

Aus dem Julius Wolff Institut  
für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration  
der Medizinischen Fakultät Charité  
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Genexpression von Extrazellulären Matrixproteinen während der frühen  
Knochenheilung nach systemischer Applikation von Wachstumshormon am Modell  
der Ratte**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin  
Berlin

von

Rodanthi E. Margariti

aus Thessaloniki / Griechenland

Datum der Promotion: 23.06.2019

**Inhaltsverzeichnis**

<b>I.</b>	<b>Abstrakt</b>	<b>5</b>
<b>II.</b>	<b>Abstract</b>	<b>7</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1.	Anatomie und Physiologie des Knochens	9
1.1.1.	Osteoblasten	10
1.1.2.	Osteozyten	11
1.1.3.	Osteoklasten	11
1.1.4.	Organische Komponenten des Knochens	11
1.1.4.1.	Kollagene Proteine	11
1.1.4.2.	Nichtkollagene Proteine	12
1.1.4.2.1.	Osteonectin	12
1.1.4.2.2.	Osteocalcin	12
1.1.4.2.3.	Zell-Bindungsproteine	13
1.1.4.2.4.	Proteoglykane	13
1.2.	Physiologie der Frakturheilung	14
1.3.	Wachstumshormon	18
1.3.1.	Struktur und Synthese	18
1.3.2.	Wirkungsweise	19
1.3.3.	Andere Wachstumsfaktoren	21
1.3.4.	Einsatz in der Medizin	22
1.4.	Fragestellung der vorliegenden Arbeit	23
1.5.	Ziel der Arbeit	24
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1.	Tierversuch	25
2.1.1.	Versuchsaufbau	25
2.1.2.	Tiermodell	25
2.2.	Operatives Vorgehen	26
2.2.1.	Narkose	26
2.2.2.	Blutabnahme	26
2.2.3.	Operationsdurchführung	27
2.2.4.	Röntgen	29
2.2.5.	Postoperative Versorgung	29
2.3.	Versuchsgruppen: rh-Growth Hormone vs. Placebo	30
2.3.1.	Herstellung der rh-GH Injektionslösung	30

2.3.2.	Systemische Applikation	30
2.4.	Gewebepräparation	31
2.4.1.	Gewebeentnahme und Fixation	31
2.4.2.	Schnittanfertigung	32
2.5.	In Situ Hybridisierung	32
2.5.1.	Allgemeines	32
2.5.2.	Herstellung der mRNA-Sonden	33
2.5.2.1.	PCR der cDNA Sonden	33
2.5.2.2.	In Vitro Transkription und Herstellung der Dig-mRNA	36
2.5.3.	Herstellung der Gebrauchslösungen, Materialien und Geräte	37
2.5.4.	Durchführung	42
2.6.	Auswertung	44
2.6.1.	Geräte	44
2.6.2.	Software	45
2.6.3.	Definition der <i>Regions of Interest</i>	45
2.6.4.	Deskriptive Analyse	45
2.6.5.	Bildanalyse	46
2.6.6.	Statistik	47
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>49</b>
3.1.	Klinische Beurteilung des Heilungsverlaufes	49
3.2.	Auswertung	50
3.3.	Histologische Veränderungen während der Knochenheilung	50
3.4.	<i>In Situ Hybridisierung</i> mit $\alpha_1$ Kollagen Typ I - mRNA	56
3.4.1.	7 Tage postoperativ	56
3.4.2.	14 Tage postoperativ	59
3.4.3.	21 Tage postoperativ	60
3.4.4.	$\alpha_1$ Kollagen Typ I im Verlauf der Knochenheilung	62
3.5.	<i>In Situ Hybridisierung</i> mit Osteopontin - mRNA	63
3.5.1.	7 Tage postoperativ	63
3.5.2.	14 Tage postoperativ	66
3.5.3.	21 Tage postoperativ	68
3.5.4.	Osteopontin im Verlauf der Knochenheilung	70
3.6.	<i>In Situ Hybridisierung</i> mit Osteocalcin - mRNA	71
3.6.1.	7 Tage postoperativ	71
3.6.2.	14 Tage postoperativ	73
3.6.3.	21 Tage postoperativ	75

3.6.4.	Osteocalcin im Verlauf der Knochenheilung	77
3.7.	<i>In Situ Hybridisierung</i> mit Osteonectin – mRNA	78
3.7.1.	7 Tage postoperativ	78
3.7.2.	14 Tage postoperativ	81
3.7.3.	21 Tage postoperativ	83
3.7.4.	Osteonectin im Verlauf der Knochenheilung	85
3.8.	<i>In Situ Hybridisierung</i> mit $\alpha_1$ Kollagen Typ II - mRNA	86
3.8.1.	7 Tage postoperativ	86
3.8.2.	14 Tage postoperativ	90
3.8.3.	21 Tage postoperativ	92
3.8.4.	$\alpha_1$ Kollagen Typ II im Verlauf der Knochenheilung	94
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>96</b>
4.1.	Arbeitshypothese	96
4.2.	Diskussion der Ergebnisse	96
4.3.	Diskussion der Methoden	106
4.3.1.	Operation und postoperative Behandlung	106
4.3.2.	In Situ Hybridisierung	106
4.3.3.	Auswertung	107
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>110</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>112</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>123</b>
<b>8.</b>	<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	<b>124</b>
8.1.	Abbildungen	124
8.2.	Tabellen	125
<b>9.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>127</b>
<b>10.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>128</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>129</b>

## I. Abstrakt

### **Einleitung:**

Zahlreiche *in vivo* Studien der letzten Jahrzehnte zeigten, dass die exogene Applikation von Wachstumshormon die Knochenheilung beschleunigen kann. Welche genauen molekularen Effekte dieser Wirkung zugrunde liegen, blieb jedoch ungeklärt.

Ziel dieser Studie war es, anhand von spezifischen RNA-Sonden für ausgewählte, an der Knochenheilung beteiligte Extrazelluläre Matrixproteine, die Wirkung von systemisch applizierbarem Wachstumshormon auf die Knochenheilung auf histologischer Ebene am Rattenosteotomiemodell zu beschreiben.

### **Material und Methoden:**

Bei adulten Sprague-Dawley Ratten (weiblich, n=30) wurde eine standardisierte Osteotomie von 0,3 mm Spaltbreite erzeugt und mittels monolateralem Fixateur externe stabilisiert. Es wurden zwei Hauptgruppen mit den Standzeiten 7, 14 und 21 Tage (n=5) analysiert:

Gruppe I: 3 mg/Kg/d rhGH s. c.

Gruppe II: NaCl s. c. (Placebo)

2 x täglich

*In Situ Hybridisierung* wurde mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden auf 4 µm dicken Paraffinserienschnitten durchgeführt. Fünf knochenrelevante Matrixproteine wurden dargestellt:  $\alpha_1$  Kollagen I und II als Marker osteogener bzw. chondrogener Zellen, Osteocalcin als Marker osteoblastärer Zellen sowie Osteopontin und Osteonectin als Marker mineralisierender Zellen.

### **Ergebnisse:**

Nach 7 Tagen konnte in den osteoblastären und chondrozytären Zellen eine deutlich stärkere Signalaktivität für alle Extrazellulären Matrixproteinen in der Wachstumshormongruppe beobachtet werden. Nach 14 Tagen nahm die Expression für  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, Osteocalcin und Osteonectin-mRNA in der GH-Gruppe weiterhin zu, während eine deutliche Abnahme der Expression für Osteopontin und  $\alpha_1$  Kollagen Typ II zu verzeichnen war. In der Placebo-Gruppe zeigte sich zu diesem Zeitpunkt eine wiederum erhöhte Signalaktivität für die beiden mRNA. Nach 21 Tagen fand sich in der GH-Gruppe eine annähernd gleiche Signalaktivität für  $\alpha_1$  Kollagen Typ I und Osteocalcin-mRNA bei deutlicher Abnahme der Expression von Osteopontin, Osteonectin und  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA. In der Placebo-Gruppe zeigte sich in diesem Zeitraum ein tendenzieller Anstieg der Expression von Osteonectin-mRNA.

**Diskussion:**

Im Rahmen dieser Studie wurde der *in vivo* Einfluss von exogen verabreichtem Wachstumshormon auf die Bildung Extrazellulärer Matrixproteine während der Knochenheilung untersucht. Die Ergebnisse lassen rückschließen, dass die exogene Applikation von Wachstumshormon seine positive Wirkung auf die Knochenheilung durch die frühzeitige Erhöhung der Syntheseaktivität von Extrazellulären Matrixproteinen sowie die Beschleunigung der Zellproliferation und -differenzierung und somit der Abfolgen der Phasen der Knochenheilung entfaltet.

Berücksichtigt man die Nebenwirkungen der systemischen Applikation von Wachstumshormon, so ist sein Einsatz zur Beschleunigung der Frakturheilung beim Menschen eher nicht zu befürworten. Stattdessen wäre eine lokale, protrahierte Verabreichung von Wachstumshormon, entweder allein über eine Injektion/Pumpe oder mit Trägermaterialien (Osteosynthesematerial, Membranen etc), welche mit einer Reduktion der verwendeten Hormonmenge und systemischen Nebenwirkungen einhergehen würde, vielversprechend.

## II. Abstract

### **Introduction:**

*In vivo* studies have shown that GH can accelerate bone healing. However, the precise molecular effects underlying this fact remained unclear.

The aim of this study was to describe the effect of systemically applied GH on bone healing at histological level in a rat osteotomy model, based on the analysis of specific ECMP-RNA probes involved in the healing cascade.

### **Material and methods:**

In adult Sprague-Dawley rats (female, n = 30) a standardized 0.3 mm osteotomy was applied and stabilized with fixateur externe. Two groups of 7, 14 and 21 days lifetime (n = 5) were analyzed:

Group I: 3 mg / kg / d rhGH s. c.

Group II: NaCl s. c. (Placebo)

twice daily

*ISH* was performed with digoxigenin-labeled RNA probes on 4  $\mu$ m paraffin sections. Five ECMP were described:  $\alpha$ 1 Collagen I and II as markers of osteogenic and chondrogenic cells, osteocalcin as marker of osteoblastic cells and osteopontin and osteonectin as markers of mineralizing cells.

### **Results:**

After 7 days, significantly stronger signal activity was observed in osteoblast and chondrocytic cells for all ECMP in the GH group. After 14 days, the expression of  $\alpha$ 1 collagen type I, osteocalcin and osteonectin mRNA increased further, while there was a marked decrease in the expression of osteopontin and  $\alpha$ 1 collagen type II. At the same time in the placebo group an increased signal activity was shown for these mRNAs. After 21 days, the GH group showed the same signal activity for  $\alpha$ 1 collagen type I and osteocalcin mRNA whereas a decrease in the expression of osteopontin, osteonectin and  $\alpha$ 1 collagen type II mRNA was seen. In the placebo group, a mild increase in the expression of osteonectin mRNA was shown during this period.

### **Discussion:**

In this study, the *in vivo* influence of GH on the formation of ECMP during bone healing was investigated. The results suggest that GH exerts its beneficial effect on bone healing through the early enhancement of the synthesis activity of ECMP, the acceleration of cell proliferation and differentiation and thus the succession of the phases of bone healing.

Considering the side effects of the systemic administration of GH, its use in humans is rather not to be advocated. Instead, a local, protracted administration of GH, either via an injection / pump or with support materials (osteosynthesis material etc.), which would result in a reduction of GH used and its systemic side effects, would be promising.



## 1. Einleitung

Über 15 Millionen Frakturen werden jährlich in den Vereinigten Staaten behandelt. Während die Mehrheit davon durch geeignete unfallchirurgische und orthopädische Behandlung, problemlos ausheilt, kommt es in 10-15% der Fälle zu Komplikationen (ausgedehnter Substanzverlust, Infektion etc.), welche in verzögerter oder gar ausbleibender Frakturheilung resultieren <sup>(28)</sup>.

Tritt im Rahmen einer Verletzung des Skeletts eine der erwähnten Komplikationen auf, kommt es zu einer starken Verlängerung der Behandlungsdauer und eventuell zu einer dauerhaften Invalidität der betroffenen Patienten.

Eine Verkürzung der Behandlungsdauer würde nicht nur zu einer Verbesserung der Lebensqualität des Patienten führen, sondern auch eine signifikante Kostensenkung für das Gesundheitswesen bedeuten.

Zur Beschleunigung der Frakturheilung oder der Behandlung von Pseudarthrosen existieren unterschiedliche Konzepte. Hier sind z. B. der Verfahrenswechsel auf eine andere Osteosynthese, die Spongiosaplastik oder die Implantation von Knochenersatzstoffen zu erwähnen, welche jedoch nicht immer erfolgreich sind.

Ein weiterer therapeutischer Ansatz besteht daher darin, die Regeneration des geschädigten Knochens derart zu unterstützen, dass die Wiederherstellung der Belastbarkeit frühzeitig und vor allem komplikationslos einsetzt. Dies könnte durch eine lokale oder systemische Stimulation und Beschleunigung der Knochenheilung erreicht werden, welche durch eine schnellere Überbrückung der Fraktur, die Folgekomplikationen zu vermeiden hilft.

Aufgrund dessen stellt der therapeutische Einsatz von osteoinduktiven Substanzen zur Beschleunigung der physiologischen Frakturheilung, schon seit Jahrzehnten, ein Schwerpunkt der klinischen und experimentellen unfallchirurgischen Forschung dar.

### 1.1. Anatomie und Physiologie des Knochens

Knochen besteht aus Zellen (Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten) sowie aus extrazellulärer Matrix (ECM). Letztere wird in eine organische und eine anorganische Komponente unterteilt. Die anorganische Komponente des Knochens besteht hauptsächlich aus Kalzium, Phosphaten und Hydroxylapatit. Die organische Komponente wird in kollagene und nicht kollagene Proteine unterteilt.

### 1.1.1. Osteoblasten

Die Osteoblasten gehen aus mesenchymalen Stammzellen hervor. Infolge einer Stimulierung von Vorläuferzellen wird die Proliferation und Differenzierung zunächst zu Präosteoblasten und später zu reifen Osteoblasten veranlasst <sup>(155)</sup>.

Die reifen Osteoblasten sind kuboidale Zellen, welche über einen zentralen Kern und ein gut entwickeltes endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat verfügen. Sie haben die Aufgabe, Proteine der Knochenmatrix zu synthetisieren, wie z. B. Kollagen Typ I und Osteocalcin (Bone Gla Protein). Ferner besitzen sie eine hohe Aktivität an Alkalischer Phosphatase (AP), die möglicherweise eine essentielle Rolle in der Knochenmineralisation spielt. Aufgrund dessen wird die knochenspezifische AP häufig in Studien als Marker für Zellen mit osteoblastischem Phänotyp oder als Serummarker für die Aktivität der Osteoblasten verwendet <sup>(56,155)</sup>.

Desweiteren sind die Osteoblasten in der Lage, verschiedene Wachstumsfaktoren zu sezernieren, wie z. B. Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), Bone Morphogenetic Protein (BMP), Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) sowie Insulin-like Growth Factor-I und -II (IGF-I und -II), welche u. a. im Knochen gespeichert werden <sup>(56)</sup>. Osteoblasten spielen eine wichtige Rolle bei der Mineralisation des neugebildeten Knochens aufgrund ihrer Fähigkeit, alkalische Phosphatase sowie andere Phospholipide und Proteoglykane zu synthetisieren <sup>(155)</sup>.

Osteoblasten können sich zu Knochensaumzellen (Bone-lining-cells) oder Osteozyten entwickeln. Knochensaumzellen verbleiben an der Oberfläche, wo sie auf der Knochenmatrix direkt aufliegen. Sie drosseln ihre synthetische Aktivität und bekommen dadurch eine langgestreckte, abgeflachte Form <sup>(178)</sup>.

Die Entdeckung und Charakterisierung der Zytokinrezeptor-Zytokin-Decoyreceptor Triade, gebildet durch den Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B- Ligand (RANKL), den Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B (RANK) und Osteoprotegin (OPG) führte zu immensen Fortschritten im Verständnis der Knochen-Homöostase. RANK, welches zur Tumor Necrosis Factor (TNF) Rezeptor Superfamilie gehört, kommt bei den Osteoklasten vor und induziert Osteoklastogenese, wenn es an RANKL bindet. RANKL wiederum wird von den Osteoblasten und anderen Stromazellen produziert. Die Bindung von RANKL an RANK stimuliert die Differenzierung von Pre-Osteoklasten, aktiviert die reifen Osteoklasten und prolongiert ihren Lebenszyklus. Das ebenfalls von den Osteoblasten produzierte OPG, ist ein Protein, welches die Entwicklung der Osteoklasten beeinträchtigt und als Decoy Receptor für das RANKL fungiert <sup>(25, 125, 172)</sup>.

*In vitro* Studien haben gezeigt, dass ein reduziertes oder nicht vorhandenes Level an RANKL und/oder RANK zu Osteopetrosis und niedriger Konzentration an reifen Osteoklasten führt. Eine wiederum hohe Konzentration an RANKL und/oder RANK resultiert in einer erhöhten Osteoklastenaktivität und somit in Osteoporosis und rapidem Knochenverlust <sup>(25, 125, 172)</sup>.

### **1.1.2. Osteozyten**

Die Osteozyten sind eingebettet in dem kalzifizierten Knochen. Sie gehen aus Osteoblasten hervor. Die Osteozyten sind miteinander und mit Zellen der Knochenoberfläche über dendritische Zellfortsätze, die in sogenannten Canaliculi verlaufen, funktionell verbunden. Solche Canaliculi entstehen während der Matrixsynthese und kontrollieren möglicherweise die Aktivität der reifen Osteoblasten. Es gibt Hinweise darauf, dass die Osteozyten verschiedene Proteine wie TGF- $\beta$  und Osteopontin produzieren <sup>(26,152)</sup>.

### **1.1.3. Osteoklasten**

Aus der Verschmelzung von Monozyten/Makrophagen entstehen durch weitere Differenzierung mehrkernige Vorläuferzellen von Osteoklasten. Diese exprimieren als Membranrezeptor RANK. Die Bindung von RANKL an RANK löst die Differenzierung dieser Vorläuferzellen zum reifen, mehrkernigen Osteoklasten aus <sup>(95)</sup>. Im lebenslangen Prozess des Umbaus und Neuaufbaus von Knochenmatrix übernehmen die Osteoklasten die Aufgabe der Resorption von mineralisierter Knochenmatrix <sup>(178)</sup>. So gewährleisten sie, dass Knochengewebe laufend umgewandelt werden kann.

Osteoklasten resorbieren Knochen bis zu einer Tiefe von 50–70  $\mu\text{m}$ . Sie gehen dann in Apoptose über, wobei wahrscheinlich von Osteoblasten gebildetes TGF- $\beta$  eine wichtige Rolle spielt. Die Resorption des Knochengewebes ist Voraussetzung für seine Neubildung durch die Aktivität der Osteoblasten/Osteozyten, die in die von den Osteoklasten gebildeten erosiven Höhlen (Howship-Lakunen) einwandern <sup>(95, 124)</sup>.

### **1.1.4. Organische Komponenten des Knochens**

#### **1.1.4.1. Kollagene Proteine**

Der Knochen besteht zum größten Teil aus Kollagen Typ I. Es handelt sich dabei um ein komplexes Molekül, welches aus einem Heterotrimer von zwei pro- $\alpha_1$ (I) und einer pro- $\alpha_2$ (I) polypeptiden Ketten zusammengebaut wird. Diese Ketten sind sich strukturell sehr ähnlich, werden jedoch von verschiedenen Chromosomen kodiert. Kollagen Typ I hat einen hohen

Anteil an gebundenen Kohlenhydraten und ist für die Zugfestigkeit des Knochens verantwortlich <sup>(95)</sup>.

Der restliche Anteil der kollagenen Proteine im Knochen (<1%) besteht aus einem Gemisch aus Typ V, VIII und XII Kollagen, welche mit dem Typ I Kollagen zur Bildung der Struktur der kollagenen Fibrillen interagieren <sup>(95)</sup>.

#### **1.1.4.2. Nichtkollagene Proteine**

Die restlichen 10% des organischen Knochenanteils bilden verschiedene Proteinen, welche u. a. regulatorische Funktionen für die Mineralisation, für diverse Interaktionen mit den strukturellen Proteinen, wie z.B. Kollagen übernehmen und als Mediatoren für die Zell-Matrix Bindung fungieren.

##### **1.1.4.2.1. Osteonectin**

Osteonectin oder SPARC (Secreted Protein Acid und Rich in Cystein) bildet mit 2,5% das häufigste nichtkollagene Protein des Knochens <sup>(91)</sup>. Es ist ein 32 kDa saures Glykoprotein, welches hauptsächlich von den Osteoblasten, jedoch auch von Hautfibroblasten, Sehnenzellen und Odontoblasten synthetisiert wird. Obwohl seine Funktion noch nicht vollständig geklärt ist, gibt es mehrere Hinweise darauf, dass es in der Lage ist, Kalzium sowie Kollagen Typ I und auch Hydroxylapatit zu binden und aufgrund dessen eine wichtige Rolle bei der Mineralisation und der Matrixstabilisation spielt <sup>(39,91,141)</sup>. In *in vitro* Studien zur Untersuchung der physiologischen Knochenheilung wurde nachgewiesen, dass Osteonectin ein Synthesemaximum während der Phase, in der der Ossifikationsprozess am aktivsten ist, aufweist <sup>(141)</sup>. Desweiteren wurde in einer *in vivo* Studie gezeigt, dass die grösste Menge an Osteonectin von Fibroblasten und osteoblastischen Zellen während rapider Proliferation und Differenzierung synthetisiert wird <sup>(62)</sup>. Osteonectin wurde ferner auch in proliferativen, jedoch nicht in hypertrophen Chondrozyten nachgewiesen <sup>(39,71,112)</sup>.

##### **1.1.4.2.2. Osteocalcin**

Osteocalcin oder bone Gla Protein (Gla = Glutamic acid) ist ein 6 kDa großes Protein, welches drei  $\gamma$ -Karboxyglutamat-Enden aufweist. Diese verleihen dem Protein eine kalziumbindende Fähigkeit. Aufgrund dessen wird vermutet, dass Osteocalcin ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Mineralisation und Bildung von Hydroxylapatitkristallen spielt <sup>(91)</sup>. Die  $\gamma$ -Karboxylierung erfolgt während der post-translationalen Modifikation des Proteins und ist abhängig vom Vitamin K. Price et al. beobachteten, dass mit Warfarin behandelte Ratten nahezu kein

Osteocalcin mehr in ihren Knochen, jedoch einen hohen Osteocalcinserumspiegel aufweisen, weil das Protein nicht im Knochen deponiert werden kann <sup>(127)</sup>. Osteocalcin wird hauptsächlich von Osteoblasten synthetisiert, wird jedoch nicht kontinuierlich freigesetzt. Der Serumspiegel von Osteocalcin variiert mit der Formation neugebildeten Knochens <sup>(141)</sup>. Aufgrund dessen wird Osteocalcin, ähnlich wie die alkalische Phosphatase als Marker für die osteoblastäre Aktivität verwendet <sup>(140, 141)</sup>.

#### **1.1.4.2.3. Zell-Bindungsproteine**

Die Knochenmatrix besteht ferner aus diversen Zell-Bindungsproteine (cell-attachment-proteins), welchen eine tripeptide Sequenz von Arginin-Glycin-Aspartat (RGD) gemeinsam ist. Diese tripeptide Sequenz ist dafür verantwortlich, dass das tragende Protein an Integrine (in der Membran der Zelle integrierte Proteine) der Zelloberfläche bindet. Zu dieser Gruppe gehören Osteopontin, Fibronectin, Thrombospondin, Knochensialoprotein (bone sialoprotein) und BAG (bone acidic sialoprotein) <sup>(141)</sup>.

*Osteopontin* ist ein 32 kDa großes Phosphoprotein und verfügt ebenfalls über die Fähigkeit, Kalzium zu binden. Ferner wurde in einer *in vivo* Studie gezeigt, dass Osteopontin an CD44 binden und CD44 abhängige Chemotaxis induzieren kann. Desweiteren wurde Immunoreaktivität von CD44 in Osteozyten und auf der basolateralen Plasmamembran der Osteoklasten nachgewiesen <sup>(39)</sup>. Die Tatsache, dass Osteopontin-positive Osteozyten und Osteoklasten nebeneinander lokalisiert sind, spricht für eine Osteopontin-CD44 initiierte Zell-Zell-Interaktion im Knochenremodeling. Ferner lässt sich vermuten, dass Osteopontin über einen Vitronectin-Rezeptor Osteoklasten auf der Knochenoberfläche verankert. Osteopontin wird hauptsächlich von Osteoprogenitor Zellen, Osteozyten und Osteoklasten produziert, während kleine Mengen von Osteopontin auch in kuboiden Osteoblasten beobachtet wurde <sup>(39,71)</sup>. Ferner kommt es auch in anderen Geweben, wie der Niere, dem Uterus, dem Gehirn und der Lunge vor.

#### **1.1.4.2.4. Proteoglykane**

Die Proteoglykane (PG) stellen eine Familie von Makromolekülen dar. Sie bestehen aus einem zentralen Kernprotein und einer variablen Anzahl an angekoppelten, sulfatisierten Glykoaminoglykanen und kurzen Oligosacchariden. Während die großen Proteoglykane, wie z. B. das Aggrecan, hauptsächlich im Knorpelgewebe anzutreffen sind, finden sich kleine Proteoglykane, wie z. B. Biglykan, Decorin und Fibromodulin auch im Knochengewebe und sind mit der Bildung der Kollagenfibrillen assoziiert. Sie sind nicht knochenspezifisch und erhalten entweder Chondroitinsulfat oder Dermatansulfat <sup>(141)</sup>.

Biglykan besteht aus einem 45 kDa großen Proteinkern und zwei Glykosaminoglykanen. Über seine Funktion ist insgesamt wenig bekannt. Decorin oder PG-S2 setzt sich ebenfalls aus einem 45 kDa großen Proteinkern, der annähernd homolog zum Proteinkern von Biglykan ist, jedoch nur aus einem Glykosaminoglykan zusammen. Decorin bindet an Kollagen Typ I und II *in vitro* und verhindert die kollagene Fibrinogenese. Fibromodulin ist ein 59 kDa großes Protein, welches modulierend auf die kollagene Fibrillenformationen wirkt <sup>(141)</sup>.

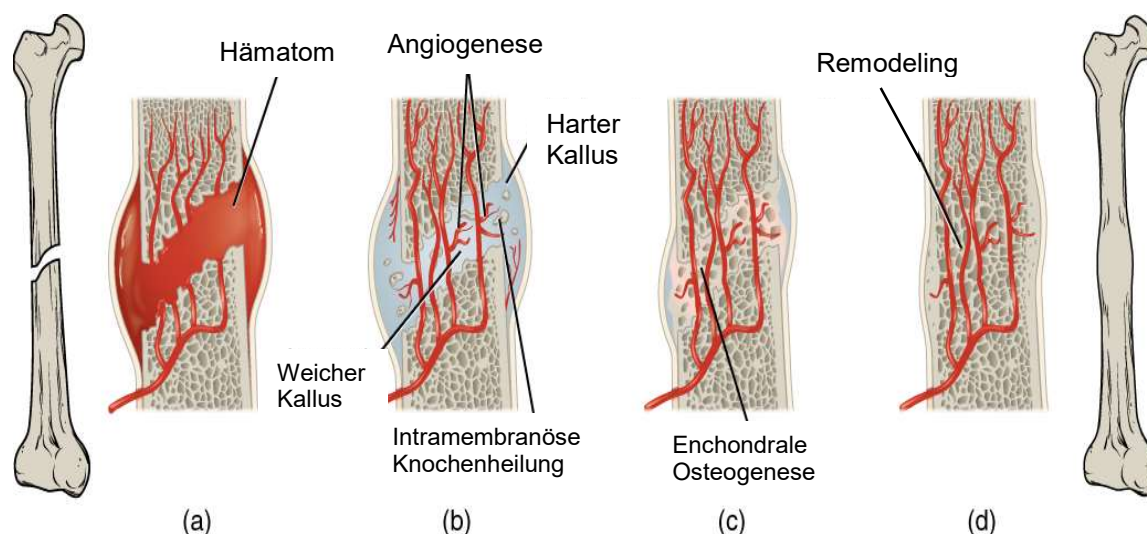
## 1.2. Physiologie der Frakturheilung

Die Frakturheilung ist ein komplexer physiologischer Prozess mit dem Ziel, die anatomische Kontinuität und die physiologische Belastbarkeit des Knochens wiederherzustellen. Im Gegensatz zu anderen Geweben, bei denen die Ausheilung über Formation von minderwertigem fibrinösem Gewebe zustande kommt, verfügt der Knochen über die Fähigkeit zur vollständigen Regeneration; die Ausheilung erfolgt also über die Wiederherstellung der Struktur und Funktion des ursprünglichen Knochengewebes.

Die Frakturheilung kann in manchen wenigen Fällen durch direkte Verwachsung der Haver'schen Kanäle und Knochenlamellen vollzogen werden, wenn der Frakturspalt ca. 100-300 µm beträgt. Diese Form der Frakturheilung wird als „direkte“ oder „primäre“ Frakturheilung bezeichnet und benötigt ein rigide stabilisierendes Verfahren. Sie ist durch das Fehlen einer Kallusbildung charakterisiert <sup>(140, 141, 156)</sup>.

Die weit häufiger vorkommende Form der Frakturheilung ist die „indirekte“ oder „sekundäre“ Frakturheilung, bei der die Frakturrenden weiter als ca. 500 µm voneinander entfernt sind. Sie ist durch periostale und endostale Kallusbildung charakterisiert und geht mit einer flächenhaften Resorption der in der Frakturzone liegenden Knochenenden einher <sup>(140, 141, 156)</sup>. Die sekundäre Frakturheilung kann in 5 Phasen unterteilt werden, welche parallel oder zum Teil überlappend ablaufen (s. Abb. 1.1):

1. Inflammatorische Phase
2. Intramembranöse Osteogenese (periostal)
3. Chondrogenese
4. Enchondrale Osteogenese und Remodeling



**Abb 1.1:** Schematische Darstellung der Stadien der Frakturheilung; a. Inflammatorische Phase, b. Intramembranöse Osteogenese (periostal), Chondrogenese im Bereich des weichen Kallus, c. Enchondrale Osteogenese, d. Remodeling (aus *Anatomy & Physiology, Connexions Web site*. <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>, open access 18 Juli 2018.)

Bei der Entstehung einer Fraktur kommt es zu einer Kontinuitätsunterbrechung des Knochens mit begleitendem Weichteiltrauma und Verletzung der Nachbarstrukturen wie z. B. Gefäßen, Nerven und Sehnen.

Infolge der Verletzung von Knochen- und Knochenmarksgefäßen kommt es zur Ausbildung eines Hämatoms, welches sich entlang des kortikalen Knochens oberhalb des Periosteums, zwischen dem darüberliegenden Weichteilgewebe, ausbreitet. Dadurch kommt es zu einer lokalen Infiltration von undifferenzierten Entzündungszellen, wie z. B. Makrophagen und Mastzellen. Letztere rufen durch Sekretion von Histamin und Heparin eine lokale Entzündungsreaktion mit Kapillardilatation hervor. Dieser Prozess resultiert in der Formation eines reparativen Granulationsgewebes, welches als externer Kallus bezeichnet wird <sup>(124, 166)</sup>. Weitere mesenchymale Stammzellen des Frakturhämatoms können durch Sekretion von verschiedenen Zytokinen, Interleukinen und Wachstumsfaktoren zu Osteo- und Chondroprogenitorzellen und später zu Osteoblasten und Chondrozyten ausdifferenzieren. Die sich neu bildenden Gefäße entspringen hauptsächlich aus den periostalen Gefäßen <sup>(101, 124, 166)</sup>.

In der Phase der intramembranösen Ossifikation kommt es ausgehend vom Periost zur Bildung von Geflechtknochen zunächst in gewisser Entfernung vom Frakturspalt. Die aus den periostalen mesenchymalen Stammzellen entstandenen Osteoprogenitorzellen differenzieren weiter zu Präosteoblasten und Osteoblasten, welche durch die Synthese von Matrixproteinen, wie z. B. Kollagen Typ I für die Bildung des Osteoids verantwortlich sind <sup>(101, 124, 166)</sup>.

Während der Chondrogenese ähnelt die Knochenheilung der Knochenformation in der Wachstumsfuge und zwar kommt es durch die aus pluripotenten Stammzellen entwickelten Chondrozyten ebenfalls durch die Synthese von Matrixproteinen zu einer verstärkten Bildung von Knorpelgewebe <sup>(166)</sup>.

Das charakteristische Protein im Knorpelgewebe stellt das Kollagen Typ II dar, welches aus dem von den Chondrozyten synthetisierten Prokollagen entsteht. Es besteht aus drei gleichen  $\alpha_1$  Typ II-Ketten, die zu einer Tripelhelix formiert sind. Ferner besitzt es einen hohen Anteil an Hydroxylysin, welches die Verknüpfung von Tropokollagenmolekülen der Fibrillen untereinander ermöglicht <sup>(39)</sup>.

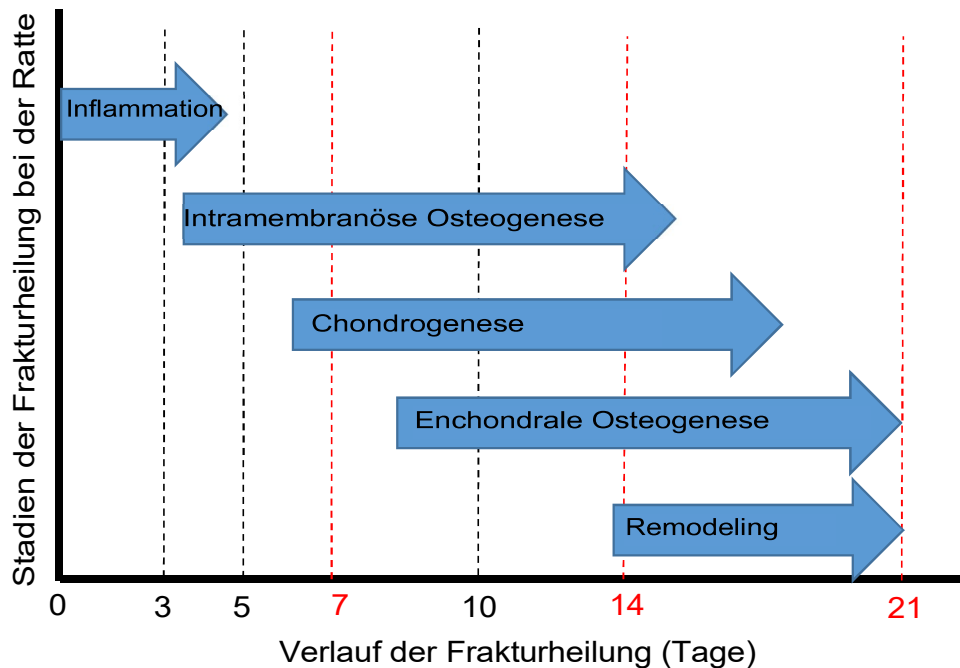
Die Menge des gebildeten Knorpelgewebes im Rahmen der Chondrogenese hängt stark von der Stabilität und Gefäßversorgung der Fraktur ab. Kommt es zu einer mangelhaften Gefäßversorgung oder zu einer Instabilität in diesem Stadium, resultiert hieraus eine vermehrte Knorpelbildung und somit eine verzögerte Frakturheilung <sup>(101, 124, 166)</sup>.

Im Anschluss an die Chondrogenese wird das gebildete Knorpelgewebe sukzessive durch neugebildeten Geflechtknochen ersetzt. Parallel dazu kommt es zum Remodeling des Kallus, d. h. zu einer gleichzeitigen Knochenbildung und Knochenresorption mit Entfernung von überschüssigem Gewebe und Ersatz des neugebildeten Geflechtknochens durch lamellären Knochen <sup>(101, 124, 166)</sup>.

Für die experimentelle Untersuchung der Knochenheilung hat sich die Ratte als Versuchstier etabliert <sup>(9,10,11,12,90)</sup>. Zahlreiche Studien über die Wirkung von Wachstumshormon auf die Knochenheilung sind am Rattenmodell durchgeführt worden <sup>(2, 3, 9, 10, 11, 12, 32, 47, 58, 71, 72, 78, 104, 109, 115, 128, 142, 145, 146, 151, 154, 157, 161, 174, 179, 185, 188)</sup>. Infolge dessen liegen Daten über den Ablauf der Knochenheilung vor, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

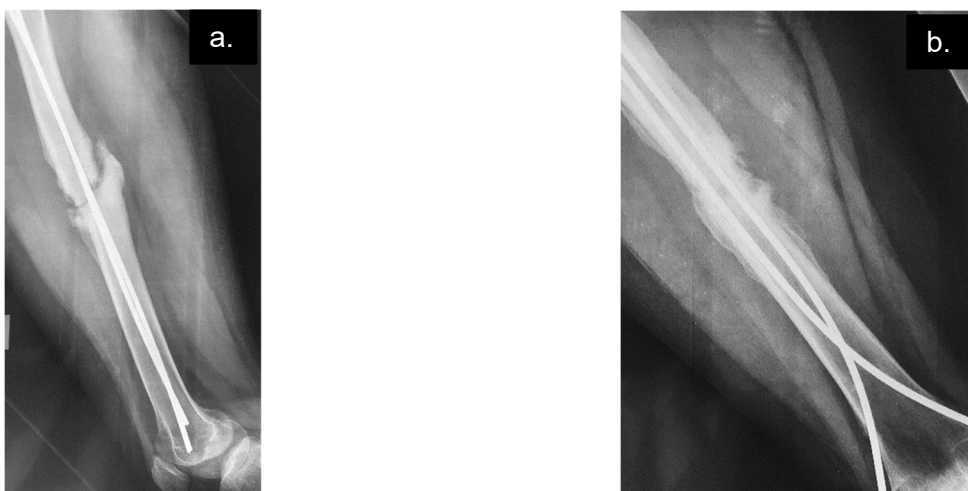
Die Knochenheilung erfolgt bei der Ratte mit einer zweifachen Geschwindigkeit im Vergleich zum Menschen <sup>(126)</sup>: In den ersten Stunden nach der Osteotomie kommt es zur Hämatombildung, wodurch die Inflammationsphase eingeleitet wird. Am 7. Tag ist bei der Ratte die Inflammationsphase abgeschlossen, der harte Kallus ist bereits geformt (intramembranöse Osteogenese) und im Bereich des weichen Kallus proliferieren die Chondrozyten (Chondrogenese). Am 14. Tag beginnt der weiche Kallus zu kalzifizieren (enchondrale Osteogenese). Ab dem 21. Tag findet sich im Bereich des harten Kallus weitestgehend Geflechtknochen. Es folgen das Remodeling und die Bildung von lamellärem Knochen <sup>(54,126)</sup> (s. Abb. 1.2).





**Abb. 1.2:** Zeitliche Abfolge der Heilungsstadien und Untersuchungszeitpunkte am Modell der Ratte (modifiziert nach Hadjiargyrou 2002)

Die Abfolge der oben beschriebenen Phasen der Frakturheilung hängt stark von allgemeinen Bedingungen, wie z. B. dem Alter und Gesamtzustand des Patienten, der Lokalisation der Fraktur sowie stabilisierenden Maßnahmen ab und kann sich über mehrere Monate oder Jahre hinziehen. Bei Störungen biologischer oder mechanischer Genese können die anfangs erwähnten Probleme auftreten, wie in Abb. 1.3 dargestellt.



**Abb. 1.3:** Ausbildung einer Pseudarthrose nach Versorgung einer Femurschaftfraktur bei einer 14-jährigen Patientin mit einer non-rigid Osteosynthese (ESIN: Elastisch Stabile Intramedulläre Nagelung) (a.: Laterale Aufnahme, b.: a. p. Aufnahme) (aus dem eigenen Röntgenbilderarchiv)

### 1.3. Wachstumshormon

#### 1.3.1. Struktur und Synthese

Das Wachstumshormon (engl: Growth Hormone, GH) ist ein endogen synthetisiertes Protein, welches für das Wachstum des Organismus verantwortlich ist. Ein Überschuss an Wachstumshormon im Kindesalter führt zum „Gigantismus“, einem proportionierten Riesenwuchs, während ein Mangel an Wachstumshormon oder ein angeborener Defekt der Wachstumshormonrezeptoren einen Zwergwuchs durch Hemmung des Längenwachstums zur Folge hat. Selbst im Erwachsenenalter führt ein Überschuss an Wachstumshormon zur Ausbildung der sogenannten „Akromegalie“, als Folge eines vermehrten disproportionalen Wachstums von Gesichtsteilen und Akren<sup>(89, 114)</sup>.

Das Wachstumshormon von Menschen und anderen Säugetieren ist ein aus 191 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, welches in der Adenohypophyse gebildet wird. Es weist zwei Disulfidketten auf, dadurch ist die Aminosäurekette des Hormons in zwei Schleifen gelegt (s. Abb. 1.4)<sup>(89, 114)</sup>.

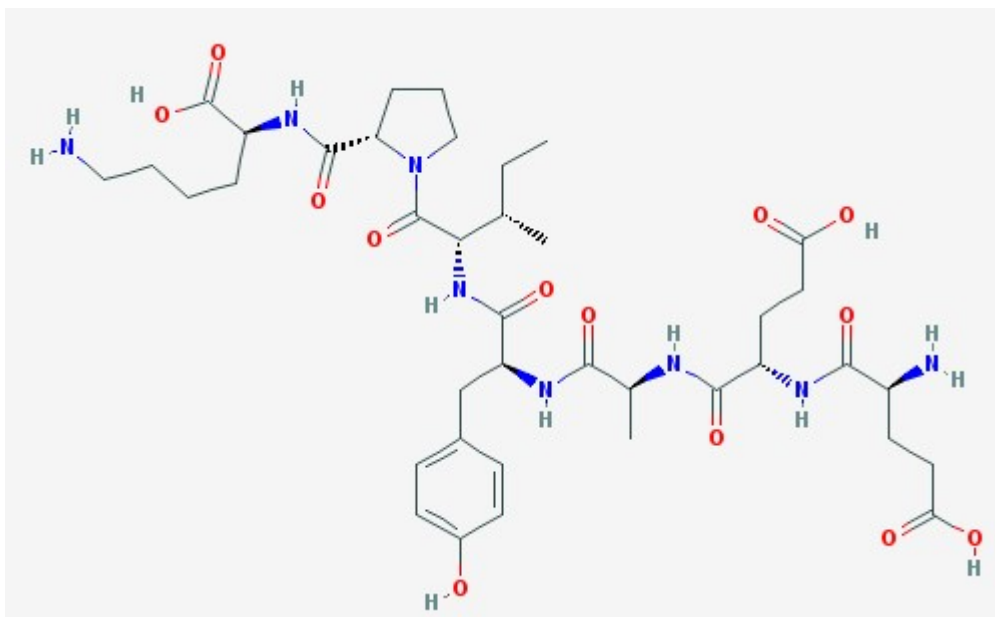


Abb. 1.4: Struktur des humanen Wachstumshormons (Source: PubChem, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, open access, 18 Juli 2018)

Die Sekretion von Wachstumshormon wird hauptsächlich durch zwei im Hypothalamus gebildete Polypeptide, das Wachstumshormon-Releasing Hormon (GH-RH) und das Somatostatin reguliert<sup>(43)</sup>.

Das GH-RH, ein aus 44 Aminosäuren gebildetes Polypeptid, wird im Nucleus arcuatus und ventromedialis synthetisiert und induziert die Synthese und Freisetzung des Wachstumshormons. Das im Nucleus peri- und paraventricularis gebildete Somatostatin kann die Freisetzung, jedoch nicht die Synthese von Wachstumshormon hemmen.

Sowohl das GH-RH als auch das Somatostatin gelangen über die Blutbahn in die Hypophyse und regulieren dort die Freisetzung von Wachstumshormon.

Die Produktion von GH-RH wird über neurale und humorale Mechanismen reguliert. Verschiedene Hormone wie z. B. Glucagon, Vasopressin und Glucocorticoide steigern die Synthese und Freisetzung von GH-RH und damit auch die Freisetzung von Wachstumshormon. Auch andere physiologische Faktoren, wie z. B. das Alter, der Ernährungszustand, das Geschlecht oder auch der Schlaf-Wach-Rhythmus beeinflussen die Freisetzung von Wachstumshormon <sup>(43)</sup>.

Die Freisetzung von Wachstumshormon über die Adenohypophyse erfolgt pulsatil in einem zirkadianen Rhythmus. Die hauptsächliche Freisetzung findet in der Nacht während des Schlafens statt <sup>(95)</sup>.

### 1.3.2. Wirkungsweise

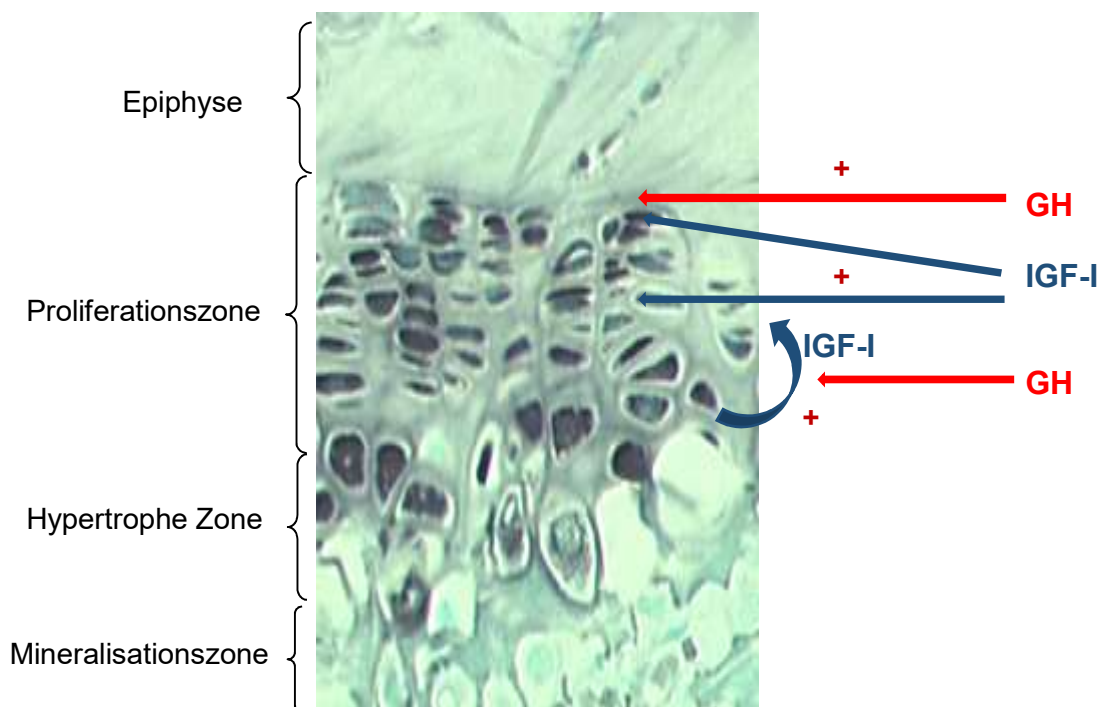
Wachstumshormon wird von der Adenohypophyse in den Blutkreislauf abgegeben. Nach seiner Freigabe kann sich das Wachstumshormon an eines der bisher zwei bekannten Bindungsproteine binden. Die Bindung des Wachstumshormons an eines der Bindungsproteine erhöht seine Halbwertszeit von durchschnittlich 7 auf 29 Minuten <sup>(15)</sup>.

Wachstumshormon entfaltet seine Wirkung direkt an der Zielzelle durch Bindung an spezifische membranständige Glykoproteinrezeptoren <sup>(137)</sup>.

Die insgesamt komplexe Wirkung des Wachstumshormons wird jedoch nicht nur direkt durch die Bindung an membranständige Rezeptoren, sondern auch durch die Induktion der Synthese von IGF-I und zum Teil von IGF-II in der Leber erzielt. Gemäß der „Dual effector theory“ führen sowohl der direkte Einfluss von Wachstumshormon, als auch sein indirekter über die Induktion der Syntheseaktivität von IGF-I in der Leber, zusammen zu einem gesteigerten Wachstum von Geweben. Dabei unterscheiden sich jedoch der zelluläre Wirkort sowie die Wirkungsart <sup>(120, 132)</sup>.

