf. Osteoklasten befinden sich in Bereichen der entstehenden Knochenmatrix.



Abbildungen 8: 100x, ISH, Epi-, Metaphyse am 11. Tag postnatal: Ein schwach bis moderat positives Signal tritt in ruhenden und proliferierenden Chondrozyten (1) auf. Reifende Chondrozyten (2) und hypertrophierenden Chondrozyten (3) zeigen ein stark positives Signal. Ein moderat positives Signal befindet sich in degenerierenden Chondrozyten (4). Eine diffuse Anfärbung fällt in der aufgelösten Knorpelmatrix (5) auf. Moderat positive osteoblastenähnliche Zellen (6) und moderat bis stark positive osteoklastenähnliche Zellen (7) befinden sich in Bereichen der entstehenden Knochenmatrix.

Diaphyse

Im Bereich des Periosts umgeben zahlreiche moderat positive, mesenchymähnliche Fibrozyten die entstehende Kortikalis (Abbildung 9). Innerhalb der entstehenden knöchernen Strukturen befinden sich moderat bis stark positive Osteozyten. Signal negative Osteozyten halten sich innerhalb von Strukturen mit reifer Knochenmatrix auf. Moderat bis stark positive Osteoblasten umsäumen perlschnurartig knöchernen Inseln (Abbildung 10). In höhlenartigen Zwischenräumen befinden sich überwiegend signalnegative Erythrozyten und Knochenmarkszellen.

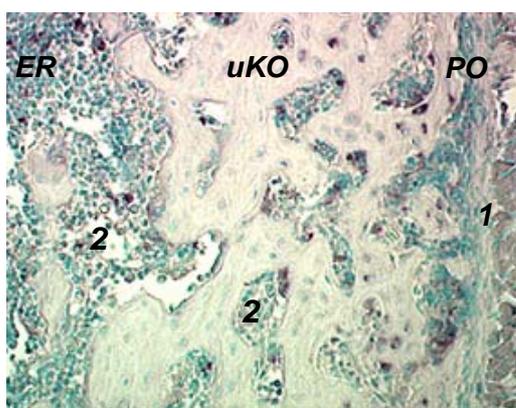


Abbildung 9: 200x, ISH, Diaphyse am 11. Tag postnatal: Moderat positive mesenchymähnliche Zellen (1) befinden sich im periostalen Bereich (PO). Inselförmige knöchernen Strukturen bilden die uneife Kortikalis (uKO), höhlenartige Zwischenräume beinhalten negative Erythrozyten und Knochenmarkszellen (2), der endostale Raum (ER) schließt sich mit zahlreichen weitgehend negativen Knochenmarkszellen (3) an die sich im Aufbau befindende Kortikalis an.

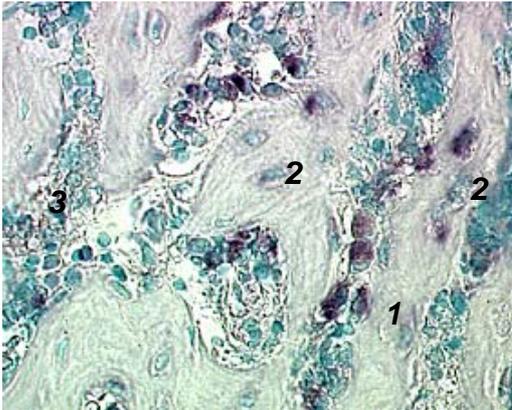


Abbildung 10: 400x, ISH, Diaphyse am 11. Tag postnatal: Stark positive Osteoblasten (1) umsäumen perlschnurartig knöcherne Strukturen. Moderat bis stark positive Osteozyten (2) befinden sich innerhalb einer geflechtknochenähnlichen Matrix. In höhlenartigen Zwischenräumen befinden sich überwiegend negative Erythrozyten und Knochenmarkszellen (3).

Osteoklastenähnliche Zellen zeigen ein moderates bis starkes Signal. Sie befinden sich in Knochenlakunen (Abbildung 11) und bilden Zellansammlungen teilweise in Form sehr großer Cluster (Abbildung 12).

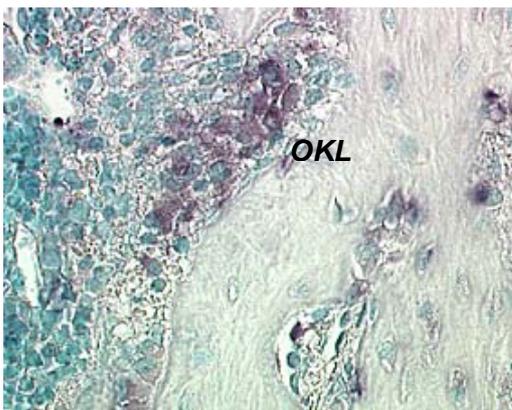


Abbildung 11: 400x, ISH, Diaphyse am 11. Tag postnatal: Osteoklastenähnliche Zellansammlung (OKL) in einer Knochenlakune

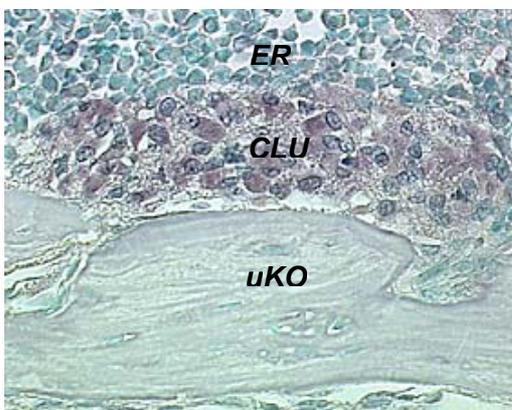


Abbildung 12: 400x, ISH, Diaphyse am 11. Tag postnatal. Stark positiver großer Zell-Cluster von osteoklasten (CLU) der im endostalen Raum (ER) an der unreifen Kortikalis (uKO) auftritt.

Im endostalen Raum fallen moderat positive, sich in Migration befindende, makrophagenähnliche Knochenmarkszellen auf (Abbildung 13). Sie sind weitestgehend von negativen Knochenmarkszellen umgeben.

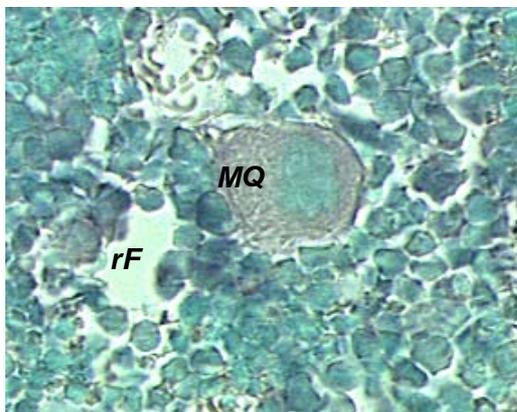


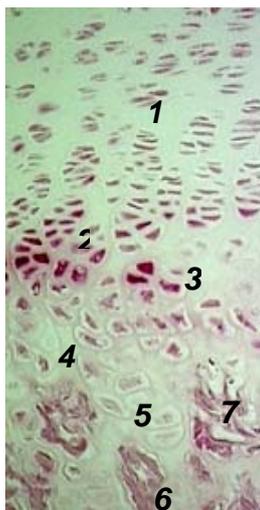
Abbildung 13: 400x, ISH, Endostaler Raum am 11. Tag postnatal: Eine moderat positive makrophagenähnliche Zelle (MQ) ist weitgehend von negativen Knochenmarkszellen umgeben. Der residuelle Freiraum (rF) den diese Zelle hinterlässt, könnte auf eine Migration hindeuten. Die mobile Eigenschaft und die Größe der Zelle sind charakteristisch für Zellen des monozytären Systems, zu denen auch Osteoklasten gezählt werden. Bei dem residuellen Freiraum könnte es sich aber auch um ein Artefakt handeln.

3.1.3 Immunhistologie (IHC)

Die BMP-2 Proteinexpression kann in der Epi-, Meta- und Diaphyse in allen osteogenen Zelltypen nachgewiesen werden. Es sind keine wesentlichen Unterschiede im Verteilungsmuster zwischen mRNA und Proteinexpression erkennbar. Somit beschränkt sich die Darstellung der Ergebnisse der immunhistologischen Methode auf exemplarische Beispiele.

Epiphyse und Metaphyse

In der aktiven Wachstumsfuge ist die BMP-2 Proteinexpression im Zytoplasma von Chondrozyten aller Reifegrade nachweisbar (Abbildung 14). Ruhende und proliferierende Zellen zeigen ein schwach bis moderat positives Signal. Die Färbung dominiert in reifenden Zellen stark positiv und nimmt mit zunehmender Degeneration der Chondrozyten ab. In der extrazellulären Knorpelmatrix ist kein Signal erkennbar. In der metaphysären Übergangzone fällt eine schlierenartige Anfärbung der aufgelösten Knorpelmatrix bzw. der entstehenden Knochenmatrix auf. Die immunhistologische Färbung stimmt mit der mRNA-Expression weitestgehend überein.



Abbildungen 14 :Epi-, Metaphyse am 11. Tag postnatal. IHC des BMP-2 Proteins. Schwach bis moderat positives Signal in ruhenden und proliferierenden Chondrozyten (1), stark positives Signal in reifenden Chondrozyten (2), stark positives Signal in hypertrophierenden Chondrozyten (3), moderat positives Signal in degenerierenden Chondrozyten (4), diffuse Anfärbung der aufgelösten Knorpelmatrix (5), moderat positive Osteoblasten (6), moderat bis stark positive Signal in einer osteoklastenähnlichen Zelle (7).

Diaphyse

Im Bereich des Periost umgeben moderat positive mesenchymähnliche und erythrozytenähnliche Zellen die entstehende Kortikalis (Abbildung 15). Moderat bis stark positive Osteozyten dominieren innerhalb der sich im Aufbau befindenden Kortikalis. Moderat bis stark positive Osteoblasten umsäumen Knocheninseln. In höhlenartigen Zwischenräumen halten sich überwiegend weitere Knochenmarkszellen auf.

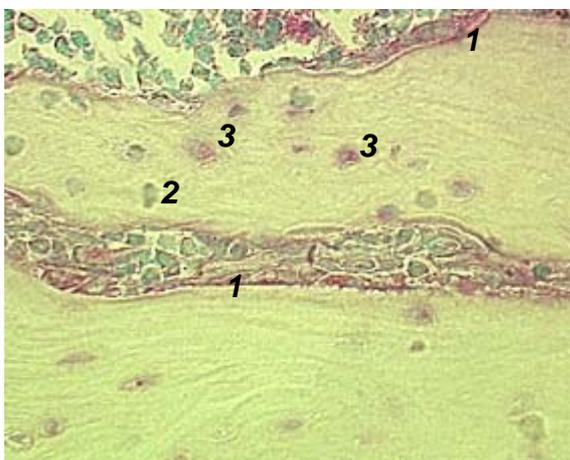


Abbildung 15: 400x, IHC, Diaphyse am 11. Tag postnatal: stark positive Osteoblasten (1) reihen sich perlschnurartig an die entstehende Kortikalis, negative bis moderat positive Knochenmarkszellen (2) befinden sich in höhlenartigen Zwischenräumen und moderat bis stark positive Osteozyten (3) innerhalb von Knocheninseln. Es ist kein Signal in der Knochenmatrix nachweisbar.

Osteoklasten zeigen ein moderates bis starkes Signal. Sie fallen durch die Bildung einer Ansammlung von Zellen in Form von Zell-Clustern auf (Abbildung 16). Im endostalen Raum befinden sich moderat positive makrophagenähnliche Knochenmarkszellen in Migration (Abbildung 17).

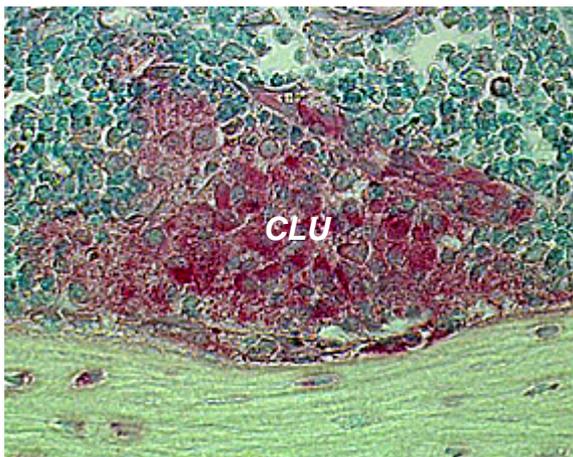


Abbildung 16: 400x, IHC, Stark positiver großer Zell-Cluster (**CLU**) an der postnatalen Kortikalis.

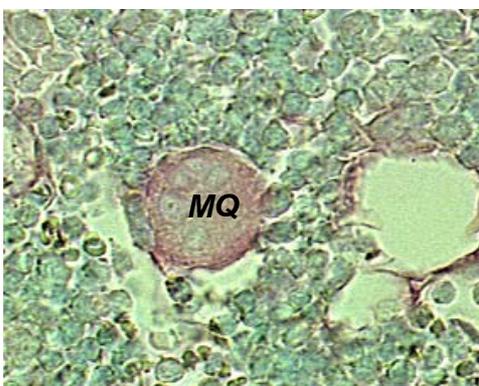


Abbildung 17: 400x, IHC: moderat positive makrophagenähnliche Knochenmarkszelle (**MQ**) im endostalen Raum, umgeben von weitestgehend negativen Knochenmarkszellen. Auch diese große Knochenmarkszelle weist typische Merkmale des monozytären Systems auf.

Zusammenfassung

BMP-2 ist während der Knochenentwicklung in osteogenen Zelltypen der chondralen und der enchodralen Ossifikation nachweisbar. Es handelt sich dabei vorrangig um ein intrazelluläres Signal. Es ist darüberhinaus eine diffuse Anfärbung der sich auflösenden Knorpelmatrix im Bereich der Metaphyse erkennbar. Innerhalb einer reifen Knochenmatrix ist kein positives Signal vorhanden. Bei den positiven osteogenen Zelltypen ist eine Zunahme der Signalintensität analog zur Größe des Zellplasmas erkennbar.

Im Vergleich zwischen der mRNA- und Protein-Expression tritt eine Übereinstimmung sowohl in den Zelltypen als auch im topographischen Verteilungsmuster auf. Allerdings fällt das Ergebnis der immunhistologischen Methode durch ein insgesamt schwächeres Signal und eine verstärkte Hintergrundfärbung auf.

Osteoklasten zeigen ein stark positives Signal in Form von großen Zellansammlung an der sich im Aufbau befindenden Kortikalis. Kleinere Osteoklasten sind nicht immer ein-

deutig identifizierbar. Da BMP-2 nicht spezifisch, sondern von verschiedenen Zelltypen exprimiert wird, könnte es sich bei den osteoklastenähnlichen Zellen auch um mehrere übereinander positionierte Osteoblasten handeln.

Tabelle 1: BMP-2 Expression in der Epi- und Metaphyse am 11. Tag postnatal

Zelltypen	Signalstärke
Ruhende Chondrozyten	+ / -
Proliferierende Chondrozyten	+ / -
Reifende Chondrozyten	+ + +
Hypertrophierende Chondrozyten	+ + + / + +
Osteoblasten	+ + / + + +
Osteoklasten	+ + +

Tabelle 2: BMP-2 Expression in der Diaphyse am 11. Tag postnatal

Zelltypen	Signalstärke
Osteoblasten	+ + +
Osteozyten	+ + / + + +
Osteoklasten	+ + +
Makrophagen-ähnliche Knochenmarkszellen	+ +

(+ + +) stark (+ +) moderat (+) minimal

3.2 BMP-2-Expression in der physiologischen versus durch GH stimulierten Knochenheilung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der histologischen Färbung mit Alcianblau und der BMP-2 Expression während der Knochenheilung am 7., 14. und 21. Tag nach der Operation dargestellt. Die Beschreibung bezieht sich auf den diaphysären Bereich des operierten Femurs in einer sagittalen Schnittebene.

Die BMP-2 mRNA- und Protein-Expression der Kontroll-Gruppe wird den jeweiligen Zeitpunkten der GH-stimulierten Gruppe gegenübergestellt. Der Osteotomiebereich der fixateurnahen Kortikalis wird mit dem Osteotomiebereich der fixateurfernen Kortikalis des gleichen operierten Femurs verglichen (Abbildungen 18 und 19).

