

Aus der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
im Centrum für Muskuloskelettale Chirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss von systemisch appliziertem Wachstumshormon
auf die intramembranöse Ossifikation
bei der Distraktionsosteogenese
Eine histomorphometrische Analyse am Yucatan Minipig

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Silke Eckelt

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. H.-J. Bail

2. Priv.-Doz. Dr. med. R. Placzek

3. Prof. Dr. med. G. Zimmermann

Datum der Promotion: 08.12.2017

Meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis

Begriffserklärungen

American Society for Bone and Mineral Research (ASBMR) Nomenklatur

1	EINLEITUNG	10
1.1	Die Distraktionsosteogenese	10
1.1.1	Historisches	11
1.1.2	Grundlagen der Knochenbildung und -heilung	15
1.1.3	Histologie und Biologie der Distraktionsosteogenese	20
1.1.3.1	<i>Histologie - Historisches</i>	20
1.1.3.2	<i>Histologie und Biologie - Allgemeines</i>	21
1.1.3.3	<i>Histologie und Biologie der Distraktionsosteogenese nach Ilizarov</i>	22
1.1.3.4	<i>Histologie und Biologie der Distraktionsosteogenese nach Giebel</i>	23
1.1.3.5	<i>Histologie und Biologie der Distraktionsosteogenese nach Wiedemann</i>	23
1.1.3.6	<i>Kallusmorphologie der Distraktionsosteogenese nach Aronson</i>	25
1.1.3.7	<i>Einflüsse auf histobiologische Prozesse der Distraktionsosteogenese</i>	25
1.1.4	Distraktionsosteogenese heute	27
1.2	Das Wachstumshormon	31
1.2.1	Allgemeines	31
1.2.2	Wirkung des Wachstumshormons (GH)	32
1.2.2.1	<i>Allgemeine Wirkung</i>	32
1.2.2.2	<i>Die "Dual Effector Theory" der Wachstumshormonwirkung</i>	33
1.2.2.3	<i>Die Wirkung des Wachstumshormons (GH) auf Knorpelgewebe</i>	34
1.2.2.4	<i>Die Wirkung des Wachstumshormons (GH) auf Knochengewebe</i>	34
1.2.2.5	<i>Die Wirkung des Wachstumshormons (GH) auf die Frakturheilung</i>	36
1.2.2.6	<i>Bisherige Untersuchungen zur Rolle von Wachstumshormon (GH) und IGF I bei der Distraktionsosteogenese</i>	38

1.2.3 Histologie und Biologie der Frakturheilung unter GH-Substitution	38
1.3 Die Histomorphometrie	39
1.3.1 Entwicklung der Bildanalyse	39
1.3.1.1 Allgemeines	39
1.3.1.2 Historischer Hintergrund	40
1.3.1.3 Halbautomatische Bildanalyse am PC	41
1.3.1.4 Einflussfaktoren auf die Histomorphometrie	42
1.3.2 Histomorphometrische Nomenklatur	42
1.4 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit	43
1.4.1 Allgemeine Problematik	43
1.4.2 Theoretische Grundlagen	44
1.4.3 Ziel der Untersuchung	44
2 MATERIAL UND METHODEN	46
2.1 Material	46
2.1.1 Das Wachstumshormon	46
2.1.1.1 Präparat: Recombinant met - porcine growth hormone (met-pGH)	46
2.1.1.2 Zubereitung	46
2.1.2 Der Fixateur	46
2.1.3 Versuchstiere	47
2.1.4 Reagenzien und Pharmaka	49
2.1.4.1 Pharmaka für Anästhesie, Sedation und Analgesie	49
2.1.4.2 Pharmaka zur Antibiose	50
2.1.4.3 Port und Portpflege	50
2.1.5 Untersuchungsmaterialien, Reagenzien und Pharmaka zur histologischen Untersuchung	51
2.1.5.1 Materialien zur Erstellung und Befundung der histologischen Präparate	51
2.1.5.2 Reagenzien zur histologischen Aufarbeitung	51

2.2 Methoden	52
2.2.1 Versuchsplanung	52
2.2.1.1 <i>Zur Auswahl der Versuchsgruppen:</i>	52
2.2.1.2 <i>Berechnung und Erstellung der Wachstumshormondosis</i>	53
2.2.1.3 <i>Festlegung des Versuchsplans (Gesamtprojekt)</i>	53
2.2.1.4 <i>Antibiose und Infektionsprophylaxe</i>	54
2.2.1.5 <i>Dokumentation</i>	54
2.2.1.6 <i>Zusammenfassung</i>	55
2.2.2 Tierhaltung	55
2.2.3 Prämedikation, Anästhesie und Analgesie	56
2.2.4 Operatives Vorgehen	56
2.2.4.1 <i>Portimplantation</i>	56
2.2.4.2 <i>Tibiaosteotomie und Fixateurmontage</i>	57
2.2.5 Testphase	58
2.2.5.1 <i>Röntgen, Digiscan, Ultraschall, Blutproben, Steifigkeit in vivo</i>	58
2.2.6 Explantation und Aufbereitung	58
2.2.7 Histologische Aufarbeitung	59
2.2.7.1 <i>Die Entwässerung</i>	60
2.2.7.2 <i>Die Einbettung</i>	60
2.2.7.3 <i>Schneiden und Beschriftung</i>	61
2.2.7.4 <i>Färben</i>	62
2.2.8 Bildanalyse	65
2.2.8.1 <i>Die Nomenklatur der Histomorphometrie</i>	65
2.2.8.2 <i>Standardisierungsverfahren zur Bildanalyse</i>	65
2.2.8.3 <i>Erfasste Parameter des mineralisierten Kallus</i>	69
2.2.8.4 <i>Parameter der Kortikalis-Messungen</i>	69
2.2.9 Statistische Analyse	70
2.2.9.1 <i>Normalisierung</i>	70
2.2.9.2 <i>Statistische Tests</i>	71

3	ERGEBNISSE	72
3.1	Verlauf des Versuches	72
3.1.1	Allgemeines	72
3.1.2	Covarianten	72
3.2	Biomechanische und biochemische Ergebnisse	74
3.2.1	Biomechanische Steifigkeit in vivo und vitro	74
3.2.2	Biochemische Daten	74
3.3	Histologische Morphologie	74
3.3.1	Allgemeines	74
3.3.2	Vergleich zwischen GH und Placebo	75
3.4	Histomorphometrie	76
3.4.1	Van Kossa-Färbung	76
3.4.2	Einschlusskriterien	77
3.4.3	Histomorphometrische Ergebnisse	77
3.4.4	Ergebniszusammenfassung und Beantwortung der Fragestellung	80
4	DISKUSSION	82
4.1	Histologie der Distraktionsosteogenese unter GH-Gabe	82
4.2	Einflüsse des GH auf Histomorphologie und -metrie der Distraktionsosteogenese	84
4.3	Die Bildanalyse	90
4.4	Stärken und Schwächen der Arbeit	91
5	ZUSAMMENFASSUNG	93
6	LITERATURVERZEICHNIS	95

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AO	Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen
Ar	Area
ASBMR	American Society for Bone and Mineral Research
B	Bone
BLOOD	Blutentnahme
Cg	Cartilage
Cl	Callus
Ct	Cortical
DIGISCAN	digitalisierte Röntgenaufnahme
Dn	Density
Dr	Distraction
Ds	Distance
Fibrous Interzone	fibröse Zwischenzone
GH	growth hormone (Wachstumshormon)
IGF	insulinlike growthfactor (IGF I und IGF II)
IGFBP's	IGF-Binding-Proteins (IGF-Bindungsproteine)
L	Labeled
Md	Mineralized
met-pGH	recombinant porcine growth hormone (rekombinantes porcines Wachstumshormon)
Pm	Perimeter
RÖ	konventionelle Röntgenaufnahme
ROI	region of interest
SI	sagittal
Somatomedin C	strukturidentisch mit IGF I
SSA	sagittal section area
STH	somatotropes Hormon (Synonym für Wachstumshormon)
STIFF	Stiffness (Steifigkeitsmessung)
ULTRASOUND	Ultraschalluntersuchung
Wi	Width

BEGRIFFSERKLÄRUNGEN

Geflechtknochen Bälkchenknochen. Anatomischer Oberbegriff für Bindegewebsknochen und dem ihm in der Embryonalphase bezüglich der Struktur ähnlichen Ersatzknochen. Als perichondraler Geflechtknochen mit dichtem als enchondraler mit weitmaschigem Aufbau kollagener Fasergflechte ohne lamelläre Schichtung und charakteristischen Einschlüssen restlicher Knorpelgrundsubstanz. Ab Ende des 2. Lebensjahres erfolgt Umbau in den mechanisch stabileren → Lamellenknochen.

Lamellenknochen Bestehend aus verkalkter Grundsubstanz sowie kollagenen Fibrillen in lamellärer Schichtung. Osteone bilden das Haverssche System.

Havers-Kanal Lamelläre Schicht von Knochen um einen Gefäßkanal mit Arterie und Vene.

Osteon Aus Lamellen bestehendes Knochensäulchen um einen → Havers - Kanal

Periost Bindegewebsmembran, der Knochenoberfläche unmittelbar aufliegend. Als zell- und bindegewebsreiche Cambiumschicht Ort der Osteoblastendifferenzierung aus osteogenetischen Stammzellen (auch im → Endost). Als Faserschicht aus kollagenem Fasergeflecht mit elastischen Netzen mit mechanischen Aufgaben. Gefäßverbindungen mit dem Gefäßsystem des Knochens.

Endost dünne Schicht platter Bindegewebszellen.

Osteoid Proteoglykanhaltige Grundsubstanz von Osteoblasten gebildet. Kalksalze → Hydroxylapatit werden in Osteoid eingelagert.

Hydroxylapatit Calcium – Phosphor – Verbindung

Kortikalis Synonym für Compacta, äussere Knochenschicht bestehend aus Lamellenknochen

Regenerat Bei der Distraktionsosteogenese neu gebildeter Knochen

Konsolidierungsphase Zeit bis zur mechanische Belastbarkeit des → Regenerates

Latenzzeit Zeit zwischen Operation und Distraktionsbeginn

Distraktionsgeschwindigkeit/-rate Strecke, um die pro Zeiteinheit verlängert wird.

Distraktionsfrequenz/-rhythmus Distraktionsschritte pro Zeiteinheit

Kallostasis Kallusdistraktion

Ossifikation Knochenbildung, chondral oder membranös = desmal

Osteogenese Bildung und Entwicklung von Knochengewebe

Model-/Remodeling (englisch) Knochenerneuerungsprozess oder Umbau des Geflecht- zu Lamellenknochen durch osteoklastische bzw. osteoblastische Aktivität.

AMERICAN SOCIETY FOR BONE AND MINERAL RESEARCH (ASBMR)

NOMENKLATUR (180)

Knochen Knochenmatrix, egal ob mineralisiert oder nicht

Knochengewebe Knochen und seine Weichteilgewebe und / oder Mark

Endokortikale Oberfläche Innere Grenze der Kortex

Trabekel strukturelles Element der Spongiosa

Osteoid unmineralisierte Knochenmatrix

Osteoblast nur knochenbildende Zelle

Erosionsoberfläche resorbierte Fläche des Knochens

Mineralisierte Oberfläche Fläche, die *gerade* mineralisiert wurde

1 EINLEITUNG

1.1 Die Distractionsosteogenese

Die Distractionsosteogenese ist heute eine weitverbreitete Methode zur Behandlung ausgeprägter Knochendefekte basierend auf den entscheidenden Forschungsergebnissen *G. A. Ilizarovs* (116). Seine Erkenntnisse über die biomechanischen, biochemischen und histologischen Vorgänge während der Distractionsosteogenese und deren Umsetzung finden heute weltweit unter dem „Ilizarov-Konzept“ Anwendung (118). *Ilizarov* formulierte das Gesetz des „Tension Stress Effects“ (119, 120): „Lebendes Gewebe wird metabolisch sowohl auf biosynthetische, als auch auf proliferative Weise aktiviert, wenn es einem langsamen, stetigem Zug ausgesetzt ist, ein Phänomen, das von der Vaskularität und dem funktionellem Gebrauch abhängt.“

Der „Tension Stress Effect“ bildet somit die Grundlage der Wachstumsstimulation und Geweberegeneration. Er führt zur Aktivierung des metabolischen Umsatzes mit Zunahme der proliferativen und biosynthetischen Funktionen im Gewebe und ist von einer adäquaten Blutversorgung, dem stimulierenden Stress und funktionellem Gebrauch abhängig.

Somit versteht *Ilizarov* unter Distractionsosteogenese die Knochenneubildung zwischen vaskularisierten Knochenoberflächen, die durch gerichtete Distraction getrennt werden. Sein Konzept fordert (117):

- die Verwendung eines stabilen Fixateurs, der möglichst nur axiale Mikrobewegungen zulässt,
- die Durchführung einer Kortikotomie, bei der im Gegensatz zur Osteotomie Knochenmark und Endost geschont werden,
- die Einhaltung einer Latenzperiode (5-7 Tage),
- eine Distractionsrate von bis maximal 2 mm/Tag,
- einen Distractionsrhythmus von 4 x 0,25 mm/Tag,
- eine frühzeitige Mobilisation des Patienten, optimaler Weise unter Vollbelastung.

In der Ausheilungsphase sollte der Fixateur mindestens für die doppelte Dauer der Distractionszeit belassen werden.

Aronson et al. aus Little Rock, Arkansas, hat das Konzept verifiziert, weiterentwickelt und neue, vor allem histologisch überprüfte Grundlagen hinzugefügt (9, 11, 7, 15, 8, 14). Weltweit ist die Distractionsosteogenese Gegenstand von großem Interesse. Sie hat den Vorteil, unter kontrollierter mechanischer Distraction nur durch die Weichteilreaktion limitiert vitales Knochengewebe an der Kortikotomie-seite zu bilden. Damit können an langen Röhrenknochen Defekte von 15 cm oder mehr „ersetzt“ werden. Je jünger der Patient, umso besser das Ergebnis. *Ilizarov* setzte die Altersobergrenze für die Kallusdistraction auf 60 Jahre fest (121). Auch wenn heute noch wesentlich ältere Patienten behandelt werden konnten, geht dies mit einer in etwa doppelt so langen Ausheilungszeit einher (31). Die Indikationsstellungen lassen sich von denen zur Knochen- transplantation ableiten. So wird die Distractionsosteogenese z. B. zur Knochen- verlängerung und Defektbehandlung traumatischer, genetisch-/metabolischer oder infektiöser Genese sowie nach Knochenresektionen und zur Korrektur von Deformitäten der langen Röhrenknochen, der Gelenke, des Unterkiefers u. v. a. mehr eingesetzt (41, 108, 196, 237). Lange Behandlungszeiten bis zu mehr als einem Jahr, hohe Kosten sowie Behinderung und psychische Belastungen der Patienten durch den Fixateur externe sind nicht zu bestreitende Nachteile der *Ilizarov*-Methode. Des Weiteren können Pininfekte, Knocheninfektionen, Weichteilschwellung, Muskelkontrakturen, Gelenkluxationen, Fehlstellungen, Nerven- und Gefäßläsionen sowie Schmerzen während der langen Behandlungsdauer als Komplikationen auftreten. Als Spätkomplikationen werden Refraktur, Knochenbiegungen, Längenverlust und auch permanente Gelenkversteifung genannt (123, 176, 179, 236, 264).

Es besteht somit ein großer Bedarf, den Heilungsprozess zu beschleunigen.

1.1.1 Historisches

Erstmals wurde mit Beginn des 20. Jahrhunderts über mögliche Verfahren zur Knochenverlängerung berichtet. Davon wendeten nur wenige konstanten Zug an. Die meist radikalen Methoden wurden ohne Rücksicht auf Muskel, Gelenke, Gefäße oder Nerven durchgeführt.

1904 veröffentlichte *A. Codevilla* eine Methode zur Beinverlängerung (52). Er wies auf die Risiken einer abrupten Distraction mit großer Krafteinwirkung auf die Weichteilgewebe hin. Nervenläsionen, Muskelschäden, Krampfanfälle und anderes mehr waren die

Folgen. So entwickelte er ein Verfahren, bei dem Distractionen unter Narkose in mehreren Sitzungen mittels plötzlicher und intensiver Krafteinwirkung durchgeführt wurden. Dabei ermöglichte die direkte Kraftübertragung auf den Knochen über einen in die Ferse eingebrachten Nagel eine Verlängerung um bis zu 8 cm. *Bosworth* (39) berichtet über eine Abhandlung, die *Dr. O. Lambret*, Lille, Frankreich, 1911 niederschrieb. In dieser wurden die Grundsätze der Distraction und Transfixion erläutert, einschließlich einer Darstellung eines Zwei-Pin-Apparates zum Gebrauch bei Frakturen (185). 1916 wurde sie zusammen mit einer Illustration und Röntgenbildern von Fallbeispielen veröffentlicht. *Lambret* ist die Anerkennung für die erste wirklich durchgeführte skelettale Distraction plus Transfixion zu zollen, die jedoch lediglich bei Knochenbrüchen Anwendung fand. Die Weiterentwicklung zur Extremitätenverlängerung war nur eine Frage der Zeit. Obwohl *Paul B. Magnuson* bereits 1908 (*University of Pennsylvania Medical Bulletin* im Mai 1908) an Versuchen mit Hunden zeigte, dass Einschnitt-Distractionen bis 7,5 cm ohne Beschädigung der Weichteile möglich waren, scheiterten diese jedoch durch Auftreten schwerer Schockzustände am Menschen. Dennoch erkannte er das biologische Potential von Periost und Endost und entwickelte 1913 die „Z-geführte“ Osteotomie (151). Ebenfalls 1913 distrahierte *Ombredanne* erstmals über eine Art unilateralen Fixateur langsam bis auf 4 cm (178). Schwere Osteomyelitiden während seiner Behandlung bescherten ihm schlechte Publikationen und seine Arbeit geriet in Vergessenheit, bis sie 1918 von *Vittorio Putti* erneut aufgegriffen wurde. Er konstruierte das Osteoton, das als Prototyp des unilateralen Fixateurs gilt. Es ermöglichte eine kontinuierliche Distraction mit einer Rate von 2 - 3 mm/Tag bis zu 8 cm (191, 192). Bereits 1905 erkannte *August Bier* die Wichtigkeit des Frakturhämatoms (34). 1923 schrieb er im *Archiv für klinische Chirurgie*: „Die Knochenbildung kann vom Knochen selbst, aber auch von beliebigem Bindegewebe ausgehen, das von Reizen aller Art zur Knochenneubildung (Potenz der undifferenzierten mesenchymalen Zellen zur Osteoblastentransformation) angeregt wird.“ Er folgerte, dass eine Latenzperiode von einigen Tagen nach der Osteotomie bis zum Distractionsbeginn eingehalten werden sollte. Gleichzeitig berichtet er von sechs mittlerweile erfolgreich durchgeführten Distractionen. Dabei wurden zunächst mit einem Meißel Periost, Kortikalis und Knochenmark in einer Ebene durchtrennt und nach einer Latenzperiode von wenigen Tagen mit der Distraction begonnen (35). Trotz seiner weitreichenden Erkenntnisse hatte *Bier* das knochenbildende Potential von Periost und Endost nicht erkannt und lies diese bei seiner Methode unberücksichtigt. Er

glaubte, dass metaplastische Knochenneubildung ausschließlich vom umgebenden Weichteilmantel ausgehe, und achtete daher bei der Osteotomie auf völlige Durchtrennung aller Strukturen. Den sich neu bildenden Knochen nannte er – im Gegensatz zum Frakturkallus – aperiostalen Kallus. Der neue Knochen umbaute das zentrale Hämatom in mehreren Schichten, während die Knochenenden an der Regeneratbildung kaum beteiligt waren. Daher resultierte vermutlich die ausgeprägte Zerstörung des umliegenden Gewebes mit deren Komplikationen. 1924 entwickelte *Leroy C. Abbott* Puttis Osteotom weiter, dessen Vorteil in einer nun weitaus stabileren Konstruktion lag. Er beschrieb eine Methode zur Tibia-Verlängerung, die mit Abwandlungen zur Standardoperation in den Vereinigten Staaten wurde (1). Sie wurde im Laufe der Zeit von vielen Chirurgen modifiziert. *Bosworth* verwendete ebenfalls diese Methode. Jedoch wies er darauf hin, bis zu zehn Tage nach Osteotomie sowie bei Anzeichen eines Hämatoms oder Infektion mit der Distraction abzuwarten, um Komplikationen zu vermeiden (39). *Compere* unterteilte diese Komplikationen und deren mögliche Ursache in drei Gruppen: 1) Überdehnung; 2) gestörte Blutversorgung der Frakturrenden; 3) ungenügende Fixation (54). Der Enthusiasmus wurde schon bald durch neu auftretende Probleme gedämpft. *Sofield et al.* berichteten über massive Komplikationen im Vergleich zu anderen Behandlungsmethoden bei Längenabweichungen, z. B. der Verkürzung des gesunden Beines (231). Dennoch flammte das Interesse nach dem Zweiten Weltkrieg erneut auf. *Allan* entwickelte den 1932 von *Haboush* und *Finkelstein* stationären Distraction-Apparat weiter (2, 102). Er befürwortete eine schräge Osteotomie, bei der das Periost soweit als möglich intakt blieb, einschließlich Schonung der Weichteile. Durch langsames, schonendes Verlängern mit einer Rate von 1,6 mm am Tag erreichte er bei seinen Patienten die knöcherne Verbindung. Trotzdem kam es auch hier zu folgeschweren Komplikationen. Andere Behandlungsmethoden zum Ausgleich von Längendifferenzen entwickelten sich weiter und gelangten mehr und mehr zu Akzeptanz. Ihnen allen waren jedoch Grenzen gesetzt und die Notwendigkeit einer unkomplizierten Verlängerungstechnik wuchs. 1952 führte die *Anderson*-Technik, bestehend aus einer Kontinuitätsunterbrechung der Fibula mittels einer initialen Fibulaosteotomie, Schaffung einer soliden tibiofibularen Synostose und erst anschließender Tibiaverlängerung, zu repräsentablen Ergebnissen. Neues Knochengewebe wurde gebildet, der Knochen konsolidierte ohne Knochentransplantat (4).

