

Diplomarbeit

Evaluierung automatisierter versus visueller Auswertung
von BrdU Schnitten an der Epiphysenfuge der wachsenden
Ratte.

Eingereicht von:

Nina Hauter

Matrikelnummer: 0533472

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktorin der gesamten Heilkunde
(Dr.med.univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

Ausgeführt an der

Universitätsklinik für Kinder- und Jugendchirurgie

Unter der Anleitung von Betreuerin

Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. Annelie-Martina Weinberg

Berlin, 16.01.2011

Unterschrift

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Berlin, 16. Januar 2011

Nina Hauter

Danksagung

Diese Diplomarbeit entstand an der Klinik für Kinder- Jugendchirurgie der Universitätsklinik Graz unter der Leitung von Frau Assoz. Prof. Priv.-Doz. Dr. med. Annelie-Martina Weinberg.

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Besonders möchte ich mich bei Frau Annelie-Martina Weinberg für die Möglichkeit bedanken, in Ihrer Arbeitsgruppe diese Diplomarbeit anzufertigen zu können. Nicht zuletzt durch die freundliche und engagierte Betreuung hat mir diese Arbeit viel Freude bereitet. Ein besonderer Dank gilt meinem Zweitbetreuer Univ.-Ass. DI Dr. Thomas Kroneis, der mit sehr viel Engagement, guten Ideen und unermüdlichem Einsatz meine Diplomarbeit betreut hat . und stets für eine gute Kommunikation innerhalb des gesamten Teams gesorgt hat.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Dr. Eva Widni, die stets für mich ansprechbar war und mich vor allem in der Anfangsphase für das Projekt begeistert hat und mir immer zur Seite stand.

Außerdem möchte ich mich bei Dr. Silvia Zoetsch und DI (FH) Katrina Evers für eine angenehme Zusammenarbeit als Team bedanken.

Ein großer Dank geht zudem an das gesamte Personal des histologischen Institutes der Medizinischen Universität Graz, wo ich sehr freundlich aufgenommen wurde und mir viele Personen die Einarbeitung in neue Arbeitsprozesse sehr leicht gemacht haben.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Ziel dieser Arbeit	1
1.2 Problemstellung	3
2. Allgemeine Knochenlehre/Osteologie	6
2.1 Knochenformen anhand der Morphologie	8
2.2 Knochenarten	10
2.3 Knochenaufbau	12
2.4 Gefäßversorgung	14
2.5 Knochenzellen	15
2.6 Knochenmatrix	19
2.7 Osteogenese	21
2.8 Epiphysenfuge	25
2.9 Frakturheilung	32
2.10 Zellproliferation und Zellzyklus	35
3. Material und Methoden	36
3.1 DNA-Replikation und BrdU-labeling	36
3.2 Rattenmodell	38
3.3 Entkalkung und HOPE®-Fixierung	39
3.4 Immunhistochemie/ BrdU-Protokoll	39
3.5 VIS – Visiopharm Image System / newCAST / Cell Count	42
3.6 Automatisiertes Auswertverfahren (Cellenger Developer Studio 4.0®)	43
4. Auswertung	46
5. Diskussion	49
6. Anhang	52
7. Literaturverzeichnis	54

Abkürzungsverzeichnis

AO	Arbeitsgemeinschaft Osteosynthese
ATF-2	Activating Transcription Factor-2
ATP	Adenosintriphosphat
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BrdU	5-Bromo-2'-desoxyuridin
C	Celsius
CAK	CDK Inhibitoren und Aktivatoren
CDK	Zyclinabhängige Kinasen
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EZM	Extrazelluläre Matrix
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FGF	Fibroblast Growth Factor
g	Gramm
GH	Growth Hormon (Wachstumshormon)
gtt	Tropfen (Einheit)
h	Stunde
H&E	Hämatoxylin-Eosin Färbung
HBSS	Hanks Buffered Salt Solution
HOPE	Hepes Glutamic Acid Buffer Mediated Organic Solvent Protection Effect
IGF-I	Insulin-like Growth Factor-I
IGF-II	Insulin-like Growth Factor-II
IgG1	Immunglobulinklasse G, Subklasse 1
Ihh	Indian hedgehog
kg	Kilogramm
mg	Milligramm
Min	Minuten
ml	Milliliter
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MPS	Mononukleares Phagozytensystem
MSC	Mesenchymal Stem Cells

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI	Proliferationsindex
PTH	Parathormon
PTHrP	Parathyroid Hormone-Related Peptide
RANK	Receptor for Activation of Nuclear Factor Kappa B
RANKL	RANK-Ligand
RB	Retinoblastom-Gen
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
TGF-β	Transforming Growth Factor Beta
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (TdT)-mediated dUTP Nick End Labelling
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VIS	Visiopharm Image System

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Schematische Darstellung des Lamellenknochens	11
Abbildung 2:	Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (MSC)	15
Abbildung 3:	Schematische Darstellung chondraler Ossifikation	23
Abbildung 4:	Epiphysenfuge aufgenommen mit Fluoreszenzmikroskop 10-fache Vergrößerung	25
Abbildung 5:	Morphologie der Epiphysenfuge	26
Abbildung 6:	Darstellung der 4 Phasen der Frakturheilung	33
Abbildung 7:	Strukturformeln von BrdU und Thymidin	36
Abbildung 8:	Markierung von proliferierenden Zellen mit BrdU	37
Abbildung 9:	Aufnahme einer Epiphysenfuge mittels Fluoreszenzmikroskop	40
Abbildung 10:	Epiphysenfuge Negativkontrolle	41
Abbildung 11:	Positivkontrolle 769-P Zelllinie, Nierenzellkarzinom	41
Abbildung 12:	Epiphysenfuge R102RA_BrdU_OT070 komplett ausgeschnitten	42
Abbildung 13:	Ausschnitt aus Abbildung 13; Vergrößerung	42
Abbildung 14:	Epiphysenfuge R102RA_BrdU_OT070 halbiert	43
Abbildung 15:	Arbeitsmaske Cellenger® Developer Studio 4.0	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Visuelle Auswertung: Gesamtanzahl an Kernen sowie BrdU-pos. Kernen der Epiphysenfugen an neun Beispielen	43
Tabelle 2:	Auswertung mit Cellenger® Developer Studio 4.0; Anzahl DAPI- positiver sowie BrdU-positiver Kerne	45

Grafik-Verzeichnis

Grafik 1:	Graphische Darstellung der Werte aus Tab. 1 und 2, BrdU-Signal 50	46
Grafik 2-4:	Vergleich der Ergebnisse von Cellenger-Auszählung und VIS- Auszählung	47-48

Abstract

Introduction

Overgrowth as a response to bone trauma is a well known phenomenon in paediatric traumatology, but to date, the underlying drivers have not been fully clarified yet. The hypothesis that fracture instability alters physal growth processes at the nearby growth plate and is thereby thought to be a leading cause of the incidence of growth disturbances after fracture, gave the foundation to this study to compare processes of the physis after non-stabilised and stabilised fractures of the tibia. This part of the project however, describes the testing to develop an automated method to evaluate BrdU-labeled chondrocytes of the physis with the Cellenger Developer Studio 4.0[®].

Methods

In a rat-fracture-Model the growth processes in the nearby physis are examined. The testing of an automated method focuses on BrdU-labeled chondrocytes of the proliferative zone, which were firstly visually, secondly automated detected and compared. In contrast to former projects, in this study chondrocytes of the entire physis were included, and the fraction of BrdU-positive cells out of all detected cells were determined.

Results

The data of the visually as well as automated method were graphically displayed and compared. This showed, despite the specific developed adjustments of the Cellenger[®], a considerable discrepancy towards the visual enumeration. However, the relation of the results from different images towards each other are highly similar.

Discussion

The advantage of an automated method to detect cells would be the possibility to analyze a large quantity of data and be able to work efficiently, reproducibly and within a short period of time. Nevertheless, a systematic error needs to be taken into account, because cells beyond the proliferative zone are incorporated into the evaluation. Therefore, the favoured results by using the automated method with the Cellenger[®] should not rely on definite numerary. The program detects the signals in terms of size, which makes it an adequate method, as long as the favoured results are based on relations.

Zusammenfassung

Einleitung

Stimulative Wachstumsstörungen sind in der Kindertraumatologie gut bekannt, die Ursachen sind bisher nicht vollständig geklärt. Die Annahme, dass die Instabilität einer Fraktur die Prozesse der fraktur nahen Epiphysenfugen modifiziert und somit als Ursache für Wachstumsstörungen nach Frakturen in Betracht kommt, bietet die Grundlage dieser Studie, den Einfluss von nicht-stabilisierten und stabilisierten Frakturen auf fraktur nahe Epiphysenfugen und somit auf Wachstumsprozesse zu klären. Ziel ist es, Zusammenhänge der Frakturheilung, Frakturstabilität und physyaleer Wachstumsprozesse zu analysieren. Die vorliegende Arbeit beschreibt als Teil des Projektes die Testung einer automatisierten Auswertmethode von BrdU-gelabelten Chondrozyten der Epiphysenfugen mit Hilfe des Cellenger Developer Studio 4.0®.

Methodik

In einem Ratten-Fraktur-Modell wird der Wachstumsprozess der fraktur nahen Epiphysenfuge untersucht. Die Erprobung einer automatisierten Auswertmethode fokussierte sich dabei auf BrdU-gelabelte Chondrozyten der Proliferationszone, welche mittels visueller sowie automatisierter Methode detektiert und verglichen wurden. Im Gegensatz zu früheren Studien wurden Chondrozyten der gesamten Epiphysenfuge in die Auswertung einbezogen und der Anteil BrdU-positiver Zellkerne an der Gesamtzellkernzahl der Epiphysenfuge ermittelt.

Ergebnisse

Die Werte der visuellen sowie der automatisierten Auswertung wurden graphisch dargestellt und verglichen. Dabei wird deutlich, dass trotz spezifischer Einstellungen im Cellenger®, eine deutliche Diskrepanz zur visuellen Auszählung besteht, die Relationen der Ergebnisse der unterschiedlichen Bilder zueinander in beiden Auszählverfahren jedoch sehr ähnlich sind.

Diskussion

Der Vorteil einer automatisierten Auswertmethode besteht vor allem in der Möglichkeit, eine große Menge an Daten mit wenig Zeitaufwand effizient und reproduzierbar auszuwerten. Dabei muss ein systematischer Fehler einkalkuliert werden, da Chondrozyten außerhalb der proliferativen Zone in die Auswertung miteinbezogen werden. Wird die automatisierte Auswertung mit Hilfe des Cellenger® angewendet, sollte es bei den gewünschten Ergebnissen nicht auf direkte Zahlenwerte ankommen, da das Programm mit Flächen arbeitet. Steht jedoch eine Relation im Vordergrund, so bietet sich die erprobte automatisierte Auswertung als geeignete Methode an.

1. Einleitung

1.1 Ziel dieser Arbeit

Das kindliche Skelett besitzt die Besonderheit, auf Traumata mit vermehrtem Längenwachstum oder Wachstumsstillstand zu reagieren. Diese Phänomene sind in der Kindertraumatologie gut bekannt, jedoch konnten die Ursachen bisher nicht vollständig geklärt werden. In vorangegangenen Studien von Gaber *et al.* und Janezic *et al.* (1,2) konnte gezeigt werden, dass die Proliferations- sowie Apoptoserate der Chondrozyten der fraktur nahen Epiphysenfugen nach nicht-stabilisierter Fraktur der Tibia erhöht sind. Diese erhöhte Proliferationsrate der Chondrozyten konnte nicht durch erhöhte Expression von Wachstumsfaktoren wie BMPs (Bone Morphogenetic Protein), VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) oder FGF (Fibroblast Growth Factor) erklärt werden. Basierend auf diesen Ergebnissen eines nicht-stabilisierten Fraktur-Modells wird angenommen, dass die Instabilität einer Fraktur die Prozesse der fraktur nahen Epiphysenfugen modifiziert und somit als Ursache für Wachstumsstörungen nach Frakturen in Betracht kommt.

Im Rahmen eines laufenden Projektes (AO-Projekt; Does fracture instability cause leg length discrepancies?) werden diese Prozesse in einem Ratten-Fraktur-Modell untersucht, um den Einfluss von nicht-stabilisierten und stabilisierten Frakturen auf die fraktur nahen Epiphysenfugen und somit auf Wachstumsprozesse zu klären. Das Ziel dabei ist es, Informationen für zukünftige Therapiemöglichkeiten in der Kindertraumatologie zu erlangen, um somit Wachstumsstörungen nach Frakturen von langen Röhrenknochen zu vermeiden.

Janezic *et al.* (2) konnte in seiner Arbeit zeigen, dass es zu einer signifikanten Steigerung der Proliferationsrate der Chondrozyten der fraktur nahen Epiphysenfugen (nicht-stabilisierte Fraktur) im Vergleich zu den intakten kontralateralen Knochen (Tibiae) sowie der Kontrollgruppe (ohne Fraktur) kam. Er kam zu der Vermutung, dass posttraumatische stimulative Wachstumsstörungen durch die lokale Reaktion der fraktur nahen Wachstumsfuge ausgelöst werden.

In der Arbeit von Janezic *et al.* (2) wurden proliferierende Chondrozyten der proximalen Epiphysenfugen nach nicht-stabilisierter Querfraktur der Tibia mittels 5-Bromo-2'-desoxyuridin -Färbung (BrdU, 5-Bromo-2'-desoxy-uridine Labeling and Detection Kit I®;

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) dargestellt. Dabei wird BrdU anstelle von Thymin in die DNA proliferierender Zellen eingebaut. Anhand von primären und sekundären Antikörpern können die BrdU-gelabelten Kerne detektiert werden. Dies erwies sich als kompetente Methode zur Darstellung von proliferierenden Chondrozyten. Zur Auswertung wurden jeweils drei Bereiche pro Schnitt (medial, median, lateral) herangezogen. Diese Bereiche umfassten je nach Beschaffenheit des Schnitts etwa 15 bis 20 vertikale Zellsäulen. Die Proliferationsrate wurde aus dem prozentuellen Anteil der BrdU-positiven Kerne innerhalb dieser Bereiche ermittelt (Proliferationsindex). Bei dieser Auswertmethode ergeben sich folgende Schwierigkeiten: Die drei Bereiche der Epiphysenfuge können nicht repräsentativ (vorurteilsfrei) ausgewählt werden und sind nicht reproduzierbar. Die Auswahl der Bereiche muss auf alle Schnitte angewendet werden und ist dadurch mit einem hohen Aufwand verbunden. Das visuelle Auszählen der Kerne ist stark vom Auswertenden abhängig, zusätzlich kommen Unterschiede durch Faktoren wie Müdigkeit, Lernkurve und Motivation jedes Operateurs hinzu.

Das Ziel dieser Diplomarbeit ist es, eine automatisierte Auswertung BrdU-gelabelter Chondrozyten der Epiphysenfuge mit Hilfe des Cellenger Developer Studio 4.0[®] zu testen, sodass 1. die Proliferation der gesamten Fuge berücksichtigt wird, 2. eine große Menge an Daten erfasst, sowie reproduzierbar und effizient ausgewertet werden kann, sowie 3. die Abhängigkeit vom Auswertenden minimiert wird. Die automatisierte Auswertung wurde anhand eines Anteils der Daten aus dem laufenden Projekt optimiert und getestet. Die Ergebnisse wurden mit ermittelten Daten aus der visuellen Auswertung gesamter Epiphysenfugen verglichen. Zur visuellen Auswertung wurden die am Fluoreszenzmikroskop (Leica DM6000 B) gescannten Bilder der Epiphysenfugen ausgezählt (VIS – Visiopharm Image System, newCAST, Cell Count). Die Proliferation (Proliferationsindex) wurde ermittelt als der Quotient aus der Anzahl BrdU-positiver Kerne und der Anzahl aller epiphysärer Kerne.

1.2 Problemstellung

Die Instabilität einer Fraktur bzw. des Frakturkallus als Auslöser für vermehrtes Längenwachstum wurden schon in der Arbeit von Garces *et al.* (3) beleuchtet. Es wird davon ausgegangen, dass nicht nur die Kallusbildung im Frakturgebiet, sondern ebenso Prozesse der Epiphysenfuge durch Frakturinstabilität aktiviert werden. Ferner geht aus den Arbeiten von Janezic *et al.* und Gaber *et al.* (1,2) hervor, dass Frakturinstabilität die Proliferationsrate der Chondrozyten der fraktur nahen Fuge erhöht. Ziel des AO-Projektes ist es, Proliferationsunterschiede in fraktur nahen Epiphysenfugen nach stabilisierter sowie nicht-stabilisierter Fraktur anhand eines Rattenmodells aufzuklären. Die Hypothese dabei ist, dass Fraktur stabilisierung die Proliferationsrate der Wachstumsfuge und damit stimulative Wachstumsstörungen vermindert.

Es können zwei Arten von Wachstumsstörungen unterschieden werden: die stimulative und die hemmende Wachstumsstörung.

Unter einer hemmenden Wachstumsstörung versteht Lear *et al.* (4) den vorzeitigen Verschluss der Epiphysenfuge. Diese Wachstumsstörungen entstehen aufgrund von Knochenbrückenbildungen und können partiell oder vollständig auftreten. Die hemmende Wachstumsstörung ist sehr selten und kommt vor allem bei schweren Traumata mit Weichteil- und Quetschverletzungen vor, bei denen es zur Schädigung des epiphysären Gefäßsystems und damit zum Untergang des Knorpelsystems kommt (5). Hemmende Wachstumsstörungen führen zu Verkürzung mit möglicher Achsabweichung des betreffenden Knochens und damit der entsprechenden Extremität.

Die zugrundeliegenden Pathomechanismen der stimulativen Wachstumsstörungen nach Fraktur sind immer noch nicht vollständig geklärt. Laer *et al.* (4) beschreibt die posttraumatische Stimulation einer oder mehrerer Wachstumsfugen in ihrer gesamten Ausdehnung als typische und obligatorische Reaktion des wachsenden Skeletts auf ein adäquates Trauma. Demnach erfahren nach jeder Fraktur die fraktur nahen Fugen eine Aktivitätssteigerung.

Es existieren konkurrierende Hypothesen, die den Grund für das unterschiedliche Wachstum nach einer Fraktur zu erklären versuchen. Zu diesen Hypothesen gehören

Hypervaskularität der Epiphysenfuge als ein Ergebnis des Traumas (6), Instabilität einer Fraktur (3), verminderter periostaler Zug (4), Geschlecht (7), Frakturtyp (8) und Alter (9). Bei prämaternen Traumata kommt es nach passagerem Längenzuwachs zum frühzeitigen Fugenschluss mit geringgradiger Verkürzung des betroffenen Knochens. Als grobe Regel gilt, dass vor dem 10. Lebensjahr eine Verlängerung, nach dem 10. Lebensjahr eher eine Verkürzung des betroffenen Skelettabschnitts eintritt (10).