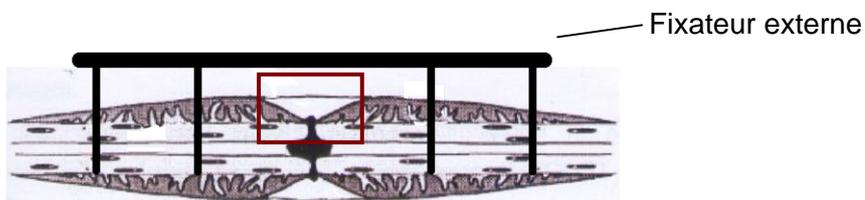


Abbildung 18: Fixateurnahe Kortikalis

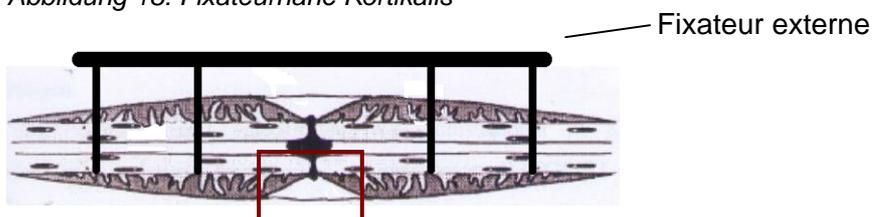


Abbildung 19: Fixateurferne Kortikalis

3.2.1 7 Tage nach der Operation

3.2.1.1 Histologische Färbung mit Alcianblau (HAB)

Am 7. Tage nach der Operation tritt in beiden Gruppen eine Gewebeneubildung im Osteotomiebereich auf (Abbildung 20). Im marginalen Bereich tritt eine periostale Reaktion auf. Proximal und distal des Osteotomiespaltes befindet sich in geringer Menge Kallus. Der Osteotomiespalt ist in den periostalen Bereichen distal und proximal des Osteotomiespaltes mit zellreichem bindegewebigem Kallus aufgefüllt. Der Spaltbereich zwischen den Kortikalisenden der fixateurnahen Kortikalis ist mit primitiven knöchernen Strukturen (Geflechtknochen) durchsetzt. Primitive knöchernen Strukturen (Geflechtknochen) und bindegewebiger Kallus setzten sich in den endostalen Bereich fort.

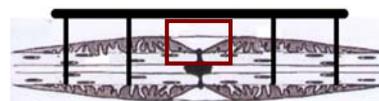
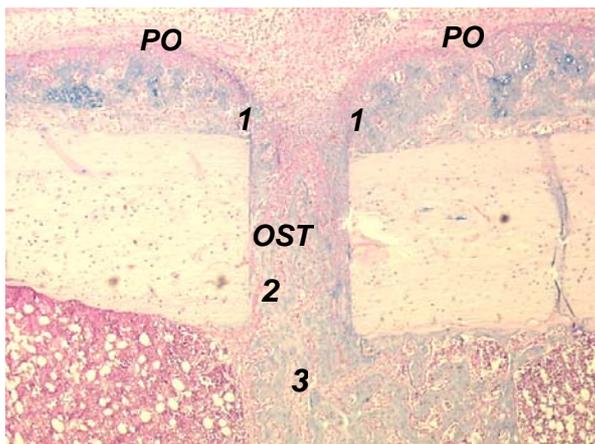


Abbildung 20: 50x, HAB, Gewebeneubildung im Osteotomiebereich am 7. Tag postoperativ am Beispiel der fixateurnahen Kortikalis eines Tieres aus der Kontroll-Gruppe: Periostale Reaktion im periostalen Bereich (PO) mit einer Gewebeneubildung distal und proximal des Osteotomiespalt (OST), marginales Bindegewebe (1), welches von periostal in den OST einwandert, primitive knöcherne Strukturen (2) im Osteotomiespalt, Bindegewebe und primitiver Knochen schließen sich im endostalen Raum (3) an.

Der periostale Kallus besteht aus verschiedenen Gewebeschichten. Periostale, mesenchymähnliche Zellen bilden marginales Bindegewebe. Dieses geht in Richtung Kortikalis in zellreiche geflechtknochenartige Strukturen über. Innerhalb dieser Strukturen treten chondrozytenähnliche und vereinzelt osteozytenähnliche Zellen auf. In unmittelbarer Nähe zur Kortikalis nimmt der Zellreichtum stark ab. Neugebildete knöcherne Strukturen (Osteoid) bilden einen Übergang zum Lamellenknochen der Kortikalis (Abbildung 21).

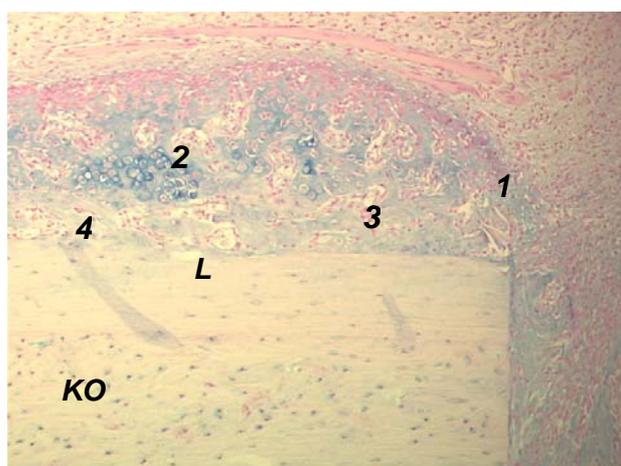


Abbildung 21: 200x, Periostale Reaktion am 7. Tag postoperativ am Beispiel der fixateurnahen Kortikalis eines Tieres aus der Kontroll-Gruppe: Marginales periostales Bindegewebe mit mesenchymähnlichen Zellen (1) infiltrieren den OST. Subperiostal tritt eine Geflechtknochenbildung mit einer Ansammlung von chondrozyten-ähnlichen (2), osteozyten- und osteoblasten-ähnlichen Zellen (3) auf. Primitive knöcherne Strukturen befinden sich bereits in unmittelbarer Nähe zur Kortikalis (4) (Osteoid). Lamellenknochen (L) bildet die Kortikalis (KO).

Fixateurnahe Kortikalis

Mesenchymähnliche Zellen des bindegewebigen Kallus infiltrieren den Spaltbereich zwischen den Kortikalisenden. Gleichzeitig bildet zellreicher Geflechtkochen inselartige Strukturen. Innerhalb der primitiven Knocheninseln befinden sich osteozytenähnliche Zellen und vereinzelt chondrozytenähnliche Zellen (Abbildung 22).

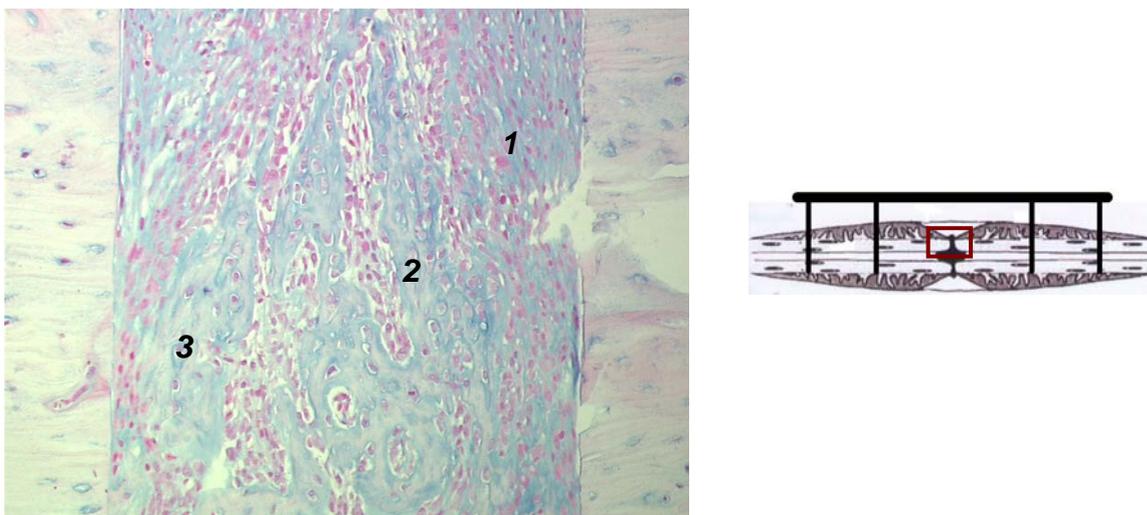


Abbildung 22: 200x, HAB, Osteotomiespalt zwischen den Kortikalisenden am 7. Tag postoperativ am Beispiel der fixateurnahen Kortikalis eines Tieres aus der Kontroll-Gruppe: Mesenchymähnliche Zellen (1) umgeben neugebildete Knocheninseln. Osteozytenähnliche Zellen (2) und vereinzelt chondrozytenähnliche Zellen (3) treten innerhalb des primitiven Knochengewebes auf.

Fixateurferne Kortikalis

Der Osteotomiespalt der fixateurfernen Kortikalis unterscheidet sich im Vergleich zum Osteotomiespalt der fixateurnahen Kortikalis durch eine geringere Neubildung an primitivem Knochen. Bindegewebiger Kallus mit zahlreichen mesenchymähnlichen Zellen dominiert hier den Bereich zwischen den Kortikalisenden (Abbildung 23). Teilweise befindet sich der bindegewebige Kallus im Übergang zu Geflechtknochen und weist dort osteozytenähnliche Zellen und chondrozytenähnliche Zellen auf.

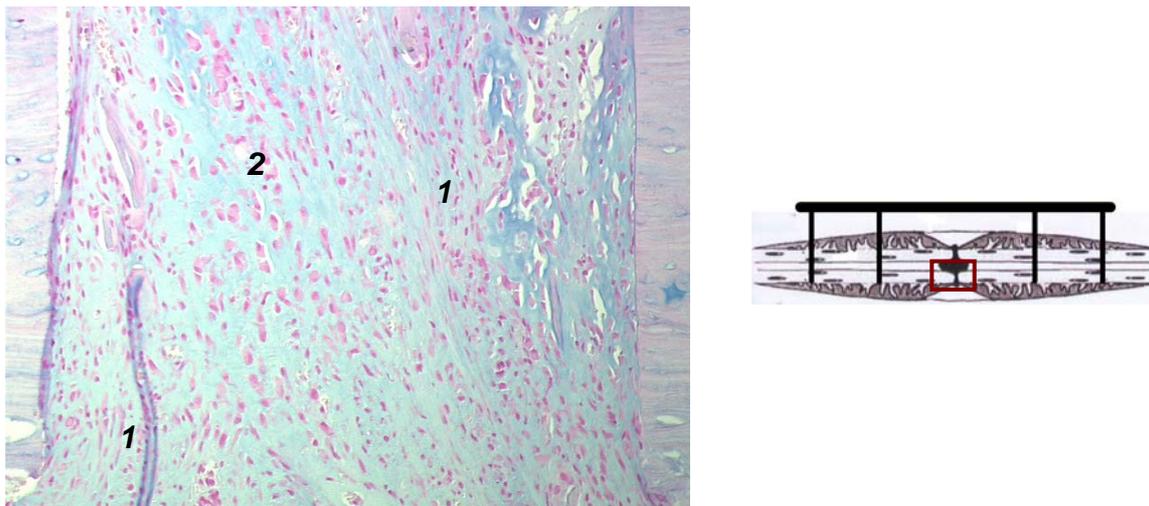


Abbildung 23: 200x, HAB, Osteotomiespalt der fixteurfernen Kortikalis am 7. Tag postoperativ am Beispiel eines Tieres aus der Kontroll-Gruppe: Überwiegend bindegewebiger Kallus mit zahlreichen mesenchymähnlichen Zellen (1), die sich teilweise in Transformation zu osteozytenähnlichen und chondrozytenähnlichen Zellen (2) befinden. Es treten insgesamt wenig eindeutige Knochenstrukturen zwischen den Kortikalisenden auf.

Der endostale Bereich der Gewebeneubildung zeigt starke individuelle Diversität. Im Gruppenvergleich zwischen der GH-stimulierten und der Kontroll-Gruppe unterscheidet sich die Morphologie im Osteotomiespalt nach 7 Tagen nicht wesentlich.

3.2.1.2 In Situ Hybridisierung (ISH)

7 Tage nach der Operation ist die BMP-2 mRNA-Expression im Bereich der periostalen Reaktion, im Osteotomiespalt und im endostalen Raum des Osteotomiebereichs lokalisierbar. Es handelt sich um ein intrazelluläres Signal in osteogenen Zellpopulationen der Knochenheilung.

Der marginale Bereich des bindegewebigen Kallus enthält zahlreiche mesenchymähnliche Zellen mit einem schwach bis moderat positiven BMP-2 Signal (Abbildung 24). Stark positive osteozytenähnliche und chondrozytenähnliche Zellen treten innerhalb der subperiostalen Geflechtknochenbildung auf. Stark positive osteoblastenähnliche Zellen umsäumen primitive knöcherne Strukturen. Neugebildete knöcherne Strukturen in unmittelbarem Übergang zur Kortikalis werden ebenfalls von stark positiven osteoblastenähnlichen Zellen umsäumt. Im Lamellenknochen der Kortikalis ist kein Signal nachweisbar. Marginale schwach bis moderat positive mesenchymähnliche Zellen wandern in den Osteotomiespalt ein.

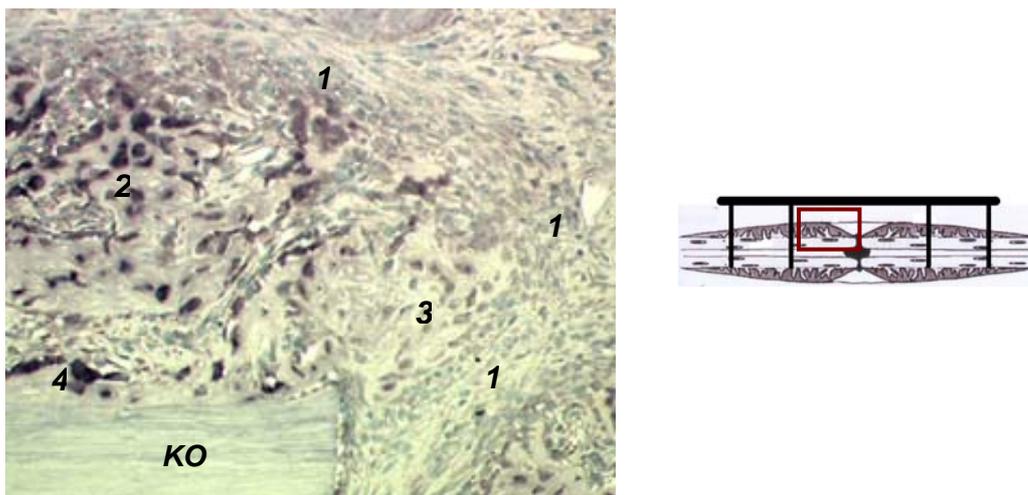


Abbildung 24: 200x, ISH, BMP-2 mRNA Expression während der periostale Reaktion am 7. Tag postoperativ am Beispiel der fixateurnahen Kortikalis eines Tieres aus der Kontroll-Gruppe: Schwach bis moderat positive mesenchymähnliche Zellen (1) bilden marginales Bindegewebe, welches von periostal den Osteotomiespalt infiltriert. Moderat bis stark positive chondrozytenähnliche (2) und osteozytenähnliche Zellen (3) befinden sich innerhalb des Geflechtknochens. Osteoblastenähnliche Zellen (4) umsäumen Geflechtknochen und neugebildete knöcherne Strukturen in unmittelbarer Nähe zur Kortikalis. Es ist kein Signal im Lamellenknochen der Kortikalis (KO) nachweisbar.

Fixateurnahe Kortikalis

Die BMP-2 mRNA wird im Osteotomiespalt der Fixateurexterne nahen Kortikalis von moderat positiven mesenchymähnlichen Zellen des bindegewebigem Kallus exprimiert. Zahlreiche stark BMP-2 positive osteozytenähnliche Zellen treten innerhalb des Geflechtknochens auf. Neu gebildete Knochen werden von stark positiven osteoblastenähnlichen Zellen umsäumt (Abbildungen 25a und 25b).