Anfangs wurden diese oder ähnliche Techniken nur zur Verlängerung von verkürzten Knochen nach Osteomyelitis angewendet. Komplikationen waren hierbei weniger zu befürchten als bei der Verlängerung kongenital verkürzter Beine. Aber gerade hier bestand ein besonders großer Bedarf. Eine Verlängerung war auf längere Sicht der Verkürzung des gesunden Beines oder gar einer Amputation vorzuziehen.

Um die entstandene Distraktionslücke quasi wieder aufzufüllen, etablierten sich drei biologische Methoden. Die 1963 entwickelte *Wagner*-Technik benutzte einen monolateralen Fixateur externe. Der offenen mitdiaphysären Osteotomie mit Durchtrennung des Periosts und der umgebenen Faszien, initialen Diastasis von 0,5 cm und anschließenden Verlängerungsrate von 1,5 mm/Tag folgte später eine erneute Operation zur Einbringung eines Geflechtknochentransplantates und einer Plattenosteosynthese zur Stabilisierung (252). Die *Wasserstein*-Methode füllte die Distraktionslücke dagegen mit kortikalem Knochentransplantat. Ein modifizierter Ringfixateur mit sich kreuzenden Kirschnerdrähten diente zur Fixation. Nach einer offenen subperiostalen Osteotomie wurde über einen dünnen, flexiblen intramedullären Nagel distrahiert. Sobald die Verlängerung erreicht war, wurde über den Nagel das Transplantat eingesetzt, so dass nicht auf Knochenregeneration und Konsolidierung gewartet werden musste (254). Dagegen untersuchte *Ilizarov* die Biologie des Knochens und der Weichteilregeneration und verließ sich allein auf die Konsolidierung des unter Distraktionsosteogenese neu gebildeten Knochenregenerates, einer Knochenneubildung vom intramembranösen Typ. Er entwickelte 1951 seine Apparatur zur Extremitätenverlängerung (Abb. 1).

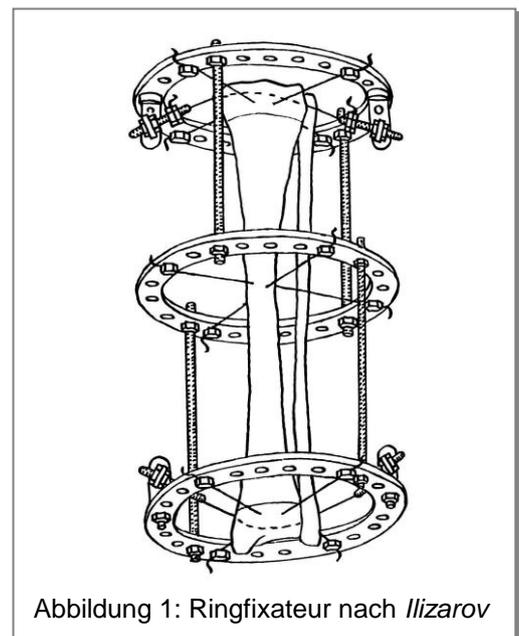


Abbildung 1: Ringfixateur nach *Ilizarov*

Nach perkutaner, subperiostaler Kortikotomie mit dem Ziel, sowohl Periost als auch Endost zu schonen, bot sein Ringfixateur, ebenfalls aus sich kreuzenden Kirschnerdrähten bestehend, den Vorteil einer gleichzeitigen Korrektur multiplanarer und multidirektionaler Deformitäten. Er zeichnete sich somit durch universelle Einsetzbarkeit sowie hervorragende Stabilisierungs- und Korrekturmöglichkeiten aus. Insbesondere gewährleistete er auch in unmittelbarer Gelenknähe eine sichere Verankerung auch kurzer

knöcherner Segmente (118). *De Bastiani et al.* haben die biologischen Grundlagen *Ilizarovs* übernommen, jedoch einen monolateralen Fixateur verwendet, der eine axiale Dynamisierung zuließ. Außerdem wurden 14 Tage Latenz bis zur maximalen Kallusbildung vor Beginn der Distraction abgewartet. Dieses Verfahren nannten sie Kallotaxis (62). *De Bastiani et al., Peltonen, De Pablos* u. v. a. forschten zudem intensiv auf dem Gebiet der Wachstumsfugendistraction (61, 60, 70, 69, 186). *Ring* entwickelte zuvor schon 1958 einen ersten intramedullären Kraftträger zur Knochenverlängerung (204).

Zusammenfassend lässt sich die Entwicklung der Extremitätenverlängerung wie folgt beschreiben:

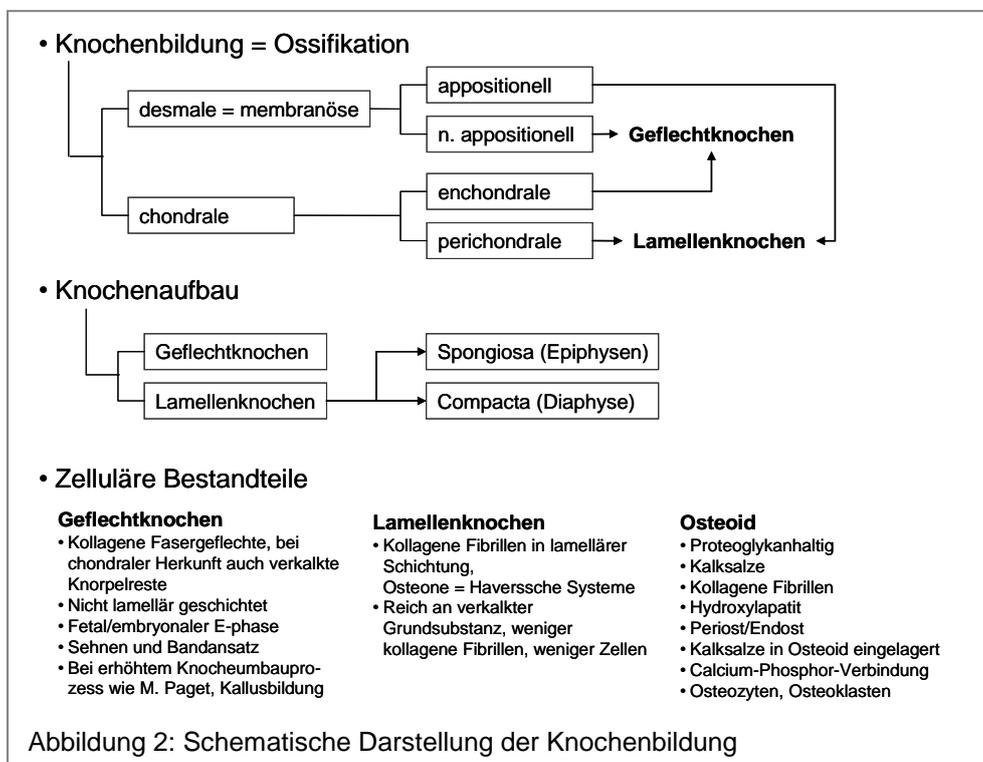
- Einschnitt- oder Mehrschritt-Distraction mit größtmöglicher Kraftübertragung auf große Distanzen (*Codevilla, Putti*)
- stufenweise Distraction nach ausgedehnter Weichteildurchtrennung mit aufwendigen, stationären Apparaten (*Abbott, Allan*)
- technische Weiterentwicklung der Distractionsvorrichtungen sowie Entwicklung biologischer Operationsverfahren (*Haboush/Finkelstein, Bosworth, Anderson*)
- Grundlagenforschung, wissenschaftliche Interpretation und praktische Anwendung nach Entwicklung eines den Anforderungen entsprechenden Apparates (*Ilizarov*)
- gleichzeitig Entwicklung anderer Methoden einschließlich biologischer Techniken (*Wagner*)
- erste Versuche mit Wachstumsfugendistractionen und Knochenverlängerung über intramedulläre Kraftträger (*DeBastiani, Ring*)
- weltweite Anwendung des Ilizarov-Konzeptes, wissenschaftliche Forschung und Entwicklung auf dem Gebiet der Distractionsosteogenese (s. u.)

1.1.2 Grundlagen der Knochenbildung und -heilung

Um die Biologie und Morphologie des Kallusgewebes während der Distraction zu verstehen, ist es wichtig, zunächst auf die Grundlagen der Knochenbildung und Knochenheilung einzugehen. Dabei ist der Frakturheilung besonderes Interesse zu zollen, um später Gemeinsamkeiten und Unterschiede aufzeigen zu können, vor allem auch im Hinblick auf die Anwendung und Wirkung von Wachstumsmediatoren.

Biologie der Knochenbildung als Grundlage zur Distraktionsosteogenese:

Man unterscheidet die chondrale von der membranösen Ossifikation (Abb. 2). Unter unterschiedlichen Bedingungen kann über jeden Weg Geflecht- oder Lamellenknochen gebildet werden. Die desmale oder auch membranöse Knochenbildung entspricht dabei dem direkten Weg, d. h. es findet kein ‚Ersatz‘ von primärem Knorpelgewebe statt. Als Beispiel ist hier der sogenannte Bindegewebsknochen zu nennen: Embryonale Mesenchymzellen werden zu Osteoblasten und bilden Interzellulärsubstanz in Bälkchenform mit anschließender Mineralisation unter Einschluss von Osteozyten. Im Gegensatz dazu wird bei der chondralen Knochenbildung das primär gebildete Knorpelregenerat/-gebilde in Knochengewebe umgewandelt. Dabei durchläuft die Ossifikation vom Perichondrium des vorgebildeten Knorpelmodells ausgehend in der Regel zwei Stufen. Zunächst als perichondrale Ossifikation mit Wachstum des Perichondriums, Umbildung von Mesenchymzellen zu Osteoblasten, Bildung von Osteoid sowie Interzellulärsubstanz und Bildung der perichondralen Knochenmanschette. Anschließend als enchondrale Ossifikation mit Eindringen von Periostbindegewebe und -gefäßen durch die Manschette in die Knorpeldiaphyse unter Zerstörung des Knorpels und Aufbau des primären Knochenmarks und primärer Bälkchen (Epiphysenfuge) (96, 141, 140).



Der Modeling/Remodeling-Prozess des Knochengewebes:

Die Um-, Auf- und Abbauvorgänge des lamellären (i. e. trabekulären, endokortikalen) Knochengewebes sind fließend. Das Gewebe steht in einem stetigen, humoral gesteuerten Anpassungsprozess an mechanischer Belastung, Alterungserscheinungen, etc. Unter anderem ist hier das *Wolff'sche Gesetz* zu erwähnen (245). Der Erforschung dieses sogenannten Erneuerungs- oder Model-Remodeling-Prozesses widmen sich zahlreiche Studien (45, 55, 59, 78, 168, 162, 183, 199). Es soll jedoch hier nicht im Einzelnen darauf eingegangen werden.

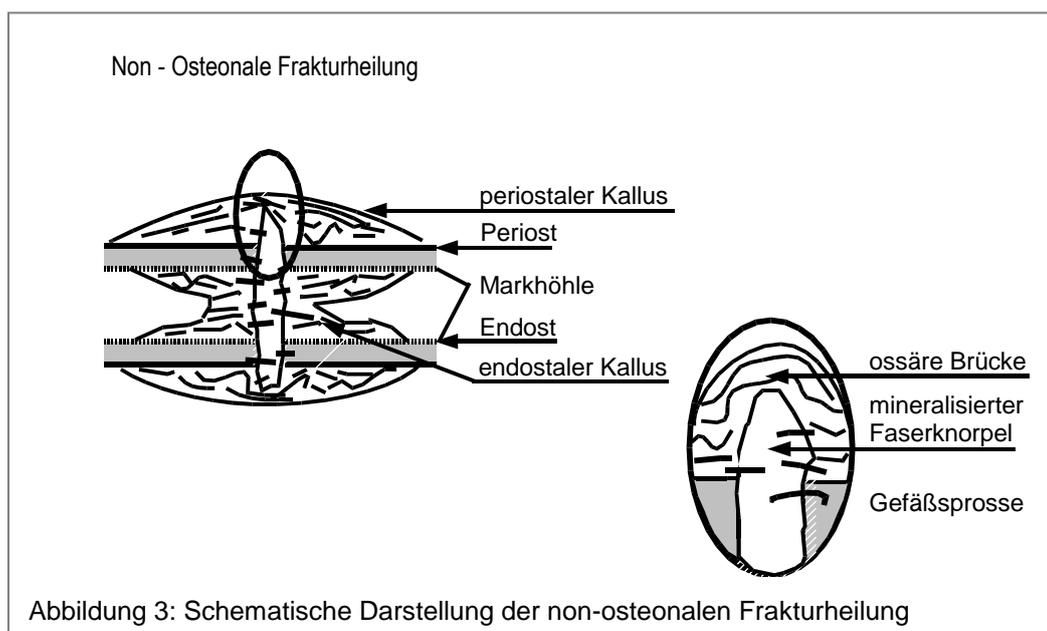
Biologie der Knochenheilung als Grundlage zur Distractionsosteogenese:

Bei einer Fraktur wird die Kontinuität der Kortikalis unterbrochen. Die Frakturzone unterteilt sich in Kontakt- und Spaltzonen. Früher wurde zwischen einer primären und sekundären Frakturheilung unterschieden. Hierbei handelt es sich um eine radiologische Klassifikation. Als primär wurde eine Frakturheilung ohne radiologisch sichtbaren Kallus bezeichnet. Entsprechend verlief eine Fraktur mit sichtbarer Kallusmanschette sekundär. Heute entspricht die primäre Heilung der sogenannten osteonalen Überbrückung, bei der sich ein sogenanntes *Havers'sches System* einem Bohrkopf gleich in die Kortikalis vorbohrt und durch streng basale Ausscheidung von Grundsubstanz lamellären Knochen bildet. Voraussetzung für diese Kontaktheilung oder *Havers'schen Umbau* der Kortikalis als Erneuerungsprozess der Osteone ist die absolute Stabilität der Frakturzone durch z. B. innere Kompression der Fragmente nach exakter anatomischer Reposition (s. u.). Der Grenzwert hierfür liegt bei 200 μm . Dagegen führen mikroskopisch erkennbare stabil fixierte Spalten zur primär angiogenen Knochenbildung. Die resultierende Knochenheilung wird als Spaltheilung bezeichnet. Nach der ursprünglichen radiologischen Klassifikation wäre diese Frakturheilung ebenfalls als primär bezeichnet worden. Sie durchläuft dabei jedoch wie die Spontanheilung einen zweiphasigen Konsolidierungsprozess über die Bildung eines faserknochigen Trabekelwerkes mit anschließendem Umbau und Auffüllen zu Lamellenknochen, und ist somit non-osteonal. Die Osteoblasten scheiden im Gegensatz zur osteonalen Überbrückung die Matrixbausteine nicht nur basal aus. Die Fibrillen setzen sich in den kollagenen Fasern des Bindegewebes fort, der Anteil eingemauerter Osteozyten ist grösser. Mit dieser Form der Trabekelbildung wird ähnlich wie bei einem Fachwerkbau mechanische Stabilität erreicht. Die Toleranzgrenze liegt bei 0,5 – 0,8 mm (217). Darüber hinaus bildet sich intermediäres Bindegewebe. Die ursprüngliche Integrität wird dann über die biologische

Stabilisierung durch eine Kallusnarbe und sekundären inneren Umbau wieder hergestellt (s. Schema Abb. 2).

Frakturheilung ohne sichtbaren Kallus und ohne Auftreten von Knorpelgewebe ist – wie schon gesagt – nur dann möglich, wenn eine sehr rigide Stabilisierung der Fraktur vorgenommen wurde. Die international anerkannte Terminologie der Arbeitsgemeinschaft für Osteosynthesefragen (AO) spricht hier dann von „absoluter Stabilität“. In der Regel werden derartige Stabilisierungen z. B. mittels Zugschrauben oder Kompressionsplatten erzielt.

Wird bei einer Fraktur keine Stabilisierung durchgeführt oder finden die Prinzipien der „relativen Stabilität“ (Definition ebenfalls durch die AO etabliert) Anwendung, bildet sich bei der Frakturheilung ein deutlich sichtbarer Kallus. Relative Stabilität wird z. B. mit intramedullären Kraftträgern und den meisten externen Fixateuren und Überbrückungsplatten erreicht. Der dann gebildete periostale Kallus dient als Ankerkallus auf der Frakturoberfläche und führt zur Vergrößerung der Querschnittsfläche. Dies wirkt sich mechanisch in einer Verlängerung des wirksamen Hebelarmes in dem zu stabilisierendem Gebiet aus. Bei gleichbleibendem Biegemoment nimmt der Bewegungsausschlag ab (216). In den meisten Fällen bildet sich peripher der Kortikalis bindegewebiger Knorpel, der ähnlich den Prozessen in der Epiphysenfuge mineralisiert und durch Geflechtknochen ersetzt wird (Abb. 3).



Bei einer Knochenverletzung wie einer Fraktur finden sich nach *Einhorn et al.* typischerweise vier unterschiedliche Formen der Gewebsreaktionen (73):

- Periostale Reaktion: Sie ist fundamental, verläuft immer gleich und ist unabhängig von äußeren Einflüssen. Sie entspricht einer rein membranösen Ossifikation in der Peripherie des Frakturspaltes.
- Weichteilreaktion: Diese erzeugt hohe Zellaktivität am Spalt und bildet als erstes stützendes Granulationsgewebe den weichen Frakturkallus. Ihr Ausmaß ist von mechanischen Faktoren abhängig. Bewegung erzeugt einen größeren Kallus und mehr Knorpelmasse mit der möglichen Entwicklung einer hypertrophen Pseudoarthrose.
- Endostale Reaktion: Sie verläuft unabhängig von mechanischen Faktoren und ersetzt das fibröse Bindegewebe.
- Kortikale Reaktion: Diese führt zur direkten osteonalen Überbrückung.

Einhorn et al. unterteilen daher die chondrale und direkte/desmale Bildung von Geflechtknochen während der spontanen Frakturheilung in insgesamt fünf Phasen und unterscheiden vier Stadien der zellulären Antwort (73):

1. Hämatom und Entzündung	I – Vaskularisierung
2. Gefäßeinsprossung und Knorpelbildung	II – Migration
3. Knorpelmineralisation	III – Proliferation
4. Knorpelauflösung und Knochenbildung	IV – Differenzierung und Matrixsynthese
5. Knochenumbau	

Der Vorteil liegt in einer raschen Bildung von Geflechtknochen mit kurzer Zeitspanne zwischen Osteoidproduktion und Mineralisation. Der mechanisch weniger belastbare Knochen muss jedoch durch den stabileren Lamellenknochen ersetzt werden.

Zusammenfassend äußert sich die Initialphase der Fraktur als Entzündungsreaktion und Konsolidierung des Frakturhämatoms, gefolgt durch die Proliferation periostaler, endostaler und Knochenmarkszellen sowie Einwanderung mesenchymaler undifferenzierter Zellen aus dem umliegenden Weichteilgewebe. Diese und ihre Vorläufer diffe-

renzieren zu Chondroblasten, Chondrozyten, Osteoblasten und Osteozyten. Der Knorpelbildung im Spalt, Kallusbildung periostal folgt ein Umbau über Geflecht- zu Lamellenknochen (89, 189, 213, 216, 245).