Das jeweilige Ausmaß des Stimulus an der Fuge ist dabei abhängig vom Umbau, vom Zeitpunkt (Alter des Kindes), von der Häufigkeit durchgeführter Repositionsverfahren sowie von operativen Folgeeingriffen. Je mehr Achsabweichungen, Seit-zu-Seit-Verschiebungen und je mehr Kallus remodelliert werden muss, desto länger ist die Stimulationszeit und desto ausgeprägter sind die Folgen der Wachstumsstörung (11).

Bezüglich der oberen Extremitäten führen Längenunterschiede nicht zu funktionellen Störungen und sind klinisch irrelevant. Stimulative Wachstumsstörungen der unteren Extremitäten sind meist klinisch relevant, da sie zu Gelenksdeformitäten, Beckenschiefstand mit folgender lumbaler Skoliose, früher Arthrose sowie psychologischen Problemen führen können (10).

Der Begriff der posttraumatischen Deformität umfasst persistierende Achsen- und Torsionsfehler, die funktionell nicht kompensiert werden können oder als kosmetisch störend empfunden werden (10). Deformitäten nach Frakturen im Kindesalter sind meist das Resultat überschätzter Spontankorrektur von primär belassenen Fehlstellungen und demzufolge vermeidbar. Ein wesentliches Effizienz- und damit Qualitätskriterium in der Frakturbehandlung besteht im Verhindern von posttraumatischen Deformitäten (10).

Im Vergleich zum adulten Skelett besitzen wachsende Knochen die Fähigkeit zur Spontankorrektur, welche den Ausgleich von Achsen- und Rotationsfehlern in allen drei Ebenen bezeichnet. Spontankorrekturen korrelieren mit dem Patientenalter und mit der Lokalisation, d.h. mit dem Wachstumsanteil der nächstliegenden Fugen, von der funktionellen sowie statischen Belastung der Fraktur (5). Die Epiphysenfugen sind in unterschiedlichem Maße an dem Längenwachstum des jeweiligen Knochens beteiligt. Es werden hochprozentig wachsende von niedrigprozentig wachsenden Fugen unterschieden, wobei sich erstgenannte wesentlich später verschließen.

Die Fähigkeit der Spontankorrektur kann und wird in Therapiekonzepten miteinbezogen, jedoch darf sie nicht auf alle Frakturen des wachsenden Skeletts angewendet werden. Der Spontankorrektur stehen die Kenntnisse biologischer Grenzen gegenüber, die sich aus

Besonderheiten der Physiologie der Wachstumsfugen, des Periosts und nicht zuletzt aus klinischen Erfahrungen ableiteten lassen (10).

Im Rahmen des Projektes soll gezeigt werden, dass durch Stabilisierung einer Fraktur, die Proliferationsrate der fraktur nahen Wachstumsfuge und damit stimulative Wachstumsstörungen vermindert werden können. Dazu wird in einem Ratten-Fraktur-Modell der Wachstumsprozess der fraktur nahen Epiphysenfuge untersucht. Die Untersuchung fokussiert sich dabei auf die Chondrozyten der Proliferationszone sowie die Apoptoserate epiphysärer Chondrozyten, um Zusammenhänge der Frakturheilung, Frakturstabilität und physealer Wachstumsprozesse zu analysieren.

2. Allgemeine Knochenlehre/Osteologie

Das Skelett des erwachsenen Menschen besteht aus ca. 206 Einzelknochen unterschiedlicher Form und Struktur, die in axiale Anteile und Extremitätenknochen unterteilt werden.

Knochengewebe ist ein hochdifferenziertes Stützgewebe, das an sämtlichen Bewegungen des Körpers beteiligt ist und darüber hinaus zum Schutz wichtiger Organe (wie die Schädelknochen das Gehirn, der Brustkorb das Herz und die Lunge) dient.

Zum anderen dient Knochen als größter Speicher für Kalzium- und Phosphationen, die mit dem Extrazellulärraum im Gleichgewicht stehen.

Knochengewebe ist ein Bindegewebe aus einer ausgewogenen Mischung organischer Substanz (kollagene Fasern und Knochenzellen) sowie anorganischem Material (Mineralsalze v.a. in Form von Kalziumphosphat-Verbindungen). Dabei besteht Knochen zu etwa 70 % aus Kalziumhydroxylapatit, einem Kalziumphosphatkomplex mit einem geringen Anteil anderer Kalziumverbindungen. Etwa 20 % des Knochenmaterials werden aus organischer Matrix gebildet, wobei der größte Teil auf Typ I-Kollagen fällt.

In einem komplexen Mineralisationsprozess werden Hydroxylapatitkristalle an Komponenten der Grundsubstanz sowie an kollagene Fibrillen angelagert. Die daraus resultierende spezielle Festigkeit und Stabilität des Gewebes machen es für die Stütz- und Schutzfunktionen besonders geeignet (12).

Im roten Knochenmark findet die Hämatopoese statt, die sich beim Erwachsenen auf folgende Orte beschränkt: Brustbein, Wirbelkörper, Rippen, Beckenkamm, Schädel und proximales Ende von Femur und Humerus. Während der Kindheit ist noch der gesamte Knochenmarkraum an der Hämatopoese beteiligt.

Binde- und Stützgewebe erfüllt im Organismus eine große Zahl unterschiedlichster Funktionen. Es bildet Knochen, Knorpel und die für das Funktionieren des Bewegungsapparates unerlässlichen Bänder und Sehnen. Daneben ist das Bindegewebe an der Architektur parenchymatöser Organe, an dem Aufbau der Blutgefäße, des Intestinaltraktes sowie des Fettgewebes beteiligt. Entsprechend dieser vielen unterschiedlichen Funktionen kann man auch eine Reihe unterschiedlicher zellulärer Elemente des Bindegewebes unterscheiden. Allen ist gemein, dass sie von undifferenzierten, mesenchymalen Stammzellen abstammen und eine Mischung aus

Glykoproteinen und Proteoglykanen sezernieren, die auch als extrazelluläre Matrix bezeichnet wird, darstellen.

Die Zellen des Bindegewebes produzieren zum Teil erhebliche Mengen der extrazellulären Matrix. In dieser finden sich in jeweils unterschiedlichen Proportionen vier Typen von Makromolekülen: Kollagene, Elastin, Proteoglykane und nicht-kollagene Glykoproteine.

Die jeweilige Gestalt der Knochen ist genetisch determiniert, ihre Struktur ist jedoch abhängig von der funktionellen Beanspruchung. Die Architektur des Knochens folgt dem Prinzip der Leichtbauweise. Durch diese kommt es bei geringstem Materialaufwand zu größtmöglicher Gewichtsminimierung. Dadurch wird eine maximierte Stabilität mit minimiertem Materialaufwand erreicht, welche als Maximum-Minimum-Prinzip bezeichnet wird. Das Trabelkelwerk der Substantia spongiosa zeigt für die einzelnen Knochen eine jeweils spezifische Ausrichtung. Diese Spongiosaarchitektur ist Ausdruck und Resultat einer funktionellen Anpassung. Dies bedeutet, dass die Knochen-trabelkel so ausgerichtet sind, dass sie den am gegebenen Ort auftretenden Maxima der Zug- und Druckspannung entsprechen. Dieses Bauprinzip wird als trajektorielle Bauweise bezeichnet (13).

Funktions- und Belastungsänderungen im Organismus führen stets zu einer Reorganisation des Knochengewebes und zum Umbau des Knochens. Nicht nur während der Embryonalentwicklung, sondern auch im erwachsenen Körper wird in Anpassung an die funktionellen Bedingungen und die jeweilige Belastungssituation laufend umorganisiert. Dieser Prozess ist verbunden mit Knochenresorption, Neubildung von mineralisierter Matrix und Gefäßneubildung (12).

2.1 Knochenformen anhand der Morphologie

Anhand ihrer äußeren Form können 5 Knochentypen unterschieden werden: *Ossa brevia*, *Ossa longa*, *Ossa plana*, *Ossa pneumatica* und *Ossa irregularia*.

Kurze Knochen (*Ossa brevia*) sind unregelmäßig würfelförmig, bestehen größtenteils aus Spongiosa, die von einer dünnen Kortikalis umgeben und mit Knochenmark ausgefüllt ist. Sie sind bis auf die Gelenkflächen von Periost umgeben. Beispiele dieser Knochenarten sind Hand- und Fußwurzelknochen (*Ossa carpi*, *Ossa tarsi*).

Lange Knochen (*Ossa longum*) oder Röhrenknochen sind lange Knochen der Gliedmaßen. Es handelt sich um stabförmige Knochen, bei denen die Längsausdehnung die Breitenausdehnung deutlich überragt. Sie lassen sich makroskopisch in vier Abschnitte unterteilen: Die Diaphyse [1], besteht aus einer massiven Kortikalis. Ein Lamellensystem bildet einen Zylindermantel, der die *Cavitas Medullaris* umhüllt. Während der Embryonalentwicklung findet sich in den Diaphysen rotes, blutbildendes Knochenmark, welches im erwachsenen Skelett durch gelbes Fettmark ersetzt wird. Die distalen und proximalen Epiphysen [2] werden von Spongiosa mit einer dünnen Kortikalis Spongiosa gebildet. Sie bilden die Gelenkkörper und tragen die Gelenkflächen. Als Metaphyse [3] bezeichnet man den an die Diaphyse angrenzenden Teil der Epiphyse. Hier befindet sich die Epiphysenfuge, welche der Zone des Längenwachstums entspricht. Apophysen [4] sind Fortsätze für Sehnen- und Muskelansätze, die einen eigenen Knochenkern enthalten. Ein Röhrenknochen ist an seinen Gelenkflächen von Gelenkknorpel, sonst von Periost bedeckt. Sie besitzen eine hohe Biegezugfestigkeit und haben durch ihre Leichtbauweise eine optimale Funktionsanpassung an Zug- und Druckspannung. Als Beispiele für lange Röhrenknochen dienen Humerus, Tibia, *Ossa metacarpale*.

Platte Knochen (*Ossa plana*) bestehen aus einer äußeren und inneren Kortikalis (*Lamina externa* und *interna*), die die Spongiosa umschließen. Als platte Knochen werden das Brustbein, die Rippen, das Schulterblatt und die Schädelkalotte (im Bereich Schädeldach als *Diploe* benannt) bezeichnet.

Lufthaltige Knochen (*Ossa pneumatica*) besitzen mit Schleimhaut ausgekleidete Hohlräume (Nasennebenhöhlen, Mittelohr etc.). Diese Hohlräume kommunizieren mit der Außenwelt und werden so belüftet und dem Umgebungsdruck angepasst. Als Beispiele dienen Sieb-, Keil-, Stirnbein, Oberkiefer, Proc. mastoideus, Cavum tympani.

Als unregelmäßige Knochen (*Ossa irregulare*) werden Knochen bezeichnet, die keinem der o.g. Knochentypen zugeordnet werden können. Beispiele sind hier das Os sphenoidale, *Ossa vertebrae* (14,13).

2.2 Knochenarten

Man unterscheidet auf Grund der räumlichen Organisation der extrazellulären Matrix des Knochens Geflecht- und Lamellenknochen. Während im Geflechtknochen die Kollagenbündel kreuz und quer miteinander verflochten sind, ist die Struktur des Lamellenknochens geordnet.

Faser- und Geflechtknochen

Beim Geflechtknochen bilden die kollagenen Fasern ein ungeordnetes Fasergeflecht, in dem die Kanäle für Blutgefäße unregelmäßig angeordnet sind. Der Geflechtknochen besitzt keine Lamellen. Er bildet sich in der Fetalzeit und wird bis zum 5. Lebensjahr fast vollständig in Lamellenknochen umgewandelt. Beim Erwachsenen findet sich Geflechtknochen nur noch im Knochen des äußeren Gehörgangs, an knöchernen Ansätzen von großen Muskelsehnen, sowie bei der Frakturheilung und in Knochentumoren (15,16).

Lamellenknochen

Das reife Knochengewebe des Menschen zeigt einen Lamellenbau, bei dem schichtweise aufgebaute, geordnete Systeme mit Durchmessern von 3-7 μm die Knochensubstanz bilden. Lamellenknochengewebe ist komplizierter aufgebaut als Geflechtknochengewebe und ersetzt diesen nach der Geburt. Es werden drei verschiedene Lamellensysteme unterschieden: Das Havers-System oder Zirkulär- bzw. Speziallamellen, Interstitial- oder Schalllamellen, General- oder Grundlamellen.

Innen wird der Knochen gegen das Knochenmark durch innere, außen gegen das Periost durch äußere Generallamellen abgeschlossen und wird dadurch vollständig von ihnen umgeben.

Unter einer Zirkulärlamelle versteht man einen knöchernen Hohlzylinder, in dem die Kollagenfasern parallel zueinander schraubenförmig verlaufen. Es handelt sich um Fasern, die zu feinen Fibrillenbündeln angeordnet sind, welche konzentrisch um einen Zentralkanal (Havers-Kanal) angeordnet sind. Jeweils 4 bis 15 dieser Lamellen bilden als Funktionseinheit des Knochengewebes ein Osteon (Havers-System). Die Havers-Kanäle führen Blutgefäße und marklose Nervenfasern und verlaufen parallel zur Längsachse des Knochens. Sie stehen mit querverlaufenden Volkmann-Kanälen in Verbindung, die Blutgefäße und Nervenfasern enthalten, die sie den Havers-Kanälen aus dem Periost zuführen. Sie werden nicht von Zirkulärlamellen umhüllt. Durch ständige Ab- und

Umbauvorgänge im Laufe von Wachstumsvorgängen oder Belastungsanpassungen bleiben Reste von Osteonen zwischen neugebauten bestehen und bilden Schaltlamellen (15,16).

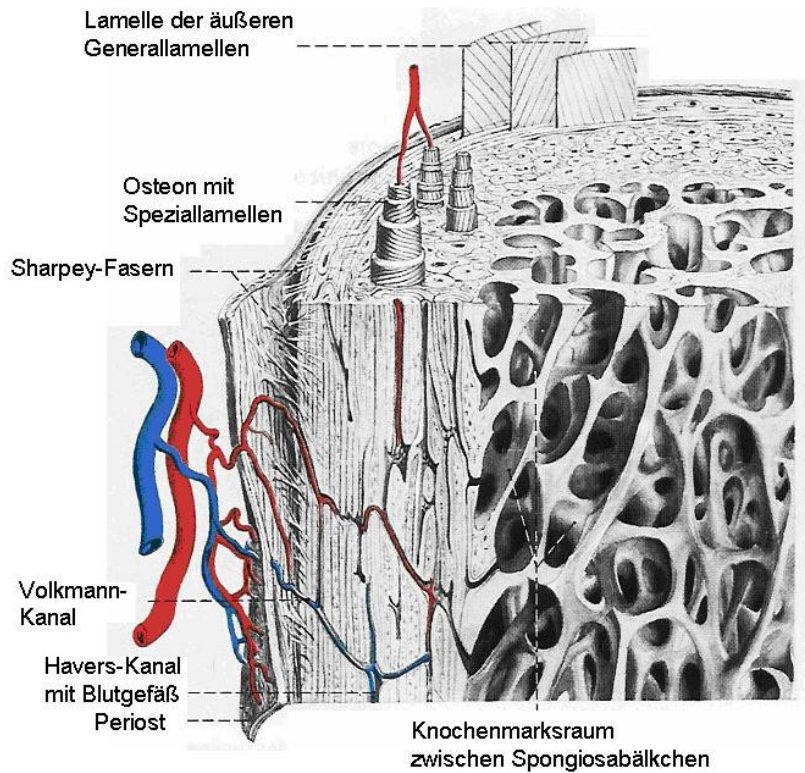


Abb. 1: Schematische Darstellung des Lamellenknochens aus Junqueira LCU, Carneiro J. Knochen. Histologie. 6th ed.: Springer; 1996 (17).

2.3 Knochenaufbau

Der Aufbau von Knochen kann in fünf makroskopische Anteile aufgeteilt werden: Das Periost, die Kortikalis, die Spongiosa, das Endost und die Cavitas medullaris.

Periost/Knochenhaut

Die Knochen werden an ihrer gesamten Oberfläche, mit Ausnahme der Gelenkflächen und der chondral-apophysären Sehnenansätze von einer bindegewebigen Hüllschicht, der Knochenhaut ummantelt. Das Periost gliedert sich mikroskopisch in zwei Schichten: das äußere Stratum fibrosum und das dem Knochen direkt aufliegende innere Stratum osteogenicum oder Kambiumschicht.

Das Stratum fibrosum stellt eine besonders derbe Schicht aus straffem Bindegewebe und elastischen Fasern dar. Aus der Textur von Kollagenfaserbündeln zweigen Fibrae perforantes, sogenannte Sharpey-Fasern, in die Substantia compacta des Knochens ab, um so das Periost an der Knochensubstanz zu verankern.

Während des Wachstums stellt sich die Kambiumschicht aufgrund ihrer hohen Zellzahl mikroskopisch deutlich dar. Hierbei handelt es sich um Osteoprogenitorzellen, Vorläuferzellen von knochenbildenden Zellen, die für das appositionelle Dickenwachstum verantwortlich sind. Nach Abschluss des Wachstums kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Kambiumzellschicht. Die verbleibenden Zellen sind bei der Frakturheilung beteiligt, indem sie den Frakturspalt überbrückenden Kallus bilden.

Das Stratum osteogenicum enthält ein dichtes Kapillarnetz und sensible Nerven mit Schmerzsensoren. Dadurch ist das Periost im Gegensatz zur nicht schmerzempfindlichen Knochensubstanz äußerst schmerzempfindlich (13,14).

Kortikalis/Rindenschicht

Die Substantia compacta bildet die äußere formgebende Schicht der Knochen und wird daher auch als Kortikalis (Corticalis, von lat. cortex „Rinde“) bezeichnet. Sie wird von Periost überzogen. Das Grundbauelement der Substantia compacta ist das Osteon. Es besteht aus einem zentralen Kanal, dem Havers-Kanal, der Blutgefäße und marklose Nervenfasern führt. Um diesen Gefäßkanal lagern sich konzentrisch Knochenzellen an, die sogenannte Speziallamellen bilden. Die einzelnen Osteone sind durch Schaltlamellen miteinander verbunden. Schaltlamellen sind Reste alter, umgebauter Osteone. Die Havers-Kanäle der einzelnen Osteone sind durch ebenfalls Blutgefäße enthaltende Querkanäle, die

Volkman-Kanäle, untereinander verbunden. So entsteht eine Verbindung zwischen den Blutgefäßen des Periosts, der Havers-Kanäle und der Knochenmarkhöhle (14,15).