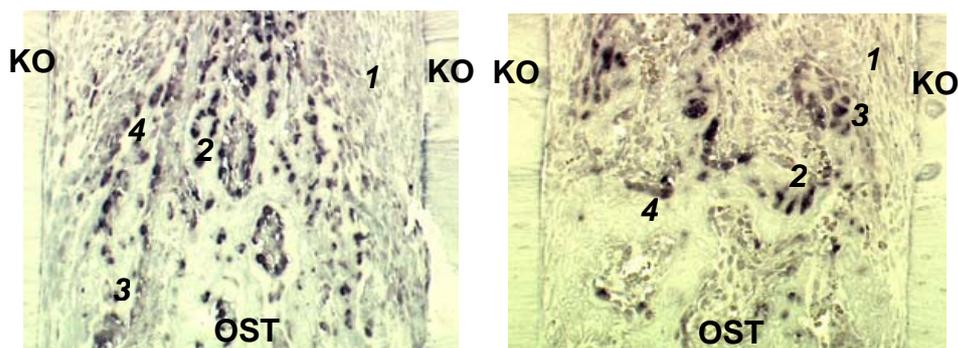


Abbildung 25a

Abbildung 25b

200x, ISH, am 7. Tag postoperativ, Osteotomiespalt (OST) der fixateurnahen Kortikalis: Der Bereich zwischen den Kortikalisenden (KO) weist in der Kontroll-Gruppe (Abbildung 25a) und in der GH-Gruppe (Abbildung 25b) BMP-2 mRNA positive, im Expressionmuster übereinstimmende Zellpopulationen auf. Zahlreiche schwach bis moderat positive mesenchymähnliche Zellen (1) umgeben neugebildete Knochenstrukturen. Stark positive osteozytenähnliche Zellen (2) und vereinzelt stark positive chondrozytenähnliche Zellen (3) treten innerhalb des neugebildeten Knochengewebes auf. Osteoblastenähnliche Zellen (4) umsäumen knöcherne Strukturen.

Fixateurferne Kortikalis

Der Osteotomiespalt der fixateurfernen Kortikalis unterscheidet sich vom Osteotomiespalt der fixaturnahen Kortikalis durch einen größeren Anteil an bindegewebigem Kallus. Die BMP-2 mRNA wird überwiegend von moderat positiven mesenchymähnlichen Zellen exprimiert. Im Übergang zum Geflechtknochen ist BMP-2 vereinzelt in stark positiven osteozytenähnlichen Zellen nachweisbar. Der geringere Anteil an eindeutigen knöchernen Strukturen ist ein Hinweis auf den geringeren Reifegrad der Knochenneubildung auf der fixateurfernen Kortikalis (Abbildungen 26a und 26b).

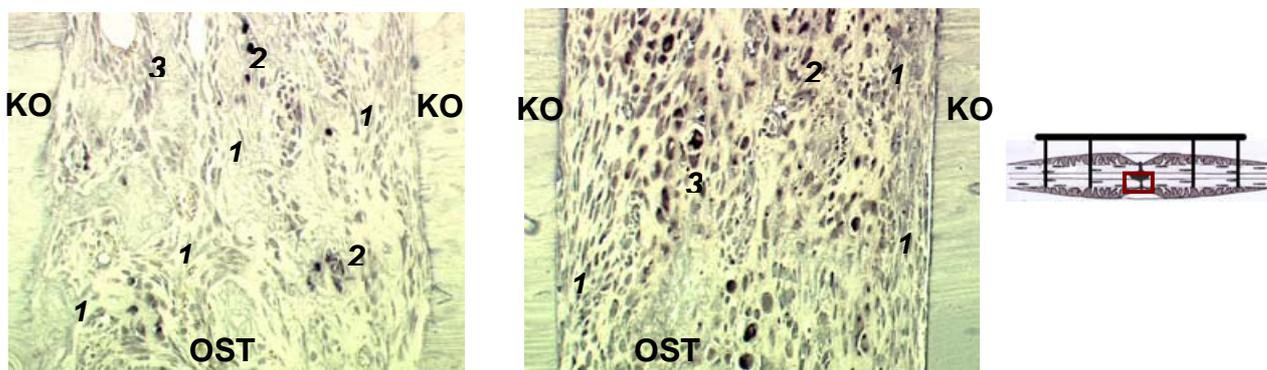


Abbildung 26a

Abbildung 26b

200x, ISH, am 7. Tag postoperativ, **OST** der fixateurfernen Kortikalis: Bei der Kontroll- (Abbildung 26a) sowie der GH-Gruppe (Abbildung 26b) tritt eine geringere Neubildung von knöchernen Strukturen auf. Die BMP-2 mRNA befindet sich hier überwiegend in schwach bis moderat positiven mesenchymähnlichen Zellen (1). Vereinzelt treten stark positive osteozytenähnliche Zellen (2) und stark positive chondrozytenähnliche Zellen (3) auf.

Im Gruppenvergleich sind am 7. Tag nach der Operation keine wesentlichen Unterschiede in der BMP-2 Genexpression zwischen Kontroll- und GH-Gruppe erkennbar.

3.2.1.3 Immunhistologie (IHC)

Das BMP-2-Protein ist im Bereich der periostalen Reaktion, im Osteotomiespalt und im endostalen Osteotomiebereich nachweisbar. Es wird von osteogenen Zelltypen exprimiert. Es handelt sich um mesenchymähnliche Zellen, osteozytenähnliche und osteoblastenähnliche Zellen. Die BMP-2-Proteinexpression stimmt weitestgehend mit der BMP-2-mRNA-Expression in den Zellpopulationen und im topographischen Verteilungsmuster überein. Aufgrund der stärkeren Hintergrundfärbung der immunhistologischen Methode beschränkt sich die Darstellung der Ergebnisse der BMP-2-Proteinexpression auf exemplarische Beispiele (Abbildungen 27 und 28).

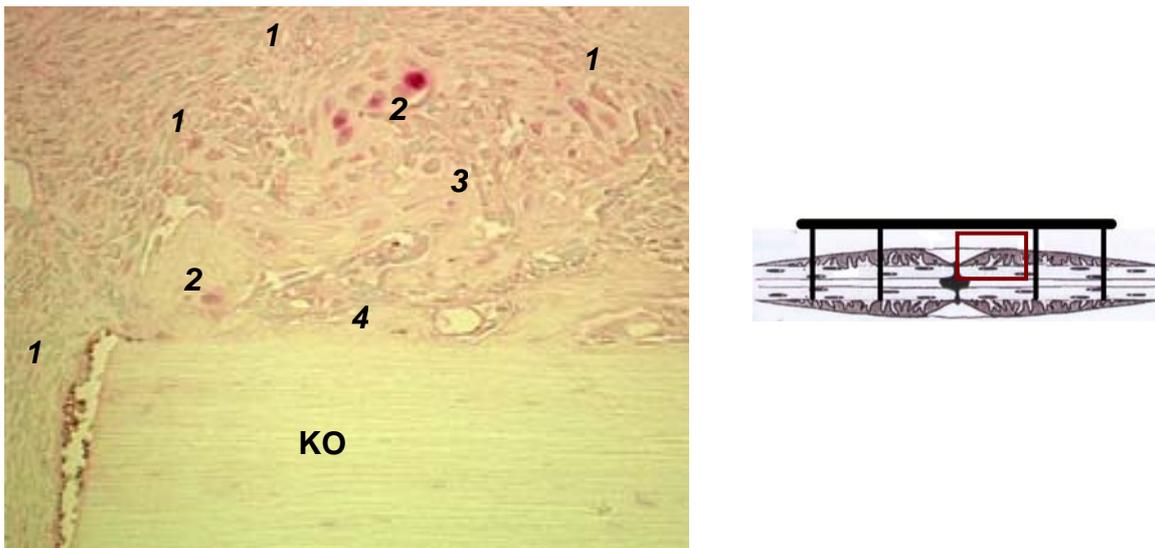


Abbildung 27: 200x, IHC, Periostale Reaktion am 7. Tag postoperativ am Beispiel der fixateur-nahen Kortikalis eines Tieres aus der Kontroll-Gruppe. Schwach bis moderat positive mesenchymähnliche Zellen (1) befinden sich im marginalen Bereich des bindegewebigen Kallus, moderat bis stark positive chondrozytenähnliche (2) und osteozytenähnliche Zellen (3) im Geflechtknochen. Osteoblastenähnliche Zellen (4) umsäumen Geflechtknochen und neugebildete knöcherne Strukturen in unmittelbarer Nähe zur Kortikalis. Kein Signal im Lamellenknochen der Kortikalis (KO)

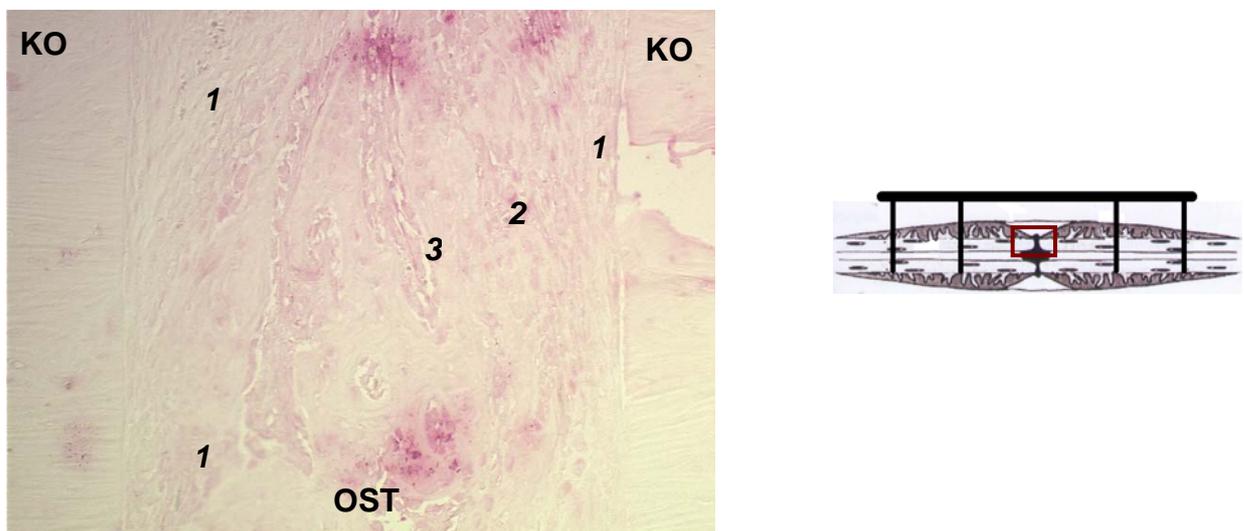


Abbildung 28: 200x, HAB, Osteostomiespalt (OST) zwischen den Kortikalisenden (KO) am 7. Tag postoperativ am Beispiel der fixateurnahen Kortikalis eines Tieres aus der Kontroll-Gruppe: schwach positive mesenchymähnliche Zellen (1), moderat positive osteozytenähnliche Zellen im Geflechtknochen (2), osteoblastenähnliche Zellen (3) umsäumen Geflechtknochen und neugebildete knöcherne Strukturen.

3.2.2 14 Tage nach der Operation

3.2.2.1 Histologische Färbung mit Alcianblau (HAB)

Fixateurnahe Kortikalis

Am 14. Tag nach der Operation ist die periostale Reaktion in beiden Gruppen deutlich rückläufig (Abbildung 29). Im Osteotomiespalt der fixateurnahen Kortikalis der Kontroll-Gruppe und der GH-Gruppe ist mesenchymales Granulationsgewebe weitgehend durch Knochengewebe ersetzt. Osteoblasten umsäumen nun vermehrt perlschnurartig den neugebildeten Knochen. Osteozyten sind von Knochen umgeben. In höhlenartigen Zwischenräumen treten vereinzelt retikuläre bzw. blutbildende Zellen auf.

Im Vergleich zwischen den Gruppen tritt bei der Kontroll-Gruppe teilweise eine Chondrogenese auf der fixateurnahen Kortikalis auf (siehe ISH).

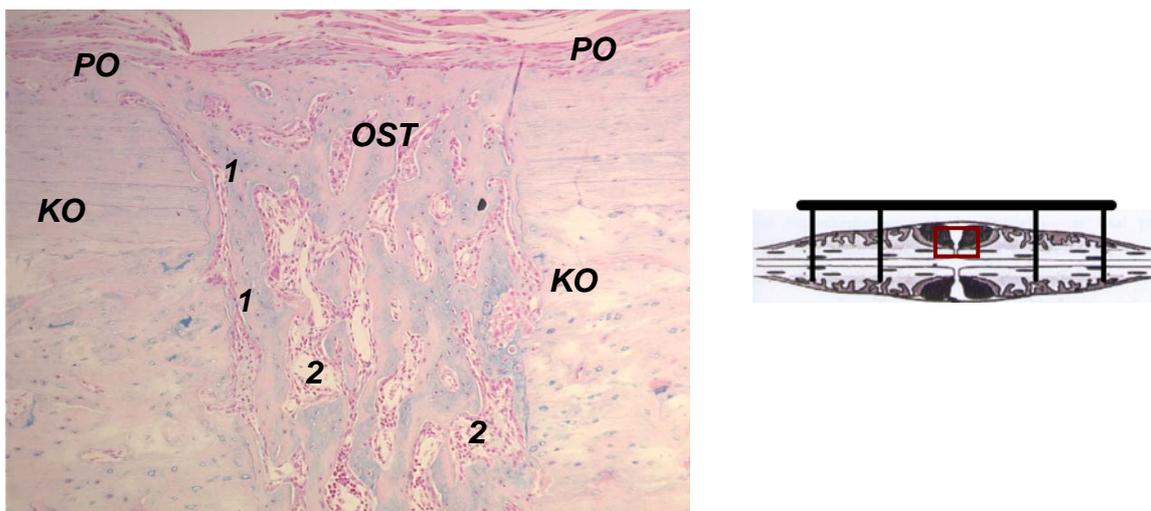


Abbildung 29: 100x, HAB, Knochenneubildung zwischen den Kortikalisenden (**KO**) am 14. Tag postoperativ auf der fixateurnahen Kortikalis am Beispiel eines Tieres aus der GH-Gruppe: Die periostale Reaktion (**PO**) ist stark zurückgegangen. Der **OST** ist mit primitivem Knochen aufgefüllt, Osteoblasten (**1**) umsäumen perlschnurartig neugebildeten Knochen. Höhlenartige Zwischenräume enthalten retikuläre und blutbildende Zellen (**2**).

Fixateurferne Kortikalis

Im Unterschied zur fixateurnahen Kortikalis tritt zu diesem Zeitpunkt auf der fixateurfernen Kortikalis eine vermehrte Chondrogenese im Osteotomiespalt auf. Reifende und hypertrophierende Chondrozyten befinden sich im Bereich zwischen den Kortikalisenden (Abbildungen 30a und 30b).

In der Kontroll-Gruppe bilden zahlreiche reifende und hypertrophierende Chondrozyten eine Knorpelmatrix (Abbildung 30a). Diese Knorpelmatrix befindet sich teilweise im Übergang zu primitivem Knochen.

Auf der fixateurfernen Kortikalis der GH-Gruppe tritt zwar ebenfalls Chondrogenese auf, es handelt sich jedoch um einzelne Chondrozyten. Diese sind weitestgehend von neugebildetem Knochen umgeben. Eine schlierenartige Anfärbung mit Alcianblau innerhalb des neugebildeten Knochens ist ein Hinweis auf eine ehemalige Knorpelmatrix (Abbildung 30b).

Im Gruppenvergleich ist im Osteotomiespalt der fixateurfernen Kortikalis die Chondrogenese ausgeprägter bei der Kontroll-Gruppe. In der GH-Gruppe ist der Osteotomiespalt bereits mit primitivem Knochen aufgefüllt. Durch die Färbung mit Alcianblau ist hier eine residuelle und zu primitivem Knochen weiterentwickelte Knorpelmatrix nachweisbar.