Green erhärtete 1985 in einem *in vitro* Experiment den „direkten GH-Effekt“ und bestätigte ebenfalls den „indirekten GH-Effekt“. Es wurde dabei nachgewiesen, dass das GH die Differenzierung von mesenchymalen Zellen fördert. Das durch das GH freigesetzte IGF-I

begünstigt die Proliferation bereits differenzierter Zellen und kann, in seiner Wirkung, das GH nicht ersetzen. Beide Faktoren stimulieren eine Zellteilung: das GH die von undifferenzierten Zellen und das IGF-I die von bereits differenzierten Zellen <sup>(51)</sup> (s. Abb. 1.5).



**Abb. 1.5:** Nach Ohlsson et al. stimuliert GH das Längenwachstum direkt über die Stimulation von Prächondrozyten in der Wachstumszone, während die anschließende klonale Expansion sowohl von der GH-induzierten lokalen Synthese von IGF-1 als auch von dem GH-induzierten Anstieg des zirkulierenden IGF-I im Serum reguliert wird.

Ferner wurde 2004 mit Hilfe eines *in vivo* Versuchs gezeigt, dass bei vollständiger IGF-I Abwesenheit und erhöhtem GH-Spiegel lediglich die Chondrozytenhypertrophie gedrosselt wird, während bei gleichzeitiger Abwesenheit von GH und IGF-I zusätzlich die Chondrozytengeneration unterbunden wird, was letztendlich in einem kombinierten Defizit des longitudinalen Knochenwachstums resultiert <sup>(173)</sup>.

Die Hauptaufgabe vom Wachstumshormon besteht also darin, entweder direkt, oder indirekt über die Induktion der Syntheseaktivität für IGF-I und IGF-II in der Leber oder anderen Gewebearten, das Körperwachstum zu stimulieren <sup>(73, 120)</sup>.

Beim Muskelwachstum stimuliert die Freisetzung von IGF-I die Differenzierung von Myoblasten. Dadurch kommt es sehr häufig unter der Behandlung mit Wachstumshormon zu einer Gewichtszunahme der inneren Organe. Im Proteinmetabolismus zeigt das

Wachstumshormon einen anabolen Effekt, da bei Gabe von Wachstumshormon die Aufnahme von Aminosäuren und die Proteinsynthese in den Muskeln angeregt werden <sup>(20)</sup>.

Ein kataboler Effekt vom Wachstumshormon wird insbesondere im Fettstoffwechsel beobachtet: Die Lipogenese wird unter dem Einfluss vom Wachstumshormon herabgesetzt, was einen erhöhten Spiegel an freien Fettsäuren und einen reduzierten Cholesterinspiegel zur Folge hat <sup>(134)</sup>.

Die Wirkung vom Wachstumshormon auf den Kohlenhydratstoffwechsel ist komplex. Während es einerseits die Glucoseaufnahme in peripheren Geweben durch eine herabgesetzte Insulinempfindlichkeit vermindert und zusätzlich auch die Gluconeogenese in der Leber hemmt, fördert es andererseits die Insulinsekretion in den B-Zellen des Pankreas. Daraus resultiert sowohl ein erhöhter Glucose- als auch Insulinspiegel im Blut <sup>(20)</sup>.

Erst vor kurzer Zeit wurde anhand von *in vitro* Versuchen ferner nachgewiesen, dass das GH direkt über die Syntheseninduktion von Uncoupling Protein (UCP) 2 und 3 am Energie- und Fettstoffwechsel teilnimmt. Ersteres kommt vor allem im Muskel-, Fett- und Lebergewebe vor, während UCP 3 das hauptsächliche UCP des Skelettgewebs darstellt <sup>(45, 57)</sup>.

### **1.3.3. Andere Wachstumsfaktoren**

Die Frakturheilung stellt einen komplexen Prozess dar, welcher der Regulation durch zahlreiche Wachstumsfaktoren unterliegt. Ihre Wirkung wird über Mediatoren entfaltet, welche sowohl systemisch als auch lokal, endo-, para- oder autokrin wirksam werden.

Für diverse Wachstumsfaktoren wurden anhand zahlreicher *in vivo* und *in vitro* Studien osteoinduktive und die Frakturheilung beschleunigende Effekte nachgewiesen <sup>(48, 145, 146, 168)</sup>.

Insbesondere werden den Wachstumsfaktoren TGF- $\beta_1$  und - $\beta_2$ , IGF-I und -II, PDGF, FGF und BMP wichtige regulatorische Aufgaben während der Frakturheilung zugesprochen (s. Tabelle 1.1).

**Tabelle 1.1:** Wachstumsfaktoren und ihre Wirkungsweise während der Frakturheilung (mod. nach Solheim et al. 1998)

Transforming growth factor beta - 1 / 2 TGF $\beta_1$ / $-\beta_2$	Mesenchymzellen-, Osteoprogenitor-, Osteoblastenproliferation, Differenzierung von Mesenchymzellen zu Chondrozyten, Synthese von extrazellulärer Matrix.
Insuline like growth factor – I / II IGF – I / II	Osteoblasten- und Chondrozytenproliferation, Knochenformation, Kollagensynthese- und abbau, Synthese extrazellulärer Matrix
Platelet derived growth factor PDGF – AA, BB, AB	Osteoblasten-, Fibroblasen-, Mesenchymzellenproliferation, Synthese extrazellulärer Matrix, intramembranöse Ossifikation, Chemotaxis
Acidic / basic Fibroblast growth factor a, b FGF	Chondrozyten-, Osteoblasten-, Mesenchymzellenproliferation, Chondrozytenreifung, enchondrale Ossifikation, Kollagensynthese
Bone morphogenetic protein BMP – 2,3,4,6,7	Differenzierung von Mesenchym-, Osteoprogenitorzellen zur Osteoblasten und Chondrozyten, Aktivierung kortikaler Osteoblasten, Synthese extrazellulärer Matrix

#### 1.3.4. Einsatz in der Medizin

Das Wachstumshormon wird schon seit mehreren Jahren in der Medizin therapeutisch eingesetzt, vor allem bei Kindern mit Wachstumshormonmangel, Turnersyndrom oder auch chronischem Nierenversagen <sup>(63,64)</sup>.

Mittlerweile wird Wachstumshormon auch bei Erwachsenen mit einem Hormondefizit, wie z. B. nach einer Hypophysektomie oder Traumatisierung der Hypophyse appliziert. Der anabole Effekt vom Wachstumshormon kann auch bei kachektischen Zuständen, wie z. B. bei Krebspatienten oder auch infolge einer schweren Brandverletzung genutzt werden <sup>(39,81)</sup>.

Ferner scheint die Applikation von Wachstumshormon einen positiven Einfluss bei Frauen mit Subfertilität zu haben, die sich eine Gonadotropin-Therapie unterziehen. Hierbei waren die erforderlichen Gonadotropingaben geringer <sup>(67)</sup>.

#### Wie kann jedoch das Wachstumshormon die Frakturheilung beeinflussen?

Der positive Effekt vom Wachstumshormon auf die Frakturheilung in vivo konnte erstmalig von Koskinen et al. (1959) demonstriert werden. Bei 15 weiblichen Ratten wurde i. m. Wachstumshormon verabreicht, was zu einer histologisch nachweisbaren Beschleunigung der Frakturheilung führte <sup>(84)</sup>. Seitdem wurde die positive Rolle des Wachstumshormons auf

die Frakturheilung durch die Ergebnisse zahlreicher *in vivo* Studien unterstützt (7, 8, 9, 10, 11, 12, 58, 82, 109, 145, 160).

Versuche, den Effekt des Wachstumshormons auf die Frakturheilung am Menschen aufzuklären, sind in der Literatur seit Anfang der 70er Jahre bekannt. Misol et al. verglichen 1971 den Serumspiegel von Wachstumshormon gesunder Probanden vs. Patienten mit verzögerter Frakturheilung. Es wurde nachgewiesen, dass der Wachstumshormon-Serumspiegel bei den Patienten mit verzögerter Frakturheilung niedriger als bei den gesunden Probanden war <sup>(106)</sup>.

Raschke et al. haben 2007 die Wirkung des Wachstumshormons in einer randomisierten kontrollierten Studie untersucht. Hierbei wurden 368 Patienten mit Tibiafraktur, welche sich einer intramedullären Nagelosteosynthese unterzogen haben, in vier Gruppen unterteilt. Den ersten drei Gruppen wurde eine unterschiedliche Dosis von Wachstumshormon verabreicht (0.01, 0.03 und 0.06 mg/kg Körpergewicht/Tag) und der vierten Placebo. Der Hauptendpunkt der Studie war die radiologisch nachweisbare Konsolidierung der Fraktur, welche in der Gruppe der höchsten GH Dosis (0.06 mg/kg/d) um 26% früher erreicht wurde. Dieser positive Effekt bezog sich jedoch lediglich auf die geschlossenen Frakturen, was, nach Auffassung der Autoren, eventuell auf die längere Heilungsperiode der offenen Frakturen zurückzuführen ist. Lebensbedrohliche Nebenwirkung wurden bei der Studie nicht angegeben <sup>(129)</sup>.

#### **1.4. Fragestellung der vorliegenden Arbeit**

Wie erreicht das Wachstumshormon seine positive Wirkung auf die Frakturheilung auf molekularem Niveau?

Der Effekt des Wachstumshormons auf die *in vitro* Osteogenese wurde bereits Ende der 80er Jahre dargestellt. So wurde gezeigt, dass das Wachstumshormon *in vitro* zur Proliferation der Osteoblasten und einer Steigerung der Synthese von osteoblastenspezifischen extrazellulären Matrixproteinen führt <sup>(104, 120)</sup>. Ferner beschrieb Isaksson et al. einen direkten fördernden Einfluss auf das Längenwachstum, während Madsen et al. in einer weiteren *in vitro* Studie, dem Wachstumshormon eine stimulierende Wirkung auf die Chondrozytenproliferation zuschrieb <sup>(73, 99)</sup>.

Zusammenfassend wird festgestellt, dass das Wachstumshormon einen stimulierenden Einfluss auf die Proliferations- und Differenzierungsaktivität osteogener und chondrogener Zellen hat. Gleichzeitig beeinflusst es positiv die Knochenheilung *in vivo*.

Folgende Fragestellungen können formuliert werden:

- a. Kommt es während der GH stimulierten Knochenheilung zu einer Veränderung der Synthesefähigkeit osteogener bzw. chondrogener Zellen?
- b. Wird die GH - stimulierte Knochenheilung durch eine alterierte Genexpression von knochenzellspezifischen extrazellulären Matrixproteinen charakterisiert?
- c. Hat die systemische Verabreichung von GH einen Einfluss auf den physiologischen Ablauf der Knochenheilung?

### **1.5. Ziel der Arbeit**

Das Ziel der Arbeit war, die Genexpression von Extrazellulären Matrixproteinen während der frühen Knochenheilung nach systemischer Applikation von Wachstumshormon mit nicht-radioaktiver *In Situ* Hybridisierung (ISH) zu untersuchen.

Es sollte die Expression der Extrazellulären Matrixproteine Kollagen Typ I und II als Marker osteoblastärer und chondrogener Zellen, Osteocalcin als Marker osteoblastärer Zellen, Osteopontin und Osteonectin als Marker mineralisierender Zellen anhand eines Rattenosteotomiemodells analysiert werden. Dazu wurde mit Hilfe von Digoxigenin-markierten Ribonucleinsäurensonden die mRNA der o. g. Proteine dargestellt.

Dadurch sollte der direkte Einfluss von Wachstumshormon auf das Expressionsniveau der o. g. mRNA sowie den mRNA exprimierenden Zelltyp untersucht werden.

Die Darstellung des Einflusses von Wachstumshormon auf molekularem Niveau und somit die Verifizierung seiner Rolle während der frühen Frakturheilung stellen Erkenntnisse dar, welche dazu dienen sollten, sinnvolle Therapiekonzepte zur Stimulation der Frakturheilung zu entwickeln.



## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Tierversuch**

#### **2.1.1. Versuchsaufbau**

In den Versuch wurden insgesamt 36 Tiere eingeschlossen. Davon ist eine Ratte bei der Narkoseeinleitung zur Setzung der Osteotomie verstorben, zwei mussten wegen Fraktur bei der Pineinbringung und zwei wegen Implantatversagen (Pinlockerung) getötet werden. Bei einer weiteren Ratte waren die Präparatschnitte nach der *In Situ Hybridisierung* nicht auswertbar.

Die 30 Versuchstiere, welche ausgewertet werden konnten, wurden für die semiquantitative und qualitative Analyse mittels ISH in 2 Hauptgruppen von je n=15 unterteilt und erhielten eine systemische Applikation von GH bzw. einer Placebo-Substanz. Die histologischen Analysen wurden zu 3 Zeitpunkten durchgeführt. Als Zeitpunkte wurden 7, 14 und 21 Tage postoperativ festgelegt, um den sequentiellen Ablauf des Heilungsprozesses mit den charakteristischen Phänomenen erfassen zu können. Dementsprechend wurden pro Hauptgruppe drei Untergruppen von je n = 5 Ratten gebildet. Ferner wurden am ersten Tag postoperativ sowie an den Kontrolltagen 7, 14 und 21 ebenfalls postoperativ Gewichts-, Blut-, und röntgenologische Untersuchungen durchgeführt.

#### **2.1.2. Tiermodell**

Für die Studie wurden ausgewachsene, etwa 6 Monate alte, weibliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 300-350 g verwendet (Vertrieb: Charles River Deutschland GmbH). Ratten sind neben Mäusen die am häufigsten verwendeten Tiere für molekularbiologische Untersuchungen im Zusammenhang mit osteoinduktiven Faktoren, dadurch war es möglich, einerseits bereits vorliegende Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppe bei der Konzeption und Durchführung des eigenen Projekts zu berücksichtigen und andererseits die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Die Ratten wurden bei freier Futter- und Wasseraufnahme in Gruppen zu maximal 4 Tieren in großräumigen (15 x 20 x 30 cm) Käfigen gehalten. Es wurde ein künstlicher 12-Stunden Tag-Nacht-Rhythmus angeboten, die Raumtemperatur betrug 20° C, die Luftfeuchtigkeit 70%.

Die Studie wurde in der tierexperimentellen Einrichtung im Forschungshaus Charité-Campus Virchow-Klinikum, die über vollzeitbeschäftigte Tierärzte und Tierpfleger verfügt, durchgeführt und vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin

genehmigt (Tierversuchsnummer: G 231/99).

## 2.2. Operatives Vorgehen

### 2.2.1. Narkose

- 1-Chlor-2,2,2-trifluorethyldifluormethylether (Isofluran) Forene® (Abott GmbH, Wiesbaden, Deutschland)
- Ketaminhydrochlorid Ketavet® (Pharmacia & Upjohn GmbH, Wien, Österreich)
- Xylacinhydrochlorid, Xylacin 2%, Medistar® (Arzneimittelvertrieb GmbH, Holzwickende, Deutschland)
- Narkosegerät (Artec Typ Vet, Stephan GmbH, Medizintechnik Gnadenbach, Deutschland)

Zunächst wurden die Tiere durch Inhalationsnarkose (1,6 l/min O<sub>2</sub>, 0,8 l/min N<sub>2</sub>O, 5 Vol% Isofluran) sediert. Hierzu wurden die Ratten in einen mit einem Deckel verschliessbaren Behälter gesetzt, welcher mit dem o.g. Narkosegerät in Verbindung stand.

Für eine tiefe und länger anhaltende Narkose wurde dann eine intraperitoneale Injektion von 0,3 ml Ketaminhydrochlorid-Xylacinhydrochlorid-Gemisch im Verhältnis 1,5:1 (Ketaminhydrochlorid 80 mg/kg, Xylazinhydrochlorid 12 mg/kg, 2 I.E.) entsprechend dem Körpergewicht des Tieres angewandt.

### 2.2.2. Blutabnahme

- Heparinnatrium Liquemin (R) N25 000 000 (Roche, Grenzach, Whylen, Deutschland)
- Hämatokrit-Kapillaren 75mm / 60 µl
- Eppendorfreaktionsgefäße 1,5 ml
- Dexpanthenol, Panthenol-Augensalbe (Jenapharm, Bibrach / Riss, Deutschland)

Die Blutabnahmen erfolgten immer präoperativ und an den Kontrolltagen (7, 14 und 21 Tage postoperativ).

Dabei wurde beim narkotisierten Tier 1 ml Blut nach Punktion des retrobulbären Venenplexus mit einem heparinisierten Kapillarröhrchen abgenommen. Am Ende der Blutabnahme wurde das Auge, nach Blutstillung durch leichte Druckausübung am medialen Augenwinkel, mit Panthenol-Salbe zur Erleichterung und Beschleunigung der Augenheilung vollständig bedeckt.

### 2.2.3. Operationsdurchführung

- OP – Besteck:
  - Einmal-Skalpell No 15; Hautfäden 4-0. Prolene® nichtresorbierbar (Ethicon, Norderstedt, Deutschland)
  - Vier Kirschnerdrähte aus Stahl (1,25 mm Durchmesser, Synthes® USA); Fixateur Externe (28 mm Länge, Eigenanfertigung); Diamantsäge (0,3 mm Dicke, 16 mm Durchmesser, Bauhaus, Berlin Deutschland); Osteotomieschablone (Eigenanfertigung)
  - Schere; Abstandshalter; Zange; Haken; Nadelhalter; Pinzette
- Geräte:
  - Bohrmaschine (Bauhaus, Berlin Deutschland); Bohrer (1,0 mm Dicke, Bauhaus, Berlin Deutschland)
  - Kilomat-Präzisionswaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland); Elektrorasierer; Wärmematratze
- Sonstiges:
  - Thioglykolsäure, Pilca® (Enthaarungscreme) (Schwarzkopf & Henkel, Düsseldorf, Deutschland)
  - Desinfektionsmittel, Sterilium®
  - Natriumchlorid 0,9 % (B | Braun®, Melsungen, Deutschland)
  - 1 ml Einmalspritzen; Sterile Handschuhe; Sterile Tüpfel; Steriles OP – Tuch; Sprüpflester; Edding: Schwarz, rot, grün, blau zur Markierung bzw. Nummerierung der Tiere

Präoperativ wurde die Ratte durch Inhalationsnarkose sediert und durch intraperitoneale Injektionsnarkose anästhesiert (siehe Kapitel 2.2.1). Nach Gewichtsbestimmung und Nummerierung des Tieres wurde aus dem retrobulbären Venenplexus 1 ml Blut abgenommen (siehe Kapitel 2.2.2)

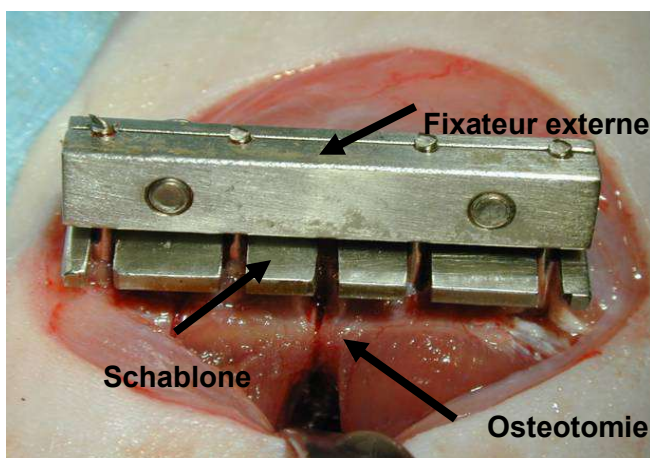
Zur Operationsvorbereitung wurde zunächst das linke Hinterbein des Versuchstieres rasiert und mit Enthaarungscreme von den restlichen Haaren befreit. Dann wurde die gesamte linke Hälfte mit Sterilium desinfiziert und das Tier auf eine sterile Unterlage in Rechtsseitenlage mit Unterstützung des linken Beines gebracht. Der Eingriff fand unter aseptischen Bedingungen statt.

Der 28 mm lange Fixateur externe wurde mit Hilfe von vier gewindetragenden

Kirschnerdrähten (1,25 mm Durchmesser) an das Femur angelegt. Nach einem Hautschnitt über die gesamte Länge im tastbaren Verlauf des Femurs erfolgte zunächst ein stumpfes Vorpräparieren, unter Schonung des Periosts und der umgebenden Weichteile, bis zur völligen Darstellung des Femurs zwischen der Beuger- und Streckerloge.

Mit einem 1,0 mm dicken Bohrer wurde dann der proximale Pinkanal monokortikal in den Trochanter minor gebohrt. In diesen wurde der erste Kirschnerdraht in 45° anterolateral, rechtwinklich zur Femurachse eingebracht. Die Bohrung des distalen Drahtkanals erfolgte nach Montage des Fixateurs am proximalen Draht, unter visueller und manueller Kontrolle der Lage und Markierung der Drahtinsertionsstelle. Nach der Bohrung des distalen Drahtkanals wurden die Fixateurschrauben gelockert und der distale Draht manuell eingebracht. Dem entsprechend erfolgten die Bohrung und das Einbringen der beiden mittleren Drähte über den proximal und distal befestigten Fixateur. Der Fixateur wurde dann in Höhe einer Fixateurbreite festgestellt und die überstehenden Drähte wurden knapp über dem Fixateur abgekniffen.

Um die Weichteile von der Osteotomiestelle fernzuhalten, wurden zwei Haken in Schaftmitte, medial und lateral des Femurs eingesetzt. Durch Herunterschieben an den vier Drähten erfolgte dann das Einsetzen der Osteotomieschablone, die der Gewährleistung einer reproduzierbaren und standardisierten Osteotomie diente (Abb. 2.1). Die Osteotomie wurde unter Kühlung mit einem 0,3 mm dicken Diamantsägeblatt (Durchmesser 16 mm) durchgeführt. Nach Kontrolle der Vollständigkeit der Osteotomie wurde das Operationsgebiet gespült und die Haut mit 4,0 mm nichtresorbierbarem Nahtmaterial in Einzelknopftechnik zugenäht. Zuletzt wurde die Hautnaht gründlich desinfiziert und mit einem Sprühpflasterverband versehen.



**Abb. 2.1:** Intraoperative Aufnahme nach Durchführung der 0,3mm breiten Osteotomie. Darstellung des montierten Fixateur externe und der Schablone.

#### 2.2.4. Röntgen

- Röntgengerät Siemens Röntgenstrahler Model No 6077379 X037E (Siemens AG, München, Deutschland)
- Röntgenkassette Cronex Cassete Quanta Detail 24 x 30 cm (Fa. Du Pont de Nemours, Bad Homburg, Deutschland)
- Entwickler

Am Ende der Operation sowie an den Kontrolltagen (7, 14 und 21 Tage postoperativ) wurden am anästhesierten Tier Röntgenkontrollen des operierten Beins in 2 Ebenen (axial und a.p.) durchgeführt. Für die laterale Aufnahme wurde das Tier mit dem Bauch auf die Röntgenplatte gelegt und das operierte, linke Bein mithilfe einer Schablone abduziert und leicht aussenrotiert. Für die p.a. Aufnahme wurde das linke Rattenbein mit Hilfe einer Schablone um 90 Grad gedreht, so dass der Calcaneus senkrecht zur Röntgenplatte stand. Die Röntgenaufnahmen erfolgten mit einer Strahlenhärte von 55 kV und einer Belichtungszeit von 2,2 mA, wobei der Abstand des Röntgengeräts von der Platte 60 cm betrug. Nach Durchführung der Röntgenaufnahme wurde die Position des Tieres auf der Röntgenplatte mit seiner Nummer markiert (Abb. 2.2).

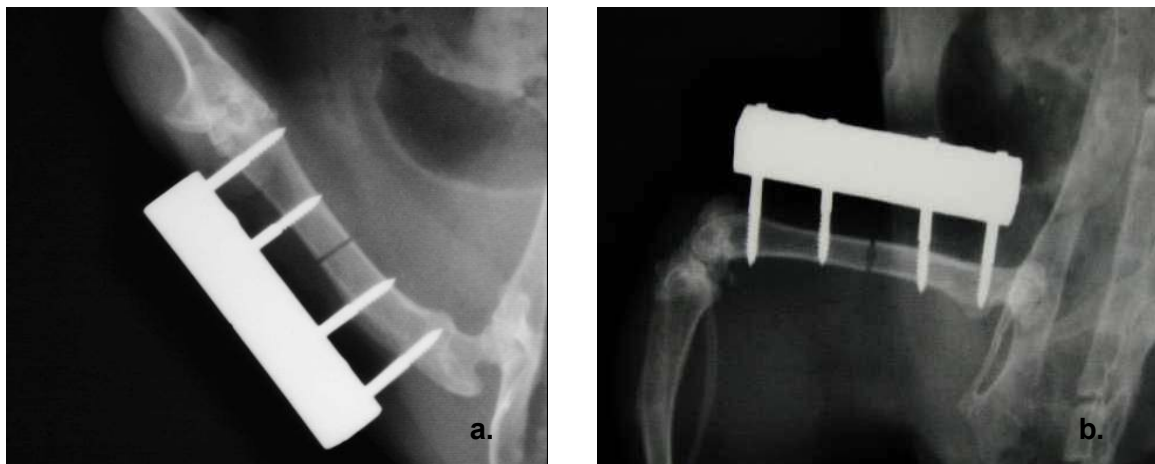


Abb. 2.2: Postoperative Nativröntgenaufnahmen: a. anterior-posteriore Ebene, b. axiale Ebene.

#### 2.2.5. Postoperative Versorgung

Nach der Operation wurde das Tier in einen Käfig verbracht, welcher mit einer Wärmelampe ausgestattet war. Wasser und Futter wurden sofort nach dem Aufstehen angeboten. Dem Tier

war es gestattet, sich nach dem Aufstehen frei zu bewegen. Schon am Ende des Operationstags wurden die am selben Tag operierten Tiere in Gruppen zu maximal 4 Tieren in 15 x 20 x 30 cm grosse Käfige verbracht und in ihre gewohnte Umgebung zurückgebracht. Es wurde kein Schmerzmittel verabreicht, da die Tiere schon kurze Zeit nach dem Aufwachen in der Lage waren, das Bein ohne sämtliche Beeinträchtigungen voll zu belasten.

### 2.3. Versuchsgruppen: rh Growth Hormone vs. Placebo

Es wurden insgesamt zwei Hauptgruppen von je n = 15 Ratten gebildet:

**Gruppe I:** Placebo (NaCl, s. c.)

**Gruppe II:** Rekombinantes Humanes Wachstumshormon (rhGH) (3 mg/ kg/ d, s. c.) (Novo Nordik, Dänemark)

Zeitpunkte der Tötungen: 7, 14 und 21 Tage post operativ

n = 5 pro Gruppe und Zeitpunkt

Insgesamt wurden 30 Ratten semiquantitativ und qualitativ mittels *In Situ Hybridisierung* untersucht.

#### 2.3.1. Herstellung der rh-GH Injektionslösung

Der Arbeitsgruppe wurde ein rekombinantes, humanes Wachstumshormon (rhGH) der Firma Novo Nordik (Dänemark) zur Verfügung gestellt. Zuerst wurde das rhGH Trockenpulver in Mengen á 100 mg aliquotiert und in sterilen Gefäßen im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt.

Ziel war die Herstellung einer Injektionslösung mit einer Konzentration von 3 mg/ml GH in Phosphatpuffer. In 33,3 ml 10mM Phosphatlösung wurden jeweils 100 mg rhGH gelöst, so dass eine Konzentration von 3mg/ml rhGH entstand. Da jedes Tier zwei mal am Tag 3 mg rhGH/kg Körpergewicht bekam, wurden der Gewichtsklasse entsprechend 1 ml Spritzen aufgezogen, bei -80°C gelagert und bei Bedarf aufgetaut. Der Kontroll-Gruppe wurde die entsprechende Menge isotone Kochsalzlösung (Friesenius, Bad Homburg) zwei Mal täglich appliziert.

#### 2.3.2. Systemische Applikation

Die Applikation des rhGH erfolgte entsprechend dem zirkadianen Rhythmus des physiologisch ausgeschütteten GH zwei mal täglich (zwischen 08:00 bis 10:00 Uhr und 16:00 bis 18:00) subkutan in den Nacken des Versuchstieres. Parallel dazu erfolgte die Applikation von äquivalenten NaCl-Mengen bei den Tieren der Placebogruppe. Die erste Injektion erfolgte am ersten postoperativen Tag.

Vor der Applikation erfolgte immer eine gründliche Desinfektion der Injektionsstelle und des Bereichs unterhalb des Fixateurs zur Vermeidung von Infektionen.

## 2.4. Gewebepreparation

### 2.4.1. Gewebeentnahme und Fixation

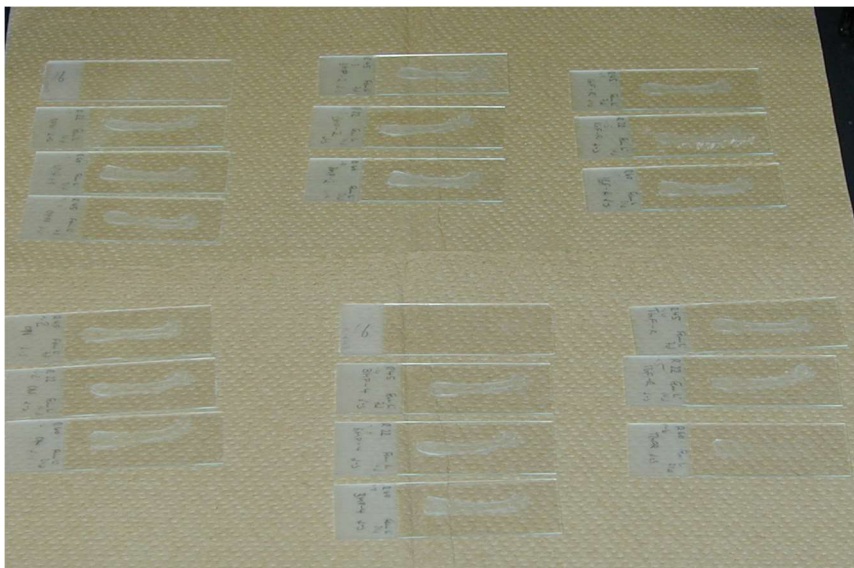
- Tötungsbesteck:
  - s. Operationsbesteck (siehe Kapitel 2.2.3.)
- Geräte:
  - Entwässerungsautomat (HiTec(R) Gewebeeinbettautomat "1500" Typ DDm-P800, Busek, Deutschland)
  - Einbettungsmaschine (Leica, Solms, Deutschland)
- Sonstiges:
  - Kaliumchlorid 14,9% (B | Braun®, Melsungen, Deutschland); 4% Paraformaldehydlösung (s. unten Herstellung der Gebrauchslösungen); 0,36 M EDTA, gepuffert (Herbeta®, Berlin, Deutschland); Paraffin (Sigma®, Deisenhofen, Deutschland)
  - Butterfly Nadel; 10 ml Einmalspritzen

Die Tiere wurden zunächst entsprechend dem o.g. Anästhesieschema narkotisiert und nach Desinfektion auf eine sterile Unterlage gebracht. Nach einem Hautschnitt entlang des Sternums wurde das Zwerchfell eröffnet und durch eine direkte intrakardiale Punktion mithilfe einer Butterfly Nadel 2 x 1,5 ml Blut entnommen. Über diese Nadel wurden dann 10 ml KCl verabreicht und nach Feststellung des Todes (Atemstillstand, Herstillstand, völlige Muskelrelaxation) wurden die Tiere mit ca. 100 ml 4% Paraformaldehydlösung perfundiert. Der linke Oberschenkelknochen wurde nach Freipräparieren und Exartikulation des Hüft- und Kniegelenks entnommen und in 4% Paraformaldehydlösung über Nacht fixiert. Anschließend wurden die linken Femora in EDTA für zwei Wochen bei Raumtemperatur dekalzifiziert und mit Hilfe eines Entwässerungsautomaten dehydriert. Im Anschluss daran wurden die Präparate achsengerecht in Paraffin eingebettet.

## 2.4.2. Schnitthanfertigung

- Objektträger (Menzel, Deutschland)
- Geräte:
  - Mikrotom (Leica RM 2035, Solms, Deutschland)

Aus den in Paraffin eingebetteten linken Femora wurden schließlich mit Hilfe eines Mikrotoms 4 µm dicke Serienschnitte angefertigt, die dann auf silanisierte Objektträger stets mit den Femurcondylen zur Beschriftungsfläche aufgezogen wurden. Die Objektträger wurden mit fortlaufenden Nummern versehen, um später die Schnittebenen der Präparate besser beurteilen zu können. Die Präparate wurden anschliessend zum Aushärten der Schnitte für einen Tag im Brutschrank bei 37°C getrocknet und den weiteren histologischen Untersuchungen zugeführt (s. Abb. 2.3).



*Abb. 2.3: Schnitthanfertigung: Die linken Rattenfemora wurden geschnitten und auf Objektträger aufgetragen. Bevor sie in der In Situ Hybridisierung Verwendung finden, werden sie ausgehärtet, indem sie für einen Tag im Brutschrank bei 37°C getrocknet werden*

## 2.5. In Situ Hybridisierung

### 2.5.1. Allgemeines

Die semiquantitative und qualitative Analyse erfolgte mittels der Technik der nicht-radioaktiven *In Situ Hybridisierung* mit Digoxigenin markierten mRNA Sonden. Somit war es möglich, nicht nur die Genexpression verschiedener mRNA Sequenzen im intakten



histologischen Gewebeschnitt zu lokalisieren, sondern auch die an der Knochenheilung beteiligten Zellen zu charakterisieren.

Zur Charakterisierung der Knochenmatrixsynthese und Phänotypisierung osteogener und chondrogener Zellen, sowie zur Beurteilung einer möglichen Veränderung ihrer Proliferation und Differenzierung während der GH-stimulierten Knochenheilung wurde die Genexpression für kollagene ( $\alpha_1$  Kollagen Typ I als Marker osteoblastärer Zellen und  $\alpha_1$  Kollagen Typ II als Marker chondrozytärer Zellen) und nicht-kollagene (Osteopontin, Osteocalcin und Osteonectin) extrazelluläre Matrixproteine analysiert und untersucht.

### 2.5.2. Herstellung der mRNA-Sonden

Zur Herstellung der mRNA Sonden lagen plasmidgebundene cDNA-Sequenzen vor, welche für  $\alpha_1$  Kollagen Typ I,  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, Osteocalcin, Osteopontin und Osteonectin kodieren. Es handelte sich um:

1. Murines  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, Länge 321 bp, kloniert in pBluescript SK (-) und
2. murines  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, Länge 405 bp, kloniert in pBluescript SK (-),
3. murines Osteopontin, Länge 1,2 Kb, kloniert in pBluescript SK (-),
4. murines Osteonectin, Länge 1,0 Kb, kloniert in pBluescript SK (-) und
5. rattenspezifisches Osteocalcin, Länge 470 bp, kloniert in pBluescript SK (-).

Die DNA-Sequenzen für  $\alpha_1$  Kollagen Typ I und II wurden uns von Thomas Aigner (Abteilung für Pathologie, Universität Erlangen) <sup>(105)</sup>. und die für Osteopontin, Osteocalcin und Osteonectin von Shintaro Nomura (Abteilung für Pathologie, Osaka University) <sup>(65, 118, 143)</sup> zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurden die entsprechenden cDNA-Sequenzen mittels PCR amplifiziert, um sie in ausreichender Menge verfügbar zu machen.

#### 2.5.2.1. PCR der cDNA-Sequenzen

- Material:
  - Plasmidgebundene cDNA-Sequenzen für  $\alpha_1$  Kollagen Typ I und II, Osteopontin, Osteonectin und Osteocalcin,
  - Nucleotid Mix: Desoxynucleosidtriphosphate Set, PCR Grade (Roche®, Deutschland)
  - Thermo Pol Buffer (New England Biolabs®, USA)
  - Spezifische Primer (s. Tab. 2.1) (Metabion, Deutschland)
  - Vent DNA-Polymerase (2000 U/ml) (New England Biolabs®, USA)

- Phenol-Chloroform (Gibco BRL, England),
  - Lithium-Chlorid (Merck, Deutschland)
  - H<sub>2</sub>O dest. (Milipore, USA), verschieden prozentig EtOH (Merck, Deutschland), Agarose (Gibco BRL, England)
  - DNA-Längenstandard (0,07 – 12,2 kb, Boehringer Ingelheim, Deutschland)
  - PCR – Tubes 0,5 ml (Eppendorf, Deutschland)
- Gerät:
    - PCR Gerät (PTC-200, Peltier Thermal Cycler, MJ Research, USA)

- Durchführung:

Hierfür wurde ein Reaktionsansatz, bestehend aus dem jeweiligen Plasmid (2µl), dem Nucleotid Mix (10µl), der Vent-DNA-Polymerase (2µl, 1:10 verdünnt in Aqua dest. = 0,2 U/µl) und den vektorspezifischen Primern (je 2 µl) in PCR-Tubes vorbereitet und mit Aqua dest. auf 50 µl aufgefüllt.

Die Tubes wurden ins PCR-Gerät gestellt und das für die jeweilige Probe spezielle PCR-Programm gestartet. Im ersten Zyklus wurde eine längere DNA-Denaturierung (*Initialisierung*: 10 Min. bei 95°C) zur Lösung der DNA-Basenpaarungen sowohl der Matrizen als auch der Primer und anschließend 30 PCR-Zyklen durchgeführt, welche jeweils mit einer kürzeren DNA-Denaturierungsphase begannen (30 Sek. bei 95°C).

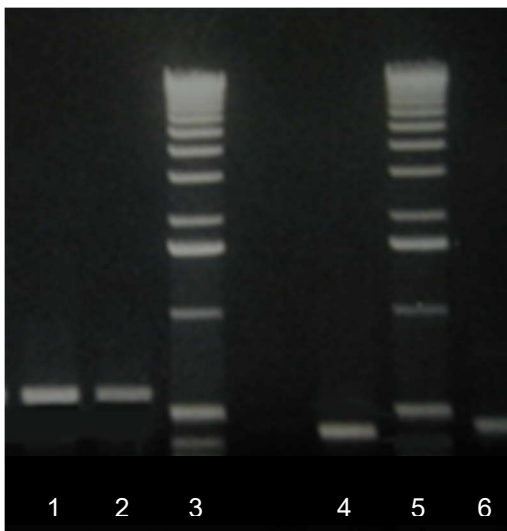
Nach der Denaturierung folgte die Hybridisierung von Primern mit der Matrizen cDNA (*primerannealing*). Um die korrekte Hybridisierung der verschiedenen, vektorspezifischen Primer an den Flanken der zu replizierenden und in das Plasmid einklonierten cDNA-Sequenz zu gewährleisten, ist die Wahl der richtigen Hybridisierungstemperatur ( $T_H$ ) wichtig. Diese hängt einerseits von der Länge der cDNA-Sequenz und andererseits von der Art der Basen ab. So kamen bei den PCRs mit  $\alpha_1$  Kollagen Typ I,  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, Osteopontin, Osteocalcin und Osteonectin unterschiedliche Primer zum Einsatz (s. Tab. 2.1).

**Tab. 2.1:** Übersicht über die verwendeten PCR-Primer:

Bezeichnung	Forward primer	Reverse Primer	Größe (bp)	Annealing temperature	Verd.
$\alpha_1$ Kollagen Typ I	Ggtgaacagggtgttcctgg (391-410)	Ttcgcaccaggttgccatc (874-893)	503	56°C	1:100
$\alpha_1$ Kollagen Typ II	Acatgtcagcctttgctggc (3521-3540)	catggctctcctcaaaccaga (3905-3924)	404	56°C	1:100
Osteopontin	Gaaactctccaagcaattc (280-299)	ggactagctgtccttgg (850-869)	589	56°C	1:50
Osteocalcin	Cagacaagtcccacacagca (4-23)	ctttatttggagctgctgt (440-459)	456	53°C	1:50
Osteonectin	ccctgtttaaaatgtttgg (1061-1080)	tgggagctgtcatgtgtgc (1566-1580)	525	53°C	1:50

Bei dem letzten Zyklusschritt kam es dann zur Bindung der Vent-DNA-Polymerase an den kurzen Doppelstrang, der durch Bindung des Primers an einen Matrizen-DNA-Einzelstrang entstanden ist. Diese amplifiziert die gewünschten cDNA Abschnitte.

Nach Beendigung der 30 Zyklen wurde die cDNA mittels Phenol-Chloroform (Verhältnis 1:1) extrahiert und über Nacht bei -20°C (4 M LiCl, 100% EtOH) ausgefällt. Der Überstand wurde dann durch Zentrifugation mit 70% EtOH aufgereinigt. Die amplifizierte cDNA wurde nach Lufttrocknung in 25  $\mu$ l aqua bidest. aufgenommen. Schließlich wurden damit Agarosegel-Elektrophoresen zur Qualitätskontrolle durchgeführt (s. Abb. 2.4)



**Abb. 2.4.:** Standard 1% Agarosegel mit PCR- und Transkriptionsprodukten (T). Die Slots befinden sich im oberen Bildrand, d.h. Laufrichtung der cDNAs und RNAs von oben nach unten. 1.  $\alpha_1$  Kollagen Typ II cDNA (PCR), 2.  $\alpha_1$  Kollagen Typ II a-s RNA (T), 3. DNA-Längenstandard, 4.  $\alpha_1$  Kollagen Typ I cDNA (PCR), 5. DNA-Längenstandard, 6.  $\alpha_1$  Kollagen Typ I a-s RNA (T)

### 2.5.2.2. *In Vitro* Transkription und Herstellung der Dig - mRNA

Die PCR-cDNA-Produkte wurden in mRNA transkribiert und gleichzeitig mit Digoxigenin markiert. So entstanden die Digoxigenin-markierten mRNA-Sonden, welche für die *In Situ Hybridisierung* eingesetzt wurden.

- Material:

- PCR-cDNA-Produkte von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I,  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, Osteonectin, Osteocalcin und Osteopontin
- Dig-UTP-RNA Labeling Mix (10fach konzentriert, Roche®, Deutschland)
- T3 und 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), autokl. Aqua dest (QPAK – Millipore, USA), DEPC (Diethyl-Pyrocbonat, Sigma, Deutschland)
- Wasserbad, Haake P2I (Hanke, Deutschland)

- Durchführung:

Zur *in Vitro* Transkription der PCR-cDNA-Produkte wurden die vier Nukleotide dATP, dCTP, dGTP und dUTP (teilweise als Digoxigenin-11-UTP) und die RNA-Polymerasen T3 und T7 eingesetzt. Die Polymerasen wiesen komplementäre Leserichtungen auf und wurden so eingesetzt, dass pro Ansatz entweder eine "anti-sense" (a-s) oder eine "sense"-RNA-Sonde entstand.

Die "anti-sense" Sonde ist immer der nachzuweisenden mRNA komplementär und dient in der Hybridisierungsreaktion als Nachweissonde. Die "sense" Sonde ist der mRNA homolog, kann somit mit ihr nicht hybridisieren und wird deshalb bei der *In Situ Hybridisierung* als Negativkontrolle eingesetzt.

Die T3 RNA-Polymerase wurde bei der Transkription eingesetzt, um für  $\alpha_1$  Kollagen Typ I und II sowie für Osteopontin die "anti-sense" Sonde und für Osteocalcin und Osteonectin die "sense" Sonde zu erhalten. Stattdessen entstand beim Einsatz der T7 RNA-Polymerase für Osteocalcin und Osteonectin die "anti-sense" Sonde und für  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, -II und Osteopontin die "sense" Sonde.

In autoklavierten Eppendorf-Reaktionsgefäßen wurde ein Ansatz aus 2  $\mu$ l des PCR-Produktes, 12  $\mu$ l DEPC-H<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ l Transkriptionspuffer, 2  $\mu$ l der entsprechenden RNA-Polymerase und 2  $\mu$ l Dig-UTP-Labeling-Mix vorbereitet. Die Transkription lief im Wasserbad ab (2 h bei 37°C). Die Reaktion wurde anschließend mit 0,5 M EDTA, 4 M LiCl und 100% EtOH abgestoppt und die RNA über Nacht bei -20°C ausgefällt. Die gefällte RNA wurde durch Zentrifugieren mit 70% EtOH aufgereinigt und nach Lufttrocknung in 50ml DEPC- H<sub>2</sub>O bidest.

aufgezogen. Die DEPC Behandlung wurde durchgeführt, um eventuell vorhandene RNAsen zu inaktivieren, so dass eine Beschädigung der Transkriptionsprodukte vermieden wird. Zur Qualitätskontrolle wurden Agarosegel-Elektrophoresen von den Transkriptionsprodukten durchgeführt (s. Abb. 2.4).

### 2.5.3. Herstellung der Gebrauchslösungen, Materialien und Geräte:

- 10 x PBS – Puffer (Phosphate-Buffered Saline)
  - NaCl 400 g
  - Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 89 g
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 12 g
  - KCl 10 g

---

ad 5 l H<sub>2</sub>O bidest.

  - ⇒ Mischen
  - ⇒ pH auf 7,4 einstellen
  
- Tris-HCl
  - 121,1 g Tris-Puffer (DAKO, Hamburg, Deutschland)  
in 800 ml H<sub>2</sub>O lösen
  - 70 ml 37% HCl

---

ad 1 l H<sub>2</sub>O bidest

  - ⇒ Mischen
  - ⇒ pH auf 7,4 einstellen
  
- 4% Paraformaldehydlösung (PFA)
  - 8 g Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland)
  - 150 ml H<sub>2</sub>O dest.

---

  - ⇒ Mischen
  - ⇒ Unter Abzug auf 60°C erhitzen
  - ⇒ Filtrieren  
  - 20 ml 10x PBS dazugeben

---

ad 200 ml H<sub>2</sub>O bidest

- ⇒ Mischen
- ⇒ pH auf 7,4 einstellen
- ⇒ auf 4 C abkühlen lassen

- TE - Puffer

- 2 ml 1 M Tris - HCl (pH = 7,4)
- 0,4 ml 0,5 M EDTA (pH = 8) (Herbeta, Berlin, Deutschland)

---

ad 200 ml H<sub>2</sub>O

- ⇒ Mischen

- TEA - Puffer

- 100 ml 1M TEA (Triethanolamin)-Lösung (Merck-Deutschland)

---

⇒ ad 1 l H<sub>2</sub>O bidest

- ⇒ pH auf 8 einstellen

- 20 x SSC (Natriumchlorid – Natriumcitrate)

- NaCl 525,9 g
- NaCitrat 441,0 g

---

ad 3 l H<sub>2</sub>O bidest

- Prähybridmix

- 1 ml 20 x SSC
- 5 ml 100% deion. Formamin
- 4 ml H<sub>2</sub>O bidest.

---

⇒ 10 ml Lösung

- Denhard`s (50x)

- 0,5 g Ficoll 400
  - 0,5 g Polyvinylpyrolidon (MW = 40.000 kD)
  - 0,5 g BSA
-

- ⇒ in 50 ml DEPC H<sub>2</sub>O sterilfiltrieren
- ⇒ à 10 ml aliquotieren
- ⇒ einfrieren

- Grundmix (10 x)

- 2 ml 1M Tris – HCl (pH = 7,4) (Sigma, Deutschland)
- 200 µl 0,5M EDTA (pH = 8) (Gibco, England)
- 2 ml 50x Denhardt`s (Sigma, Deutschland)
- 2 ml tRNA 25 mg/ml
- 1 ml Hering Sperm DNA 10 mg/ml (Roche, Deutschland)
- 2,8 ml DEPC H<sub>2</sub>O

- 
- ⇒ à 1 ml aliquotieren

- 2M DDT (Dithiothreitol)

- 3,09 g DDT (Sigma, Deutschland)
- 33,3 µl 3M Na-Acetat (pH = 5,2) (Sigma, Deutschland)

---

ad 10 ml H<sub>2</sub>O bidest.