Spongiosa/Bälkchenschicht

Die Spongiosa (von lat. spongia „Schwamm“) oder auch Substantia spongiosa wird von einem Maschenwerk aus Trabekeln im zentralen Bereich des betreffenden Skelettstücks gebildet. Es handelt sich um ein schwammartig aufgebautes System aus feinen Knochenbälkchen (Trabekeln). Diese Knochenbälkchen sind nach Druck- und Zugkräften angeordnet (Trajektorienbauweise). Die Spongiosa liegt im Inneren der Knochen und wird nach außen hin von der Kortikalis umhüllt. In den Hohlräumen des von den Spongiosabälkchen gebildeten „Schwammes“ befindet sich das Knochenmark. Bei Röhrenknochen geht die Spongiosa kontinuierlich in die Markhöhle der Diaphyse über (13,14).

Endost

Die innere Oberfläche der Knochen, sowohl im Bereich der Kompakta einschließlich der Volkman- und Havers-Kanäle, als auch das Stratum spongiosum wird von einer bindegewebigen Hülle, dem Endost ausgekleidet und bildet damit die Grenzschicht zum Knochenmark (14).

Cavitas medullaris

Die zentrale Markhöhle ersetzt die Spongiosa im Bereich der Diaphyse von Röhrenknochen. Sie ist von einer dicken, soliden Kortikalis umgeben. In der Cavitas medullaris befindet sich das Knochenmark (Medulla ossium) (13).

2.4 Gefäßversorgung

Die Knochen weisen ein relativ dichtes Blutgefäßnetz auf. Über dieses Netz werden Knochengewebe, Periost und Knochenmark versorgt. Die starke Vaskularisierung ist Ausdruck einer starken Stoffwechsellistung des Knochengewebes (18).

Sie erfolgt in der Regel über eine epiphysäre Quelle, eine diaphysäre Quelle sowie ein periostales Gefäßnetz. Nicht alle Epiphysen weisen das gleiche Vaskularisierungsmuster auf. Dies ist mit ein Grund für die unterschiedlichen Auswirkungen der Verletzungen auf das Skelett. Bestimmte Epiphysen besitzen ein Durchblutungssystem, das die Wachstumsfuge überbrückt, sodass es bei einer Epiphysenlösung zu keiner Durchblutungsstörung kommt. Andere Epiphysen, bei denen die Gefäße in die Wachstumsfuge eindringen, sind bei traumatischen Dislokationen durchblutungsgefährdet (5).

Arterien

Die Arteria nutritia dringt durch mikroskopisch sichtbare Kanäle durch die Kortikalis in den Markraum und speist in einem endostalen Netzwerk die Gefäße des Knochenmarks, aus denen auch die gefäßlosen Spongiosabälkchen versorgt werden. Vom Markraum wenden sich Gefäße zentrifugal und transkortikal zurück und speisen die Mikrogefäße der Kompakta, die Havers-Gefäße, die mit dem Gefäßplexus in Verbindung stehen. Über das Havers-System wird die gesamte Kompakta von einem gefäßführenden Kanalsystem durchsetzt und durch diesem versorgt.

Die Gefäße treten zentral der Diaphyse in die noch wenig gestaltete Knochenanlage ein und induzieren von hieraus das Längenwachstum (18).

Venen

Aus dem spongiösen Bereich eines Extremitätenknochens wird das Blut sehr effektiv über regionale oberflächliche und tiefe Venen drainiert. Der periostale Venenplexus erhält sein Blut aus den intrakortikalen Kapillargefäßen an der Knochenoberfläche und führt es über portale Gefäße in die Venen der in der Umgebung inserierenden Muskeln ab (14).

2.5 Knochenzellen

Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stammzellen (MSC; Mesenchymal stem cells) werden definiert als sich selbst erneuernde multipotente Vorläuferzellen, welche die Fähigkeit besitzen, in unterschiedliche mesenchymale Phänotypen zu differenzieren (19). Diese MSC besitzen die Fähigkeit, sich in Fettgewebe, Sehnen- und Muskelgewebe, Knorpelgewebe, Knochengewebe, in Knochenmark-Stromazellen und Gewebe neuronalen Charakters zu differenzieren (19).

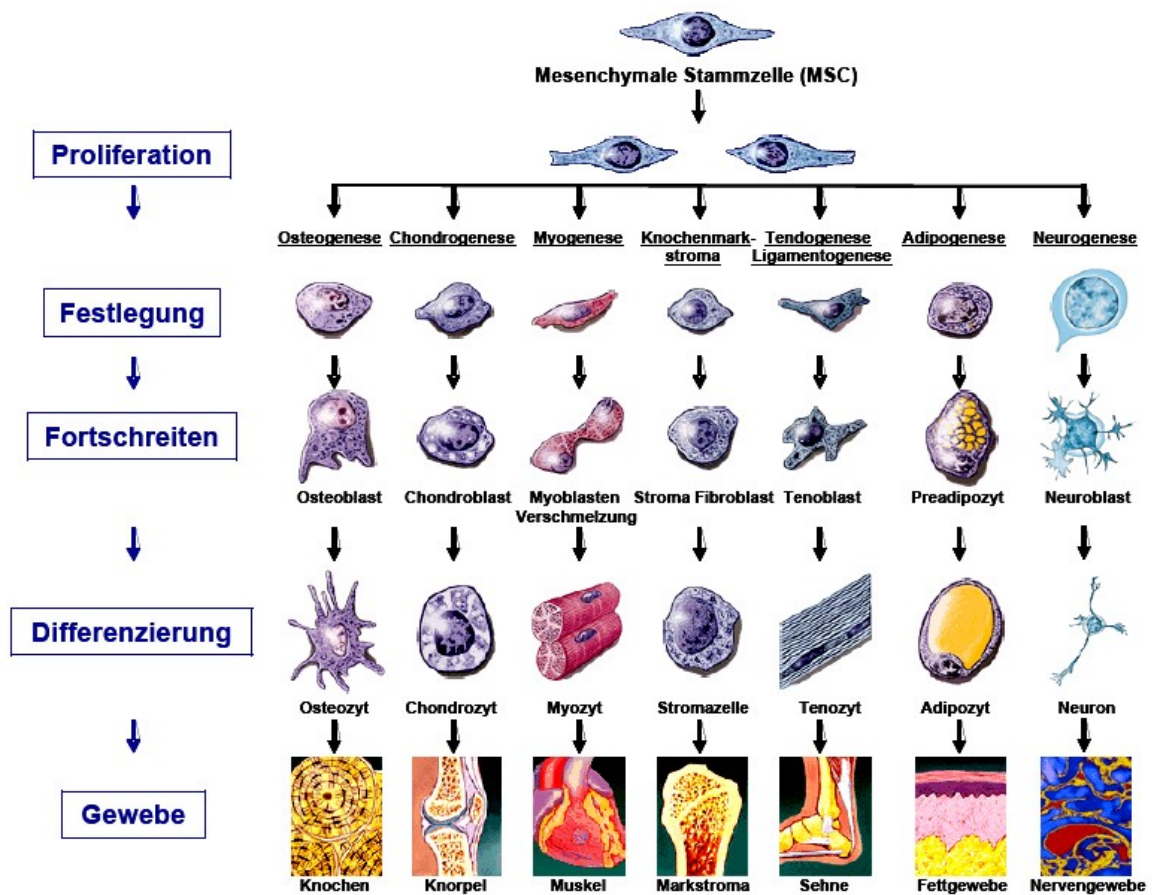


Abb. 2: Differenzierung mesenchymaler Stammzellen (MSC) aus Caplan AI. The mesengenic process. Clin Plast Surg 1994, (20).

Als zelluläre Elemente lassen sich im Knochen drei Typen von Zellen unterscheiden, die in enger Beziehung zueinander stehen: Chondroblasten/Chondrozyten/Chondrozyten,

Osteoprogenitorzellen, welche sich zu Osteoblasten/Osteozyten differenzieren, sowie Osteoklasten.

Chondroblasten und Osteoblasten sind Abkömmlinge von pluripotenten mesenchymalen Stammzellen, dagegen entstammen Osteoklasten monocytären Stammzellen des Knochenmarks und gehören dem MPS (mononukleares Phagozytensystem) an.

Osteoprogenitorzellen

Osteoprogenitorzellen differenzieren sich aus MSC und entwickeln sich zu Osteoblasten weiter (21). Sie haben eine spindelförmige Form und befinden sich im End- sowie Periost, in den Wänden der Haverskanäle und im Knochenmark (22).

Osteoblasten

Osteoblasten sind stoffwechselaktive Zellen und befinden sich vor allem in der Nähe von Blutgefäßen. Aktive Osteoblasten zeigen Charakteristika sezernierender Zellen mit großen Nukleolen, dicht gepacktem rauem endoplasmatischem Retikulum und prominenten Golgi-Apparaten. Sie sind epithelartig aufgereiht und produzieren Osteoid. Als Osteoid wird die noch nicht mineralisierte Knochenmatrix bezeichnet, welche hauptsächlich aus Typ I kollagenen Fibrillen, weniger Kollagen Typ V und aus einer Reihe von Grundsubstanzmolekülen (Glykosaminoglykanen, Glykoproteinen, wie Osteocalcin, Osteopontin und Osteonektin) besteht (12). Botenstoffe, die für die Vermehrung, Differenzierung und Funktion von Knochenzellen notwendig sind, werden ebenfalls von Osteoblasten synthetisiert und sezerniert. Hierzu zählen u.a. Prostaglandine, Interleukine, TGF- β (Transforming growth factor beta), BMP und Somatomedine (Insulin like growth factors I und II).

Eine weitere Funktion der Osteoblasten ist die Bildung von Hydroxylapatit, ein knochenspezifisches anorganisches Material aus Kalzium und Phosphat. Osteoblasten können sich zu Knochensaumzellen (Bone-lining-cells) oder Osteozyten entwickeln. Knochensaumzellen verbleiben an der Oberfläche, wo sie der Knochenmatrix direkt aufliegen. Sie drosseln ihre synthetische Aktivität und bekommen dadurch eine langgestreckte, abgeflachte Form. Über ihre Zytoplasmaausläufer stehen sie mit Chondrozyten in Verbindung (22). Nach Stimulierung mit 1,25-Dihydroxycholecalciferol, PTH und Eikosanoiden exprimieren sie als integrales Membranprotein RANKL (RANK-Ligand; Receptor for activation of nuclear factor kappa-B) (23). Zu Osteozyten differenzieren sie, indem sie sich von dem von ihnen gebildeten Osteoid umgeben, welches

erst als feine fibrilläre (nichtmineralisierte) Schicht, später als mineralisierte Knochenmatrix besteht.

In der Synthesephase haben Osteoblasten eine kubische bis hochprismatische Form, die sich bei Abnahme der Syntheseaktivität abflacht.

Osteozyten

Osteozyten sind in Lakunen der Knochenmatrix eingelagerte, morphologisch veränderte Osteoblasten (21). Sie besitzen im Vergleich zu Osteoblasten weniger Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum, was ihrer niedrigen Syntheseleistung entspricht. Sie haben eine Lebensdauer von ca. 10 Jahren und liegen innerhalb des Knochens in einem weitvernetzten Hohlräumssystem aus Lakunen und Canaliculi. In den Lakunen befinden sich die Zellkörper, über die Canaliculi stehen die Zellen über Fortsätze und Gap Junctions miteinander in Verbindung. Um jede Zelle und ihre Ausläufer bleibt eine schmale Zone, die nur Kollagenfibrillen und interstitielle Flüssigkeit enthält bestehen. Dieses Hohlräumssystem, welches die mineralisierte Matrix durchsetzt, garantiert die Ernährung und Kommunikation der Osteozyten und Osteoblasten (12,16,23).

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 (23). Im lebenslangen Prozess des Umbaus und Neuaufbaus von Knochenmatrix übernehmen die Osteoklasten die Aufgabe der Resorption von mineralisierter Knochenmatrix (21). So gewährleisten sie, dass Knochengewebe laufend umgewandelt werden kann. Durch die Kopplung von Knochenneubildung und -resorption, kann ein komplexer Skelettteil ausgeformt werden, können die Gefäßkanäle entstehen und die notwendigen Anpassungen des Skeletts an Funktions- und Belastungsänderungen des Körpers stattfinden. Knochenresorption durch Osteoklasten bildet die Grundlage für die Regulierung des Blutkalziumspiegels. Der Knochenabbau erfolgt folgendermaßen:

Durch Anheftung der Osteoklasten an die Knochenoberfläche, wobei am äußeren Rand der Anheftungszone mit Hilfe von Integrinen eine dichte Verbindung zwischen Knochen und Zelle aufgebaut wird, wird ein abgeschlossener Reaktionsraum, auch Howship-Lakune, gebildet. An der dem Knochen anliegenden Oberfläche wird die Plasmamembran durch

Ausbildung zahlreicher Entfaltungen massiv vergrößert. Dadurch bildet sich die für Osteoklasten charakteristische gekrauste, resorbierende Oberfläche, die „Ruffled border“. Zum Abbau des Hydroxylapatits wird zunächst durch eine Protonen-ATPase der pH erniedrigt und damit Hydroxylapatit aufgelöst. Freiwerdende Kalzium- und Phosphationen werden ans Blut abgegeben.

Die dadurch entmineralisierte Knochenmatrix wird durch lysosomale Proteasen, v. a. Cathepsin K und Matrix-Metalloproteinasen (MMP), abgebaut. Knochenresorption ist demnach ein komplexer Vorgang, bei dem die Matrix demineralisiert wird, die Mineralsalze im sauren Milieu gelöst und organische Substanzen enzymatisch abgebaut werden. Osteoklasten resorbieren Knochen bis zu einer Tiefe von 50–70 µm. Sie gehen dann in Apoptose über, wobei wahrscheinlich von Osteoblasten gebildetes TGF-β 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 Höhlen einwandern (12,16,23).

Chondroblasten/Chondrozyten

Die Entwicklung einer knorpeligen Struktur beginnt mit der Zusammenlagerung von Mesenchymzellen, wodurch sich Chondroblasten bilden. Diese beginnen Knorpelmatrix zu produzieren und sich dadurch zu Chondrozyten zu differenzieren. Durch die zunehmende Masse an Knorpelmatrix werden die Zellen auseinandergedrängt, wobei sie gleichzeitig proliferieren. Dieser Prozess wird als interstitielles Wachstum bezeichnet. Er führt zu rascher Vergrößerung der knorpeligen Struktur und findet vor allem in der frühen Phase der Knorpelbildung sowie in der Wachstumsfuge statt (18). (Näheres siehe Epiphysenfuge).

2.6 Knochenmatrix

Die Zusammensetzung des Knochens besteht aus zwei Phasen, einer festen, mineralischen Phase und einer organischen Matrix. Diese Knochenmatrix besteht zu ca. 35% aus Kollagen Typ I, die restlichen 65% des Knochengewebes werden von anorganischen Salzen, vor allem in Form von Kalziumhydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) gebildet (21). Zusätzlich kommen geringe Mengen an Proteoglykanen, verschiedenen Glykoproteinen sowie weiteren anorganischen Bestandteilen wie Karbonat, Nitrat, Natrium, Magnesium, Fluor und Spurenelemente vor (18).

Kollagen Typ I ist ein fibrilläres Protein, das aus drei Proteinketten besteht, die sich zu einer Tripelhelix verbinden. Es wird von Osteoblasten produziert und bildet die Lamellen des Lamellenknochens. Diese Lamellen sind untereinander quervernetzt (Pyridin cross links) und verleihen so dem Knochen seine Zugfestigkeit. Weitere Bestandteile sind Proteoglycan-Komponenten wie Chondroitinsulfat und Glykoproteine (Osteonektin, Osteocalcin, Osteopontin). Zusammen bilden sie die Grundsubstanz der extrazellulären Matrix, in die die Apatitkristalle eingelagert sind (21).

Durch die Ein- bzw. Anlagerung der Apatitkristalle an die Kollagenen Fasern, erhält der Knochen seine hohe Kompressionsfähigkeit.

Knochenstoffwechsel

Das Knochengewebe bleibt bis ins Erwachsenenalter sehr aktiv. Dabei stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Knochenan- und Knochenabbau ein, das auch als ständiger Knochenumbau (Remoedeling) bezeichnet wird. Der Knochenumbau ist notwendig, damit der Knochen seiner Funktion als Kalziumspeicher nachkommen und sich geänderten Belastungsverhältnissen anpassen kann (23). Über 95% des im Körper vorkommenden Kalziums befinden sich in Knochen und Zähnen. In die Aufrechterhaltung des Serumkalziumspiegels sind regulative Einwirkungen verschiedener Organe und Organsysteme integriert.

Dazu gehört an erster Stelle das in den Nebenschilddrüsen gebildete, zum Teil osteotrope Parathormon (PTH). PTH bewirkt im Magen-Darm-Trakt eine erhöhte Kalziumresorption, in der Niere eine verstärkte tubuläre Rückresorption (24). Zusätzlich aktiviert PTH

indirekt, über Osteoblasten vermittelt, die osteoklastäre Resorption, wodurch Kalzium mobilisiert und ins Blut abgegeben wird.

Kalzitonin wird in den parafollikulären (C-) Zellen der Schilddrüse gebildet und fungiert als Antagonist zu PTH. Kalzitonin senkt durch Osteoklastenhemmung und Aktivierung der Osteoblasten die Resorption des Knochengewebes und dadurch den Kalziumspiegel im Blut (25).

Vitamin D fördert in dihydroxylierter Form als $1,25(\text{OH})^2\text{D}_3$ die enterale Kalziumresorption und die parathormonvermittelte Kalziummobilisation aus dem Knochen (25). Gleichzeitig fördert $1,25(\text{OH})^2\text{D}_3$ bei ausreichendem Kalziumstatus die Mineralisierung der Knochen, indem es die intestinale Kalzium- und Phosphataufnahme erhöht und so zur Verfügung stellt.

Zusätzlich ist eine ausgewogene Balance zwischen Somatotropin, Schilddrüsenhormon, Kortisol, Östrogen und Androgen für die Regulation des Kalziumhaushaltes notwendig.

2.7 Osteogenese

Das menschliche Skelett entwickelt sich auf bindegewebiger (desmale Ossifikation) oder knorpeliger (chondrale Ossifikation) Grundlage. In beiden Fällen erscheinen die ersten Anlagen der Skelettelemente in Form von Mesenchymverdichtungen (Blasteme).

Zunächst bildet sich Geflechtknochen, in dem die Kollagenbündel der Grundsubstanz ungeordnet verlaufen, der später zu Lamellenknochen mit geordneter Faserarchitektur und ausdifferenzierter Kompakta bzw. Spongiosa umgewandelt werden kann.

Das Skelettwachstum ist durch einen primär genetisch und endokrin gesteuerten Prozess der Knochenbildung und des Knochenumbaus geprägt. Die Knochenbildung erfolgt durch Osteoblasten, die sich aus Mesenchymzellen differenzieren und Knochengrundsubstanz (Osteoid) bilden, in die sich anschließend Kalksalze einlagern. Der Um- und Abbau des Knochens erfolgt durch mehrkernige Riesenzellen, die Osteoklasten.