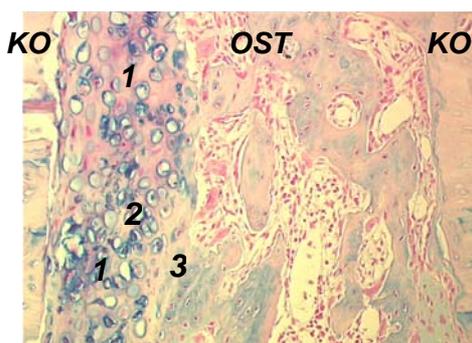


Abbildung 30a

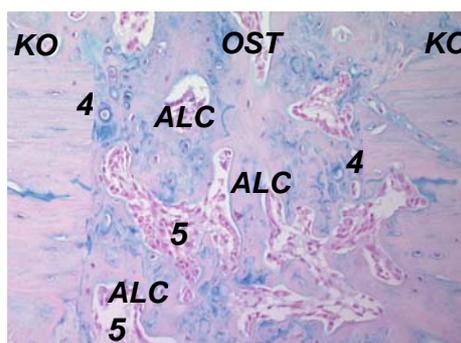


Abbildung 30b



200x, HAB, am 14. Tag postoperativ, Osteotomiespalt der fixateurfernen Kortikalis Kontroll- versus GH-Gruppe: In der Kontroll-Gruppe (Abbildung 30a) treten reife und hypertrophierende Chondrozyten (1) in einer Knorpelstraße im **OST** zwischen den Kortikalisenden (**KO**) auf. Teilweise befindet sich die Knorpelmatrix (2) in Auflösung und ist im Übergang zu knöchernen Strukturen (3). Bei der GH-Gruppe (Abbildung 30b) tritt ebenfalls Chondrogenese auf, allerdings befinden sich lediglich vereinzelt reifende und hypertrophierende Chondrozyten (4) im OST. Eine schlierenartige Anfärbung mit Alcianblau (**ALC**) innerhalb des neugebildeten Knochens weist auf eine residuelle Knorpelmatrix hin. Höhlenartige Räume zwischen den Knocheninseln enthalten retikuläre und blutbildende Zellen (5).

3.2.2.2 In Situ Hybridisierung (ISH)

Fixateurnahe Kortikalis

Die BMP-2-mRNA-Expression ist am 14. Tag nach der Operation auf der fixateurnahen Kortikalis in beiden Gruppen deutlich zurückgegangen (Abbildungen 31a und 31b). Im periostalen Bereich und im Osteotomiespalt umsäumen Osteoblasten mit einem moderat bis stark positiven Signal neugebildeten Knochen. Innerhalb des neugebildeten Knochens treten vereinzelt moderat bis stark positive Osteozyten auf. Residuelle schwach positive mesenchymähnliche Zellen befinden sich in höhlenartigen Zwischenräumen. Im Gruppenvergleich fällt ein stärker Rückgang der BMP-2 Expression in der GH-Gruppe auf. Positive Osteozyten innerhalb des Knochengewebes sowie Knochengewebe umsäumende positive Osteoblasten treten in der GH-Gruppe weniger auf.

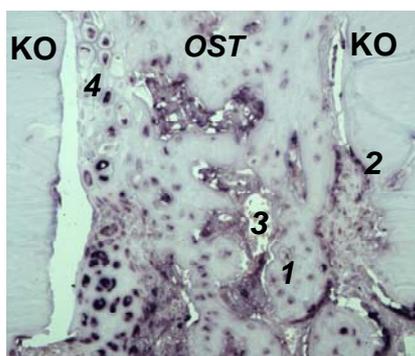


Abbildung 31a

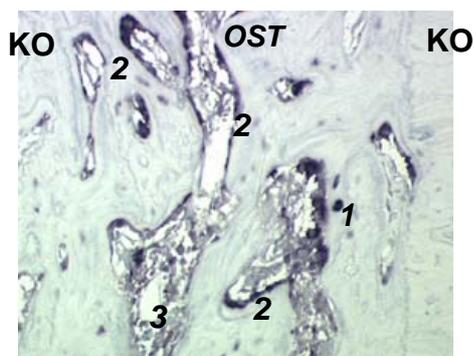


Abbildung 31b



400x, ISH, am 14. Tag postoperativ: Im **OST** der Fixateurexterne nahen Kortikalis wird die BMP-2-mRNA nur noch von einer geringen Anzahl stark positiver osteozytenähnlicher Zellen (1) innerhalb des neugebildeten Knochens zwischen den Kortikalisenden (KO) exprimiert. Moderat bis stark positive Osteoblasten (2) umsäumen die köchernen Strukturen. Schwach bis moderat positive residuelle mesenchymähnliche und blutbildende Zellen (3) befinden sich in höhlenartigen Zwischenräumen. Im Unterschied zur Kontroll-Gruppe (Abbildung 31a) ist ein deutlicher Rückgang der BMP-2-Expression in der GH-Gruppe (Abbildung 31b) erkennbar. Positive Zellen treten in der GH-Gruppe weniger auf. In der Kontroll-Gruppe tritt teilweise eine aktive Chondrogenese auf (4).

Fixateurferne Kortikalis

Wie bereits auf der fixateurnahen Kortikalis beschrieben, ist auch hier ein starker Rückgang des positiven BMP-2-Signals kennzeichnend. Im Unterschied zum Osteotomiespalt der fixateurnahen Kortikalis tritt besonders in der Kontroll-Gruppe ein stark positives BMP-2-Signal in chondrogenen Zellen auf. Im Vergleich zwischen Kontroll-

und GH-Gruppe bestehen folgende Unterschiede. In der Kontroll-Gruppe ist die Anzahl der stark positiven Chondrozyten grösser als in der GH-Gruppe. Zahlreiche Chondrozyten bilden teilweise eine Knorpelstraße. Innerhalb dieser Knorpelmatrix exprimieren reifende und hypertrophierende Chondrozyten ein stark positives BMP-2-Signal (Abbildung 32a).

In der GH-Gruppe ist der Osteotomiespalt weitestgehend mit Knochengewebe aufgefüllt. Eine Identifizierung von positiven Chondrozyten ist im Unterschied zur Kontroll-Gruppe schwieriger. Osteozyten treten nur noch vereinzelt mit einem stark positiven BMP-2-Signal innerhalb des neugebildeten Knochengewebes auf. Im Vergleich mit der Kontroll-Gruppe ist auch auf der fixateurfernen Kortikalis der GH-Gruppe ein umfassender Rückgang der BMP-2-Expression erkennbar (Abbildung 32b).

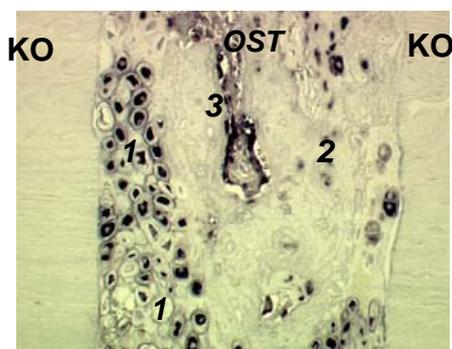


Abbildung 32a

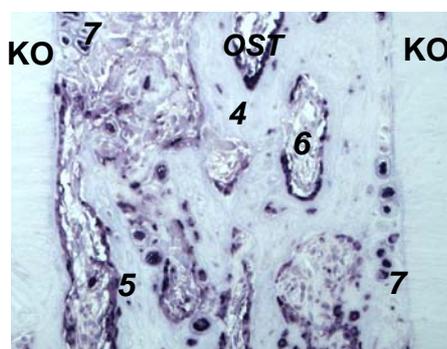


Abbildung 32b



400x, ISH, **OST** der fixateurfernen Kortikalis am 14. Tag postoperativ: Die BMP-2-mRNA wird in der Kontroll-Gruppe (Abbildung 32a) vermehrt von stark positiven reifenden und hypertrophierenden Chondrozyten (1) exprimiert. Innerhalb des neugebildeten Knochens ist die BMP-2-Expression nur noch vereinzelt in Osteozyten (2) und Osteoblasten (3) nachweisbar. In der GH-Gruppe (Abbildung 32b) befinden sich einzelne BMP-2-positive chondrozytenähnliche Zellen. Der Osteotomiespalt zwischen den Kortikalisenden (**KO**) ist hier weitestgehend mit knöchernen Strukturen aufgefüllt. In geringer Zahl sind stark BMP-2-positive Osteozyten (4) und Osteoblasten (5) nachweisbar. Höhlenartige Zwischenräume enthalten schwach bis moderat positive residuelle mesenchymähnliche und blutbildende Zellen (6). Insgesamt ist der Rückgang der BMP-2-mRNA-Expression auf der fixateurfernen Kortikalis der GH-Gruppe ausgeprägter als auf der fixateurfernen Kortikalis der Kontroll-Gruppe. Obwohl auch einzelne Knorpelzellen (7) bei den GH-Tieren auftritt.

3.2.2.3 Immunhistologie IHC

Die BMP-2-Protein-Expression stimmt auch am 14. Tag nach der Operation mit der BMP-2-mRNA-Expression in den positiven Zelltypen und im topographischen Verteilungsmuster überein.

Fixateurnahe Kortikalis

Im periostalen Bereich und im Osteotomiespalt der fixateurnahen Kortikalis ist in beiden Gruppen ein deutlicher Rückgang der BMP-2-Protein-Expression feststellbar. Das BMP-2-Protein wird von Osteoblasten und Osteozyten des Knochengewebes exprimiert. Mesenchymähnliche Zelle treten in höhlenartigen Zwischenräumen mit einem positiven Signal auf. Im Gruppenvergleich sind keine eindeutigen Unterschiede im Expressionsniveau erkennbar. Die Immunhistologie bestätigt allerdings das Bild einer weitestgehend intramembranösen Ossifikation auf der fixateurnahen Kortikalis des Osteotomispaltes. Zirkuläre Strukturen, vergleichbar mit Gefäßanschnitten, sind durch die Färbung deutlicher erkennbar als in der In Situ Hybridisierung.

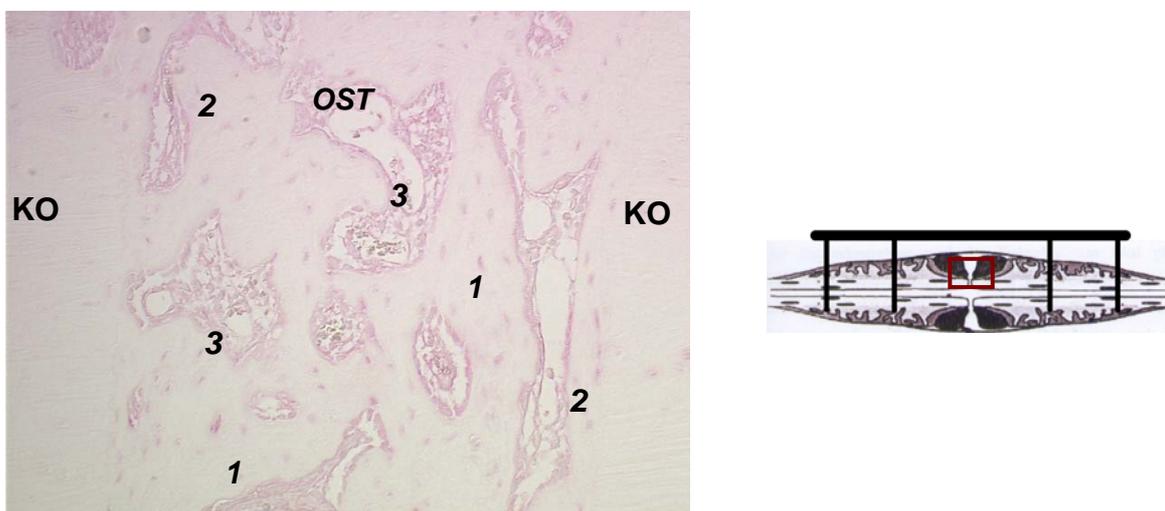


Abbildung 33: 400x, IHC, am 14. Tag postoperativ, **OST** der fixateurnahen Kortikalis am Beispiel der Kontroll-Gruppe. Das BMP-2-Protein wird von positiven Osteozyten (1) innerhalb des neugebildeten Knochens exprimiert. Positive Osteoblasten (2) umsäumen neugebildeten Knochen zwischen den Kortikalisenden (**KO**). In höhlenartigen Zwischenräumen bzw. zirkulären Strukturen befinden sich positive residuelle mesenchymähnliche und blutbildende Zellen (3). Das Expressionmuster des BMP-2-Proteins stimmt mit dem der mRNA überein. Unterschiede im Expressionniveau sind durch die Homogenität der Färbung zwischen Kontroll- und GH-Gruppe nicht erkennbar.

Fixateurferne Kortikalis

Der BMP-2-Proteinnachweis bestätigt eine vermehrte Chondrogenese im Osteotomiespalt im. Im Vergleich zur GH-Gruppe ist in der Kontroll-Gruppe die Anzahl der stark positiven Chondrozyten grösser. Innerhalb einer Knorpelmatrix exprimieren rei-

fende und hypertrophierende Chondrozyten ein positives BMP-2-Signal. (Abbildung 34a).

In der GH-Gruppe ist das Kallusgewebe und die Knorpelmatrix weitgehend durch primitiven Knochen ersetzt. Im Unterschied zur Kontroll-Gruppe wird BMP-2 nur von einzelnen positiven chondrozytenähnlichen Zellen deutlich exprimiert (Abbildung 34b).

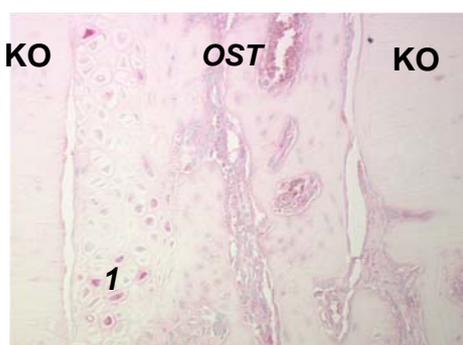


Abbildung 34a

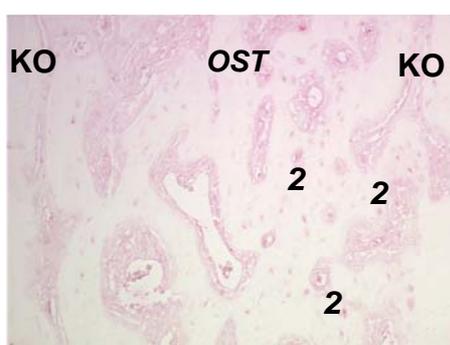


Abbildung 34b



400x, IHC, **OST** der fixateurfernen Kortikalis am 14. Tag postoperativ: Die BMP-2-Proteinexpression bestätigt die Chondrogenese in der Kontroll-Gruppe zwischen den Kortikalisenden (**KO**) (Abbildung 29a). Reifende und hypertrophierende Chondrozyten (**1**) innerhalb einer Knorpelmatrix zeigen ein positives Singnal. In der GH-Gruppe (Abbildung 34b) befinden sich nur einzelne BMP-2-positive chondrozytenähnliche Zellen (**2**) im Osteotomiespalt.

3.2.3 21 Tage nach der Operation

3.2.3.1 Histologische Färbung mit Alcianblau (HAB)

Fixateurnahe Kortikalis

Am 21. Tag nach der Operation ist der Osteotomiespalt weitestgehend knöchern überbrückt. Die periostalen Bereiche zeigen eine morphologische Diversität. Die Anzahl der Zellen innerhalb des neugebildeten Knochens ist allerdings stark reduziert. Die Ausrichtung der Knochenbalken weist jedoch noch keine Lamellenstruktur auf. Markhölenartige Zwischenräume und gefäßartige Strukturen treten im Bereich des knöchernen Umbaus auf. Diese Zwischenräume sind deutlich mit blutbildenden Zellen besiedelt. Im Gruppenvergleich sind keine wesentlichen Unterschiede in der histologischen Morphologie (Abbildung 35) erkennbar.