1.1.3 Histologie und Biologie der Distractionsosteogenese

1.1.3.1 Histologie - Historisches

Zunächst sei die Entwicklung und Problematik bei der Herstellung nichtentkalkter Knochenschnitte geschildert. Diese betrifft gleichermaßen die Untersuchung der klassischen Frakturheilung sowie die Distractionsosteogenese.

Die histologische Aufarbeitung von Knochen stellt die Wissenschaftler vor ein Problem. Knochen ist ein kalkhartes Material, dass sich nicht ohne weiteres schneiden lässt. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, besteht in der Entkalkung der Knochenmatrix. Das mit Säuren und Chelatbildnern entkalkte Material lässt sich so zwar schneiden, einer weiteren Verarbeitung durch zum Beispiel Färben werden wiederum Grenzen gesetzt (206). Eine Beurteilung des Funktionszustandes des Knochens und des umgebenen Gewebes ist durch das Fehlen der Kalksalze ebenfalls nicht mehr möglich.

Eine andere Möglichkeit bietet das Einbetten in ein geeignetes Medium, um ein Schneiden zu ermöglichen. Dieses muss in seiner Härte dem Knochen entsprechen und zusätzlich beim Einbettungsvorgang den Knochen ausreichend durchdringen.

Auf der Suche nach einem geeigneten Medium stießen *Arnold* und *Jee* 1954 auf die für die Elektronenmikroskopie entwickelten Methacrylate (Methylmethacrylat). Diese durchdrangen den unentkalkten Knochen in ausreichender Form, waren aber zunächst wegen ihrer Härte und Brüchigkeit lediglich für Knochenschliffe, nicht aber für Schnitte geeignet (6). *Boellard* und *v. Hirsch* beschrieben 1958/59 erstmals ein Verfahren zur Einbettung unentkalkter Knochen (37, 251). Sie fanden heraus, dass eine Kombination des Methylmetacrylats mit einem Weichmacher (Polyethylenglykol) ein Schneiden nach dem Aushärten ermöglichte. *Schenk* und *Burkhardt* benutzten Dibutylphtalat und/oder Plastoid-N (219).

Diese Entdeckung ermöglicht nun ein Anpassen des Mediums an das Knochenmaterial. Dennoch war und ist dieses Verfahren mit einem hohen Kostenaufwand ver-

bunden. Zum einen ist das Einbettungsmedium teuer, zum anderen ist das Schneiden trotz allen Fortschritts nur mit einem speziell entwickelten und ebenfalls teuren Hartschnittmikrotom möglich. Die Feuergefährlichkeit und Gesundheitsschädlichkeit sowie die Notwendigkeit geschulten und routinierten Personals tragen ebenfalls dazu bei, dass diese Methode der Knochenhistologie bisher auf Zentren beschränkt bleibt. Viele Versuche, durch Veränderung der unterschiedlichen Komponenten die Einbettung zu beschleunigen und zu vereinfachen, sind seitdem unternommen worden (65, 74, 77, 110, 143, 148, 222, 247). Des Weiteren bleibt das Problem der oft beobachteten Blasenbildung und der meist ungleichmäßigen und ungenügenden Durchdringung des Materials bestehen (38, 206). *Petersdorff et al.* erarbeiteten eine Arbeitsanweisung für die Methylmetacrylateinbettung, nach der gute Ergebnisse für polarisationsoptische Untersuchungen erzielt wurden (190).

Wie bereits erwähnt erfordert das Schneiden ein speziell entwickeltes Hartschnittmikrotom, welches sich durch sein besonders gehärtetes, im steilen Anstellwinkel fixiertes Messer und der ebenfalls stabilen Fixierung des Knochens sowie der langsamen Vorschubgeschwindigkeit auszeichnet und so ein optimales Schneiden ermöglicht (215).

Durch Schneiden, anschließendes Strecken und Aufkleben der Schnitte kommt es häufig zu Artefakten. Der steile Anstellwinkel führt häufig zu Bruch- und Risslinien. Trotzdem bieten die Schnitte wegen ihrer geringen Schichtdicke (bis etwa 4 µm) und ihrer Anfärbbarkeit eine optimale Beurteilung des Funktionszustandes des Knochens und der Gewebe. Der Beurteilung der Knochenarchitektur, insbesondere der Kompakta, sind jedoch nach wie vor Grenzen gesetzt. Sinnvolle Ergänzungen bleiben hier die alt hergebrachten Methoden wie das Dünnschleifen oder Sägen mit schnellrotierenden Sägen sowie natürlich die Histologie des entkalkten Knochens (71, 74, 87).

1.1.3.2 Histologie und Biologie - Allgemeines

Auf dem Gebiet der Distraktionsosteogenese wird weltweit intensive Forschung betrieben. Das Interesse gilt besonders der Weiterentwicklung und Beschleunigung der gängigen Verfahren. Dazu ist das Verständnis der Histologie und Biologie der Knochenneubildung unter Distraktion von grundlegender Bedeutung. Pionierarbeit hat hier *Garvill A. Ilizarov* geleistet. In umfangreichen tierexperimentellen Untersuchungen am Kniiekot-Institut in Kurgan/Sibirien hat er zu den wissenschaftlichen Grundlagen

beigetragen. *Ilizarov* fasste seine schon früher in mehreren Publikationen dargestellten Untersuchungen in seinem Werk von 1992 zusammen (121). Die biochemischen, elektronenmikroskopischen und zellularmorphologischen Untersuchungen waren von grundlegender Bedeutung.

1.1.3.3 Histologie und Biologie der Distractionsosteogenese nach Ilizarov

Ilizarov beschreibt die Vorgänge in der Distractionszone wie folgt (116):

Mit der *Ilizarov*-Technik kann der Chirurg eine Zone des Knochenwachstums innerhalb eines Knochens schaffen. Diese, einer Wachstumsfuge ähnliche Struktur verknöchert in proximaler und distaler Richtung von einer zentralen Wachstumszone aus. Unter optimalen Bedingungen findet die Knochenneubildung direkt aus Bindegewebe ohne einen knorpeligen Zwischenschritt statt. Dies entspricht einer intramembranösen Knochenbildung. Morphologisch zeigen sich jedoch parallele Knochensäulen und Gefäßkanäle, ähnlich der primären Ossifizierungszone der kindlichen Wachstumsfuge. Nach der Knochendurchtrennung kommt es wie bei der non-osteonalen Frakturheilung zu einer Entzündungsreaktion. Mit Distractionsbeginn erscheinen Fibroblasten-ähnliche Zellen, die in ihrer Länge parallel zum Distractionsvektor ausgerichtet sind. Elektronenmikroskopisch ähneln diese dem Kollagenblasten Typ 2, der auch während der embryonalen und fetalen Entwicklung gefunden wird. Diese Fibroblasten-ähnlichen Zellen sind metabolisch und biosynthetisch aktiv und produzieren Kollagenmoleküle. Die Kollagenfibrillen richten sich parallel zum Elongationsvektor aus, kondensieren zu Kollagenbündeln proximal und distal der Distractionslücke. Zum gleichen Zeitpunkt sprossen Kapillargefäße zwischen die Bündel ein. Mit ihnen erscheinen Osteoidproduzierende Osteoblasten, die sich entlang der Kollagenfibrillen anreihen. Elektronenmikroskopisch zeigen diese Merkmale einer hohen biosynthetischen Aktivität: große Mitochondrien mit eng gepackten Cristae und reichlich endoplasmatischem Retikulum. Selbst diese zytoplasmatischen Zellorganellen sind entlang des Tension-Stress-Vektors ausgerichtet. Mit Fortschreiten der Elongation wandelt sich neu gebildetes Osteoid in lamellären Knochen mit Osteozyten, die zum Teil in Kontakt mit den Knochenenden stehen, um. Eine zentrale, avaskuläre Zone durchsetzt die Mitte des Spaltes und beträgt durchschnittlich 2-4 mm. Während der Konsolidierungsphase ossifiziert die zentrale Wachstumszone, während sich gleichzeitig im Knochenregenerat neue Kortizes ausbilden.

1.1.3.4 Histologie und Biologie der Distraktionsosteogenese nach Giebel

In ähnlicher Form beschreibt *Giebel* den biologischen Ablauf in Form der Knochensäulchen (94):

Das initiale Frakturhämatom wird durch Fibroblastennetze durchzogen, welche Kollagen bilden und beide Knochenenden verbinden. Das entstehende Regenerat wird zeitgleich vaskularisiert. Während der Distraktion ordnen sich parallel zur Zugspannung Fibroblasten um Kapillargefäße und später auch Knochentrabekel an (1. Woche). Die schon Ende der zweiten Woche der Distraktion einsetzende Mineralisierung beginnt von den Osteotomieenden her in Form konischer, 200 µm starker Knochensäulchen (3. Woche), die ähnlich wie Stalagmiten und Stalaktiten aufeinander zuwachsen. Die zentrale, fibröse Zwischenzone (Wachstumszone) wird so komplett mineralisiert, Bindegewebe und Knochen richten sich longitudinal aus. Es findet eine direkte Knochenbildung in Form intramembranöser Osteogenese statt. Enchondrale Ossifikation findet sich nur bei mechanischen oder vaskulären Störungen. Die zentrale Wachstumszone bleibt während der Distraktion unverkalkt, hypovaskulär und in ihrem Durchmesser etwa konstant. Hier findet die Osteogenese statt. Die mineralisierten Säulen zeigen sich radiologisch in einem überwiegend streifenförmigen Kallus mit Ausrichtung parallel zur Zugrichtung. Bis tragfähiger Kallus gebildet ist, der die Entfernung des Fixateurs erlaubt, vergehen in der Regel ein bis zwei Monate Gesamtbehandlungszeit pro verlängerten Zentimeter.

1.1.3.5 Histologie und Biologie der Distraktionsosteogenese nach Wiedemann

Schematisch zusammengefasst am Beispiel einer Distraktion über 8 Wochen (257):

1. Woche: Organisationsphase

→ Latenzphase

- 1) Hämatom + fibröses Exsudat → Resorptions- und Granulationsgewebe
- 2) Verbindungsgewebe zwischen den knöchernen Enden mit zahlreichen Kapillargefäßen → Frakturkallus

→ Distraktion

- 3) Ausrichtung der Längsachse der fibroblastenähnlichen, metabolisch aktiven Osteoblasten parallel zum Distraktionsvektor →

- 4) Kondensation und Ausscheiden fibröser Matrix →
- 5) Kollagenfaserbündel mit paralleler, longitudinaler Ausrichtung →
- 6) Kollagenes, orientiertes Bindegewebe

2.-4. Woche: Phase der longitudinalen Polarisierung

- 7) zentral: 4 – 6 mm breite hypovaskuläre Zwischenzone, angrenzend: hypervaskularisiertes, dichtes, longitudinal ausgerichtetes, kollagenes Gewebe mit proliferierenden Zellen, Gefäße überbrücken ca. 3 Wochen nach Beginn den Interfragmentärspace → Schlüsselstelle für aktive Osteogenese
- 8) peripher: Osteoblasten hoher synthetischer Aktivität entlang der kollagenen Fasern → parallele Osteoidsäulen als Ausdruck der direkten Knochenbildung als primäre Mineralisationsfront an den freien Enden, als Remodeling an den Osteotomieoberflächen

→ Beendigung der Distraction

5.-8. Woche: Ossifikationsphase (post distractionem)

- 9) Verschmelzen der Mineralisationsfronten
- 10) rein intramembranöse Knochenbildung, von zentral nach peripher alle Stadien
- 11) Umbau des spongiösen Netzwerkes in longitudinal gerichteten lamellären Knochen
- 12) Resorptionsvorgänge medullär → beginnende Röhrenform
- 13) Weiterer Umbau durch Osteoklasten

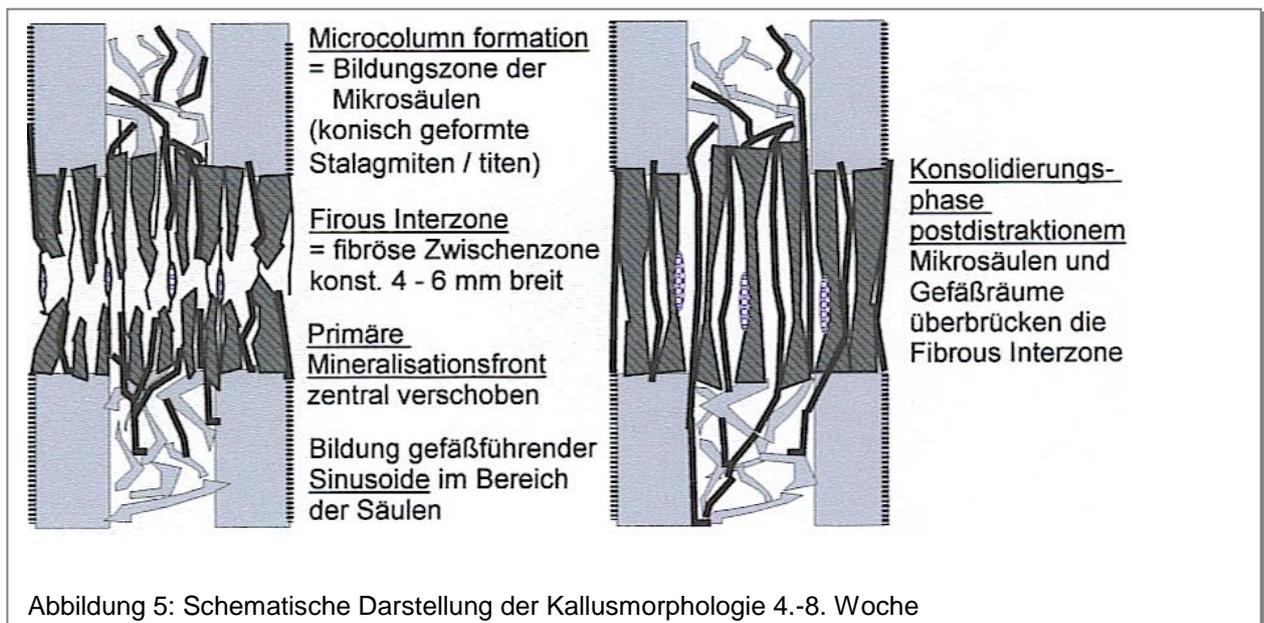
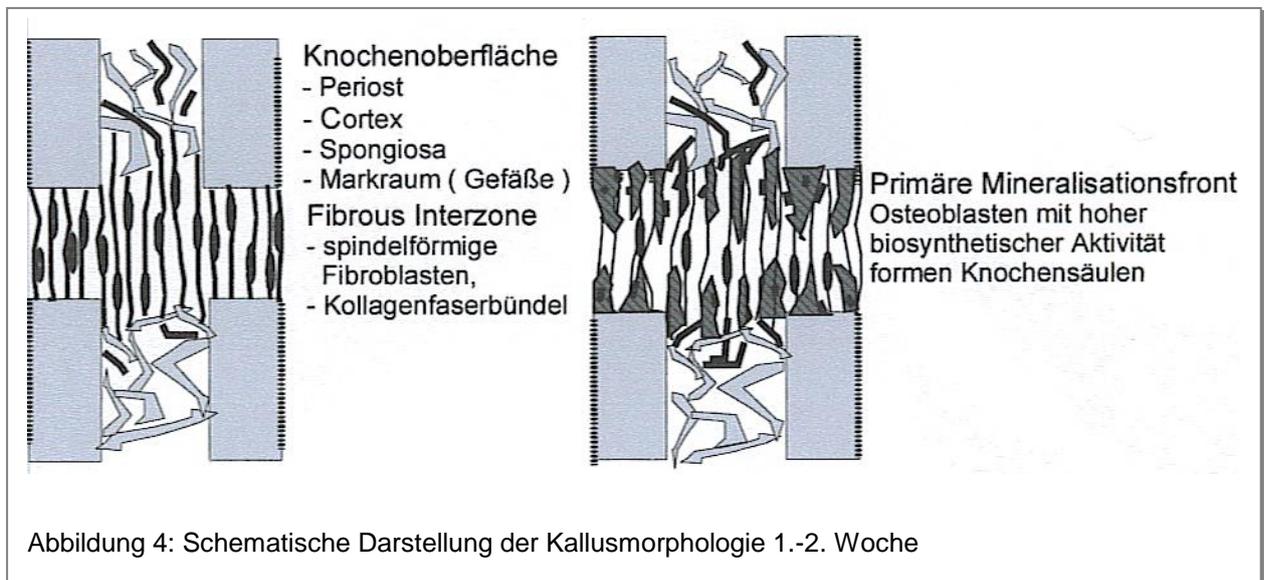
Konsolidierungsphase = Remodeling

- 14) Longitudinale Rekonstruktion → mechanisch festeres *Havers'sches System*
- 15) Bildung einer Neokortex unter Wiederherstellung einer Röhrenform

Radiologisch beschreibt er nach zwei Wochen ebenfalls longitudinal orientierte end- und periostale Kallusformationen als schwache röntgendichte Bänder an der proximalen und distalen Kortikotomieoberfläche. Zentral zeigen sich fortschreitende Fronten mit zickzackförmiger Abschlusslinie. Diese schließen ein konstant 2-6 mm messendes kallusfreies Band (Regenerationszone) ein, welches nach Abschluss der Distraction kontinuierlich ossifiziert. Das Remodeling zur geschlossenen Röhre und der Umbau zu lamellären Knochen dauert sogar noch 1 ½ Jahre nach Distractionsosteogenese an.

1.1.3.6 Kallusmorphologie der Distractionsosteogenese nach Aronson

(9, 10, 7, 15, 8, 14)



1.1.3.7 Einflüsse auf histobiologische Prozesse der Distractionsosteogenese

Iizarov untersuchte an einem caninem Tibia-Modell unter Verwendung seines externen Ringfixateurs histologische Auswirkungen auf die Knochenbildung bei unterschiedlicher Stabilität in Kombination einer zweiten Variablen (i. e. Erhalt der knöchernen Blutversorgung) (119, 120). Dabei führte zunehmende Stabilität zur direkten Knochenneubildung ohne Knorpelbildung. Bei Schonung des Periosts zeigten sich die prämaternen

Kallusgerüste mehr periostal, bei Schonung des Markraumes mehr endostal. Unter Schonung beider Systeme waren sowohl die medulläre als auch periostale Osteogenese aktiv. Ebenso untersuchte er den Einfluss von Rate und Rhythmus während der Distraction. Dabei zeigte sich bei einer Rate von 0,5 mm/Tag häufiger eine vorzeitige Konsolidierung. Umgekehrt führte eine Rate von 2,0 mm/Tag zu einer Zerstörung des periostalen Weichteilgewebes und suboptimaler Knochenbildung. Eine Rate von 1,0 mm/Tag in möglichst kleinen Inkrementen erzielte die besten Resultate, so möglich z. B. unter Verwendung seines Autodistraktors. Histologisch verglich *Ilizarov* die Vorgänge auf zellulärer Ebene mit dem Zellwachstum der Embryonal-/Fetal-/Neonatal-Zeit. Zu jedem Zeitpunkt konnte unter schlechten Distractionsbedingungen die rein intramembranöse Ossifikation gestört werden. Es entstand dann hypertrophes Knorpelgewebe mit nicht resorbierten Hämatomresten sowie vereinzelte Knorpelhaufen. Diese wurden nach vaskulärer Invasion durch Chondroklasie aufgelöst und im Sinne einer atypischen enchondralen Ossifikation zu Knochen umgebaut. *Kawamura et al.* und *Delloye* fanden ähnliche Vorgänge am Kaninchen und menschlichen Knochen (67, 66, 132). Dieser Umbauprozess verlief jedoch different zu denen in der Wachstumsfuge. Es blieben Reste von Knorpelgewebe inklusive Chondrozyten vorübergehend zwischen den frischen Knochenablagerungen liegen. *Yasui et al.* befassten sich in ihren Studien ebenfalls mit der Einflussnahme von Faktoren auf die Kallusdistraction sowie Auswirkungen der Distraction auf Knochen- und Weichteilgewebe (264, 265). Sie beschrieben sogar einen möglichen dritten Weg der Ossifikation während der Distractionsosteogenese (266): Die sogenannte transchondrale Ossifikation mit Auftreten phänotypisch ähnlicher Chondrozyten und Osteoblasten. In ihrer Theorie bilden sich aus Osteoblasten Chondrozyten. Die seien das eigentlich Charakteristische der intramembranösen Knochenbildung. Das Auftreten von Knorpelgewebe während der Distractionsosteogenese sei somit möglicherweise ein normaler Vorgang.