Die Knochenbildung beginnt im zweiten Embryonalmonat am Schlüsselbein und endet zu Beginn des 3. Dezenniums mit dem Schluss der Apo- und Epiphysenfugen (26,27).

Desmale Ossifikation

Im Gegensatz zur überwiegend chondralen Knochenbildung kommt die desmale Osteogenese lediglich an wenigen Stellen des Skeletts, insbesondere im Bereich des Schädels vor.

Bei der desmalen Ossifikation entsteht das Knochengewebe direkt aus dem embryonalen Bindegewebe (Mesenchym), weshalb man auch von direkter bzw. primärer Ossifikation spricht. Dabei kommt es zur Vermehrung und Verdichtung von Mesenchymzellen, die dadurch Ossifikationszentren bilden und sich über Osteoprogenitorzellen zu knochenbildenden Osteoblasten differenzieren. Diese Osteoblasten liegen in einem engmaschigen Kapillarplexus relativ weit voneinander entfernt und sind über Gap-junctions miteinander verbunden.

Sie lagern um ihren Zelleib und die Fortsätze Osteoid ab, was zu einer Art Einmauerung führt. Der Knochen wächst radiär durch Apposition so lange, bis die Nahtstellen erreicht sind und das umwandlungsfähige Bindegewebe an den Nahtstellen verbraucht ist. Erst dann kommt es zur knöchernen Vereinigung benachbarter Skelettanteile. Nach Mineralisation des Osteoids werden die Osteoblasten zu Osteozyten. Bei der

Mineralisation des Osteoids kommt es zur Einlagerung und Anreicherung anorganischer Komponenten wie Kalzium oder Phosphat durch die Osteoblasten. Es entsteht Hydroxylapatit. Von Osteoblasten abgeschnürte Matrixvesikel werden ins Osteoid abgegeben und bilden Foci, an denen die weitere Anlagerung und Kristallisation von Mineralsalzen erfolgen.

Durch desmale Ossifikation entstehen die meisten Knochen des Schädeldaches, des Gesichtsschädels und teilweise die Klavikula. Die nach diesem Modus entstandenen Skelettstücke werden als Bindegewebsknochen bzw. Deckknochen bezeichnet (16,18,27).

Chondrale Ossifikation

Beim osteogenetischen Prozess der chondralen Knochenbildung, werden hyalinknorpelige Vorläufermodelle durch Knochengewebe ersetzt, weshalb man auch von Ersatzknochen oder indirekter Ossifikation spricht.. Die Stellen der chondralen Osteogenese sind dadurch gekennzeichnet, dass sich Zellen mesenchymaler Blasteme zunächst zu Vorknorpelzellen und anschließend zu Chondrozyten differenzieren. Solche knorpeligen Vorstufen, die in ihrer Form dem späteren Knochen entsprechen (Primordialskelett), findet man an kurzen Knochen, an den Röhrenknochen der Gliedmaßen und an den Apophysen einiger platter Knochen.

Bei diesem Prozess wird Knorpel nicht direkt in Knochengewebe umgewandelt. Vielmehr wird das zuerst bestehende Knorpelgewebe durch Osteoklasten zerstört und durch Knochengewebe ersetzt. Dieser Ersatz des Knorpels kann von außen her, perichondrale, oder von innen her, enchondrale Ossifikation, erfolgen. Bei den langen Röhrenknochen setzt die perichondrale vor der enchondralen Verknöcherung ein.

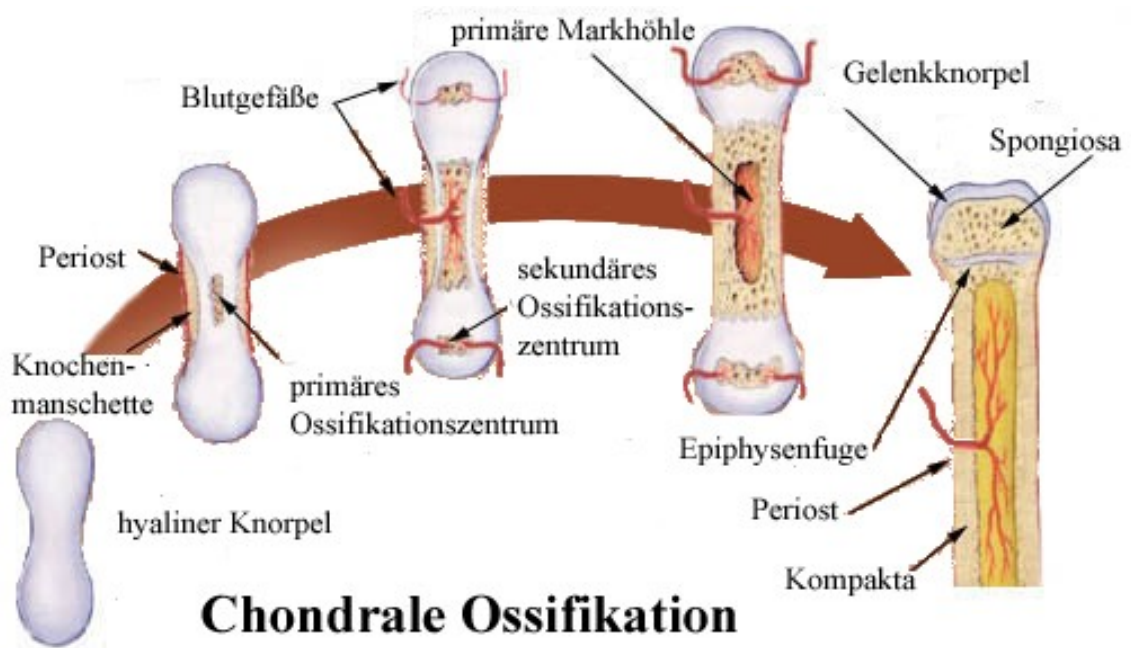


Abb. 3: Schematische Darstellung chondraler Ossifikation aus Bone growth, available at: http://training.seer.cancer.gov/module_anatomy/unit3_3_bone_growth.html (46).

Die perichondrale Ossifikation beginnt bei den langen Röhrenknochen an der Diaphyse bereits vor der Geburt. Mesenchymale Zellen im Perichondrium differenzieren zu Osteoblasten, die das perichondrale Bindegewebe (ähnlich der desmalen Ossifikation) durch Abscheidung von Osteoid und anschließender Mineralisation in geflechtartigen Knochen umwandeln. Um die Diaphyse entsteht damit eine Knochenmanschette, die dem Schaft eine größere Festigkeit verleiht. Das Perichondrium wird zu Periost.

Mit zunehmender Verknöcherung kommt es zur Beeinträchtigung der Durchblutung im Inneren des knorpelig angelegten Skelettstücks, bei den langen Röhrenknochen im Bereich der Diaphyse und im Zentrum der Epiphysen.

Im primären Ossifikationszentrum beginnen Knorpelzellen im Zentrum der Diaphyse die sie umhüllende Matrix zu resorbieren, wodurch die Knorpelhöhlen (Lacunae cartilaginae) ausweiten und die Knorpelzellen hypertrophieren und somit Blasenknorpel entsteht.

Diese hypertrophen Chondrozyten vergrößern sich und veranlassen die Mineralisation der interterritorialen Knorpelmatrix.

Durch die zirkuläre Knochenmanschette eindringende periostale Gefäße werden von mesenchymalen Zellen (Osteoprogenitorzellen) begleitet.

Gleichzeitig beginnen Chondroklasen einen Teil der mineralisierten Knorpelmatrix zu resorbieren und hypertrophe Chondrozyten gehen im Zuge von Apoptose zugrunde. Auf diesem Wege entsteht die primäre Markhöhle.

Ein Teil der mineralisierten Matrix bleibt in Form von kleinen Sporen und Balken bestehen, die von Osteoblasten als Ablagerungsorte für Osteoid gebraucht wird. Durch diese Osteoidbildung mit anschließender Mineralisation entsteht Geflechtknochen, der später durch Lamellenknochen ersetzt wird.

Die enchondrale Ossifikation der Diaphyse schreitet nach proximal und distal fort, wobei die primäre Markhöhle jeweils von einer querstehenden Ossifikationsfront (Zone der Ablagerung von Knochenmatrix auf mineralisierter Knorpelmatrix) begrenzt wird.

Synchron zur Verlängerung der Knochenmanschette wird in Richtung der Epiphyse kontinuierlich Knorpel an- und Knochen abgebaut.

An den Enden der langen Röhrenknochen setzt die enchondrale Verknöcherung erst etwas später ein. Durch die Einsprossung perichondraler Gefäße werden dieselben Knorpelveränderungen wie in der Diaphyse veranlasst (Reihenstellung der Chondrozyten, Hypertrophie und Aufblähung des Knorpels, Mineralisation/Verknöcherung) und es entstehen die (sekundären) Knochenkerne der Epiphysen. Dieser Verknöcherungsprozess schreitet radiär fort, bis schließlich nur noch eine schmale Knorpelzone an den Enden als Gelenkknorpel und gegen die Diaphyse hin als Epiphysenfuge bzw. Wachstumsfuge erhalten bleibt (18,27).

2.8 Epiphysenfuge

Morphologie

Die Epiphysenfugen (Cartilagine epiphysiales) befinden sich zwischen den knöchernen Epiphysen und Metaphysen der langen Röhrenknochen, wo sie eine horizontale Platte aus hyalinem Knorpel bilden.

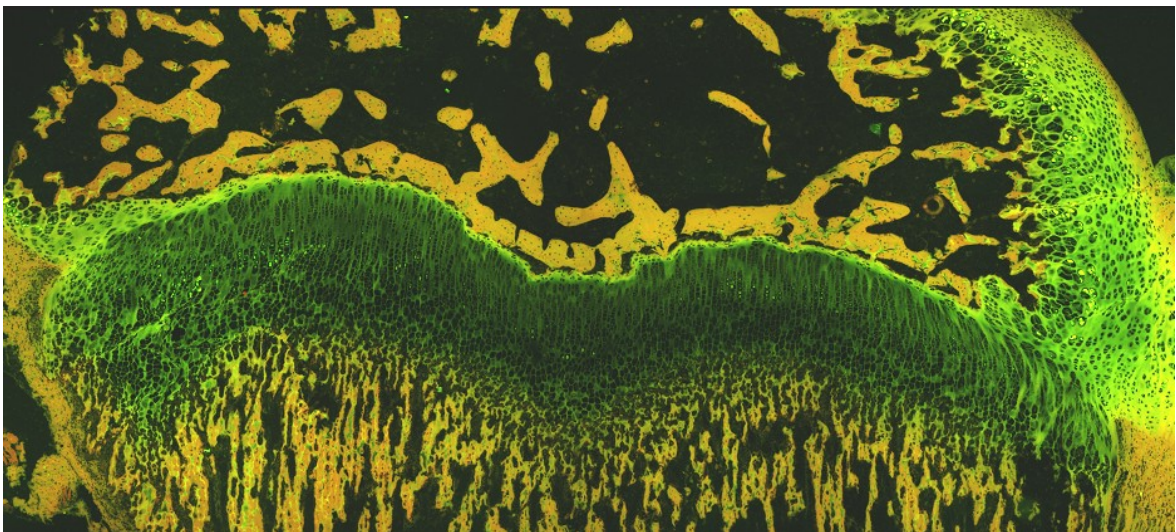


Abb. 4: Epiphysenfuge H&E-Färbung. Aufnahme der Autofluoreszenz in drei Fluoreszenzkanälen mittels vollautomatischem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM6000 B), 10-fache Vergrößerung.

Die Hauptfunktion der Epiphysenfugen ist das enchondrale Längenwachstum, welches unter komplexen Regulationsmechanismen steht. Ausführliche Untersuchungen haben gezeigt, dass die Kontrolle von Längenwachstum an den Epiphysenfugen von mehreren Faktoren abhängig ist: Die Wachstumsrate von korrespondierenden Knochenpaaren auf der linken und rechten Körperhälfte verläuft synchronisiert, was auf eine systemische Kontrolle schließen lässt. Da die Aktivität unterschiedlicher Wachstumsfugen stark differiert, muss von einer zusätzlichen lokalen Kontrolle ausgegangen werden.

Längenwachstum richtet sich nach Knochenachsen anhand von mechanischen Kräften aus, was eine mechanische Wachstumskontrolle nahe legt (28).

Diese Regulationsmechanismen unterliegen demnach der Interaktion von zirkulierenden systemischen Hormonen und lokal produzierten Wachstumsfaktoren, was wiederum zu einer veränderten Genexpression der Chondrozyten in der Wachstumsfuge führt.

Diese molekularen Prozesse führen zu bestimmten Veränderungen der Chondrozytengröße und- form, der Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM), der sezernierten Enzyme und Wachstumsfaktoren sowie der Invasion von Gefäßen. Daraus resultiert schließlich die Mineralisation der EZM, die Apoptose der Chondrozyten und die enchondrale Knochenbildung (29).

Die Zellen der Wachstumsfuge werden während dieses Prozesses kontinuierlich aufgefüllt und schließlich an der Verbindungsstelle von Epiphysenfuge und Metaphyse von Knochensubstanz ersetzt, wodurch die Länge des gesamten Knochens zunimmt. Dabei entfernen sich die Fugen an beiden Enden des Knochens immer weiter vom Zentrum, behalten jedoch während der gesamten Wachstumsperiode die gleiche Höhe (30).

Die Wachstumsfuge kann morphologisch und biochemisch in verschiedene, horizontal ausgerichtete Zonen von Chondrozyten verschiedener Differenzierungsgrade gegliedert werden.

- Zone des Reserveknorpels (resting or germinal zone,)
- Proliferationszone
- Zone der reifenden Knorpelzellen (Reifungszone, Zone of maturation)
- Prehypertrophe Zone
- Hypertrophen Zone
- Zone provisorischer Mineralisation/Gefäßeinsprossung

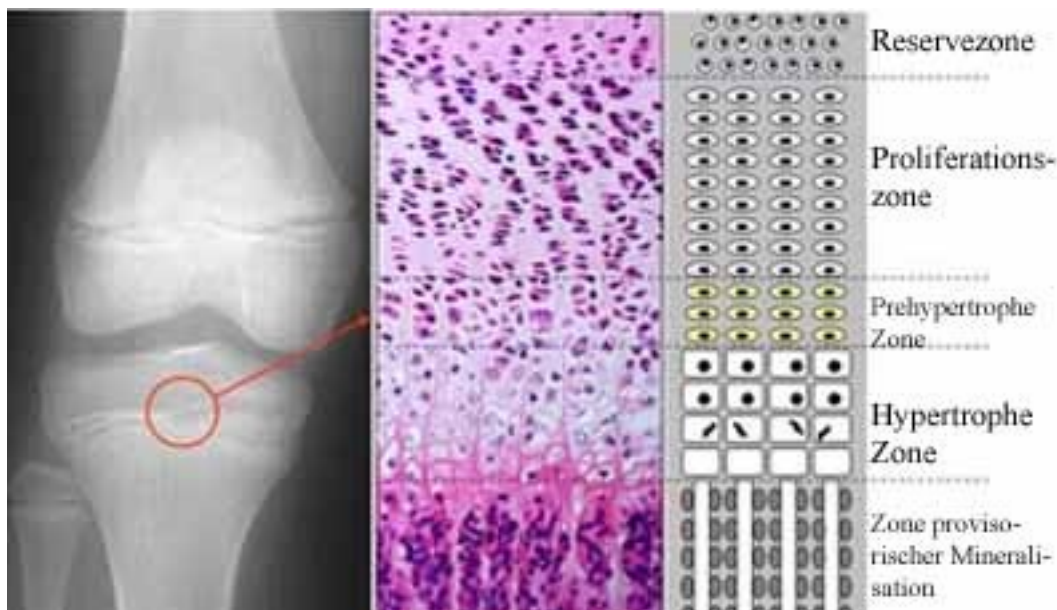


Abb. 5: Morphologie der Epiphysenfuge aus Growth plate. Available at: <http://www.eurogrow.net/eug/Project+Information/Objectives> (47).

Epiphysenwärts der Wachstumszone befindet sich als erstes die Zone des Reserveknorpels (Resting or Germinal zone), in der das Verhältnis von extrazellulärer Matrix zu Zellvolumen deutlich auf der Seite der EZM liegt. In ihr befinden sich die Knorpelvorläuferzellen (Progenitorzellen), die sich in einem ruhenden Stadium befinden. Diese Zellen bilden den Vorratspool der Chondrozyten und bilden die Grundlage für die Anordnung der darunterliegenden Knorpelzellen in Zellsäulen (Proliferationszone) und damit für das unidirektionale Wachstum (28).

Chondrozyten der Proliferationszone haben eine abgeflachte Morphologie und zeigen eine starke mitotische Aktivität. Proliferierende Chondrozyten sind in longitudinal ausgerichteten Zellsäulen formiert (Säulenknorpel) und produzieren große Mengen an interkolumnärer Matrix. Diese Matrix besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ II, sowie Kollagen Typ IX und XI. Kollagen Typ II ist ein Homotrimer, das stark glykolisiert ist und viele Hydroxyprolinreste enthält. Dies führt zu seinem hydrophilen Charakter. Aggrekan ist das prominente Proteoglykan der Proliferationszone sowie der prehypertrophen Zone. Aggrekan besitzt einerseits osmotische Eigenschaften, die dem Knorpel seinen hohen Wassergehalt generiert und dadurch vor Kompressionskräften schützt, andererseits hemmt es die Mineralisation (23,31). Abhängig von der Mitoserate und Aktivität der proliferierenden Chondrozyten bestehen die Zellsäulen aus 10 bis 20 Chondrozyten. Somit bestimmt diese horizontale Zone hauptsächlich die Knochenlänge.

Der untere Abschnitt der Proliferationszone wird auch als Zone der reifenden Knorpelzellen (Reifungszone, Zone of maturation) bezeichnet. In der Reifungszone führt die hohe Produktion an EZM dazu, dass die sich gerade geteilten Zellen auseinander weichen. Charakteristisch für die Reifungszone ist die Abnahme der Mitoseaktivität bei konstanter Produktion von EZM (32).

In der prehypertrophen und letztlich der hypertrophen Zone sistiert die Zellteilung und die Chondrozyten reifen aus. Diese Differenzierung ist mit einer deutlichen Zunahme des Zellvolumens auf das 5-10-fache assoziiert, was auf eine Vermehrung der Zellorganellen und die Akkumulation von Glykogen zurückzuführen ist. Zusätzlich wird in dieser Zone Kollagen Typ X, ein spezifisches Kollagen für die hypertrophe Zone der Wachstumsfugen, sowie VEGF produziert (31).