- ⇒ sterilfiltrieren

- Hybridmix

- Berechnung der erforderlichen Sondenlösung:

Das Gesamtvolumen der Sondenlösung wurde nach dem Protokoll von Prof. Vogel (Institut für Pathologie, Campus Virchow Klinikum, Berlin) berechnet:

Zahl der zu untersuchenden Schnitte pro Sonde: (A)

Erforderliches Volumen pro Schnitt: (B)/µl

Gesamtvolumen (C) : (A) x (B + 5) = (C)

- 50% deionisiertes Formamid (Sigma, Deutschland)
- 1 M Tris HCL, pH = 7,5 (Sigma, Deutschland)
- 0,5 M EDTA, pH = 8 (Gibco, England)
- 50x Denhardt`s 1 mg/ml (Sigma, Deutschland)
- Hering Sperm DNA (10 mg/ml) (Roche, Deutschland)
- 5 M NaCl
- 2 M DTT

- 50% iges Dextransulfat (Sigma, Deutschland)
- 4 ng RNA-Probe/ $\mu$ l Hybridmix (= Sonde)
  
- ⇒ 3 Minuten auf 100°C erhitzt (Linearisierung der RNA)
- ⇒ 5 Minuten auf Eis (Stabilisierung der RNA in linearisierter Form)
  
- Puffer 1
  - 20 ml 1M Tris – HCl (pH = 7,4)
  - 5 ml 5M NaCl

---

ad 200 ml H<sub>2</sub>O bidest.

  - ⇒ Mischen
  
- Modifiziertes Blocking Medium (Puffer 2)
  - 2 g 1% Blocking Reagenz (Boehringer Ingelheim)
  - 200 ml Puffer 1

---

  - ⇒ im Wasserbad auf 50° C erwärmen
  - ⇒ vortexen
  - ⇒ abkühlen lassen
  - 1 g 0,5% BSA dazugeben

---

  - ⇒ Mischen
  
- Puffer 3
  - 25 ml 1M Tris - HCl
  - 5 ml 5M NaCl (Merck, Deutschland)
  - 12,5 ml 1M MgCl<sub>2</sub> (Merck, Deutschland)

---

ad 250 ml H<sub>2</sub>O bidest

  - ⇒ Mischen
  
- Entwicklungspuffer
  - 10 ml Puffer 3
  - 35  $\mu$ l NBT (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
  - 2,5 mg Levamisol (Sigma, Deutschland)



- 35 µl X-Phosphat (Boehringer Mannheim, Deutschland)

- 
- ⇒ Mischen
  - ⇒ Falcon mit Alufolie umgeben (Lichtschutz)

- Puffer 4

- 20 ml 1M Tris – HCl (pH = 7,4)
- 0,4 ml 0,5M EDTA

---

ad 200 ml H<sub>2</sub>O bidest

- ⇒ Mischen

- Sonstige Materialien:

- Anti – Digoxigenin – AP, Fab Fragmente (Roche®, Deutschland)
- Proteinase K (Merck, Deutschland)
- Rnase T<sub>1</sub> ( 2µl / 100 ml = 2 U/ml) (Boehringer Ingelheim, Deutschland)
- autokl. Aqua bidest (QPAK, Millipore, USA)
- Verdünnungsreihe Xylol (Merck, Deutschland) – EtOH (Merck, Deutschland):
  - 100% Xylol
  - 100% unvergällter Ethanol
  - 96% unvergällter Ethanol
  - 70% unvergällter Ethanol
- Triton X-100 (Sigma, Deutschland)
- Erlenmeyerkolben, 1L, 2L, 5L
- Glassgefäße
- Objektträger-Schiffchen
- Eppendorf-Pipetten, Pipettenspitzen, Eppendorf – Reaktionsgefäße (1,5 ml), Falcon Röhrrchen, 10 ml
- Feuchte Kammer
- Parafilm M (American National Can, Chicago, USA)
- Sterile Filter, Alufolie, Deckgläser, 24 x 60 (Menzel, Deutschland)

- Geräte:

- pH – Meter pH 320 (WTW, Weilheim, Deutschland)
- Geeichte Präzisionswaage (Sartorius, Göttingen, Deutschland)

- Rüttler (Karl-Knecht GmbH, Sondheim, Deutschland)
- Mikroskop (Leica DMRB, Deutschland)
- Abzug, Trockenschrank, Kühltank

#### 2.5.4. Durchführung der *In Situ* Hybridisierung

##### 1. Tag: Hybridisierung

- 1) Schnitte entparaffinieren:
  - ⇒ Schnitte für 30 min. Trocken in einer Küvette im Inkubationsofen bei 55° C erwärmen, dann:
    - a. 2 x 10 min. 100% Xylol
- 2) Schnitte rehydrieren:
  - a. 2 x 5 min. 100% unvergällter Ethanol
  - b. 5 min. 96% unvergällter Ethanol
  - c. 5 min. 70% unvergällter Ethanol
  - ⇒ Waschschrift: 2 x 5 min. H<sub>2</sub>O dest.
- 3) Deproteinieren (zur Inaktivierung endogener Enzyme, z. B. der Alkalischen Phosphatase):
  - a. 20 min. 0,2 M HCl
  - ⇒ Waschschrift: 2 x 5 min. 1 x PBS
- 4) Permeabilisieren (Erhöhung der Permeabilität des Gewebes für die mRNA Sonde):
  - a. 15 min. 0,3% Triton X-100 in 1 x PBS
  - ⇒ Waschschrift: 3 x 5 min. 1 x PBS
- 5) Deproteinieren:
  - a. 30 min. Proteinase K bei 37° C in 1x TE
- 6) Stopp der Wirkung der Proteinase K:
  - a. 1 x 5 min. 0,2 % Glycin
  - ⇒ Waschschrift: 2 x 5 min. 1 x PBS
- 7) Nachfixieren (zur Aufrechterhaltung der Gewebemorphologie):
  - a. 15 min. frisches PFA bei 4 C
  - ⇒ Waschschrift: 3 x 5 min. 1 x PBS
- 8) Acetylieren (zur Vermeidung unspezifischer Bindungsreaktionen der RNA-Sonde):
  - a. 2 x 5 min. 0,1 M TEA mit 750 µl Essigsäureanhydrid in 200 ml Lösung
  - ⇒ Waschschrift: 2 x 5 min. 2 x SSC
- 9) Prähybridisieren (zur Vermeidung unspezifischer Bindungsreaktion der RNA-Sonde) :
  - ⇒ Prähybridmix auf die Schnitte auftragen,

- ⇒ Schnitte in die feuchte Kammer legen,
- ⇒ 30 min. Inkubation im Trockenschrank bei 50°C.

10) Hybridisieren:

- ⇒ Schnitte abtropfen lassen,
- ⇒ 150 µl Hybridmix / Schnitt auftragen,
- ⇒ Eindeckeln mit Silicon-Deckgläschen.
- ⇒ In feuchter Kammer für 16 h bei 50°C in den Trockenschrank stellen.

**2. Tag: Stringenzerhöhung / Detektion**

1) Waschen (Zur Entfernung der nicht oder unspezifisch gebundenen Sonde):

- ⇒ Küvetten und Lösungen zunächst auf 50°C im Wasserbad aufwärmen, erst dann Schnitte aus dem Trockenschrank entfernen.
- a. Schnitte kurz in 2 x SSC bei 50°C abwaschen zum Abdeckeln, dann:
- b. 30 min. 2 x SSC bei 50°C
- c. 30 min. 1 x SSC bei 50°C
- d. 30 min. 1 x SSC / 50% Formamid bei 50°C
- e. 30 min. 0,5 x SSC / 50% Formamid bei 50°C
- f. 30 min. 0,1 x SSC / 50% Formamid bei 50°C

2) RNase Behandlung (zum Abbau unvollständig entfernter oder nur teilweise hybridisierter, ssRNA):

- a. 15 min. 2 U/ml Rnase T<sub>1</sub> in 2 x SSC, 1 mM EDTA, pH = 8

3) Waschen:

- a. 30 min. 0,1 x SSC bei 47°C
- b. 10 min. 2 x SSC bei Raumtemperatur
- c. 5 min. Puffer 1 bei Raumtemperatur

4) Blocken (zur Vermeidung unspezifischer Bildungsreaktionen des Digoxigenin-Antikörpers):

- ⇒ Schnitte kurz abtropfen lassen,
- ⇒ Modifiziertes Blocking Medium auftragen,
- ⇒ in eine feuchte Kammer legen,
- ⇒ 1 h bei -20°C inkubieren lassen.

5) Dig – Detektion:

- ⇒  $\alpha$ -Dig-AP, Fab Fragmente (Antikörper gegen das bei der in Vitro Transkription in die RNA-Sonde eingebaute Digoxigenin) in einer 1:1000 Verdünnung im Modifizierten Blocking Medium lösen (z. B. 1  $\mu$ l  $\alpha$ -Dig-AP, Fab Fragmente in 999  $\mu$ l Modifiziertem Blocking Medium),
- ⇒ 150  $\mu$ l von der Lösung pro Schnitt auftragen
- ⇒ bei 4°C über Nacht inkubieren lassen.

### 3. Tag      **Entwicklung**

1) Spülen:

- a. 2 x 15 min. im Puffer 1 bei Raumtemperatur
- b. 2 x 15 min. im Puffer 3 bei Raumtemperatur

2) Entwicklung:

- ⇒ 150  $\mu$ l Entwicklungspuffer pro Schnitt auftragen,
- ⇒ Bei Raumtemperatur stehen lassen und unter dem Lichtmikroskop beobachten bis die blau-violette Farbreaktion im Zellzytoplasma eintritt.

3) Spülen (Zum Stoppen der Entwicklungsreaktion):

- a. 2 x 10 min. im Puffer 4 bei Raumtemperatur
- b. 2 x 10 min in 1 x PBS bei Raumtemperatur.

4) Gegenfärbung:

- ⇒ Kerngegenfärbung mit Methyl-Grün (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- ⇒ Eindeckeln mit Glyceringelantine unter Abzug.

Zur Verifizierung der Spezifität der Hybridisierung und des detektierten Signals wurden auch Kontrollversuche mit der "sense" Sonde durchgeführt, welche negativ blieben. So konnte unspezifisches Signal ausgeschlossen werden.

Das durchgeführte Protokoll der *In Situ Hybridisierung* basiert auf Studien unserer Kooperationspartner <sup>(65,118,43)</sup>, modifiziert durch die Ergebnisse unserer eigenen Vorversuche.

## 2.6      **Auswertung**

### 2.6.1      **Geräte**

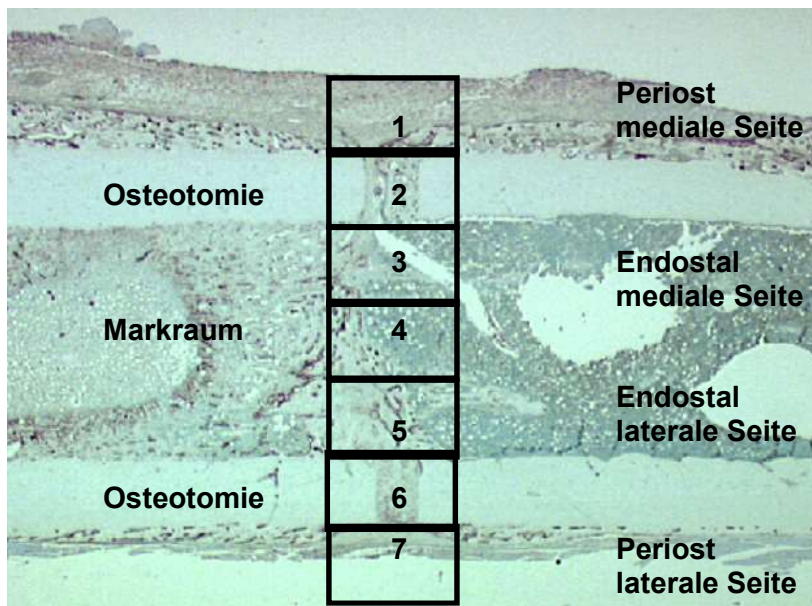
- Mikroskop (Leica DMRB, Deutschland)
- Kamera (Sony 3CCD Color Video Camera MC-3254)

### 2.6.2. Software

- Bildanalyse-Software (Zeiss KS 400, Kontron Elektronik GmbH, Eching, Deutschland).

### 2.6.3. Definition der *Regions of Interest*

Zur Beurteilung und Lokalisierung der markierten Zellen im Bereich des Kallus wurde jedes Präparat, mithilfe eines Lichtmikroskops (Leica DMRB, Vergrößerungsokular 10x / Objektiv 20x = 200fache Vergrößerung), welches über eine Kamera an einem Computer angeschlossen war, in 7 Messfelder (Regions of Interest = ROI) unterteilt (Abb. 2.5). Dadurch waren die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen und im Verlauf besser erfassbar und analysierbar. Eine Region of Interest entsprach der Bildfläche des Computers bei 200facher Vergrößerung (Abb. 2.6):



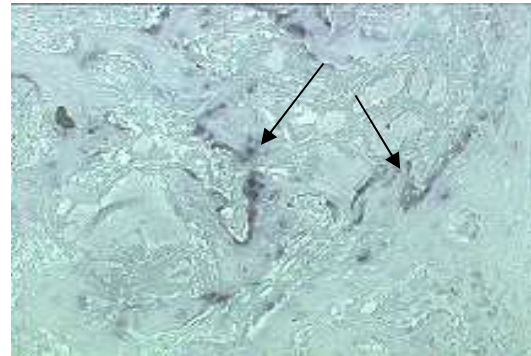
**Abb. 2.5:** Definition der ROI am Beispiel einer  $\alpha_1$  Kollagen Typ I In Situ Hybridisierung (16x Vergrößerung): Der auszuwertende Kallusbereich wurde in 7 Regions unterteilt.

### 2.6.4 Deskriptive Analyse

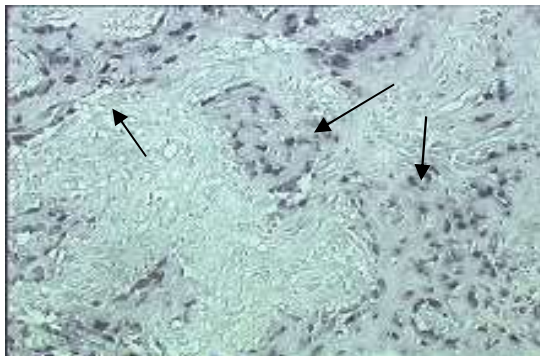
Die Genexpression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, Osteopontin, Osteocalcin und Osteonectin wurde deskriptiv analysiert. Anhand eines vierstufigen Scores (Guizzardi et al. 2000, Wildemann et al. 2001) wurden die histologischen Schnitte durch zwei unabhängige Untersucher wie folgt klassifiziert:



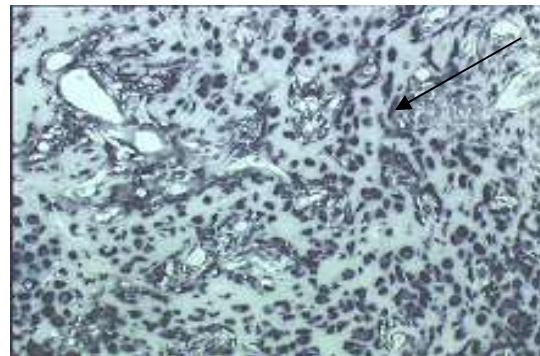
200x Vergrößerung      Ø Reaktion: 0



200x Vergrößerung      Minimal: 1  
(weniger als 1/3 der gesamten Zellzahl)



200x Vergrößerung      Mittel: 2  
(weniger als 2/3 der gesamten Zellzahl)



200x Vergrößerung      Maximal: 3  
(mehr als 2/3 der gesamten Zellzahl)

**Abb. 2.6:** Definition der ROI am Beispiel einer  $\alpha_1$  Kollagen Typ I In Situ Hybridisierung: Jede der insg. 7 Regionen entsprach einer Bildfläche des Computers in 200 x Vergrößerung. Anhand eines vierstufigen Scores wurde die m-RNA Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, deskriptiv erfasst. Je nach positiver Reaktion wurde die m-RNA Expression des entsprechenden Proteins mit 0-3 ausgewertet (Pfeil: signalpositive osteogene Zellen).

Bei der Auswertung der Präparate nach Durchführung der *In Situ Hybridisierung* war, aufgrund der teils starken Hintergrundfärbung und der Clusterung insbesondere der osteoblastären Zellen, eine genaue Diskriminierung erheblich erschwert. Trotz mehrfacher Versuche war uns die Entwicklung eines Makros, welches die genaue Zahl dieser Zellen ohne große Abweichungen hätte bestimmen können, nicht gelungen.

Aufgrund dessen wurde für die Auswertung der vor allem von osteoblastären Zellen exprimierten mRNA Sequenzen eine semiquantitative, deskriptive Analyse anhand des oben dargestellten 4-stufigen Scores angewandt.

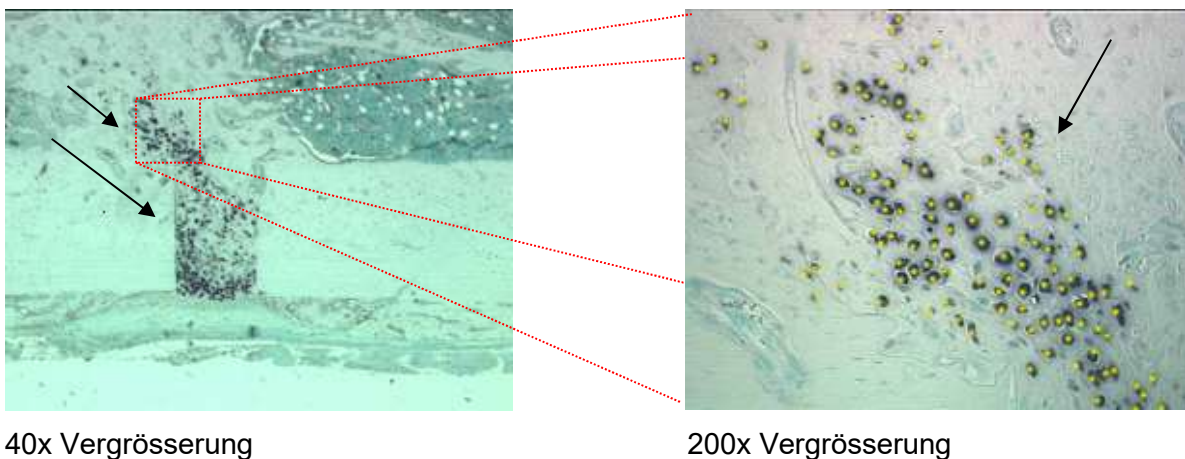
### 2.6.5. Bildanalyse

Die Analyse der Genexpression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II erfolgte quantitativ, mithilfe eines Lichtmikroskops (Leica DMRB), welches über eine Kamera an einem Computer angeschlossen war. Auf dem Computer war eine spezielle Bildanalyse-Software, sowie ein

eigens für diese Fragestellung entwickeltes Makro installiert, was die Bestimmung der absoluten Zahl der positiven Zellen pro *Region of Interest* ermöglichte.

$\alpha_1$  Kollagen Typ II wird fast ausschließlich von chondrogenen (Chondroblasten und Chondrozyten) Zellen exprimiert.

Die Chondroblasten sind polygonale Zellen mit scharfer Grenze und einem rundlich bis ovalen Kern mit vereinzelter Einbuchtung oder Lobulierung. Während der weiteren Differenzierung werden die Chondroblasten in Chondrozyten umgewandelt. Auch die Chondrozyten besitzen einen ovalen bis runden Kern, den ein breites organellenreiches Zytoplasma umgibt. Durch das helle Zytoplasma, den deutlichen, rundlichen Kern und die scharfe Zellgrenze können die o. g. Zellen in entsprechender Vergrößerung im Mikroskop zweifelsfrei identifiziert, abgetrennt und demzufolge auch gezählt werden. Dies trifft bei den osteogenen Zellen nicht zu. Aufgrund dessen war die genaue Quantifizierung der  $\alpha_1$  Kollagen Typ II - mRNA exprimierten Zellen durch deren direkte Abzählung mit dem dafür entwickelten software Programm möglich (Abb. 2.7).



**Abb. 2.7:** Quantifizierung der  $\alpha_1$  Kollagen Typ II - mRNA exprimierten Zellen: In 200x Vergrößerung wurden durch eine speziell für diese Fragestellung entwickelte Software die positiven Zellen direkt abgezählt (Pfeil: signalpositive chondrogene Zellen).

#### 2.6.6. Statistik

Alle gewonnenen Messdaten wurden aus pragmatischen Gründen mit dem Tabellenkalkulationsprogramm MS Excel dokumentiert, archiviert und anschließend in SPSS überführt.

Es wurden keine Humandaten erhoben, so dass sich kein Konflikt mit derzeitigen Datenschutzregularien ergibt.

Alle statistischen Analysen entsprachen gängigen Verfahren zum Nachweis etwaiger Zufallsbefunde in tierexperimentellen Studien. Mittelwerte einzelner Regions of Interest (ROI) wurden in Balkendiagrammen mit probaten Fehlerindikatoren (Standardabweichung, SD) dargestellt. Gruppenvergleiche erfolgten mittels non-parametrischem Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben.

Da *a priori* keine schließend zu prüfende Hypothese aufgestellt und eine formale Fallzahlkalkulation durchgeführt wurde, sind alle *p*-Werte explorativ zu interpretieren. Aufgrund der international gängigen Grenzwerte wird hier davon ausgegangen, dass Mittelwertdifferenzen, welche in den genannten Testverfahren zu einem *p*-Wert  $<0,05$  führten, nicht mit dem Zufall vereinbar waren.

Die statistische Auswertung wurde durch das Biometrische Institut der Humboldt Universität zu Berlin unterstützt.



### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Klinische Beurteilung des Heilungsverlaufs

Der postoperative Verlauf gestaltete sich bei den meisten Tieren komplikationlos. Direkt nach dem Eingriff wurde das operierte Tier in einen Käfig, unter eine Wärmelampe verbracht und bis zum vollständigen Wiedererlangen des Bewußtseins beobachtet. Nach Abklingen der postoperativen Wundschmerzen, meistens schon am Operationstag, waren die Tiere in der Lage, die operierte Extremität voll und ohne jegliche Einschränkung zu belasten (Abb. 3.1).



*Abb. 3.1: Die Tiere zeigten bereits am Operationstag eine vollständige Belastung der frisch operierten Extremität.*

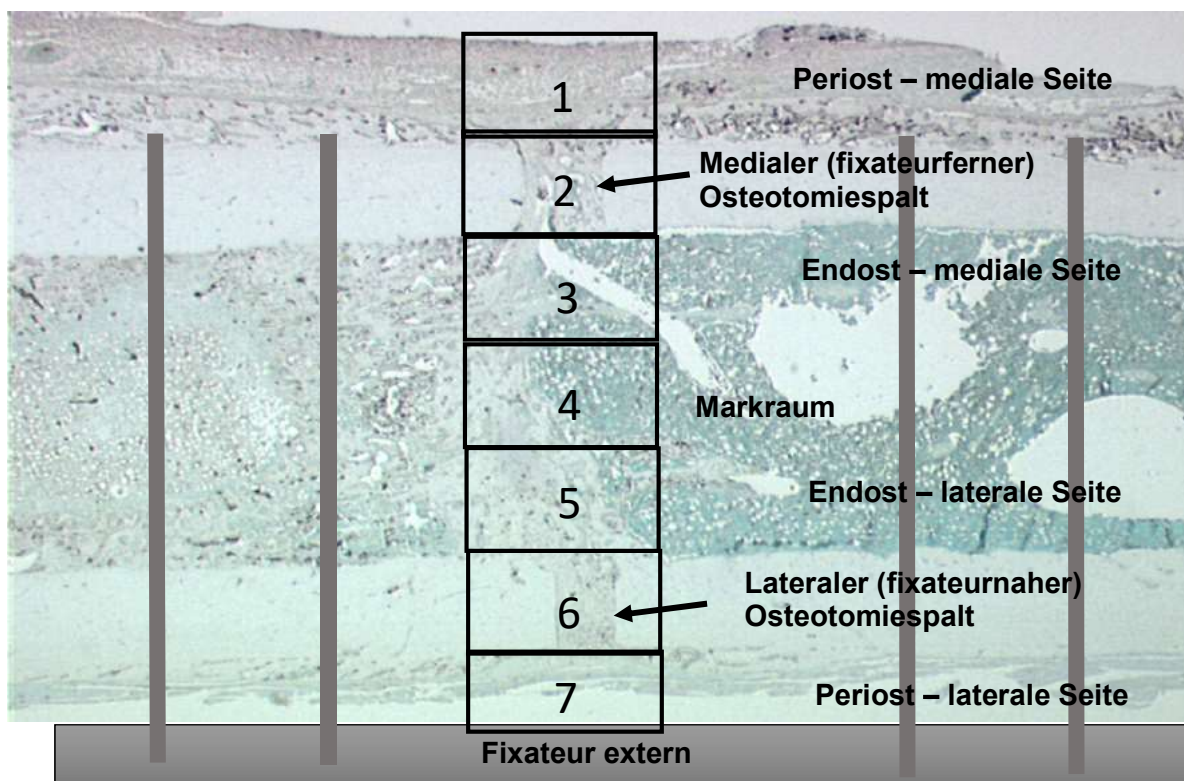
Die Futter- und Wasseraufnahme waren unbeeinträchtigt. Eine Manipulation der frischen Wunde durch das Tier selbst oder durch die anderen, im selben Käfig befindlichen Tiere wurde nicht beobachtet. Ebenfalls zeigten sich im Verlauf keine Nachblutungszeichen.

Die Wundheilung erfolgte bei allen Tieren per primam intentionem, ohne klinischen Anhalt für ein lokales oder fortgeleitetes Entzündungsgeschehen. Eine Entleerung von trübem oder eitrigem Sekret im Bereich der Pinstellen fand sich nicht. Ebenfalls zeigte sich keine Rötung oder Überwärmung der betroffenen Extremität. Die an den Standzeitpunkten durchgeführten Röntgenaufnahmen ergaben keinen Hinweis auf Osteolysen oder andere entzündliche Veränderungen.

### 3.2. Auswertung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der *In Situ Hybridisierung* mit  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-,  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-, Osteocalcin-, Osteopontin- und Osteonectin-mRNA während der Knochenheilung am 7., 14. und 21. Tag postoperationem beschrieben. Die Expression der einzelnen Extrazellulären Matrixproteine in der Placebo-Gruppe wird den jeweiligen Zeitpunkten der GH-Gruppe gegenüber gestellt.

Die Beschreibung bezieht sich auf den diaphysären Bereich des operierten Femurs in einer Sagittalschnittebene entsprechend der definierten *Regions of Interest* (RoI). Der Osteotomiebereich der fixateurnahen (lateralen) Kortikalis (lateralen Osteotomiespalt) wird von dem Osteotomiebereich der fixateurfernen (medialen) Kortikalis (medialer Osteotomiespalt) unterschieden (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2:** Die Beschreibung der Ergebnisse erfolgt anhand der einzelnen *Regions of Interest*. Der Osteotomiespalt wird in einen medialen (fixateurfernen) und einen lateralen (fixateurnahen) Bereich unterteilt.

### 3.3. Histologische Veränderungen während der Knochenheilung

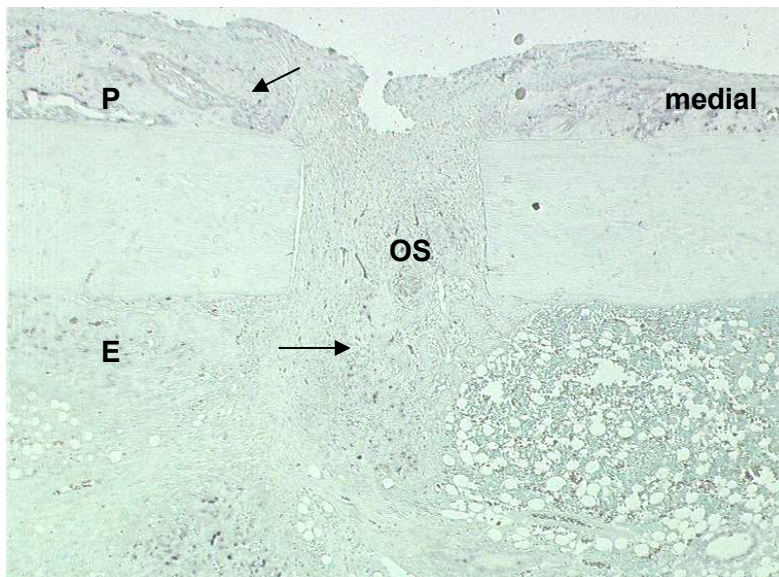
Infolge der Femurosteotomie kommt es durch die Verletzung von Knochen, Gefäßen und das begleitende Weichteiltrauma zur Ausbildung eines Hämatoms, welches sich entlang des

kortikalen Knochens und des verletzten Periosteums ausbreitet. Dies initiiert Kaskaden von zellulären Prozessen, welche unabdingbar für die Knochenheilung sind und bestehen in die chemotaktische Anlockung von mesenchymalen Stammzellen und Entzündungsmediatoren. Diese sezernieren Zytokinen und Wachstumsfaktoren, welche wiederum die Differenzierung und Proliferation der anfangs undifferenzierten mesenchymalen Stammzellen induzieren, so dass die Angiogenese und Knochenneubildung beginnen kann. Unter normalen Umständen ist diese Entzündungsphase kurz und endet vor der ersten Woche nach der Verletzung<sup>(39, 54, 107, 126)</sup>.

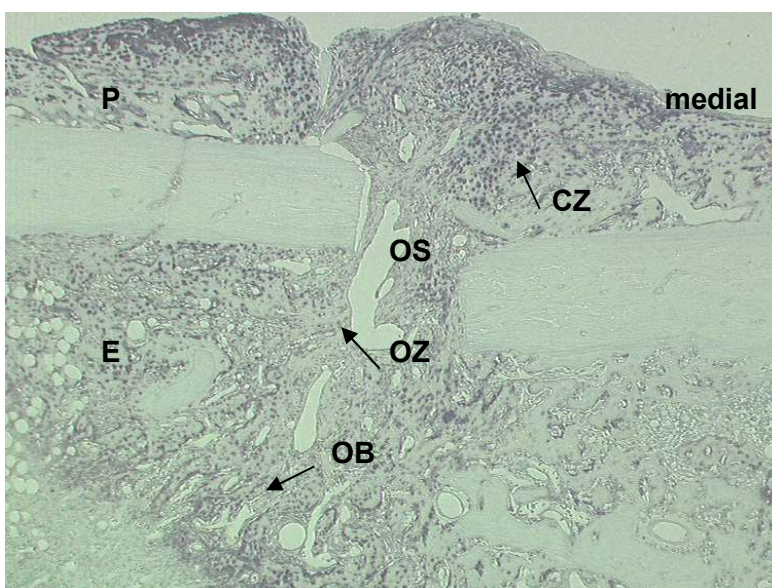
Aus dem primären Hämatom kommt es in der Folge zur Ausbildung fibrinreichen Granulationsgewebes. Innerhalb des Granulationsgewebes kommt es, durch die Differenzierung von Osteoprogenitorzellen zu Osteoblasten, subperiostal, distal und proximal der Knochenkontinuitätsunterbrechung zur Formation des "harten" Kallus. Mehrkernige Makrophagen fangen an, avitale Knochensubstanz abzubauen, während Osteoblasten am Periost und Endost mit der intramembranösen Ossifikation beginnen. Parallel dazu bildet sich zwischen der beiden Knochenenden "weicher" Kallus, wo sich die mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten differenzieren und diese dann proliferieren.

Am 7. Tag nach Operation trat in beiden Gruppen Gewebeneubildung im Osteotomiebereich auf. Um den Osteotomiespalt befand sich, im Rahmen der intramembranösen Ossifikation, neugebildeter Kallus, welcher vor allem aus Bindegewebe und mesenchymalen, insbesondere osteoblastären Zellen bestand. Letztere waren sowohl periostal, im harten Kallus als auch endostal, marginal des neugebildeten Geflechtknochens zu beobachten. In der Placebo-Gruppe zeigte sich eine geringere Neubildung am primitiven Knochen. Bindegewebiger Kallus mit zahlreichen mesenchymalen Zellen, jedoch wenige Osteoblasten dominiert in der Gruppe im Bereich zwischen den beiden Kortikalisenden. Hingegen fand sich in der GH-Gruppe eine von periostal und endostal ausgehende, zum Teil Defekt überbrückende knöcherne Verbindung, die aus unreifem Geflechtknochen mit meistens einreihig angelegten osteoblastären Zellen bestand. Im Osteotomiespalt zeigten sich vereinzelte proliferierende Chondrozyten, als Hinweis für den Eintritt in die folgende Phase der Frakturheilung, die Chondrogenese (Abb. 3.3 und 3.4).





**Abb 3.3:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, Placebo 7 Tage, 50x Vergrößerung:** Geringe Produktion von neugebildetem Geflechtknochen, v. a. periostal und endostal. Schwach angefärbte, vereinzelt Osteoblasten (Pfeil: signalpositive Osteoblasten am Geflechtknochen, OS: Osteotomiespalt, P: periostal, E: endostal, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung).



**Abb 3.4:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, GH 7 Tage, 50x Vergrößerung:** Deutliche Ausbildung von Geflechtknochen, v. a. periostal und endostal. Neben stark angefärbten osteoblastären und osteozytären Zellen finden sich auch signalgebende Chondrozyten (OB: Osteoblasten, OZ: Osteozyten, CZ: Chondrozyten, OS: Osteotomiespalt, P: periostal, E: endostal, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung).

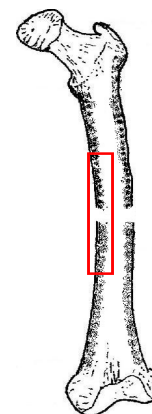
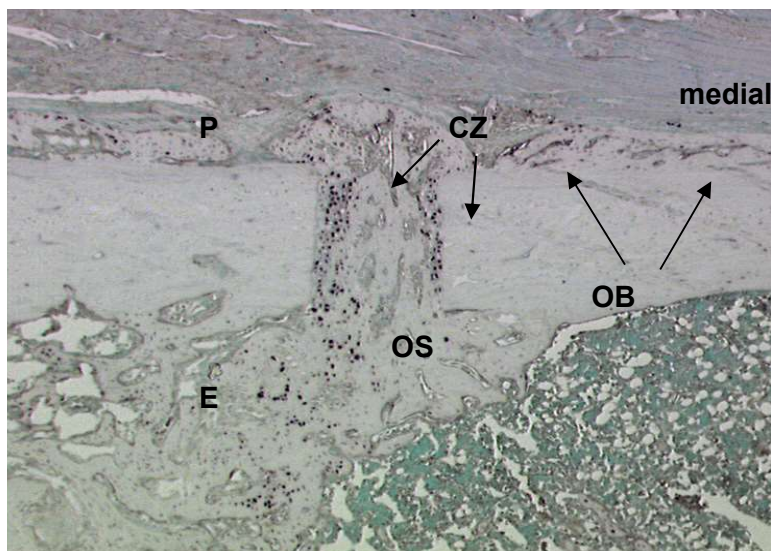
Um den 10.-14. Tag nach gesetzter Osteotomie wird bei der Ratte das Maximum der Knorpelbildung im "weichen" Kallus erreicht, es stellt sich ein "budding" von hypertrophen Chondrozyten dar. Bei genügend Stabilität der Fraktur hat beim 14. Tag die enchondrale Ossifikation begonnen. Im Bereich des "harten" Kallus hört die zelluläre Proliferation durch

die Ausbildung von Geflechtknochen langsam auf <sup>(54, 126)</sup>.

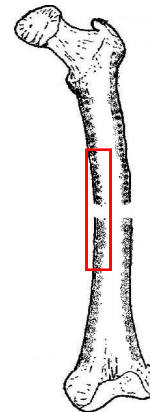
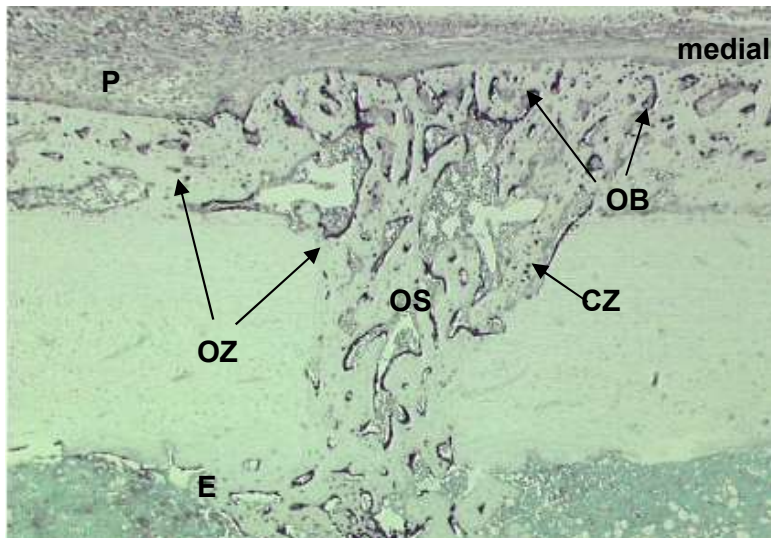
In unserer Studie war zu diesem Zeitpunkt sowohl in der Placebo als auch in der GH-Gruppe eine vermehrte Kallusbildung zu beobachten. Der Osteotomiespalt wurde in beiden Gruppen zunehmend vom Geflechtknochen überbrückt.

Neben dem neugebildeten Geflechtknochen fanden sich im Osteotomiespalt der Placebo-Gruppe noch große Anteile von Bindegewebe, welches von starker Knorpelbildung umgeben war.

Während sich die Placebo-Gruppe 14 Tage nach der Operation, in der Phase der Chondrogenese befand, gekennzeichnet durch das Auftreten von zahlreichem Knorpelgewebe, zeigte sich in der GH-Gruppe ein zunehmender Ersatz des schon 7 Tage nach der Operation nachgewiesenen Knorpelgewebes durch den neugebildeten Geflechtknochen, als Zeichen des Abschlusses der Chondrogenese und des Übertritts in die nächste Phase der Knochenheilung, die enchondrale Ossifikation. Am Geflechtknochen finden sich einreihig angelegene Osteoblasten sowie ruhende Osteozyten in Knocheninseln (Abb. 3.5 und 3.6).



**Abb. 3.5:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, Placebo 14 Tage, 50x Vergrößerung: Zahlreiche Chondrozyten im Bereich des medialen Osteotomiespalts neben dem Geflechtknochen. Die Placebo-Gruppe befindet sich in der Phase der Chondrogenese. (Pfeil: Signalreiche Chondrozyten (CZ) bzw. Osteoblasten (OB), P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung)**



**Abb. 3.6:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, GH 14 Tage, 50x Vergrößerung:** In der GH Gruppe ist die Chondrogenese 14 Tage postoperationem abgeschlossen, nahezu keine Chondrozyten sind im Osteotomiespalt nachweisbar. Geflechtknochen hat den Defektbereich fast vollständig überbrückt. (Pfeil: Signalreiche Osteozyten bzw. Osteoblasten, P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung).

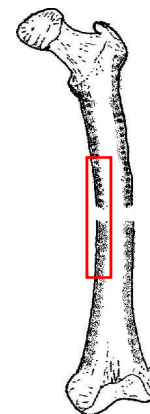
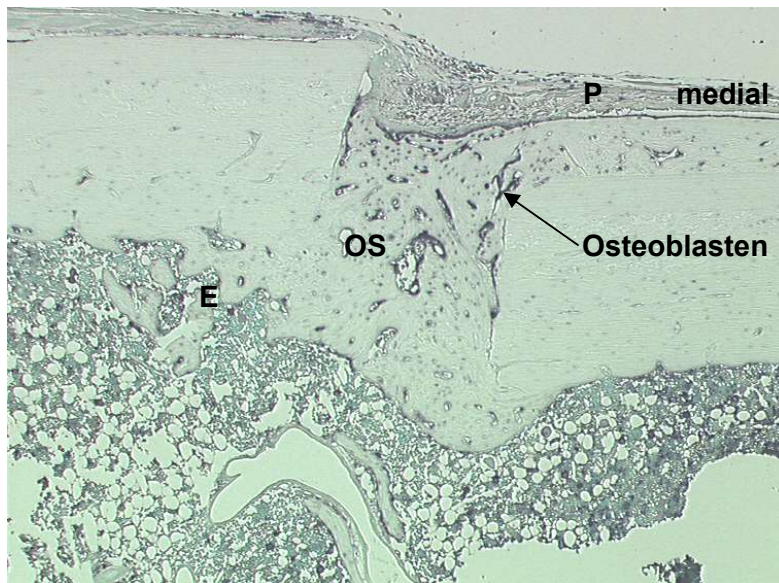
Am 21.-25. Tag der Knochenheilung ist bei der Ratte keine Zellproliferation mehr zu beobachten. Die Struktur, welche im Bereich des "harten" Kallus nun dominiert, ist die des Geflechtknochens. Im "weichen" Kallus unterziehen sich die Chondrozyten Apoptose. Es folgen das Remodelling und die Formation von lamellärem Knochen <sup>(54, 126)</sup>.

21 Tage postoperativ war die Knochenheilung in beiden Gruppen schon so weit fortgeschritten, dass der Osteotomiespalt fast vollständig durch den einwachsenden Geflechtknochen überbrückt war.

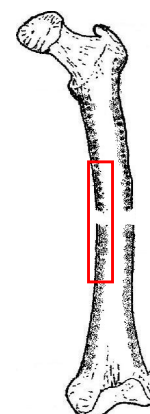
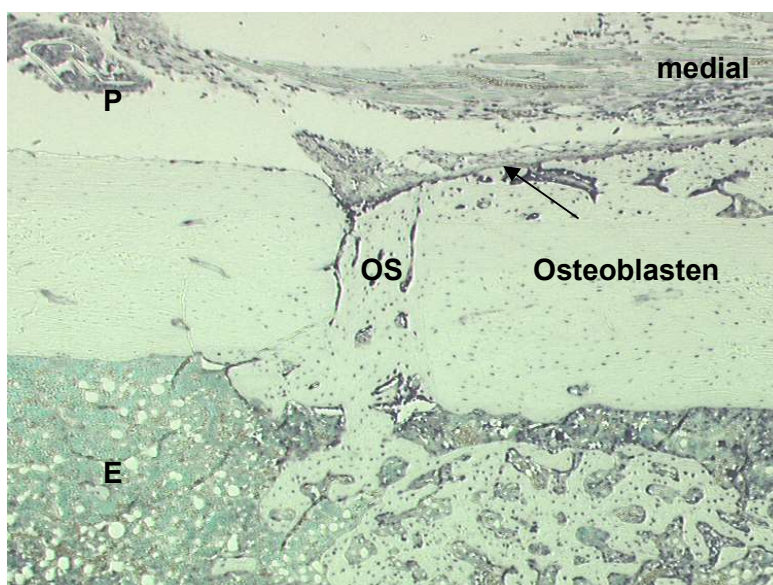
Der Knorpelanteil im Osteotomiespalt war nahezu verschwunden.

Während die enchondrale Ossifikation in der Placebo - Gruppe hauptsächlich im periostalen Bereich stattgefunden hat, fand sich in der GH - Gruppe auch eine deutliche Bildung von Geflechtknochen im endostalen Bereich und im Markraum (Abb. 3.7 und 3.8).





**Abb. 3.7:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, Placebo 21 Tage, 50x Vergrößerung:** Der Frakturspalt in der Placebo-Gruppe ist 21 Tage postoperativ vollständig verknöchert. Chondrozyten sind lediglich vereinzelt im Bereich des Osteotomiespalts zu erkennen (Pfeil: positive Osteoblasten, P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung).



**Abb. 3.8:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, GH 21 Tage, 50x Vergrößerung:** Auch in der GH Gruppe ist der Osteotomiespalt 21 Tage postoperativ vollständig verknöchert. (Pfeil: positive Osteoblasten, P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung).

### 3.4. *In Situ Hybridisierung mit $\alpha_1$ Kollagen Typ I - mRNA*

#### 3.4.1 7 Tage postoperativ

7 Tage nach Operation konnte  $\alpha_1$  Kollagen Typ I – mRNA in den meisten osteoblastären Zellen, d. h. sowohl in den proliferierten als auch in den reifen Osteoblasten nachgewiesen werden. In den wenigsten Fällen wurde das Signal auch in proliferierenden, chondrozytären Zellen, meistens im periostalen Bereich lokalisiert (s. u.). Endostal war die positive Reaktion fast ausschließlich in Osteoblasten zu beobachten.

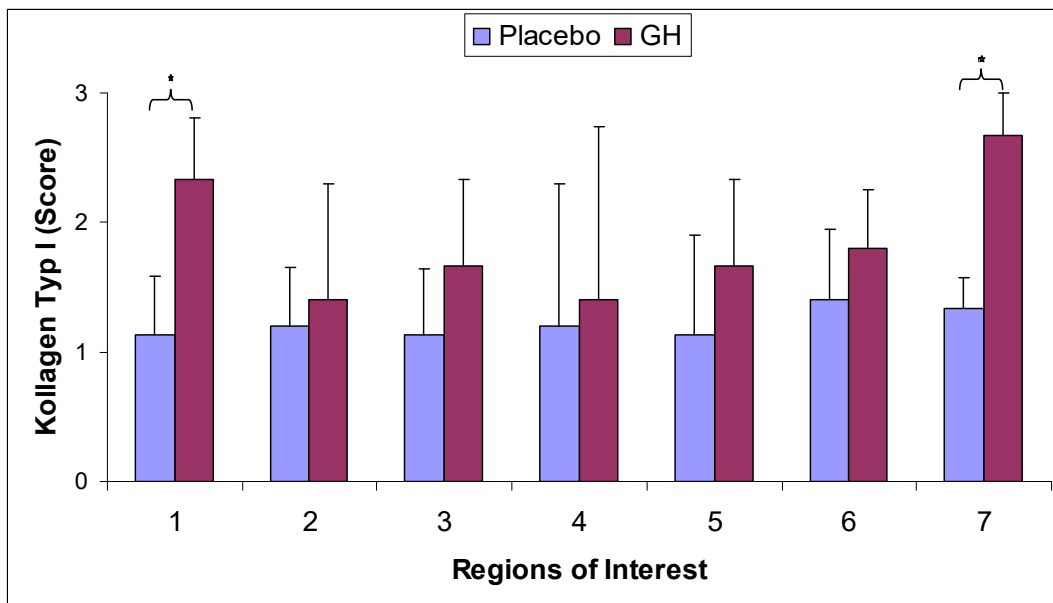
Bereits 7 Tage post operationem fanden sich in beiden Gruppen osteogene Zellen. In der Placebo - Gruppe zeigte sich eine annähernd gleiche Verteilung der positiven osteoblastären Zellen in allen ausgewerteten Regions of Interest. Im Gegensatz dazu fand sich in der GH-Gruppe eine bevorzugte Lokalisation der osteoblastären Zellen periostal entlang der kortikalen Fragmente. Dort war sowohl die Signalquantität als auch die Signalqualität bei den mit Wachstumshormon behandelten Tieren signifikant höher, insgesamt war jedoch, sowohl im endostalen Bereich, als auch im Osteotomiespalt ein tendenziell stärkeres Auftreten von positiven osteoblastären Zellen in der GH-Gruppe zu beobachten (Abb. 3.9, 3.10, 3.11 und 3.12).

Wie oben bereits erwähnt, fanden sich am Tag 7 nach Setzen der Osteotomie in der GH-Gruppe chondrozytäre Zellen des proliferierten Knorpels, die  $\alpha_1$  Kollagen Typ I – mRNA exprimierten. Bei der *In Situ Hybridisierung* mit  $\alpha_1$  Kollagen Typ II – mRNA, als typischer Marker für chondrogene Zellen, zeigte sich ebenfalls ein starkes Signal (s. u. bei  $\alpha_1$  Kollagen Typ II – mRNA).