Zusammenfassend findet bei Distractionbeginn eine Umwandlung der reparativen Form der Frakturheilung (Osteotomie mit nachfolgender non-osteonaler Frakturheilung) in eine regenerative Form (Osteogenese i. S. einer membranösen Ossifikation) statt. Im Hinblick auf die Knochenregeneration ist die Distractionsosteogenese eine Wachstumsfuge, histologisch zeigt sich jedoch eine rein intramembranöse – oder gemäß *Yasui* transchondrale – Ossifikation (266). Lediglich dort, wo das Periost dünn aufliegt findet sich ähnlich der Wachstumsfuge appositionelles Knochenwachstum. Der üblicherweise

bei Kallusheilung auftretende Knorpel findet sich nach *Ilizarov* bei der Distraktionsosteogenese nicht. Unter suboptimalen Bedingungen wie z. B. durch Auftreten von Scherkräften, zu schneller Distraction, vaskulärem Defizit, etc. finden sich dagegen nicht resorbierte Hämatomreste und Knorpelhaufen, die durch vaskuläre Invasion aufgelöst werden (Chondroklasie). *Ilizarov* weist daher ausdrücklich auf die nötige mechanische Stabilität der Knochenenden hin. Durch stabile Fixation, Gewichtsbelastung und aktives Muskeltraining wird die lokale Blutzirkulation verbessert, die Ausheilungszeit verkürzt und einer Inaktivitätsosteoporose vorgebeugt (116, 118, 120, 117, 121).

1.1.4 Distraktionsosteogenese heute

Zahlreiche Publikationen sind zu diesem Thema in den letzten Jahren erschienen. Im Wesentlichen entsprechen die Verfahrensweisen bei Distraktionsosteogenese dem *Ilizarov-Konzept*. Material und Fixateurkonstruktionen wurden erneuert. Mit der Einführung von Titan-Pins wurde eine deutliche Reduktion der Pininfektionsrate erreicht. Zum anderen ist der Komfort für den Patienten durch die Gewichtsreduktion der leichteren Carbon-Ringsysteme gestiegen. Die komplette Transfixion durch Kirschnerdrähte wurde durch Half-Pin-Modelle (Orthofix, AO Modell) ergänzt und mit ersteren kombiniert (sog. Composite-Fixateure).

Anwendung findet die Distraktionsosteogenese in großen Bereichen der Orthopädie und Unfallchirurgie. Die Behandlung komplizierter Knochenbrüche mit ausgedehnten Knochen- und Weichteildefekten oder nach Trauma infizierter, nicht konsolidierter Brüche gestaltet sich sehr schwierig und ist mit einer hohen Komplikationsrate verbunden. Häufig muss trotz aller Bemühungen amputiert werden. Hier eröffnet die *Ilizarov-Technik* alternative Perspektiven (196). Auch in der Behandlung bestehender Skelettdeformitäten aufgrund z. B. metabolischer Knochenerkrankungen ist diese Technik von großem Vorteil. Sie ermöglicht eine Korrektur axialer Fehlstellungen oder Biegungsdeformitäten in einem Behandlungsschritt (121, 236).

Experimentell und klinisch sind die von *Ilizarov* aufgestellten Grundprinzipien im Einzelnen eingehend durch die Arbeitsgruppe um *Aronson et al.* an Hunden- und Ratten-Modellen untersucht worden (9, 10, 7, 12, 16, 13). Dabei wurde Rate, Rhythmus, Kortikotomie versus Osteotomie, Dauer der Latenzperiode, Verwendung verschiedener Fixateursysteme u. v. a. getestet.

Eine tägliche Rate von 1 mm hat sich dabei sowohl experimentell als auch klinisch etabliert. Bei schlechter Mineralisierung rät *Aronson* (9, 14) eine Verringerung auf zunächst 0,75 mm und dann auf 0,5 mm pro Tag. Umgekehrt ist bei vorschneller Konsolidierung die Rate auf 2 mm zu steigern. Der Rhythmus ist entscheidend für eine kontinuierliche Distraction und somit für eine optimale Knochenregeneratbildung und natürlich Weichteilschonung. Eine Unterteilung der Rate in viermal täglich durchgeführte Einzel-Distraktionen ist wünschenswert.

Ein gewisses Maß an axialer Mikrobewegung kann nach Untersuchungen von *Goodship* und *Kenwright* die sekundäre Frakturheilung beschleunigen. Sie scheinen im Bereich von wenigen Mikrometern zu liegen (95, 134). Die Arbeitsgruppe um *Claes* entwickelte hierzu die Möglichkeit, durch den Vergleich eines „Finite Element Modells“ mit den histologischen Ergebnissen eines Frakturmodells die knöchernen Gewebsreaktion bei unterschiedlichen mechanischen Belastungen vorauszusagen (51). Demnach wird durch lokal wirkende Kräfte die Ossifikationsform entscheidend beeinflusst. Dies entspricht dem von *Ilizarov* postulierten „Trampolin-Effekt“ durch Belastung bei physiologischem Gebrauch während der Distractionsosteogenese (118).

Die Einhaltung der Latenzperiode trägt nach weitverbreiteter Meinung entscheidend zu einer rein intramembranösen Ossifikation bei. Das so gebildete fibrovaskuläre Bindegewebe fungiert als artifizielle Wachstumszone und ist Ursprung des sich neu formierenden Knochens (31). *Aronson* hat unterschiedliche Lokalisationen der Kortikotomie bei unterschiedlicher Dauer der Latenzperiode untersucht (12). Er verglich das Heilungsverhalten von proximal metaphysärer mit middiaphysärer Lokalisation. Dabei führte die metaphysäre Distraction zu einer besseren und schnelleren Knochenbildung und Mineralisation. Erstaunlicherweise zeigte sich in beiden Gruppen bei Auslassen der Latenzperiode ein wesentlich kleinerer Heilungs-Index (Behandlungszeit/cm neu gebildeter Knochen) als bei einer Latenzzeit von 7, 14 bzw. 21 Tagen. Des Weiteren führte eine zu lange Latenz (> 14 Tage) zu einer vorzeitigen Konsolidierung. Er folgert daraus, dass die Bildung und Konsolidierung ohne Latenzperiode am effektivsten ist und so das osteogene Potential nicht behindert wird. Es ist anzunehmen, dass durch zu langes Warten Knorpelanlagen entstehen und die Knochenbildung, welche dann eine Mischung aus enchondraler und intramembranöser Ossifikation darstellt, länger dauert. Eine ausreichende Konsolidierungsperiode scheint für eine erfolgreiche Ausheilung bedeutsamer zu sein. Dennoch kommt den Verfahren ohne Markraumschonung die

Einhaltung einer Latenzperiode entgegen, um eine medulläre Revaskularisation zu gewährleisten.

Quantitative Untersuchungen zeigten einen Anstieg der Blutversorgung auf das 7-fache des Normalwertes (Gegenseite) während der Distraktionsphase, gefolgt von einem Abfall auf das 3-fache des Normalen während der Remodelingphase (16). Das bestätigt, welche wichtige Rolle dem Erhalt der Blutversorgung zukommt. Histologisch und radiologisch fand sich nach Osteotomie bzw. Kortikotomie mit bzw. ohne resorbierbarem Knochenwachs zur zeitweiligen Unterbrechung der medullären Blutversorgung im Distractionsspalt kein Unterschied bezüglich der medullären und periostalen Osteogenese bzw. der neu gebildeten Knochenmenge. *Delloye et al.* unterstreichen somit in diesem Zusammenhang die ebenfalls wichtige Rolle des Periosts (67, 66). Neben den Markraumgefäßen ist es die wichtigste Struktur, die eine ausreichende Blutversorgung und somit eine erfolgreiche Distraction gewährleistet. Der periostale Kallus versorgt die peripheren Anteile des Knochenregenerates und ist auch in der Lage, die Bildung des endostalen Kallus zu fördern. Dies führen die Autoren auf eine mögliche Revaskularisation der Medulla durch einen zentripetalen Blutfluss aus dem periostalen System und im geringeren Ausmaß durch die Proliferation neuer Gefäße aus den metaphysären Arterien zurück. Bei vollständiger Unterbrechung durch z. B. Knochenzement wird die Ausbildung eines endostalen Kallus zwar verhindert, der Erhalt der medullären Arterien ist jedoch nicht unabdingbare Voraussetzung für eine erfolgreiche Distraction.

Frierson et al. schließen daraus, dass zur erfolgreichen Distractionsosteogenese der Erhalt des Periosts wesentlich wichtiger sei als die sorgfältige Kortikotomie. Sie haben das Konsolidierungs- und Durchblutungsverhalten nach herkömmlicher Kortikotomie und anderen Osteotomieverfahren im Tierversuch an Hunden histologisch untersucht (85). Die Kortikotomie wurde dabei mit Osteotom und Hammer unter Erhalt des Markraumes durchgeführt, die Osteotomie entweder durch Setzen mehrerer Bohrlöcher und anschließender Verwendung eines Osteotoms oder mittels einer oszillierenden Säge. Radiologisch zeigte sich ein Ausbleiben der endostalen Kallusbildung und sogar verspätete Konsolidierung nach Anwendung der oszillierenden Säge. Die Durchblutung in Periostnähe nahm in dieser Gruppe sogar deutlich ab. Insgesamt jedoch kam es zu einer rapiden Neovaskularisation und Rekanalisation der Arteriolen auch nach Durchtrennen des Markraumes mittels Osteotom. Histologisch zeigten sich in den beiden ersten Gruppen unter Verwendung des Osteotoms keine signifikanten Unterschiede. In

beiden Fällen kam es zur primären membranösen Knochenheilung. Dagegen zeigten sich im histologischen Bild der letzten Gruppe nach Kortikotomie mittels oszillierender Säge Felder mit Faserknorpel und fehlende Gefäßneubildung. Die Autoren befürworten daher die weniger komplizierte transverse Osteotomie anstelle der technisch aufwendigeren Kortikotomie mit dem Osteotom.

Histologische Untersuchungen des Knochenregenerates nach Anwendung unterschiedlicher Fixateursysteme (multiplanar, full-pin *Ilizarov*-System versus uniplanar, half-pin *Wagner*-System) in einem Tierversuch an Hunden zeigten bei zwar gleichen Knochen volumina Regeneratgewebe unterschiedlicher Qualität (10). So fanden sich trotz initial paralleler Ausrichtung des half-pin Fixateurs zur Tibiaachse Winkelbildungen der kollagenen Fasern, Gefäße und zellulären Anteile sowie verspätete Ossifikation. Als mögliche Ursache sind unterschiedlich auf das Regenerat wirkende Kraftvektoren aufgrund der verschiedenen Fixateurmontagen und daraus resultierende Beeinflussung der intramembranösen Ossifikation anzunehmen.

Durch die weniger aufwendige Montage, einfache Handhabung, vielseitige Anwendbarkeit, Dynamisierungsmöglichkeit, geringe Weichteiltraumatisierung und Patientenbeeinträchtigung besitzt die unilaterale externe Stabilisierung in der klinischen Praxis dennoch einen Stellenwert (97). Ebenso wird die Distraction und der Segmenttransport über Marknägel klinisch eingesetzt (41, 129, 197). Vorteile dieses Verfahrens sind nicht nur zusätzliche Stabilität und kontrollierte anatomische Ausrichtung des Knochen transportes, sondern auch die weniger aufwendige externe Fixierung. *Brunner et al.* betonen den erheblichen Komfortgewinn für den Patienten. Ein externer Zugapparat ist nur während des Segmenttransportes, also 1/3 der notwendigen Fixierungszeit erforderlich. An Schafstibiae konnten sie nachweisen, dass trotz der durch Marknagelung verursachten intramedullären Durchblutungsstörung alle Schaftdefekte kontinuierlich knöchern und primär röhrenförmig überbrückt wurden (41). Die alternativen Verfahrensweisen zum Ringfixateur reichen vom Mono- über den Hybridfixateur über den Marknagel + Fixateur bis hin zum vollimplantierbaren, programmierbaren Verlängerungsnagel, mit ihren jeweiligen Indikationsstellungen, Vor- und Nachteilen (31). Beim Segmenttransport wird alternativ zu Halfpins und *Ilizarov*-Drähten auch die Zugseilmethode eingesetzt. Vorteile aller Zugseilsysteme sind die Vermeidung von Weichteilverziehungen, die niedrigere Pin-Infektionsrate und ein erhöhter Patientenkomfort (197, 41).

1.2 Das Wachstumshormon

1.2.1 Allgemeines

Das Verständnis der zellulären und biochemischen Prozesse des Knochenmetabolismus ist elementare Voraussetzung, anabole Substanzen auf eine mögliche Akzeleration und Verstärkung der Knochenheilung/-bildung zu testen. Hierzu sind zahlreiche Publikationen, beruhend auf experimentellen und klinischen Studien erschienen (45, 59, 79, 106, 158, 166, 165, 167, 200, 255, 256). Sie liefern fundamentale Erkenntnisse z. B. hinsichtlich Erforschung und Behandlungsmöglichkeiten der Osteoporose. So konnte z. B. durch körperliches Training oder Parathormonsubstitution eine Zunahme der Knochendichte bzw. -maße erreicht werden (48, 75, 145, 164, 173, 232). Ebenso bewirkt die Vitamin D- bzw. Fluoridsubstitution einen günstigen Einfluss auf die vertebrale Osteopenie (76, 163). Die Ergebnisse auf diesem Feld zeigen klar die hormonelle Beeinflussbarkeit des Knochens. Somit liegt die Fragestellung nahe, ob sich auch die Frakturheilung, als Ereignis der Knochenneubildung, exogen durch z. B. Applikation von Hormonen beeinflussen lässt.

Eine systemische Beeinflussbarkeit der Frakturheilung lässt sich auch aus der Beobachtung ableiten, dass Patienten mit schweren Kopfverletzungen oft eine schnellere, mit einer stärkeren Kallusbildung einhergehende Knochenheilung als Patienten ohne Kopfverletzungen zeigen (188). Einige Autoren berichten über eine ipsilateral verstärkte Knochenbildung distal einer skelettalen Verletzung, während andere sogar eine geringere mechanische Belastbarkeit beobachten (19, 135). Auch wird unter systemischer Applikation von Factor XIII eine beschleunigte Ausheilung von Frakturen beobachtet (32, 49, 50, 107).

Aus der Endokrinologie war die Wirkung des Wachstumshormons (GH) auf das Skelett seit den frühen 50iger Jahren bekannt. Der Zusammenhang zwischen dem Mangel oder Fehlen des Hormons und verzögertem Längenwachstum mit einhergehendem Minderwuchs bei Kindern bzw. umgekehrt Akromegalie bei Patienten mit wachstumshormonproduzierenden Tumoren bei vermehrtem appositionellem Wachstum führte zu einem regen Interesse der Wissenschaft (83).

Erstmals 1956 beim Menschen entdeckt, lag seine Bedeutung zunächst in der Behandlung wachstumshormondefizienter Kinder (238). Die systemische Wirkung von GH sowie seiner Mediatoren auf die unterschiedlichsten Gewebe wurde untersucht.

Neben der systemischen Beeinflussbarkeit der Knochenbildung sind in den letzten zwanzig Jahren zunehmend lokale Mediatoren in den Mittelpunkt des Interesses gerückt. So zeigte sich, dass in der Knochenmatrix zahlreiche Wachstumsfaktoren (Growth factors) vorhanden sind. Im Falle einer Verletzung/Fraktur werden diese freigesetzt (19, 115, 126, 209, 255). Sogenannte bone morphogenetic proteins (BMP's) (56, 57, 92), fibroblastic like growth factors (FGF's) (44, 125, 244, 254), transforming growth factors (TGF's) (105) und platelet-derived growth factors (PDGF's) (98, 112) scheinen die Knochenbildung zu stimulieren. Auch die Prostaglandin E₂ Substitution führt zu einer beschleunigten Heilung (133). Nachteile dieser lokal wirksamen Wachstumsfaktoren sind jedoch vor allem die schwierige Administration mit einer limitierten Aufnahme in der Frakturzone und unsichere effektive Konzentrationsspiegel bei nicht optimierter Freisetzungskinetik.

Obwohl gerade bei der Optimierung der sequentiellen und permanenten Freisetzung von Wachstumsfaktoren Fortschritte gemacht wurden, muss immer noch auf nicht-humane Kollagene zurückgegriffen werden. Ebenso muss weiterhin bei der Applikation an geschlossenen Frakturen die Frakturzone eröffnet werden. Der vorübergehend als Alternative erscheinende Weg der Applikation von Wachstumsfaktoren über virale Vektoren scheint noch weit von seiner klinischen Einsetzbarkeit entfernt zu sein. Somit ist eine Stimulation der Frakturheilung durch Hormone, insbesondere durch das Wachstumshormon (Somatotropin, Growth Hormone, GH), nach wie vor eine interessant erscheinende Option. Das seit ca. 20 Jahren gentechnisch herstellbare humane Hormon ist in seinen pharmakologischen Eckdaten durch den langjährigen Einsatz in der Ersatztherapie gut bekannt. Zunehmende Erfahrungen werden derzeit in der Anwendung an nicht defizienten Patienten in der Anti-Aging Medizin gesammelt.

1.2.2 Wirkung des Wachstumshormons (GH)

1.2.2.1 Allgemeine Wirkung

Das humane Wachstumshormon (GH, Growth factor, STH, somatotropes Hormon) wird im Hypophysenvorderlappen gebildet. Seine Ausschüttung steigt während der Kindheit

langsam an, erreicht in der Pubertät sein Maximum und fällt danach wieder ab. Die Synthese wird durch die im Hypothalamus produzierten Releasing- und Inhibiting-Hormone gesteuert. Es wirkt auf kein spezifisches Endorgan. Seine endokrine Wirkung entfaltet es über eine Stimulation der DNA-Synthese, Steigerung der Proteinproduktion sowie Erhöhung des Glucagonspiegels. In der Leber wird die Gluconeogenese gesteigert, der Glucosespiegel nimmt aufgrund seiner insulinantagonistischen Wirkung zu.

Seinen auf das Gewebe stimulatorischen, systemischen Effekt erzielt es sowohl direkt als auch indirekt durch seine beiden Mediatoren: Insulinlike Growth Factor (IGF) I und II. Speziell dem IGF I wird dieser Effekt zugeschrieben. Es wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert (81, 99) und zeigt insulinähnliche Wirkung, ohne jedoch durch Insulinantikörper blockiert zu werden (86, 201). Im Blut wird IGF I an Proteine (IGFBP's = IGF-Binding-Proteins) gebunden.

Erstmals beschrieben *Salmon und Daughaday* 1957 einen Stoff, der als Mediator des GH auf die kindlichen Knorpelzellen in der Epiphysenfuge galt, das Somatomedin C (208). Es sollte sich später zeigen, dass das von *Rinderknecht und Humbel* (203, 202) aus menschlichem Körper isolierte IGF I und das Somatomedin C strukturidentisch waren. Verschiedene in vivo- und in vitro-Studien zeigen einen anabolen aber auch katabolen Effekt von GH bzw. IGF.

1.2.2.2 Die "Dual Effector Theory" der Wachstumshormonwirkung

1985 stellte Green die sogenannte „Dual Effector Theory“ auf (99). In dieser regt GH am Beispiel der Chondrozyten der Epiphysenfuge über GH-Rezeptoren direkt die Differenzierung der Vorstufen an und erhöht gleichzeitig die Sensibilität der Zellen gegenüber IGF I. Außerdem kommt es durch GH zu einer vermehrten lokalen Freisetzung von IGF I.

Die proliferationsfördernde Wirkung des GH wird durch in vitro-Versuche mit hypophysektomierten Ratten bestätigt (146). Dabei entfaltet GH eher auf Vorläuferzellen und IGF I auf differenziertere Zellen Wirkung. In weiteren Versuchen tritt ein verspäteter Effekt des GH gegenüber IGF I ein. Eine mediatorgestützte Wirkung liegt somit nahe. So dokumentierte *Ohlson* einen nachlassenden Effekt des GH bei höherer Zelldichte, welcher durch höhere Konzentrationen im Gegensatz zu IGF nicht ausreichend zu steigern war (175).

Es zeigte sich weiterhin, dass GH allgemein nicht nur zu einer gesteigerten IGFI-Produktion in der Leber sondern auch im mesenchymalen Gewebe führt (79, 80, 244). Es hat somit einen indirekten, mediatorgesteuerten Einfluss auf mesenchymales Gewebe. *Morel* vermutet sogar einen direkten Einfluss (160).