Matrixvesikel, die sich von der Chondrozytenmembran abknospen, werden in der umgebenden EZM abgelagert und induzieren die Mineralisation der longitudinalen Septen zwischen den Zellsäulen und bilden damit die Zone der provisorischen Mineralisation (Zone of provisional calcification) (31). Diese Vesikel akkumulieren Kalzium und

beinhalten in hoher Konzentration Enzyme wie die alkalische Phosphatase, welche essentiell für die Kalzifikation der Knorpelsubstanz ist, sowie Matrix-Metalloproteinasen (MMP) (30). MMPs sind verantwortlich für den Katabolismus und den Umsatz der EZM und kommen aus der hypertrophen Zone hervor (31).

In die Zone der Gefäßeinsprossung (Zone of vascular invasion), wachsen Gefäßschlingen von der Metaphyse aus in die Lakunen der hypertrophen Zone ein. Diese Vaskularisation befähigt die Einwanderung von Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Chondroklasten und Osteoklasten (2). Ungefähr zwei Drittel der longitudinalen Septen werden aktiv von den eingewanderten Chondroklasten resorbiert, das übrige Drittel dieser Septen dient den Osteoblasten als Anbaustätte für Knochensubstanz. Diese Mischung aus mineralisierter Knorpelmatrix und Knochensubstanz wird als primäre Trabekel bezeichnet und anschließend zu Trabekeln des lamellären Knochens und sekundäre Trabekeln umgebaut (31).

Letztendlich begeben sich die hypertrophen, enddifferenzierten Knorpelzellen in den programmierten Zelltod (Apoptose), ein notwendiger Prozess zur Aufrechterhaltung der Homöostase der Wachstumsfuge. Die Aufgabe der differenzierten Chondrozyten ist die Vorbereitung und Induktion der Mineralisierung der EZM, welche die Grundlage für osteoblastische Knochenbildung darstellt. Die daraufhin apoptotischen Chondrozyten machen Platz für einwachsende Gefäße und Stromazellen des Knochenmarkes (31). Die Epiphysenfuge wird von einem peripheren Ring aus Faserknorpel umgeben, der als Ranvierscher Schnürring bezeichnet wird. Dieser bildet ein keilförmiges Areal aus Knorpelvorläuferzellen, die dazu beitragen, dass die Wachstumsfuge sich in der Breite ausdehnen kann, während sie in die Länge wächst. Ein perichondraler Faserring, der Ring nach LaCroix, bildet einen Ring aus fibrösem Gewebe, der in engem Kontakt zum Perichondrium steht und mechanische Unterstützung als Antwort auf Druck, Zug und Scherkräfte bietet (31).

Gefäßeinsprossung in die Physe

Die Wachstumsfuge ist im wesentlichen eine avaskuläre Struktur, die von der Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen aus Gefäßarkaden der Metaphyse abhängig ist. Metaphysäre Gefäßkanälchen befinden sich in der unteren Schicht der hypertrophen Zone der Epiphysenfuge zwischen mineralisierter Knorpelmatrix in longitudinaler Ausrichtung, wo sie ein ab- und ein aufsteigendes Kapillarsystem bilden. Der ausschlaggebende Faktor

für das Einwachsen der Gefäße ist dabei VEGF, welcher von den hypertrophen Knorpelzellen der Fuge gebildet wird (29).

Regulierung der Synthese von EZM

Eine Vielzahl an Molekülen in der Epiphysenfuge beeinflussen die Entwicklung und Funktion der Chondrozyten. Chondrozyten der Wachstumsfugen produzieren beträchtliche Mengen an spezifischer EZM. Da es sich hierbei um einen Teil der Chondrogenese handelt, wird er von den gleichen Faktoren beeinflusst, die auch für die Differenzierung der Knorpelzellen verantwortlich sind. Analog der Myogenese, Adipogenese und Osteogenese, wird auch bei der Chondrogenese die Entwicklung von mesenchymalen Stammzellen zu Knorpelzellen von der Aktivität eines DNA Transkriptionsfaktors bestimmt, welcher die Expression von Genen kontrolliert, die die Produktion von EZM kodieren.

In dem Fall der Chondrogenese handelt es sich bei diesem Transkriptionsfaktor um Sox9, welcher für die Expression mehrerer knorpelzellspezifischer Matrixproteinen wie Kollagen Typ II, Typ IX und Typ XI sowie Aggrecan notwendig ist (31).

Regulierung der Zellproliferation

Die Proliferation von Knorpelzellen in der Epiphysenfuge werden durch einen lokalen Feedbackmechanismus durch drei von Chondrozyten synthetisierten Signalstoffen kontrolliert. Dabei handelt es sich um Parathyroid hormone-related peptide (PTHrP), Indian hedgehog (Ihh) und TGF- β . Dieser komplexe Regelmechanismus bestimmt, mit welcher Geschwindigkeit und Anzahl, Knorpelzellen ihren oben beschriebenen Differenzierungsweg durchlaufen. PTHrP wird von Zellen des Perichondriums sezerniert und wirkt an den PTH/PTHrP-Rezeptoren, welche an der Oberfläche von prehypertrophen Chondrozyten exprimiert werden. Sein Effekt unterdrückt die Differenzierung zu hypertrophen Chondrozyten. Prehypertrophe Chondrozyten sezernieren wiederum Ihh, welches an den Zellen des Perichondriums zu einer Hochregulierung der PTHrP Synthese führt und dadurch die Entwicklung zu hypertrophen Chondrozyten inhibiert (33). Zusätzlich wirken hier Proteine, die den Zellzyklus regulieren: Zykline, zyklinabhängige Kinasen (CDK), CDK Inhibitoren und Aktivatoren (CAKs) und Activating transcription

factor-2 (ATF-2). ATF-2 wird nur in der Reservezone und der Proliferationszone exprimiert und kontrolliert die Expression von Genen, die Proliferation fördern oder inhibieren.

In der Wachstumsfuge vorkommende Wachstumsfaktoren sind hauptsächlich TGF (Transforming growth factors), FGF and BMP, sowie angiogenetische Faktoren wie VEGF. Wachstumshormone führen unter anderem zu einer lokalen Synthese von IGF-1 (Insulin-like growth factor-1), welcher den Beginn der Proliferation bestimmt.

MMP, vor allem MMP-9, ein enzymatisches Protein, liegt in hohen Konzentrationen in der hypertrophen Zone vor und ist an dem Abbau der interkolumnaren Knorpelmatrix beteiligt (30).

Verschiedene BMP werden von prehypertrophen und hypertrophen Chondrozyten exprimiert. Diese Steigerung der BMP führt wiederum zu einer vermehrten Expression von Ihh dieser Zellen, was zu einer Verstärkung der Proliferation und damit zu einer Verlängerung der Zellsäulen führt. BMP wirken somit antagonistisch zu FGF, der die Proliferation der Chondrozyten und die Expression von Ihh hemmt (30).

Die Proliferation der Chondrozyten der Wachstumsfuge werden demnach teilweise von einem intrinsischen Rückkopplungsmechanismus kontrolliert, indem 4 verschiedene von Chondrozyten gebildeten Moleküle wirken: PTHrP, Ihh, BMP und FGF.

Systemische Kontrolle

Knochenwachstum benötigt stets eine hohe anabole Stoffwechsellage, die sich vor allem auf die Proteinbiosynthese konzentriert. Jegliche Funktionsstörungen, welche Zellvermehrung und -differenzierung, Kollagensynthese oder die Produktion von Proteoglykanen beeinflussen, können zu Störungen im Skelettwachstum führen. Hormone wirken auf verschiedene Arten auf die Knochenentwicklung, beeinflussen die Breite der Epiphysenfuge und das Ausmaß und die Geschwindigkeit des Wachstums. Die oben beschriebenen lokalen Einflussfaktoren stehen dabei in Interaktion mit systemischen Hormonen. Dazu gehören das Wachstumshormon (GH), Schilddrüsenhormone (T4/Thyroxin und T3/Trijodthyronin), Östrogene und Androgene, IGF-I und -II, Glukokortikoide und Kalzitriol (Vitamin D) (30).

IGF-I und IGF-II scheinen die Hauptwachstumsregulatoren vor der Geburt zu sein, unabhängig von GH, wohingegen postnatal von einem engen Zusammenspiel von IGF-I und GH vor allem an der Wachstumsfuge ausgegangen wird. Dabei bindet GH an

Rezeptoren der Chondrozyten der Reservezone und führen zu Zellteilung (30). Während der Pubertät überwiegt der Einfluss von den Sexualhormonen, Androgene und Östrogene (34).

Epiphysenfugenschluss

Das Knochenwachstum endet im Augenblick der metaphysär-epiphysären Verschmelzung, wonach die Wachstumsfuge nicht mehr nachweisbar ist. Dieser Vorgang tritt nicht spontan ein, sondern ist ein 2–3 Jahre dauernder Prozess. Anfangs sind die Wachstumsfugen radiologisch noch nachweisbar, funktionell jedoch nicht mehr wirksam (5).

Mit zunehmendem Alter lässt das Längenwachstum nach und die Proliferationsrate der Chondrozyten der Epiphysenfuge nimmt ab. Dies geht mit strukturellen Veränderungen der Fuge einher: Es kommt zu einem allmählichen Rückgang der gesamten Fughöhe durch Verminderung der proliferativen sowie der hypertrophen Zone, sowie zu einem Abfall der Größe der hypertrophen Chondrozyten und der Dichte der Zellsäulen. Es kommt zu einer kompletten Resorption der Fuge, die in der Fusion von Epi- und Metaphyse endet. Es können grundsätzlich drei verschiedenen Stadien unterscheiden werden:

Proliferations- und Mineralisationsphase. In dieser Phase sind Proliferations- und Mineralisationsvorgänge gleichermaßen aktiv und halten die Fuge offen.

Ruhephase. Kurz vor Wachstumsabschluss kommt es zu einer Ruhephase, in der die Proliferationsvorgänge sistieren, die Mineralisationsvorgänge aber nicht aggressiv auf den metaphysären Teil der Fuge übergreifen.

Verschlussphase. Die Proliferation sistiert vollständig, die Mineralisationsvorgänge aus dem metaphysären Grenzbereich greifen nun auf den metaphysären, später auf den epiphysären Fugenanteil über bis zur Verschmelzung mit der Epiphyse (35).

Der Prozess des Epiphysenfugenschlusses (physiologische Epiphysiodese) steht für beide Geschlechter unter der Kontrolle von Östrogen (36). Dabei verknöchern die Wachstumsfugen verschiedener Lokalisationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und mit individueller Geschwindigkeit, beim Mädchen etwa 2 Jahre früher als beim Jungen.

2.9 Frakturheilung

Knochengewebe besitzt die Fähigkeit zur narbenlosen Ausheilung, *Restitutio ad integrum*, wobei Knochendefekte durch neu gebildetes Knochengewebe ersetzt werden. Dabei geht die Neubildung von Blastemen des Periosts, Endosts oder der Havers-Kanäle aus. Aus dem jeweiligen Blastem gehen die für den Knochen- und -aufbau notwendigen Zellpopulationen, Osteoblasten für den Knochenaufbau und Osteoklasten für den Knochenabbau hervor. Voraussetzungen einer komplikationslosen Frakturheilung sind Reposition, ein möglichst enger Kontakt der Frakturrenden, eine adäquate Blutversorgung und Ruhigstellung (37). Das Ziel ist die Wiedererlangung der mechanischen Stabilität des Knochens mit anatomischen Achsenverhältnissen (38).

Grundsätzlich können zwei Arten der Knochenbruchheilung unterschieden werden: die primäre und die sekundäre Frakturheilung.

Primäre Frakturheilung

Bei der primären (direkten) Frakturheilung handelt es sich um desmale Osteogenese, ohne Frakturspaltverbreiterung und Kallusbildung. Bei der primären Frakturheilung muss ein enger Kontakt der Frakturrenden bei absoluter Stabilität im Frakturspalt generiert sein. Dies wird durch externe oder interne (Platten-) Osteosynthese erreicht, die im Falle der primären Knochenbruchheilung nicht einmal Mikrobewegungen zulassen darf.

Von Kontaktheilung spricht man, wenn der Frakturspalt durch längs einwachsende Osteone überbrückt wird, wozu ein kongruenter Flächenkontakt notwendig ist. Es handelt sich um primäre Spalthheilung, wenn nach Osteosynthese minimale Knochenspalten verbleiben, die zuerst mit Geflechtknochen aufgefüllt werden, um später durch den Havers-Umbau ein funktionelles Remodeling zu erfahren. Die definitive primäre Knochenheilung dauert bis zu 2 Jahre (37-39).

Sekundäre Frakturheilung

Die sekundäre (indirekte) Frakturheilung ist die natürliche und häufigere Form der Knochenbruchheilung und erfolgt über ein vorläufiges transientes, knorpeliges Narbengewebe, den Kallus. Durch Mikrobewegungen im Frakturspalt entsteht ein Reizkallus, der die Fraktur stabilisiert (Stabilisierungskallus). Dazu kommt es bei konservativer Knochenbruchbehandlung und bei der Stabilisierung mittels Marknagelosteosynthese und Fixateur externe (40). Diese Art der Knochenheilung kann in

Fasen eingeteilt werden, es muss aber betont werden, dass diese sich während des Heilungsprozesses weit überlappen (41).

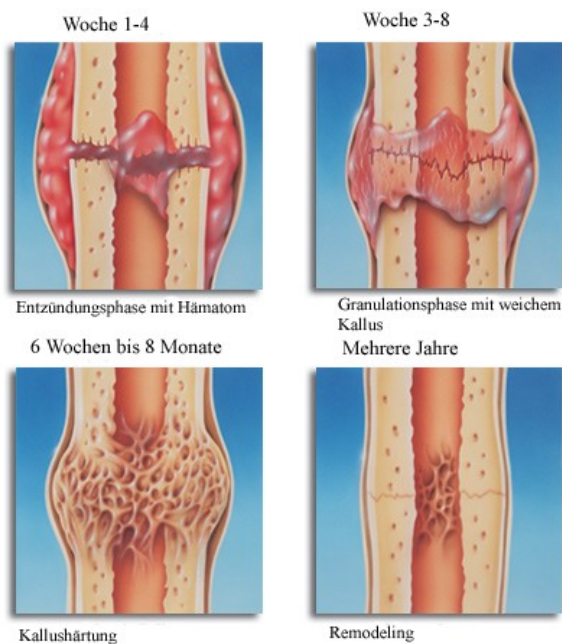


Abb. 6: Darstellung der 4 Phasen der Frakturheilung. Zu beachten ist die zeitliche Überschneidung der Perioden. Aus Fracture healing. Available at: http://4.bp.blogspot.com/_4ydy8JbJZXI/TCdnuMcce9I/AAAAAAAAABTE/tFVtR-VIE3s/s1600/FractureHealing.jpg (48).

Die Entzündungsphase beginnt mit der Fraktur und erstreckt sich über 3 bis 4 Wochen. Es kommt zur Ausbildung eines Frakturhämatoms zwischen den Frakturrenden und unter abgehobenem Periost durch die Kontinuitätsunterbrechung von Gefäßen, Periost und ggf. Muskelgewebe im Bereich des Markraums. Durch die Unterbrechung der Gefäßversorgung kommt es zur Nekrosebildung an den Frakturrenden, was zu einer akuten Entzündungsreaktion mit lokaler Infiltration von Granulozyten, Mastzellen, Monozyten, Thrombozyten und Ödembildung führt. Die einwandernden Entzündungszellen sezernieren Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche die Stimulation zur Proliferation und Differenzierung der umliegenden Gewebezellen auslösen (39,40).

In der Granulationsphase, 3. bis 8. Woche, kommt es zur Bildung eines weichen Kallus von peripher nach zentral, indem das Hämatom zuerst durch einwandernde Fibroblasten organisiert wird. Dies führt zur Bildung von Faserknorpel. Dadurch kommt es zu einer weiteren Stabilisierung im Frakturspalt und der Einwanderung von Osteoblasten und Osteoklasten, die auf stabilen Fragmentsäulen appositionell Knochen aufbauen und nekrotisches Knochenmaterial abbauen.

In der Phase der Kallushärtung (6 Wochen bis 4 Monate) kommt es zur allmählichen Mineralisation und Bildung von Geflechtknochen mit zunehmender Stabilisierung und Versteifung des Knochens (40).

Die Remodelingphase dauert mehrere Jahre und beinhaltet die Umwandlung von Geflechtknochen durch den Havers-Umbau zu lamellärem Knochengewebe. Mit fortschreitender funktioneller Adaptation kommt es zur Auflösung des Kallusgewebes und zur Wiederherstellung des medullären Systems, wodurch der Knochen allmählich seine ursprüngliche Form und Stabilität wiedererlangt (39,41).

2.10 Zellproliferation und Zellzyklus

Da im menschlichen Organismus ständig Zellen zugrunde gehen, müssen zur Aufrechterhaltung des Gleichgewichtes (Steady state) ständig neue Zellen gebildet werden. Dieser Prozess der Zellteilung unterliegt strenger Regulation und ist eng mit Wachstum, Differenzierung und Gewebsumsatz assoziiert. Normalerweise befinden sich Zellen in der Interphase, der Phase zwischen 2 Zellteilungen (G₀- oder Arbeitsphase). In dieser Phase unterziehen sie sich keiner Teilung, außer sie erhalten ein Signal, welches sie veranlasst sich in den aktiven Zellzyklus zu begeben. Diese Signale, die Zellen dazu anregen sich zu teilen, triggern meist komplexe Signaltransduktionskaskaden. Hauptsächlich handelt es sich hierbei um Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Mitogene (42).

Wurde eine Zelle angeregt sich zu teilen, begibt sie sich in die aktiven Phasen des Zellzyklus, welche in 4 Stadien eingeteilt werden:

Während der G₁-Phase [1] wird die DNA-Synthese vorbereitet. In dieser Phase durchläuft die Zelle einen Restriktionspunkt, nachdem der Zyklus nicht mehr durchbrochen werden kann. In der S-Phase [2] (Synthese-Phase) kommt es zur DNA-Synthese und damit zur Replikation des Genoms. Die darauf folgende S₂-Phase [3] dient der Vorbereitung zur Zellteilung sowie der Kontrolle und Reparatur der replizierten DNA. Während der M-Phase [4] erfährt die Zelle die eigentliche Zellteilung durch Mitose (oder Meiose) um danach wieder in die G₀ oder G₁-Phase einzutreten.

Die Progression durch diesen Zyklus wird von CDK kontrolliert. Diese CDK phosphorylieren Substrate wie das Retinoblastom-Gen (RB), welches für den Übergang zur jeweils nächsten Zellzyklusphase verantwortlich ist. CDK werden wiederum von Zyklinen aktiviert, die nur zu bestimmten Zeitpunkten des Zyklus exprimiert werden. Kommt es zu der Verbindung von CDK und Zyklinen, so werden die CDK durch CAK mittels Phosphorylierung aktiviert (42).

3. Material und Methoden

3.1 DNA-Replikation und BrdU-Labeling

Eine Methode, um den Parameter der Zellproliferation analysieren zu können, ist die Messung von DNA-Synthese. Die Arbeit von Janezic *et al.* (2) zeigte, dass BrdU-Labeling von proliferierenden Chondrozyten der Epiphysenfugen von Ratten als geeignete Nachweismethode einsetzbar ist.