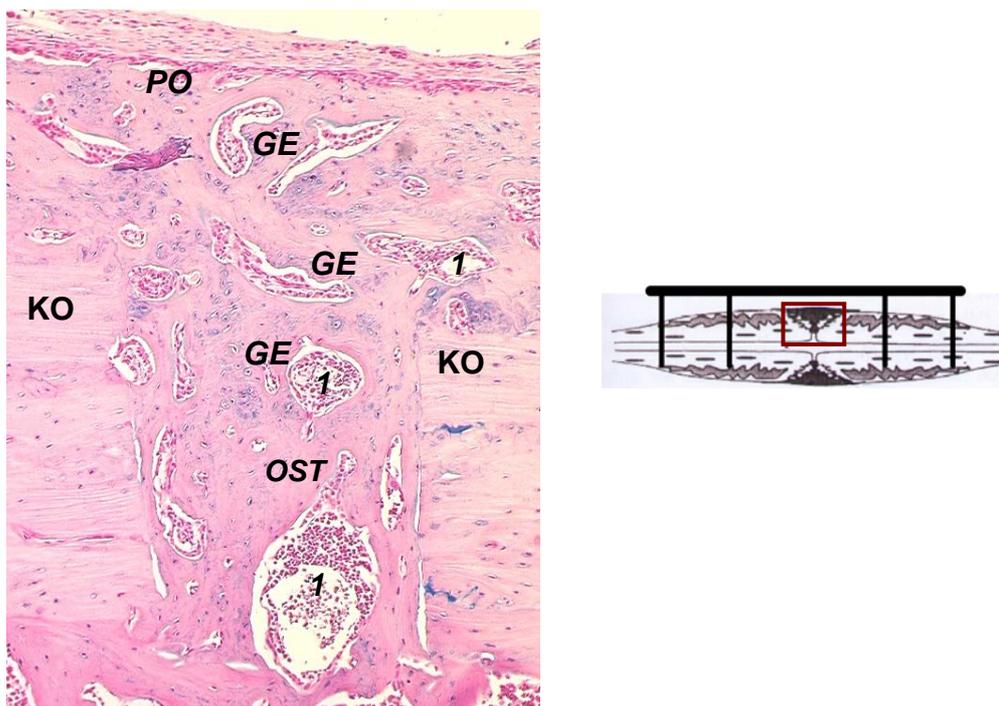


Abbildung 35: 100x, HAB, Knöcherner Umbau am 21. Tag postoperativ auf der fixateurnahen Kortikalis am Beispiel eines Tieres aus der GH-Gruppe: Der **OST** ist zwischen den Kortikalisenden (**KO**) vollständig knöchern überbrückt. Der Zellreichtum des neugebildeten Knochens ist stark zurückgegangen. Markhölenartige Zwischenräume und gefäßartige Strukturen (**GE**) dehnen sich innerhalb des knöchernen Umbaus und im periostalen Bereich (**PO**) aus. Diese sind mit blutbildenden Zellen (**1**) besiedelt.

Fixateurferne Kortikalis

Die fixateurferne Kortikalis unterscheidet sich am 21. Tag postoperative nicht wesentlich von der fixateurnahen Kortikalis. Einzelne Versuchstiere zeigen im periostalen Bereich und im Osteotomiespalt in der Alcianblaufärbung ein residuelles Knorpelgewebe im Übergang zu Knochengewebe. Der Osteotomiespalt der fixateurfernen Kortikalis ist jedoch bei den meisten Tieren der Kontroll- und GH-Gruppe vollständig knöchern überbrückt und entspricht der Morphologie der fixateurnahen Kortikalis.

3.2.3.2 In Situ Hybridisierung (ISH)

Fixateurnahe Kortikalis

Die BMP-2-mRNA-Expression ist am 21. Tag nach der Operation bei beiden Gruppen in osteogenen Zellpopulationen kaum noch nachweisbar. Im Periost wird BMP-2 schwach bis moderat von mesenchymähnlichen Zellen exprimiert. Einzelne Osteoblasten und Osteozyten sind mit einem moderat positivem Signal im Knochengewebe

des vorherigen Osteotomispaltes nachweisbar. Im periostalen Bereich zeigen sich teilweise stark positive zirkuläre Strukturen, die vergleichbar mit Gefäßanschnitten sind. Im Gruppenvergleich ist im Bereich des vorherigen Osteotomiespaltes die Anzahl der positiven Zellen in beiden Gruppen sehr gering. In der Kontroll-Gruppe ist die Anzahl einzelner Osteoblasten und Osteozyten im Osteotomiespalt geringfügig vermehrt.

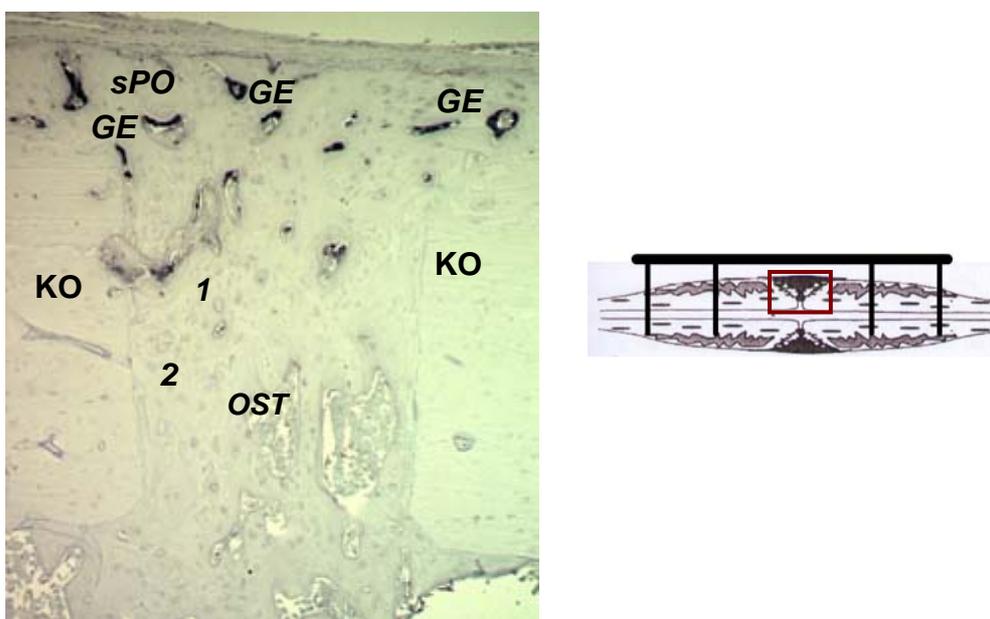


Abbildung 36: 400x, ISH, am 21. Tag postoperativ, fixateurnaher Kortikalis am Beispiel der GH-Gruppe. Die BMP-2-mRNA-Expression zwischen den Kortikalisenden (KO) ist zu diesem Zeitpunkt weitestgehend zurückgegangen. Ein schmales Periost exprimiert BMP-2 in moderat positiven mesenchymähnlichen Zellen. Stark positive zirkuläre Strukturen (GE) fallen im subperiostalen Bereich (sPO) auf. (BMP wird unter anderem vom Endothelzellen exprimiert; die Morphologie der zirkulären Strukturen deutet auf Gefäßanschnitte hin). Im Bereich des vorherigen OST treten einzelne Osteoblasten (1) und Osteozyten (2) mit einem moderat positiven Signal auf.

Fixateurferne Kortikalis

Der Rückgang der BMP-2-Expression ist an der fixateurfernen Kortikalis mit dem Rückgang an der fixateurnahen Kortikalis vergleichbar. Einzelne BMP-2-positive Osteoblasten und Osteozyten treten im vorherigen Osteotomiespalt auf. Einige Kontroll-Tiere weisen teilweise residuelle Knorpelzellen mit stark positivem Signal auf. Die periostalen Bereiche zeigen bei wenigen Tieren eine sehr ausgeprägte individuelle Diversität.

3.2.3.3 Immunhistologie (ICH)

Fixateurnahe Kortikalis

Am 21. Tag nach der Operation ist das BMP-2-Protein auf der fixateurnahen Kortikalis in beiden Gruppen weitestgehend nicht mehr nachweisbar. Eine verstärkte Hintergrundfärbung tritt in den markhölenartigen Zwischenräumen in Bereichen des knöchernen Umbaus auf (Abbildung 37).

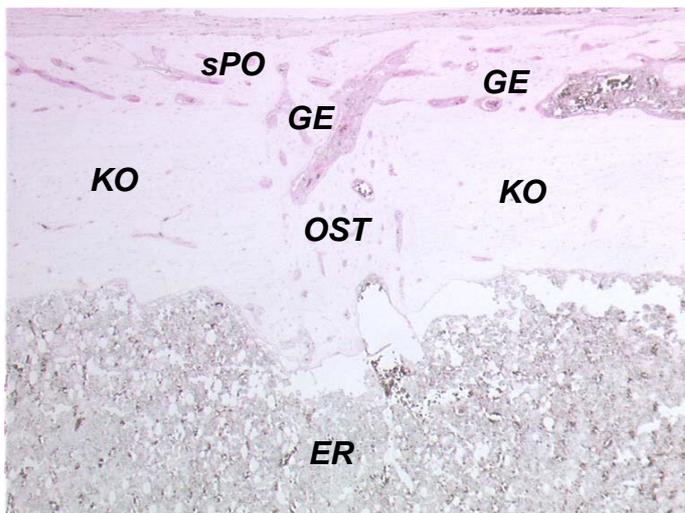


Abbildung 37: 100x, ICH, BMP-2-Protein-Expression am 21. Tag postoperativ auf fixateurnahen Kortikalis: Es tritt eine diffuse Hintergrundfärbung in markhölen- und gefäßartigen Zwischenräumen (**GE**) auf, die sich bis in den subperiostalen Bereich (**sPO**) ausdehnen. Eine Protein-Expression ist im **OST** zwischen den Kortikalisenden (**KO**) kaum noch nachweisbar. Sowohl die subperiostalen als auch die endostalen Bereiche (**ER**) weisen teilweise eine sehr starke Diversität auf.

Fixateurferne Kortikalis

Die BMP-2-Protein-Expression ist am 21. Tag postoperativ auch auf der fixateurfernen Kortikalis weitgehend zurückgegangen. Im periostalen Bereich befinden sich lediglich vereinzelt moderat bis stark positive osteoblastenähnliche Zellen. Im Osteotomiespalt treten in der Kontroll-Gruppe vereinzelt moderat bis stark positive chondrozytenähnliche Zellen auf. Eine Hintergrundfärbung tritt in markhölenartigen Zwischenräumen auf. Sowohl die subperiostalen als auch die endostalen Bereiche zeigen individuelle Diversität analog zur fixateurnahen Kortikalis.

3.3 Osteoklasten

Osteoklasten sind mittels BMP-2-ISH- oder BMP-2-IHC-Nachweis weder am 7. Tag, am 14. Tag noch am 21. Tag und in keiner der Gruppen sowohl auf der fixateurnahen als auch auf der fixateurfernen Kortikalis, in den periostalen Bereichen, im OST und in den endostalen Bereichen eindeutig identifizierbar.

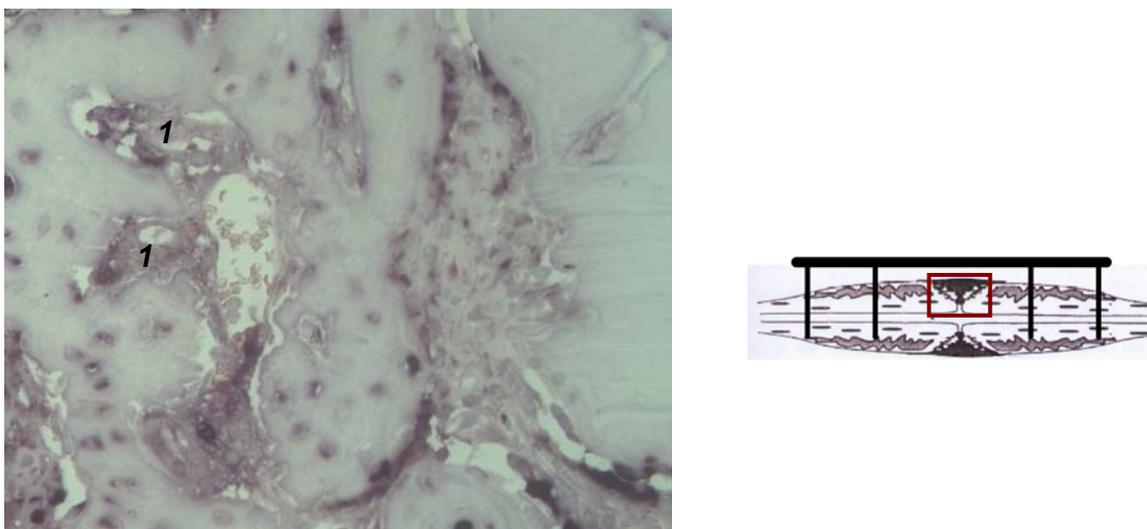


Abbildung 38: 400x, ISH, BMP-2-Protein-Expression am 14. Tag postoperativ auf fixateurnahen Kortikalis. Osteoklasten sind nicht eindeutig identifizierbar. Bei den osteoklastenähnlichen Zellen (1) könnte es sich auch um mehrere übereinander liegende bzw. dicht aneinandergereihte Osteoblasten handeln.

3.4 Auswertung

Die Färbungen aus der In Situ Hybridisierung wurden bildanalytisch untersucht. Das BMP-2-Signal wurde in definierten Regions of Interest (ROI) gemessen. Das positive BMP-2-Signal wurde von einem Computerprogramm erkannt und im Verhältnis zur gemessenen Fläche wiedergegeben. Es resultierte der relative Wert $\text{BMP-2-positive Fläche } [\mu\text{m}^2] / \text{Gesamtfläche } [\mu\text{m}^2]$.

Zur Auswertung wurden deskriptive und varianzanalytische Verfahren verwendet. Die Wirkung der Faktoren Medikation, Zeit und Fixateur externe wurden durch eine drei faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Die Wirkung der Faktoren Medikation und Fixateur externe wurden isoliert zu den einzelnen Zeitpunkten durch eine zwei faktorielle Varianzanalyse (ANOVA) untersucht. Für die Varianzanalysen wurden Post-Hoc-Tests nach Scheffé verwendet. Die Ergebnisse dieser Tests stellen die Mittelwerte zu den jeweiligen Varianzanalysen im Paarvergleich dar. Das Signifikanzniveau wurde bei $p=0,05$ festgelegt.

Die Wirkung folgender Faktoren auf die BMP-2-Gen-Expression wurden ausgewertet:

- **Faktor Zeit:** Messung nach 1 Woche versus nach 2 Wochen versus nach 3 Wochen
- **Faktor Medikation:** GH-Gruppe versus Kontroll-Gruppe
- **Faktor Fixateur externe:** Fixateur externe nahe Kortikalis versus Fixateur externe ferne Kortikalis des gleichen, operierten Femurs

Zeitlicher Verlauf

Die BMP-2-positive Fläche nimmt in Relation zur untersuchten Fläche kontinuierlich ab, je länger die Heilung fortgeschritten ist (Tabelle 3). A-posteriori-Einzelvergleiche nach Scheffé sind für alle Mittelwertsvergleiche signifikant. Die BMP-2-mRNA erreicht eine Woche nach der Operation die höchsten Messwerte, nimmt dann in der 2. und in der 3. Woche jeweils signifikant ab.

Tabelle 3: Mittelwerte und Standardabweichungen der BMP-2-positiven Fläche relativ zur Gesamtfläche am 7., 14. und 21. Tag nach der Operation

7. Tag postoperativ

BMP-2-positive Fläche	Kontroll-Gruppe	GH-Gruppe
Fixateurnahe Kortikalis	0,061(±) 0,013	0,065 (±) 0,009
Fixateurferne Kortikalis	0,047 (±) 0,027	0,049 (±) 0,017
Gesamt	0,05 (±) 0,02	0,06 (±) 0,02

14. Tag postoperativ

BMP-2-positive Fläche	Kontroll-Gruppe	GH-Gruppe
Fixateurnahe Kortikalis	0,012 (±) 0,005	0,005 (±) 0,002
Fixateurferne Kortikalis	0,018 (±) 0,009	0,005 (±) 0,002
Gesamt	0,02 (±) 0,01	0,01 (±) 0,01

21. Tag postoperativ

BMP-2-positive Fläche	Kontroll-Gruppe	GH-Gruppe
Fixateurnahe Kortikalis	0,002 (±) 0,001	0,002 (±) 0,001
Fixateurferne Kortikalis	0,003 (±) 0,001	0,002 (±) 0,001
Gesamt	0,003 (±) 0,01	0,002 (±) 0,01

Die Wirkung der GH-Gabe

Die gemessene BMP-2-Gen-Expression weist eine Woche nach der Operation keine wesentlichen Unterschiede zwischen der mit GH behandelten Gruppe und der Kontroll-Gruppe auf.