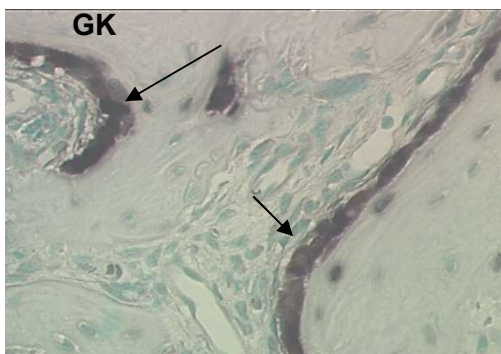
***Tabelle 3.1:***  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, 7 Tage postoperativ: Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*  $p = 0,08$  Placebo vs. GH-Gruppe

$\alpha_1$ Kollagen Typ I 7 Tage postoperative							
ROI	1	2	3	4	5	6	7
Placebo	1,1 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 1,1	1,1 $\pm$ 0,8	1,4 $\pm$ 0,6	1,3 $\pm$ 0,2
GH	2,3 $\pm$ 0,5*	1,4 $\pm$ 0,9	1,7 $\pm$ 0,7	1,4 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,7	1,8 $\pm$ 0,5	2,7 $\pm$ 0,3*

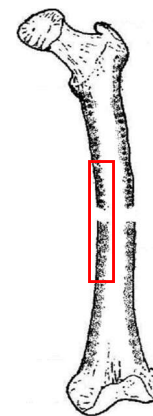
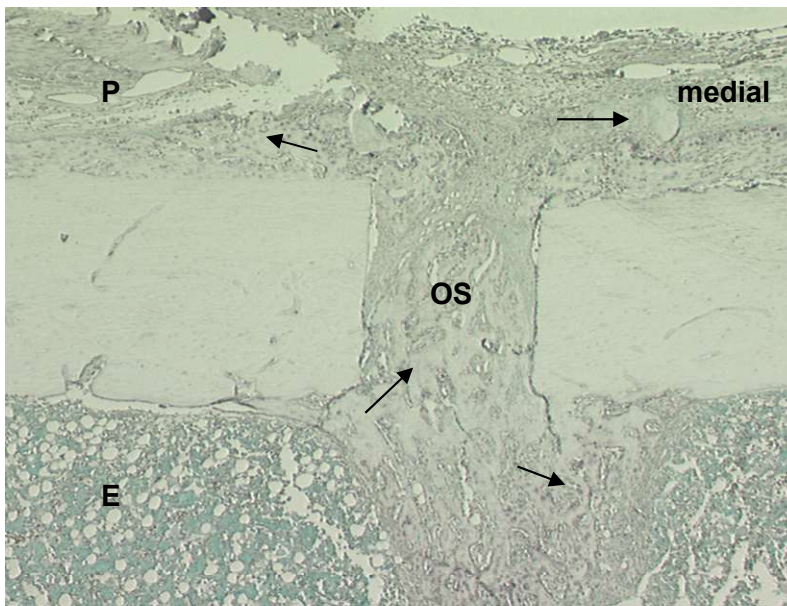




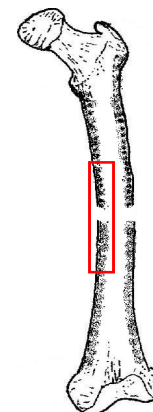
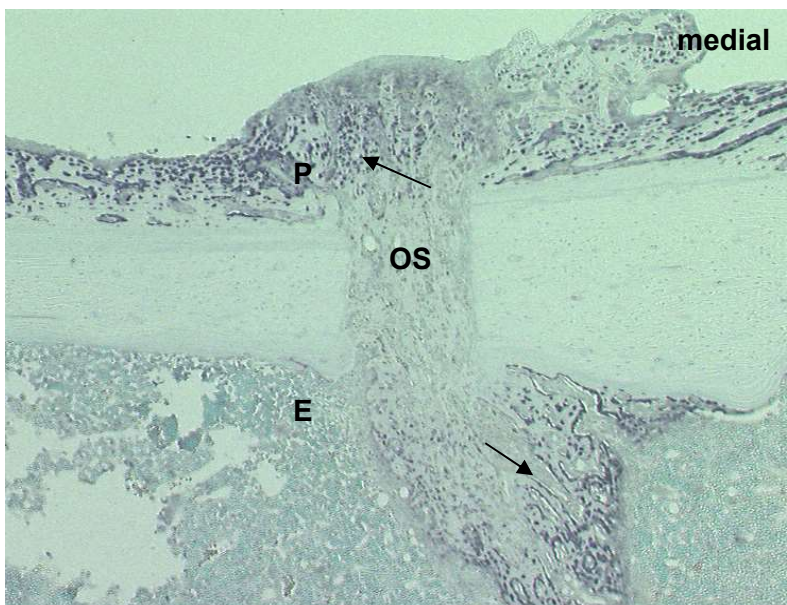
**Abb. 3.9:** Genexpression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I – mRNA am 7. postoperativen Tag in den einzelnen Regions of Interest. Darstellung anhand eines Fehlerbalkendiagramms. \* $p = 0,008$ .



**Abb. 3.10:**  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, GH 7 Tage, 400x Vergrößerung: Geflechtknochen im Osteotomiespalt mit einreihig angelegten Osteoblasten (OB: Osteoblasten, GK: Geflechtknochen).



**Abb. 3.11:**  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, Placebo 7 Tage, 50x Vergrößerung: Schwaches Signal in Osteoblasten mit annähernd gleicher Verteilung sowohl periostal als auch endostal in der mit Placebo behandelten Gruppe (Pfeil: signalpositive Osteoblasten, OS: Osteotomiespalt, P: periostal, E: endostal, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung).



**Abb. 3.12:**  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, GH 7 Tage, 50x Vergrößerung: Deutlich stärkeres Auftreten von positiven osteoblastären Zellen in der mit GH behandelten Gruppe (Pfeil: signalpositive Osteoblasten, P: periostal, E: endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung).

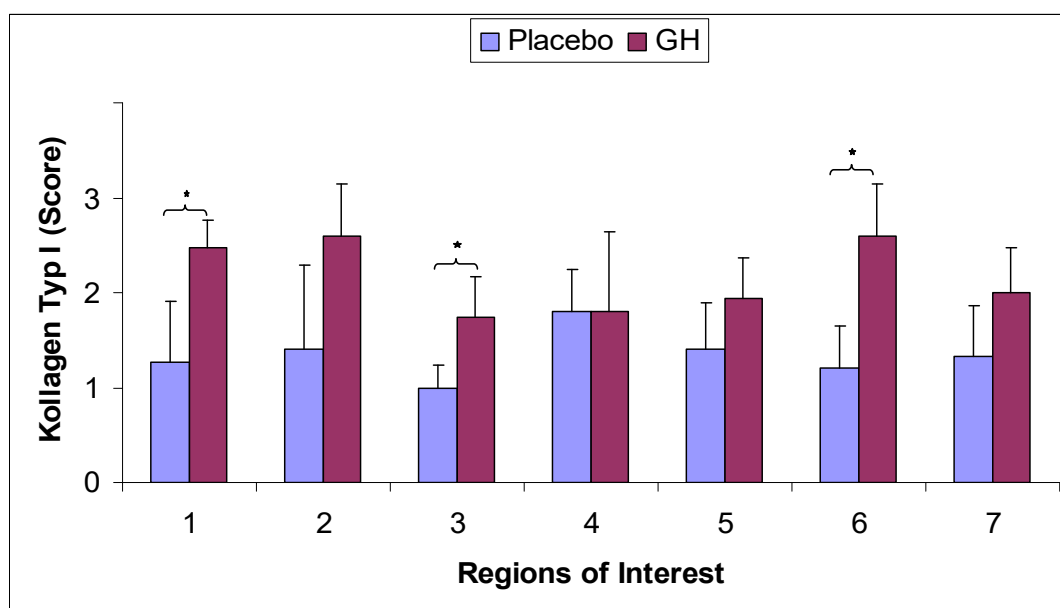
### 3.4.2 14 Tage postoperativ

Während die Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA am 14. postoperativen Tag in der Placebo-Gruppe im Vergleich zum 7. postoperativen Tag insgesamt in ihrer Signalquantität und Verteilung annähernd gleich geblieben war, fand sich in der GH-Gruppe eine tendenziell stärkere Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA in fast allen ausgewerteten *Regions of Interest*. Signifikante Unterschiede zwischen der Placebo und GH-Gruppe wurden im Bereich der medialen Seite des Femurs und zwar sowohl periostal als auch endostal beobachtet. Ebenfalls konnte im Osteotomiespalt der lateralen Femurseite ein signifikant stärkeres Signal nachgewiesen werden.

Das positive Signal wurde in der Placebo-Gruppe auch in vereinzelt Chondrozyten des im Vergleich zum 7. postoperativen Tag zunehmenden Knorpelgewebes beobachtet, so wie in der GH-Gruppe des ersten Zeitpunktes. In der GH-Gruppe zeigte sich ein spezifischeres Verteilungsmuster mit Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA nahezu ausschließlich in osteoblastären und osteozytären Zellen, die epithelartig dem Geflechtknochen anlagen (Abb. 3.13, 3.14 und 3.15).

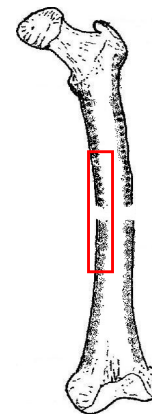
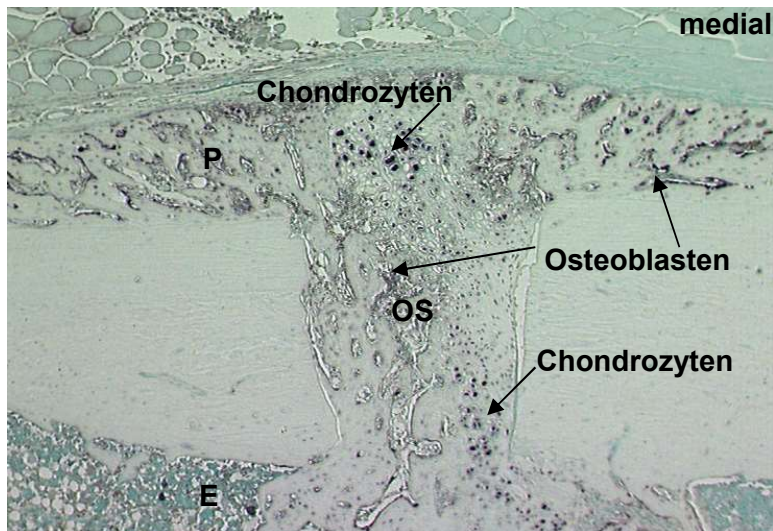
**Tabelle 3.2:**  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, 14 Tage postoperativ: Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* $p = 0,016$

$\alpha_1$ Kollagen Typ I 14 Tage postoperativ							
ROI	1	2	3	4	5	6	7
Placebo	1,3 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,9	1,0 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,5	1,3 $\pm$ 0,5
GH	2,5 $\pm$ 0,3*	2,6 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,4*	1,8 $\pm$ 0,8	1,9 $\pm$ 0,4	2,6 $\pm$ 0,6*	2,1 $\pm$ 0,5

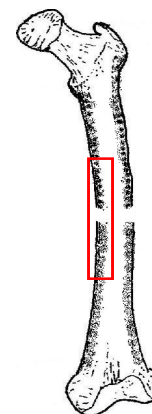
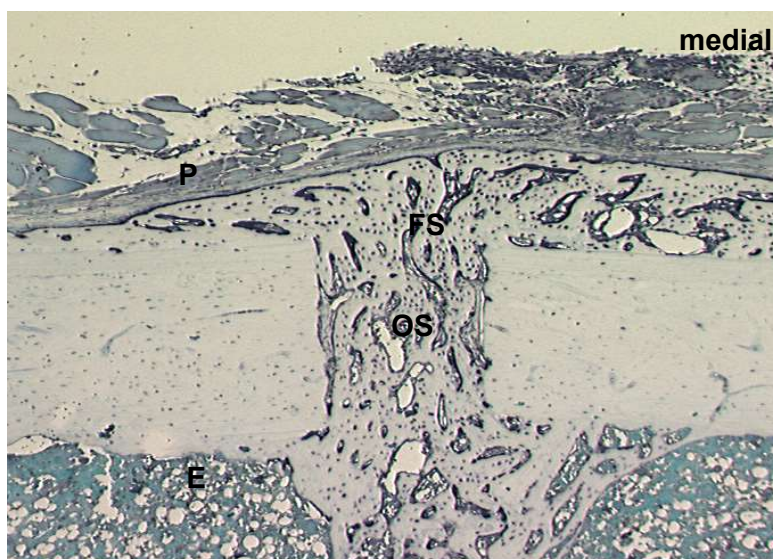


**Abb. 3.13:** Genexpression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA am 14. postoperativen Tag in den einzelnen *Regions of Interest*. Darstellung anhand eines Fehlerbalkendiagramms. \* $p = 0,016$





**Abb. 3.14:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, Placebo 14 Tage, 50x Vergrößerung:** Mässige Signalgebung für  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA in der Placebo-Gruppe des zweiten Zeitpunktes. Auffällig ist hier die simultane Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA von chondrozytären Zellen. Deutliche Bildung von Knorpelgewebe im Osteotomiespalt (Pfeil: Signalreiche Chondrozyten bzw. Osteoblasten, P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung).



**Abb. 3.15:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, GH 14 Tage, 50x Vergrößerung:** Starke Signalgebung für  $\alpha_1$  Kollagen Typ I ausschließlich in osteoblastären und osteozytären Zellen im Bereich der periostalen und endostalen medialen Femurseite in der GH-Gruppe. Insgesamt progrediente Knochenheilung mit Ausbildung von Geflechtknochen im Osteotomiespalt ohne Nachweis von chondrozytenreichen Areale (P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung).

### 3.4.3. 21 Tage postoperativ

Zu diesem Zeitpunkt wurde in der Placebo-Gruppe eine deutliche Abnahme der Syntheseaktivität für  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA in allen ausgewerteten *Regions of Interest*

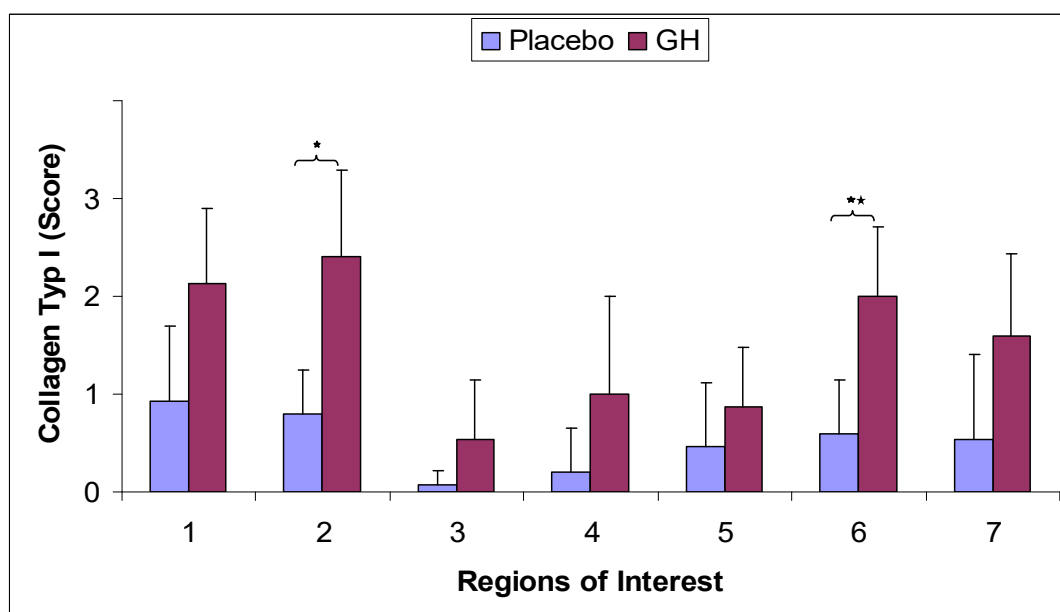
beobachtet. Im Vergleich zum 7. und 14. postoperativen Tag zeigte sich ein signifikanter Rückgang der positiv angefärbten Zellen im endostalen Bereich sowohl medial als auch lateral. Im Markraum ließ sich ebenfalls eine im Vergleich zum 14. postoperativen Tag signifikant geringere Signalintensität nachweisen (Abb. 3.17).

Ebenfalls fand sich in der GH-Gruppe eine tendenziell geringere Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA. Während die Signalquantität und -qualität im Vergleich zum 14. postoperativen Tag im medialen periostalen Bereich und in den beiden Osteotomiespalten annähernd gleich geblieben war, ließ sich eine im Vergleich zum 7. und 14. postoperativen Tag signifikant geringere Syntheseaktivität im endostalen Bereich erkennen (Abb. 3.18).

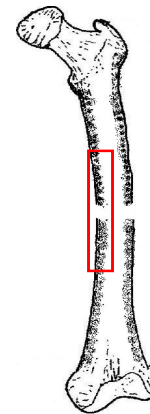
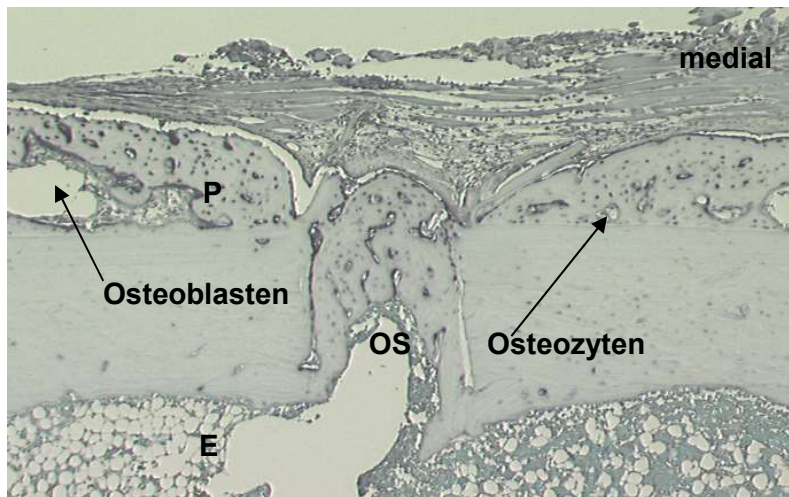
Zwischen der Placebo und GH-Gruppe wurden am 21. postoperativen Tag signifikante Unterschiede in der Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA im Bereich beider Osteotomiespalten nachgewiesen. Trotz der geringeren Syntheseaktivität für  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA in beiden Gruppen zu diesem Zeitpunkt, läßt sich anhand der Abbildung 3.16 eine tendenziell höhere Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA in der GH-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe auch in den weiteren ausgewerteten *Regions of Interest* erkennen.

**Tabelle 3.3:**  $\alpha_1$  Kollagen Typ I , 21 Tage postoperativ: Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* $p = 0,032$ , \*\* $p = 0,016$

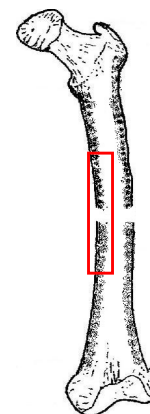
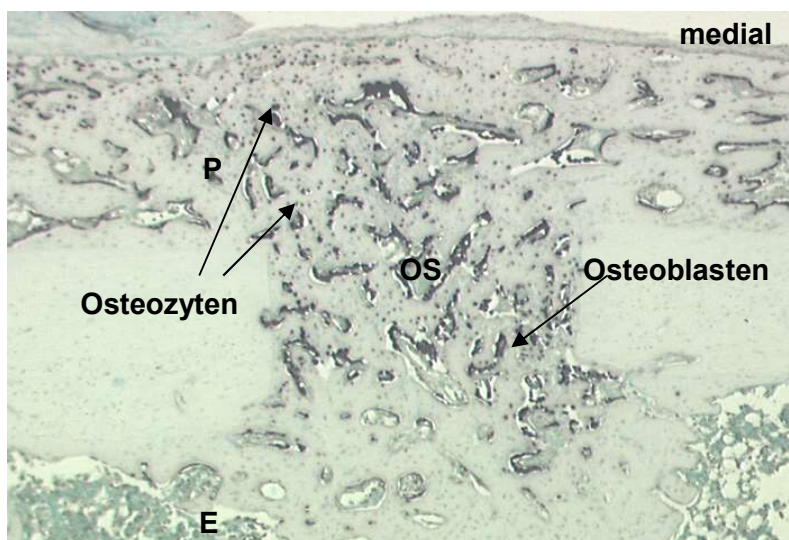
$\alpha_1$ Kollagen Typ I 21 Tage postoperativ							
ROI	1	2	3	4	5	6	7
Placebo	0,9 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 0,5	0,1 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,4	0,5 $\pm$ 0,7	0,6 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 0,9
GH	2,1 $\pm$ 0,8	2,4 $\pm$ 0,9*	0,5 $\pm$ 0,6	1,0 $\pm$ 1,0	0,9 $\pm$ 0,6	2,0 $\pm$ 0,7**	1,6 $\pm$ 0,8



**Abb. 3.16:** Genexpression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA am 21. postoperativen Tag in den einzelnen *Regions of Interest*. Darstellung anhand eines Fehlerbalkendiagramms. \* $p = 0,032$ , \*\* $p = 0,016$



**Abb. 3.17:**  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, Placebo 21 Tage, 50x Vergrößerung: Lediglich im Bereich des Osteotomiespalt und medial periostal zeigte sich in der Placebo-Gruppe eine Signalaktivität für  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA (P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite).



**Abb. 3.18:**  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, GH 21 Tage, 50x Vergrößerung: 21 Tage postoperativ zeigte sich eine nahezu vollständige Verknöcherung des Osteotomiespalt. Trotzdem zeigt sich eine starke Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA im Bereich des Osteotomiespalt. Im endostalen Bereich wird eine schwächere Signalgebung beschrieben (P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung).

#### 3.4.4 $\alpha_1$ Kollagen Typ I im Verlauf der Knochenheilung

Im Folgenden wird die Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA im Bereich des Frakturkallus mithilfe des deskriptiven 4stufigen Scores zusammengefasst und über den erfassten Zeitraum der Knochenheilung beschrieben.

Am 7. postoperativen Tag zeigte sich in der GH-Gruppe eine im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant höhere Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA im Bereich des Frakturkallus. Nach weiteren 7 Tagen fand sich in der Placebo – Gruppe eine annähernd gleich starke Signalgebung, während sich in der GH-Gruppe eine tendenzielle Zunahme der Signalintensität erkennen ließ. Die Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA war im gesamten Frakturkallus der GH-Gruppe auch in diesem Zeitpunkt signifikant höher.

Am 21. Tag ließ sich in der Placebo-Gruppe eine im Vergleich zum 7. und 14. postoperativen Tag signifikant geringere Expression beobachten. Ebenfalls war in der GH-Gruppe eine tendenzielle Abnahme des Signals von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA zu verzeichnen. Trotzdem wurde in der GH-Gruppe eine im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant erhöhte Signalintensität zu diesem Zeitpunkt nachgewiesen.

**Tabelle 3.4:** Mittelwert des deskriptiven Scores für  $\alpha_1$  Kollagen Typ I im gesamten Frakturkallus zu den drei untersuchten Zeitpunkten  $\pm$  Standardabweichung,  $*p^1 = 0,016$ ,  $*p^2 = 0,08$ ,  $*p^3 = 0,028$  zwischen Placebo und GH Gruppe zum angegebenen Zeitpunkt,  $**p = 0,016$  in der Placebo Gruppe zwischen 7 und 21 Tagestieren sowie 14 und 21 Tagestieren

$\alpha_1$ Kollagen Typ I im Verlauf der Knochenheilung			
Standzeiten	7 Tage nach OP	14 Tage nach OP	21 Tage nach OP
Placebo	1,2 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,4**
GH	2,0 $\pm$ 0,5* <sup>1</sup>	2,2 $\pm$ 0,2* <sup>2</sup>	1,5 $\pm$ 0,6* <sup>3</sup>

### 3.5. *In Situ Hybridisierung* mit Osteopontin - mRNA

#### 3.5.1. 7 Tage postoperativ

7 Tage post operationem ließ sich Osteopontin mRNA ebenfalls in osteoblastären Zellen nachweisen, das Signal war jedoch im Vergleich zu der *In Situ Hybridisierung* mit  $\alpha_1$  Kollagen Typ I deutlich schwächer.

In der Placebo Gruppe schienen ausschliesslich die proliferierenden Osteoblasten Osteopontin-mRNA zu exprimieren. Bei der GH-Gruppe war ein stärkeres Signallevel auch in den proliferierenden Osteoprogenitor und teilweise auch in osteoblastären und osteozytären Zellen zu beobachten.

In der Placebo Gruppe zeigte sich eine nahezu gleichmässige Verteilung der positiven osteozytären und osteoblastären Zellen. Im Gegensatz dazu fand sich in der mit GH

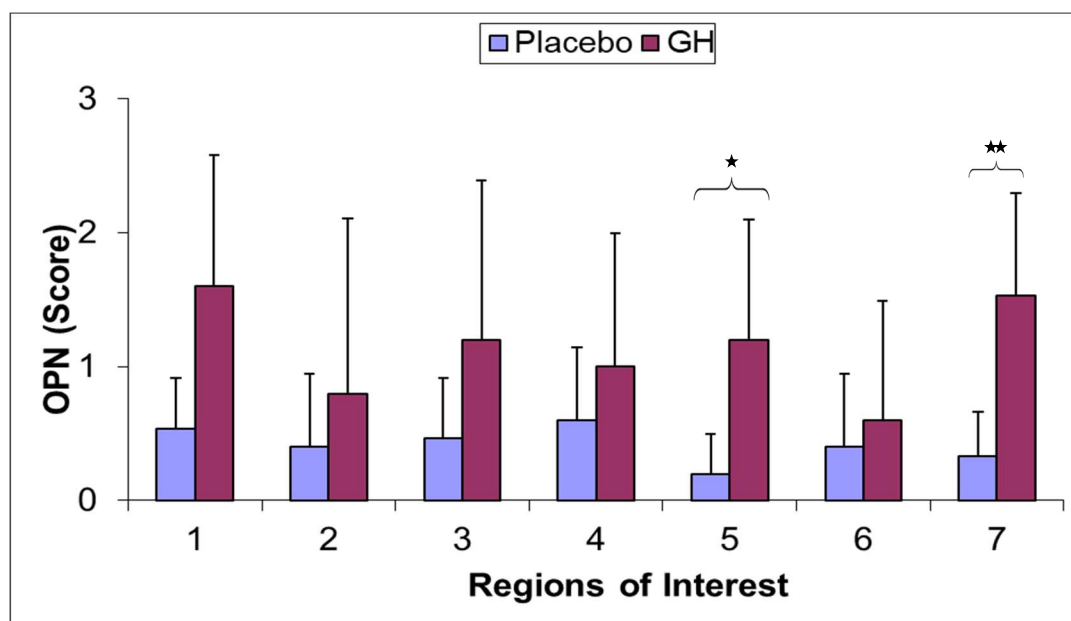


behandelten Gruppe ein signifikant stärkeres Auftreten von signalreichen Zellen im endostalen und periostalen Bereich der lateralen Seite (Abb. 3.19, 3.20 und 3.21).

Ferner wurde insbesondere in der GH Gruppe eine starke Expression von Osteopontin – mRNA in Osteoklasten im Osteotomiespalt zwischen den beiden kortikalen Knochenenden, in direkter Nachbarschaft der osteoblastären Zellen nachgewiesen (Abb. 3.22).

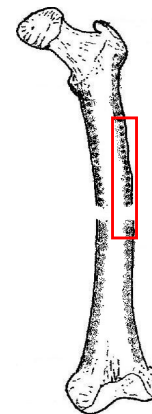
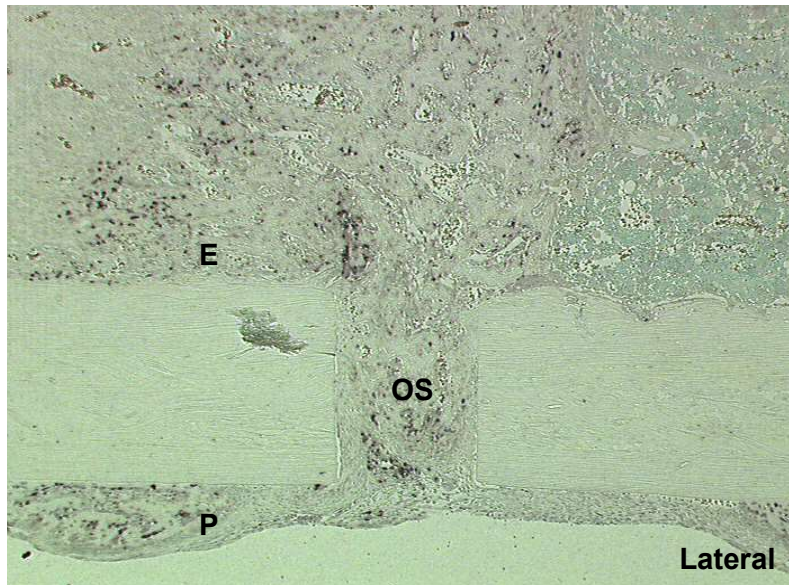
**Tabelle 3.5:** Osteopontin, 7 Tage postoperativ: Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* $p = 0,032$ , \*\* $p = 0,016$

Osteopontin 7 Tage postoperative							
ROI	1	2	3	4	5	6	7
Placebo	0,5 $\pm$ 0,4	0,4 $\pm$ 0,6	0,4 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,6	0,2 $\pm$ 0,3	0,4 $\pm$ 0,6	0,3 $\pm$ 0,3
GH	1,6 $\pm$ 0,9	0,8 $\pm$ 1,3	1,2 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 1,0	1,2 $\pm$ 0,2*	0,6 $\pm$ 0,9	1,5 $\pm$ 0,8**

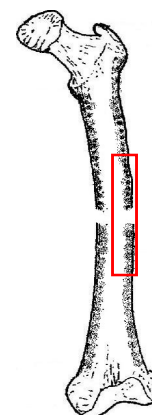
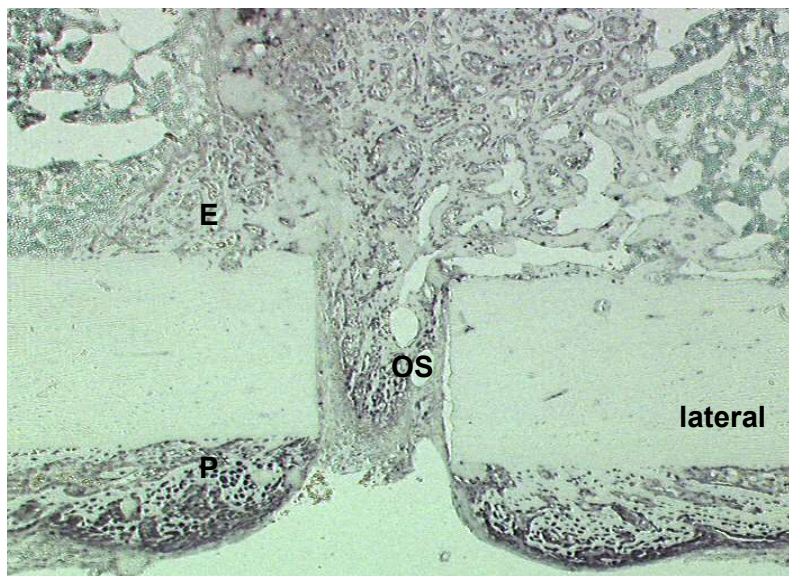


**Abb. 3.19:** Genexpression von Osteopontin - mRNA am 7. postoperativen Tag in den einzelnen Regions of Interest. Darstellung anhand eines Fehlerbalkendiagramms. \* $p = 0,032$ , \*\* $p = 0,016$





**Abb. 3.20: Osteopontin, Placebo 7 Tage, 50x Vergrößerung:** In der Placebo-Gruppe zeigt sich am 7. postoperativen Tag eine schwache Signalgebung für Osteopontin-mRNA, welche gleichmäßig im gesamten Präparat verteilt ist (Pfeil: signalpositive osteogene Zellen, P: periostal, E: endostal, OS: Osteotomiespalt, laterale Seite des Femurs – eigene Femurzeichnung)



**Abb. 3.21: Osteopontin, GH 7 Tage, 50x Vergrößerung:** Signifikant stärkeres Signal in osteogenen Zellen in der mit GH behandelnden Gruppe, bevorzugt im periostalen und endostalen Bereich der lateralen Seite (Pfeil: signalpositive Zellen, P: periostal, E: endostal, OS: Osteotomiespalt, laterale Femurseite – eigene Femurzeichnung).

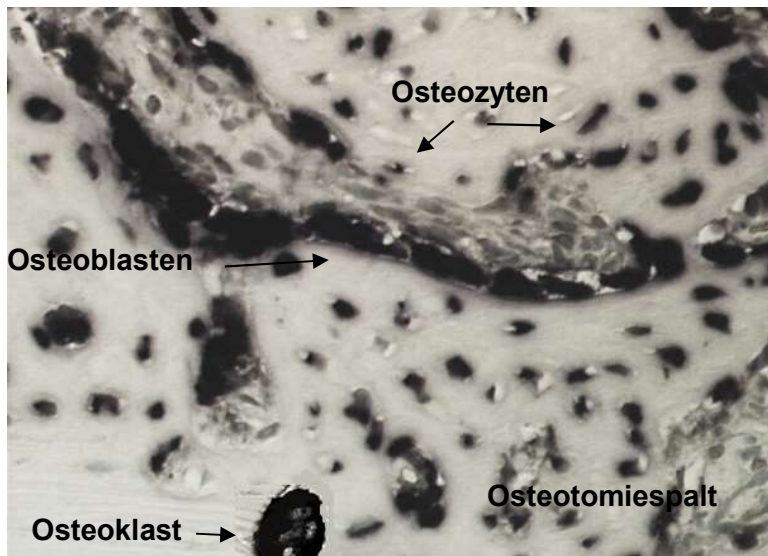


Abb. 3.22: Osteopontin, GH 7 Tage, 400x Vergrößerung: Neben den stark angefärbten Osteoblasten und Osteozyten wurde Osteopontin-mRNA auch in Osteoklasten im Bereich des Frakturspalts am osteotomierten Knochen nachgewiesen. (Pfeil: Osteoklasten, OS: Osteotomiespalt)

### 3.5.2. 14 Tage postoperativ

Die *In Situ Hybridisierung* mit Osteopontin-mRNA ergab in der Placebo-Gruppe am 14. postoperativen Tag, im Vergleich zum früheren Zeitpunkt, eine tendenzielle Zunahme der Expression von Osteopontin-mRNA von den osteoblastären und osteozytären Zellen. Dieses war insbesondere im periostalen Bereich sowohl der lateralen als auch der mediale Femurseite ersichtlich (Abb. 3.23 und 3.24).

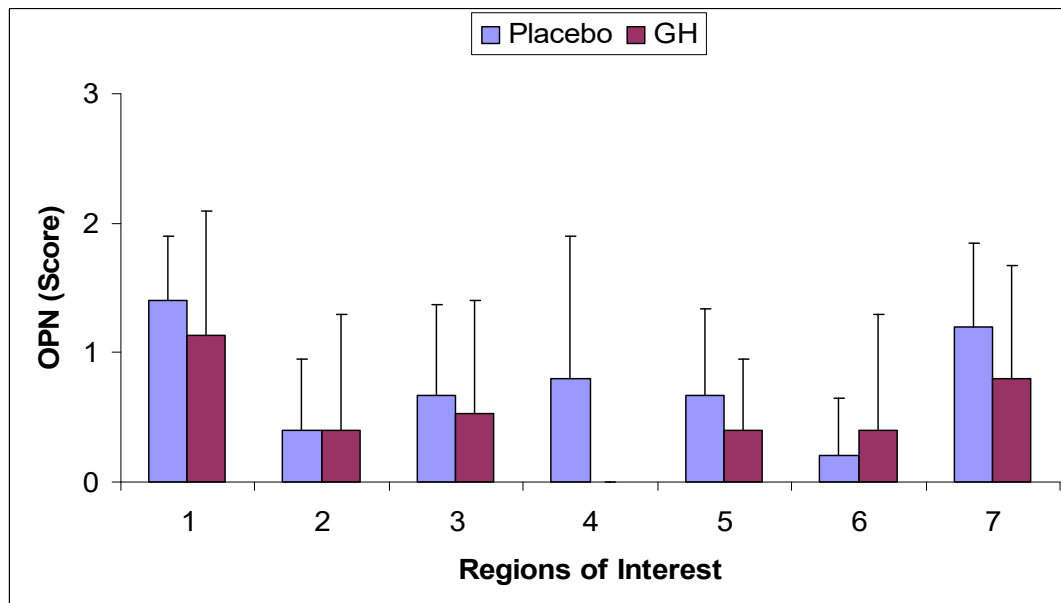
Im Gegensatz dazu, zeigte sich in der GH-Gruppe eine tendenzielle Abnahme der Expression von Osteopontin-mRNA in allen ausgewerteten *Regions of Interest*. Die Signalqualität und –quantität war vor allem in den osteoblastären und osteozytären Zellen des lateralen periostalen und endostalen Bereichs sowie im Markraum deutlich geringer. Signifikante Unterschiede in der Expression von Osteopontin-mRNA wurden zwischen der Placebo und GH-Gruppe nicht beobachtet (3.25).

Osteopontin-mRNA ließ sich auch in dieser Phase der Knochenheilung in osteoklastären Zellen, diesmal im neugebildeten Geflechtknochen beider Gruppen, nachweisen.

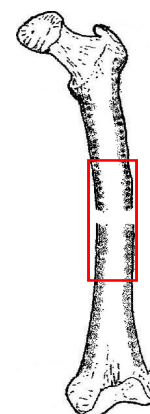
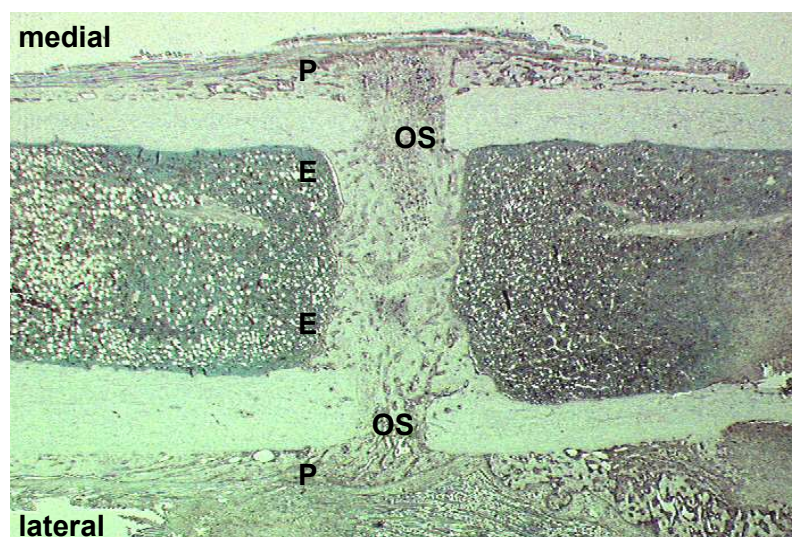
Im Bereich des Knorpelgewebes war bei der *In Situ Hybridisierung* mit Osteopontin-mRNA keine Expression in den chondrozytären Zellen zu beobachten.

**Tabelle 3.6:** Osteopontin, 14 Tage postoperativ: Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

Osteopontin 14 Tage postoperativ							
ROI	1	2	3	4	5	6	7
Placebo	1,4 $\pm$ 0,5	0,4 $\pm$ 0,6	0,7 $\pm$ 0,8	0,8 $\pm$ 1,1	0,7 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,7
GH	1,1 $\pm$ 0,9	0,4 $\pm$ 0,9	0,5 $\pm$ 0,9	0,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,6	0,4 $\pm$ 0,9	0,8 $\pm$ 0,9

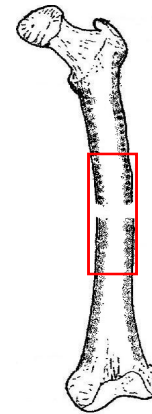
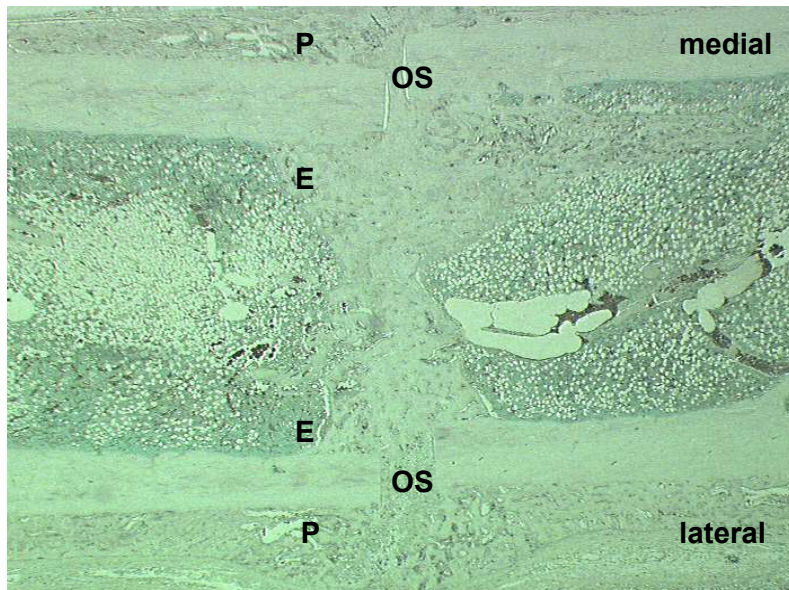


**Abb. 3.23:** Genexpression von Osteopontin - mRNA am 14. postoperativen Tag in den einzelnen Regions of Interest. Darstellung anhand eines Fehlerbalkendiagramms



**Abb. 3.24:** Osteopontin, Placebo 14 Tage, 16x Vergrößerung: Die In Situ Hybridisierung mit Osteopontin-mRNA ergab in der Placebo-Gruppe des zweiten Zeitpunktes (14 Tage postoperativ) eine tendenziell zunehmende Expression von Osteopontin-mRNA in osteoblastären, osteozytären und osteoklastären Zellen insbesondere im periostalen Bereich sowohl der medialen als auch der lateralen Seite des Femurs (P: Periosteal, E: Endosteal, OS: Osteotomiespalt, mediale und laterale Femurseite – eigene Femurzeichnung)





**Abb. 3.25: Osteopontin, GH 14 Tage, 16x Vergrößerung:** Nach 14 Tagen findet sich eine schwache Expression von Osteopontin-mRNA in der GH-Gruppe. Insbesondere endostal findet sich nahezu keine Signalgebung für Osteopontin-mRNA (P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale und laterale Femurseite – eigene Femurzeichnung).

### 3.5.3. 21 Tage postoperativ

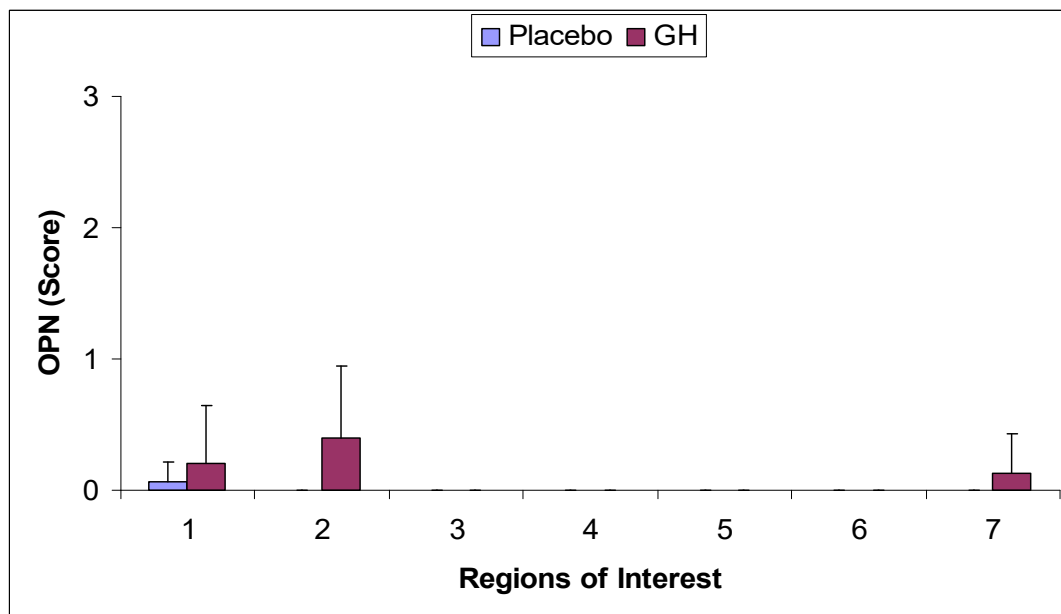
Die *In Situ Hybridisierung* mit Osteopontin-mRNA ergab am 21. postoperativen Tag sowohl in der Placebo- als auch in der GH-Gruppe eine nahezu fehlende Expression von Osteopontin-mRNA.

Während sich am 14. postoperativen Tag eine tendenzielle Zunahme der Signalquantität und -qualität in der Placebo-Gruppe, insbesondere im periostalen Bereich erkennen ließ, fand sich 21 Tage postoperativ auch in diesem Bereich ein deutlicher Rückgang der Osteopontin-mRNA exprimierenden Zellen (Abb. 3.26 und 3.27).

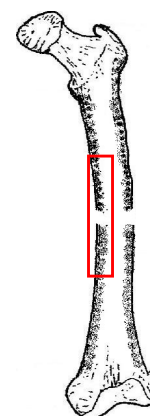
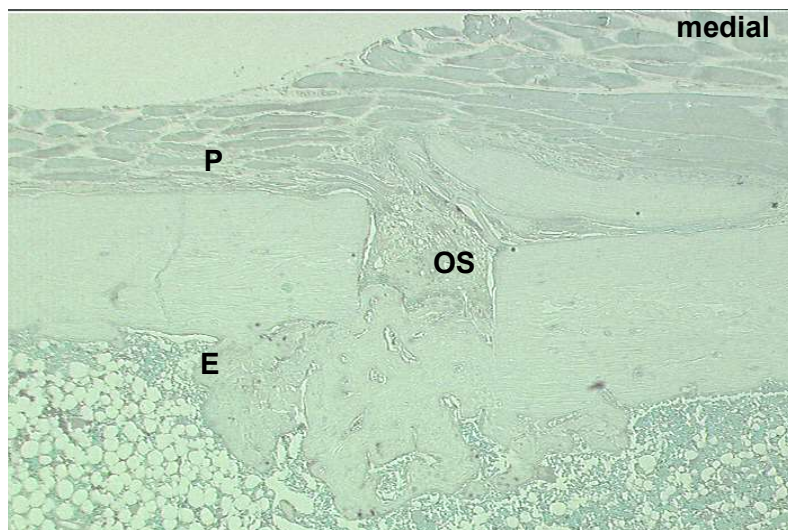
In der GH-Gruppe ließ sich schon am 14. postoperativen Tag eine Abnahme der Syntheseaktivität erahnen. Am 21. postoperativen Tag wurde lediglich im periostalen Bereich sowie im medialen Osteotomiespalt eine äußerst schwache Signalintensität beobachtet. Signifikante Unterschiede wurden zwischen der Placebo- und GH-Gruppe am 21. postoperativen Tag nicht nachgewiesen (Abb. 3.28).

**Tabelle 3.7:** Osteopontin, 21 Tage postoperativ: Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

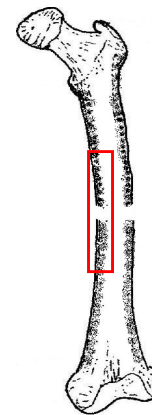
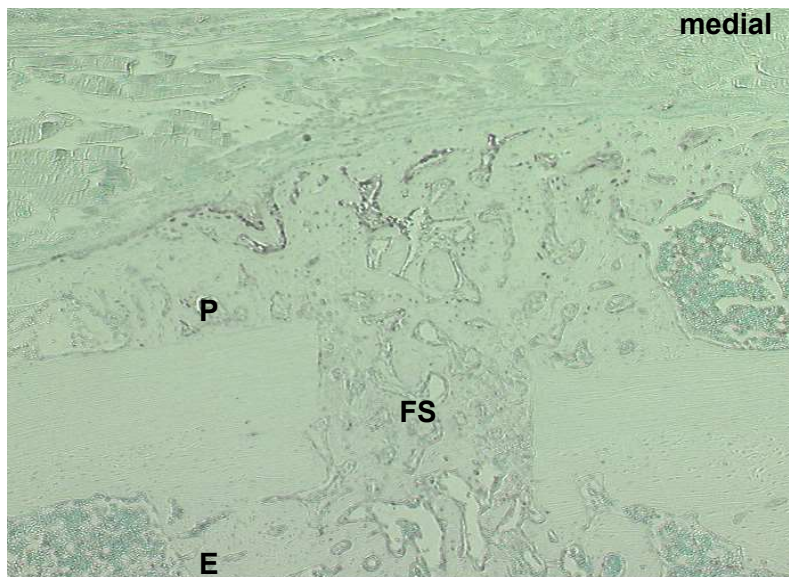
Osteopontin 21 Tage postoperativ							
ROI	1	2	3	4	5	6	7
Placebo	0,1 $\pm$ 0,2	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
GH	0,2 $\pm$ 0,5	0,4 $\pm$ 0,6	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,3



**Abb. 3.26:** Genexpression von Osteopontin – mRNA am 21. postoperativen Tag in den einzelnen Regions of Interest. Darstellung anhand eines Fehlerbalkendiagramms.