Während des Zellzyklus wird die DNA in der Synthesephase (S-Phase) verdoppelt, damit in der nachfolgenden Zellteilung der jeweilige Gehalt an DNA pro Zelle erhalten bleibt. Bei der Proliferationsanalyse macht man sich den Einbau neuer Nukleotide zunutze. 5-Bromo-2'-desoxyuridin (BrdU) ist ein Thyminanalogon, das spezifisch während der DNA Synthese (S-Phase) von aktiv proliferierenden Zellen anstelle von Thymin in die DNA eingebaut wird.

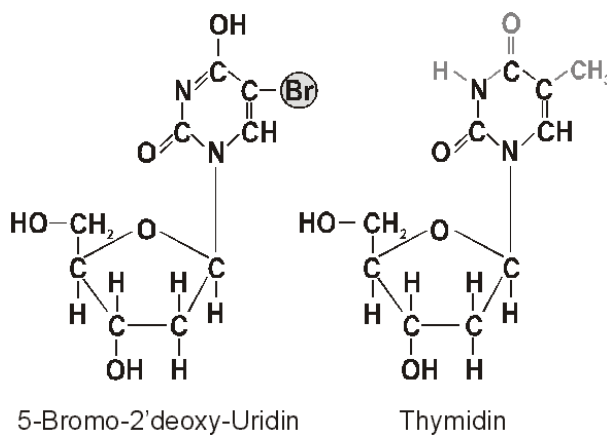


Abb. 7: Strukturformeln von BrdU und Thyminidin. Die analogen Moleküle bestehen beide aus einer Desoxyribose und unterscheiden sich lediglich in ihrem Basenrest. Thyminidin setzt sich aus einer Desoxyribose und einem Thyminbasenrest zusammen. BrdU besteht aus Desoxyribose mit einem Uridinrest, der an Stelle 5 im Ring einen Bromrest besitzt. Aus Strukturformeln BrdU und Thyminidin. Available at: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/grampp-anne-2000-10-06/HTML/grampp-ch2.html> (49).

Mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers gegen BrdU (Anti-BrdU-Antikörper) können die Zellen, welche während der S-Phase BrdU eingebaut haben, immunocytochemisch identifiziert werden. Dabei zeigt der Anti-BrdU-Antikörper keine Kreuzreaktion mit ähnlichen Molekülen wie Thymin oder Uridin. Der Anti-BrdU-Antikörper fungiert als primärer Antikörper, welcher an BrdU bindet. Der sekundäre Antikörper, ein mit

Fluoreszeinisothiocyanat (FITC) gelabelter polyklonaler Anti-Maus Antikörper bindet an den Fab-Teil des primären Antikörpers. Somit sind BrdU-positive Zellen ein Indikator für die Zellteilung. Man geht davon aus, dass das aufgenommene BrdU die weitere Entwicklung des Tieres nicht beeinflusst (43).

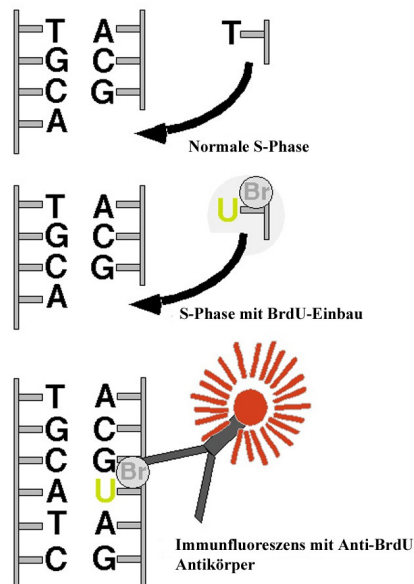


Abb. 8: Markierung von proliferierenden Zellen mit BrdU. Die schematische Zeichnung zeigt im oberen Teil, wie in der normalen Synthesephase der Mitose Thymidin (T) sich mit Adenin (A) paarend in den neuen Strang der DNA eingebaut wird. Wird das Thymidinanalogue Bromodesoxyuridin (BrdU) im Überfluß angeboten, kompetiert es mit Thymidin um den Einbau in die DNA und wird statt Thymidin in den neu synthetisierten Strang inkorporiert (mittleres Bild). Nicht eingebautes BrdU wird schnell vom Körper eliminiert. Zellen, die BrdU enthalten, können mit Antikörpern (hier nur ein primärer Antikörper) gegen BrdU sichtbar gemacht werden. Aus: Aktivitätsabhängige Regulation von Neurogenese im erwachsenen Hippocampus, von Dr. med. Gerd Kempermann (44).

3.2 Rattenmodell

Es wurden 150 Sprague-Dawley-Ratten für ein in vivo Frakturmodell des wachsenden Knochens eingesetzt. Die Ratten waren im Alter von vier Wochen und wogen 100-120 g. Die Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip in zwei experimentelle Gruppen sowie in eine Kontrollgruppe aufgeteilt. In jeder Gruppe befanden sich 50 Tiere.

Unter Vollnarkose [subkutane Injektion von 0,1 ml/100 g Körpergewicht FDD-Narcotic solution (1 ml Fentanyl + 1 ml Dormicum + 0,5 ml Dormitor)] wurden nach Desinfektion mit Bethaisodina® an der experimentellen Gruppe I unilaterale (links), transversale Osteotomien der Epiphysen mit anschließender Plattenosteosynthese der Tibia mittels spezifischen Platten für Ratten (Entwicklung: AO Research Centre Davos, Schweiz) durchgeführt.

Die Tiere der experimentellen Gruppe II erfuhren ebenfalls unter Vollnarkose eine standardisierte geschlossene Tibiafraktur, jedoch wurde die Fraktur nicht mittels Plattenosteosynthese stabilisiert. Bei den Tieren der Kontrollgruppe wurde ein unilateraler Hautschnitt (links) mit anschließender Naht in Vollnarkose durchgeführt.

Alle drei Gruppen erhielten Antibiotika für drei Tage, sowie eine Schmerzmedikation (subkutane Injektion von Rimadyl® 5 mg/kg Körpergewicht) für eine Woche, danach wurden für eine weitere Schmerztherapie bis zum Zeitpunkt der Euthanasie Novalgin®-Tropfen dem Trinkwasser beigemischt.

An den Tagen 1, 3, 7, 14 und 28 post Trauma wurden je zehn Ratten pro Gruppe mittels intrakardialer Thiopental®-Gabe unter Vollnarkose (Isofluran-Narkose) euthanasiert. Zwei Stunden vor der Euthanasie wurde den Tieren entsprechend dem Protokoll (5-Bromo-2'-desoxyuridin Labeling and Detection Kit I®; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) 1,6 ml pro 100 g Körpergewicht unverdünnte BrdU-Labeling Lösung [sterile 1x10 ml BrdU Stammlösung 1000x conc. in 10 mM phosphatgepufferter Salzlösung (PBS: phosphate buffered saline)] intraperitoneal appliziert, um dadurch proliferierende Chondrozyten zu kennzeichnen.

Nach Euthanasie wurden bilateral die Tibiae entnommen und von bindegewebigen Strukturen befreit. Kurzfristig wurden die Präparate in Flüssigstickstoff, später in einem Eisschrank bei -80°C gelagert.

3.3 Entkalkung und HOPE®-Fixierung

Zur Entkalkung wurden die Knochen für drei Tage in 20%iger EDTA-Lösung (pH 7) unter Schütteln bei 8°C inkubiert. Die EDTA-Lösung wurde alle 24 Stunden gewechselt (Protokoll 3). Die Knochen wurden gespült und daraufhin HOPE®-fixiert (Protokoll 4). Bei diesem Verfahren wurden die zuvor entnommenen und entkalkten Epiphysen mittels Frontalschnitt halbiert und in eisgekühlte HOPE I®-Lösung eingebracht und auf Eis im Kühlraum für 16 Stunden inkubiert (2°C). Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die HOPE I®-Lösung entfernt und durch HOPE II®-Lösung ersetzt und erneut im Kühlraum (2°C) zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurde die HOPE II®-Lösung durch Aceton ersetzt und das Gewebe für weitere 2 Stunden inkubiert. Dieser Vorgang (in reinem Aceton) wurde zur vollständigen Dehydratation zwei Mal wiederholt. Für diese Gewebeprozessierung werden weder Alkohole noch Aldehyde ("Formalin", Glutaraldehyd) eingesetzt, so dass es zu keiner Quervernetzung der Molekülstrukturen im Gewebe kommt.

Daraufhin wurden die Knochen in Niedrigtemperaturparaffin (55°C Hybridisator) übertragen und über Nacht inkubiert. Die in frischem Niedrigtemperaturparaffin ausgegossenen Paraffinblöcke wurden im Kühlraum gelagert (Protokoll Nr. 4).

3.4 Immunhistochemie/ BrdU-Protokoll

Entparaffinieren

Für die immunocytochemische Evaluation wurde anhand eines standardisierten Protokolls gearbeitet (5-Bromo-2'-desoxyuridin Labeling and Detection Kit I®; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland).

Von den in Paraffin eingebetteten Knochen wurden mittels Microtom 6 µm Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in Bädern bei Raumtemperatur auf Objektträger aufgezogen, bei 40°C gestreckt und anschließend für 30 min im Brutschrank (50°C) wärmefixiert.

Zum Entparaffinieren wurden die Präparate erst bei 60°C in Isopropanol, anschließend in kaltem 70%igem Aceton inkubiert und abschließend in PBS gewaschen (Protokoll Nr. 1).

BrdU-Labeling

Das BrdU-Labeling wurde laut Prokoll Nr. 2 durchgeführt. Dazu wurden Schnitte sowie Cytospins einer Positivkontrolle (LGC Standards®, Adenokarzinom der Niere, Zellreihe 769-P, 60% Konfluent, mit 10 ml HBSS (Hanks Buffered Salt solution) gewaschen, 1 Stunde mit RPMI 1640 Medium (mit BrdU versetzt 1:1000) unter Standardbedingungen inkubiert) mit einer Primärantikörper/Anti-BrdU-Arbeitslösung für 30 min in einer Wärmefeuchtkammer inkubiert. Gleichzeitig wurde die Negativkontrolle mit Maus-IgG-Antikörper (Isotyp IgG1, kappa; X0931, DakoCytomation Negativkontrolle, 5 µg / ml) ebenfalls für 30 min in einer Wärmefeuchtkammer inkubiert. Anschließend wurden alle Objektträger in PBS gewaschen.

Folgend wurden die Schnitte (inklusive Positiv- und Negativkontrolle) mit dem sekundären Antikörper (Anti-Maus-FITC) für 30 min in einer Wärmefeuchtkammer inkubiert und anschließend in PBS gewaschen.

Zur Darstellung der Kerne wurden die Präparate mit DAPI für 5 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss gegengefärbt.

Abschließend wurde auf alle Präparate ein Tropfen Vectashield sowie ein Deckglas gegeben und die Objektträger in einem abgedunkelten Behälter bis zur weiteren Verwendung gelagert.

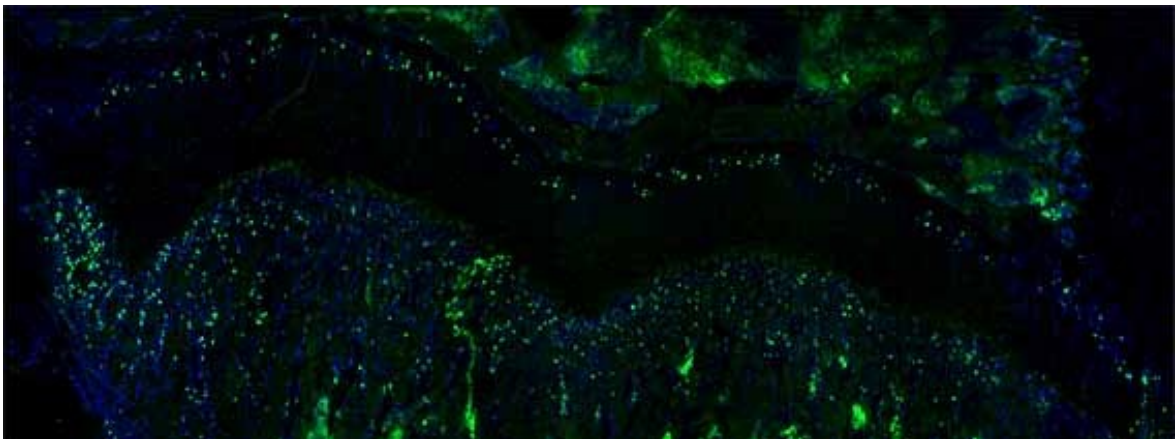


Abb. 9: Aufnahme einer Epiphysenfuge mittels Fluoreszenzmikroskop (Leica DM6000 B)

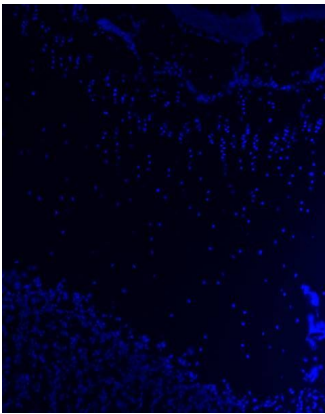
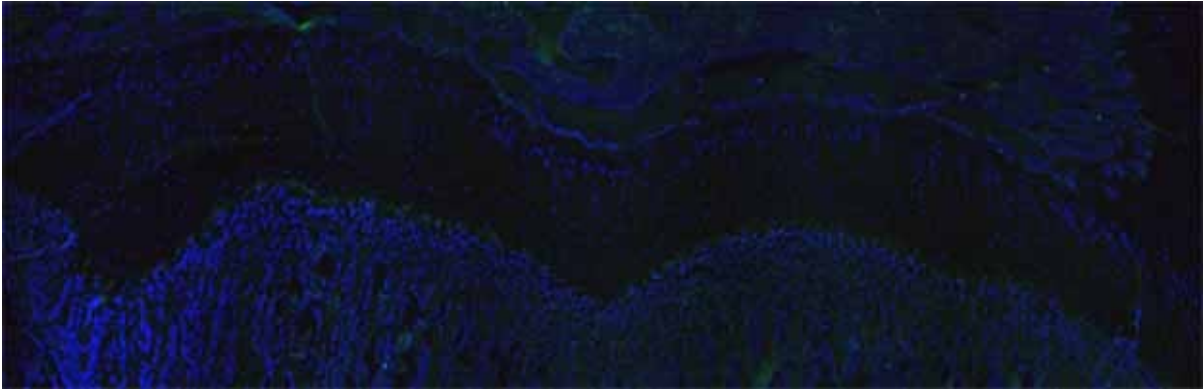


Abb. 10: Epiphysenfuge Negativkontrolle

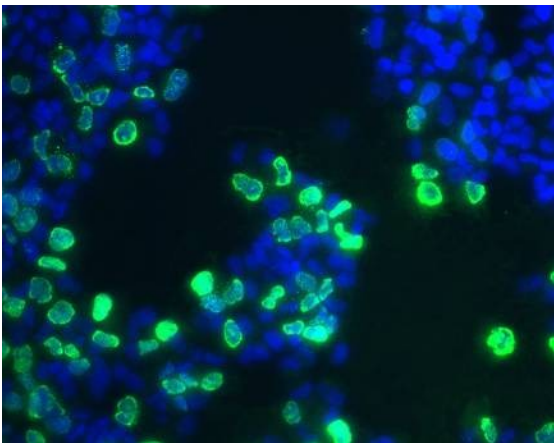


Abb. 11: Positivkontrolle 769-P Zelllinie, Nierenzellkarzinom

3.5 VIS – Visiopharm Image System / newCAST / Cell Count

Die Schnitte von 9 Präparaten wurden mittels Fluoreszenzmikroskop (Leica DM6000 B) gescannt und die einzelnen Aufnahmen als Panoramabild gespeichert. Mithilfe von Adobe Photoshop 6.0 wurden die Epiphysenfugen ausgeschnitten. Fallweise wurden die Tonwerte der Bilder korrigiert, um Hintergrundfärbungen zu reduzieren oder Kontraste zu verstärken.

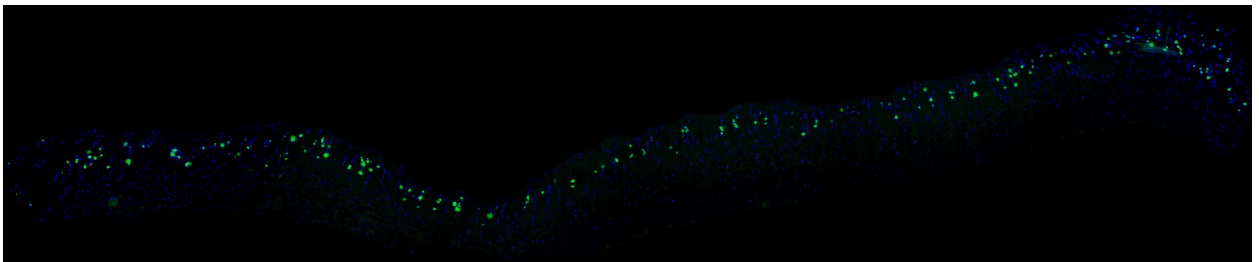


Abb. 12: Epiphysenfuge R102RA_BrdU_OT070 komplett ausgeschnitten.

Zur Auswertung BrdU-positiver Kerne wurden zwei Methoden verwendet: 1. visuelle Auswertung (Auszählen) und 2. Cellenger Developer Studio 4.0®.

Visuelle Auszählung

Mithilfe des VIS (Visiopharm Integrator System Version 3.6.2.0® im Modus newCAST mit dem Tool: Count Tool) wurden die DAPI-positiven (blau angefärbt) sowie BrdU-positiven (grün angefärbten) Kerne der gesamten Epiphysenfuge gezählt.

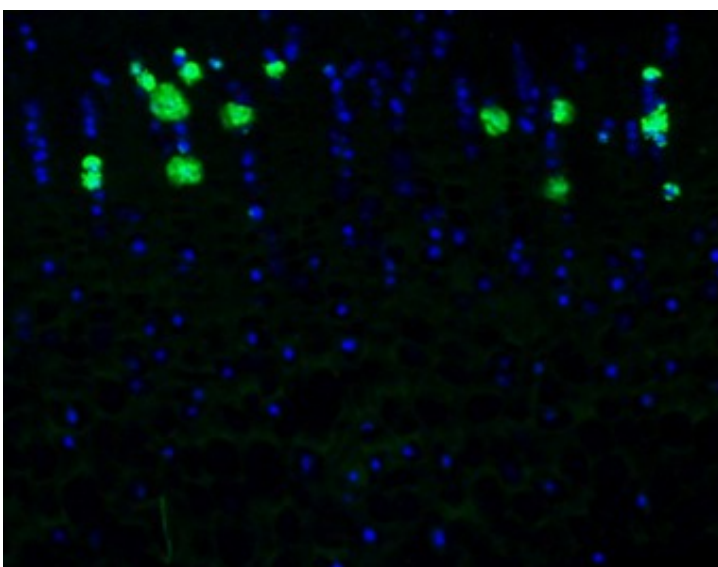


Abb. 13: Ausschnitt aus Abbildung 13; Vergrößerung zur visuellen Auszählung.