Zwei Wochen nach der Operation ist die BMP-2-mRNA-Expression in der GH-Gruppe signifikant geringer als in der Kontroll-Gruppe (Abbildung 39).

Auch drei Wochen nach der Operation ist die BMP-2 mRNA-Expression in der GH-Gruppe signifikant kleiner als in der Kontroll-Gruppe.

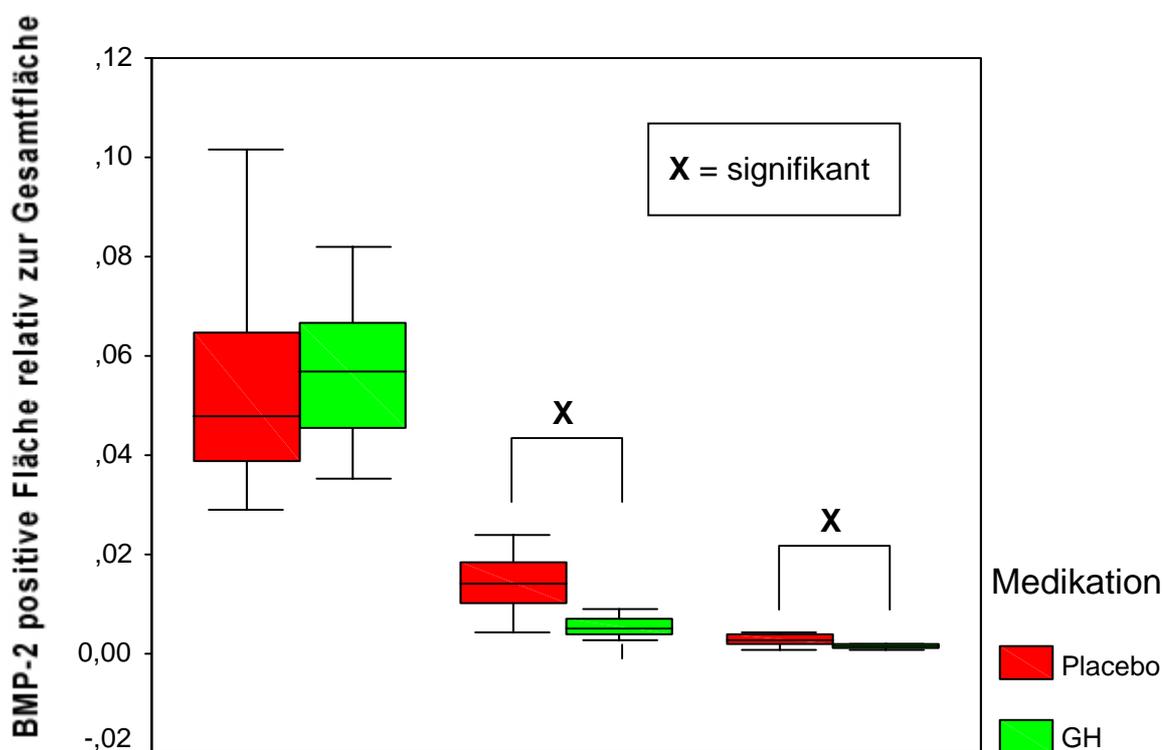


Abbildung 39: Median, Interquartilbereich, innere Eingrenzung der BMP-2-positiven Fläche relativ zur gemessenen Gesamtfläche unterteilt nach Kontroll- und GH-Gruppe. 1 Woche nach der Operation liegen die gemessenen Expressionwerte der BMP-2-mRNA dicht beieinander. In der 2. Woche zeigt die Wirkung der Medikation mit GH eine signifikante niedrigere BMP-2-Expression. Das Signifikanzniveau ist $p < .01$. Ebenso in der 3. Woche, GH-Gruppe zeigt eine signifikant niedrigere BMP-2-Expression. Dabei sind die ermittelten Expressionswerte zu diesem Zeitpunkt in beiden Gruppen sehr gering.

Fixateur externe

Der Vergleich zwischen der fixateurnahen Kortikalis und der fixateurfernen Kortikalis zeigt Folgendes. Am 7. Tag nach der Operation tritt eine tendenziell höhere BMP-2-mRNA-Expression auf der fixateurnahen Kortikalis auf. Diese wird in einer zweifaktoriellen Varianzanalyse zwar nicht signifikant, bestätigt sich aber als Tendenz mit einem Signifikanzniveau von $p=0.06$ (Abbildung 40).

Am 14. Tag nach der Operation ist die BMP-2-mRNA-Expression auf der fixateurnahen Kortikalis geringer als auf der fixateurfernen Kortikalis. Innerhalb einer Gruppe ergibt sich jedoch keine Signifikanz zwischen fixateurnahen und fixateurfernen Kortikalis.

Am 21. Tag nach der Operation ist wiederum ein geringer Anstieg auf der fixateurnahen Kortikalis messbar. Insgesamt ist jedoch die BMP-2-Expression auch drei Wochen nach der Operation auf sehr niedrigem Niveau.

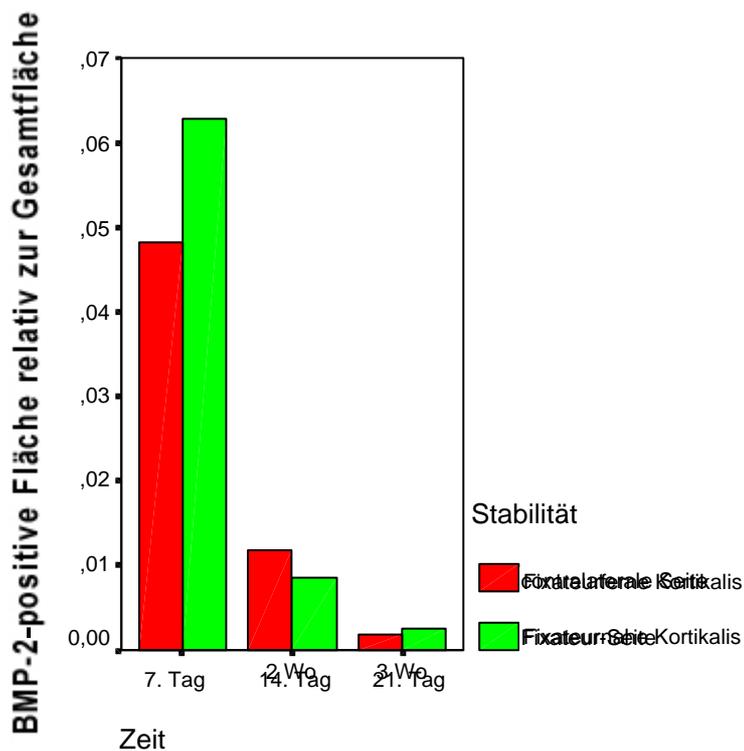


Abbildung 40: Mittelwerte der positiven Fläche relativ zur Gesamtfläche am 7., 14. und 21. Tag nach der Operation unterteilt in fixateurnahe Kortikalis und fixateurferne Kortikalis.

4 Diskussion

4.1 Arbeitshypothese

Das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit ist, mögliche Effekte einer systemischen GH-Medikation während der Knochenheilung auf die lokale Synthese der BMP-2-mRNA und die Synthese des BMP-2-Proteins zu beschreiben.

Hierzu wurde an einem Osteotomiemodell der Ratte mittels Fixateur externe die Voraussetzung für eine weitgehend intramembranöse Knochenheilung geschaffen. Es erfolgte eine Stimulation der Heilung durch eine systemische Applikation von GH bzw. einer Kontroll-Substanz. Die BMP-2-mRNA-Expression wurde mittels In Situ Hybridisierung zu drei Zeitpunkten der Knochenheilung dargestellt.

Es erfolgte eine bildanalytische Messung des positiven BMP-2-Signals und eine statistische Gegenüberstellung der GH-stimulierten und der Kontroll-Bedingung.

Im Einzelnen wurden folgende Fragen untersucht:

- Kann durch eine systemische GH-Applikation eine Steigerung der lokalen BMP-2-Synthese *in vivo* erreicht werden?
- Welche Unterschiede können zwischen einer GH-stimulierten und einer Kontroll-Bedingung beschrieben werden?
- Ist ein Zusammenhang zwischen einer systemischen GH-Zufuhr und einer lokalen BMP-2-Synthese *in vivo* nachweisbar?

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass sieben Tage nach der Operation in der GH-stimulierten Gruppe die gemessene Fläche an BMP-2-positiver mRNA geringfügig größer ist als in der Kontroll-Gruppe. Eine Tendenz oder eine signifikante Steigerung der lokalen BMP-2-Expression konnte *in vivo* durch eine systemische GH-Gabe jedoch zu keinem Zeitpunkt festgestellt werden.

Folgende Unterschiede sind im zeitlichen Expressionsmuster von BMP-2-mRNA zwischen GH-stimulierter und physiologischer Knochenheilung deutlich:

- Bei GH-Zufuhr wurde eine signifikant kleine BMP-2-Expression ab der zweiten Woche nach der Operation gemessen.
- Das signifikante Nachlassen der BMP-2-Expression in der GH-Gruppe war auch drei Wochen nach der Operation messbar.

Wie sind diese Ergebnisse zu erklären?

In Studien wurde bereits ein zeitliches Verteilungsmuster von BMP-2 mittels In Situ Hybridisierung und mittels Immunhistochemie während der Frakturheilung beschrieben (Cho 2002, Bostrom 1998, Yu 2001). Die Ergebnisse der In Situ Hybridisierung zeigten eine maximale Expression der BMP-2-mRNA am 1. Tag nach einer Fraktur (Cho 2002). Die immunhistochemischen Versuche zeigten einen Höhepunkt der Expression des BMP-2 Proteins zwischen dem 3. und 7. Tag nach einer Fraktur (Bostrom 1998, Yu 2001).

Daraus folgt für die vorliegende Arbeit die Überlegung, dass sieben Tage nach einer Osteotomie ein physiologisches, maximales Expressionsniveau bereits überschritten ist.

Eine weitere Überlegung ist, dass in einem biologischen System die Expression von BMP verschiedenen Einflüssen unterliegt. Es ist davon auszugehen, dass *in vitro* nicht vorhandene Regelmechanismen *in vivo* eine berücksichtigenswerte Rolle spielen. Dabei ist naheliegend, dass eine Steigerung der Genantwort *in vivo* konkret durch einen BMP-2-Antagonisten wie z.B. Noggin begrenzt und inhibiert wird.

Unter einer GH-Medikation wurde eine signifikant geringe BMP-2-Expression ab der zweiten Woche nach der Operation gemessen. Das signifikante Nachlassen der BMP-2-Expression in der GH-Gruppe zeigte sich auch in der dritten Woche nach der Operation.

Diese Unterschiede zwischen GH-stimulierter und physiologischer Knochenheilung können wie folgt interpretiert werden:

- Es besteht ein Zusammenhang zwischen GH-Gabe und signifikantem Nachlassen von BMP-2 in der späten Phase der Knochenheilung.

Studien zeigen zudem, dass die physiologische Expression von BMP nach einem Bruch oder Knochendefekt mit dem Fortschreiten der Heilung nachlässt (Bostrom 1995, Cho 2002, Nakase 1994). Das Nachlassen der BMP-Expression entspricht auch in der vorliegenden Arbeit einem Fortschreiten in der Heilung. Das signifikante Nachlassen der BMP-2-Expression unter GH-Gabe weist indirekt auf eine fortgeschrittenere Heilung hin, als ohne GH-Gabe. Dieser Unterschied kann mit einem beschleunigenden Effekt der GH-Applikation erklärt werden.

Ergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe bestätigen den beschleunigenden Effekt von GH am Osteotomiemodell der Ratte. Es wurde nachgewiesen, dass GH seine

Wirkung einerseits durch Erhöhung der Synthese extrazellulärer Matrixproteine, andererseits durch die Beschleunigung der Zelldifferenzierung von Vorläuferzellen zu matrixproduzierenden Zellen entfaltet. Dabei erfolgt durch die Gabe von GH eine Verkürzung der chondrogenen Phase. Es wurden weniger Chondrozyten als in der Kontroll-Gruppe nachgewiesen (*Margariti 2002*).

Ergebnisse aus vorangegangenen Studien zeigen bereits einen beschleunigenden Effekt einer systemischen GH-Zufuhr während der Distraktionsosteogenese am Minischwein, und zwar sowohl für die intramembranöse, als auch für die enchondrale Ossifikation. GH wird eine begünstigende Wirkung auf die Reifung des Knochenregenerats zugeschrieben. Dabei wird ebenso ein gewünschter positiver Effekt auf biomechanische Eigenschaften festgestellt (*Bail 2002, Kohlbeck 2003, Raschke 2000, 2001*). Weiterführende Analysen bestätigten den stimulierenden Effekt einer GH-Gabe an einem Frakturmodell der Ratte. Eine systemische und eine lokale Applikation zeigten dabei jeweils für sich einen stimulierenden Effekt (*Schmidmaier 2002*).

4.2 Methoden

Eine BMP-2-mRNA-Lokalisation war zur Darstellung von osteogenen Zelltypen während der Knochenheilung geeignet. Dabei waren mesenchymähnliche Vorläuferzellen sowie Zellpopulationen einer enchondralen und einer chondralen Ossifikation darstellbar.

Die angewandte Methode der In Situ Hybridisierung ist geeignet für eine bildanalytische Auswertung.

Mittels Immunhistochemie konnte das BMP-2-Protein während der Knochenheilung weitgehend intrazellulär dargestellt werden. Der immunhistologische Proteinnachweis stimmt in seinem zeitlichen und topographischen Expressionmuster weitgehend mit dem positiven Signal der BMP-2-mRNA-Lokalisation mittels In Situ Hybridisierung überein.

Das insgesamt schwache immunhistologische Signal war jedoch wegen der Hintergrundfärbung für eine bildanalytische Auswertung nicht geeignet.

Eine Unterteilung des operierten Femurs in eine fixateurnahe und fixateurferne Kortikalis erfolgte aufgrund von Unterschieden im Verlauf der Heilung der jeweiligen Kortikalis.

Auf der fixateurnahen Kortikalis trat eine weitgehend intramembranöse Ossifikation auf. Der BMP-2-mRNA-Nachweis zeigte am 7. Tag nach der Operation eine Tendenz hoher Expression. Neben zahlreichen schwach bis moderat positiven mesenchymähnlichen Fibrozyten traten gleichzeitig stark positive osteozyten- und osteoblastenähnliche Zellen auf. Eine Differenzierung zu osteogenen Zellpopulationen war im Osteotomiespalt bereits deutlich erkennbar.

Auf der fixateurfernen Kortikalis hingegen traten am 7. Tag nach der Operation vermehrt moderat positive mesenchymähnliche Zellen und deutlich weniger osteozytenähnliche und osteoblastenähnliche Zellen mit einem stark positiven Signal auf.

Am 14. Tag nach der Operation ist auf der fixateurnahen Kortikalis der Osteotomiespalt weitgehend mit primitivem Knochen aufgefüllt. Auf der fixateurfernen Kortikalis zeigte sich eine Chondrogenese mit stark positiven Chondrozyten innerhalb einer Knorpelmatrix.

Wie können diese Unterschiede erklärt werden?

Eine bereits erwähnte Studie beschreibt, dass Mikrobewegungen an den Kortikalisenden eines Knochendefektes eine chondrale Ossifikation induzierten (Culliane 2002).

Kann das Auftreten einer Chondrogenese auch bei dem vorliegenden Osteotomiemodell durch biomechanische Effekte erklärt werden?

Auf der fixateurnahen Kortikalis trat eine weitgehend intramembranöse Ossifikation auf, da der Fixateur externe winkelstabile Bedienungen gewährleistet.

Aufgrund einer größeren Distanz zwischen Kortikalis und Fixateur externe können Scherkräfte an der fixateurfernen Kortikalis als Auslöser von Mikrobewegungen wirken und damit die Ursache für das Auftreten einer Chondrogenese sein.