**Abb. 3.27: Osteopontin, Placebo 21 Tage, 50x Vergrößerung:** Die In Situ Hybridisierung mit Osteopontin-mRNA erbrachte am 21. postoperativen Tag in der Placebo-Gruppe eine deutliche Abnahme des Signals. Wie auch in der Abbildung ersichtlich, ließen sich kaum osteoblastäre, osteozytäre oder osteoklastäre Zellen nachweisen, welche Osteopontin-mRNA exprimierten (P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung)



**Abb. 3.28: Osteopontin, GH 21 Tage, 50x Vergrößerung:** In der GH-Gruppe zeigte sich nach 21 Tagen lediglich im Bereich der periostalen Reaktion und des Osteotomiespaltes insbesondere medialseits eine sehr schwache Signalaktivität für Osteopontin-mRNA. Die übrigen ausgewerteten ROIs waren signalfrei (P: Periosteal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung)

#### 3.5.4. Osteopontin im Verlauf der Knochenheilung

In der Folge wird die Expression von Osteopontin-mRNA mithilfe des deskriptiven 4stufigen Scores im Bereich des Frakturkallus zusammengefasst und über den gesamten Verlauf der Knochenheilung beschrieben.

Am 7. postoperativen Tag zeigte sich in der GH-Gruppe eine im Vergleich zur Placebo – Gruppe tendenziell höhere Expression für Osteopontin-mRNA. Im Verlauf wurde in der Placebo-Gruppe eine tendenzielle Zunahme des Signals für Osteopontin-mRNA beobachtet, welche dann am 21. postoperativen Tag signifikant abfiel. Während dessen ließ sich in der GH-Gruppe eine kontinuierliche Abnahme der Signalintensität erkennen.

**Tabelle 3.8:** Mittelwert des deskriptiven Scores für Osteopontin-mRNA im gesamten Frakturkallus zu den drei untersuchten Zeitpunkten  $\pm$  Standardabweichung,  $**p^1 = 0,08$  zwischen 14 und 21 Tagestieren in der Placebo-Gruppe,  $**p^2 = 0,08$  zwischen 7 und 21 Tagestieren in der GH-Gruppe.

Osteopontin im Verlauf der Knochenheilung			
Standzeiten	7 Tage nach OP	14 Tage nach OP	21 Tage nach OP
Placebo	0,4 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,4	0,0 $\pm$ 0,0 <sup>**1</sup>
GH	1,1 $\pm$ 0,8	0,5 $\pm$ 0,5	0,1 $\pm$ 0,1 <sup>**2</sup>

### 3.6. *In Situ Hybridisierung* mit Osteocalcin - mRNA

#### 3.6.1. 7 Tage postoperativ

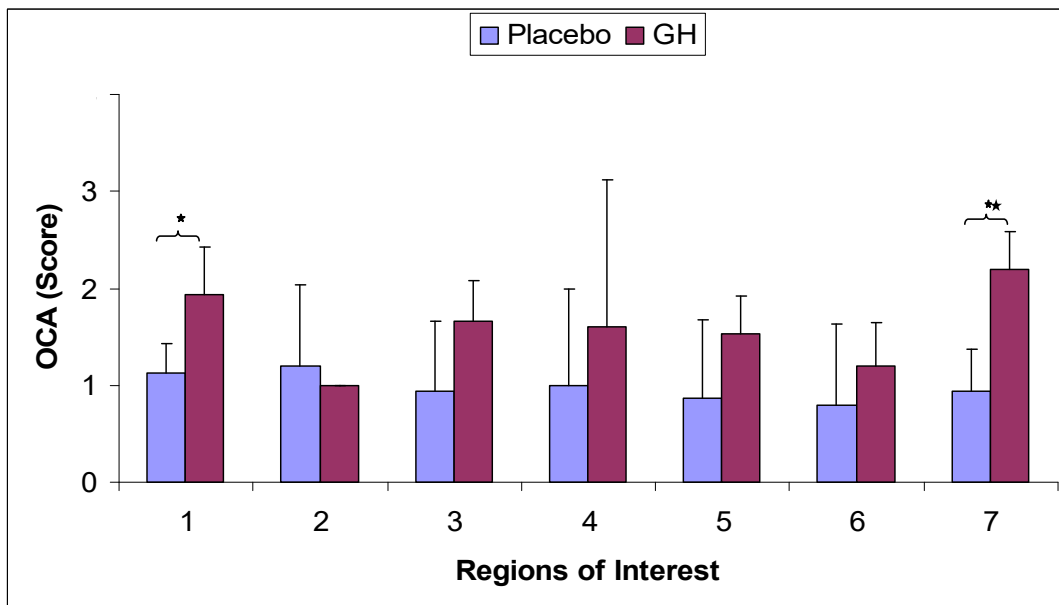
7 Tage postoperationem ließ sich Osteocalcin-mRNA in der mit Placebo behandelten Gruppe in vereinzelt proliferierenden Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten sowie unreifen Osteozyten nachweisen, welche wiederum im gesamten Präparat verteilt waren. In der GH-Gruppe fand sich ein eher bevorzugtes Auftreten von positiven osteoblastären Zellen periostal der beiden Cortices, wo auch signifikante Unterschiede zwischen Placebo und GH-Gruppe beobachtet wurden. Tendenziell war ebenfalls eine vermehrte Lokalisation von osteoblastären Zellen im lateralen periostalen Bereich zu verzeichnen (Abb. 3.29, 3.30 und 3.31).

Eine Anfärbung von chondrozytären Zellen wurde nicht beobachtet. Das Signal war ausschließlich in osteoblastären Zellen lokalisiert. Selbst die oben beschriebenen chondrozytären Zellen, die in der Lage waren, beide Typen von Kollagen zu exprimieren (sowohl  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA als auch  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA), waren bei der *In Situ Hybridisierung* mit Osteocalcin-mRNA negativ. Lediglich eine leichte Hintergrundfärbung war bei vereinzelt chondrozytären Zellen zu erkennen.

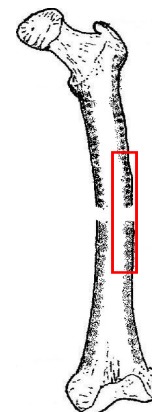
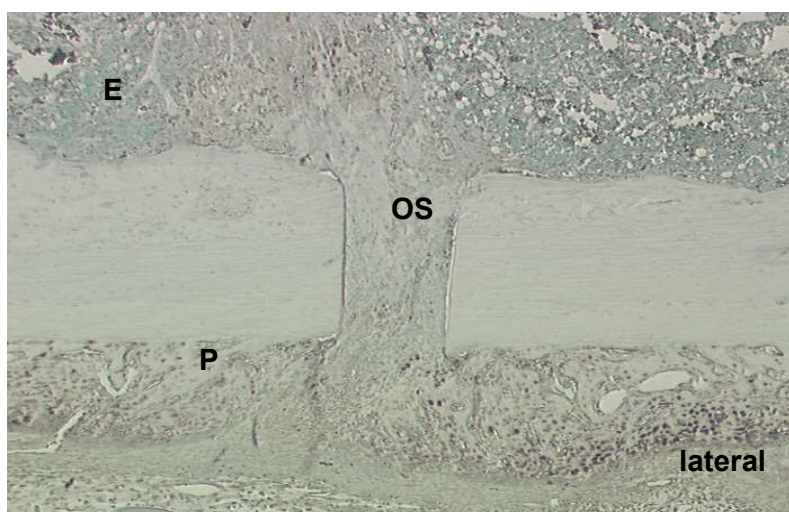
Table 3.9: Osteocalcin, 7 Tage postoperativ: Darstellung der Mittelwerte +/- Standardabweichung, \* $p=0,016$ , \*\* $p=0,008$

Osteocalcin 7 Tage postoperativ							
ROI	1	2	3	4	5	6	7
Placebo	1,1 ± 0,3	1,2 ± 0,8	0,9 ± 0,7	1,1 ± 1,0	0,9 ± 0,8	0,8 ± 0,8	0,9 ± 0,4
GH	1,9 ± 0,5*	1,1 ± 0,0	1,7 ± 0,4	1,6 ± 1,5	1,5 ± 0,4	1,2 ± 0,5	2,2±0,4**



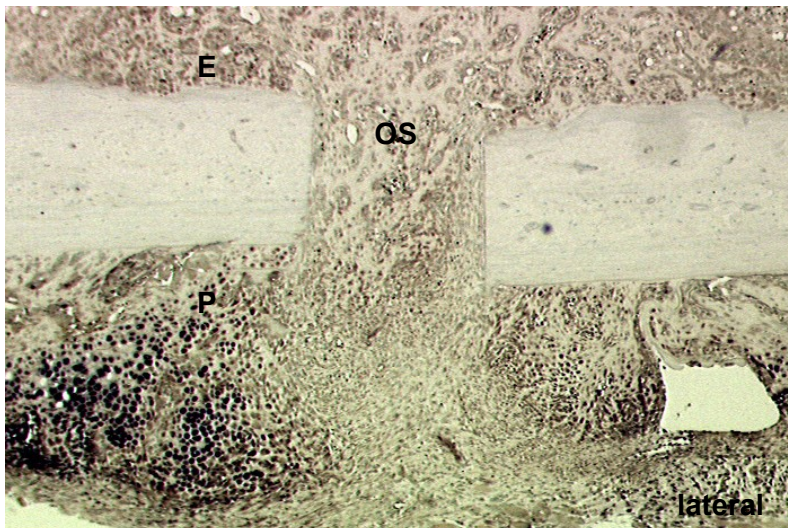


**Abb. 3.29:** Genexpression von Osteocalcin - mRNA am 7. postoperativen Tag in den einzelnen Regions of Interest. Darstellung anhand eines Fehlerbalkendiagramms. \* $p=0,016$ , \*\* $p=0,008$



**Abb. 3.30:** Osteocalcin, Placebo 7 Tage, 50x Vergrößerung: In der Placebo-Gruppe ließ sich am 7. postoperativen Tag eine gleichmäßige Verteilung von Osteoblasten nachweisen, welche eine schwache Expression von Osteocalcin-mRNA aufwiesen (Pfeil: signalpositive Osteoblasten, P: periostal, E: endostal, OS: Osteotomiespalt, laterale Femurseite – eigene Femurzeichnung)





**Abb. 3.31: Osteocalcin, GH 7 Tage, 50x Vergrößerung:** Deutlich starkes Signal wurde v.a. im lateralen periostalen Bereich beobachtet. Auch im endostalen Bereich der lateralen ließ sich eine starke Signalgebung in osteoblastären Zellen feststellen (Pfeil: signalreiche Osteoblasten, P: periostal, E: endostal, OS: Osteotomiespalt, laterale Femurseite – eigene Femurzeichnung).

### 3.6.2. 14 Tage postoperativ

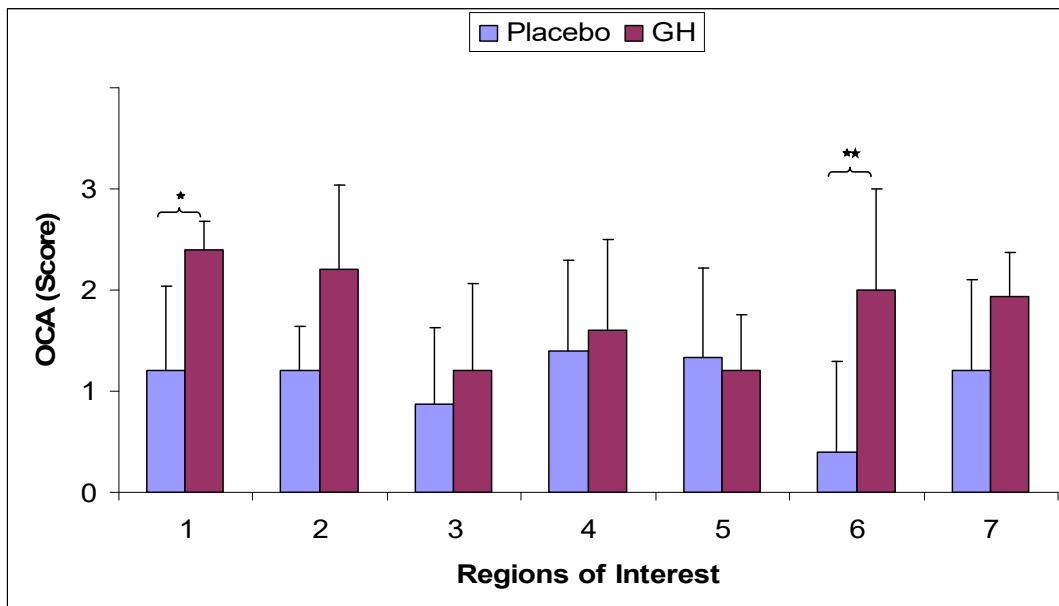
Bei der *In Situ Hybridisierung* mit Osteocalcin-mRNA fand sich in der Placebo-Gruppe 14 postoperationem eine, im Vergleich zum 7. postoperativen Tag, annähernd gleich starke Expression von Osteocalcin-mRNA. Lediglich im periostalen und endostalen Bereich medialseits zeigte sich eine tendenzielle Zunahme der Signalquantität und –qualität (Abb. 3.32 und 3.33).

Am 14. postoperativen Tag wurde medial periostal sowie im lateralen Osteotomiespalt der mit GH behandelten Gruppe eine signifikant stärkere Syntheseaktivität von Osteocalcin-mRNA beobachtet. Tendenziell wurde jedoch eine erhöhte Signalquantität und –qualität auch im Osteotomiespalt und im medialen endostalen Bereich sowie ferner lateral periostal nachgewiesen (Abb. 3.34).

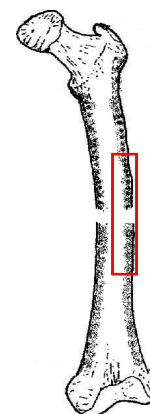
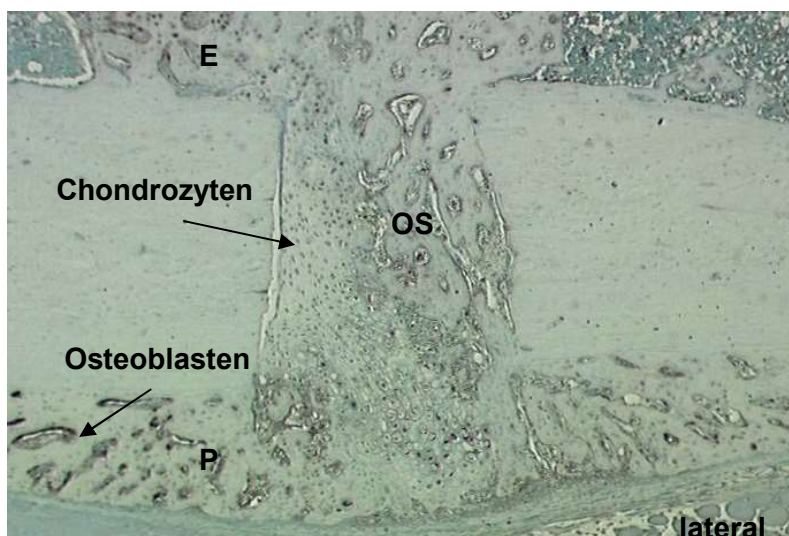
Osteocalcin-mRNA wurde auch am 14. postoperativen Tag ausschließlich von osteoblastären und osteozytären Zellen exprimiert. In der Placebo-Gruppe war lediglich eine schwache Hintergrundfärbung auch in vereinzelt chondrozytären Zellen des Knorpelgewebes insbesondere in den Osteotomiespalten zu verzeichnen.

**Tabelle 3.10:** Osteocalcin, 14 Tage postoperativ: Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* $p = 0,032$ , \*\* $p = 0,008$

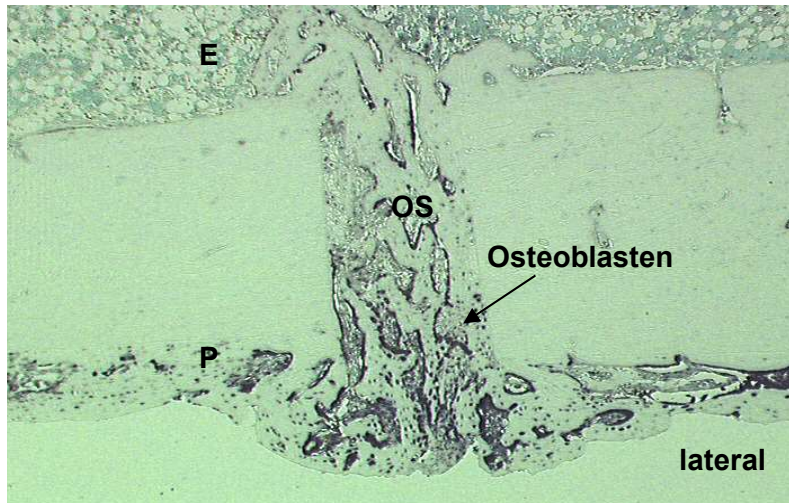
Osteocalcin 14 Tage postoperativ							
R o I	1	2	3	4	5	6	7
Placebo	1,2 $\pm$ 0,8	1,2 $\pm$ 0,5	0,9 $\pm$ 0,8	1,4 $\pm$ 0,9	1,3 $\pm$ 0,9	0,8 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 0,9
GH	2,4 $\pm$ 0,3*	2,2 $\pm$ 0,8	1,2 $\pm$ 0,9	1,6 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 0,6	2,0 $\pm$ 1,0**	1,9 $\pm$ 0,4



**Abb. 3.32:** Genexpression von Osteocalcin-mRNA am 14. postoperativen Tag in den einzelnen Regions of Interest. Darstellung anhand eines Fehlerbalkendiagramms. \* $p = 0,032$ , \*\* $p = 0,008$



**Abb. 3.33:** Osteocalcin, Placebo 14 Tage, 50x Vergrößerung: Schwache bis mässige Expression von OCA-mRNA in osteogenen Zellen der Placebo-Gruppe lateralseits. Die Chondrozyten im Osteotomiespalt exprimieren keine Osteocalcin-mRNA (P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, laterale Femurseite – eigene Femurzeichnung)



**Abb. 3.34: Osteocalcin, GH 14 Tage, 50x Vergrößerung:** Signifikant erhöhte Genexpression von Osteocalcin-mRNA im lateralen Osteotomiespalt der GH-Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe desselben Zeitpunktes. Auch hier lässt sich die Expression von Osteocalcin-mRNA ausschließlich in osteoblastären und osteozytären Zellen nachweisen (Pfeil: Signalreiche Osteoblasten, P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, laterale Femurseite – eigene Femurzeichnung)

### 3.6.3. 21 Tage postoperativ

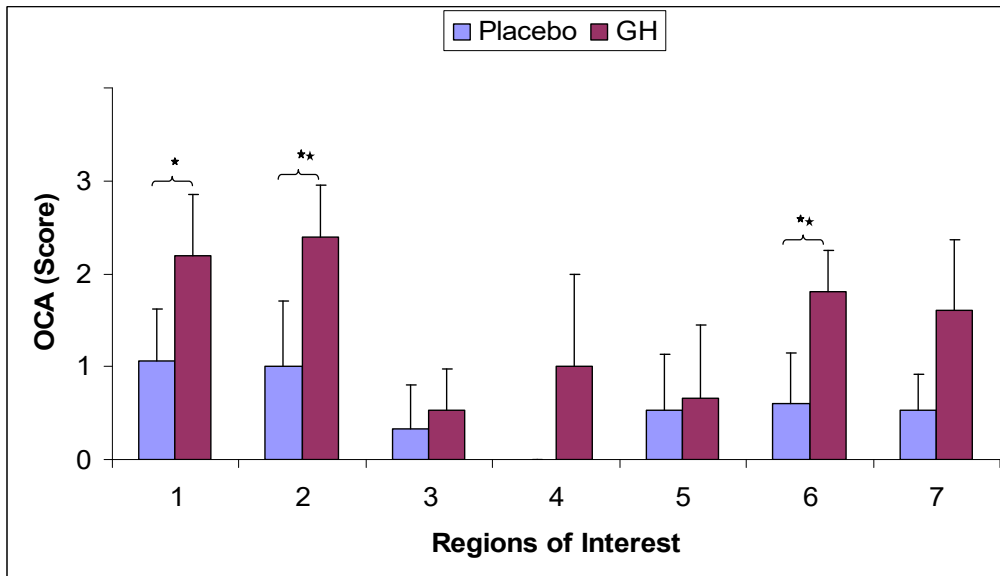
In der Placebo-Gruppe zeigte sich eine Abnahme der Syntheseaktivität für Osteocalcin-mRNA in allen ausgewerteten ROI. Während die Abnahme der Signalintensität im Vergleich zum 14. postoperativen Tag in den meisten ROI eher geringfügig war, zeigte sich am 21. postoperativen Tag im Bereich des Markraums keine Signalaktivität.

In der GH-Gruppe ließ sich eine im Vergleich zum 14. postoperativen Tag ähnlich hohe Syntheseaktivität im medialen periostalen Bereich und in beiden Osteotomiespalten detektieren. Im endostalen Bereich sowie im lateralen periostalen Bereich und im Markraum wurde eine tendenzielle Abnahme der Signalintensität beobachtet. Die GH-Gruppe wies am 21. postoperativen Tag ein signifikant stärkeres Auftreten von Osteocalcin-mRNA exprimierenden osteoblastären und osteozytären Zellen im medialen periostalen Bereich sowie in beiden Osteotomiespalten auf (Abb. 3.35, 3.36 und 3.37). Ferner zeigte sich hier eine im Vergleich zur Placebo-Gruppe tendenziell höhere Syntheseaktivität auch in den restlichen ROI.

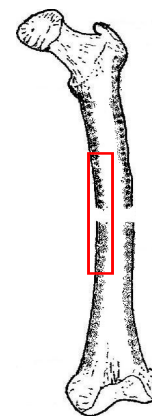
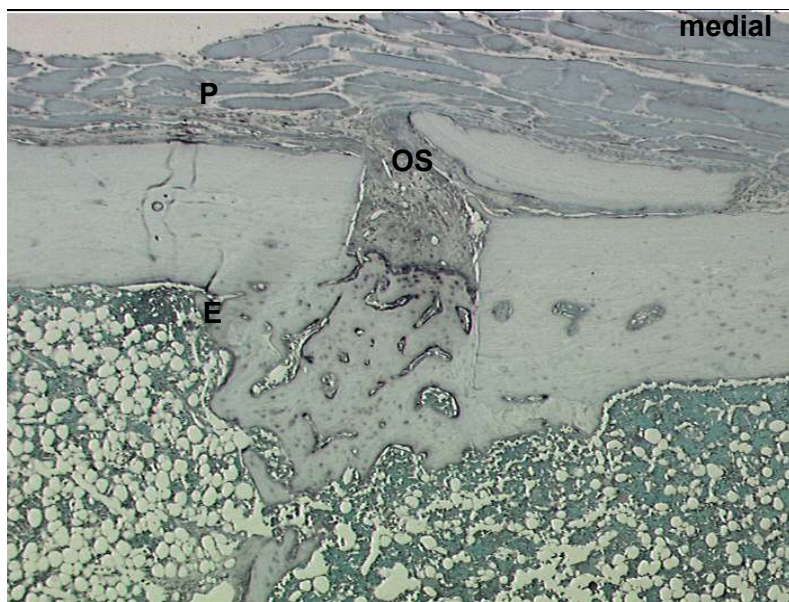
**Tabelle 3.11: Osteocalcin, 21 Tage postoperativ: Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* $p = 0,032$ , \*\* $p = 0,016$**

Osteocalcin 21 Tage postoperativ							
ROI	1	2	3	4	5	6	7
Placebo	1,1 $\pm$ 0,6	1,0 $\pm$ 0,7	0,3 $\pm$ 0,5	0,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,6	0,6 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 0,4
GH	2,2 $\pm$ 0,7*	2,4 $\pm$ 0,6**	0,5 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 1,0	0,7 $\pm$ 0,8	1,8 $\pm$ 0,4**	1,6 $\pm$ 0,8





**Abb. 3.35:** Genexpression von Osteocalcin – mRNA am 21. postoperativen Tag in den einzelnen Regions of Interest. Darstellung anhand eines Fehlerbalkendiagramms. \* $p = 0,032$ , \*\* $p = 0,016$



**Abb. 3.36:** Osteocalcin, Placebo 21 Tage, 50x Vergrößerung: Bei der In Situ Hybridisierung mit Osteocalcin-mRNA zeigte sich in der Placebo-Gruppe eine schwache Signalaktivität sowohl im periostalen, als auch im endostalen Bereich und in den Osteotomiespalten nachweisen. Im Markraum liess sich keine Signalaktivität lokalisieren (P: Periosteal, E: Endosteal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung).

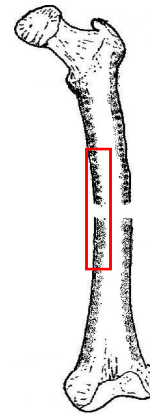
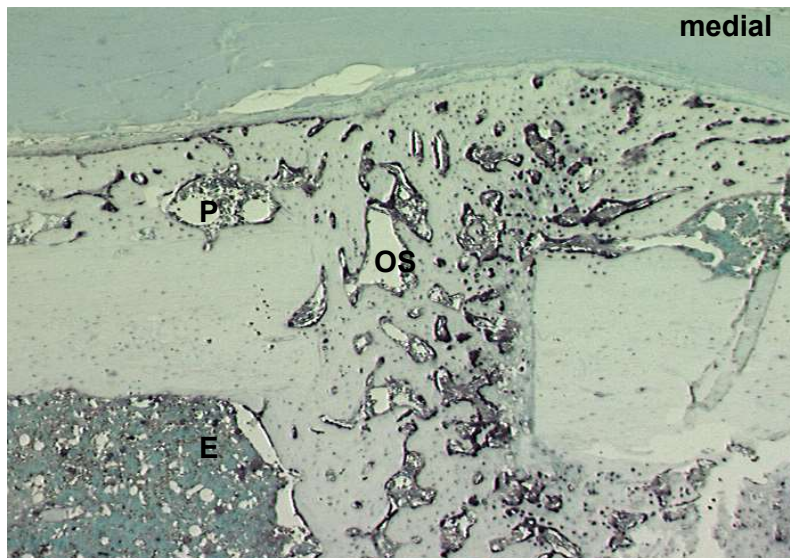


Abb. 3.37: Osteocalcin, GH 21 Tage, 50x Vergrößerung: In der GH-Gruppe fand sich am 21. postoperativen Tag eine annähernd gleich starke Syntheseaktivität von Osteocalcin-mRNA in allen Regions of Interest (P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung).

#### 3.6.4. Osteocalcin im Verlauf der Knochenheilung

In der Folge wird die Expression von Osteocalcin-mRNA mithilfe des deskriptiven 4stufigen Scores im Bereich des Frakturkallus zusammengefasst und über den gesamten Verlauf der Knochenheilung beschrieben.

Der Nachweis von Osteocalcin – mRNA mittels *In Situ Hybridisierung* erbrachte am 7. postoperativen Tag eine signifikant höhere Expression in der GH-Gruppe.

Während in einzelnen *Regions of Interest* im Verlauf eine tendenzielle Zunahme des Signals beobachtet wurde, blieb sie im gesamten Frakturkallus der mit GH behandelten Tieren nahezu gleich. Im Frakturkallus der Placebo – Gruppe ließ sich am 14. postoperativen Tag ebenfalls ein unverändertes Bild erkennen. Am 21. postoperativen Tag wurde in beiden Gruppen eine tendenzielle Abnahme der Signalgebung beobachtet. Die Expression von Osteocalcin – mRNA war in der GH – Gruppe am 21. postoperativen Tag signifikant höher.

**Tabelle 3.12:** Mittelwert des descriptiven Scores für Osteocalcin-mRNA im gesamten Frakturkallus zu den drei untersuchten Zeitpunkten  $\pm$  Standardabweichung, \*  $p^1 = 0,032$ , \*  $p^2 = 0,016$  zwischen der Placebo und GH Gruppe zum angegebenen Zeitpunkt.

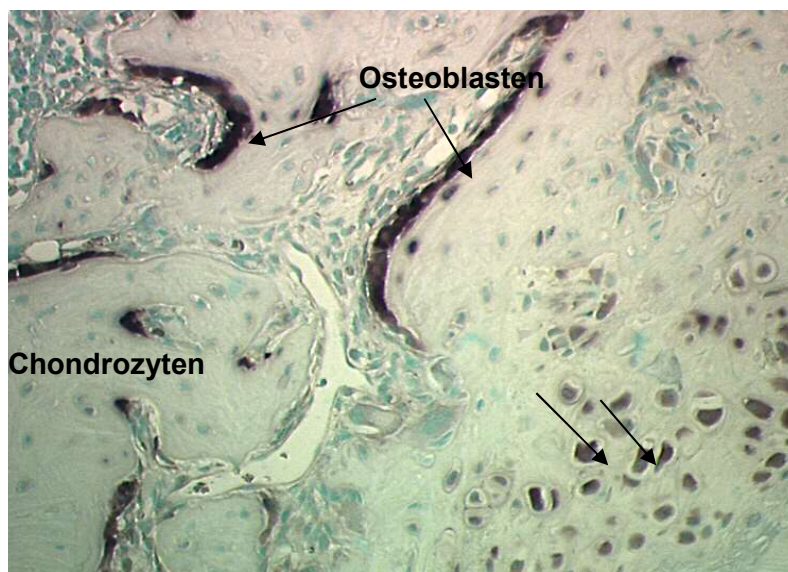
Osteocalcin im Verlauf der Knochenheilung			
Standzeiten	7 Tage nach OP	14 Tage nach OP	21 Tage nach OP
Placebo	0,98 $\pm$ 0,6	1,09 $\pm$ 0,6	0,58 $\pm$ 0,3
GH	1,59 $\pm$ 0,1* <sup>1</sup>	1,79 $\pm$ 0,3	1,46 $\pm$ 0,5* <sup>2</sup>

### 3.7. In Situ Hybridisierung mit Osteonectin - mRNA

Osteonectin (oder SPARC: secreted Protein Acid and Rich in Cystein) ist die häufigste nicht-kollagene Komponente des Knochens.

#### 3.7.1. 7 Tage postoperativ

Bei der *In Situ Hybridisierung* ließ sich sowohl in der Placebo als auch in der GH-Gruppe schon am Tag 7 vermehrt Osteonectin-mRNA nachweisen, welche hauptsächlich in periostalen, dem neugebildeten Geflechtknochen epithelartig angelegten, osteoblastären und osteozytären Zellen zu lokalisieren war. Daneben konnte eine eher schwächere, jedoch deutliche Signalgebung auch in vereinzelt chondrozytären Zellen im periostalen Kallus beobachtet werden (s. Abb. 3.38).

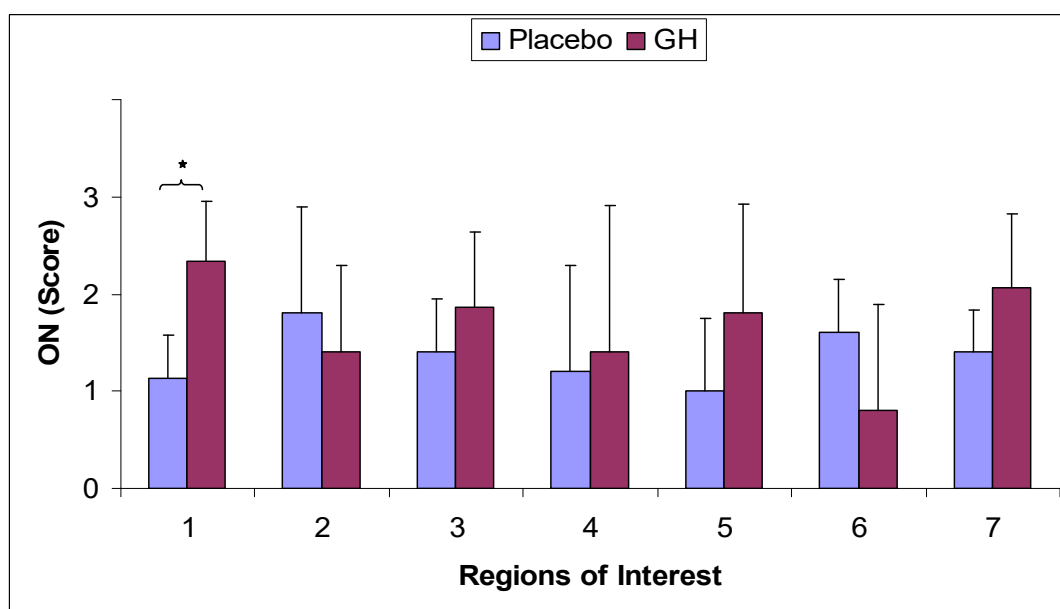


**Abb. 3.38:** Osteonectin, GH 7 Tage, 400x Vergrößerung: Neben stark signalreichen Osteoblasten ließen sich in der GH-Gruppe auch vereinzelte Osteonectin-mRNA exprimierende Chondrozyten nachweisen. Das Signal in den Chondrozyten war im Vergleich zu den mitabgebildeten Osteoblasten geringfügig schwächer.

Während das Signal in beiden Gruppen deutlich und eher diffus verteilt war, konnte anhand des semiquantitativen Scores ein signifikanter Unterschied in der GH-Gruppe - im Vergleich zur Placebo-Gruppe - im Bereich des periostalen Kallus der medialen Femurseite nachgewiesen werden. Desweiteren ließ sich in der GH-Gruppe eine tendenziell stärkere Signalgebung für Osteonectin-mRNA in osteoblastären und osteozytären Zellen des periostalen und endostalen Bereiches der lateralen Femurseite erkennen, verglichen mit dem gleichen Areal der Placebo-Gruppe. In den Osteotomiespalten wurde jedoch ein tendenziell vermehrtes Auftreten von signalpositiven Zellen in der Placebo-Gruppe beobachtet (Abb. 3.39, 3.40 und 3.41).

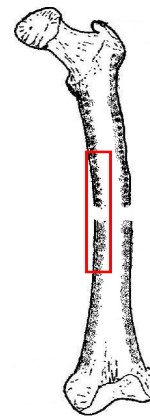
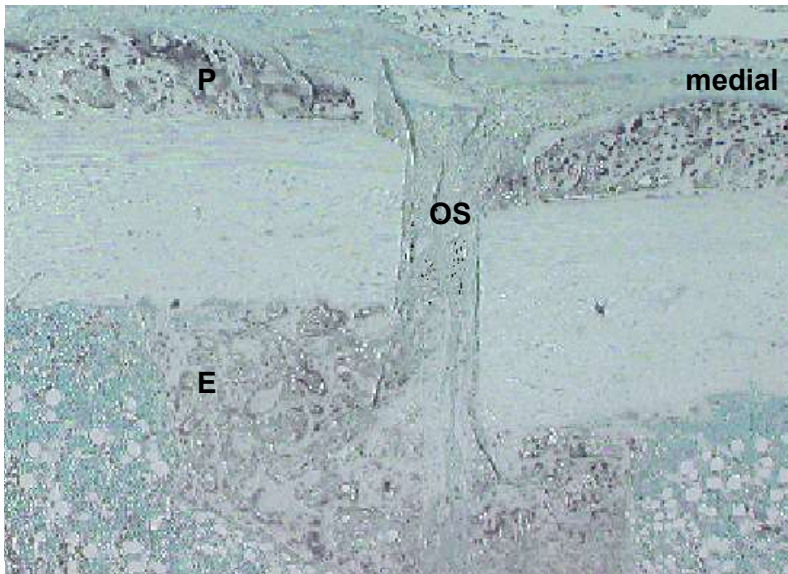
**Tabelle 3.13:** Osteonectin, 7 Tage postoperativ: Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*  $p = 0,032$

Osteonectin 7 Tage postoperativ							
ROI	1	2	3	4	5	6	7
Placebo	1,1 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 1,1	1,4 $\pm$ 0,6	1,2 $\pm$ 1,1	1,0 $\pm$ 0,8	1,6 $\pm$ 0,6	1,4 $\pm$ 0,4
GH	2,3 $\pm$ 0,6*	1,4 $\pm$ 0,9	1,9 $\pm$ 0,8	1,4 $\pm$ 1,5	1,8 $\pm$ 1,1	0,8 $\pm$ 1,1	2,1 $\pm$ 0,8

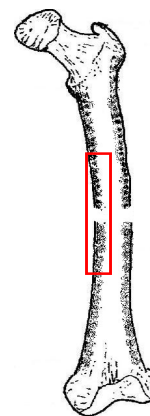
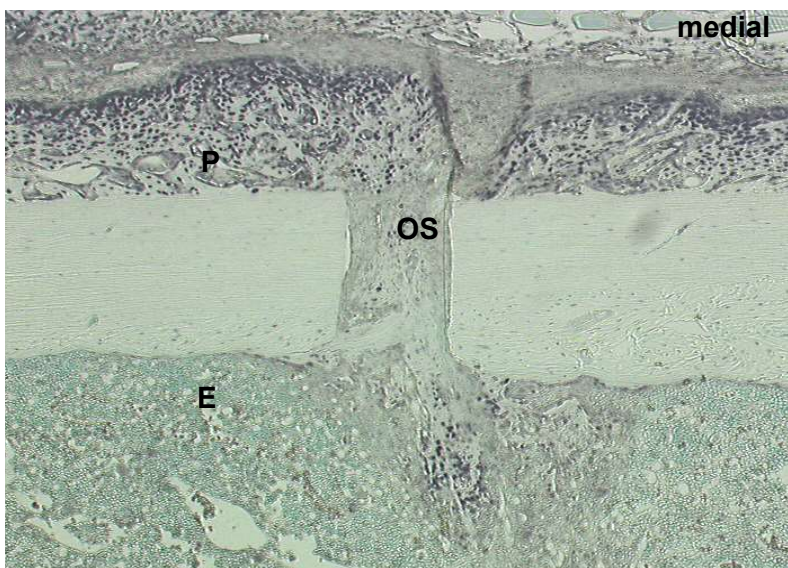


**Abb. 3.39:** Genexpression von Osteonectin - mRNA am 7. postoperativen Tag in den einzelnen Regions of Interest. Darstellung anhand eines Fehlerbalkendiagramms. \* $p = 0,032$





**Abb. 3.40: Osteonectin, Placebo 7 Tage, 50x Vergrößerung:** Schwach bis mässiges Auftreten von Osteonectin-mRNA exprimierenden osteoblastären Zellen in der Placebo-Gruppe (P: periostal, E: endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung)



**Abb. 3.41: Osteonectin, GH 7 Tage, 50x Vergrößerung:** In der GH-Gruppe liess sich eine mässig bis starke Signalgebung im medialen periostalen Bereich nachweisen, welche hauptsächlich in osteoblastären, jedoch vereinzelt auch in chondrozytären Zellen lokalisiert war. Im Osteotomiespalt wurde eine schwache Expression von Osteonectin-mRNA beobachtet (Pfeil: signalpositive Zellen, P: periostal, E: endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung).



### 3.7.2. 14 Tage postoperativ

Am 14. postoperativen Tag zeigte sich in der Placebo-Gruppe eine im Vergleich zum 7. postoperativen Tag tendenziell erhöhte Signalquantität und -qualität im medialen periorstalen Bereich des Femurs. Ferner ließ sich eine leichte Abnahme der Syntheseaktivität in beiden Osteotomiespalten erkennen. In den restlichen *Regions of Interest* blieb die Expression von Osteonectin-mRNA annähernd gleich (Abb. 3.42 und 3.43).

Auf der anderen Seite ließ sich in der GH-Gruppe insbesondere im Bereich der beiden Osteotomiespalten eine deutliche Zunahme der Expression von Osteonectin-mRNA nachweisen. Ebenfalls zeigte sich eine im Vergleich zum 7. postoperativen Tag tendenziell erhöhte Syntheseaktivität in annähernd allen ausgewerteten *Regions of Interest*.

Dadurch wiesen die Tiere der GH-Gruppe am 14. postoperativen Tag eine im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant erhöhte Signalquantität und -qualität im periostalen Bereich der medialen Femurseite sowie in beiden Osteotomiespalten bei tendenziell stärkerer Expression von Osteonectin-mRNA auch in den periostalen und endostalen Arealen lateral (Abb. 3.44).

Osteonectin-mRNA wurde auch in diesem Zeitpunkt von osteoblastären und insbesondere von osteozytären Zellen des neugebildeten Geflechtknorpels exprimiert. In manchen Fällen wurde jedoch Osteonectin-mRNA auch in proliferativen Chondrozyten insbesondere in der Placebo-Gruppe nachgewiesen.

**Tabelle 3.14:** Osteonectin, 14 Tage postoperativ: Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \* $p = 0,008$ , \*\* $p = 0,032$

Osteonectin 14 Tage postoperativ							
ROI	1	2	3	4	5	6	7
Placebo	1,5 $\pm$ 0,4	0,8 $\pm$ 0,8	1,1 $\pm$ 0,6	2,0 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 1,1
GH	2,6 $\pm$ 0,3**	2,4 $\pm$ 0,8*	1,4 $\pm$ 0,8	1,6 $\pm$ 1,5	2,1 $\pm$ 0,2	2,6 $\pm$ 0,9*	2,5 $\pm$ 0,4

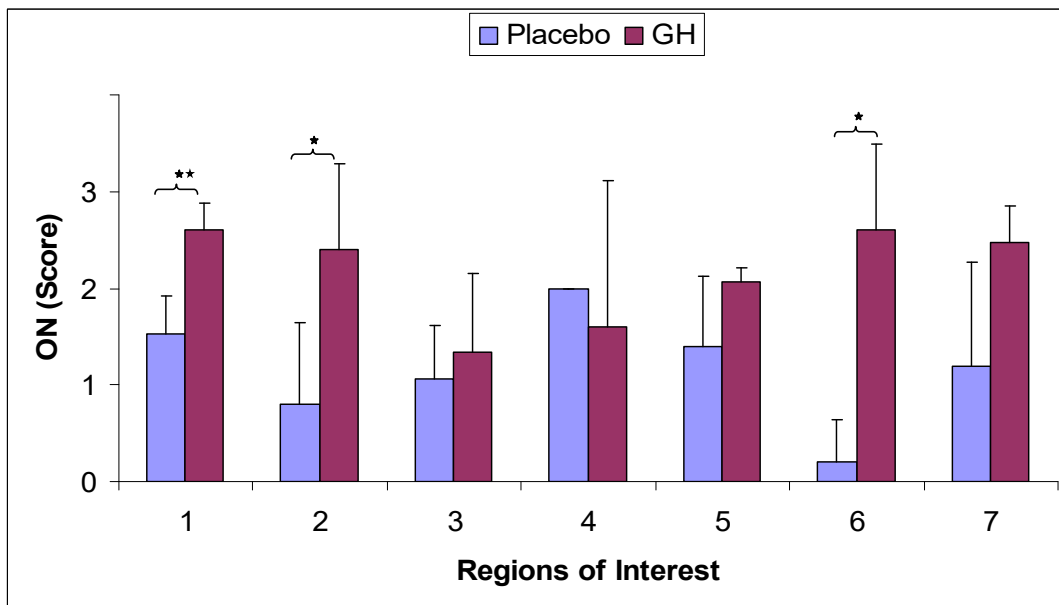


Abb. 3.42: Genexpression von Osteonectin - mRNA am 14. postoperativen Tag in den einzelnen Regions of Interest. Darstellung anhand eines Fehlerbalkendiagramms. \* $p = 0,008$ , \*\* $p = 0,032$

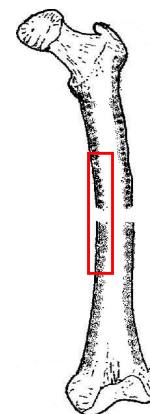
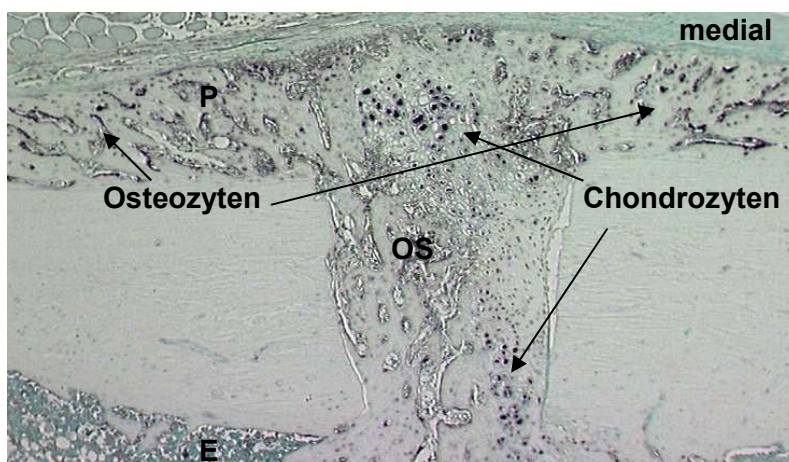
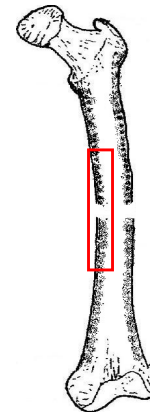
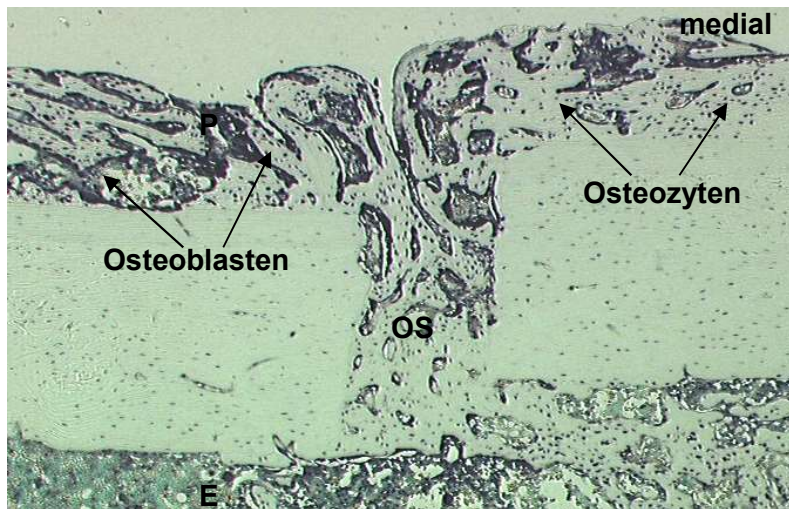


Abb. 3.43: Osteonectin, Placebo 14 Tage, 50x Vergrößerung: Schwaches bis mässiges Auftreten von ON-mRNA exprimierenden Zellen im periostalen Bereich insb. mediallyseits zu erkennen, welches zum Osteotomiespalt deutlich abnimmt. Auch Chondrozyten waren in der Lage, ON-mRNA zu exprimieren (P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung)



**Abb. 3.44: Osteonectin, GH 14 Tage, 50x Vergrößerung: Starke Signalaktivität für ON-mRNA in der GH-Gruppe 14 Tage postoperationem im medialen periostalen Bereich und im Osteotomiespalt. Das Signal ist hauptsächlich in osteoblastären und osteozytären Zellen lokalisiert (P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung).**

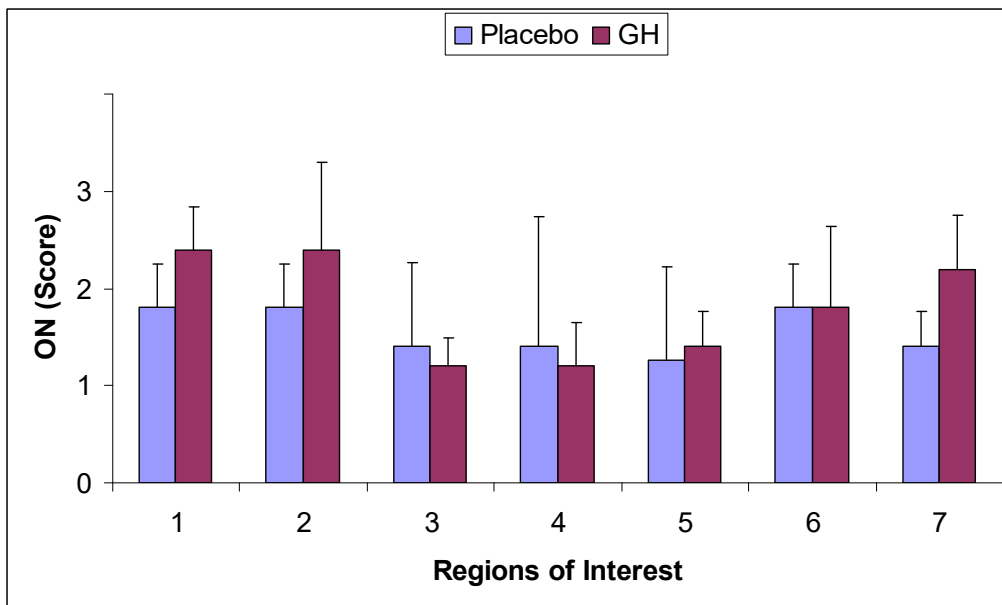
### 3.7.3. 21 Tage postoperativ

Die *In Situ Hybridisierung* mit Osteonectin-mRNA ergab eine deutliche Zunahme der Syntheseaktivität im Bereich der beiden Osteotomiespalten der Placebo-Gruppe. In den weiteren *Regions of Interest* blieb die Signalintensität annähernd gleich (Abb. 3.45 und 3.46). In der GH-Gruppe ließ sich eine im Vergleich zum 14. postoperativen Tag ähnlich hohe Expression von Osteonectin-mRNA im medialen und lateralen periostalen Bereich sowie im Osteotomiespalt und im endostalen Bereich medialseits bei einer tendenziellen Abnahme der Syntheseaktivität im Osteotomiespalt und endostal lateral (Abb. 3.47).