Der Anteil der BrdU-positiven Kerne an der Gesamtzahl der Kerne wurde in Prozent ausgedrückt [Proliferationsindex (PI) Tab. 1].

Panoramabild (Ratte/Bein/Färbung/Objekträger)	Gesamtanzahl Kerne (DAPI-pos)	BrdU-pos. Kerne	PI
R11RA_BrdU_OT049_Fuge	1977	134	6,8%
R21LB_BrdU_OT089_01_Fuge	2788	119	4,3%
R51RA_BrdU_OT041_01_Fuge	1733	126	7,3%
R91LA_BrdU_OT173_01_Fuge	1926	99	5,1%
R102RA_BrdU_OT070_01_Fuge	2888	186	6,4%
R111RA_BrdU_OT053_01_Fuge	1812	73	4,0%

Tabelle 1: Visuelle Auswertung: Gesamtanzahl an Kernen sowie BrdU-pos. Kernen der Epiphysenfugen an neun Beispielen; PI: Proliferations-Index gibt den Anteil BrdU-positiver Kerne an der Gesamtzahl der gezählten Kerne wieder.

3.6 Automatisiertes Auswertverfahren (Cellenger Developer Studio 4.0[®])

Bei der herkömmlichen automatisierten Bildanalyse werden Objekte identifiziert, indem verschiedene pixelbasierte Filter eingesetzt werden. Diese Filter beziehen sich auf Intensitätsschwellen oder –gradienten und vergleichen angrenzende Pixel miteinander.

Bei der von uns eingesetzten Software handelt es sich um Cellenger Developer Studio 4.0[®]. (Definiens AG, Munich, Deutschland). Mithilfe des Programms wird das Originalimage transformiert, so dass die zu untersuchenden Objekte durch einfache Grenzwerte extrahiert werden können, anstelle von einzelnen Pixeln (45).

Aufgrund der Größe der Bilddateien (Panoramabild aus gescannten Einzelbildern) mussten die Panoramabilder der Fugen zweigeteilt ausgewertet werden.

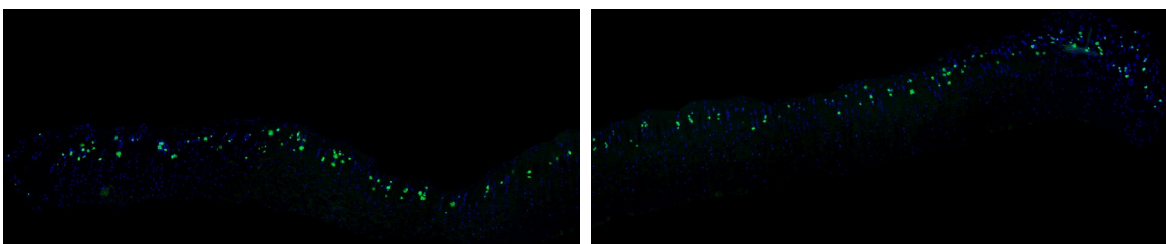


Abb.14: Epiphysenfuge R102RA_BrdU_OT070 halbiert in Fuge I und Fuge II zur Cellenger[®] Developer Studio 4.0 Bearbeitung

Für die automatisierte Bearbeitung der Images wurde als erstes die objektorientierte Erstellung eines Arbeitspfades (Regelwerk) für die Erkennung der gewünschten Zellen erarbeitet.

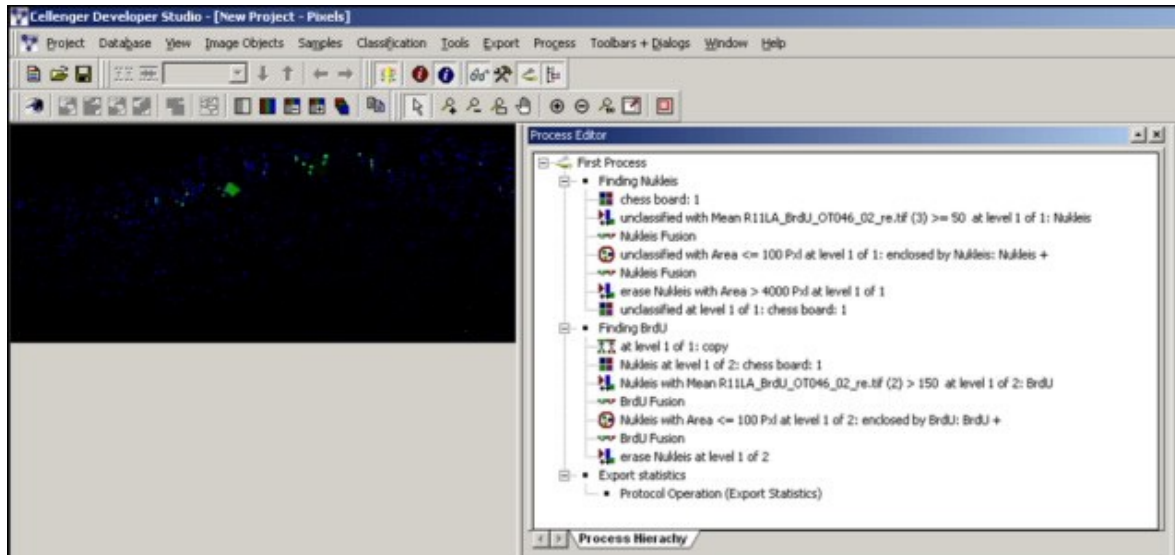


Abb. 15: Arbeitsmaske Cellenger® Developer Studio 4.0

Das Bild einer Wachstumsfuge wird durch verschiedene Faktoren bestimmt. Die Signalstärke der gefärbten Kerne bestimmt die Pixelintensität (0-255). Dazu kommt die Aufnahmezeit (Integrationszeit) sowie die Aufnahme in zwei Kanälen (blauer Kanal für die DAPI-Kernfärbung; grüner Kanal für die BrdU-gelabelten Kerne).

Bei der Einstellung eines Arbeitspfades im Cellenger® erfolgt als erstes eine Segmentierung der Bilder in die einzelnen Pixel („Chessboard segmentation“). Danach klassifiziert das Programm all jene Pixel, die eine bestimmte Intensität überschreiten. Nach der Klassifikation werden Pixel einer Klasse zu Objekten fusioniert („Nukleis Fusion“). Sollten sich innerhalb dieses Objekts Pixel befinden, deren Intensität unter dem jeweiligen Schwellenwert liegen (also nicht der Klasse Nukleis angehören), dann werden diese im Schritt danach zu dem bestehenden Objekt fusioniert. Objekte, die eine gewisse Größe über- oder unterschreiten und offensichtlich keine Kerne sind, werden als Artefakte gelöscht („erase Nukleis“). Im zweiten Teil des Programms wird innerhalb der Klasse der Kerne im Kanal der BrdU-Färbung (grüner Kanal) ein ähnlicher Prozess gestartet, um nun dementsprechend grüne Signale zu detektieren. Dies bedeutet, dass ein BrdU-positiver Kern ein blaues und ein grünes Signal aufweisen muss. Die Summe der blauen Pixelfläche entspricht der Fläche aller Kerne, die Summe der Pixelfläche, die sowohl blau als auch

grün ist, entspricht der Fläche des BrdU-Signals der Kerne. Der Quotient dieser beiden Flächen in Prozent ergibt den Proliferationsindex.

Dieser eingestellte Arbeitspfad wurde auf beide Hälften des Images angewandt. So wurden die Anzahl aller (DAPI-positiven) Kerne und der BrdU-positiven Kerne ermittelt. Die Werte beider Hälften wurden addiert und der Anteil der BrdU-positiven Kerne von der Gesamtheit der Kerne in Prozent ausgedrückt (PI in Tab. 2).

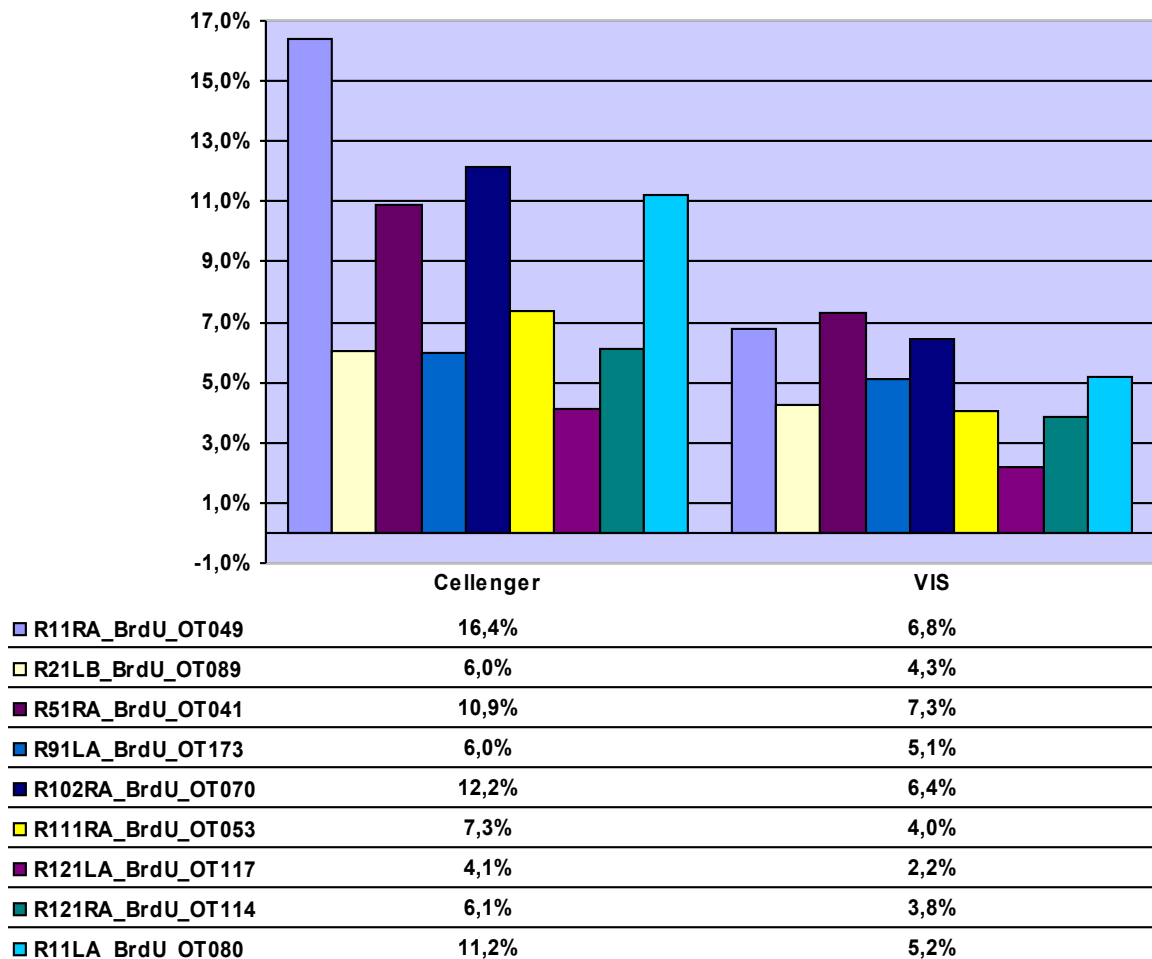
Panoramabild (Ratte/Bein/Färbung/Objekträger)	Gesamtanzahl Kerne (DAPI-pos)	Gesamtanzahl Kerne (BrdU-pos)	PI
R11RA_BrdU_OT049_Fuge	107299	17619	16,4%
R21LB_BrdU_OT089_01_Fuge	147372	8860	6,0%
R51RA_BrdU_OT041_01_Fuge	70468	7687	10,9%
R91LA_BrdU_OT173_01_Fuge	59341	3559	6,0%
R102RA_BrdU_OT070_01_Fuge	132469	16119	12,2%
R111RA_BrdU_OT053_01_Fuge	93924	6900	7,3%
R121LA_BrdU_OT117_01_Fuge	140238	5768	4,1%
R121RA_BrdU_OT114_01_Fuge	267658	16428	6,1%
R11LA_BrdU_OT080_01_Fuge	173531	19468	11,2%

Tabelle 2: Auswertung mit Cellenger® Developer Studio 4.0; Anzahl DAPI-positiver sowie BrdU-positiver Kerne; PI: Proliferations-Index gibt den Anteil BrdU-positiver Kerne von der Gesamtzahl der gezählten Kerne wieder.

4. Auswertung

Die Werte der visuellen sowie der automatisierten Auswertung sind in der Graphik 1 dargestellt. Dabei wird deutlich, dass trotz der spezifischen Einstellungen, bzw. Zellerkennungsmerkmale im Cellenger[®], eine deutliche Diskrepanz zur visuellen Auszählung besteht. In der graphischen Darstellung wird deutlich, dass die Relationen (Abstufungen) der Ergebnisse der unterschiedlichen Bilder zueinander in beiden Auszählverfahren sehr ähnlich sind.

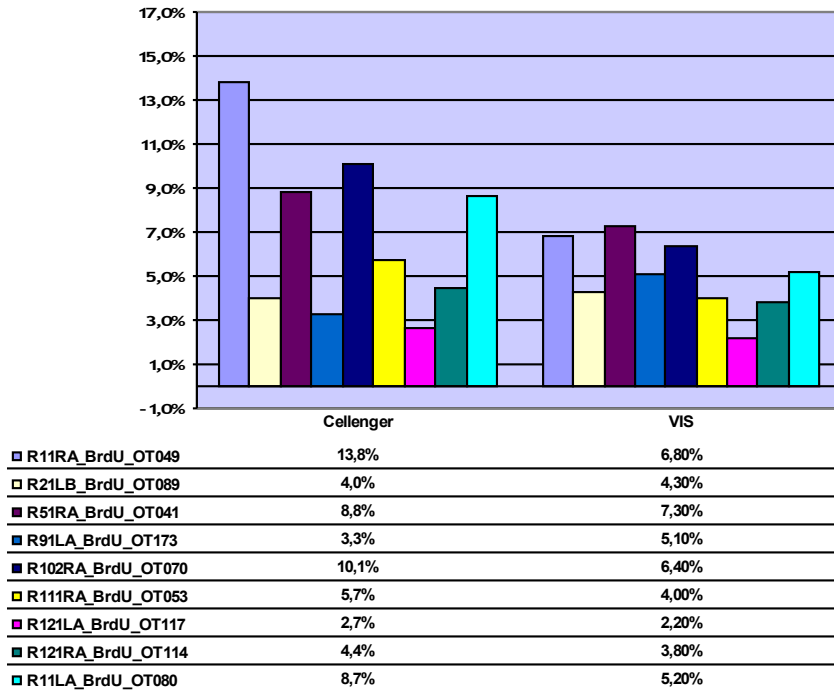
Auswertung für BrdU-Signalintensität ≤ 50



Graphik 1: Graphische Darstellung der Werte aus Tab. 1 und 2, BrdU-Signalintensität ≤ 50 .

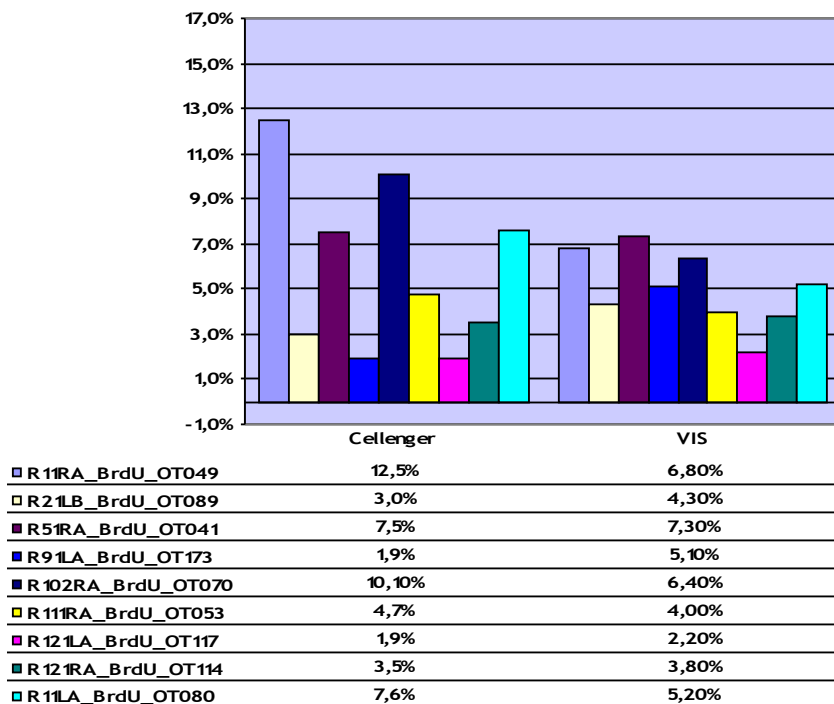
Zum Vergleich sind folgende Graphiken mit Ergebnissen unterschiedlicher Einstellungen des Cellenger[®] dargestellt.

Auswertung für BrdU-Signalintensität ≤ 80



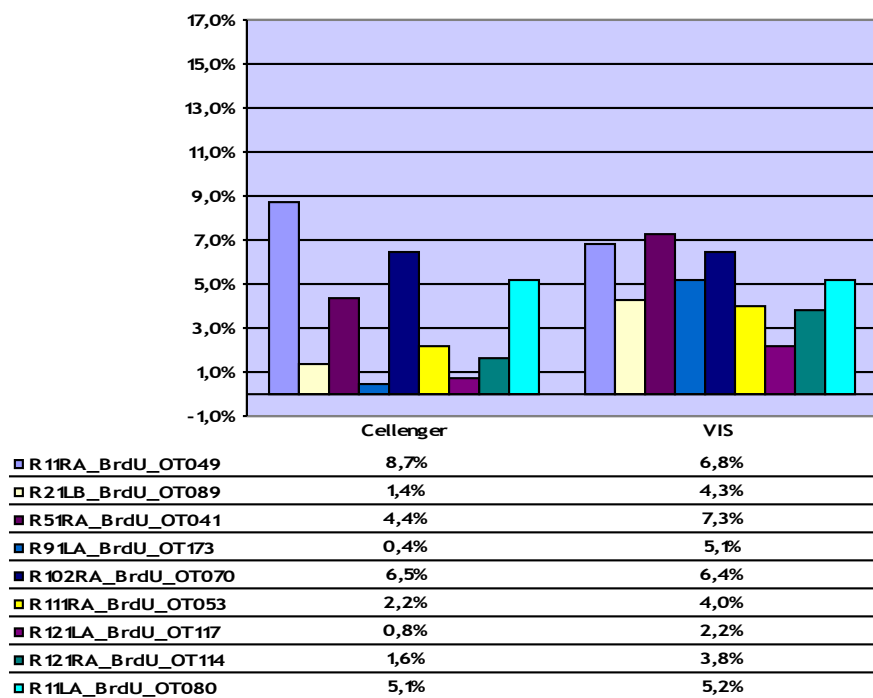
Grafik 2

Auswertung für BrdU-Signalintensität ≤ 100



Grafik 3

Auswertung für BrdU-Signalintensität ≤ 150



Grafik 4

Grafik 2-4: Vergleich der Ergebnisse von Cellenger-Auszählung und VIS-Auszählung anhand unterschiedlicher BrdU-Signalstärkewerte im Cellenger.

