

Kathrin Brower-Rabinowitsch, geb. Leiber  
Dr. med.

## **Interaktion und Wirkung von Dexamethason, Wachstumshormon und IGF-I auf die Proliferation und die Typ 1 IGF-Rezeptorregulation von Wachstumsfugen-Chondrozyten in-vitro**

Geboren am 04.11.1970 in Marburg  
Reifeprüfung am 13.06.1990 in Marburg  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1990/91 bis SS 1997  
Physikum am 07.09.1992 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg  
Staatsexamen am 14.05.1997 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Kinderheilkunde  
Doktorvater: Prof. Dr. med. O. Mehls

Hohe Dosen von Glukokortikoiden, wie sie zur inflammatorischen und immunsuppressiven Langzeittherapie eingesetzt werden, führen bei Kindern regelmäßig zu Wachstumsstörungen. In klinischen Studien und Tierexperimenten konnte gezeigt werden, daß diese Nebenwirkung durch gleichzeitige Behandlung mit GH in supraphysiologischer Dosierung kompensiert werden kann. In der Literatur wurden mehrere Interaktionsmöglichkeiten von Kortikoiden mit der endogenen GH/IGF-I-Achse beschrieben. Bisher gab es jedoch wenig Informationen über die molekularen Mechanismen auf zellulärer Ebene. Untersucht wurden deshalb die Einflüsse und möglichen Interaktionen von Dexamethason, GH und IGF-I auf die DNA-Synthese, Proliferation, Differenzierung und IGF-Rezeptor-Expression von tibialen Wachstumsfugenchondrozyten der Ratte in-vitro.

Für die Primärkulturen wurden Wachstumsknorpelzellen der proximalen Tibia von 80g-schweren Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Das Zellwachstum wurde mit Hilfe von DNA-Synthese ( $^3\text{H}$ -Thymidineinbau), Wachstumskurven (Monolayerkulturen) und Koloniebildung (Suspensionskulturen) überprüft. Die Messung der lokalen IGF-I-Konzentration im Kulturüberstand erfolgte mit Hilfe eines hochsensitiven Radioimmunoassays. Hierbei wurden die IGF-Bindungsstellen der Bindungsproteine durch einen Überschuß von IGF-II geblockt. Mit Hilfe eines polyklonalen IGF-Antikörpers erfolgten immunhistologische Anfärbungen von IGF-I. Anhand der AP-Aktivität wurde die Differenzierung der Chondrozyten bestimmt. Die Messung des Typ I IGF-Rezeptors erfolgte mit Hilfe von Bindungsstudien (Scatchardanalyse) unter Verwendung eines radioaktiv markierten monoklonalen Antikörpers ( $\alpha\text{IR3}$ ). Mit Hilfe des gleichen Antikörpers wurde der Typ 1 IGF-Rezeptor zusätzlich immunhistologisch angefärbt.

GH führte dosisabhängig zu einer Steigerung der DNA-Synthese. Eine maximale Wirkung wurde nach 48h bei einer Konzentration von 40ng/ml erreicht. Der Effekt von IGF-I war ebenfalls dosisabhängig mit einem optimalen Effekt bei einer Konzentration von 60ng/ml.

In serumfreiem Medium führte GH [40ng/ml] innerhalb ein bis zwei Wochen zu einer signifikanten Erhöhung der Zellzahl gegenüber unbehandelten Kontrollkulturen. Der Effekt von IGF-I [60ng/ml] fiel etwas höher aus als der Effekt von GH. Die AP-Aktivität konnte durch beide Hormone erhöht werden. Wurden die Zellen beiden genannten Hormonen gleichzeitig ausgesetzt, ließ sich der Proliferationseffekt gegenüber dem Effekt durch nur eines der genannten Hormone signifikant steigern.

Durch Zusatz von GH zum serumfreien Kulturmedium kam es innerhalb von 48h zu einer Verdopplung der IGF-I-Konzentration im Medium. Dieses Ergebnis konnte durch immunhistologische Anfärbungen von IGF-I bestätigt werden. Durch Zusatz eines polyklonalen

IGF-I-Antikörpers konnte die GH-induzierte DNA-Synthese als auch die Zellproliferation (Wachstumskurve über 7 Tage) nahezu vollständig gehemmt werden.

Dexamethason führte dosisabhängig mit einer optimalen Konzentration von  $10^{-7}$ M zu einer Hemmung der DNA-Synthese ( $[^3\text{H}]$ -Thymidinassay) und der Zellproliferation (Wachstumskurve über 12 Tage). Es hatte jedoch keinen negativen Einfluß auf die Zelldifferenzierung, gemessen am Effekt auf die AP-Aktivität. Die basale IGF-I-Produktion wurde durch Dexamethason nur gering, jedoch signifikant, herabgesetzt.

Bei gleichzeitigem Zusatz von Dexamethason und GH bzw. IGF-I verminderte Dexamethason die GH- und IGF-I-induzierte DNA-Synthese und die Zellproliferation (Wachstumskurve über 14 Tage) signifikant. Der prinzipiell gleiche Effekt wurde bzgl. der Koloniebildung (Suspensionskulturen) und der AP-Aktivität gefunden. Auch die GH-stimulierte IGF-I-Produktion der Chondrozyten wurde durch Dexamethason gehemmt. Obwohl Dexamethason die basale Expression des Typ I IGF-Rezeptors nicht beeinflusste, verminderte es signifikant die IGF-I-induzierte homologe Hochregulation des Rezeptors. Die Bindungsstudien wurden durch immunhistologische Anfärbungen des IGF-Rezeptors bestätigt.

Aus den dargestellten Untersuchungen kann geschlossen werden, daß Dexamethason auf Zellebene die Wirkung von GH durch Suppression der lokalen IGF-I-Produktion und Verhinderung der Hochregulation des IGF-Rezeptors negativ beeinflusst. Umgekehrt kann aus den Ergebnissen gefolgert werden, daß die Dexamethason-induzierte Hemmung der Zellproliferation durch GH/IGF-I zumindest teilweise kompensiert werden kann.