Im Folgenden soll auf die Wirkung auf Knochen- bzw. Knorpelbildung sowie Frakturheilung eingegangen werden.

1.2.2.3 Die Wirkung des Wachstumshormons (GH) auf Knorpelgewebe

Da ein Zusammenhang zwischen GH und dem Längenwachstums des Knochens nahe liegt, konzentrierten sich die Untersuchungen auf Prozesse der kindlichen Epiphysenfuge. Zunächst wurde kein direkter mitogener Effekt des GH auf Knorpelzellen vermutet und dem IGF I der alleinige Anteil der Replikation zugeschrieben (127, 249). Bei lokaler Anwendung von GH an hypophysectomierten Ratten konnte dennoch eine anabole Wirkung nachgewiesen werden, die sich jedoch durch Somatomedin C-Antikörper antagonisieren ließ (171, 220, 243). Eine Somatomedin (IGF I)-vermittelte Wirkung liegt somit nahe. *Isaksson* beschreibt dagegen einen direkten stimulatorischen Effekt des GH's auf das Längenwachstum (124). Eine mitogene Wirkung auf hyaline Knorpel wie Nasenseptum oder Ohrmuschel scheint ebenfalls vorzuliegen (150, 249).

Zusammenfassend wirkt GH sicher proliferationsfördernd auf den epiphysären Knorpel der langen Röhrenknochen (177, 256).

1.2.2.4 Die Wirkung des Wachstumshormons (GH) auf Knochengewebe

Die Wirkungsweise des GH auf den Knochenmetabolismus ist Gegenstand vieler Studien (103, 122, 138, 175, 184, 230, 240, 263). Diese zeigen einen ähnlich mitogenen Effekt auf Knochenzellen. So fanden *Slootweg et al.* in vitro eine mitogene Wirkung auf fetale Mausosteoblasten, hier jedoch im Gegensatz zum Chondrozyten verstärkt auf ausdifferenzierte Formen (229). Später dokumentierten sie eine direkte Stimulation der DNA – Synthese fetaler Kückenosteoblasten und wies neben den IGF I und II-Rezeptoren einen high-affinity-GH-Rezeptor am Mausosteoblasten nach (226, 228, 230). Er beschrieb zudem einen autokrinen – parakrinen Effekt des IGF I (225, 227, 230). Die direkte Stimulation über GH-Rezeptoren am Osteoblasten wurde bereits erstmals 1991 von *Barnard* beschrieben. Diese fanden sich an ausdifferenzierten Osteob-

lasten in höherer Konzentration (30). Durch in vivo-Studien werden diese Ergebnisse an der fetalen Ratte bestätigt, nicht jedoch am Schwein (68, 160).

Auf der Suche nach einem ähnlichen Zusammenhang zwischen GH und IGF wie beim Knorpelgewebe, sind die Ergebnisse ebenfalls unterschiedlich. Während beim unreifen Mausosteoblasten eine GH-induzierte IGF-Sekretion zu sehen ist (225, 227, 230, 263), finden sich diese Beobachtungen beim menschlichen Osteoblasten nicht (80, 131). Dagegen ist die Wirkung von IGF I auf den Osteoblasten in vitro sowohl beim Menschen als auch bei Maus/Ratte einheitlich. Es zeigt sich eine Stimulierung der Proliferation und Differenzierung sowie der Matrixsynthese (30, 255). Die IGF I-Synthese im Osteoblasten wird zudem gesteigert und IGF-Binding-Proteine gebildet (46, 68, 225, 227).

Beim Knochenremodeling-Prozess hingegen scheint GH sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten via IGF I zu stimulieren (101, 109, 172, 234). *Yeh et al.* zeigten in einer Reihe von Versuchen an Ratten, dass die zusätzliche GH-Substitution zu einer initialen Potenzierung der Trainingseffekte auf die Knochenbildung führte und den Serumspiegel des IGF I erhöhte. Dies war jedoch nur am Röhrenknochen, nicht aber am vertebralem Knochen zu beobachten. Sie fanden eine erhöhte Osteoblastenzahl sowohl periostal als auch endostal. Dort sogar mit einer gesteigerten Aktivität, welche durch eine erhöhte Mineralappositionsrate gekennzeichnet war (267, 268). *Jorgensen* berichtete bei Ratten über eine höhere biomechanische Steifigkeit an Femur und Tibia nach Langzeitbehandlung mit biosynthetischem humanem GH (128). Beim Menschen konnte durch Messung der Knochenumbauparameter an jungen männlichen Probanden, gesunden postmenopausalen Frauen sowie Frauen mit postmenopausaler Osteoporose durch GH-Substitution eine Stimulation der Osteoblasten bei gesteigertem Knochenremodeling in allen drei Gruppen dokumentiert werden (40). Dem GH ist daher in der Therapie und Prävention der Osteoporose eine mögliche Rolle zugeschrieben worden (3). *Kassem et al.* konnten im Gegensatz zu diesen Untersuchungen keinen in vivo-Effekt auf das Skelett durch GH-Applikation nachweisen (131).

Es steht jedoch fest, dass bei der Behandlung wachstumshormondefizienter Erwachsener nach GH-Substitution eine Zunahme der Knochenmasse sowie ein Anstieg biochemischer Marker der Knochenformation bzw. -resorption stattfinden (159, 210, 211).

1.2.2.5 Die Wirkung des Wachstumshormons (GH) auf die Frakturheilung

Schon früh wurde versucht, den Heilungsprozess einer knöchernen Verletzung zu beschleunigen (72, 169, 193, 246). Das Wachstumshormon kommt hier in vielen Versuchen zum Einsatz. Jedoch sind die Ergebnisse der mit Ratten, Mäusen, Hasen und Hunden durchgeführten Studien uneinheitlich. Einige Autoren berichten über eine beschleunigte und verstärkte Kallusbildung sowie verbesserte Kallusaushärtung und biomechanische Belastbarkeit (17, 25, 28, 29, 139, 136, 137, 147, 161, 170, 224), andere über fehlenden Effekt oder sogar verzögerte Konsolidierung (47, 103, 104, 169, 174, 223, 246; Tab. 1 und 2).

Tabelle 1: Literaturübersicht über GH-Applikation während der sekundären Frakturheilung

Autor	Spezies, Anz., Sex, Alter	Fraktur-modell	GH-Art, Dosis, Applikationsfrequenz, Behandlungsdauer, Follow-up	Evaluation des Effektes unter GH-Gabe
Silberberg 1935 (224)	24 junge Mee-schweine, Sex?	Geschlossene Tibiafraktur	Rind, 1xtgl, 4 Gr., GH: 4, K: 2, ü. ges. FI-up: 6,10,14,21 T.	Qualit. Histologie Schnellere Ossifikation
Koskinen 1959 (139)	40 weibliche Ratten, Alter?	Geschlossene Tibiafraktur	Mensch, 30 tibia units, 1xtgl, 5 Gr., GH / K: 5, ü.ges. FI-up: 6,10,14,18, 22 T.	Histomorph. X-Rayplanimetrie Signif. Zunahme d. Kallusfläche
Shepanek 1953 (223)	Männl. Mäuse 4 - 6 Wo. alt	Tibiafraktur	Rind, 50 gamma 1xtgl, 4 Gr. GH / K: 10, ü.ges. FI-up: 5, 10, 15, 20 T.	Qualit.Histologie Quant. X-Ray Kein Effekt
Udupa, Gupta 1965 (246)	40 junge Ratten, Sex?	Geschlossene Humerusfraktur	Rind, 0,1mg 1 x jeden 2.Tag, 5 Gr. GH/K: 4, ü.ges. FI-up: 1,2,3,4,5 Wo.	tens.Steifigkeit - kein Effekt, qualit. Histo.- schnell.+ausgepr. Kallusbildung
Harris et al. 1975 (104)	Ausgew. weibl. Hasen, Anz.?	Offener Defekt	Art? 0,46IU1xtägl., 5 Gr., Anz?, ü.ges. FI-up: 1,2,3,4,5 Wo	max. tens. failure load, kein Effekt
Northmore-Ball 1990 (174)	65 ausgew. Ratten, Sex?	Geschlossene Femurfraktur, Marknagelung	Rind, 5mg 5xwöch. 5 Gr., Anz?, ü.ges. FI-up: 2,3,4 Wo, nur K-Gr. 5,7 Wo.	tors. Steifigkeit, moderate Stimul. nur in der frühen Phase

Anz. = Anzahl, ü.ges.FI-up = über gesamten Untersuchungszeitraum, GH = Behandlungsgruppe, K = Kontrollgruppe, Gr = Gruppe, X-Ray = Röntgen, tens = tensile, tors. = torsionale, qualit. = qualitative

Tabelle 2: Literaturübersicht über GH-Applikation während der sekundären Frakturheilung

Autor	Spezies, Anz., Sex, Alter	Frakturmodell	GH- Art, Dosis, Applikationsfrequenz, Behandlungsdauer, Follow-up	Evaluation des Effektes unter GH-Gabe
Bak et al. 1990 (27)	36 weibl. ausgew. = 3 Mon. Ratten	Geschlossene diaphys. Tibiafraktur, Marknagelung Tibiafraktur	Re-human. GH, 1mg/kg/KG 2 x tägl., 1. Gr. 20 Tage: GH: 9, K: 11, 2.Gr. 40 Tage	Mech. destruktive 3Punkt-Biegung, n. 40Tagen 400% max. Steifigk. i. Vgl zur Kontrolle
Bak et al. 1991 (25)	48 männl. alte = 2 Jahre Ratten	s. o.	Re-human. GH, 1,35 mg/kg/KG 2 x tägl., 1. Gr. 40 Tage: GH:13, K: 12, 2.Gr. 80 Tage GH: 11, K: 12, GH / K: 8,	Mech. destruktive 3Punkt-Biegung n.80Tagen 63% max.Steifigk.i.Vgl zur Kontrolle
Nielsen et al. 1991 (170)	44 weibl. ausgew. = 2 Mon. Ratten	s. o.	Re-human.GH, 1,35 mg/kg/KG 2 x tägl., a 3 Gr. GH: 32, K: 12, 1 Woche=10, 2 Wochen=10, 3 Wochen=12	Mech. destruktive 3Punkt-Biegung, signif. Anstieg in der 2. + 3. Wo
Carpenter et al. 1992 (47)	27 männl. ausgew. Hasen	Standardisierte Tibiaosteotomie	Re-human.GH, 150 µg/kg/KG 5 x wöchentl., a 3Gr. 4 Wo. GH:4, K:5, 6 Wo. GH:6, K:4 8 Wo. GH:3, K:3	Mech. destruktive 4Punkt-Biegung, quant. X-Ray, in vivo Compliance Kein Effekt

Anz. = Anzahl ü.ges.FI-up = über gesamten Untersuchungszeitraum, GH = Behandlungsgruppe K = Kontrollgruppe, Gr = Gruppe, X-Ray = Röntgen, tens = tensile, tors. = torsionale, Re-human = recombinantes, humanes GH

Unterschiedliche Versuchsdesigns ermöglichen jedoch kaum eine Vergleichbarkeit. Verschiedene Wachstumshormondosierungen mit unterschiedlicher Applikationsfrequenz und -art, abweichende Anzahl in Versuchs- und Kontrollgruppe mit nicht ausgewachsenen Tieren oder sogar unterschiedlichem Alter und Geschlecht kamen zur Anwendung. Dies sind jedoch Faktoren, die gerade bei der Anwendung von Wachstumshormon berücksichtigt werden müssen. Neuere Untersuchungen zeigen unter Verwendung allogener Wachstumshormone die Bildung von Antikörpern (58, 149, 248). Keine der Studien verwendet speziesspezifisches Wachstumshormon.

1.2.2.6 Bisherige Untersuchungen zur Rolle von Wachstumshormon (GH) und IGF I bei der Distraktionsosteogenese

Auch bei der Distraktionsosteogenese finden sich Auswirkungen auf die GH-IGF-Achse. *Schumacher et al.* konnten eine erhöhte periostale IGF I-Konzentration während Distraktion an Kaninchentibiae nachweisen (221). Systemische IGF I-Administration zeigte im Tierversuch an Ratten eine Akzeleration der Knochenbildung in einem 5 mm Defekt des Os zygomaticum (240). Unter IGF I-Infusion während der Distraktionsosteogenese konnte nach Mandibular-Distraktion an Ratten eine erhöhte Aktivität der Osteoblasten nachgewiesen werden. Zudem fand sich auch bei einer Distraktionsrate von 3 mm/d eine knöcherne Überbrückung (237). Außerdem führt die Distraktionsosteogenese zur Bildung systemischer knochenzellulärer Mitogene (114) ähnlich der Genexpression extrazellulärer Matrixproteine bei stimulierter Frakturheilung im Rattenmodell (115).

1.2.3 Histologie und Biologie der Frakturheilung unter GH-Substitution

Die Arbeitsgruppe um *Bue Bak* und *Lis Mosekilde* befasst sich ausführlich mit der Erforschung der Frakturheilung. So untersuchten sie mittels eines standardisierten Tibiafraktur-Modells an Ratten u. a. den Einfluss des Alters auf Heilungsverhalten sowie biomechanische Eigenschaften des Knochenregenerates (24, 25, 26, 27, 28, 29). Sie setzten zudem ein Wachstumshormon ein und führten eine histologische Untersuchung durch (161). Das Versuchsdesign entsprach den biomechanischen Studien, in denen eine höhere biomechanische Stabilität des gebildeten Regenerates bei jungen und älteren Ratten unter Wachstumshormonsubstitution nachgewiesen werden konnte (25, 29):

Nach exakt reproduzierbarer Tibiafraktur und anschließender Marknagelung erhielt die Hälfte der Ratten menschliches Wachstumshormon (GH) für 20 Tage, die andere Hälfte Placebo (NaCl). Jeweils am 10., 20., 30., 40., 50. und 80. Tag wurde ein Teil der Tiere getötet, histologisch aufgearbeitet und histomorphometrisch untersucht. Alle Tiere zeigten sekundäre Frakturheilung mit Ausbildung eines externen Kallus. Das Kallusgewebe bestand aus Knorpel und Bindegewebsfasern. Distal und proximal der Fragmentenden zeigte sich Geflechtknochen. In der GH-Gruppe kam es zur vermehrten Einwanderung von Zellen aus dem Knochenmark. Am 20. Tag zeigte sich ein struktureller Unterschied in Form eines aufgelockerteren Kallus bei den GH-Tieren. Bis zum

30. Tag verstärkte sich dieser Effekt. In beiden Gruppen bestand der Kallus nun vollständig aus Geflechtknochen, wobei der Kallus der GH-Tiere in Länge und Durchmesser deutlich größer war. Er bestand aus einem lockeren Netzwerk von Geflechtknochenstrahlen, das sich in der Gesamtknochenmasse aber nicht von der Kontrollgruppe unterschied. Erst nach 40 Tagen nahm auch die Gesamtknochenmenge gegenüber der Kontrollgruppe zu. Nach 80 Tagen hatten Tiere der Kontrollgruppe den externen Kallus vollständig abgebaut, während in der GH-Gruppe immer noch aufgelockerte Trabekel zu finden waren.

Zusammenfassend zeigt sich in dieser Studie eine abnormal große Kallusbildung bestehend aus Geflechtknochen nach 30 Tagen mit Zunahme der Gesamtknochenmenge nach 40 Tagen. Dies erklärt zwar die höhere biomechanische Belastbarkeit, ein qualitativ hochwertiger Kallus entsteht jedoch nicht. Auch scheint die Gabe von Wachstumshormon nicht zu einer beschleunigten Ausheilung insbesondere einer beschleunigten Mineralisierung zu führen. Im Gegenteil, der Umbau zu kortikalem Knochen erscheint sogar verzögert.

1.3 Die Histomorphometrie

1.3.1 Entwicklung der Bildanalyse

1.3.1.1 Allgemeines

Schon immer gilt das Interesse nicht nur den qualitativen Untersuchungen wie der Histologie. Mit Hilfe der Histomorphometrie wird versucht, auch quantitative Informationen hinsichtlich der Zellzahl bzw. -dichte oder Form zu bekommen, um z. B. eine Vergleichbarkeit unterschiedlicher Schnitte herzustellen. Außerdem können Flächenberechnungen bei angefärbten Arealen abgeschätzt werden. Sie liefert somit Informationen über zeitliche Zusammenhänge biohistologischer Veränderungen und ermöglicht Verlaufsbeobachtungen gleich den Jahresringen eines Baumes. Sie kann als einzige Methode erfassen, ob eine Veränderung durch Zellaktivitätsunterschiede oder durch Zellzahlvermehrung verursacht wurde.

1.3.1.2 Historischer Hintergrund

Um subjektive Eindrücke des Untersuchers zu objektivieren, wurden verschiedene Methoden entwickelt. So etablierte sich zunächst die manuelle Punkt-Auswertung nach der Methode von *Merz* und *Schenk* 1970 (157, 156). *Schenk* berichtete bereits erstmals 1967 über die Möglichkeit, Umbauvorgänge der Knochenkompakta morphometrisch zu analysieren (218, 214) und orientierte sich hierbei an der von *Rosival* dargelegten geometrischen Gesteinsanalyse zur ziffernmäßigen Feststellung des Quantitätsverhältnisses der Mineralbestandteile (207).

Diese beruht auf der Theorie, dass durch Anwendung eines Zählnetzes nach den Gesetzen der geometrischen Wahrscheinlichkeit (*Delesse*, 1847) eine dreidimensionale Struktur aus ihrem zweidimensionalen Bild hergeleitet werden kann (63). Die Wahrscheinlichkeit, eine gegebene Struktur in einer willkürlichen Ebene (Sektionseben) zu erfassen, hängt von der Bezugsebene ab. Sie ist 0, wenn diese parallel liegt, und 1, wenn sie senkrecht aufeinander stehen. Der Anteil der Punkte, der eine geometrische Struktur überdeckt, wird als Beschreibung des Volumenanteils angenommen (volumetrische Dichte einer einzelnen Struktur). So wird durch Zählnetze die Anzahl der zufälligen Schnittpunkte, die eine gegebene Musterlinie mit einer Struktur bildet, ermittelt. Nach dem Theorem von *Georg Louis Leclerc Buffon* (1777) muss die Zählung mathematisch durch Multiplikation des Wertes für die Oberflächendichte mit dem Faktor $4/\pi$ korrigiert werden (153) (Abb. 6).