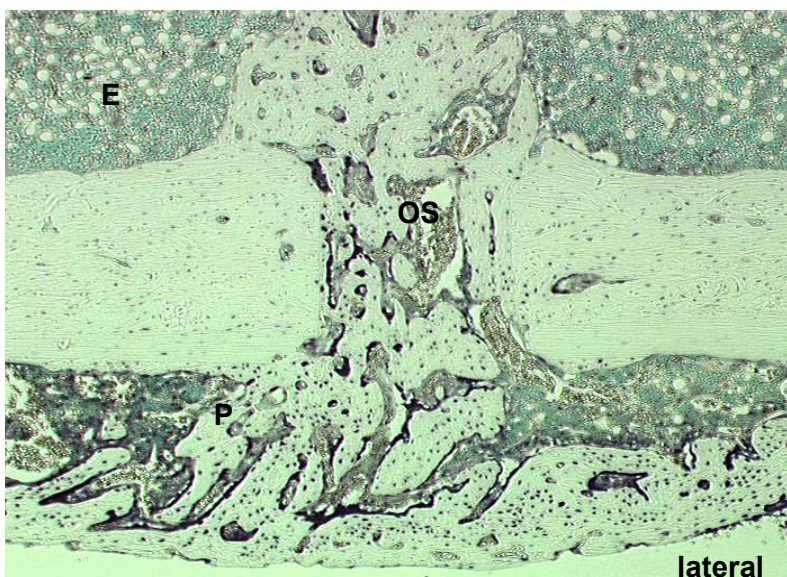
Signifikante Unterschiede zwischen der Placebo und der GH-Gruppe wurden am 21. postoperativen Tag nicht beobachtet.

**Tabelle 3.15: Osteonectin, 21 Tage postoperativ: Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.**

Osteonectin		21 Tage postoperativ					
ROI	1	2	3	4	5	6	7
Placebo	1,8 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,9	1,4 $\pm$ 1,3	1,3 $\pm$ 0,9	1,8 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,6
GH	2,4 $\pm$ 0,4	2,4 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,8	2,2 $\pm$ 0,6

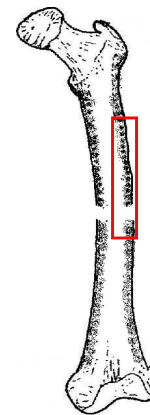
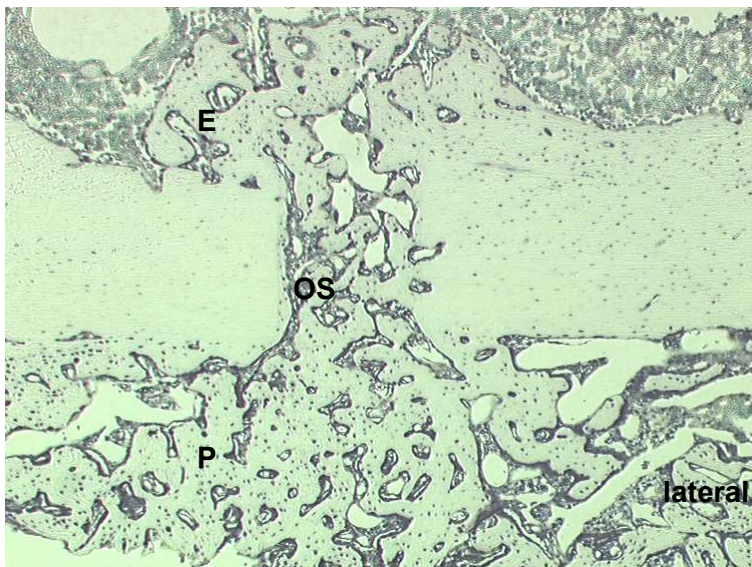


*Abb. 3.45: Genexpression von Osteonectin-mRNA am 21. postoperativen Tag in den einzelnen Regions of Interest. Darstellung anhand eines Fehlerbalkendiagramms.*



*Abb. 3.46: Osteonectin, Placebo 21 Tage, 50x Vergrößerung: Deutliche Expression von Osteonectin-mRNA v. a. Im Bereich des Osteotomiespaltes (P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, laterale Femurseite – eigene Femurzeichnung).*





**Abb. 3.47.: Osteonectin, GH 21 Tage, 50x Vergrößerung:** Deutliche Signalgebung in osteoblastären und osteozytären Zellen, die Knochenheilung ist nahezu vollständig abgeschlossen. (P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, laterale Femurseite – eigene Femurzeichnung).

#### 3.7.4. Osteonectin im Verlauf der Knochenheilung

Im Folgenden wird die Expression von Osteonectin-mRNA anhand des Mittelwertes des descriptiven 4stufigen Scores im gesamten Frakturkallus der jeweiligen Gruppe dargestellt und über den Verlauf beschrieben.

Am 7. postoperativen Tag fand sich sowohl in der Placebo als auch in der GH-Gruppe eine annähernd gleich starke Expression von Osteonectin-mRNA. Im Verlauf kam es in der Placebo-Gruppe zu einer tendenziellen Abnahme der Signalintensität in den beiden Osteotomiespalten, welche dann bis zum 21. postoperativen Tag wieder anstieg. In der GH-Gruppe wurde am 14. postoperativen Tag eine tendenzielle Zunahme der ON-Expression beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt fand sich eine im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant höhere Signalgebung, welche jedoch am 21. postoperativen Tag tendenziell abnahm.

**Tabelle 3.16:** Mittelwert des descriptiven Scores für Osteonectin-mRNA im gesamten Frakturkallus zu den drei untersuchten Zeitpunkten  $\pm$  Standardabweichung  
\*  $p = 0,008$  zwischen der Placebo und GH Gruppe am 14. postoperativen Tag.

Osteonectin im Verlauf der Knochenheilung			
Standzeiten	7 Tage nach OP	14 Tage nach OP	21 Tage nach OP
Placebo	1,4 $\pm$ 0,5	1,2 $\pm$ 0,3	1,5 $\pm$ 0,5
GH	1,7 $\pm$ 0,7	2,2 $\pm$ 0,3*	1,9 $\pm$ 0,3

### 3.8 *In Situ Hybridisierung mit $\alpha_1$ Kollagen Typ II - mRNA*

Die Analyse der Genexpression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II erfolgte qualitativ, mithilfe eines Lichtmikroskops und einer speziell dafür entwickelten Bildanalyse Software. Dies ermöglichte die genaue Auszählung der positiven Zellen und somit die Bestimmung der absoluten Zellzahl pro *Region of Interest*.

Als typischer Marker für chondrozytäre Zellen, wurde  $\alpha_1$  Kollagen Typ II – mRNA ausschließlich von chondrozytären und chondroblastären Zellen exprimiert.

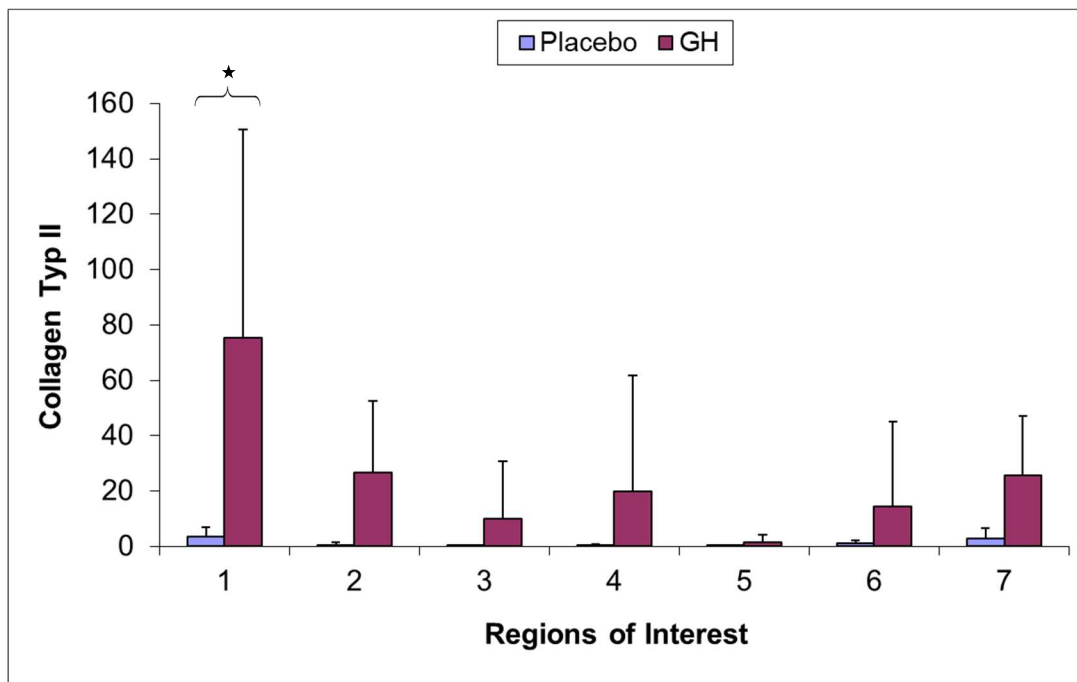
#### 3.8.1. 7 Tage postoperativ

Am 7. Tag der Knochenheilung war in der Placebo-Gruppe nahezu keine  $\alpha_1$  Kollagen Typ II - mRNA detektierbar. Lediglich vereinzelte, chondrozytenreiche Areale wurden in den periostalen Reaktionen sowohl der lateralen als auch der medialen Femurseite beobachtet.

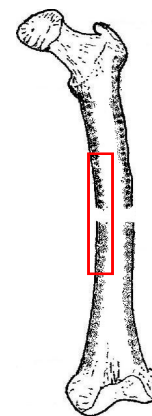
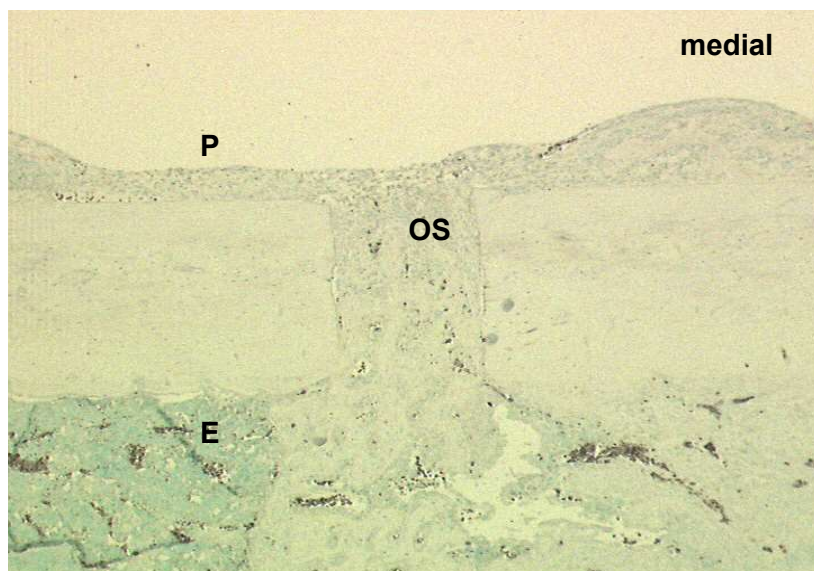
Im Gegensatz dazu fanden sich in der GH-Gruppe chondrozytenreiche Areale mit einer starken Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II – mRNA nahezu im gesamten Präparat. Signifikante Unterschiede waren im periostalen Bereich medial zu verzeichnen. Tendenziell war jedoch in allen Regions of Interest ein stärkeres Auftreten von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II – mRNA exprimierenden chondrozytären Zellen zu beobachten (Abb. 3.48, 3.49 und 3.50).

***Tabelle 3.17:  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, 7 Tage postoperativ: Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*  $p = 0,008$***

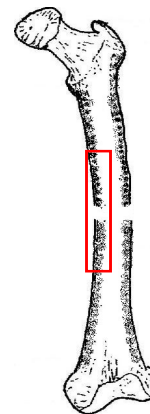
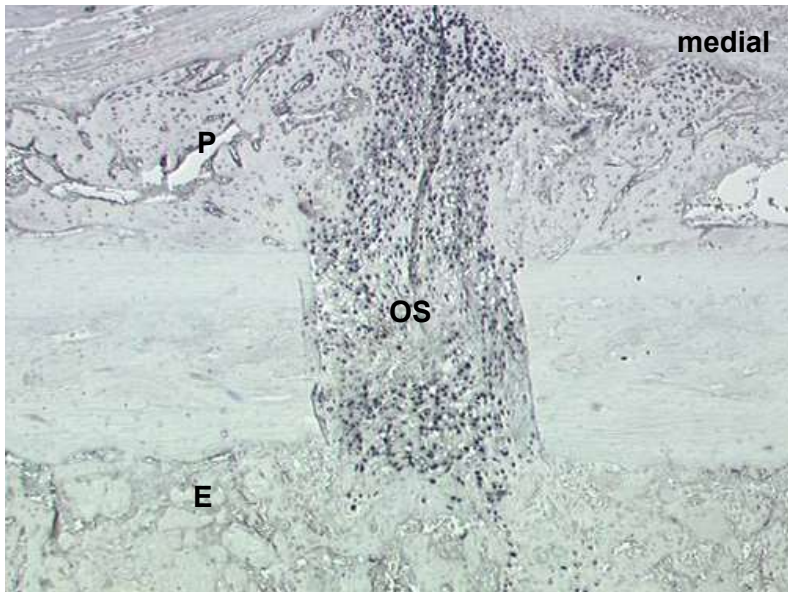
$\alpha_1$ Kollagen Typ II 7 Tage postoperativ							
ROI	1	2	3	4	5	6	7
Placebo	3,33 $\pm$	0,40 $\pm$	0,07 $\pm$	0,20 $\pm$	0,07 $\pm$	1,20 $\pm$	2,80 $\pm$
	3,5	0,9	0,2	0,5	0,2	1,1	3,9
GH	75,27 $\pm$	26,60 $\pm$	9,93 $\pm$	19,80 $\pm$	1,60 $\pm$	14,40 $\pm$	25,53 $\pm$
	75,4*	25,8	20,8	42,0	2,6	30,6	21,4



**Abb. 3.48:** Genexpression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II – mRNA am 7. postoperativen Tag in den einzelnen Regions of Interest. Darstellung anhand eines Fehlerbalkendiagramms. \* $p = 0,008$

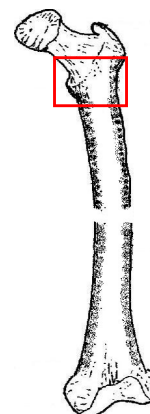
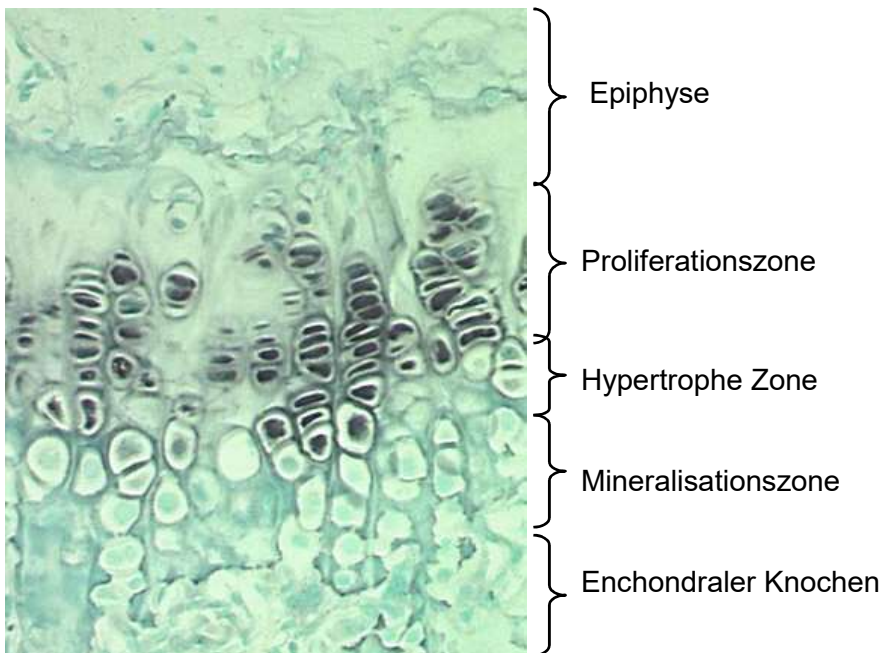


**Abb. 3.49**  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, Placebo 7 Tage, 50x Vergrößerung: Am 7. postoperativen Tag konnte in der Placebo-Gruppe nahezu keine  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA nachgewiesen werden. In der In Situ Hybridisierung mit  $\alpha_1$  Kollagen Typ II wurden in der Placebo-Gruppe lediglich vereinzelte chondrozytenreiche Areale insbesondere im periostalen Bereich und im Osteotomiespalt lokalisiert, welche  $\alpha_1$  Kollagen Typ II exprimierten (Pfeil: Chondrozytenreiche Areale, P: periosteal, E: endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung)



**Abb. 3.50:**  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, GH 7 Tage, 50x Vergrößerung: Starkes Auftreten von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA exprimierenden Chondrozyten im periostalen Bereich und im Osteotomiespalt insbesondere der medialen Seite am 7. postoperativen Tag (Pfeil: signalreiche Chondrozyten, P: periostal, E: endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung)

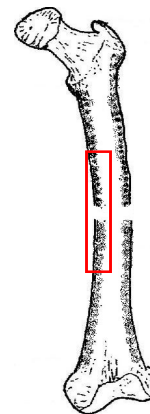
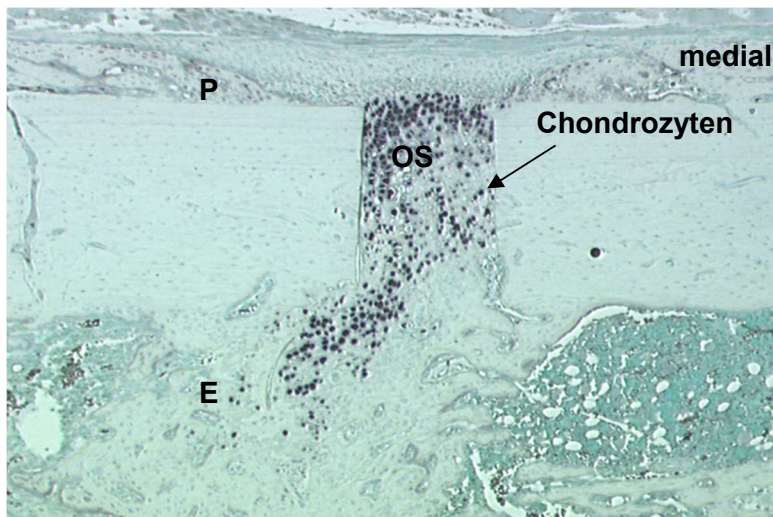
Die Epiphysenfuge war sowohl in der Placebo- als auch in der GH-Gruppe stets positiv (Abb. 3.51).



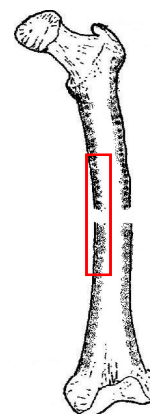
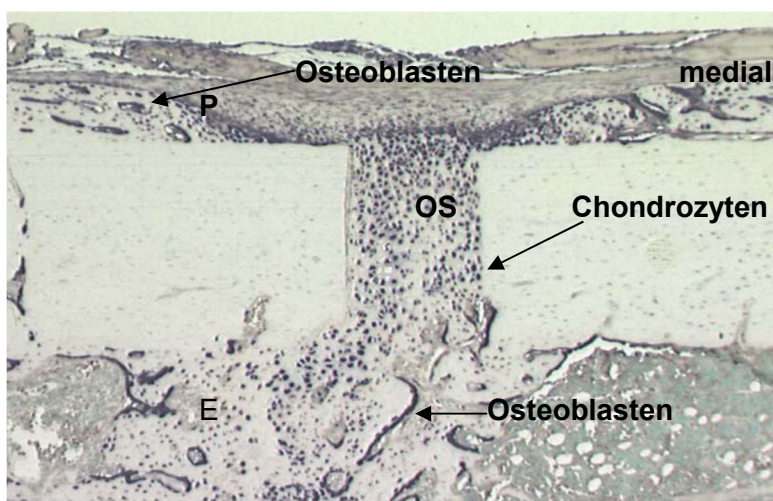
**Abb. 3.51:**  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, GH 7 Tage, 400x Vergrößerung: Epiphysenfuge eines mit GH-behandelten Tieres 7 Tage postoperativ. Die  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA exprimierenden Chondrozyten sind deutlich zu erkennen (Pfeil).



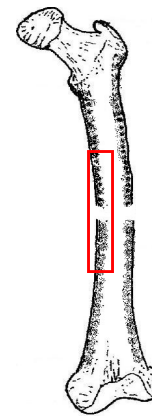
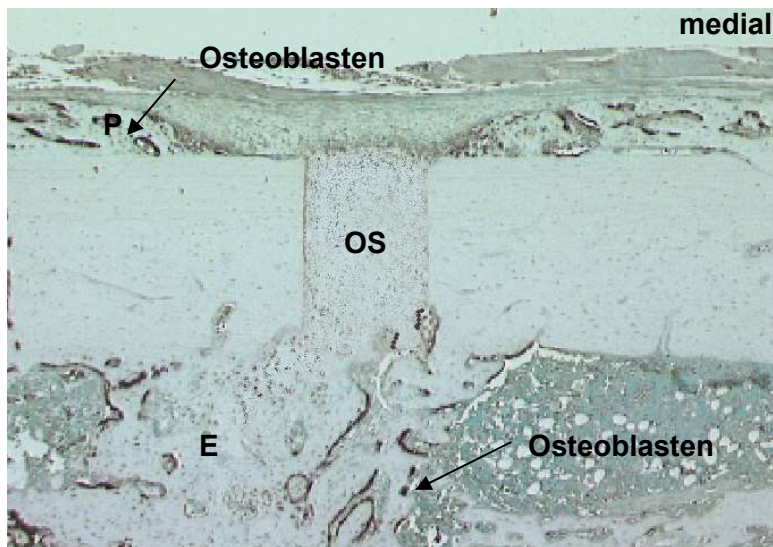
In der mit GH-behandelten Gruppe dieser Phase der Knochenheilung zeigten sich chondrozytäre Zellen im neu gebildeten Knorpel zwischen den beiden Kortikalisenden, die in der Lage waren sowohl  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA als auch  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA bei der *In Situ Hybridisierung* zu exprimieren. Beim Versuch mit Osteocalcin-mRNA blieben diese Zellen negativ. Lediglich eine leichte Hintergrundfärbung in den chondrozytären Zellen konnte bei starkem Signal in den osteoblastären Zellen beobachtet werden (s. Abb. 3.52, 3.53 und 3.54).



**Abb. 3.52:  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, GH 7 Tage, 50x Vergrößerung:** Starke Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II – mRNA in chondrozytären Zellen des medialen Osteotomiespaltes (Pfeil: Signalreiche Chondrozyten, P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung)



**Abb. 3.53:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, GH 7 Tage, 50x Vergrößerung:** Die chondrozytären Zellen sind in der Lage beide Kollagentypen zu exprimieren. Die  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA positive Osteoblasten sind bei der *In situ Hybridisierung* mit  $\alpha_1$  Kollagen Typ II- mRNA negativ (Pfeil: Signalreiche Chondrozyten bzw. Osteoblasten, P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung)



**Abb. 3.54: Osteocalcin, GH 7 Tage, 50x Vergrößerung:** *In situ Hybridisierung mit Osteocalcin – mRNA. Die osteoblastären Zellen zeigen eine starke Expression. In den o. b. chondrozytären Zellen läßt sich lediglich eine diffuse Hintergrundfärbung beobachten (Pfeil: Signalreiche Osteoblasten, P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung)*

### 3.8.2. 14 Tage postoperativ

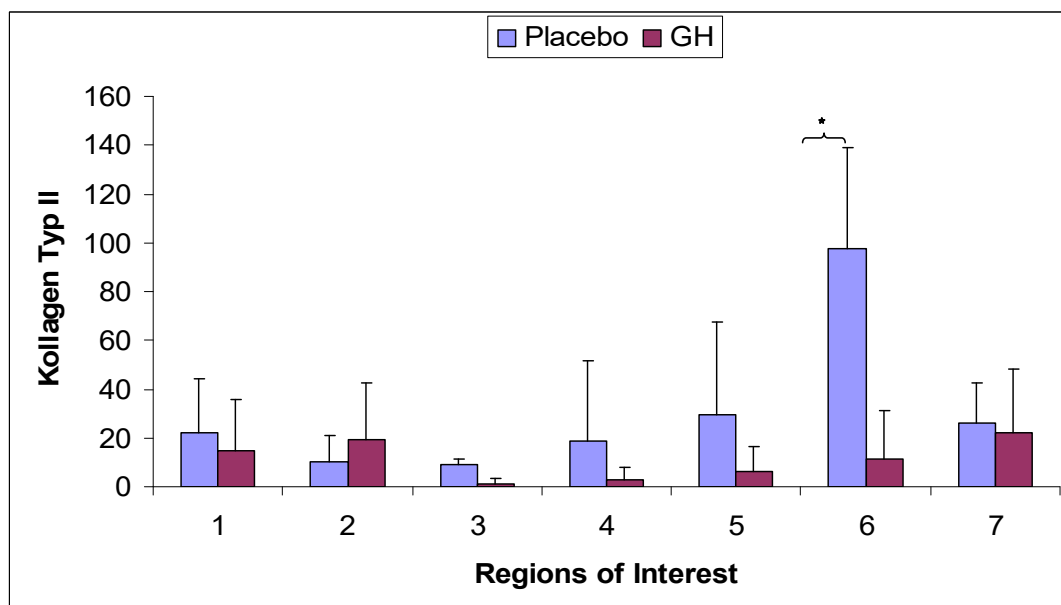
Das histologische Bild der mit Placebo behandelten Tiere war am 14. postoperativen Tag durch die erhöhte Proliferation und Differenzierung von chondrozytären Zellen und somit die Ausbildung von Knorpelgewebe, insbesondere im lateralen Osteotomiespalt charakterisiert. Die Placebo-Gruppe befindet sich in der Phase der Chondrogenese. Die Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA erreichte in der Placebo-Gruppe am 14. postoperativen Tag ihr Maximum (Abb. 3.56).

Im Gegensatz dazu wurde in den mit GH-behandelten Tieren eine zunehmende Verdrängung bzw. ein sukzessiver Ersatz des bereits am 7. postoperativen Tag gebildeten Knorpelgewebes durch Geflechtknochen, was den Übertritt in die enchondrale Osteogenese gekennzeichnet. Die nachgewiesenen chondrozytären Zellen waren im Vergleich zum 7. postoperativen Tag deutlich weniger. Somit nahm am 14. postoperativen Tag die Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA in der GH-Gruppe deutlich ab (Abb. 3.57).

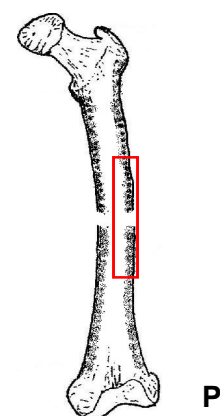
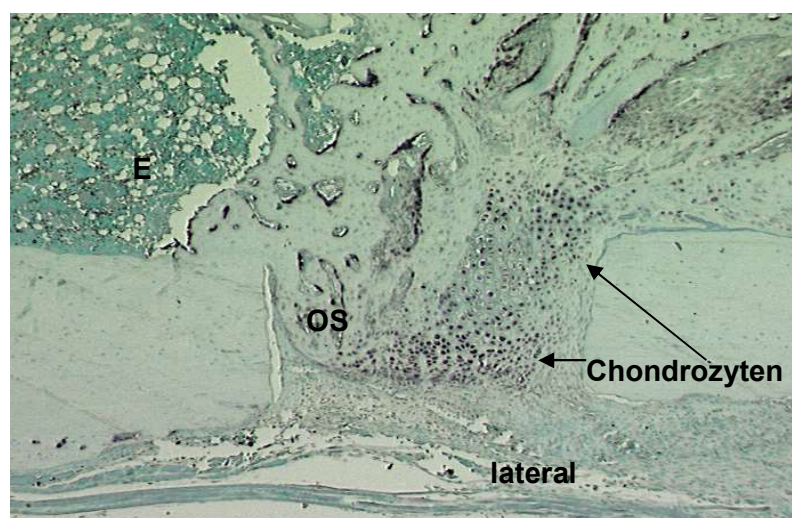
In der Placebo-Gruppe wurde eine im Vergleich zur GH-Gruppe signifikant höhere Syntheseaktivität von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA im Osteotomiespalt der lateralen Femurseite beobachtet (Abb. 3.55).

**Tabelle 3.18:**  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, 14 Tage postoperativ: Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung, \*  $p = 0,008$

$\alpha_1$ Kollagen Typ II		14 Tage postoperativ						
ROI	1	2	3	4	5	6	7	
Placebo	22,13 $\pm$	10,40 $\pm$	9,07 $\pm$	18,60 $\pm$	29,47 $\pm$	97,80 $\pm$	26,20 $\pm$	
	22,4	10,4	2,00	33,3	38,2	41,0*	16,3	
GH	14,93 $\pm$	19,40 $\pm$	1,00 $\pm$	3,00 $\pm$	6,00 $\pm$	11,60 $\pm$	22,33 $\pm$	
	20,7	23,1	2,2	5,2	10,2	19,5	26,1	



**Abb. 3.55:** Genexpression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA am 14. postoperativen Tag in den einzelnen Regions of Interest. Darstellung anhand eines Fehlerbalkendiagramms. \* $p = 0,008$ .



**Abb. 3.56:**  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, Placebo 14 Tage, 50x Vergrößerung: Insbesondere im lateralen Osteotomiespalt zeigte sich in der Placebo-Gruppe 14 Tage postoperativ eine hohe Signalaktivität für  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA (P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung)



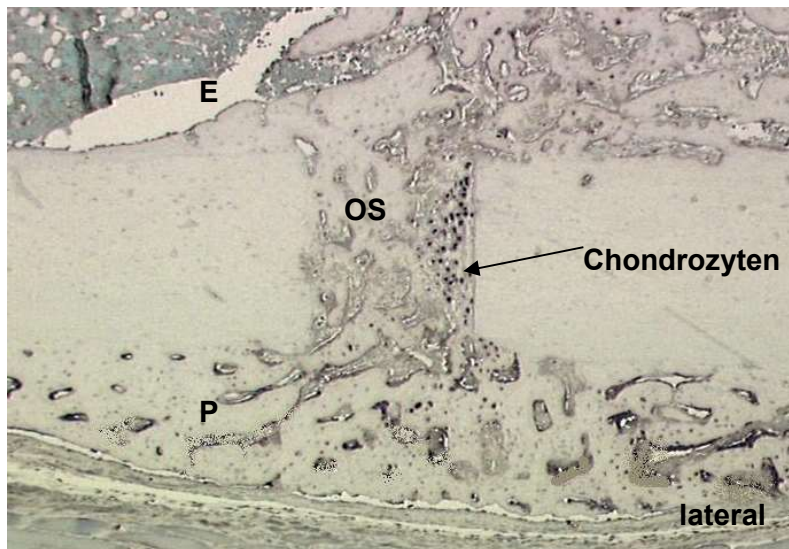


Abb. 3.57:  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, GH 14 Tage, 50x Vergrößerung: Der Frakturspalt in der GH-Gruppe ist 14 Tage postoperativ ist zu einem großen Teil verknöchert, so dass der Chondrozytenanteil und somit auch die Signalaktivität für  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA deutlich abnehmen (P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung)

### 3.8.3. 21 Tage postoperativ

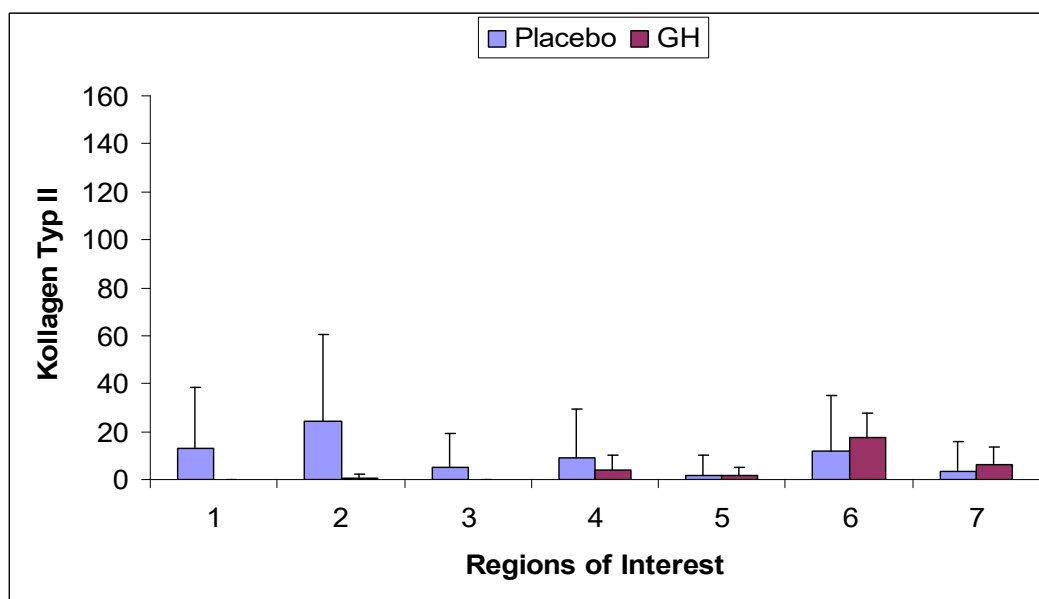
Im weiteren Verlauf der Knochenheilung zeigte sich in der Placebo-Gruppe eine deutliche Regression des gebildeten Knorpelgewebes bei zunehmender Bildung von Geflechtknochen, im Rahmen der enchondralen Osteogenese. Infolge dessen wurde ein deutlicher Rückgang der  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA exprimierenden chondrozytären Zellen in der Placebo-Gruppe beobachtet. Dies war insbesondere auf der lateralen Femurseite ersichtlich. Lediglich im medialen Osteotomiespalt war eine überhängende Präsenz chondrozytärer Zellen zu erkennen (Abb. 3.59).

In der GH-Gruppe ließ sich eine deutliche Abnahme der Signalintensität für  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA schon am 14. postoperativen Tag nachweisen. Am 21. Tag zeigten sich lediglich vereinzelte,  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA exprimierende chondrozytäre Zellen (Abb. 3.60).

Durch die deutliche Abnahme der Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA ließen sich zwischen der Placebo und GH-Gruppe zu diesem Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede erkennen (Abb. 3.58).

**Tabelle 3.19:**  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, 21 Tage postoperativ: Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

$\alpha_1$ Kollagen Typ II 21 Tage postoperativ							
ROI	1	2	3	4	5	6	7
Placebo	12,93 $\pm$ 25,3	24,20 $\pm$ 36,4	4,93 $\pm$ 14,3	9,00 $\pm$ 20,1	1,87 $\pm$ 8,0	12,00 $\pm$ 23,1	3,53 $\pm$ 12,1
GH	0,00 $\pm$ 0,0	0,80 $\pm$ 1,3	0,00 $\pm$ 0,0	3,80 $\pm$ 6,5	1,53 $\pm$ 3,5	17,40 $\pm$ 10,3	6,07 $\pm$ 7,3



**Abb. 3.58:** Genexpression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II – mRNA am 21. postoperativen Tag in den einzelnen Regions of Interest. Darstellung anhand eines Fehlerbalkendiagramms.

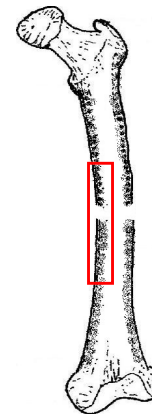
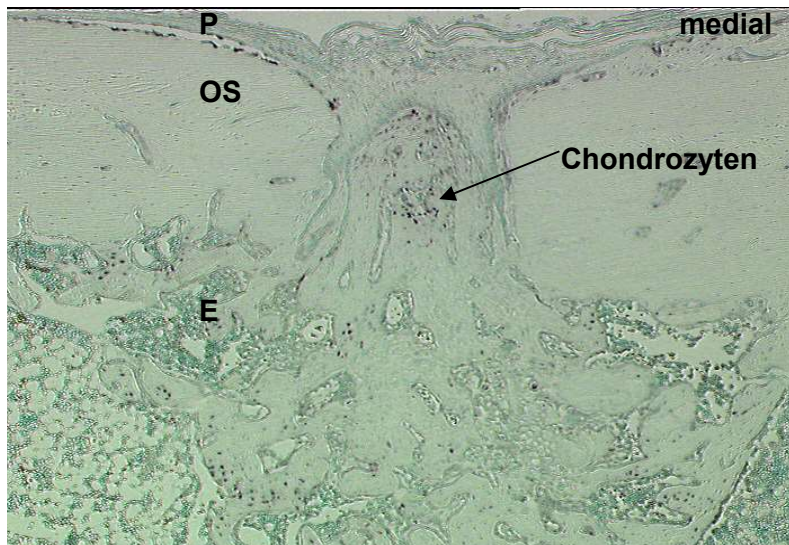


Abb. 3.59:  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, Placebo 21 Tage, 50x Vergrößerung: Lediglich im Osteotomiespalt der Placebo-Gruppe exprimierten vereinzelte Chondrozyten  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA (P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung)

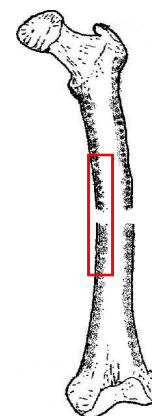
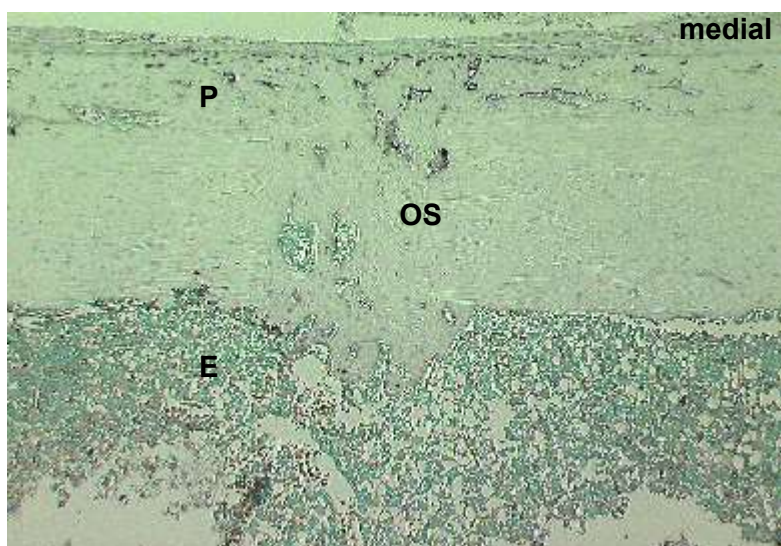


Abb. 3.60:  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, GH 21 Tage, 50x Vergrößerung: Der Osteotomiespalt ist am 21. postoperativen Tag in der GH-Gruppe vollständig knöchern durchbaut, so dass sich eine Signalaktivität für  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA bei fehlenden Chondrozyten nicht mehr nachweisen ließ (P: Periostal, E: Endostal, OS: Osteotomiespalt, mediale Femurseite – eigene Femurzeichnung)

#### 3.8.4. $\alpha_1$ Kollagen Typ II im Verlauf der Knochenheilung

Im Folgenden wird die Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II -mRNA anhand des Mittelwertes der signalreichen Zellen/ROI im gesamten Frakturkallus in der jeweiligen Gruppe dargestellt und über den Verlauf beschrieben.

Am 7. postoperativen Tag ließ sich bei der *In Situ Hybridisierung* mit  $\alpha_1$  Kollagen Typ II – mRNA eine signifikant höhere Expression in der GH-Gruppe nachweisen. Im Verlauf kam es zu einer Umkehrung der Signalintensität und zwar zeigte sich in der Placebo-Gruppe eine signifikante Zunahme der Expression, während sie in der GH-Gruppe bis zum 21. postoperativen Tag kontinuierlich abfiel. Die hohe Signalgebung für  $\alpha_1$  Kollagen Typ II – mRNA in den mit Placebo behandelten Tieren nahm dann schließlich am 21. postoperativen Tag auch signifikant ab.

Table 3.20: Mittelwert der  $\alpha_1$  Kollagen Typ II – exprimierenden Zellen/ROI im gesamten Frakturkallus zu den 3 untersuchten Zeitpunkten  $\pm$  Standardabweichung, \* $p = 0,008$  zwischen Placebo und GH Gruppe am 14. postoperativen Tag, \*\* $p^1 = 0,008$  zwischen 7 und 14 Tagestieren und \*\* $p^2 = 0,032$  zwischen 14 und 21 Tagestieren in der Placebo-Gruppe, \*\* $p^3 = 0,016$  zwischen 14 und 21 Tagestieren in der GH Gruppe.

$\alpha_1$ Kollagen Typ II im Verlauf der Knochenheilung			
Standzeiten	7 Tage nach OP	14 Tage nach OP	21 Tage nach OP
Placebo	1,37 $\pm$ 0,8	25,83 $\pm$ 9,4** <sup>1</sup>	7,66 $\pm$ 10,6** <sup>2</sup>
GH	24,88 $\pm$ 16,6*	11,12 $\pm$ 11,3	2,99 $\pm$ 2,2** <sup>3</sup>



## 4. Diskussion

### 4.1 Arbeitshypothese

Das zentrale Thema der vorliegenden Arbeit war, mögliche Effekte einer systemischen GH-Applikation auf die lokale Synthese von knochenspezifischen Extrazellulären Matrixproteinen während der frühen Knochenheilung zu beschreiben.

Hierzu wurde an einem mittels Fixateur externe stabilisierten Rattenosteotomiemodell Wachstumshormon bzw. Placebo über 21 Tage postoperativ systemisch verabreicht.

Mittels *In Situ Hybridierung* wurde die mRNA Expression von 5 wichtigen Extrazellulären Matrixproteinen am 7., 14. und 21. Tag der Knochenheilung dargestellt:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I und II als Marker osteogener bzw. chondrogener Zellen, Osteocalcin als Marker der Osteoblastenaktivität, Osteonectin und Osteopontin als Marker mineralisierender Zellen.

Es erfolgte eine bildanalytische Auswertung des positiven Signals und eine statistische Gegenüberstellung der GH vs. der Placebo-Gruppe.

Im Einzelnen wurden folgende Fragen untersucht:

- a. Kommt es während der GH stimulierten Knochenheilung zu einer Veränderung der Synthesefähigkeit osteogener bzw. chondrogener Zellen?
- b. Wird die GH - stimulierte Knochenheilung durch eine alterierte Genexpression von knochenzellenspezifischen extrazellulären Matrixproteinen charakterisiert?
- c. Hat die systemische Verabreichung von GH einen Einfluss auf den physiologischen Ablauf der Knochenheilung?

### 4.2 Diskussion der Ergebnisse

Es wurden insgesamt zwei Gruppen (rhGH vs. Placebo) mit jeweils n=15 Ratten (insgesamt n=30) gebildet und untersucht. Die Heilung erfolgte bei allen Tieren per primam, ohne Anhalt für ein lokales oder fortgeleitetes Entzündungsgeschehen.

Auf histologischer Ebene zeigte sich nach Abschluss der initialen Inflammationsphase, am 7. postoperativen Tag in beiden Gruppen, neugebildeter Kallus, welcher hauptsächlich von periostal ausging und sich in Richtung Osteotomiespalt ausbreitete. Dieser war in der

Placebo-Gruppe insgesamt gering ausgeprägt. Stattdessen wurde in der GH-Gruppe eine starke periostale Reaktion mit Ausbildung von hartem Kallus beobachtet, welcher inselartige Strukturen mit einreihig angelegten Osteoblasten aufwies. Zwischen den beiden Kortikalisenden, im weichen Kallus des Osteotomiespaltes, fanden sich insbesondere in der GH-Gruppe chondrogene Zellen vor allem auf der medialen, fixateurfernen Femurseite.

Im weiteren Verlauf zeigte sich in der GH Gruppe ein zunehmender Ersatz des harten und weichen Kallus durch neugebildeten Geflechtknochen. Der knorpelige Anteil nahm rapide ab. Auch in der Placebo-Gruppe fand sich am 14. postoperativen eine zunehmende Verdrängung des bindegewebigen Kallus durch trabekulären Knochen, wenn auch in geringerem Maß. Im Gegensatz zu der GH-Gruppe wurde zu diesem Zeitpunkt eine starke Knorpelbildung im Bereich des Osteotomiespaltes beobachtet.

Nach 21 Tagen war die Knochenheilung in beiden Gruppen nahezu abgeschlossen.

Der oben beschriebene, histologisch dargestellte Ablauf der Knochenheilung steht in Übereinstimmung mit Veröffentlichungen, welche die Frakturheilung bei der Ratte beschreiben <sup>(54, 126)</sup>. Die histologische Beurteilung der mit Wachstumshormon beeinflussten Heilung zeigte eine schnellere Ausbildung und Verknöcherung des Kallus, gekennzeichnet durch ein früheres Auftreten von Knorpelarealen und trabekulärem Knochen. Dies lässt vermuten, dass die systemische Applikation von Wachstumshormon eventuell zu einer beschleunigten Abfolge der Phasen der Knochenheilung und einem beschleunigten Remodeling des Kallus des frakturierten Knochens führt. Chondrogenese, enchondrale Osteogenese und Remodeling scheinen, unter Einfluss des Wachstumshormons im Vergleich zur Placebo-Gruppe zu einem früheren Zeitpunkt einzusetzen.

Bei der *In Situ Hybridisierung* mit  $\alpha_1$  Kollagen Typ I zeigte sich, dass es bei den Tieren, welche mit Wachstumshormon behandelt wurden, im Vergleich zur Placebo-Gruppe, zu einem früheren und vor allem stärkeren Auftreten von osteoblastären Zellen kam. Bereits am 7. postoperativen Tag fand sich eine signifikant höhere Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, insbesondere im Bereich des medialen und lateralen periostalen Kallus.