4.3 BMP-2 während der Entwicklung

In der vorliegenden Arbeit erfolgt zum besseren Verständnis der Herkunft und Funktionweise von BMP die Darstellung der BMP-2-Expression in der postnatalen Skelettentwicklung. Diese wird mit der BMP-2-Expression in der Knochenheilung verglichen.

Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen am 11. Tag postnatal zahlreiche schwach bis moderat BMP-2-positive mesenchymähnlichen Fibrozyten im Bereich des Periost. Eine vergleichbare Expression kann in mesenchymähnlichen Fibrozyten in periostalen Bereichen des Osteotomiespaltes während der Knochenheilung beschrieben werden. Periostales Bindegewebe kann somit als eine glaubhafte Quelle für Zellen einer BMP-induzierten Osteogenese angesehen werden.

Im Bereich der sich entwickelnden Kortikalis kann BMP-2 in stark positiven osteozyten- und osteoblastenähnlichen Zellen gezeigt werden. Die Morphologie dieser plasmareichen und offensichtlich syntheseaktiven Zellen entspricht der Morphologie der stark BMP-2-positiven osteozyten- und osteoblastenähnlichen Zellen im 7 Tage alten Osteotomiespalt einer sich in Heilung befindenden fixateurnahen Kortikalis.

In der aktiven Epiphyse traten stark BMP-2-positive, reifende und hypertrophierende Chondrozyten auf. Während der Knochenheilung traten stark positive, reifende und hypertrophierenden Chondrozyten insbesondere auf der fixateurfernen Kortikalis ab dem 14. Tag nach der Operation auf.

Diese Ergebnisse legen den Schlussfolgerung nahe, dass die BMP-2-Expression während der postnatalen Knochenentwicklung Gemeinsamkeiten mit der Expression während der Knochenheilung aufweist. Die positiven Zelltypen stimmen hinsichtlich ihrer Morphologie und Differenzierungsgrades weitgehend überein. Eine vergleichbare osteogene Funktion liegt nahe.

Eine vorangegangene Studie sieht darüberhinaus Aspekte der Frakturheilung als die Rekapitulation von Prozessen aus der embryonalen Knochenentwicklung an. BMP wird dabei eine lokale Funktion als Morphogen zugeschrieben (*Gerstenfeld 2003*).

Es stellt sich die Frage nach einem gemeinsamen Regelmechanismus dieser Morphogene während der Entwicklung und Heilung.

Eine Freisetzung von BMP aus einer fakturierten Knochenmatrix ist während der Entwicklung unwahrscheinlich. Die Funktion von inflammatorischen Zytokinen während der Entwicklung ist weitgehend unerforscht.

Eine GH-, IGF-I/BMP-Achse könnte hingegen in beiden Prozessen an einer übergeordneten Funktionen beteiligt sein. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen zwar keinen direkten Zusammenhang zwischen einer exogenen GH-Zufuhr und einer Steigerung der lokalen BMP-Synthese zu den jeweiligen ausgesuchten Zeitpunkten. Dieses schließt jedoch eine GH-, IGF-I/BMP-Achse *in vivo* nicht aus.

Im Unterschied zur Knochenheilung können während der Entwicklung im Übergang von Kortikalis zum endostalen Markraum BMP-2-exprimierende Zell-Cluster beschrieben werden. Es handelt sich um Zellhaufen aus dem Knochenmark entstammender Zellen. Aufgrund der Morphologie liegt die Vermutung nahe, dass es sich dabei um Osteoklasten-Cluster handelt. Die einzelnen, weit auseinander liegenden Zellkerne sind jedoch für Osteoklasten untypisch.

Während der Entwicklung traten im endostalen Markraum große makrophagenähnliche Knochenmarkszellen mit einem positivem BMP-2-Signal auf. Morphologisch handelt es sich um Monozyten. Im Zusammenhang mit BMP wurde dieser Zelltyp bislang nicht beschrieben. Ein falsch positives Signal ist ausgeschlossen, da dieser Zelltyp sowohl mittels In Situ Hybridisierung als auch in der Immunhistochemie reproduktiv darstellbar ist. Monozyten sind zur Migration und Phagozytose fähig. Sie besitzen verschiedene Rezeptoren auf ihrer Membranoberfläche. Sie synthetisieren und sezernieren eine Vielzahl von Substanzen, darunter den „fibroblastenstimulierenden Faktor“, das „mitogene Protein“ und den „Tumor Nekrose Faktor“. Sie können zu gewebeständigen Makrophagen wie Osteoklasten differenzieren. Während der inflammativen Phase der Frakturheilung sind Makrophagen aktiv an der Phagozytose von Gewebe und Zelltrümmern beteiligt.

Aufgrund der Versuchsanordnung kann eine Aussage über das BMP-2-Expressionsmuster von Osteoklasten nicht getroffen werden. Durch eine Färbung mit Osteoklastenmarker wird allerdings eine Aussage zur Typisierung der oben genannten monozytären Zellen möglich. Eine eindeutige Identifikation von Osteoklasten ist durch den alleinigen BMP-2-Nachweis nicht zu realisieren. BMP-2 wird von zahlreichen verschiedenen Zelltypen exprimiert. Osteoklasten sind von diesen Zelltypen aufgrund ihrer geringen Anzahl schwer zu unterscheiden. Somit wird ein zusätzlicher Osteoklastenmarker bei einer BMP-Färbung insbesondere während der Fraktur- bzw. Knochenheilung erforderlich.

4.4 Zusammenfassung und Ausblick

Experimente an Zellkulturen zeigen, dass sowohl die Zufuhr von GH als auch von IGF-I die Expression von BMP-2- und BMP-4-mRNA quantitativ um ein vielfaches steigert. Als Resultat der vermehrten mRNA konnte mittels Western Blotting ebenso eine Zunahme der Protein-Expression beobachtet werden. Aufgrund dieser Ergebnisse ist ein Zusammenhang zwischen BMP und dem osteogenen Einfluss von GH und IGF-I vorstellbar. GH kann somit seine Wirkung *in vitro* zusätzlich durch die Aktivierung des lokalen Morphogens BMP entfalten (*Li 1998*).

In der vorliegenden Arbeit wurde an einem Osteotomiemodell der Ratte mittels Fixateur externe Voraussetzungen für eine weitgehend intramembranöse Ossifikation geschaffen. Es erfolgte eine Stimulation der Knochenheilung durch eine systemische Applikation von GH- bzw. einer Kontroll-Substanz. Die BMP-2-mRNA-Expression wurde mittels In Situ Hybridisierung zu drei Zeitpunkten der Knochenheilung dargestellt. Es erfolgte eine bildanalytische Messung des positiven BMP-2-Signals und eine statistische Auswertung.

Folgende Unterschiede zwischen der GH- und der Kontroll-Gruppe können festgestellt werden:

- a. 7 Tage nach der Operation ist die gemessene Fläche BMP-2-positiver mRNA geringfügig größer als in der Kontrollgruppe. Eine signifikante Steigerung der BMP-Expression war unter GH-Gabe jedoch zu keinem Zeitpunkt nachweisbar. Somit ist die Regulierung des Effektes der systemischen GH-Applikation offensichtlich nicht BMP-vermittelt.
- b. Eine Veränderung der BMP-Expression unter GH-Zufuhr konnte ab der zweiten Woche nach der Operation festgestellt werden. Es besteht ein Zusammenhang zwischen signifikantem Nachlassen der BMP-Expression und der GH-Gabe. Die beschleunigte Remission der BMP-Expression in der GH-Gruppe entspricht einem Fortschreiten der Heilung und ist somit ein indirekter Nachweis des stimulierenden Einflusses von GH auf die Knochenheilung.

Untersuchungen zum zeitlichen Verteilungsmuster der BMP-2-mRNA mittels In Situ Hybridisierung in einem Frakturmodell zeigten eine maximale Expression am 1. Tag nach einer Fraktur (*Cho 2002*). Vorangegangene Immunhistochemische Versuche

zeigen einen Höhepunkt der Expression des BMP-2-Proteins zwischen dem 3. und 7. Tag nach einer Fraktur (*Bostrom 1998, Yu 2001*).

Weil am 7. Tag nach der Osteotomie bei vorliegendem Versuchsaufbau keine Steigerung der BMP-2-Expression durch GH festgestellt werden konnte, ist davon auszugehen, dass zu diesem Zeitpunkt ein mögliches, maximales Expressionsniveau bereits überschritten war. Eine weitere Erklärung für das Fehlen eines GH-Effektes bezüglich der Steigerung der BMP-2-Synthese ist, dass in einem biologischen System die Expression von BMP Regelmechanismen unterliegt. Es ist davon auszugehen, dass *in vivo* z.B. Antagonisten die Gen-Antwort begrenzen.

GH, IGF-I und BMP sind drei Botenstoffe der Osteogenese, deren therapeutische Nutzbarkeit im Mittelpunkt moderner Behandlungsmethoden steht. Experimente an Zellkulturen dienen als grundlegende Hinweise für die Wirkungsweise und Zusammenhänge zwischen osteogenen Faktoren. Effekte aus *in vitro*-Modellen sind jedoch nicht einfach auf biologische Systeme übertragbar. Das Verständnis für die Funktionsweise von Wachstumsfaktoren *in vivo* erfordert weitere Kenntnisse über Interaktionen von stimulierenden und inhibierenden Faktoren sowie über Regelmechanismen der Osteogenese innerhalb eines biologischen Systems.

Literaturverzeichnis

- Ashton, I. K. and S. Dekel (1983). "Fracture repair in the Snell dwarf mouse." *Br J Exp Pathol* 64(5): 479-86.
- Bail, H., M. J. Raschke, et al. (1998). "[Recombinant growth hormone increases callus maturation time in distraction osteogenesis--a histomorphometric study]." *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 115(Suppl I): 675-80.
- Bail, H. J., S. Kolbeck, et al. (2002). "Systemic application of growth hormone for enhancement of secondary and intramembranous fracture healing." *Horm Res* 58 Suppl 3: 39-42.
- Bail, H. J., M. J. Raschke, et al. (2002). "Recombinant species-specific growth hormone increases hard callus formation in distraction osteogenesis." *Bone* 30(1): 117-24.
- Bak, B. (1993). "Fracture healing and growth hormone. A biochemical study in the rat." *Dan Med Bull* 40(5): 519-36.
- Bak, B. and T. T. Andreassen (1991). "The effect of growth hormone on fracture healing in old rats." *Bone* 12(3): 151-4.
- Bak, B., P. H. Jorgensen, et al. (1990). "Increased mechanical strength of healing rat tibial fractures treated with biosynthetic human growth hormone." *Bone* 11(4): 233-9.
- Barnes, G. L., P. J. Kostenuik, et al. (1999). "Growth factor regulation of fracture repair." *J Bone Miner Res* 14(11): 1805-15.
- Bartmeyer, B. (2004). "The osteogenic potential of inflammatory fracture hematoma." *J Ortho Trauma* 9(18): Suppl.
- Bianco, P. and M. Riminucci (2001). "[Stem cells in medicine]." *Recenti Prog Med* 92(4): 251-6.
- Bolander, M. E. (1992). "Regulation of fracture repair by growth factors." *Proc Soc Exp Biol Med* 200(2): 165-70.
- Bostrom, M. P., J. M. Lane, et al. (1995). "Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing." *J Orthop Res* 13(3): 357-67.
- Brunet, L. J., J. A. McMahon, et al. (1998). "Noggin, cartilage morphogenesis, and joint formation in the mammalian skeleton." *Science* 280(5368): 1455-7.
- Canalis, E. (1994). "Skeletal growth factors and aging." *J Clin Endocrinol Metab* 78(5): 1009-10.
- Carlsson, B., S. Eden, et al. (1991). "Expression and physiological significance of growth hormone receptors and growth hormone binding proteins in rat and man." *Acta Paediatr Scand Suppl* 379: 70-6; discussion 77-8.
- Carpenter, J. E., J. A. Hipp, et al. (1992). "Failure of growth hormone to alter the biomechanics of fracture-healing in a rabbit model." *J Bone Joint Surg Am* 74(3): 359-67.
- Chen, D., M. A. Harris, et al. (1997). "Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the in-

- duction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts." *Calcif Tissue Int* 60(3): 283-90.
- Cheng, H., W. Jiang, et al. (2003). "Osteogenic activity of the fourteen types of human bone morphogenetic proteins (BMPs)." *J Bone Joint Surg Am* 85-A(8): 1544-52.
- Cho, T. J., L. C. Gerstenfeld, et al. (2002). "Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing." *J Bone Miner Res* 17(3): 513-20.
- Cordebar, R. and P. Guilleman (1956). "[Effects of somatotropin on osseous consolidation]." *Presse Med* 64(16): 363-5.
- Cullinane, D. M., A. Fredrick, et al. (2002). "Induction of a neoarthrosis by precisely controlled motion in an experimental mid-femoral defect." *J Orthop Res* 20(3): 579-86.
- Daughaday, W. H. (1977). "Hormonal regulation of growth by somatomedin and other tissue growth factors." *Clin Endocrinol Metab* 6(1): 117-35.
- Daughaday, W. H., K. Hall, et al. (1972). "Somatomedin: proposed designation for sulphation factor." *Nature* 235(5333): 107.
- Daughaday, W. H., A. C. Herington, et al. (1975). "The regulation of growth by endocrines." *Annu Rev Physiol* 37: 211-44.
- Daughaday, W. H., L. S. Phillips, et al. (1976). "The effects of insulin and growth hormone on the release of somatomedin by the isolated rat liver." *Endocrinology* 98(5): 1214-9.
- D'Ercole, A. J., A. D. Stiles, et al. (1984). "Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(3): 935-9.
- Dudley, A. T., K. M. Lyons, et al. (1995). "A requirement for bone morphogenetic protein-7 during development of the mammalian kidney and eye." *Genes Dev* 9(22): 2795-807.
- Ernst, M. and E. R. Froesch (1988). "Growth hormone dependent stimulation of osteoblast-like cells in serum-free cultures via local synthesis of insulin-like growth factor I." *Biochem Biophys Res Commun* 151(1): 142-7.
- Feld, S. and R. Hirschberg (1996). "Growth hormone, the insulin-like growth factor system, and the kidney." *Endocr Rev* 17(5): 423-80.
- Ferguson, C., E. Alpern, et al. (1999). "Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation?" *Mech Dev* 87(1-2): 57-66.
- Florini, J. R., D. Z. Ewton, et al. (1996). "Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis." *Endocr Rev* 17(5): 481-517.
- Fox R (1992). "New bone?" *The Lancet* 339: 463-464.
- Francis-West, P. H., T. Tatla, et al. (1994). "Expression patterns of the bone morphogenetic protein genes Bmp-4 and Bmp-2 in the developing chick face suggest a role in outgrowth of the primordia." *Dev Dyn* 201(2): 168-78.
- Franzen, P., P. ten Dijke, et al. (1993). "Cloning of a TGF beta type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor." *Cell* 75(4): 681-92.