5. Diskussion

Grundsätzlich stellt sich der Auszählung der Zellkerne wie bereits erwähnt folgendes Problem: Da es anhand der Färbungen nicht möglich ist, allein die proliferative Zone der Epiphysenfuge auszuwählen, muss bei der Auswertung in jedem Fall ein systematischer Fehler in Kauf genommen werden. Dieses Problem hat sich auch in den Vorprojekten von Janezic *et al.* und Gaber *et al.* gezeigt (1,2).

In diesen Vorprojekten wurden drei Bereiche der Epiphysenfuge ausgewählt, ausgewertet und auf die gesamte Fuge bezogen. Allerdings konnten die Bereiche mit der verwendeten Methode nicht repräsentativ (vorurteilsfrei) ausgewählt werden. Dabei stellt sich zusätzlich das Problem, dass die Auswahl der drei Bereiche auf alle Schnitte angewendet werden muss und dadurch mit einem hohen Aufwand verbunden ist. Im vorliegenden Projekt wurde dieser systematische Fehler berücksichtigt. Allerdings wurden im Unterschied zu den Vorprojekten Chondrozyten der gesamten Epiphysenfuge für die Berechnung verwendet.

Die visuelle Auszählung ist in beiden Fällen mit einem hohen Aufwand verbunden. Zudem ist das visuelle Auszählen stark vom Auswertenden abhängig. Dazu kommen Unterschiede bei der Auszählung durch denselben Operateur durch Faktoren wie Müdigkeit, Lernkurve und Motivation. Letztlich wird dadurch die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse in Frage gestellt. Eine automatisierte Auswertung ist nicht vom Operateur abhängig, arbeitet schneller und lässt sich nicht von Faktoren wie Müdigkeit beeinflussen. Diese Probleme sind der Grund für den Vergleich des visuellen mit einem automatisierten Verfahrens.

Die Herausforderung und gleichzeitig die Hauptproblematik bei der Erprobung eines automatisierten Auswertverfahrens besteht darin, eine Einstellung im verwendeten Programm, hier Cellenger[®], so zu wählen, dass folgende Punkte berücksichtigt werden:

1. BrdU-Färbung der Schnitte.

Durch den Einbau von BrdU in die DNA proliferierender Zellen anstelle von Thymin, erwies sich diese Methode (wie auch in Vorprojekten gezeigt (2)) als gute Darstellung von Proliferation. Zudem erwies sich die Färbung als einfach durchführbar und gut auswertbar. Die Signale der BrdU-positiven sowie DAPI-positiven Zellen waren stets eindeutig und es kam zu wenigen Artefakten.

2. Möglichst wenig falsch negative sowie falsch positive Kerne detektieren.

Dies bedeutet, dass trotz Betrachtung der gesamten Epiphysenfuge, BrdU-positive Zellkerne ausschließlich in der (soweit abgrenzbaren) proliferativen Zone detektiert werden sollten.

Dabei wurde eine Einstellung des Cellenger[®] auf alle Schnitte angewendet, welche die gewünschten Kriterien erfüllten und die Ergebnisse reproduzierbar erfasst wurden.

Wichtig in diesem Zusammenhang sind neben einer guten Färbung auch die am Mikroskop für die Aufnahmen optimierten Einstellungen, da starke Signale und wenig Hintergrund (für starken Kontrast) die Auswertung erleichtert. Es gilt, dass je größer der Unterschied zwischen Hintergrund und Signal (eines Kerns), desto klarer die Unterscheidbarkeit mittels eines Regelwerks.

In Anbetracht der Auswahl der gesamten Fuge (anstatt nur der Proliferationszone) für die Analyse muss man mit einer (dergegenüber) reduzierten Sensitivität rechnen. Dies liegt in der Tatsache begründet, dass ein und dieselbe Anzahl an BrdU-positiven Kernen bezogen auf die gesamte Fuge (inklusive der hypertrophen Zone) einem kleineren Prozentsatz entspricht, als wenn der analysierte Bereich sich nur auf die Proliferationszone bezogen wird. Unterschiede in der Proliferation zwischen Präparaten erreichen demnach erst durch größere Unterschiede in der detektierten BrdU-Fläche eine Signifikanz.

3. Den richtigen BrdU Schwellenwert wählen.

Die Grafiken 1-4 zeigen, dass bei einem BrdU-Schwellenwert von 50 im Cellenger[®] die größte Annäherung an die visuelle Auszählmethode erreicht wurde. Mit dieser Einstellung konnte reproduzierbar Proliferation in der Epiphysenfuge dargestellt werden.

4. Die visuelle Auszählung bezieht sich auf die gezählte Anzahl der Zellkerne, die automatisierte Auswertung arbeitet mit Flächen (Pixel²).

Hier besteht das Problem in der unterschiedlichen Größe der Kerne, bzw. der unterschiedlichen Größe des BrdU-Signals innerhalb der Zellkerne, welche

zwangsläufig zu Abweichung der Ergebnisse führt. Bei der visuellen Auszählung wird jeder als BrdU-positiv erkannter Zellkern (zu 100%) als positiv gezählt. Das Cellenger[®]-Programm wertet die Fläche, also die Kerngröße bzw. die Flächen der BrdU-Signale innerhalb der Kernflächen aus. Dadurch werden durch beide Methoden die selben Zellen detektiert, die Ergebnisse können jedoch anhand der Größenunterschiede der BrdU-Signale bzw. der Kerngrößen erheblich variieren.

Fazit

Unter Berücksichtigung der genannten Punkte, lässt sich der Aufwand des Auszählens der Zellkerne deutlich verringern, da eine Bearbeitung mittels Cellenger[®] auf alle Schnitte anwendbar ist. Der Vorteil einer automatisierten Auswertmethode besteht also vor allem in der Möglichkeit, eine große Menge an Daten mit wenig Zeitaufwand effizient, reproduzierbar und Operator-unabhängig auszuwerten.

Unter folgenden Voraussetzungen bietet sich die automatisierte Auswertung mit dem Cellenger[®] an: Der Benutzer muss sich der oben genannten Problematik bewusst sein und den erwähnten systematischen Fehler einkalkulieren. Dies ist nur sinnvoll, wenn es bei den Ergebnissen nicht auf direkte Zahlenwerte ankommt (die derzeit nur mit der visuellen Methode zu erfassen sind), sondern vielmehr eine Relation im Vordergrund steht (die auch anhand von Flächen darstellbar ist). Das Programm ist leicht zu bedienen und verfügt über übersichtliche Arbeitsmasken. Der Aufwand der Einarbeitung und die Durchführung der Einstellungen sind gering

Bezogen auf das Ziel der vorliegenden Studie bedeutet das, dass die Kombination der BrdU-Färbung und die Auswertung mit dem Cellenger[®] dazu beitragen könnten, die Prozesse der Frakturheilung nach Frakturen der Röhrenknochen im Kindesalter besser zu bewerten und gegebenenfalls neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

6. Anhang

Protokoll 1

Schnittpräparation / Entparaffinieren von HOPE-Schnitten

Schneiden am Microtom 6 µm

Strecken in kaltem Aqua deionisata

Aufziehen in Aqua deionisata, 37°C

- 30 min bei 50°C Wärmefixieren (Brutschrank)
 - 2x 10 min bei 60°C in Isopropanol inkubieren (Brutschrank)
 - 10 min bei 4°C in 70%igem Aceton inkubieren
 - Schwemmen in Aqua dest.
 - 1 min trocknen am Heizblock (optional)
-

Protokoll 2

5-Bromo-2'-desoxyuridin Labeling and Detection Kit I[®] (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)

BrdU Labeling

- Objektträger 3 x waschen PBS (optional)
- 30 min bei 37°C, je 50 µl Anti-BrdU AK (, 1:10 verdünnt in Puffer 3) in feuchter Atmosphäre (Wärmefeuchtkammer) unter Deckglas inkubieren (neg. Ko.: Maus IgG1, kappa AK)
- 3 x waschen in PBS
- 30 min bei 37°C, je 50 µl anti-m FITC AK (1:10 in PBS) in feuchter Atmosphäre (Wärmefeuchtkammer) unter Deckglas inkubieren
- 3 x waschen in PBS

DAPI Gegenfärbung

- 5 min bei Raumtemperatur, je 150 µl DAPI (1:2000 in PBS) unter Lichtausschluss inkubieren
 - 3 x waschen in PBS
 - 1 gtt Vectashild, Deckglas
 - Lagerung unter Lichtausschluss
-

Protokoll 3

EDTA-Entkalkung

- Inkubieren der Proben in 50 ml 20%iger EDTA-Lösung (pH 7) für drei Tage bei 8°C unter ständigem Schwenken. Die Lösung wird alle 24 Stunden getauscht.
-

Protokoll 4

HOPE®-Fixierung

- Entkalkte Knochen frontal schneiden.
- 16 h in 5 ml 2°C kalter HOPE I Lösung inkubieren (Eis-Wasser-Gemisch!)
- 2 h in 5 ml 2°C kalter HOPE II Lösung (1:1000 in Azeton verdünnet) inkubieren
- 3 x 2 h in 100%igem Azeton inkubieren (2°C)
- Die Gewebe in Niedrigtemperaturparaffin (54 – 55°C) übertragen und über Nacht inkubieren.
- Am nächsten Tag ausgießen.
- Die Blöcke im Kühlschrank lagern.

7. Literaturliste

- (1) Gaber S, Fischerauer EE, Frohlich E, Janezic G, Amerstorfer F, Weinberg AM. Chondrocyte apoptosis enhanced at the growth plate: a physal response to a diaphyseal fracture. *Cell Tissue Res* 2009 Mar;335(3):539-549.
- (2) Janezic G, Widni EE, Haxhija EQ, Stradner M, Frohlich E, Weinberg AM. Proliferation analysis of the growth plate after diaphyseal midshaft fracture by 5'-bromo-2'-deoxy-uridine. *Virchows Arch* 2010 Jul;457(1):77-85.
- (3) Garces GL, Garcia-Castellano JM, Nogales J. Longitudinal overgrowth of bone after osteotomy in young rats: influence of bone stability. *Calcif Tissue Int* 1997 Apr;60(4):391-393.
- (4) Laer L, Herzog B. Leg length differences and rotation defects after femoral shaft fractures in childhood. Therapeutic influence and spontaneous correction. *Helv Chir Acta* 1978 May;45(1-2):17-21.
- (5) Wick M, Arens S, Muhr G, Källicke T. Wachstumsstörungen und Korrekturmechanismen des wachsenden Skeletts. *Trauma und Berufskrankheit* 2005.
- (6) Aitken AP. Overgrowth of the femoral shaft following fracture in children. *The American Journal of Surgery* 1940 7;49(1):147-148.
- (7) Clement D, Colton C. Overgrowth of the femur after fracture in childhood. An increased effect in boys. *J Bone Joint Surg Br* 1986 August 1;68-B(4):534-536.
- (8) Staheli LTMD. Femoral and Tibial Growth Following Femoral Shaft Fracture in Childhood. *Clinical Orthopaedics & Related Research* 1967(55):159-164.
- (9) Corry IS, Nicol RO. Limb length after fracture of the femoral shaft in children. *Journal of pediatric orthopedics* 1995(15(2)):217-219.
- (10) Hasler CC, von Laer L. Pathophysiologie posttraumatischer Deformitäten der unteren Extremität im Wachstumsalter. *Der Orthopäde* 2000(29):757-765.
- (11) Marzi I. *Kindertraumatologie*. . 2. ed.: Springer; 2010. p. 6-8.
- (12) Pavelka M, Roth J. *Atlas der Biologie und Pathologie von Geweben. Funktionelle Ultrastruktur* 2005.
- (13) Graumann W", " Sasse D", " Baur R", " Nitsch C. Knochenarchitektur. In: Graumann W", " Sasse D, editors. *Allgemeine Anatomie: Schattauer GmbH*; 2004.
- (14) Filler TJ", " Peuker ET", " Pera F", " Schulte E", " Fanghänel J", " Lemke C. Waldeyer, *Anatomie des Menschen, Allgemeine Anatomie*. In: Fanghänel J", " Pera F", " Anderhuber F", " Nitsch R, editors. ; 2003.

- (15) Apell H", " Stang-Voss. Allgemeine Anatomie des Bewegungsapparates. In: Apell H, editor. Funktionelle Anatomie: Grundlagen sportlicher Leistung und Bewegung. 4th ed.: Springer; 2008.
- (16) Baumhoer", " Steinbrück", " Götz. Allgemeine Histologie. Kurzlehrbuch Histologie. 2nd ed. Germany: Urban und Fischer; 2003.
- (17) Junqueira LCU, Carneiro J. Knochen. Histologie. 6th ed.: Springer; 1996.
- (18) Lüllmann-Rauch R. Binde- und Stützgewebe. Taschenlehrbuch Histologie. 2nd ed.: Thieme; 1. Auflage 2003.
- (19) H. Bertram. Untersuchungen zur Osteogenese von humanen mesenchymalen Stammzellen Technische Universität Carolo-Wilhelma zu Braunschweig; 2002.
- (20) Caplan AI. The mesengenic process. Clin Plast Surg 1994, p. 429-435.
- (21) Welsch U. Gewebe. Sobotta Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie. 2nd ed.: Urban und Fischer; 2006. p. 127-131.
- (22) Linß W, Fanghänel J. Binde- und Stützgewebe. In: deGruyter, editor. Histologie: Zytologie, allgemeine Histologie, mikroskopische Anatomie; 1998. p. 61-64.
- (23) Löffler G. Zelluläre Bestandteile des Bindegewebes; Binde- und Stützgewebe; Knochen. Basiswissen Biochemie. 6th ed.: Springer Verlag; 2005.
- (24) Adler C-. Knochen und Knochengewebe. Knochenkrankheiten. 3rd ed.: Springer; 2005. p. 2-13.
- (25) Böcker W, Denk H, Heitz PU. Knochen. Repetitorium Pathologie: Urban und Fischer; 2004. p. 362-372.
- (26) Schünke M. Knochen. Funktionelle Anatomie- Topographie und Funktion des Bewegungssystems: Georg Thieme Verlag.
- (27) Scharf HP, Rüter A. Grundprinzipien der Kinderorthopädie. In: Günther KP, editor. Orthopädie und Unfallchirurgie; Facharztwissen nach der neuen Weiterbildungsordnung: Urban und Fischer; 2009.
- (28) Rauch F. Bone growth in length and width: the Yin and Yang of bone stability. J Musculoskelet Neuronal Interact 2005 Jul-Sep;5(3):194-201.
- (29) Ballock RT, O'Keefe RJ. Physiology and pathophysiology of the growth plate. Birth Defects Res C Embryo Today 2003 May;69(2):123-143.
- (30) Forriol F, Shapiro F. Bone development: interaction of molecular components and biophysical forces. Clin Orthop Relat Res 2005 Mar;(432)(432):14-33.
- (31) Ballock RT, O'Keefe RJ. The biology of the growth plate. J Bone Joint Surg Am 2003 Apr;85-A(4):715-726.

- (32) T. Baurmann. Ultrastruktur und Biochemie der Epiphysenfuge. München: Orthopädischen Praxis in München Vorstand: Prof. Dr. med. W. Pförringer; 2007.
- (33) Wagner EF, Karsenty G. Genetic control of skeletal development. *Curr Opin Genet Dev* 2001 Oct;11(5):527-532.
- (34) van der Eerden BC, Karperien M, Wit JM. Systemic and local regulation of the growth plate. *Endocr Rev* 2003 Dec;24(6):782-801.
- (35) B. Bartel. Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität zu Köln; 2004.
- (36) Weise M, De-Levi S, Barnes KM, Gafni RI, Abad V, Baron J. Effects of estrogen on growth plate senescence and epiphyseal fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 Jun 5;98(12):6871-6876.
- (37) Souza-Offtermatt G, Staubach KH, Udolph A, Sterk P. Allgemeine Traumatologie, Frakturheilung. Intensivkurs Chirurgie. 1st ed.: Urban und Fischer; 2004.
- (38) C. Schopohl. Vergleichende Untersuchung der Frakturheilung mit minimal invasiver Fixateur intern Osteosynthese und gedeckter, unaufgebohrter Marknagelung. Eine tierexperimentelle Untersuchung an der SchafstibiaKlinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin; 2009.
- (39) Cruess RL, Dumont J. Fracture healing. *Can J Surg* 1975 Sep;18(5):403-413.
- (40) Siewert JR. Basiswissen Chirurgie. : Springer Medizin Verlag Heidelberg 2007; 2007.
- (41) Berchtold R. Verletzungen des Halte- und Bewegungsapparates. In: Bruch HP, Trentz O, editors. *Chirurgie*. 6th ed.: Urban und Fischer; 2008.
- (42) Rode HJ, Eisel D, Frost I. Apoptosis, Cell Death and Cell proliferation Manual.
- (43) M. M. Raiber. Studien über die postnatale Zellproliferation im Vorderhirn der Ratte Albert-Ludwigs-Universität Freiburg; 2002.
- (44) G. Kempermann. Aktivitätsabhängige Regulation von Neurogenese im erwachsenen Hippocampus. Berlin: Medizinische Fakultät Charité der Humboldt-Universität zu Berlin; 2001.
- (45) Definiens AG. Cellenger Developer Studio 4.0 User Guide. 2004.
- (46) Bone growth. Available at: http://training.seer.cancer.gov/module_anatomy/unit3_3_bone_growth.html. Accessed 10/2010.
- (47) Growth plate. Available at: <http://www.eurogrow.net/eug/Project+Information/Objectives>. Accessed 01/2011.
- (48) Fracture healing. Available at: http://4.bp.blogspot.com/_4ydy8JbJZXI/TCdnuMcce9I/AAAAAAAAABTE/tFVtR-VIE3s/s1600/FractureHealing.jpg. Accessed 11/2010.

(49) Strukturformeln BrdU und Thymidin. Available at: <http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/grampp-anne-2000-10-06/HTML/grampp-ch2.html>. Accessed 01/2011.