Am 14. postoperativen Tag fand sich in der mit Wachstumshormon behandelten Gruppe weiterhin eine signifikant stärkere Signalgebung. Diese wurde vor allem im periostalen und endostalen Bereich der medialen Seite sowie im lateralen Osteotomiespalt beobachtet.

Nach 21 Tagen zeigte sich in der Wachstumshormongruppe eine tendenzielle Abnahme der Syntheseaktivität für  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, insbesondere im endostalen Bereich beider Seiten bei einer signifikanten Abnahme dieser in der Placebo-Gruppe. Die Expression von  $\alpha_1$  Kollagen

Typ I war in der Wachstumshormongruppe im Bereich beider Osteotomiespalten signifikant höher.

Die *In Situ Hybridisierung* mit Osteocalcin-mRNA zeigte ein ähnliches Verteilungsmuster. Nach 7 Tagen fand sich in der Wachstumshormongruppe eine signifikant stärkere Expression von Osteocalcin-mRNA, welches insbesondere im periostalen Bereich sowohl lateral als auch medial ersichtlich war.

14 Tage postoperationem zeigte sich in der mit Wachstumshormon behandelten Gruppe eine tendenzielle Zunahme der Syntheseaktivität für Osteocalcin-mRNA, vor allem im Bereich beider Osteotomiespalten. Es konnte eine signifikant erhöhte Expression von Osteocalcin mRNA periostal der medialen Femurseite und im lateralen Osteotomiespalt der GH stimulierten Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe.

Nach 21 Tagen blieb die Expression von Osteocalcin-mRNA in der Wachstumshormongruppe nahezu gleich, während sie in der Placebo-Gruppe tendenziell abfiel. Die Syntheseaktivität für Osteocalcin-mRNA war in der GH-Gruppe signifikant höher im Osteotomiespalt beidseits und periostal medial.

$\alpha_1$  Kollagen Typ I und Osteocalcin sind Proteine, die von osteogenen Zellen produziert werden und daher häufig zur Identifizierung von Osteoblasten und Osteozyten sowie als wichtige Marker für die Kontrolle des Verlaufs der Knochenheilung und des Knochenwachstums in molekularbiologischen Studien verwendet werden <sup>(12, 60, 63, 78, 86, 87, 88, 104)</sup>.

Die *In Situ Hybridisierung* mit  $\alpha_1$  Kollagen Typ I und Osteocalcin erbrachte, dass die systemische Applikation von Wachstumshormon zu einer signifikant erhöhten Expression dieser Proteine bei einem stärkeren Auftreten von osteogenen Zellen führt. Dies lässt den Schluss zu, dass es während der stimulierten Knochenheilung zu einer positiven Beeinflussung der Proliferation und der Syntheseaktivität osteogener Zellen kommt.

Ferner lässt sich vermuten, dass die systemische Applikation von Wachstumshormon auch die Differenzierung von osteogenen Zellen in reifere, matrixproduzierende Zellen positiv beeinflusst.

Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit zahlreichen *in vitro* Studien. Langdahl et al. konnten nachweisen, dass die Stimulation von humanen Osteoblasten-ähnlichen Zellen mit rekombinantem, humanen Wachstumshormon zu einer Steigerung der Proliferation und Differenzierung dieser Zellen führt <sup>(87)</sup>. Sloopweg et al. und Kassem et al. konnten anhand einer *in vitro* Studie zeigen, dass die Stimulation von osteoblastären Zellen mit

Wachstumshormon zu einer Steigerung der Syntheseaktivität für  $\alpha_1$  Kollagen Typ I und Osteocalcin führt <sup>(80, 152)</sup>.

Doessing et al. konnten 2010 nachweisen, dass die 14tägige, systemische Applikation von rekombinatem Wachstumshormon die Genexpression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA in Muskeln und Sehnen von gesunden, jungen Menschen stimuliert <sup>(38)</sup>. Ein Jahr später schlugen Krusenstjerna-Hafstrø et al. infolge einer in vivo Studie vor,  $\alpha_1$  Kollagen Typ I und Osteocalcin als biochemische Marker zur Detektion von GH Missbrauch einzuführen. Es wurde hierbei nachgewiesen, dass Patienten mit einer operierten Tibiafraktur zu einem signifikant höheren Serumspiegel von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I und Osteocalcin aufweisen, wenn ihnen - während der Knochenheilung - GH verabreicht wird. Der signifikant höhere Serumspiegel ist bis zu 8 ( $\alpha_1$  Kollagen Typ I) bzw. 12 Wochen (Osteocalcin) nach Pausieren der Wachstumshormons nachweisbar <sup>(86)</sup>.

Die Analyse der Osteopontin-mRNA zeigte nach 7 Tagen in der mit Wachstumshormon behandelten Gruppe eine signifikant stärkere Signalintensität, insbesondere im periostalen Bereich der medialen und lateralen Seite.

Am 14. postoperativen Tag ließ sich eine deutliche Abnahme der Expression von Osteopontin-mRNA in der Wachstumshormongruppe feststellen, während die Syntheseaktivität in der Placebo-Gruppe, insbesondere im Bereich der periostalen Reaktionen tendenziell zunahm.

Nach 21 Tagen ließ sich eine Abnahme der Expression von Osteopontin-mRNA sowohl in der Placebo als auch in der Wachstumshormongruppe nachweisen.

Dieses Ergebnis stimmt vollkommen mit einer in vivo Studie überein, die erst vor kurzem (2017) veröffentlicht wurde: Ju et al. zeigten an einem orthodontischen Rattenmodell, dass die systemische Verabreichung von Wachstumshormon zu einem starken Anstieg der Osteopontinexpression am 7. Tag führt, gefolgt von einem signifikanten Abstieg am 10. Tag, im Vergleich zur Placebo-Gruppe <sup>(78)</sup>.

Neben Fibronectin, Bone sialoprotein und Thrombospondin gehört Osteopontin zu den cell-attachment-proteins. Osteopontin soll mit dem CD 44 multifunktionalen Oberflächenglykoprotein interagieren, welches Hyaluronsäure, Fibronectin und  $\alpha_1$  Kollagen Typ I bindet. Ferner soll es über eine Kalzium-Bindungskapazität verfügen <sup>(32)</sup>. Während  $\alpha_1$  Kollagen Typ I und Osteocalcin überwiegend von osteoblastären und osteozytären Zellen gebildet werden, wurde Osteopontin in Osteoblasten und Osteozyten sowie zusätzlich in Osteoklasten nachgewiesen <sup>(39, 72)</sup>, so dass eine potentielle physiologische Rolle von Osteopontin in der Knochenresorption vermutet wird <sup>(72)</sup>.

Mrak et al. konnten 2007 im Rahmen einer *in vitro* Studie nachweisen, dass das Wachstumshormon die Interaktion zwischen Osteoblasten und Osteoklasten reguliert, was vermutlich das Knochenremodeling beschleunigt <sup>(110)</sup>. Ohlsson et al. stellten 1998 das biphasische Model der GH-Wirkung in der Knochenheilung vor. Nach diesem Model kommt es bei der stimulierten Knochenheilung durch Wachstumshormon zunächst zu einer Steigerung der Knochenresorption, welche anschließend von einer erhöhten Knochenformation gefolgt wird. Erst wenn die Knochenformation mehr als die Knochenresorption stimuliert wird (transition point), kommt es zu einer Zunahme der Knochenmasse <sup>(120)</sup>. Dies könnte die Abnahme der Expression der Osteopontin-mRNA in der mit Wachstumshormon behandelten Gruppe im Laufe der Knochenheilung erklären.

Die Auswertung der *In Situ Hybridisierung* mit Osteonectin-mRNA brachte folgendes Ergebnis:

Am 7. postoperativen Tag fand sich in der GH-Gruppe eine stärkere Syntheseaktivität für Osteonectin-mRNA, welche im Bereich des periostalen Kallus medial signifikant - verglichen zur Placebo-Gruppe - war.

Am 14. postoperativen Tag wurde in der GH-Gruppe eine tendenzielle Zunahme der Expression für Osteonectin-mRNA bei einer gleichzeitigen Abnahme in der Placebo-Gruppe und insbesondere in den beiden Osteotomiespalten. Zu diesem Zeitpunkt fand sich in der GH-Gruppe eine signifikant erhöhte Signalquantität und -qualität im lateralen und medialen Osteotomiespat.

Nach 21 Tagen fand sich in der GH-Gruppe eine tendenzielle Abnahme der Syntheseaktivität, während die Syntheseaktivität in der Placebo-Gruppe eher zunahm.

Osteonectin ist ein phosphoryliertes, kalziumbindendes Glykoprotein, welches außer von Osteoblasten noch von Hautfibroblasten, Sehnenzellen und Odontoblasten synthetisiert wird und eine wichtige Rolle in der Initiierung der Mineralisation zu spielen scheint <sup>(39,72,120,141,157)</sup>.

In einer *in vivo* Studie ließ sich ferner feststellen, dass die Produktion von Osteonectin ein Maximum aufweist, wenn der Ossifikationsprozess am aktivsten ist <sup>(141)</sup>. Desweiteren wurde in einer weiteren *in vivo* Studie gezeigt, dass Osteonectin von fibroblastischen und osteoblastären Zellen während rapider Proliferation und Differenzierung exprimiert wird <sup>(62)</sup>.

Die verstärkte Expression von Osteonectin-mRNA in der mit Wachstumshormon behandelten Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe sowie der verspätete Anstieg der Syntheseaktivität für Osteonectin-mRNA in der Placebo-Gruppe weisen daraufhin, dass die durch Wachstumshormon stimulierte Heilung zu einem beschleunigten Remodeling des Kallus führt.

Die *In Situ Hybridisierung* mit  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA erbrachte am 7. postoperativen Tag eine signifikant stärkere Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA in der Wachstumshormongruppe periostal lateral, als Zeichen des Übertritts in die nächste Phase der Knochenheilung, die Chondrogenese, während in der Placebo-Gruppe nahezu kein Signal zu beobachten war.

Nach weiteren 7 Tagen ließ sich das umgekehrte Bild beobachten: Die Syntheseaktivität für  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA nahm in der GH-Gruppe deutlich ab, während sie in der Placebo-Gruppe signifikant anstieg. Gleichzeitig zeigte sich in der GH-Gruppe ein vermehrtes Verdrängen bzw. Ersetzen des Knorpelgewebes durch den neugebildeten Geflechtknochen. Die mit Wachstumshormon behandelte Gruppe befand sich somit in der Phase der enchondralen Ossifikation.

Nach 21 Tagen fand sich in beiden Gruppen eine Abnahme der Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA.

$\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA ist ein Protein, welches typischer Weise von chondrozytären Zellen produziert wird und das häufigste kollagene Protein im Knorpelgewebe darstellt. In *in vitro* Studien wurde bisher gezeigt, dass Wachstumshormon das Wachstum von Knorpelgewebe stimuliert, indem es die Proliferation und Differenzierung chondrogener Progenitorzellen fördert <sup>(120)</sup>. Ferner konnte in einer weiteren *in vivo* Studie nachgewiesen werden, dass die exogene Applikation von Wachstumshormon zum einen zu einer gesteigerten Proliferation von Chondrozyten und zum anderen zu einer erhöhten Syntheseaktivität für  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA führt <sup>(69)</sup>. Der höchste Proliferationsindex konnte sogar schon 24 Stunden nach Applikation des Wachstumshormons erreicht werden.

Die Analyse von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA lässt die Vermutung zu, dass die exogene, systemische Applikation von Wachstumshormon einerseits die Abfolge der unterschiedlichen Phasen der Knochenheilung beschleunigt und andererseits zu einer gesteigerten Proliferation und Differenzierung chondrogener Zellen führt.

Die Unterteilung in *Regions of Interest* sowie ihr Vergleich zwischen den einzelnen Gruppen und Zeitpunkten war wichtig, um die Wirkung des Wachstumshormons genauer darstellen zu können. Es war ersichtlich, dass die Expression von extrazellulären Matrixproteinen in der Placebo-Gruppe eher ein gleiches Verteilungsmuster sowohl im endostalen als auch im periostalen Bereich und im Osteotomiespalt aufweist, während in der mit Wachstumshormon behandelten Gruppe die Expression von extrazellulären Matrixproteinen periostal beginnt und

sich erst im Laufe der Knochenheilung in den Osteotomiespalt und den endostalen Bereich ausdehnt.

Die nachgewiesenen Unterschiede zwischen der lateralen und medialen Seite des Femurs könnten sich durch einen eventuellen Rigiditätsunterschied erklären lassen: Die laterale Seite könnte sich als die Fixateur externe-tragende Seite im Vergleich zur gegenüberliegenden medialen Seite möglicherweise als etwas stabiler erweisen. Mikrobewegungen können an den Kortikalisenden eines Knochendefektes eine enchondrale Ossifikation induzieren, was unter Umständen das signifikant höhere Auftreten von chondrogenen Zellen und somit m-RNA-Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II am 7. postoperativen Tag im medialen periostalen Bereich und tendenziell auch im medialen Osteotomiespalt der GH stimulierten Gruppe erklären könnte <sup>(35)</sup>.

Die vorliegende Arbeit konnte den *in vivo* Einfluss vom Wachstumshormon auf die Bildung extrazellulärer Matrixproteine im Verlauf der frühen Knochenheilung darstellen. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Wachstumshormon seine stimulierende Wirkung durch eine Erhöhung der Synthese von extrazellulären Matrixproteinen entfaltet, die im Falle der osteoblastären Syntheseaktivität ihr Maximum um den 14. postoperativen Tag erreicht und eine längere Expressionsdauer aufweist und im Falle der chondrozytären Syntheseaktivität schon am 7. Tag eintritt, jedoch eine eher kürzere Expressionsdauer hat. Andererseits lässt sich anhand der dargestellten Ergebnisse vermuten, dass die durch Wachstumshormon stimulierte Knochenheilung durch eine Beschleunigung der Zellproliferation und Differenzierung charakterisiert ist.

Diese Ergebnisse unterstützen die biomechanischen und histomorphologischen Ergebnisse vorangegangener *in vivo* Studien und könnten eine Erklärung für die dort gefundene signifikant beschleunigte Knochenheilung, höhere Kallusformation und torsionale Stabilität des frakturierten Knochens im Vergleich zur Kontrollgruppe geben <sup>(2,7,8,9,11,55,58,82,102,115,120)</sup>.

Bak et al. zeigten bereits 1991 im Rahmen einer *in vivo* Studie, dass solche Ratten, welche über die ersten 20 Tage und jene, welche über den gesamten Verlauf der Knochenheilung Wachstumshormon erhielten, eine signifikant höhere Belastbarkeit und Steifigkeit des frakturierten Knochens aufwiesen<sup>(9, 12)</sup>. 2002 haben Bail et al. die Wirkung von GH auf die Distractionsosteogenese von Tibia und Fibula am Schweinmodell histomorphometrisch untersucht. Dabei wurden bei 10 Mikropigs 100  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{Tag}$  rpGH für 25 Tage appliziert vs. 10 Mikropigs, welche über den gleichen Zeitraum Placebo erhielten. Die Untersuchung ergab eine signifikant erhöhte Kallusformation sowie schnellere Ossifikation bei der GH Gruppe <sup>(7)</sup>.



Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Kolbeck et al. ein Jahr später, indem sie die systemische Wirkung von rpGH auf die Knochenheilung von osteotomierten Tibia am Schweinmodell untersuchten. Die GH Gruppe wies dabei bessere torsionale Steifigkeit, fortgeschrittene Kallusformation und höhere Knochenmineralisation auf <sup>(82)</sup>.

Wachstumshormon entfaltet seine Wirkung zum größten Teil über IGF-I. Ferner gibt es zahlreiche Hinweise darauf, dass das Wachstumshormon auch die Freisetzung anderer Wachstumsfaktoren, wie z. B. die von BMPs induziert <sup>(90)</sup>.

Auch für die Applikation von allein oder in Kombination applizierten Wachstumsfaktoren, wie von dem Insulin-like-Growth Faktor-I und -II (*IGF-I und II*), dem Transforming-Growth Faktor- $\beta$  (*TGF- $\beta$* ) und dem Bone Morphogenetic Protein (*BMP*) werden in der Literatur deutliche Effekte auf Knochenstoffwechsel, Wachstumsgeschwindigkeit, Kallusformation und torsionale Stabilität beschrieben.

Langdahl et al. konnten nachweisen, dass die Applikation von IGF-I und -II zu einer signifikant erhöhten Proliferation der stimulierten humanen Osteoblasten-ähnlichen Zellen und Markstromazellen führt. Ferner konnte in dieser Studie auch ein synergistischer Effekt von IGF-I,-II und Wachstumshormon beobachtet werden <sup>(87)</sup>. Ebenfalls haben Sundström et al. 2014 gezeigt, dass die gleichzeitige Verabreichung von GH und IGF-I zu einem signifikant höheren IGF-I Serumspiegel führt, ohne jedoch die endogene GH Sekretion zu kompromitieren. Die kombinierte Therapie erbrachte einen additiven Effekt, was die Knochenmasse betraf, stimulierte jedoch das longitudinale Knochenwachstum weniger, als das GH allein <sup>(158)</sup>. In einem anderen Rattenmodell konnten Wildemann et al. beobachten, dass die simultane lokale Applikation von IGF-I und TGF- $\beta$  mittels beschichteter Plattenosteosynthese zu einer signifikant höheren torsionalen Stabilität des osteotomierten Femurs sowie zu einer beschleunigten Mineralisation des Frakturkallus führt <sup>(180)</sup>. Lind et al. konnten nachweisen, dass das TGF- $\beta$  die Knochenheilung beschleunigt <sup>(91)</sup>. Ebenfalls beobachteten Barnes et al. einen positiven Einfluss von BMPs auf die Proliferation und Differenzierung von osteoblastären Zellen<sup>(14)</sup>.

Die Wirkung der Wachstumsfaktoren scheint jedoch je nach Applikationsart, Dosierung und Eigenschaften des Trägermediums stark zu variieren. Während die Kombination von Wachstumsfaktoren in manchen Studien die Knochenheilung positiv beeinflusst hat, führt sie nicht automatisch zu einer Summierung der positiven Effekte <sup>(94, 113)</sup>. Ebenfalls konnte im Rahmen anderer Studien nachgewiesen werden, dass die Applikation von BMP-2 zu keinem nennenswerten Effekt auf die Knochenheilung unter stabilen mechanischen Verhältnissen

führte <sup>(16)</sup>. Ferner konnte beobachtet werden, dass die Applikation von TGF- $\beta$  in arthrotische Mäuseknie auch die Entstehung von Osteophyten induziert. <sup>(48,168)</sup>.

Der große Unterschied zwischen der Applikation von Wachstumshormon und der von den verschiedenen Wachstumsfaktoren liegt darin, dass letztere entweder über ein Trägermaterial oder durch eine Injektion lokal verabreicht wurden. Im Gegensatz dazu wurde das Wachstumshormon bisher fast ausschließlich systemisch verabreicht. In einer placebo kontrollierten Studie haben Schmidmaier et al. 2002 die Wirkung von GH und von anderen lokal applizierten Wachstumsfaktoren allein und in Kombination auf die Knochenheilung untersucht. Anhand eines Rattenfrakturmodells, welches operativ mit Implantaten versorgt wurde, wurden insgesamt 4 Gruppen gebildet: Die erste Gruppe erhielt unbeschichtete Implantate, die zweite wurde mit IGF-I und TGF- $\beta$ 1 beschichteten Implantaten versorgt, die dritte erhielt GH systemisch und die vierte sowohl die IGF-I und TGF- $\beta$ 1 beschichtete Implantate als auch GH via s. c. Injektionen. Es ergab sich, dass sowohl die lokale Applikation von IGF-I und TGF- $\beta$ 1 über die Implantate als auch die systemische Applikation von GH die Knochenheilung stimulieren, wobei die lokalen Wachstumsfaktoren einen grösseren Effekt als das systemische GH aufwiesen. Die Kombination beider Verfahren habe zu keiner additiven Wirkung geführt <sup>(145, 146)</sup>.

Es gibt mehrere Hinweise darauf, dass ein systemisch erhöhter Serumspiegel von IGF-I die Entstehung von Tumoren, wie z. B. Lungen-, Prostatakarzinom und kolorektalen Tumoren begünstigen soll <sup>(32,96,103)</sup>. Ebenfalls ist ein erhöhter Wachstumshormonspiegel mit der Entstehung von Leukämie, Diabetes Mellitus, Carpal-Tunnel-Syndrom und arterieller Hypertonie vergesellschaftet <sup>(50,63,64)</sup>, während die systemische Applikation von Wachstumshormon für Kinder mit Wachstumshormonmangel, mangelhaftem Wachstum aufgrund einer Niereninsuffizienz, Turner-Syndrom oder Prader-Willi-Syndrom und in den U.S.A für Kinder mit idiopathischen Wachstumsdefiziten zugelassen ist <sup>(63)</sup>.

Die Entstehung von diesen u. U. fatalen Nebenwirkungen von GH scheint nicht nur von der Verabreichungsart (systemisch), jedoch auch von der applizierten Dosis stark abzuhängen. 2003 wurde von Weissberger et al. die Applikation von rhGH an Patienten, welche sich einer elektiven Hüftendoprothesenimplantation unterziehen, 14 Wochen präoperativ bis 2 Wochen postoperativ, untersucht. In den 14 Wochen präoperativ wurde GH in einer Dosis von 0,04 IU/ Kg/ Tag verabreicht, gefolgt von einer Verdoppelung der Dosis für die 2 Wochen postoperativ. Dadurch sei es zu einer Steigerung der Muskelmass präoperativ und einer Besserung der Funktion, gemessen in einer 4-Min-Laufdistanz, postoperativ gekommen. Es wurden jedoch

ungünstige, dosisabhängige Fälle von Flüssigkeitsretention und Gelenkschmerzen berichtet<sup>(177)</sup>.

Im selben Jahr wurde eine weitere Studie zur Untersuchung der Wirkung von rhGH auf 31 Frauen mit einer Hüftfraktur veröffentlicht, wobei Dosierungen von 0,05 und 0,025 mg/ Kg/ Tag rhGH s. c. einmal täglich für 14 Tagen appliziert wurden. Die Untersuchung ergab keinen Unterschied in der Sekretion von IGF-I und IGFBP-3 zwischen den beiden rhGH Gruppen, während sie im Vergleich zur Placebo-Gruppe erhöht war. Es zeigten sich jedoch bei den Patienten der rhGH Gruppen ernste Nebenwirkungen wie Niereninsuffizienz, Lungenarterienembolie und Myokardinfarkt, während bei den Kontroll-Patienten zu keiner ernsthaften Nebenwirkung kam<sup>(186)</sup>.

2004 publizierten Hedstrom et al. ihre Ergebnisse der systemischen Gabe von rhGH an 20 Patienten mit Hüftfraktur. rhGH wurde in einer Dosis von 0,1 IU/ Kg/ Tag einmal tgl. s. c. injiziert, die Studie wurde jedoch abgebrochen, wegen der Ergebnisse einer parallellaufenden Studie, welche eine steigende, auf die Applikation von rhGH zurückzuführende Mortalität bei kritisch kranken Patienten erbrachte<sup>(159)</sup>. Hedstrom et al. setzten die Studie ein Jahr später mit einer auf 0,04 mg/ Kg/ Tag reduzierten Dosis fort. Die Ergebnisse zeigten eine signifikant erhöhte Sekretion von IGF-I in der rhGH Gruppe, während die einzige aufgetretene Nebenwirkung zwei Fälle mit Weichteilödemen darstellten<sup>(59)</sup>.

Lediglich in den letzten Jahren wird das Wachstumshormon lokal auf die Oberfläche der tibialen Diaphyse nach durchgeführter Osteotomie bzw. als Beschichtung von intramedullären Zahnimplantaten mit ähnlichen Ergebnissen hinsichtlich der Knochenstimulation appliziert<sup>(2,29,49,68)</sup>. Theyse et al haben bei ausgewachsenen Labrador grosse, pseudarthrosengefährdete Ulnadefekte bilateral erzeugt und auf der einen Seite lokal rhGH vs. Placebo über osmotische Pumpen kontinuierlich verabreicht. Es wurde eine fortgeschrittene Kallusformation mit Überbrückung des breiten, pseudarthrosengefährdeten Defektes beider Ulnae in der GH Gruppe beobachtet<sup>(160)</sup>.

Demzufolge stellt die Möglichkeit einer lokalen Anwendung vom Wachstumshormon in einer Dosierung, welche keine gleichzeitige Erhöhung des systemischen Spiegels vom Wachstumshormon oder IGF-I bewirkt und somit die o. b. Nebenwirkungen einer systemischen Applikation nicht auslöst, eine hoffnungsvolle Perspektive dar. Die Möglichkeit einer lokalen Anwendung vom Wachstumshormon allein über eine Injektion oder in Kombination mit verschiedenen Trägermaterialien zur Verbesserung der Knochenheilung wäre aufgrund der vorliegenden Ergebnisse vielversprechend.

### 4.3 Diskussion der Methoden

#### 4.3.1 Operation und postoperative Behandlung

Ratten sind neben Mäusen, die am häufigsten verwendeten Tiere für molekularbiologische Studien, insbesondere im Zusammenhang mit der Untersuchung der Knochenheilung. Zahlreiche Studien über die Wirkung von Wachstumshormon auf die Knochenheilung sind am Rattenmodell durchgeführt worden (2, 3, 9, 10, 11, 12, 32, 47, 58, 71, 72, 78, 104, 109, 115, 128, 142, 145, 146, 151, 154, 157, 161, 174, 179, 185, 188). Dadurch war es möglich, einerseits bereits vorliegende Erkenntnisse anderer Arbeitsgruppen bei der Konzeption und Durchführung des eigenen Projekts zu berücksichtigen, andererseits die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Zur Stabilisierung der Knochenenden nach der Osteotomie für die Dauer der Heilung wurde ein Fixateur externe angebracht. Dieses Verfahren bietet im Vergleich zu anderen Methoden wie z. B. der Implantation von intramedullären Kraftträgern eine zusätzliche mechanische Stabilität hinsichtlich der Rotationsbewegung. Ferner werden dadurch eine eventuelle Kompromittierung der endostalen Durchblutung sowie eine mögliche Beeinträchtigung der Knochenheilung durch mechanische Einflüsse vermieden. Diese Fixationsmethode wurde bereits in Modellen der Distraktionsosteogenese für Ratten komplikationslos verwandt (8, 133).

Da sich die vorliegende Arbeit hauptsächlich mit der frühen Knochenheilung befassen sollte, mussten die Standzeiten der operierten Tiere an den uns bekannten zeitlichen Ablauf der Frakturheilung bei der Ratte angepasst werden (39, 54,126). Als Zeitpunkte wurden aufgrund dessen der 7. (Erfassung der intramembranösen Knochenheilung - Beginn der Chondrogenese), 14. (Beginn der enchondralen Osteogenese) und 21. Tag (Abschluss der enchondralen Osteogenese, Remodeling) postoperativ untersucht. Zur vollständigen Erfassung der initialen Mechanismen der Knochenheilung sowie zur Beurteilung des genauen sequentiellen Ablaufs des Heilungsprozesses wären eventuell auch frühere sowie Zwischenstandzeiten erforderlich.

#### 4.3.2 In Situ Hybridisierung

Die semiquantitative und qualitative Analyse wurde anhand der Technik der nicht-radioaktiven *In Situ Hybridisierung* mit Digoxigenin markierten mRNA Sonden, welche vorher von den entsprechenden cDNA-Klonen nach Amplifizierung mittels PCR durch in vitro-Transkription erzeugt wurden, durchgeführt. Dadurch war es möglich, einerseits die Genexpression im

histologischen Schnitt zu lokalisieren und andererseits die entsprechende mRNA exprimierenden Zellen zu identifizieren und zu charakterisieren.

Die *In Situ Hybridisierung* ist eine weltweit angewandte Methode zur Untersuchung der Expression verschiedener mRNA Sequenzen in unterschiedlichen Geweben (33,61,122,163,167,184,187). Im Rahmen mehrerer *in vitro* und *in vivo* Studien wurde die *In Situ Hybridisierung* bereits zur genauen Untersuchung der Genexpression von extrazellulären Matrixproteinen und Charakterisierung der exprimierenden Zellen eingesetzt (71,72,100,121,140,141,171).

Trotz des hohen Stellenwertes der Methode in molekularbiologischen Studien, eignet sie sich nur zur semiquantitativen und qualitativen Untersuchung der Genexpression bestimmter mRNA Sequenzen. Zur quantitativen mRNA Analyse wäre die Durchführung anderer Methoden, wie z. B. der quantitativen PCR, welche nach Extraktion der RNA aus dem Gewebe eine densitometrische Messung der RNA Menge ermöglichen, denkbar.

Desweiteren läßt sich durch den Nachweis einer mRNA Sequenz auf dem histologischen Schnitt nicht mit absoluter Sicherheit sagen, ob tatsächlich daraus das entsprechende Protein entsteht. Aufgrund dessen sollte im Verlauf nach dem Nachweis einer bestimmten mRNA Sequenz eine immunhistochemische Untersuchung mit spezifischen Antikörpern gegen das Protein, welches nach der Translation der mRNA Sequenz entstehen sollte, erfolgen.

### 4.3.3 Auswertung

Um eine größtmögliche Übereinstimmung und damit Vergleichbarkeit der Schnittebenen zu erreichen, wurden aus den jeweiligen Präparaten Serienschnitten angefertigt, welche mit fortlaufenden Nummern versehen wurden. Bei der Durchführung der *In Situ Hybridisierung* wurden jedes Mal Schnitte aus der Mitte des Frakturkallus gewählt, welche innerhalb eines bestimmten Bereichs lagen. Die verschiedenen Schnitte und Gewebetypen wurden erst einzeln und dann zusammen beurteilt. Trotz dieser Maßnahme zeigte sich, dass die Präparate zum Teil inter- und intraindividuelle Unterschiede in der Morphologie und Zusammensetzung der Kallusse aufwiesen. Möglicherweise ist die Reaktion auf die Applikation von exogenem Wachstumshormon von Individuum zu Individuum unterschiedlich, wie auch letztendlich das individuelle Heilungspotential.

Durch die aggressiven physikalischen und enzymatischen Bearbeitungsprozesse im Rahmen der *In Situ Hybridisierung*, welche notwendig waren, um vorhandene Enzyme und andere Proteine von den Gewebeschnitten zu entfernen, um sie dadurch für RNA Sonden permeabel zu machen ohne sie dabei zu beschädigen, kam es nicht selten zum Gewebeverlust. Der

Versuch die Präparate vor der *In Situ Hybridisierung* in der Mikrowelle "festzubacken" oder sie auf einer heißen Platte zu erhitzen, erwies sich als wenig hilfreich.

Bei der *In Situ Hybridisierung* fanden sich deutliche intrazelluläre Signale bei einer leichten Anfärbung des umliegenden Gewebes. Diese Hintergrundfärbung konnte durch die Verwendung von 0,2%iger Glycinlösung zum Blockieren der Proteinase K, sowie durch die Applikation eines modifizierten Blocking Mediums zur Stringenzerhöhung nur geringfügig gemindert werden. Es zeigte sich jedoch, dass Zellzytoplasma und Hintergrund sich nicht zum gleichen Zeitpunkt anfärbten, so dass durch ein frühzeitigeres Abbrechen der Farbreaktion eine geringe, selektive Reduktion der Hintergrundfärbung erreicht werden konnte. Trotz dieser Maßnahme konnte die Hintergrundfärbung nicht ausreichend vermieden werden. Dadurch war die Diskriminierung insbesondere der osteoblastären Zellen, die einen Durchmesser von ca. 20-30  $\mu\text{m}$  aufweisen und zum Teil in Clustern gelegen haben, erheblich erschwert. Deswegen wurde für die Auswertung der vor allem von osteoblastären Zellen exprimierten mRNA - Sequenzen eine semiquantitative, deskriptive Analyse anhand eines 4-stufigen Scores (von 0 bis 3) angewandt, welches wiederum ein anerkanntes Verfahren zur Beurteilung von histologischen Präparaten darstellt <sup>(42,53,79)</sup>.

Anders sah die Situation bei der Auswertung von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II – mRNA aus, welche hauptsächlich von chondrozytären Zellen exprimiert wird. Die Chondrozyten werden durch eine perizelluläre Matrix umgeben, welche hauptsächlich aus Proteoglykanen und Hyaluronsäure besteht. Diese Matrix verleiht den Chondrozyten den im Lichtmikroskop gut erkennbaren Hof. Bei der *In Situ Hybridisierung* kam es zu einer starken Anfärbung des Kerns der Knorpelzellen, die durch den Knorpelzellenhof gut voneinander zu unterscheiden waren. Aufgrund dessen war hier eine computergestützte bildanalytische Auswertung möglich.

Der größte Vorteil einer computerassistierten bildanalytischen Auswertung findet sich in der einfachen Bedienung des Systems. Dadurch wird eine vergleichbare, nicht von individuellen Faktoren abhängige Auswertung gewährleistet. Jede Region of Interest entsprach der Bildfläche des Computers bei 200facher Vergrößerung am Durchlichtmikroskop (Vergrößerungsokular 10x / Objektiv 20x). Ihre Festlegung war damit ebenfalls frei von subjektiven Entscheidungen.

Auf der anderen Seite kann anhand eines deskriptiven Scores die Morphologie eines histologischen Präparats genauer beurteilt werden. Das Scoren unterliegt als Auswertungssystem subjektiven Einflüssen und ist von Untersucher zu Untersucher nicht

vollständig reproduzierbar. Zur Vermeidung von subjektiven Einflüssen wurde jedes histologische Präparat von zwei unabhängigen Untersuchern analysiert und klassifiziert. Der daraus entstandene Mittelwert diente als Wert zur Auswertung der histologischen Präparate.



## 5. Zusammenfassung

Zahlreiche *in vivo* Studien der letzten Jahrzehnte haben gezeigt, dass die exogene Applikation von Wachstumshormon die Überbrückung von Knochendefekten beschleunigen kann. Welche genauen molekularen und zellbiologischen Effekte dieser Wirkung zugrunde liegen, blieben jedoch ungeklärt.

Ziel dieser Studie war es, an einem Osteotomiemodell der Ratte die Wirkung von systemisch applizierbarem Wachstumshormon auf die Knochenheilung auf histologischer Ebene zu beschreiben. Anhand von spezifischen RNA-Sonden für ausgewählte, an der Knochenheilung beteiligte Extrazelluläre Matrixproteine wurde das Niveau der Genexpression sowie das Verteilungsmuster der Zellen in der physiologischen und durch exogenes Wachstumshormon stimulierten Knochenheilung dargestellt.

Bei adulten Sprague-Dawley Ratten (weiblich, n=30) wurde eine standardisierte Osteotomie von 0,3 mm Spaltbreite erzeugt und mittels monolateralem Fixateur extern stabilisiert. Es wurden zwei Hauptgruppen mit den Standzeiten 7, 14 und 21 Tage (n=5) analysiert:

Gruppe I: 3 mg/Kg/d rhGH s. c. 2 x täglich

Gruppe II: NaCl s. c. (Placebo) 2 x täglich

Eine *In Situ Hybridisierung* wurde mit Digoxigenin-markierten RNA-Sonden auf 4 µm dicken Paraffinserienschnitten durchgeführt. Fünf knochenrelevante Matrixproteine wurden dargestellt:  $\alpha_1$  Kollagen I und  $\alpha_1$  Kollagen II als Marker osteogener bzw. chondrogener Zellen, Osteocalcin als Marker osteoblastärer Zellen sowie Osteopontin und Osteonectin als Marker mineralisierender Zellen.

Nach 7 Tagen konnte in den osteoblastären und chondrozytären Zellen eine deutlich stärkere Signalaktivität für alle Extrazellulären Matrixproteinen in der Wachstumshormongruppe, insbesondere im periostalen Bereich, im Vergleich zur Placebo-Gruppe beobachtet werden. Nach 14 Tagen nahm die Expression für  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, Osteocalcin und Osteonectin-mRNA in der GH-Gruppe weiterhin zu, während eine deutliche Abnahme der Expression für Osteopontin und  $\alpha_1$  Kollagen Typ II zu verzeichnen war. In der Placebo-Gruppe zeigte sich zu diesem Zeitpunkt eine wiederum erhöhte Signalaktivität für die beiden mRNA. Nach 21 Tagen fand sich in der GH-Gruppe eine annähernd gleiche Signalaktivität für  $\alpha_1$  Kollagen Typ I und Osteocalcin-mRNA bei deutlicher Abnahme der Expression von Osteopontin, Osteonectin und  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA. In der Placebo-Gruppe zeigte sich in diesem Zeitraum ein tendenzieller Anstieg der Expression von Osteonectin-mRNA.

Im Rahmen dieser Studie wurde der *in vivo* Einfluss von exogen verabreichtem Wachstumshormon auf die Bildung Extrazellulärer Matrixproteine im Verlauf der Knochenheilung untersucht. Die Ergebnisse unterstützen biomechanische und histomorphologische Ergebnisse vorangegangener Studien und lassen den Schluss zu, dass die exogene Applikation von Wachstumshormon seine positive Wirkung auf die Knochenheilung einerseits durch die frühzeitige Erhöhung der Syntheseaktivität von Extrazellulären Matrixproteinen und andererseits durch die Beschleunigung der Zellproliferation und -differenzierung und somit der Abfolgen der Phasen der Knochenheilung entfaltet.

Berücksichtigt man jedoch die Nebenwirkungen der systemischen Applikation von Wachstumshormon, so ist sein Einsatz zur Beschleunigung der Frakturheilung beim Menschen eher nicht zu befürworten. Stattdessen wäre eine lokale, protrahierte Verabreichung von Wachstumshormon, entweder allein über eine Injektion/Pumpe, oder in Kombination mit verschiedenen Trägermaterialien (Osteosynthesematerial, Membranen etc), welche auch mit einer Reduktion der verwendeten Hormonmenge und damit systemischer Nebenwirkungen einhergehen würde, durch die im Rahmen dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse vielversprechend.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Andersson, GBJ**; Bouchard, J.; Bozic, KJ; Campbell, RM Jr; Cisternas, MG; Correa, A; Cosman, F; Cragan, JD; D Andrea, K; Doernberg, N; Dorman, JP; Elderkin, AL; Fershteyn, Z; Foreman, AJ; Gitelis, S; Gnatz, SM; Haralson, RH III; Helmick, CG; Hu, S; Katz, JN; King, T; Kirk, R; Kurtz, SM; Lane, N; Miller, A; Novich, RL; Olney, R; Panopalis, P; Pasta, DJ; Pollak, AN; Puzas, JE; Richards, BS III; Sestito, JP; Siffel, C; Sponseller, PD; St. Clair, EW; Stuart, A; Templeton, KJ; Thompson, G; Tosi, L; Ward, WG Sr; Watkins-Castillo, SI; Weinstein, SL; Wright, JG; Yelin, EH. The Burden of Musculoskeletal Diseases in the United States. Rosemont, IL: American Academy of Orthopedic Surgeons, United States Bone and Joint Decade, 2008, pp 97-161
2. **Andreassen, T.T.**; Oxlund, H. Local anabolic Effect of Growth Hormone on intact Bone and Healing fractures in Rats. *Calcif Tissue Int.* 2003, 73(3), 258-264
3. **Aspenberg, P.**; Wang, J. S.; Choong, P.; Thorngren, K. G. No Effect of Growth Hormone on bone Graft Incorporation. Titanium chamber Study in the normal Rat. *Acta Orthop Scand* 1994, 65(4), 456-461
4. **Ates, U**; Gollu, G; Bingol-Kologlu, M; Billur, D; Kucuk, G; Oruklu, N; Bagriacik, U; Hasirci, N; Dindar H. The effects of local and systemic Growth Hormone treatment on germ cell population and fertility in an experimental unilateral testicular torsion and orchietomy model. *J Urol.* 2015 Dec;194(6):1816-22
5. **Axelrad TW**; Kakar, S; Einhorn, TA. New technologies for the enhancement of skeletal repair. *Injury* 2007, 38 Suppl 1: S 49-62.
6. **Bagi, C. M.**; Wilkie, D.; Georgelos, K.; Williams, D.; Bertolini, D. Morphological and structural characteristics of the proximal Femur in Human and Rats. *Bone* 1997, 21, 261-267.
7. **Bail, H. J.**; Kolbeck, S.; Krummrey, G.; Schmidmaier, G.; Haas, N. P.; Raschke, M. J. Systemic application of growth hormone for enhancement of secondary an intramembranous fracture healing. *Horm Res* 2002, 58 (Suppl 3), 39-42.
8. **Bail, H. J.**; Raschke, M. J.; Kolbeck, S.; Krummrey, G.; Windhagen, H. J.; Weiler, A.; Raum, K.; Mosekilde, L.; Haas, N. P. Recombinant species-specific growth hormone increases hard callus formation in distraction osteogenesis. *Bone* 2002, 30(1), 117-124.
9. **Bak, B.**; Andreassen, T. T. The Effect of growth Hormone on fracture Healing in old Rats. *Bone* 1991, 12(3), 151-154.
10. **Bak, B.**; Jorgensen, P. H.; Andreassen, T. T. Dose response of Growth Hormone on Fracture Healing in the Rat. *Acta Orthop Scand* 1990, 61(1), 54-57.
11. **Bak, B.**; Jorgensen, P. H.; Andreassen, T. T. Increased mechanical strength of healing rat tibial fractures treated with biosynthetic human Growth Hormone. *Bone* 1990, 11(4), 233-239.
12. **Bak, B.**; Jorgensen, P. H.; Andreassen, T. T. The stimulating Effect of Growth Hormone on Fracture Healing is dependent on onset and duration of administration. *Clin Orthop.* 1991, 264, 295-301.
13. **Bandeira, F**; Costa, AG; Soares Filho, MA; Pimentel, L; Lima, L; Bilezikian, JP. Bone markers and osteoporosis therapy. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2014 Jul;58(5):504-13
14. **Barnes, G. L.**; Kostenuik, P. J.; Gerstenfeld, L. C.; Einhorn, T. A. Growth Factor regulation of fracture repair. *J Bone Miner Res* 1999, 14, 1805-1815.
15. **Baumann G**: Growth Hormone-Binding Proteins (Minireview). *P S E B M* 1993, 202:392-400.
16. **Bax, B.E.**; Wozney, J. M.; Ashhurst, D. E. Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. *Calcif Tissue Int.* 1999, 65(1), 83-9.
17. **Bellows, C. G.**; Reimers, S. M., Heersche, J.N.M. Expression of mRNAs for type-I Collagen, bone sialoprotein, osteocalcin and osteopontin at different stages of osteoblastic differentiation and their regulation by 1,25 dihydroxyvitamin D3. *Cell Tissue Res* 1999, 297, 249-259.

18. **Benabbad, I**; Rosilio, M; Tauber, M; Paris, E; Paulsen, A; Berggren, L; Patel, H; Carel, JC. Growth hormone in Combination with Leuprorelin in pubertal children with idiopathic short stature. *Endocrine Connections* Publish Ahead of Print, April 2018
19. **Bertelloni, S**; Baroncelli, G; Massart, F; Toschi, B. Growth in Boys with 45X/46XY Mosaicism: Effect of growth hormone treatment on statural Growth. *Sex Dev* 2015; 9: 183-189
20. **Bidlingmaier, M**; Strasburger, CJ. Growth hormone. *Handb Exp Pharmacol.* 2010;(195):187-200
21. **Binder, G.**; Revskoy, S.; Gupta, D. In vivo Growth Hormone Gene Expression in Neonatal Rat Thymus and bone Marrow. *Journal of Endocrinology* 1994, 140, 137-143.
22. **Böker, J**; Völzke, H; Nauck, M; Hannemann, A; Friedrich, N. Associations of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor binding protein-3 with bone quality in the general adult population. *Clinical Endocrinology* 2018 Jun;88(6):830-837
23. **Bolander, Mark E.** Regulation of fracture repair by Growth Factors. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1992, 200, 165-170.
24. **Bosse, A.**; Wulf, M.; Wiethage, T.; Voss, B.; Mueller, K.-M. Kollagene und Wachstumsfaktoren in der heterotopen Ossifikation. *Pathologe* 1994, 15, 216-225.
25. **Boyce, B**; Xing, L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch biochem. Biophys.* 2008, 473 (2): 139-146
26. **Boyde, A.** Electron mikroskopy of the mineralizing front. *Bone Histomorphometry third international workshop*, 1980, 69-78.
27. **Brambilla, F**; Santonastaso, P; Caregaro, L; Favaro, A. Growth hormone and Insulin-like growth factor 1 sekretions in eating disorders: correlations with psychopathological aspects of the disorders.
28. **Buza, J III**; Einhorn, T. Bone Healing in 2016. *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2016 May-Aug;13(2):101-105.
29. **Calvo-Guirado, J. L.**; Mate-Sanchez, J.; Delgado-Ruiz, R.; Ramirez-Fernandez, M. P.; Cutando-Soriano, A.; Pena, M.; Effects of growth hormone on initial bone formation around dental implants: a dog study. *Clinical oral implants research* 2010, ISSN: 1600-0501 (Electronic), 0905-7161 (Linking).
30. **Chan, J.M.**; Stampfer, M.J.; Ma, J.; Gann, P.; Gaziano, J.M.; Pollak, M.; Giovannucci, E. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF binding protein-3 as predictors of advanced-stage prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 2002, 94 (14), 1099-1106.
31. **Chen, L**; Jacquet, R; Lowder, E; Landis, W. Refinement of Collagen-mineral interaction: A possible Role for Osteocalcin in apatit crystal nucleation, growth and development. *Bone.* 2015 Feb;71:7-16
32. **Clark, R. G.**; Mortensen, D. L.; Carlsson, L. M. S.; Spencer, S. A.; McKay, P.; Mulkerrin, M.; Moore, J.; Cunningham, B. C. Recombinant human Growth Hormone (GH) – Binding Protein enhances the Growth-Promoting activity of Human GH in rat. *Endocrinology* 1996, 137, 4308-4314.
33. **Crabb, Jan D.**; Hughes, Steven S.; Hicks, David G.; Puzas, J. Edward; Tsao, Grace J. Y.; Rosier, Randy N. Nonradioactive *In Situ Hybridisierung* using Digoxigenin-labeled Oligonucleotides. *American Journal of Pathology* 1992, 141, 579-588.
34. **Crippa, GE**; Beloti, MM; Gardoso, CR. Effect of growth hormone on in vitro osteogenesis and gene expression of human osteoblastic cells is donor-age-dependent. *J Cell Biochem* 2008; 104(2): 369-376
35. **Cullinane, DM**; Fredrick, A; Eisenberg SR; Pacicca, D; Elman, MV; Lee, C; Salisbury, K; Gerstenfeld LC; Einhorn, TA. Induction of a neoarthrosis by precisely controlled motion in an experimental mid-femoral defect. *J Orthop Res.* 2002 May;20(3):579-86
36. **De Paula, FJ**; Góis-Júnior, MB; Aguiar-Oliveira, MH; de A Pereira, F; Oliveira, CR; Pereira, RM; Farias, CT; Vicente, TA; Salvatori, R. Consequences of lifetime isolated growth hormone deficiency and effects of short-term GH-treatment on bone in adults with a mutation in the GHRH-receptor gene. *Clin. Endocrinol (Oxf.)* 2008.