- Fukui, N., Y. Zhu, et al. (2003). "Stimulation of BMP-2 expression by pro-inflammatory cytokines IL-1 and TNF-alpha in normal and osteoarthritic chondrocytes." *J Bone Joint Surg Am* 85-A Suppl 3: 59-66.
- Gamer, L. W. and V. Rosen (2000). "Molekular genetics of skeletal morphogenesis." *Osteoporosis: Genetics Prevention and Treatment*.
- Gazzerro, E., V. Gangji, et al. (1998). "Bone morphogenetic proteins induce the expression of noggin, which limits their activity in cultured rat osteoblasts." *J Clin Invest* 102(12): 2106-14.
- Gerstenfeld, L. C., D. M. Cullinane, et al. (2003). "Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation." *J Cell Biochem* 88(5): 873-84.
- Gong, Y., D. Krakow, et al. (1999). "Heterozygous mutations in the gene encoding noggin affect human joint morphogenesis." *Nat Genet* 21(3): 302-4.
- Green, H., M. Morikawa, et al. (1985). "A dual effector theory of growth-hormone action." *Differentiation* 29(3): 195-8.
- Green, M. C. (1968). "Mechanism of the pleiotropic effects of the short-ear mutant gene in the mouse." *J Exp Zool* 167(2): 129-50.
- Hall, B. K. and T. Miyake (2000). "All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development." *Bioessays* 22(2): 138-47.
- Harris, J. M., 3rd, D. A. Bean, et al. (1975). "Effect of phosphate supplementation, thyrocalcitonin, and growth hormone on strength of fracture healing." *Surg Forum* 26: 519-21.
- Harris, W. H. and R. P. Heaney (1969). "Effect of growth hormone on skeletal mass in adult dogs." *Nature* 223(204): 403-4.
- Heldin, C. H., K. Miyazono, et al. (1997). "TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins." *Nature* 390(6659): 465-71.
- Hock, J. M., M. Centrella, et al. (1988). "Insulin-like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication." *Endocrinology* 122(1): 254-60.
- Hoffmann, A. and G. Gross (2001). "BMP signaling pathways in cartilage and bone formation." *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 11(1-3): 23-45.
- Hogan, B. L. (1996). "Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development." *Genes Dev* 10(13): 1580-94.
- Hsu, S., L. Raine, et al. (1981). "Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in Immunoperoxidase Techniques; a Comparison of ABC and Unlabeled Antibody (PAP) Procedures." *J Histochem Cytochem* 29: 577-580.
- Isaksson, O. G., J. O. Jansson, et al. (1982). "Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly." *Science* 216(4551): 1237-9.
- Isaksson, O. G., A. Lindahl, et al. (1987). "Mechanism of the stimulatory effect of growth hormone on longitudinal bone growth." *Endocr Rev* 8(4): 426-38.

- Iwaki, A., S. Jingushi, et al. (1997). "Localization and quantification of proliferating cells during rat fracture repair: detection of proliferating cell nuclear antigen by immunohistochemistry." *J Bone Miner Res* 12(1): 96-102.
- Jaiswal, N., S. E. Haynesworth, et al. (1997). "Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro." *J Cell Biochem* 64(2): 295-312.
- Jingushi, S., K. Urabe, et al. (2002). "Intramuscular bone induction by human recombinant bone morphogenetic protein-2 with beta-tricalcium phosphate as a carrier: in vivo bone banking for muscle-pedicle autograft." *J Orthop Sci* 7(4): 490-4.
- Joyce ME, Jingushi S, Scully SP, Bolander ME. (1991). "Role of growth factors in fracture healing." *Prog Clin Biol Res.*; 365:391-416.
- Katagiri, T., A. Yamaguchi, et al. (1990). "The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2." *Biochem Biophys Res Commun* 172(1): 295-9.
- Katagiri, T., A. Yamaguchi, et al. (1994). "Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage." *J Cell Biol* 127(6 Pt 1): 1755-66.
- Kember, N. F. (1978). "Cell kinetics and the control of growth in long bones." *Cell Tissue Kinet* 11(5): 477-85.
- Kim, H. J., D. P. Rice, et al. (1998). "FGF-, BMP- and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development." *Development* 125(7): 1241-51.
- Kingsley, D. M. (1994). "The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms." *Genes Dev* 8(2): 133-46.
- Kolbeck, S., H. Bail, et al. (2003). "Homologous growth hormone accelerates bone healing--a biomechanical and histological study." *Bone* 33(4): 628-37.
- Koskinen, E. V. (1959). "The repair of experimental fractures under the action of growth hormone, thyrotropin and cortisone. A tissue analytic, roentgenologic and autoradiographic study." *Ann Chir Gynaecol Fenn* 48(Suppl 90): 1-48.
- Küsswetter W and Teschner M (1999). "Gentechnis induziertes Knochenwachstum." *Deutsches Ärzteblatt* 28-29(31): A-1891-1896.
- Le, A. X., T. Miclau, et al. (2001). "Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures." *J Orthop Res* 19(1): 78-84.
- Leung, D. W., S. A. Spencer, et al. (1987). "Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression." *Nature* 330(6148): 537-43.
- Li, H., P. M. Bartold, et al. (1998). "Growth hormone and insulin-like growth factor I induce bone morphogenetic proteins 2 and 4: a mediator role in bone and tooth formation?" *Endocrinology* 139(9): 3855-62.
- Lind, M., E. F. Eriksen, et al. (1996). "Bone morphogenetic protein-2 but not bone morphogenetic protein-4 and -6 stimulates chemotactic migration of human osteoblasts, human marrow osteoblasts, and U2-OS cells." *Bone* 18(1): 53-7.

- Lindahl, A., J. Isgaard, et al. (1987). "Differential effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on colony formation of epiphyseal chondrocytes in suspension culture in rats of different ages." *Endocrinology* 121(3): 1061-9.
- Lindahl, A., J. Isgaard, et al. (1987). "Growth hormone in vivo potentiates the stimulatory effect of insulin-like growth factor-1 in vitro on colony formation of epiphyseal chondrocytes isolated from hypophysectomized rats." *Endocrinology* 121(3): 1070-5.
- Lindahl, A., A. Nilsson, et al. (1987). "Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on colony formation of rabbit epiphyseal chondrocytes at different stages of maturation." *J Endocrinol* 115(2): 263-71.
- Loveridge, N., C. Farquharson, et al. (1993). "The control of chondrocyte differentiation during endochondral bone growth in vivo: changes in TGF-beta and the proto-oncogene c-myc." *J Cell Sci* 105 (Pt 4): 949-56.
- Lyons, K. M., R. W. Pelton, et al. (1990). "Organogenesis and pattern formation in the mouse: RNA distribution patterns suggest a role for bone morphogenetic protein-2A (BMP-2A)." *Development* 109(4): 833-44.
- Margariti, R., Hüning, M., et al. (2002). "GH stimuliertes osteochondrale Progenitorzellen in der frühen Knochenheilung." Dissertation am Klinikum für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie, Charité, Campus Virchow-Klinikum und Department for Pathologie, University Osaka, Japan.
- Martinez, D. A., M. W. Orth, et al. (1996). "Cortical bone growth and maturational changes in dwarf rats induced by recombinant human growth hormone." *Am J Physiol* 270(1 Pt 1): E51-9.
- Massague, J., L. Attisano, et al. (1994). "The TGF-beta family and its composite receptors." *Trends Cell Biol* 4(5): 172-8.
- Mosekilde, L. and B. Bak (1993). "The effects of growth hormone on fracture healing in rats: a histological description." *Bone* 14(1): 19-27.
- Muhlbach, R. and D. Hirthe (1967). "[The metabolic effect of human growth hormones and their practical use in orthopedics]." *Beitr Orthop Traumatol* 14(1): 44-55.
- Nakahara, H., S. P. Bruder, et al. (1990). "In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum." *Clin Orthop*(259): 223-32.
- Nakase, T., S. Nomura, et al. (1994). "Transient and localized expression of bone morphogenetic protein 4 messenger RNA during fracture healing." *J Bone Miner Res* 9(5): 651-9.
- Nakashima, M. and A. H. Reddi (2003). "The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering." *Nat Biotechnol* 21(9): 1025-32.
- Nielsen, H. M., B. Bak, et al. (1991). "Growth hormone promotes healing of tibial fractures in the rat." *Acta Orthop Scand* 62(3): 244-7.
- Nilsson, A., J. Isgaard, et al. (1987). "Effects of unilateral arterial infusion of GH and IGF-I on tibial longitudinal bone growth in hypophysectomized rats." *Calcif Tissue Int* 40(2): 91-6.
- Peng, Y., Q. Kang, et al. (2003). "Transcriptional characterization of bone morphogenetic proteins (BMPs)-mediated osteogenic signaling." *J Cell Biochem* 90(6): 1149-65.

- Raschke, M., S. Kolbeck, et al. (2001). "Homologous growth hormone accelerates healing of segmental bone defects." *Bone* 29(4): 368-73.
- Raschke, M. J., S. F. Kolbeck, et al. (2000). "[Recombinant growth hormone accelerates regenerate consolidation in distraction osteosynthesis]." *Chirurg* 71(9): 1009-15.
- Raschke, M. J., Bail, H., et al. (1999). "Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis." *Bone* 24(2): 81-8.
- Rawadi, G., B. Vayssiere, et al. (2003). "BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop." *J Bone Miner Res* 18(10): 1842-53.
- Reddi, A. H. (1997). "Bone morphogenetic proteins: an unconventional approach to isolation of first mammalian morphogens." *Cytokine Growth Factor Rev* 8(1): 11-20.
- Reddi, A. H. (1998). "Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration." *Nat Biotechnol* 16(3): 247-52.
- Riley, E. H., J. M. Lane, et al. (1996). "Bone morphogenetic protein-2: biology and applications." *Clin Orthop*(324): 39-46.
- Rinderknecht, E. and R. E. Humbel (1978). "The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin." *J Biol Chem* 253(8): 2769-76.
- Ronga, M., Baldo, F., et al. (2006). "Recombinant human bone morphogenetic protein-7 for treatment of long bone non-union: An observational, retrospective, non-randomized study of 105 patients." *Injury* 37(9 Suppl): S51-6.
- Rosen, V., J. M. Wozney, et al. (2002). "Bone Morphogenetic Proteins." In: *Principles of Bone Biology* Academic Press N.Y.: 919-928.
- Rosen, V. and R. S. Thies (1992). "The BMP proteins in bone formation and repair." *Trends Genet* 8(3): 97-102.
- Rosen, V., J. M. Wozney, et al. (1989). "Purification and molecular cloning of a novel group of BMPs and localization of BMP mRNA in developing bone." *Connect Tissue Res* 20(1-4): 313-9.
- Salmon, W. D., Jr. and W. H. Daughaday (1957). "A hormonally controlled serum factor which stimulates sulfate incorporation by cartilage in vitro." *J Lab Clin Med* 49(6): 825-36.
- Sato, M., T. Ochi, et al. (1999). "Mechanical tension-stress induces expression of bone morphogenetic protein (BMP)-2 and BMP-4, but not BMP-6, BMP-7, and GDF-5 mRNA, during distraction osteogenesis." *J Bone Miner Res* 14(7): 1084-95.
- Schiltz, P. M., T. Ohta, et al. (1992). "Growth hormone stimulates cortical bone formation in immature hypophysectomized rats." *Endocr Res* 18(1): 19-30.
- Schlechter, N. L., S. M. Russell, et al. (1986). "A direct growth effect of growth hormone in rat hindlimb shown by arterial infusion." *Am J Physiol* 250(3 Pt 1): E231-5.
- Schlechter, N. L., S. M. Russell, et al. (1986). "Evidence suggesting that the direct growth-promoting effect of growth hormone on cartilage in vivo is mediated by local production of somatomedin." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(20): 7932-4.

- Schmidmaier, G., B. Wildemann, et al. (2002). "Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats." *Bone* 30(6): 816-22.
- Schmidmaier, G., B. Wildemann, et al. (2002). "Improvement of fracture healing by systemic administration of growth hormone and local application of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1." *Bone* 31(1): 165-72.
- Sekiya, I., B. L. Larson, et al. (2002). "Expansion of human adult stem cells from bone marrow stroma: conditions that maximize the yields of early progenitors and evaluate their quality." *Stem Cells* 20(6): 530-41.
- Shepanek, L. A. (1953). "The effect of endocrine substances (ACTH and growth hormone) on experimental fractures." *Surg Gynecol Obstet* 96(2): 200-4.
- Sun, W., D. D. Jin, et al. (2003). "Effect of nitric oxide synthase inhibitor on proteoglycan metabolism in repaired articular cartilage in rabbits." *Chin J Traumatol* 6(6): 336-40.
- Takuwa, Y., C. Ohse, et al. (1991). "Bone morphogenetic protein-2 stimulates alkaline phosphatase activity and collagen synthesis in cultured osteoblastic cells, MC3T3-E1." *Biochem Biophys Res Commun* 174(1): 96-101.
- Thies, R. S., M. Bauduy, et al. (1992). "Recombinant human bone morphogenetic protein-2 induces osteoblastic differentiation in W-20-17 stromal cells." *Endocrinology* 130(3): 1318-24.
- Tylkowski, C. M., H. Wezeman, et al. (1976). "Hormonal effects on the morphology of bone defect healing." *Clin Orthop*(115): 274-85.
- Urist, M. R. (1965). "Bone: formation by autoinduction." *Science* 150(698): 893-9.
- Wang, E. A., D. I. Israel, et al. (1993). "Bone morphogenetic protein-2 causes commitment and differentiation in C3H10T1/2 and 3T3 cells." *Growth Factors* 9(1): 57-71.
- Wildemann, B., F. Kandziora, et al. (2004). "Local and controlled release of growth factors (combination of IGF-I and TGF-beta I, and BMP-2 alone) from a polylactide coating of titanium implants does not lead to ectopic bone formation in sheep muscle." *J Control Release* 95(2): 249-56.
- Wildemann, B., G. Schmidmaier, et al. (2004). "Quantification, Localization, and Expression of IGF-I and TGF-beta1 During Growth Factor-Stimulated Fracture Healing." *Calcif Tissue Int*.
- Wozney, J. M. (1992). "The bone morphogenetic protein family and osteogenesis." *Mol Reprod Dev* 32(2): 160-7.
- Wozney, J. M. (1998). "The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult." *Eur J Oral Sci* 106 Suppl 1: 160-6.
- Wozney, J. M., V. Rosen, et al. (1990). "Growth factors influencing bone development." *J Cell Sci Suppl* 13: 149-56.
- Wozney, J. M., V. Rosen, et al. (1988). "Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities." *Science* 242(4885): 1528-34.

- Wright, N. M., J. Renault, et al. (1995). "Effect of growth hormone on bone: bone mineral density, trabecular bone volume, and alkaline phosphatase improve or are restored in the dwarf rat treated with growth hormone." *J Bone Miner Res* 10(1): 127-31.
- Yamaguchi, A., T. Ishizuya, et al. (1996). "Effects of BMP-2, BMP-4, and BMP-6 on osteoblastic differentiation of bone marrow-derived stromal cell lines, ST2 and MC3T3-G2/PA6." *Biochem Biophys Res Commun* 220(2): 366-71.
- Yamaguchi, A., T. Katagiri, et al. (1991). "Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro." *J Cell Biol* 113(3): 681-7.
- Yi, S. E., A. Daluiski, et al. (2000). "The type I BMP receptor BMPRII is required for chondrogenesis in the mouse limb." *Development* 127(3): 621-30.
- Zhao, G. Q. (2003). "Consequences of knocking out BMP signaling in the mouse." *Genesis* 35(1): 43-56.
- Zheng, M. H., D. J. Wood, et al. (1994). "Recombinant human bone morphogenetic protein-2 enhances expression of interleukin-6 and transforming growth factor-beta 1 genes in normal human osteoblast-like cells." *J Cell Physiol* 159(1): 76-82.

Danksagung

Mein Dank und Respekt gilt folgenden Personen:

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. N.P. Haas

Direktor des Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité, Campus Virchow, der Humboldt-Universität zu Berlin,

in dessen Abteilung ich meine wissenschaftliche Arbeit durchführen durfte,

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Hermann J. Bail

für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit,

Herrn Dr. med. Tobias Lindner und **Herrn Martin Hüning**

für die hervorragende Betreuung in Planung, Durchführung und Auswertung der Arbeit.

Des weiteren gilt mein besonderer Dank folgenden Personen:

Frau Camilla Bergmann

Frau Marzena Princ

Frau Gabriele Hardung

Herrn Devakara Epari

Herrn Jan-Eric Hoffman

Herrn Gotthard Falke

Frau Rhodanti Marghariti

Frau Lotta von Cramon

Herren Dirk Hagedorn und Jörn Jaath

für die fruchtbare Zusammenarbeit,

Frau Priv. Doz. Dr. rer. nat. Britt Wildemann und **Herrn Univ.-Prof. Ing. Georg Duda**

für die wissenschaftlich-moralische Unterstützung

sowie allen Mitarbeitern und Doktoranden des Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité, Campus Virchow, Humboldt-Universität Berlin.

Cem Yetimoglu

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mitveröffentlicht.

Vortrag

Yetimoglu C. , Hünning M., Lindner T., Nomura S., Raschke M., Bail H. BMP-2 /-4 in der Knochenentwicklung und Knochenheilung – Rekapitulation des Expressionsmusters. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, Berlin 2002

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Cem Yetimoglu, an Eides statt, dass ich die Dissertation selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe, diese auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie Literatur vollständig angegeben sind.

Cem Yetimoglu