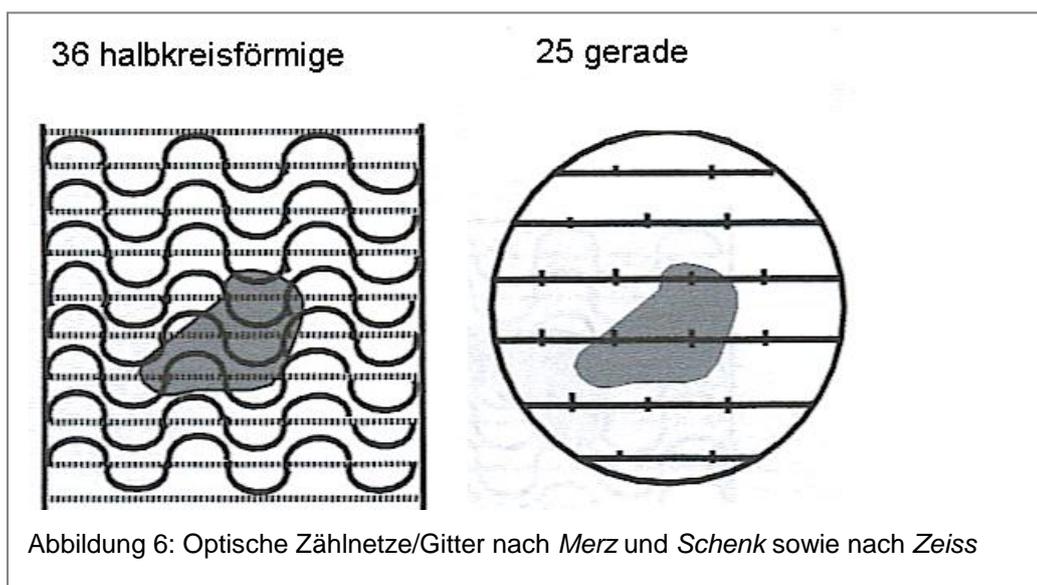
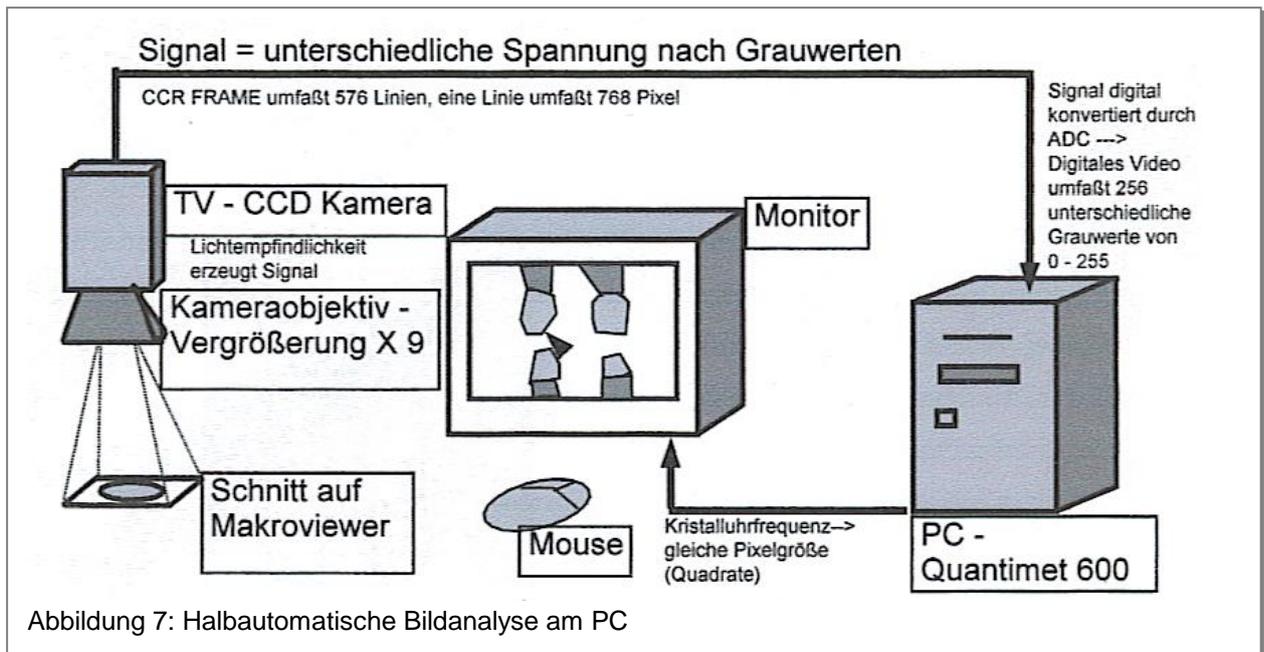


Abbildung 6: Optische Zählnetze/Gitter nach *Merz* und *Schenk* sowie nach *Zeiss*



Ein weiterer Schritt in Richtung Objektivität ist die Weiterentwicklung der zunächst semiautomatischen, computergestützten Auswertung (*Malluche et al.*, Optiplan von Zeiss (152)) zur vollautomatischen, computergestützten Bildanalyse. 1963 durch Metall Research Ltd. zunächst als QTM A (Quantitativ Television Microscope) eingeführt, wurde sie später von Leica Cambridge übernommen und fand zunächst lediglich als Qualitätskontrolle bei Stahlverunreinigungen Anwendung in der Metallurgie. Schon bald wurden dessen Vorteile auch auf dem biologischen Feld genutzt, z. B. bei der Vermessung der Lufträume der Lunge oder in der Auswertung der Silberkörnchen in Autoradiographien. Zur Bildanalyse weiterentwickelt ist sie nun in allen Bereichen anwendbar (153).

1.3.1.3 Halbautomatische Bildanalyse am PC

Ein leistungsstarkes Lichtmikroskop vergrößert das Bild, welches anschließend durch eine Digitalkamera aufgenommen und an einen Computer exportiert wird. Das so digitalisierte Bild wird durch den Untersucher mit der entsprechenden Software wie z. B. Quantimet 600 (Leica, Bensheim, Deutschland) weiterverarbeitet. Die durch die Bildanalyse erhobenen Daten können zur Weiterverarbeitung in Tabellenkalkulations- und Statistikprogramme exportiert werden (Abb. 7).

1.3.1.4 Einflussfaktoren auf die Histomorphometrie

Hauptsächlich resultieren die Aussagen zur Qualität der histomorphometrischen Messungen aus Untersuchungen der semiautomatischen Methode. Diese können jedoch prinzipiell auf die Bildanalyse übertragen werden. Es wurden Inter- und Intraobserver sowie Abweichungen bei statischen, dynamischen und zellulären Parametern erfasst (53, 64). Es zeigt sich, dass die Genauigkeit der Messungen von zwei Faktoren beeinflusst wird: (I). Von der Voreingenommenheit des Untersuchers mithin der Tendenz, den wahren Wert ermitteln zu wollen. (II). Von der Präzision, also dem Grad der Streubreite zum anderen. Werden Messungen durch unvoreingenommene oder „unvorbereitete“ Untersucher durchgeführt, ist die Streubreite groß und somit unpräzise. Umgekehrt sind Messungen präzise, ist der Untersucher voreingenommen. Folglich sind genaue Messungen unvoreingenommen aber präzise.

Es zeigt sich, dass bei Strukturparametern auch durch drei Untersucher nur geringe und bei quantitativen Parametern etwas höhere (< 10 %) Abweichungen vorliegen. Folglich werden auch bei unterschiedlichen Untersuchern histologische Merkmale des Knochens mit annähernd gleichen Ergebnissen erfasst. Vergleiche und Gegenüberstellungen können somit auch zwischen zwei Laboratorien mit einem hohen Konfidenzintervall gemacht werden. Bei Untersuchung des Areal Gesichtsfeld für Gesichtsfeld bietet die Verwendung eines Motorschlittens die größtmögliche Genauigkeit. Dieser fährt exakt die verschiedenen Gesichtsfelder ab. Um Schnitte miteinander vergleichen zu können, sind die absoluten Zahlen auf Bezugsgrößen wie z. B. der Größe des Gesichtsfeldes zu beziehen (153).

1.3.2 Histomorphometrische Nomenklatur

Die American Society of Bone and Mineral Research (ASBMR) hat ein einheitliches System der Terminologie speziell für die Knochenmorphometrie entwickelt. Es findet in der Literatur seit 1987 Anwendung, bezieht sich jedoch lediglich auf die histomorphometrische Analyse des lamellären Knochens, i. e. spongiöse und kortikale Oberfläche. (180, 181, 182). Sie ermöglicht eine einheitliche Nomenklatur in der Erforschung und Diagnose der Osteoporose und anderer Knochenerkrankungen, die mittels Knochenbiopsien (und damit einem einheitlichen Volumen) untersucht werden.

Sie erfasst statische Variablen (i. e. Fläche, Breite, Perimeter, Volumen, Dicke) oder dynamische Variablen (z. B. Fluoreszenzmarkierungen) als sogenannte Primärdaten oder Strukturparameter. Absolute Daten sind hier nur sinnvoll, wenn sie in Bezug zur gemessenen Gewebemenge gesetzt werden. Der Begriff „absolut“ wird daher nur in diesem Sinne gebraucht. Lediglich Breite oder Höhe kann ohne Bezug ausgewertet werden. Der Bezugsparameter muss genau und einheitlich festgelegt sein. Sekundär- oder abgeleitete Daten sind nur in Verbindung mit Primärdaten zu nennen. Sie geben biologisch aussagekräftigere Informationen.

In der vorliegenden Studie handelt es sich um die Analyse von Geflechtknochen. Meines Wissens liegen in der gegenwärtigen Literatur zum Zeitpunkt der Studie diesbezüglich keine festgelegten Standards vor. Es folgte daher eine aus Sicht der Untersucher bestmögliche Standardisierung (21). Statische Parameter wurden aus der Nomenklatur der ASBMR übernommen, so sie sich auf Fläche, Umfang, Länge, Breite, etc. beziehen und auf die Struktur des Geflechtknochens übertragen werden konnten. Dynamische Parameter sind auf Grund der nicht lamellären Struktur nicht definiert. Zelluläre Parameter können beim Geflechtknochen nur bedingt erfasst werden.

1.4 Fragestellungen der vorliegenden Arbeit

1.4.1 Allgemeine Problematik

Wie oben aufgezeigt, sind einer Beschleunigung der Regeneratbildung und -konsolidierung bei der Distraktionsosteogenese biologische Grenzen gesetzt (9, 10, 7, 15, 8, 14, 13, 41, 116, 118, 119, 120, 121, 264, 266). Die sehr langen Behandlungszeiten bedeuten eine große somatische und psychische Belastung für Patienten. Ebenso nehmen Komplikationen wie Pininfekte, Pinlockerungen, Gelenkkontrakturen, therapieresistente Schwellungen und auch eine zunehmende Osteoporose der fixierten Knochen im Zeitverlauf zu. Nicht zuletzt bedeutet eine lange und komplikationsbehaftete Behandlung eine erhebliche ökonomische Belastung unseres Gesundheitssystems.

Der Versuch, diese Grenzen auf medikamentöse Weise zu verschieben, liegt somit nahe.

1.4.2 Theoretische Grundlagen

Gestützt durch mehrere Studien zur Frakturheilung unter GH-Applikation (25, 28, 29, 139, 136, 137, 161, 170, 224) sowie die Erkenntnisse der Wirkung von GH auf die Epiphysenfugen (124, 171, 177, 243, 256) und die Überlegung, durch Distractionsosteogenese ein Längenwachstum ähnlich der kindlichen Wachstumsfuge zu erzeugen, kommt Wachstumshormon als Wirksubstanz in Frage. Zudem ist die systemische Applizierbarkeit bei der großvolumigen Form des Regenerates insbesondere bei Segmenttransporten (mit teilweise mehr als 20 cm Länge) sehr attraktiv, da eine räumlich eng begrenzte Mineralisation, anders als bei der Frakturheilung, keine Erfolgsaussichten böte.

Wir suchten nach einem geeigneten Tiermodell. In den bisher genannten Studien zur Erforschung der Distractionsosteogenese werden die unterschiedlichsten Tiermodelle verwendet. So kommen Hunde, Schafe (*Ilizarov, Frierson, Aronson, Delloye, Windhager*), Kaninchen/Hasen und Ratten (*Windhager, Yasui, Stewart*) zum Einsatz. In den meisten Fällen wird jedoch ein Nagetiermodell bevorzugt.

In der humanmedizinischen osteologischen Grundlagenforschung wird das Schwein seit 1993 nach den Untersuchungen von *Hönig* als aussagekräftiges Tiermodell verwendet (113). *Mosekilde et al.* setzen seitdem ebenfalls in der Erforschung der Osteoporose Minischweine erfolgreich als Tiermodell ein (166, 165). Für die Untersuchung der Distractionsosteogenese sind die Yucatan Minischweine besonders geeignet, da ihre langen Extremitäten die Montage eines Fixateurs ermöglichen.

Die Firma Novo Nordisk® (Gentoft, Dänemark) stellt rekombinantes porcines Wachstumshormon her und führt schon seit längerer Zeit Versuche an Minischweinen durch. Es erscheint sinnvoll, angesichts der Datenlage, speziesspezifisches Wachstumshormon zu verwenden (s. o.).

1.4.3 Ziel der Untersuchung

Die histologische und histomorphometrische Analyse des Knochenregenerates im Rahmen der Distractionsosteogenese ist Gegenstand der vorliegenden Studie. Der Inhalt ist Teil eines tierexperimentellen Gesamtprojektes. Dieses befasst sich mit der Erfassung der Effekte von rekombinantem Wachstumshormon auf die Kallusbildung während der Distractionsosteogenese am Minischwein. Es bezieht in vivo erfassbare

Parameter sowie Auswirkungen auf Steifigkeit und Morphologie des Kallussubstrates ein. Das Projekt stellt ebenso die verschiedenen endokrinologischen und morphologischen Veränderungen unter Wachstumshormongabe dar. Ziel ist, eine mögliche Akzeleration der Heilungsphase zu dokumentieren. Dazu werden biomechanische Parameter sowohl in vivo als auch in vitro gemessen sowie Röntgen-, CT-, Digiscan- und Ultraschalluntersuchungen durchgeführt. Außerdem werden knochenspezifische Serumparameter in den einzelnen Heilungsphasen bestimmt. Die histologischen und histomorphometrischen Untersuchungen sollen Aufschluss über Zusammensetzung und Mikrostruktur des Kallussubstrates liefern.

Dazu ist eine geeignete standardisierte Messmethode zur Erfassung des mineralisierten Kallusanteils im Regenerat (Mineralisationsgrad) mittels der halbautomatischen Bildanalyse am PC entwickelt worden (21).

Jeweils im Vergleich Wachstumshormon-Gruppe versus Placebo-Gruppe sollen folgende Fragen beantwortet werden (21):

1. Stimuliert GH die Bildung von mineralisiertem Kallus (hard callus)?
2. Stimuliert GH die Bildung von Knorpel?
3. Wie ist die Auswirkung von GH auf die Kallusstruktur?
4. Gibt es eine Korrelation mit der in vitro erfassten biomechanischen Steifigkeit?
5. Stimuliert GH die Knochenresorption?

Diese Fragen sollen durch die Erfassung der folgenden Parameter beantwortet werden:

1. Kallusfläche in mm²
2. Fläche des mineralisierten Kallusgewebes in mm²
3. Umfang des mineralisierten Kallusgewebes in mm
4. Knochendichte im Kallus in %
5. Knochendichte der kortikalen Knochenenden in %

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Das Wachstumshormon

2.1.1.1 Präparat: Recombinant met - porcine growth hormone (met-pGH¹)

Das recombinante met-porcine Wachstumshormon wird von der Fa. Novo Nordisk® (Gentofte, Dänemark) als Trockensubstanz produziert (Molekulargewicht 21, 86 kD). Es wird in Ampullen á 100 mg Trockenpulver bei -20°C aufbewahrt und kommt nach Qualitätskontrolle und Zubereitung zur Anwendung.

2.1.1.2 Zubereitung

Nach Aufbereitung mit Aqua destilata wird das gelöste met-pGH mit einer Konzentration von 8 mg/ml anschließend durch Sterilfilter unter sterilen Kautelen in Gefäße pipettiert, auf Tuberkulinspritzen aufgezogen und wiederum bei -20 °C aufbewahrt. Für jedes Tier werden alle Tagesdosen durchnummeriert und beschriftet.

Zur Kontrolle der korrekten Erstellung der met-pGH Lösung werden regelmäßig Stichproben durch Novo Nordisk® untersucht.

2.1.2 Der Fixateur

Hierbei handelt es sich um eine Spezialanfertigung aus den Forschungswerkstätten der Charité Campus Virchow Klinikum (s. Abb. 8). Der Halbringfixateur besteht aus einem Carbonhalbring und einem in sich torsionsfähigen Halbring aus Aluminium sowie Kunststoff und Teflon. Die Halbringe sind durch drei Gewindestangen á 100 mm verbunden und mit jeweils zwei Schanzschrauben im Knochen verankert. Über

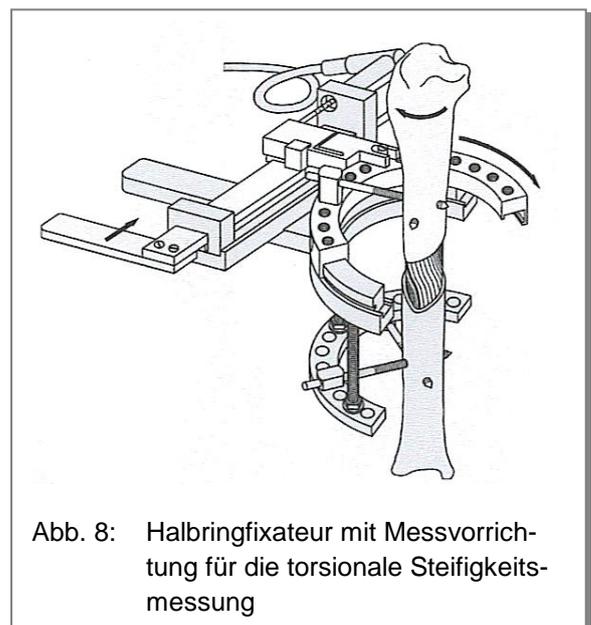


Abb. 8: Halbringfixateur mit Messvorrichtung für die torsionale Steifigkeitsmessung

¹Hersteller: Novo Nordisk A/S, Dänemark, Vertrieb: GroPep, Australia

Flügelmuttern an den Gewindestangen ist eine manuelle Distraction möglich. Dabei entspricht eine Umdrehung einer Rate von einem Millimeter.

Zum Schutz gegen Eigen- und Fremdverletzung wird eine Schutzkappe montiert.

2.1.3 Versuchstiere

Alle durchgeführten Verfahren werden mit Erlaubnis der Tierschutzbehörde und unter Aufsicht des Tierschutzbeauftragten durchgeführt (Aktenzeichen G0351/95 „Distractionosteoneogenese“).

Als Versuchstiere werden zunächst 20 ausgewachsene weibliche, geschlechtsreife Minischweinen der Züchtung Micropig® Yucatan mit einem Durchschnittsalter von 72 Wochen und einem Durchschnittsgewicht von 30 kg verwendet. Die Zucht erfolgt mit dem genetischen Status als F2-Hybriden in den Charles River Laboratorien, Paris/Frankreich. Die 20 Tiere werden randomisiert aus den 30 Tieren ausgewählt, die in der biomechanischen Studie zu möglichen Veränderungen der biomechanischen Parameter unter r-pGH-Gabe untersucht wurden.

Das Yucatan Micropig® hat bei einem kleinen Körperbau vergleichsweise lange Extremitäten, so dass es sich für eine Distraction mittels Fixateur externe besonders gut eignet.

Die Verwendung von Schweinen ermöglicht zudem die Applikation des speziesspezifischen, rekombinanten Wachstumshormons (r-pGH).

Vor Beginn dieser Studie wird die individuelle Basalrate der GH-Produktion eines jeden Tieres durch Abnahme von Serumproben in 15 minütigen Intervallen über sechs Stunden bestimmt. Das Areal unter der Serumspiegelkurve in Abhängigkeit von der Zeit wird genutzt, um die Tiere einzustufen und gleichmäßig auf GH- und Kontroll-Gruppe (GH = 10, Placebo = 10) zu verteilen.

Insgesamt werden jedoch nur 17 Minischweine in die histomorphometrische Auswertung eingeschlossen. (Tab. 3 u. Tab. 4 [Anm.: nur ausgewertete Tiere aufgeführt])

Tabelle 3: Tierdaten der GH-Gruppe (n = 8, Sex = weiblich)

Tiernummer	Alter in Wochen	Gewicht in kg	Basal GH Median in ng/ml	Basal GH Integral	Basal GH Durchschn.
5		27,2	17,1	6870,75	19
7		29,0	7,9	2838,5	8,12
11		30,5	1,6	723,0	1,985
12		27,5	2,6	976,0	2,673
16		40,0	1,7	1978,5	5,524
18		27,5	14,5	5444,25	14,78
23		34,5	3,5	1715,25	4,82
33		43,0	2,8	1341,0	3,672
Mean	81	32,4	6,5	2735,9	7,572
Range	60-116	27,5-43,0	1,6-17,1	723-6870,75	1,985-19

Tabelle 4: Tierdaten der Kontrollgruppe (PLA-Gruppe, n = 9, Sex = weiblich)

Tiernummer	Alter in Wochen	Gewicht in kg	Basal GH Median in ng/ml	Basal GH Integral	Basal GH Durchschn.
8		27,0	0,7	243,75	0,7
9		29,0	3,8	1492,5	4,13
10		24,3	0,6	1407,0	3,572
20		30,0	7,2	2853,0	7,983
21		27,0	1,1	1071,0	2,952
22		31,0	0,6	9902,25	1,683
24		50,2	1,9	1656,0	3,456
25		35,0	2,5	1171,5	3,388
31		32,0	0,9	1169,25	3,144
Mean	72	31,7	2,1	2329,9	3,4
Range	54-109	24,3–50,2	0,6–7,2	243,75– 9902,25	0,7–7,983

2.1.4 Reagenzien und Pharmaka

2.1.4.1 Pharmaka für Anästhesie, Sedation und Analgesie

Prämedikation:

Domitor®² = Medetomidinhydrochlorid, α_2 Agonist zur Sedierung
Antisedan®³ = Atipamezolhydrochlorid, α_2 Antagonist zur Antagonisierung
Atropinsulfat®⁴ = Atropin

Sedation:

Domitor®⁵ = Medetomidinhydrochlorid, α_2 Agonist zur Sedierung
Trapanal®⁶ = Thiopental

Narkose:

Trapanal®⁷ = Thiopental zur Einleitung
Pancuronium Curamed®⁸ = Pancuroniumbromid
Fentanyl-Janssen™⁹ = Fentanyldihydrogenacetat

Analgesie:

Finadyne®¹⁰ = Flunixin-Meglumin
Novalgin®¹¹ = Metamizol

Die Durchführung der einzelnen Untersuchungen sind dem Teil Methoden zu entnehmen.