37. **Dichtel, L.**; Bjerre, M; Schorr, M; Bredella, M; Gerweck, A; Russell, B; Frystyk, J; Miller, K. The effect of growth hormone on IGF-1R activation in overweight/obese women. Accepted Manuscript in Growth hormone and IGF Research 2018
38. **Doessing, S.**; Heinemeier, K. M.; Holm, L.; Mackey A. L.; Schjerling, P.; Rennie, M.; Smith, K.; Reitelsheder, S.; Kappelgaard, A. M.; Rasmussen, M. H.; Flyvbjerg, A.; Kjaer, M.; Growth hormone stimulates the collagen synthesis in human tendon and skeletal muscle without affecting myofibrillar protein synthesis. *The Journal of physiology* 2010, 588/Pt2, 341-51.
39. **Einhorn, Thomas A.** The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research* 1998, 355S, 7-21.
40. **El-Alfy, B.**; Abulsaad, M; Abdelnaby, WL. The use of free nonvascularized fibular graftin the induced membrane technique to manage post-traumatic bone defects. *European Journal of Orthopedic Surgery and Traumatology*, 2018 Feb
41. **Erotokritou-Mulligan, I.**; Bassett, EE; Bartlett, C; Cowan, D; McHung, C; Seah, R; Curtis, B; Wells, V; Harrison, K; Sönksen, PH; Holt, RI. The effects of sport injury on insulin-like-growth factor I and type 3 procollagen: Implications for detection of growth hormone abuse in athletes. *J Clin. Endocrinol Metab.* 2008, 93(7): 2760-3.
42. **Felson, D.T.**; Gale, D.R.; Elon Gale, M.; Niu, J.; Hunter, D.J.; Goggins, J.; Lavalley, M.P.; Osteophytes and progression of knee osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2005, 44(1),100-4.
43. **Frohman, L. A.**; Downs, T. R.; Chonczynski, P.; Frohman, M. A. Growth Hormone Releasing Hormone: Structure, Gene Expression and Molacular Heterogenity. *Acta Paediatr Scand* 1990, 367, 81-86.
44. **Fujii, Hideki**; Kitazawa, Riko; Maeda, Sakan; Mizuno, Kosaku; Kitazawa, Sohei. Expression of platelet – derived growth factor proteins and their receptor  $\alpha$  und  $\beta$  mRNAs during fracture healing in the normal mouse. *Histochem Cell Biol* 1999, 112, 131-138.
45. **Futawaka, K.**; Tagami, T; Fukuda, Y; Koyama, R; Nushida, A; Nezu, S; Imamoto, M; Kasahara, M; Moriyama, K. Growth hormone regulates the expression of UCP 2 in myocytes. *Growth hormone & IGF Research* 29, 2016, 57-62
46. **Gamboa-Dominguez, A.**; Dominguez-Fonseca, C.; Quintanilla-Martinez, L.; Reyes-Gutierrez, E.; Green, D.; Angeles-Angeles, A.; Busch, R.; Hermannstadter, C.; Nahrig, J.; Becker, K. F.; Becker, I.; Hofler, H.; Fend, F.; Lubner, B. Epidermal growth factor receptor expression correlates with poor survival in gastric adenocarcinoma from Mexican patients: a multivariate analysis using a standardized immunohistochemical detection system. *Mod Pathol.* 2004, 17(5), 579-87.
47. **Gil, H.**; Lozano, JJ; Alvarez-García, O; Secades-Vázquez, P; Rodriguez-Suárez, J; García-Lopez, E; Carbajo-Pérez, E; Santos, F. Differential gene expression induced by growth hormone treatment in the uremic rat growth plate. *Growth hormone IGF Res.* 2008, 18(4): 353-9.
48. **Glansbeek, H.L.**; van Beuningen, H.M.; Vitters, E.L.; van der Kraan, P.M.; van den Berg, W.B. Stimulation of articular cartilage repair in established arthritis by local administration of transforming growth factor-beta into murine knee joints. *Lab Invest.* 1998, 78(2),133-42.
49. **Gomez-Moreno, G.**; Cutando, A.; Arana, C.; Worf, C. V.; Guardia, J.; Munoz, F.; Lopez-Pena, M.; Stepherson, J.; The effects of growth hormone on the initial bone formation around implants 2009, 24/6, 1068-73.
50. **Gore, D. C.**; Honeycutt, D.; Jahoor, F.; Rut an, T.; Wolfe, R. R.; Herndon, D. N. Effect of Exogenous Growth Hormone on Glucose Utilization in burn Patients. *J Surg Res.* 1991, 51(6), 518-523.
51. **Green, H.**; Morikawa, M; Nixon, T. A dual effector theory of growth hormone action. *Differentiation* (1985) 29: 195-198
52. **Grundnes, O.**; Utvag, S. E.; Reikeras, O. Effects of graded reaming on fracture healing. *Acta orthop Scand* 1994, 32-36.

53. **Guizzardi, Stefano**; Montanari, Christiana; Migliaccio, Stefano; Strocchi, Rita; Solmi, Rossela; Martini, Desiree; Ruggeri, Alessandro. Qualitative Assessment of natural Apatite in vitro and in vivo. Inc. J. Biomed Mater Res (Appl Biomater) 2000, 53, 227-234.
54. **Hadjiargyrou, M**; Lombardo, F; Zhao, S; Ahrens, W; Joo, J, Ahn, H; Jurman, M; White, DW; Rubin, CT. Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair. J Biol Chem. 2002 Aug 16; 277(33):30177-82
55. **Hao, Y.**; Dai, K.; Guo, L.; Wang, Y.; Tang, T. Effects of recombinant human Growth Hormone on experimental osteoporotic fracture Healing. Chin J Traumatol. 2001, 4(2), 102-105.
56. **Hauschka, PV**; Mavrakos, AE; Lafrati, MD. Growth factors in the bone matrix , isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin-sepharose. J boil Chem 1986, 261: 12665-74.
57. **Hayashi, M**; Futawaka, K; Matsushita, M; Koyama, R; Fun, Y; Fukuda, Y; Nushida, A; Nezu, S; Tagami, T; Moriyama, K. GH directly stimulates UCP3 expression. Growth hormone and IGF Research, 2018.
58. **Hedner, E.**; Linde, A.; Nilsson, A.; Systemically and locally administered growth hormone stimulates bone healing in combination with osteopromotive membranes: an experimental study in rats. J Bone Miner Res 1996, 11, 1952-1960.
59. **Hedström, M**; Sääf, M; Brosjö, E, Hurtig, C; Sjöberg, K; Wesslau, A; Dalén, N. Positive effects of short-term growth hormone treatment on lean body mass and BMC after a hip fracture: a double-blind placebo-controlled pilot study in 20 patients. Acta Orthop Scand. 2004 Aug;75(4):394-401Huang, S; Zhang, L; Zhang J; Rehman, MU; Tong, X; Qiu, G; Jiang, X; Iqbal, M;
60. **Herndon, D**; Barrow, RE; Kunkel, KR; Broemeling, L; Rutan, RL. Effects of recombinant human growth hormone on donor-site healing in severely burned children. Ann Surg 1990 212(4), 424-9.
61. **Herrmann, G.**; Herrmann, D. *In Situ Hybridisierung*. Pathologe 1988, 9, 130-136.
62. **Hiltunen, Ari**; Hannu, Aro; Vuorio, Eero. Regulation of extracellular matrix genes during fracture healing in Mice. Clinical Orthopaedis and related research 1993, 297, 23-27.
63. **Hintz, R. L.**; Growth Hormone: Uses and abuses. BMJ 2004, 328, 907-908.
64. **Hintz, R. L.**; Untoward events in patient treated with growth hormone in the USA. Horm Res. 1992, 38 Suppl 1, 44-49.
65. **Hirakawa, K.**; Hirota, S; Ikeda, T; Yamaguchi, A; Takemura, T; Nagoshi, J; Yoshiki, S; Suda, T; Kitamura, Y; Nomura, S. Localization of the mRNA for Bone Matrix Proteins during fracture healinh as determined by In Situ Hybridization. Journal of bone and mineral research 1994; 9(10): 1551-1557
66. **Hoffmann, A. R.**; Kuntze, J. E.; Baptista, J.; Baum H. B.; Baumann, G.P.; Biller, B. m.; Clark R. V.; Cook, D.; Inzucchi, S. E.; Kleinberg, D.; Klibanski, A.; Phillips, L. S.; Ridway, E. C.; Robbins, R. J.; Schlechte, J.; Sharma, M.; Thorner, M. O.; Vance, M. L. Growth hormone replacement therapy in adult-onset GH deficiency: Effects on body composition in men and women in a double blind, randomized, placebo-controlled trial. J Clin Endocrinol Metab 2004, 89(5), 2048-2056.
67. **Homburg, R.**; West, C; Torresani, T; Jacobs, HS. Contreatment with human growth hormone and gonadotropins for induction of ovulation: a controlled clinical trial. Fertil steril 1990 53(2): 254-60.
68. **Hossam Eldein, A. M.**; Elghamrawy, S. H.; Osman, S. M.; Elhak, A. R.; Histological evaluation of the effect of using growth hormone around immediate implants in fresh extraction sockets: an experimental study. Implant dentistry 2011, 20, 47-55.
69. **Huang, N.**; **Luo, S. J.**; Yang, H. M. The Effects of growth Hormone on rabbit's mandibular condylar chondrocytes proliferation and secretion in vitro. Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi, 22(5), 370-372.
70. **Hvid, I.**; Horn, J; Huhnstock, S; Steen, H. The biology of bone lengthening. J Child Orthop 2016 10: 487-492

71. **Ikeda, T.**; Nagai, Y.; Yamaguchi, A.; Yokose, S.; Yoshiki, S. Age-related reduction of bone matrix protein mRNA expression in rat bone tissues: applications of histomorphometry to in situ Hybridization. *Bone* 1995, 16(1), 17-23.
72. **Ikeda, T.**; Nomura, S.; Yamaguchi, A.; Suda, T.; Yoshiki, S. In situ Hybridization of Bone Matrix proteins in undecalcified adult rat bone sections. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 1992, 40, 1079-1088.
73. **Isaksson, O.**; Lindahl, A.; Nilsson, A.; Isgaard, J. Mechanism of the stimulatory Effect of growth hormone on longitudinal bone growth. *Endocrine Reviews* 1987, Vol. 8 , No 4, 426-438
74. **Jingushi, S.**; Joyce, M.E.; Bolander M. E. Genetic expression of extracellular Matrix Proteins correlates with histology during fracture repair. *J Bone Miner Res* 1992, 7(9), 1045-1055.
75. **Johansson, J.-O.**; Oscarsson, J.; Bjarnason, R.; Bengtsson, B.-A. Two weeks of daily Injections and Continuous Infusion of Recombinant Human Growth Hormone on GH-Deficient Adults. I. Effects of Insulin-like Growth Factor, GH and IGF-binding Proteins and Glucose Homeostasis. *Metabolism*, 45(3), 362-369.
76. **Jonker, Ard**; De Boer, Piet A. J.; Van den Hoff, Maurice j. B.; Lamers, Wouter H.; Moorman, Antoon F. M. Towards quantitative In situ Hybridization. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1997, 45 (3), 413-423.
77. **Joyce, M.**; Jingushi, S; Bolander, M. Transforming growth factor in the regulation of fracture repair. *Orthop Clin North Am* 1990. 21A 199-209.
78. **Ju, H.**; Cai, X. Effect of Growth Hormone on osteopontin expression during orthodontic tooth movements in rats. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.* 2017 Sep 28;42(9):1037-1041
79. **Kaden, J.J.**; Bickelhaupt, S.; Grobholz, R.; Vahl, C.F.; Hagl, S.; Brueckmann, M.; Haase, K.K.; Dempfle, C.E.; Borggrefe, M. Expression of bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-2 in calcific aortic stenosis. *J Heart Valve Dis.* 2004,13(4),560-6.
80. **Kassem, M.**; Blum, W.; Ristelli, J.; Mosekilde, L.; Eriksen, E.F. Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro. *Calcif Tissue Int.* 1993, 52(3), 222-6.
81. **Kidder, L. S.**; Schmidt, I. U.; Evans, G. L.; Turner, R. T. Effects of growth hormone and low dose estrogen on bone growth and turnover in long bones of hypophysectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1997, 61, 327-335.
82. **Kolbeck, S.**; Bail, H. J.; Schmidmaier, G.; Alquiza, M.; Raun, K.; Kappelgard, A.; Flyvbjerg, A.; Haas, N; Raschke, M. Homologous growth hormone accelerates bone healing – a biomechanical and histological study. *Bone* 2003, 33, 628-637.
83. **Komatsu, DE**; Warden, SJ. The control of fracture healing and its therapeutic targeting: Improving upon nature. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2010, 109: 302-311
84. **Koskinen, EV**; the repair of experimental under the action of growth hormone, thyrotropine and cortison. A tissue analytic, roentgenologic and autoradiographic study. *Ann Chir Gynaecol Fenn Suppl* 1959, 48(90): 1-48
85. **Koso, R.**; Terhoeve, C; Steen, GR; Zura, R. Healing, non-union and re-operation after internal fixation of diaphyseal and distal femoral fractures: a systematic review and meta-analysis. *International Orthopaedics*, 2018 Mar
86. **Krusenstjerna-Hafstrø, T.**; Rasmussen, M, Raschke, M; Govender, S; Madsen, J; Christiansen, JS. Biochemical markers of bone turnover in tibia fracture patients randomly assigned to growth hormone (GH) or placebo injections. Implications of detection of GH abuse. *Growth Horm IGF Res.* 2011 Dec;21(6):331-5
87. **Langdahl, B. L.**; Kassem, M.; Moller, M. K.; Eriksen, E. F. The Effects of IGF-I and IGF-II on Proliferation and differentiation of human osteoblasts and Interactions with Growth Hormone. *Eur J Clin Invest* 1998, 28(3), 176 -183.
88. **Lewinson, D.**; Shenzer, P.; Hochberg, Z. Growth hormone involvement in the regulation of tartrate-resistant acid phosphatase-positive cells that are active in cartilage and bone resorption. *Calcif Tissue Int.* 1993, 52(3), 216-21.



89. **Li, H;** Dixon, JS; Liu WK. Human pituitary growth hormone. XIX. The primary structure of the hormone. *Arch Biochem Biophys.* 1969 Aug;133(1):70-91
90. **Li, H.;** Bartold, P. M.; Young, W. G.; Xiao, Y.; Waters, M. J. Growth Hormone Induces Bone Morphogenetic Proteins and Bone-related Proteins in the Developing Rat Periodontium. *J Bone Miner Res* 2001, 16, 1068-1076.
91. **Lind, M.** Growth Factor stimulation of Bone Healing. Effects on Osteoblasts, Osteomies and implants Fixation, *Acta orthop Scand* 1998 Suppl 283, 69, 1-33.
92. **Liu, CZ;** Luo, Y; Limbu, SM; Chen, LQ; Du, ZY. IGF-I induces SOCS-2 but not SOCS-1 and SOCS-3 transcription in juvenile Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Experimental Biology* 2018
93. **Liu, Z;** Han, T; Werner, H; Rosen, CJ; Schaffler, MB; Yakar, S. Reduced serum IGF-I associated with hepatic osteodystrophy is a main determinant of low cortical but not trabecular bone mass. *Journal of Bone and Mineral Research* Jan 2018; 33(1): 123-136
94. **Locatelli, V.;** Bianchi, VE. Effect of GH/IGF-I on Bone Metabolism and Osteoporosis. *Int J Endocrinol.* 2014
95. **Löffler, G.;** Petrides, PE. *Biochemie and Pathobiochemie*, Springer Verlag, 6. Auflage, 1998, 739-740
96. **Loveridge, N.;** Farquharson, C.; Palmer, R. Loble, G. E.; Flint, D. J. Growth hormone and longitudinal bone growth in vivo: short-term effect of a growth hormone antiserum. *Journal of endocrinology* 1995, 146, 55-62.
97. **Lu, C.;** Kumar, PA; Sun, J; Aggrwal, A; Fan, Y; Sperling, MA; Lumeng, CN; Menon, R. Targeted Deletion of Growth Hormone (GH) Receptor in Macrophages reveals Novel Osteopontin-mediated Effects of GH on Glucose Homeostasis and Insulin sensitivity in Diet-induced Obesity. *The journal of biological chemistry* Vol. 288, No22, 15725-15735
98. **Ma, J.;** Giovannucci, E.; Pollak, M.; Chan, J.M.; Gaziano, J.M.; Willett, W.; Stampfer, M.J. Milk Intake, Circulating Levels of Insulin-Like Growth Factor-I, and Risk of Colorectal Cancer in Men. *J Natl Cancer Inst.* 2001, 93(17), 1330-6.
99. **Madsen, M;** Friberg, U; Roos, P; Eden, S; Isaksson, O. Growth hormone stimulates the proliferation of cultured chondrocytes from rabbit ear and rat rib growth cartilage. *Nature.* 1983 Aug 11-17;304(5926):545-7
100. **Marles, P. J.;** Hoyland, J. A.; Parkinson, R.; Freemont, A. J. Demonstration of variation in chondrocytes activity in different zones of articular cartilage: an assessment of the value of in situ Hybridization. *Int J Exp Path* 1991, 72, 171-182.
101. **Marsell, R.;** Einhorn, TA. The biology of fracture healing. *Injury* 2011; 42 (6): 551-555
102. **Martinez, D. A.;** Orth, M. W.; Carr, K. E.; Vanderby Jr, R.; Vailas, A. C. Cortical bone growth and maturational changes in dwarf rats induced by recombinant human growth hormone. *American Physiological Society* 1996, E51-E59.
103. **Matsuo, K;** Irie, N. Osteoclast-Osteoblast communication. *Arch Biochem Biophys.* 2008 May 15;473(2):201-9
104. **McCarthy, TL.;** Casinghino, S.; Centrella, M.; Canalis E. Complex pattern of insulin-like growth factor binding protein expression in primary rat osteoblast enriched cultures: regulation by prostaglandin E2, growth hormone, and the insulin-like growth factors. *J Cell Physiol.* 1994, 160(1), 163-75.
105. **Metsäranta, M;** Toman, D; De Grombrugge, B; Vuorio, E. Specific hybridization probes for mouse type I, II, III und IX collagen mRNAs. *Biochem Biophys Acta* 1991, 1089: 241-243
106. **Misol, S;** Samaan, N; Ponseti, IV. Growth hormone in delayed fracture union. *Clin Orthop Relat R* 1971; 74; 206 – 8
107. **Morgan, E;** De Giacomo, A; Gerstenfeld, L. Overview of fracture healing and its assessment. *Methods Mol Biol.* 2014; 1130: 13-31
108. **Morishita, M;** Ono, N; Miyai, K; Nakagawa, T; Hanyu, R; Nagao, M; Kamolratanakul, P; Notomi, T; Rittling, S; Denhardt, D; Kronenberg, H; Ezura, Y; Hayata, T; Nakamoto, T; Noda, M. Osteopontin deficiency enhances parathyroid hormone / parathyroid hormone related peptide receptor (PPR) signaling-induced alteration in tooth formation and odontoblastic morphology. *Tissue Cell* 2011 June; 143 (3): 196-200

109. **Mosekilde, L.**; Bak, B. The Effects of Growth Hormone on fracture Healing in rats: a histological Description. *Bone* 1993, 14(1), 19-27.
110. **Mrak, E.**; Villa, I.; Lanzi, R.; Losa, M.; Guidobono, F.; Rubinacci, A.; Growth hormone stimulates osteoprotegerin expression and secretion in human osteoblast-like cells. *The Journal of endocrinology*, 2007, 192/3, 639-45.
111. **Muti, P.** The role of endogenous hormones in the etiology and prevention of breast cancer: the epidemiological evidence. *Recent Results Cancer Res.* 2005, 166, 245-56.
112. **Nakase, T.**; Sugimoto, M.; Sato, M.; Kaneko, M.; Tomita, T.; Sugamoto, K; Nomura, S.; Kitamura, Y.; Yoshikawa, H.; Yasui, N.; Yonenobu, K.; Ochi, T. Switch of osteonectin and osteopontin mRNA expression in the process of cartilage-to-bone transition during fracture repair. *Acta Histochem.* 1998, 100(3), 287-95.
113. **Neidel, J.J.** No improvement of joint cartilage healing after trauma by the administration of insulin-like growth factor I, epidermal growth factor and fibroblast growth factor in rabbits. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 1992,130(1), 73-8.
114.  **, HD.** Revised primary structure for human growth hormone. *Nat New Biol.* 1971 Mar 17;230(11):90-1
115. **Nielsen, H.**; Bak, B.; Jorgensen, P.; Andreassen, T. Growth hormone promotes healing of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand* 1991, 62, 244-247
116. **Nishiyama, K.**; Sugimoto, T.; Kaji, H.; Kanatani, M.; Kobayashi, T.; Chihara K. Stimulatory effect of growth hormone on bone resorption and osteoclast differentiation. *Endocrinology* 1996, 137(1), 35-41.
117. **Nomura, S.**; Yamamoto, T. Molecular events caused by Mechanical Stress in Bone. *Matrix Biology* 2000, 19, 91-96.
118. **Nomura, S.**; Will, A; Edwards, D; Heath, J; Hogan, B. Developmental Expression of 2ar (Osteopontin) and SPARC (Osteonectin) RNA as revealed by In Situ Hybridization. *Journal of cell biology*, 1988; 106: 441-450
119. **Obermeyer-Pletsch, B.**; Schwetz, V. Biochemische Marker des Knochenstoffwechsels und ihre Bedeutung. *Z Rheumatol* 2016, 75:451-458
120. **Ohlsson, Claes**; Bengtsson, Bengt – Åke; Isaksson, Olle G. P.; Andreassen, Troels T., Sloopweg, Maria C. Growth hormone and bone. *Endocrine Reviews* 1998, 19(1), 55-79.
121. **Ohsaka, K.**; Neo, M.; Matsuoka, H.; Akiyama, H.; Ito, H.; Nakamura, T. Tissue responses around polymethylmethacrylate particles implanted into bone: analysis of expression of bone matrix proteins by in situ Hybridization. *J. Biomed Mater Res* 2001, 15; 54(4), 501-8.
122. **Ohtani, H.**; Nagai, T.; Nagura, H. Similarities of in situ mRNA expression between galactinase A (MMP-2) and type I procollagen in human gastrointestinal carcinoma: comparison with granulation tissue reaction. *Jpn J Cancer Res* 1995, 86, 833-839.
123. **Okamoto, T.**; Sato, Y; Yamazaki, T; Hayashi, A; Takahashi, T. Growth hormone therapy for a patient with idiopathic Fanconi syndrome and growth hormone deficiency. *CEN Case Rep.* 2017, 6:85-87
124. **Oryan, A.**; Monazzah, S; Bigham-Sadegh, A. Bone injury and fracture healing biology. *Biomed Environ Sci*, 2015; 28 (1): 57-71
125. **Perez-Sayans, M**; Somosa-Martin, JM; Barros- Angueira, F; Gandara-Rey, JM; Garcia-Garcia, A. RANK/RANKL/OPG role in distraction osteogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; 109: 679-686
126. **Phillips, AM.** Overview of the fracture healing cascade. *Injury, Int. J Care injured* 2005, 36S, S5-S7
127. **Price, P.**; Williamson, M. Effects of Warfarin on bone. *J Biol Chem.* 1981 Dec 25;256(24):12754-9
128. **Price, P.**; Williamson, M; Haba, T; Dell, R; Jee, W. Excessive Mineralization with growth plate closure in rats on chronic warfarin treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, Vol. 79, 1982, pp 7734-7738

129. **Raschke, M.**; Rasmussen, MH; Govender S. Effects of growth hormone in patients with tibial fracture: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Eur J Endocrinol* 2007; 156(3): 341-51
130. **Radomsky, M. L.**; Thompson, A. Y., Spiro, R. C.; Poser, J. W. Potential Role of Fibroblast Growth Factor in Enhancement of Fracture Healing. *Clinical Orthopaedics and related research* 1998, 355S, 283-293.
131. **Raff, T.**; Germann, G. Growth hormone in surgery – an assessment of current knowledge. *Chirurg* 1997 68(10):995-1003.
132. **Rapaport, R.**; Sills, I.; Green, L.; Barrett, P.; Labus, J.; Skuza, K. A.; Chartoff, A.; Goode, L.; Steve, M.; Petersen, B. H. Detection of human Growth Hormone Receptors on IM-9 Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cell Subsets by Flow Cytometry: Correlation with Hormone-Binding Protein levels. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1995, 80, 2612-2619.
133. **Raschke, M.**; Kolbeck, S.; Bail, H. J.; Schmidmaier, G.; Flyvbjerg, A.; Lindner, T.; Dahne, M.; Roenne, I. A.; Haas, N. Homologous growth Hormone accelerates healing of segmental bone defects. *Bone* 2001, 29(4), 368-373.
134. **Rasmussen, MH.** Obesity, Growth hormone und weight loss. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Mar 25;316(2):147-53.
135. **Reinholt, FP**; Hultenby, K; Oldberg, A; Heinegard, D.: Osteopontin – a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* June 1990, 87 (12): 4473 -5
136. **Rota, F.**; Savanelli, MC; Tauchmanova, L; Savastano, S; Lombardi, G; Colao, A; Di Somma, C. Bone density and turnover in young adult patients with growth hormone deficiency after 2-year growth hormone replacement according with gender. *J Endocrinol Invest.* 2008, 31(2): 94-102.
137. **Roupas, P.**; Herington, AC. Cellular mechanisms in the processing of growth hormone and its receptor. *Mol Cell Endocrinol* 1989, 61(1): 1-12.
138. **Rousset, M.**; Walle, M; Cambou, L; Mansour, M; Samba, A; Pereira, B; Ghanem, I; Cavanese, F.: Chronic infection and infected non union of the long bones in pediatric patients: preliminary results of bone versus beta-tricalcium phosphate grafting after induced membrane formation. *International Orthopaedics*, 2018 Feb; 42 (2): 385-390
139. **Salih, M.**; Orhii, P; Chen, C; Kalu, D. Growth hormone and the expression of mRNAs of matrix proteins and oncogenes in bone. *Molecular and cellular endocrinology* 147, 1999, 149-159
140. **Sandberg, MM.**; Aro, Hannu; Multimaeki, Petteri; Aho, Heikki; Vuorio, Eero. In situ Localisation of Collagen Production by Chondrozytes and Osteoblasts in Fracture Callus. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1989, 71-A, 69-77.
141. **Sandberg, MM.**; Aro, Hannu; Vuorio, Eero. Gene Expression during Bone Repair. *Clinical orthopaedics and related research* 1993, 289, 292-312.
142. **Sasano, Y.**; Furusawa, M.; Ohtani, H.; Takahashi, T.; Kagayama, M. chondrocytes synthesize type I collagen and accumulate the protein in the matrix during development of rat tibial articular cartilage. *Anat Embryol* 1996, 194, 247-252.
143. **Sato, M**; Yasui, N.; Nakase, T.; Kawahata, H.; Sugimoto, M.; Hirota, S.; Kitamura, Y.; Nomura, S.; Ochi, T. Expression of bone matrix proteins during distaction osteogenesis. *Journal of Bone and Mineral Research* 1998, 13, 1221-1230.
144. **Schlundt, C.**; Bucher, C; Tsitsilonis, S; Schell, H; Duda, G; Schmidt-Bleek, K. Clinical and Research approaches to treat non-union fracture. *Curr Osteoporos Rep.* 2018 Apr;16(2):155-168
145. **Schmidmaier, G.** Local application of growth factors (Insulin-like growth factor I and transforming growth factor betal) from biodegradable poly(D, L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone* 2001. 28(4) 341-50.
146. **Schmidmaier, G.** Synergistic effect of IGF-I und TGF- $\beta$ 1 on fracture healing in rats. *Acta Orthop Scand*, 2003. 74(3) 596-603.
147. **Shahzad, M.**; Shen, Y; Li, J. Role and regulation of growth plate vascularisation during coupling with osteogenesis in tibial dyschondroplasia of chickens. *Scientific reports*, 2018, 8:3680

148. **Shibata, Y.**; Fujita, S; Takahashi, H; Yamaguchi, A; Koji, T. Assessment of decalcifying protocols for detection of specific RNA by non-radioactive In Situ Hybridization in calcified tissues. *Histochem Cell Biol*, 2000; 113: 153-159
149. **Sibony, Mathilde**; Commo, Frédéric; Callard, Patrice; Gasc, Jean – Marie. Enhancement of mRNA in situ Hybridization Signal by microwave heating. The United States and Canadian Academy of Pathology, Inc. 1995, 73, 586-591.
150. **Sims, N.**; Vrachnas, C. Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Nov 1;561:22-8.
151. **Slootweg, M. C.**; Swolin, D.; Netelenbos, J. C.; Isaksson, O. G. P, Ohlsson, C. Estrogen enhances growth hormone receptors expression and growth hormone action in rat osteosarcoma cells and human osteoblastic-like cells. *Journal of endocrinology* 1997, 155, 159-164.
152. **Slootweg, M.C.** Growth hormone and bone. *Horm Metab Res*. 1993, 25(7), 335-43.
153. **Solheim, E.** Growth Factors in Bone. *International Orthopaedics* 1998, 22, 410-416.
154. **Steinbrecht, D. S.**; Mehrara, B. J.; Rowe, N. M.; Dudziak, M. E.; Luchs, J. S.; Saadeh, P. B.; Gittes, G. K.; Langaker, M. T. Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats. *Plast Reconstr Surg*. 2000, 105(6), 2028-2038.
155. **Steiof, Katja.** Zelluläre und molekulare Regulation der Osteoblastendifferenzierung. Diplomarbeit im Studiengang Biotechnologie am Fachbereich für Chemie und Biotechnik der Technischen Universität zu Berlin, April 1994, 3.
156. **Stuermer, K. M.** Pathophysiologie der gestoerten Frakturheilung. *Orthopaede* 1996, 25, 386-393.
157. **Sugimoto, M.**; Hirota, S.; Sato, M.; Kawahata, H.; Tsukamoto, I.; Yasui, N.; Kitamura, Y.; Ochi, T.; Nomura, S. Impaired expression of noncollagenous bone matrix protein mRNAs during healing in ascorbic-acid deficient rats. *J Bone Miner Res* 1998, 13(2), 271-278.
158. **Sundström, K.**; Cedervall, T; Ohlsson, C; Camacho-Hübner, C; Sävendahl, L. Combined treatment with GH und IGF-I: Additive effect on cortical bone mass but not on linear bone growth in female rats. *Endocrinology*. 2014 Dec;155(12):4798-807
159. **Takala, J.**; Ruokonen, E; Webster, NR; Nielsen, MS; Zandstra, DF; Vundelinckx, G; Hinds, CJ. Increased mortality associated with growth hormone treatment in critically ill adults. *N Engl J Med*. 1999 Sep 9;341(11):785-92
160. **Theyse, LF**; Oosterlaken-Dijksterhuis, MA; van Doorn, J; Dhert, WJ; Hazewinkel, HA. Growth hormone stimulates bone healing in a critical-sized bone defect model. *Clin Orthop Relat Res*. 2006 May;446:259-67
161. **Toblli, J.E.**; Stella, I.; Inserra, F.; Ferder, L.; Zeller, F.; Mazza, O.N. Morphological changes in cavernous tissue in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2000,13(6 Pt 1),686-92.
162. **Tran, G. T.**; Pagkalos, J.; Tsiridis, E.; Narvani, A. A.; Heliotis, M.; Mantalaris, A.; Growth hormone: Does it have a therapeutic role in fracture healing? *Expert opinion on investigational drugs* 2009, 18/7, 887-991.
163. **Trembleau, Alain**; Bloom, Floyd E. Enhanced sensitivity for light and electron microscopic In situ Hybridization with multiple simultaneous non-radioactive Oligodeoxynucleotide Probes. *The journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1995, 43, 829-841.
164. **Trippel, S. B.**; Potentials Role of Insulin-like Growth Factors in fracture Healing. *Clin Orthop* 1998, 355 Suppl, 301-313.
165. **Trippel, S.**; Coutts, R.; Einhorn, T. A.; Mundy, R.; Rosenfeld, R. Growth factors as therapeutic agents. *J Bone Joint Surg* 1996, 78A, 1272-1286
166. **Tsiridis, E.**; Upadhyay, N; Giannoudis, P. Molecular aspects of fracture healing: which are the important molecules? *Injury, Int. J Care injured*, 2007, 38S1, S11-S25
167. **Urieli-Shoval, Simcha**; Meek, Rick L.; Hanson, Ronald H.; Ferguson, Marina; Gordon, David; Benditt, Earl P. Preservation of RNA for In situ Hybridization: Carnoy's

- versus Formaldehyde Fixation. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1992, 40, 1879-1885.
168. **Van Beuningen, H.M.**; Glansbeek, H.L.; van der Kraan, P.M.; van den Berg, W.B. Osteoarthritis-like changes in the murine knee joint resulting from intra-articular transforming growth factor-beta injections. *Osteoarthritis Cartilage* 2000, 8(1), 25-33.
  169. **Virk, MS**; Lieberman, JR. Biologic adjuvants of fracture healing. *Arthritis Research & Therapy*, 2012, 14:225
  170. **Wagner, J.**; Jaurich, H; Wallner, C; Abraham, S; Becerikli, M; Dadras, M; Harati, Kamran; Duhan, V; Khairnar, V; Lehnhardt, M; Behr, B. Diminished Bone regeneration after Debridement of posttraumatic osteomyelitis in accompanied by altered cytokine levels, elevated B Cell activity and increased osteoclast activity. *J Orthop Res.* 2017 Nov;35(11):2425-2434
  171. **Walsh, L.**; Freemont, A. J.; Hoyland, J. A. The effect of tissue decalcification on mRNA retention within bone for in situ hybridization studies. *Int J Exp Path* 1993, 74, 237-241.
  172. **Walsh, M**; Choi, Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone and Beyond. *Front Immunol.* 2014 Oct 20;5:511
  173. **Wang, J**; Zhou, J; Cheng, CM; Kopchick, JJ; Bondy, CA. Evidence supporting dual, IGF-I-independent and IGF-I dependent, roles for GH in promoting longitudinal bone growth. *Journal of Endocrinology* 2004, 180, 247-255
  174. **Wang, S**; Ye, L; Li, M; Zhan, H; Ye, Rui; Li, Y; Zhao, Z. Effects of growth hormone and functional appliance on mandibular growth in an adolescent rat model. *Angle Orthodontist*, 2018
  175. **Wang, W**; Yeung, KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: a review. *Bioactive Materials* 2, 2017, 224-247
  176. **Weiss, S**; Henle, P; Bidlingmaier, M; Moghaddam, A; Kasten, P; Zimmermann, G. Systemic response of the GH/IGF-I axis in timely versus delayed fracture healing. *Growth hormone IGF Res.* 2008; 18(3): 205-12.
  177. **Weissberger, AJ**; Anastasiadis, AD; Sturgess, I; Martin, FC; Smith, MA; Sönksen, PH. Recombinant human growth hormone treatment in elderly patients undergoing elective total hip replacement. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2003 Jan;58(1):99-107
  178. **Welsch U.** Gewebe. Sobotta Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie. 2nd ed.: Urban und Fischer; 2006. p. 127-131.
  179. **Wildemann, B.**; Bamdad, P.; Holmer, Ch.; Haas, N. P.; Raschke, M. J.; Schmidmaier, G. Local delivery of growth Factors from coated titanium plates increases osteotomy healing in rats. *Bone* 2004, 34(5), 862-868.
  180. **Wildemann, B.**; Schmidmaier, G.; Brenner, N.; Hüning, M.; Stange, R.; Haas, N. P.; Raschke M. Quantification, localisation and expression of IGF-I and TGF-beta1 during growth factor stimulated fracture healing. *Calcif Tissue Int.* 2004, 74(4), 388-397.
  181. **Wilton, P.** Treatment With Recombinant Insulin-Like Growth Factor I Of Children With Growth Hormone Receptor Deficiency (Laron Syndrome). *Acta Paediatr. Suppl* 1992, 383, 137-142.
  182. **Witkowska-Sedek, E**; Stelmaszczyk-Emmel, A; Demkow, U; Pyrzak, B. Association between Vitamin D and Carboxy-Terminal Cross-linked Telopeptide of Type I Collagen in Children during Growth Hormone replacement therapy.. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1047:53-60
  183. **Wu, X.**; Yu, H.; Makan, N.; Spitz, M.R. Assessment of insulin-like growth factors and mutagen sensitivity as predictors of lung cancer risk. *Methods Mol Med.* 2003, 75, 279-87.
  184. **Yang, H.**; Wanner, I. B.; Ropera, S. D.; Chaudhari, N. An optimized method for in situ Hybridization with signal amplification that allows the detection of rare mRNAs. *Journal of histochemistry and cytochemistry* 1999, 47, 431-446.
  185. **Yeh, J. K.**; Chen, M. M.; Aloia, J. F. Effects of estrogen and growth hormone on skeleton in the ovariectomized rat with hypophysectomy. *American Physiological Society* 1997, E734-E742.

186. **Yeo, A. L.**; Levy, D; Martin, FC; Sönksen, P; Sturgess, I; Wheeler, MM; Young, A. Frailty and the biochemical effects of recombinant human growth hormone in women after surgery for hip fracture. Growth Horm IGF Res. 2003 Dec;13(6):361-70
187. **Zhang, R.**; Supowit, S. C.; Hou, X.; Simmons, D. J. Transforming Growth Factor – beta2 mRNA Level in uploaded Bone Analyzed by quantitative *In Situ Hybridisierung*. *Calcif. Tissue Int* 64 1999, 522-526.
188. **Zhu, J.X.**; Sasano, Y.; Takahashi, I.; Mizoguchi, I.; Kagayama, M. Temporal and spatial gene expression of major bone extracellular matrix molecules during embryonic mandibular osteogenesis in rats. *Histochem J.* 2001, 33, 25-35

## 7. Abkürzungen

BMP	Bone morphogenetic protein
COLL I	$\alpha_1$ Kollagen Typ I
COLL II	$\alpha_1$ Kollagen Typ II
E	Endostal
ECMP	Extrazelluläre Matrixproteine
EO	Enchondrale Ossifikation
FGF a / b	Fibroblast growth factor acidic / basic
FS	Frakturspalt
GH	Growth hormone, Wachstumshormon
GK	Geflechtknochen
IGF-I	Insuline-like growth factor - I
IGF-II	Insuline-like growth factor -II
KK	Kortikaler Knochen
OB	Osteoblasten
OC	Osteozyten
OCA	Osteocalcin
OK	Osteoklasten
ON	Osteonectin
OPN	Osteopontin
OS	Osteotomiespalt
P	Periostal
PDGF	Platelet derived growth factor
PP	Periostale Proliferationen
ROI	Region of Interest
TGF $\beta_1$ / $-\beta_2$	Transforming growth faktor beta 1/ -2



## 8. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 8.1. Abbildungen

- Abb. 1.1.: Schematische Darstellung der Phasen der Frakturheilung
- Abb. 1.2.: Zeitliche Abfolge der Heilungsstadien und Untersuchungszeitpunkte am Modell der Ratte
- Abb. 1.3.: Röntgenaufnahme einer Pseudarthrosenbildung nach operativer Versorgung einer Femurschaftfraktur
- Abb. 1.4.: Struktur des humanen Wachstumshormons
- Abb. 1.5.: Darstellung der direkten und indirekten Wirkung von GH auf das Längenwachstum am Beispiel der Epiphysenfuge
- 
- Abb. 2.1.: Durchführung der Femurosteotomie
- Abb. 2.2.: Röntgenaufnahmen nach Osteotomiedurchführung
- Abb. 2.3.: Anfertigung der Paraffinserienschnitte
- Abb. 2.4.: Agarosegel mit PCR- und Transkriptionsprodukte
- Abb. 2.5.: Unterteilung des Präparats in die 7 *Regions of Interest (RoI)*
- Abb. 2.6.: Darstellung des vierstufigen Auswertungsscores zur Beurteilung des mRNA Expression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, Osteocalcin, Osteopontin und Osteonectin
- Abb. 2.7.: Quantifizierung der  $\alpha_1$  Kollagen Typ II – mRNA exprimierenden Zellen
- 
- Abb. 3.1.: Tierhaltung nach Osteotomiedurchführung
- Abb. 3.2.: Auswertung anhand der 7 *Regions of Interest (RoI)*
- Abb. 3.3.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, Placebo 7 Tage, 50x Vergrößerung
- Abb. 3.4.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, GH 7 Tage, 50x Vergrößerung
- Abb. 3.5.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, Placebo 14 Tage, 50x Vergrößerung
- Abb. 3.6.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, GH 14 Tage, 50x Vergrößerung
- Abb. 3.7.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, Placebo 21 Tage, 50x Vergrößerung
- Abb. 3.8.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, GH 21 Tage, 50x Vergrößerung
- Abb. 3.9.: Genexpression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA am 7. postoperativen Tag (Fehlerbalkendiagramm)
- Abb. 3.10.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, GH 7 Tage, 400x Vergrößerung
- Abb. 3.11.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, Placebo 7 Tage, 50x Vergrößerung
- Abb. 3.12.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, GH 7 Tage, 50x Vergrößerung
- Abb. 3.13.: Genexpression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA am 14. postoperativen Tag (Fehlerbalkendiagramm)
- Abb. 3.14.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, Placebo 14 Tage, 50x Vergrößerung
- Abb. 3.15.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, GH 14 Tage, 50x Vergrößerung
- Abb. 3.16.: Genexpression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ I-mRNA am 21. postoperativen Tag (Fehlerbalkendiagramm)
- Abb. 3.17.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, Placebo 21 Tage, 50x Vergrößerung
- Abb. 3.18.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, GH 21 Tage, 50x Vergrößerung
- Abb. 3.19.: Genexpression von Osteopontin-mRNA am 7. postoperativen Tag (Fehlerbalkendiagramm)
- Abb. 3.20.: Osteopontin, Placebo 7 Tage, 50x Vergrößerung
- Abb. 3.21.: Osteopontin, GH 7 Tage, 50x Vergrößerung
- Abb. 3.22.: Osteopontin, GH 7 Tage, 400x Vergrößerung
- Abb. 3.23.: Genexpression von Osteopontin-mRNA am 14. postoperativen Tag (Fehlerbalkendiagramm)
- Abb. 3.24.: Osteopontin, Placebo 14 Tage, 16x Vergrößerung
- Abb. 3.25.: Osteopontin, GH 14 Tage, 16x Vergrößerung
- Abb. 3.26.: Genexpression von Osteopontin-mRNA am 21. postoperativen Tag (Fehlerbalkendiagramm)
- Abb. 3.27.: Osteopontin, Placebo 21 Tage, 50x Vergrößerung

- Abb. 3.28.: Osteopontin, GH 21 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.29.: Genexpression von Osteocalcin-mRNA am 7. postoperativen Tag (Fehlerbalkendiagramm)  
 Abb. 3.30.: Osteocalcin, Placebo 7 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.31.: Osteocalcin, GH 7 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.32.: Genexpression von Osteocalcin-mRNA am 14. postoperativen Tag (Fehlerbalkendiagramm)  
 Abb. 3.33.: Osteocalcin, Placebo 14 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.34.: Osteocalcin, GH 14 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.35.: Genexpression von Osteocalcin-mRNA am 21. postoperativen Tag (Fehlerbalkendiagramm)  
 Abb. 3.36.: Osteocalcin, Placebo 21 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.37.: Osteocalcin, GH 21 Tage, 50 x Vergrößerung  
 Abb. 3.38.: Osteonectin, GH 7 Tage, 400x Vergrößerung  
 Abb. 3.39.: Genexpression von Osteonectin-mRNA am 7. postoperativen Tag (Fehlerbalkendiagramm)  
 Abb. 3.40.: Osteonectin, Placebo 7 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.41.: Osteonectin, GH 7 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.42.: Genexpression von Osteonectin-mRNA am 14. postoperativen Tag (Fehlerbalkendiagramm)  
 Abb. 3.43.: Osteonectin, Placebo 14 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.44.: Osteonectin, GH 14 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.45.: Genexpression von Osteonectin-mRNA am 21. postoperativen Tag (Fehlerbalkendiagramm)  
 Abb. 3.46.: Osteonectin, Placebo 21 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.47.: Osteonectin, GH 21 Tage, 50 x Vergrößerung  
 Abb. 3.48.: Genexpression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA am 7. postoperativen Tag (Fehlerbalkendiagramm)  
 Abb. 3.49.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, Placebo 7 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.50.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, GH 7 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.51.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, GH 7 Tage 400x Vergrößerung  
 Abb. 3.52.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, GH 7 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.53.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, GH 7 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.54.: Osteocalcin, GH 7 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.55.: Genexpression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA am 14. postoperativen Tag (Fehlerbalkendiagramm)  
 Abb. 3.56.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, Placebo 14 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.57.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, GH 14 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.58.: Genexpression von  $\alpha_1$  Kollagen Typ II-mRNA am 21. postoperativen Tag (Fehlerbalkendiagramm)  
 Abb. 3.59.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, Placebo 21 Tage, 50x Vergrößerung  
 Abb. 3.60.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ II, GH 21 Tage, 50 x Vergrößerung

## 8.2. Tabellen

- Tab. 1.1.: Wachstumsfaktoren und ihre Wirkungsweise während der Frakturheilung  
 Tab. 2.1.: Übersicht über die verwendeten Primer  
 Tab. 3.1.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, 7 Tage postoperativ  
 Tab. 3.2.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, 14 Tage postoperativ  
 Tab. 3.3.:  $\alpha_1$  Kollagen Typ I, 21 Tage postoperativ  
 Tab. 3.4.: Mittelwerte des descriptiven Scores für  $\alpha_1$  Kollagen Typ I im gesamten Frakturkallus zu den drei untersuchten Zeitpunkten

Tab. 3.5.:	Osteopontin, 7 Tage postoperativ
Tab. 3.6.:	Osteopontin, 14 Tage postoperativ
Tab. 3.7.:	Osteopontin, 21 Tage postoperativ
Tab. 3.8.:	Mittelwerte des descriptiven Scores für Osteopontin im gesamten Frakturkallus zu den drei untersuchten Zeitpunkten
Tab. 3.9.:	Osteocalcin, 7 Tage postoperativ
Tab. 3.10.:	Osteocalcin, 14 Tage postoperativ
Tab. 3.11.:	Osteocalcin, 21 Tage postoperativ
Tab. 3.12.:	Mittelwerte des descriptiven Scores für Osteocalcin im gesamten Frakturkallus zu den drei untersuchten Zeitpunkten
Tab. 3.13.:	Osteonectin, 7 Tage postoperativ
Tab. 3.14.:	Osteonectin, 14 Tage postoperativ
Tab. 3.15.:	Osteonectin, 21 Tage postoperativ
Tab. 3.16.:	Mittelwerte des descriptiven Scores für Osteonectin im gesamten Frakturkallus zu den drei untersuchten Zeitpunkten
Tab. 3.17.:	$\alpha_1$ Kollagen Typ II, 7 Tage postoperativ
Tab. 3.18.:	$\alpha_1$ Kollagen Typ II, 14 Tage postoperativ
Tab. 3.19.:	$\alpha_1$ Kollagen Typ II, 21 Tage postoperativ
Tab. 3.20.:	Mittelwerte der $\alpha_1$ Kollagen Typ II exprimierenden Zellen/Rol im gesamten Frakturkallus zu den drei untersuchten Zeitpunkten

## **9. Eidesstattliche Versicherung**

„Ich, Rodanthi E. Margariti, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Genexpression von Extrazellulären Matrixproteinen während der frühen Knochenheilung nach systemischer Applikation von Wachstumshormon am Modell der Ratte“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

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

Datum

Unterschrift

## **10. Lebenslauf**

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

## 11. Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei dem ehemaligen Direktor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin

*Herrn Univ.- Prof. Dr. med. Norbert P. Haas*

und dem Direktor des Julius Wolff Instituts für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration

*Herrn Univ.- Prof. Dr. ing. Georg Duda*

bedanken, in deren Abteilungen ich meine wissenschaftliche Arbeit durchführen durfte.

Mein besonderer Dank und Respekt gilt

*Frau Prof. Dr. rer. nat. Britt Wildemann*

für die exzellente wissenschaftliche Unterstützung, Betreuung und Motivation in der Durchführung dieses Themas sowie

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

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

Des Weiteren bedanke ich mich bei

*Frau Camilla Bergmann, Frau Gabriele Hardung und Frau Marzena Princ,*

die mir jeder Zeit hilfsbereit zur Seite standen,

bei *Frau Dr. med. Lotta von Cramon, Herrn Dr. med. Cem Yetimoglu und Herrn Gotthard Falke* sowie

bei allen Mitarbeitern und Doktoranden des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie, des Julius Wolff Instituts der Charité – Universitätsmedizin Berlin und des Biometrischen Instituts der Humboldt Universität zu Berlin für die fruchtbare Zusammenarbeit.

Schließlich möchte ich mich bei *Herrn Georgios* und *Frau Angela Bakalios* für ihre liebevolle und tatkräftige Unterstützung in den Berliner Jahren bedanken.

Meinen Eltern, meinem lieben Ehemann und meinen Töchtern danke ich herzlich für die unendliche Aufmunterung und Unterstützung in jeglicher Lebenslage.

Rodanthi E. Margariti