²Orion Corporation, FARMOS, Finland, Vertrieb:SmithKline Beecham Tiergesundheit GmbH, Deutschland

³Orion Corporation, FARMOS, Finland, Vertrieb:RichterPharma GsmbH&CoKG,Wels, Deutschland

⁴B. Braun Melsungen AG, Deutschland

⁵Orion Corporation, FARMOS, Finland, Vertrieb:SmithKline Beecham Tiergesundheit GmbH, Deutschland

⁶BYK Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH, Konstanz, Deutschland

⁷BYK Gulden Lomberg Chemische Fabrik GmbH, Konstanz, Deutschland

⁸CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland

⁹Firma Janssen, Frankfurt a.M., Deutschland

¹⁰Bayer AG,Leverkusen, Deutschland

¹¹Bayer AG,Leverkusen, Deutschland

2.1.4.2 Pharmaka zur Antibiose

Zur Antibiose werden folgende Pharmaka verwendet:

Perioperativ:

Augmentan®¹² = Amoxicillin + Clavulansäure

Prophylaxe:

Tardomyocel®¹³ = Benzylpenicillin-Benzathin/Procain

Baytril®¹⁴ = Enrofloxacin

Ciprobay®¹⁵ = Ciprofloxacin

Paraxin®¹⁶ pro injectione = Chloramphenicol

Spicef®¹⁷ = Cefotiam

2.1.4.3 Port und Portpflege

Zur Erleichterung der Blutentnahme sowie zur Applikation der Medikamente wird den Tieren ein Portsystem implantiert. Eine ausreichende Pflege, d. h. regelmäßiges Durchspülen sowie Setzen eines Heparinblocks nach jedem Gebrauch, ist erforderlich. Bei eventuellen Thrombosierungen wird einmalig ein Lyse-Versuch mit Urokinase unternommen. Es werden folgende Systeme verwendet:

Portsysteme: Intraport II®¹⁸ sowie GPV-AC®¹⁹

Pflege: Heparin²⁰ 100 I. E. sowie Actosolv®²¹ = Urokinase

¹²SmithKline Beecham Pharma GmbH, München, Deutschland

¹³Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

¹⁴ Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

¹⁵ Bayer AG, Leverkusen, Deutschland

¹⁶Boeringer Mannheim, München, Deutschland

¹⁷Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland

¹⁸Firma Fresenius, Bad Homburg, Deutschland

¹⁹Firma Access Technologies, Skokie, USA

²⁰ B. Braun Melsungen AG, Deutschland

²¹Behringwerke AG, Marburg, Deutschland

2.1.5 Untersuchungsmaterialien, Reagenzien und Pharmaka zur histologischen Untersuchung

2.1.5.1 Materialien zur Erstellung und Befundung der histologischen Präparate

Die Präparatblöcke werden auf dem Hartschnittmikrotom Polycut S®²² geschnitten, welches mit einem Spezialmesser aus Hartmetall (40°) für Hartgewebe ausgerüstet ist. Der Messerwinkel beträgt 0 - 1°.

Zur leichteren Verarbeitung der zahlreichen Proben wird ein Entwässerungs- und Infiltrationssystem²³ verwendet. Dazu werden 40-,70-,80-,96-,100-prozentige Alkohole benötigt.

Die histomorphometrischen Analysen werden mit dem digitalen Bildanalyse-System Quantimet 600®²⁴ durchgeführt. Dabei wird eine digitale Videokamera 3CCD vom Typ MC 3254 von Sony®²⁵ verwendet, die direkt in den Strahlengang eines Leica DMRB Lichtmikroskopes²⁶ montiert ist. Die digitalisierten Bilder werden an einen PC exportiert und dort verarbeitet. Die Software QWin läuft unter Microsoft Windows-Oberfläche und ermöglicht z. B. bei entsprechenden Farbunterschieden im angefärbten Schnitt durch Detektion einer bestimmten Farbintensität die automatische Berechnung der Fläche des detektierten Areals in mm² nach entsprechender Kalibrierung.

2.1.5.2 Reagenzien zur histologischen Aufarbeitung

Die Aufbewahrung der Präparate stellt eine besondere Anforderung an die Fixationslösung. Sie darf den Knochen weder entkalken noch Sequenzmarkierungen auswaschen, und muss zudem eine lange Aufbewahrung ermöglichen. 100-prozentiges Ethanol wäre zwar in diesem Sinne am besten geeignet, die Aufbewahrungszeit beträgt jedoch nur wenige Tage bis Wochen. Reines, ungepuffertes Formalin dagegen ermöglicht zwar eine lange Aufbewahrungszeit, wäscht jedoch wiederum Markierungen aus und ent-

²²Fa. Leica Cambridge Instr., England

²³Exakt Apparatebau Norderstedt, Deutschland

²⁴Fa. Leica Cambridge Instr., England

²⁵Sony Deutschland GmbH, Berlin

²⁶Fa. Leica Bensheim, Deutschland

kalkt. So wird heute zur Fixierung der gewonnenen Präparate eine gepufferte Alkohol-Formalin-Lösung mit Glukose nach *Vitali* verwendet (42, 250).

1 Liter Lösung enthält:

- 324 ml 36-%iges Formalin
- 540 ml Äthanol
- 130 ml Barbitol-Natrium-Puffer (pH 7,3/0,1 molar)
- 6 g Glukose

Zur Einbettung und Infiltration der Präparate eignen sich besonders die o. g. Methacrylsäureester. Durch unterschiedliche Zusammensetzung der Komponenten lassen sich unterschiedliche Härtegrade erzielen. Hier kommt Technovit 9100®²⁷ zur Anwendung. Es besteht aus einer Basislösung (Methylmetacrylat als Grundsubstanz), einem Weichmacher und einem Aktivator. Es zeichnet sich durch eine kurze Verarbeitungszeit, geringe Temperaturentwicklung sowie geringe Toxizität aus.

Nach dem Schneiden und Strecken werden die Schnitte auf speziell mit Chromalaun-Gelatine (KaliumchromIII Sulfat, Gelatine²⁸) beschichtete Objektträger geklebt.

2.2 Methoden

2.2.1 Versuchsplanung

2.2.1.1 Zur Auswahl der Versuchsgruppen:

Um eine möglichst homogene Verteilung zu erreichen, wird zu Beginn des Experiments, wie schon erwähnt, der individuelle GH-Basalspiegel eines jeden Tieres bestimmt. Dazu wird das über sechs Stunden alle 15 Minuten über einen zentralen Verweilkatheder entnommene Blut zur Spiegelbestimmung in das Labor Novo Nordisk/Dänemark versandt. Nach Berechnung der Fläche unter der Kurve wird eine Rangliste erstellt. Die Verteilung in der vorliegenden Arbeit erfolgt mittels der match-pair Technik in eine GH- und Kontroll-Gruppe (siehe Tab. 3 und 4). Im Rahmen des Gesamtprojektes konnten jedoch nicht alle Tiere gleichzeitig am Versuch teilnehmen. Es

²⁷Kulzer: Unternehmen der Hereaus GmbH, Deutschland

²⁸Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

wurden daher nochmals zufällige Gruppen mit jeweils 2 - 6 Tieren gebildet und nacheinander in den Versuch aufgenommen.

2.2.1.2 Berechnung und Erstellung der Wachstumshormondosis

Jedes Tier aus der GH-Gruppe erhält eine gewichtsadaptierte Dosis mit 100 µg pro Kilogramm Körpergewicht recombinatem porcinem Wachstumshormon (met-pGH, Fa. NovoNordisk®, Gentoft, Dänemark). Dazu werden vor Versuchsbeginn alle Tiere gewogen und die entsprechende Dosis berechnet.

Die tägliche Injektion erfolgt in ein markiertes Areal im Nackenbereich subkutan, in Anpassung an die physiologischen Ausschüttungsphasen, morgens zwischen 8.00 und 10.00 Uhr. Tiere aus der Kontrollgruppe erhalten zum gleichen Zeitpunkt eine subkutane Injektion NaCl 0,9%²⁹ als Placebo. Die erste Gabe erfolgt am Tag der Operation und wird täglich bis zur Einschläferung wiederholt.

Die angewendete Dosierung basiert auf einer persönlichen Kommunikation mit *Hans Orskov* (Endokrinologe, Universität Aarhus, Dänemark). Die Höhe der Dosierung soll die endogene GH-Produktion suffizient unterdrücken und damit die individuelle GH-Produktion als Variable ausschalten.

2.2.1.3 Festlegung des Versuchsplans (Gesamtprojekt)

Aus einem Vorversuch mit 4 Tieren ergibt sich, dass mit der ursprünglichen Planung mit 29 Versuchstagen und einer Distraktionsrate von 1,5 mm/d eine vorzeitige Konsolidierung eintritt.

Deshalb werden für den weiteren Versuchsablauf die folgenden Parameter festgelegt:

1. Versuchstage pro Tier: 26
2. Tägliche Injektion GH/Placebo morgens 08.00 - 10.00 Uhr
3. Tag 0: GH-Basalspiegel
4. Tag 1: OP-Fixateur und Port, 0 - Messungen für RÖ, STIFF, BLOOD
5. Latenzzeit: 5 Tage (einschließlich OP-Tag)
6. Distraktionsrate: 2 mm/d

²⁹Fresenius, Bad Homburg, Deutschland

7. Distraktionsrhythmus: 2 x 1 mm/d
8. Distraktionszeit: 10 Tage (Tag 6-15)
9. Konsolidierungszeit: 10 Tage (16-25)
10. 7 Testtage: 16., 17., 18., 19., 21., 23., 25. Tag RÖ, STIFF, BLOOD, DIGISCAN, ULTRASOUND
11. Injektion der Histomarker:
 - Calcein 90mg = 1ml/kgKG → Tag 3
 - Tetracyclin 25mg/kgKG → Tag 16
 - Xylenolorange 90mg = 1ml/kgKG → Tag 23
12. 13 Blutentnahmen: 1., 4., 7., 10., 13., 16., 17., 18., 19., 21., 23., 25., 26. Tag

2.2.1.4 Antibiose und Infektionsprophylaxe

Zur Vermeidung von Komplikationen und Verhinderung mechanischer Instabilitäten durch Pinlockerungen und Knochensequestierungen wird ein Antibioseschema festgelegt.

Perioperativ erhalten die Tiere 1,1 g Augmentan® i. v. Außerdem wird zunächst alle drei Tage ein intramuskuläres Depot-Antibiotikum (Tardomyocel®) verabreicht. Bei erschwerter i. m.-Applikation sowie letztendlicher Ineffektivität erfolgt die Umstellung auf eine tägliche i. v.-Antibiose. Dazu werden zweimal täglich 0,5 g Spizef® + 0,5 g Paraxin® i. v. via Port injiziert. Bei Temperaturen über 39,5 C° und/oder Pininfektionen kommt Ciprobay® oder Baytril® als Bedarfsantibiose zum Einsatz.

Zum Schutz des Fixateurs vor Verunreinigung sowie Manipulation durch die Tiere wird eine Schutzkappe (Cover) angebracht. Außerdem werden der Fixateur sowie die Pinaustrittsstellen zweimal täglich mechanisch gesäubert und desinfiziert.

Da trotz durchgeführter Antibiose Pininfektionen und Lockerungen auftreten, wird routinemäßig eine Revisions-OP am 15. bzw. 16. Tag durchgeführt, bei welcher eventuell notwendige Pinwechsel erfolgen.

2.2.1.5 Dokumentation

Alle OP-Protokolle, Messprotokolle, Pflegeberichte werden handschriftlich und in Lotus Notes® (Lotus Development GmbH, Deutschland) dokumentiert. Tägliche Eintragungen

in das Laborbuch über Verrichtungen, etc. sind obligat. Sektionsprotokolle werden gesondert angelegt.

2.2.1.6 Zusammenfassung

Am Tag 1 wird zeitgleich ein Portsystem zur vereinfachten Blutentnahme implantiert, der Fixateur externe montiert und die Osteotomie durchgeführt. Es folgt eine 5-tägige Latenzphase. Anschließend wird über 10 Tage kontinuierlich manuell distrahiert, wobei ein Rhythmus von zweimal täglich 1 mm eingehalten wird. Am 15. Tag werden intraoperativ die Pins auf Lockerungen untersucht und wenn nötig ausgetauscht. Nach einer Konsolidierungszeit von weiteren 10 Tagen (Tag 26) erfolgt die Einschläferung und Explantation der distrahierten Tibiae.

2.2.2 Tierhaltung

Es stehen drei Ställe á 16 m² mit je zwei Einzelboxen zur Verfügung. Pro Box werden 5-6 Tiere gehalten. Die Raumtemperatur lag bei 18 - 20°C, die Luftfeuchtigkeit bei ca. 75 %. Die Beleuchtung erfolgt über Tageslicht. Die Ställe werden zweimal täglich nass gereinigt und die Einstreu einmal täglich gewechselt. Die Tiere werden mit einem Alleinfutter für Micro- und Minischweine gefüttert (ssniff Mpig – E, energiereduziert³⁰):

- Inhaltsstoffe: 15 % Rohprotein, 3 % Rohfett, 10 % Rohfaser, 7,5 % Rohasche, 1 % Calcium, 0,8 % Phosphor, 0,2 % Natrium, 0,8 % Lysin, 0,2 % Magnesium, 0,35 % Methionin
- Zusatzstoffe/kg: 18000 I. E. Vit. A; 900 I. E. Vit. D3; 120 mg Vit. E

Pro Tier werden 600 g Futter/d in zwei Portionen verabreicht. Wasser erhalten die Tiere ad libitum über eine Selbsttränke. Postoperativ werden die Tiere für ca. 24 h in Einzelboxen untergebracht. Operierte und nicht operierte Tiere werden getrennt gehalten. Das Gewicht wird regelmäßig überprüft.

³⁰ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland

2.2.3 Prämedikation, Anästhesie und Analgesie

Zur Prämedikation werde den Tieren 1-2 ml Domitor und 1,5 mg Atropin präoperativ intramuskulär in den Nacken injiziert. Nach ca. 5-10 Minuten erfolgt die i. v.-Gabe von ca. 250 mg Trapanal über eine Venenverweilkanüle in einer Ohrvene. Anschließend werden die Tiere mit einem 7-7,5 mm Tubus unter i. v.-Gabe von Pancuronium (1 Ampulle = 4 mg) intubiert und mit einem Atemzugsvolumen von 400 ml und einer Atemfrequenz von 10/min beatmet. Die i. v.-Anästhesie wird mit 3-4 ml/h Trapanal und Fentanyl über Perfusor durchgeführt, die Pancuroniumgabe erfolgt nach Bedarf. Nach der OP erhalten die Tiere bis zum dritten Tag eine Analgesie mit 1,1 ml Finadyne i. m. bzw. Novamin-Sulfon ratiopharm® i. v.

Während der Messungen werden die sehr stress- und schmerzempfindlichen Tiere mit 1 ml Domitor i. m. oder i. v. sediert und anschließend nach Bedarf mit Trapanal anästhesiert.

2.2.4 Operatives Vorgehen

Präoperativ werden die Tiere gewogen und die linke Halsseite sowie die linke hintere Extremität geschoren.

2.2.4.1 Portimplantation

Nach Lagerung in Rechtsseitenlage und Rasur wird zunächst die Region im Bereich des Kieferwinkels sowie weiter craniolateral im Bereich des Nackens mit polyvidonjodhaltiger Seifenlösung mehrfach kräftig abgewaschen. Die definitive Hautdesinfektion erfolgt mit Polyvidonjodlösung. Nach steriler Abdeckung des Operationsfeldes erfolgt der Zugang zur V. jugularis externa über eine etwa 8 cm messende Hautinzision 2 cm caudal des Kieferwinkels. Nach Präparation des M. sternocleidomastoideus unter konsequenter Blutstillung mittels Elektrocauter wird die V. jugularis externa dargestellt. Es folgt das Abklemmen des herznahen Venenstückes und die Ligatur des kranialen Venenstückes mittels Handseide. Anschließend das Anklemmen und die Inzision der Ve-ne. Der Katheder wird 13 cm intraluminal in Richtung des Herzen vorgeschoben. Nach exakter Platzierung wird der Katheder mit SUTUPAK®-Handseide fixiert. Dann erfolgt die subkutane Tunnelung im Fettgewebe bis etwa 10 cm lateral der Wirbelsäule, dort die Hautinzision und Präparation der subkutanen Tasche für das Portsystem. Dieses

wird mit Suturamid® an zwei Punkten in der Subkutis fixiert, abschließend Hautnaht mit Mersilene®. Die Inzision zur Venae sectio wird ebenfalls mit einer Subkutannaht mit Vycril® und anschließender Hautnaht versorgt.

2.2.4.2 Tibiaosteotomie und Fixateurmontage

Nun erfolgt die Hautdesinfektion des OP-Gebietes am linken Hinterlauf und anschließend sterile Abdeckung. Am distalen Teil der Fibula wird eine laterale Hautinzision gesetzt. Anschließend stumpfes Vorpräparieren bis zur Fibula und partielle vorsichtige Deperiostierung mittels Respatorium. Positionierung zweier Hohmann-Haken zur Schonung des umliegenden Weichteilgewebes bei der Resektion eines 1,5 cm langen Teilstückes der Fibula mittels oszillierender Säge. Anschließend schichtweiser Wundverschluss.

Zur exakten Positionierung der Schanzschrauben wird unter Bildwandlerkontrolle der Kniegelenkspalt sowie der Sprunggelenkspalt dargestellt und mit Kanülen markiert.

Der Fixateur wird mit insgesamt vier 4,5 mm Schanzschrauben, zwei medialen, und senkrecht zu diesen, zwei lateralen, im Knochen montiert.

Nach Stichinzision distal-lateral der Tibia über dem Sprunggelenk erneut stumpfes Vorgehen bis zur Tibia. Unter Verwendung einer Bohrhülse wird senkrecht zur Tibiaachse mit einem 3,2 mm Bohrer bis zur Gegenkortikalis vorgebohrt und die erste Schanzschraube eingedreht. Der schon vollständig zusammengesetzte Fixateur wird achsengerecht angebracht und dient somit als Führungsschiene für weitere Schanzschrauben. Die zweite Schanzschraube wird proximal-lateral parallel zur ersten platziert, wobei die Klemmbacke des Fixateurs als Führung dient. Senkrecht und etwas caudal zu dieser wird in der Tuberositas Tibiae die dritte, mediale Schanzschraube positioniert. Entsprechend wird die letzte distal-mediale Schraube senkrecht, etwas proximal zur Ersten eingebracht. Hier ist besonders auf die Schonung der Strecksehnen zu achten.

Nach vollständiger Montage erfolgte die Osteotomie der Tibia. Dazu wird an der medialen Tibiakante eine Hautinzision gesetzt. Es folgt die Vorpräparation bis zum Periost und Inzision desselben. Unter Erhalt wird das Periost vorsichtig mit zwei Hohmann-Haken gelöst, die während der Knochendurchtrennung als Schutz dienen. Die Osteotomie wird mit einer oszillierenden Säge durchgeführt. Die vollständige Durchtrennung

wird durch Torsionsbewegungen des Fixateurs unter Bildwandlerkontrolle überprüft. Das Periost wird fortlaufend mit Vicryl® 2/0 und die Haut mit Mersilene® verschlossen. Intraoperativ erfolgen die ersten Blutentnahmen. Außerdem erhalten die Tiere perioperativ eine i. v.-Antibiose mit Augmentan 2,2 g. Das Bein wird unmittelbar postoperativ geröntgt und die Nullmessungen durchgeführt. Eine erste Analgesierung mit Metamizol erfolgt nach Ausleitung der Narkose ungefähr sechs Stunden postoperativ. Die Tiere werden für 24 Stunden in Einzelboxen untergebracht und dürfen das operierte Bein unmittelbar postoperativ voll belasten.

2.2.5 Testphase

2.2.5.1 Röntgen, Digiscan, Ultraschall, Blutproben, Steifigkeit in vivo

Um Messungen am unbelasteten, frei hängenden Bein durchführen zu können, wird eine besondere Hängematte konzipiert. Die Tiere werden zu jeder Messung sediert und in der Hängematte untersucht. Die einzelnen Messmethoden und Verfahren sind den entsprechenden Dissertationen gesondert zu entnehmen.

Für die Messung der torsionalen Steifigkeit in vivo wird ein speziell dafür entwickelter Fixateur verwendet. Dieser Halbringfixateur ermöglicht die Torsion des caudalen Teils gegen den proximalen. Beide sind zur Datenerfassung mit einem Kraft- und Wegaufnehmer gekoppelt. Dies ermöglicht die Messung der benötigten Kraft, um den distal zur Distraktionszone gelegenen Teil der Tibia gegen den proximalen zu verdrehen. Der Weg wird dabei so gering wie möglich gehalten, um dem Gewebe der Distraktionszone keinen Schaden zuzufügen (259).

Bei der Befundung der Röntgenbilder wird das postoperative Ergebnis beurteilt und auf die Kallusbildung im Distractionsspalt geachtet.

2.2.6 Explantation und Aufbereitung

Um die Tiere einzuschläfern, wird ihnen nach Blutentnahme Trapanal in atemdepressiver Dosis (ca. 40 ml = 920 mg) über den Port intravenös injiziert. Nach Einsetzen des Atemstillstandes folgt eine intravenöse Gabe von Kaliumchlorid 14,90 % in einer Dosis von 40-60 ml = 80-120 mmol. Der darauffolgende Herzstillstand wird durch Auskultation überprüft.

Nach Entfernung des Fixateurs inklusive der Schanzschrauben werden beide Hinterläufe in toto entnommen und geröntgt. Außerdem werden zur mikrobiologischen Untersuchung Abstriche aus allen Pinöffnungen entnommen. Danach folgt die Präparation der Tibia durch vorsichtiges Entfernen des gesamten Weichteilgewebes und der Fibula. Es wird darauf geachtet, das Kallusgewebe intakt zu lassen. Aus diesem Grund werden alle Präparationen durch dieselben Personen durchgeführt. Das Periost wird belassen, um ein Austrocknen des Gewebes zu verhindern. Außerdem werden die Präparate mit in 0,9-prozentiger NaCl-Lösung getränkten Mullkompressen feucht gehalten und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C aufbewahrt, um eine Autolyse zu verhindern. Nach der biomechanischen Testung in der Materialtestmaschine werden die Proben unverzüglich für 7 Tage fixiert. Die Fixationslösung (Lösung nach *Vitali*) durchdringt das Gewebe ca. 1 mm pro Stunde (42, 150).

2.2.7 Histologische Aufarbeitung

Die histologische Untersuchung von Knochengewebe, insbesondere des kalzifizierten Anteiles ist nur am unentkalkten Knochen möglich. Das Verfahren zur Einbettung von unentkalktem Knochen in Methylmetacrylat, erstmalig von *Boellaard* beschrieben, wird zur histologischen Aufarbeitung verwendet (37).

Dazu werden zunächst die Präparate 2 cm proximal und distal der Distraktionszone abgesägt und der so entstandene Zylinder (Abb. 9) mit dem angrenzenden corticalen Knochen mittels dem Makro-Trennschleifsystem (Exakt, Norderstedt, Deutschland) in drei bis fünf gleiche etwa 1 cm dicke Sagittalschnitte von ca. 2 cm Länge zerlegt (Abb. 10). Diese Scheiben werden wiederum für etwa 2 - 3 Tage in o. g. Fixationslösung gebracht. Danach werden sie unter fließendem Wasser formalinfrei gewaschen. Anschließend erfolgt die Entwässerung und Einbettung der Blöcke in Methylmetacrylat (Technovit 9100, Kulzer, Deutschland) (Abb. 11).



Abbildung 9: Knochenzylinder

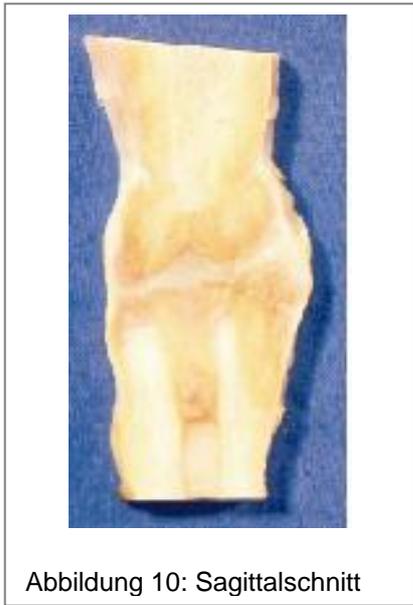


Abbildung 10: Sagittalschnitt

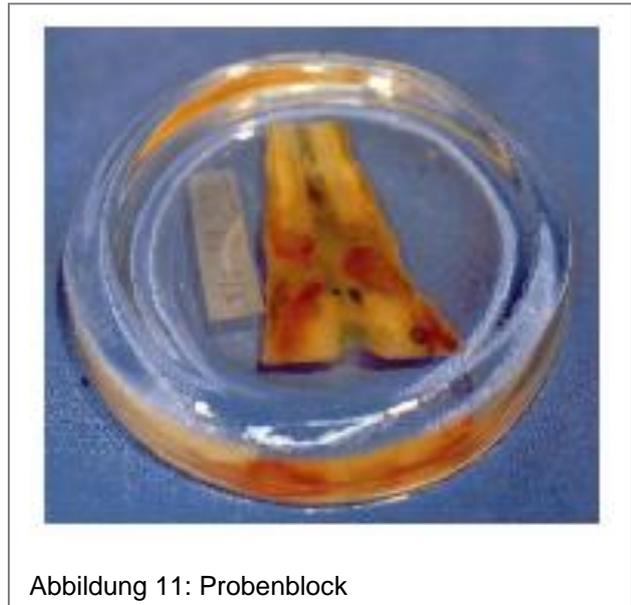


Abbildung 11: Probenblock

2.2.7.1 Die Entwässerung

Hierzu werden die Präparate in eine aufsteigende Äthanol-Alkohol-Reihe gelegt (42).

- Ethanol 40 % kurz
- Ethanol 70 % 1 Stunde
- Ethanol 80 % 3-5 Tage
- Ethanol 80 % 3-5 Tage
- Ethanol 96 % 3-5-Tage
- Etahnol 96 % 3-5 Tage
- Ethanol 100 % 3-5 Tage
- Ethanol 100 % 3-5 Tage
- Ethanol 100 % 3-5 Tage
- Xylol 100 % 1 Tag zum Entfetten

2.2.7.2 Die Einbettung

Die entwässerten und fettfreien Scheiben werden nun anschließend mit dem Kunstharz Technovit 9100® infiltriert. Dieser Kunststoff auf Methacrylat-Basis besteht aus den drei Komponenten Basislösung, Weichmacher und Aktivator. Für Hartschnittpräparate wird ein Mischungsverhältnis von 94 % Basislösung, 5 % Weichmacher und 1 % Aktivator empfohlen.

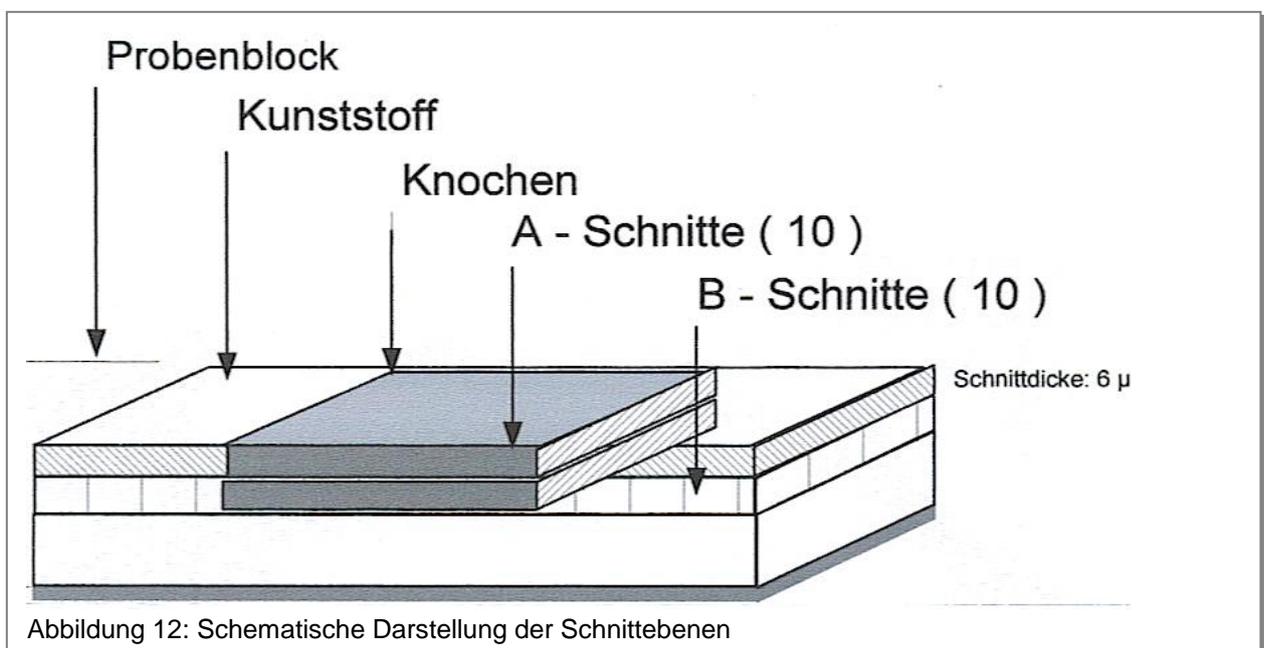
Zur Infiltration werden die Präparate bei 4 °C unter Vakuum für 7 Tage inkubiert und anschließend in neu angesetztem Technovit eingebettet.

Hierzu werden Gläser mit Twist off Deckel verwendet. In diesen wird der Boden bereits zuvor mit Kunstharz ausgegossen und gehärtet, um eine möglichst planparallele Auflage der Präparate zu gewährleisten. Die eingebrachten Proben werden nun mit Technovit übergossen, luftdicht verschlossen und ca. 5-7 Tage bei 30 °C im Brutschrank gelagert. Bei dieser Temperatur polymerisiert der Kunststoff aus.

2.2.7.3 Schneiden und Beschriftung

Nach vollständigem Aushärten werden die Gläser vorsichtig zerschlagen und die Kunstharzblöcke mit dem Makro-Trennschleifsystem (Exakt, Norderstedt, Deutschland) zurechtgesägt, um ein bequemes Einspannen in das Hartschnittmikrotom (Polycut, Leica, Cambridge, England) zu ermöglichen.

Nach dem Anschneiden werden anschließend 10 bis 15 je 6 µm dünne Serienschritte von jedem Präparatblock als sogenannte A-Schnitte, 10 bis 15 weitere als B-Schnitte angefertigt (Abb. 12).



Diese werden auf einen Chromalaun-Gelatine beschichteten Objektträger gebracht und mit Streckflüssigkeit (30 ml Butoxyethylacetat + 70 ml Alkohol 70-prozentig) gestreckt. So entstehen nahezu faltenfreie Schnitte. Nach Abdecken mit Kieselfolie und Filterpa-

pier werden sie in einer Schnittpresse über 24 Stunden bei 37 °C im Wärmeschrank gepresst und getrocknet.

Die Beschriftung bezeichnet die genaue ursprüngliche Lokalisation eines Schnittes. Ziffer 1-30 entspricht dem einzelnen Tier. L 1-5 gibt die einem Tier zugehörige Anzahl der Präparatblöcke an, wobei außerdem eine Zuordnung der Schnittebene zum ursprünglichen Knochenzylinder möglich war. Die Buchstaben a und b geben die Lokalisation innerhalb eines einzelnen Blockes wieder. Ob der Schnitt eher zentral oder peripher durch die Distraktionszone verläuft, kann somit genau ermittelt werden. Zusätzlich wird der proximal-anteriore Anteil des einzelnen Schnittes markiert.

Für die folgende histomorphometrische und histologische Untersuchung des kalzifizierten Anteils des Regenerates werden die präparierten Schnitte nun eingefärbt (88).

2.2.7.4 Färben

Vor dem Färben müssen die Schnitte zunächst entplastet, in absteigender Alkoholreihe (100-/96-/80-/60-/40-prozentigem Alkohol) gereinigt und anschließend in Aqua destilata gespült werden.

Masson-Goldner-Trichromfärbung

Als Übersichtsfärbung besonders geeignet (206).

1. Kernfärbung mit Weigerts Eisenhämatoxylin für 2-4 min
2. In fließendem Wasser auswaschen für 10 min
3. Färben in Säurefuchsin-Ponceau für 5 min
4. Spülen in 1 % Essigsäure
5. Differenzieren in Phosphormolybdänsäure-Orange G bis zur vollständigen Entfärbung
6. Spülen in 1 % Essigsäure
7. Gegenfärbung mit Lichtgrün für 10 min
8. Spülen in 1 % Essigsäure
9. Kurzes Entwässern in absteigender Alkoholreihe
10. Xylol 2 x 5 min
11. Eindecken in Vitroclud

Die gefärbten Gewebe stellen sich wie folgt dar:

- Kerne: bräunlich-schwarz
- Zytoplasma: ziegelrot
- Erythrozyten: orange-gelb
- Bindegewebe, saure Mucosubstanzen: grün
- Osteoid: rot

Safranin-O/Lichtgrünfärbung

Für eine gute Knorpel- Knochen- Abgrenzung eignet sich außerdem die Safranin-O Färbung und Gegenfärbung mit Lichtgrün.

1. Färben mit Safranin-O für 8 min
2. Spülen in Aqua dest.
3. Pikrinsäure für ca. 10 min
4. Spülen in Aqua dest.
5. Spülen in 1 %iger Essigsäure
6. Lichtgrün für 8-10 min
7. Spülen in 1 %iger Essigsäure
8. Entwässern in 100 %igem Alkohol
9. Xylol
10. Eindecken

Die gefärbten Gewebe stellen sich wie folgt dar:

- Kerne: rot
- Knorpel: intensiv rot
- Bindegewebe: grün
- Knochen: grün
- Osteoidsäume: intensiv rot

Astrablaufärbung

Diese Färbung eignet sich besonders zur Darstellung kalzifizierten Knorpelgewebes (206).

1. Färben in 1 %iger Astrablaulösung für 5-10 min
2. Spülen in 1 %iger Essigsäure

3. Spülen in Aqua dest.
4. Färben in Kernechtrot für 10 min
5. Spülen in Aqua dest.
6. Lichtgrün für 8-10 min
7. Entwässern in 70 % bzw. 100 %igem Alkohol
8. Xylol 2 x 5 min
9. Eindecken

Die gefärbten Gewebe stellen sich wie folgt dar:

- Saure Mukopolysaccharide: braun-schwarz
- Kalkknorpel: dunkelblau
- Knochen: blau
- Zellkerne: rot

Modifizierte von Kossa-Färbung

Die Fragestellung der Kallusformation bedarf einer Färbung, die kalzifiziertes/mineralisiertes Gewebe erfasst. Hier eignet sich besonders die Versilberungstechnik nach von Kossa von 1901. Diese basiert auf der Verdrängung von Calciumionen aus seinen Salzen im Austausch gegen Silberionen. Es handelt sich hierbei also um eine histochemische Methode. Über Oxidations- und Reduktionsvorgänge bildet sich schwerlösliches Silberphosphat. Die Reaktion arbeitet zuverlässig für Calcium- Phosphat bzw. Carbonat nicht jedoch für Oxalat. Für Hartschnittpräparate wird diese Methode nach Krutsay modifiziert (142, 206):

1. Färben in 3 %iger wässriger Silbernitratlösung für 5 min
2. Spülen in Aqua dest. 3 x
3. Reduzieren in Natrium-Formaldehydlösung für 2 min
4. Wässern in Leitungswasser für 10 min
5. 5% Natriumthiosulfat für 5 min
6. Wässern in Leitungswasser für 10 min
7. Spülen in Aqua dest. kurz
8. Entwässern in 2 x 96 %igem und anschließend 2 x 100 %igem Alkohol
9. Xylol 2 x 5 min
10. Eindecken

Die gefärbten Gewebe stellen sich wie folgt dar:

- Mineralisiertes Knorpel- und Knochengewebe: schwarz
- Mineralisationsfronten: schwarz granuliert

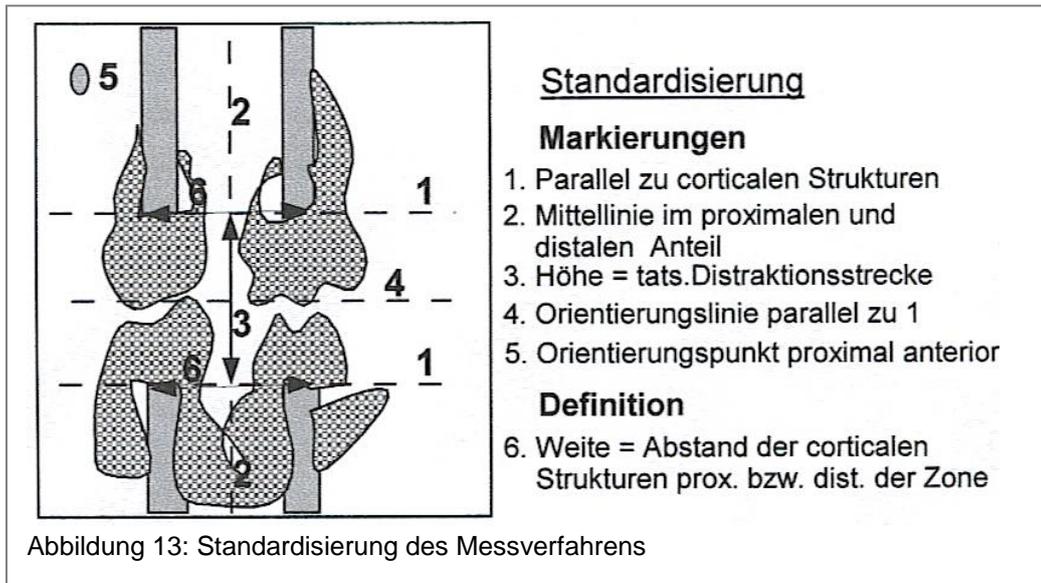
2.2.8 Bildanalyse

2.2.8.1 Die Nomenklatur der Histomorphometrie

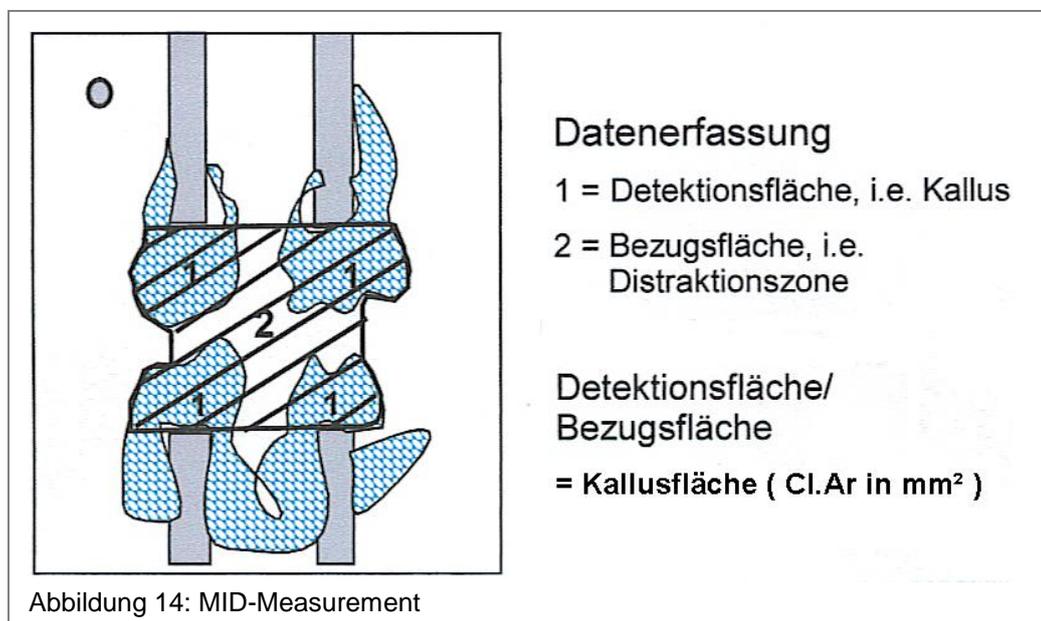
Viele Versuche zur Vereinheitlichung und Standardisierung der Messverfahren werden derzeit unternommen. Etabliert hat sich die Nomenklatur für histomorphometrische Messungen nach *Parfitt et al.* (181). Diese wird jedoch durch Vermessungen lamellären, i. e. corticalen oder spongösen Knochens verwendet, welcher mittels Biopsie und damit einheitlichem Volumen gewonnen wird. Wegen der besonderen Beschaffenheit des in der vorliegenden Studie untersuchten Gewebes (Kallus = Geflechtknochen) ist sie nicht auf alle Untersuchungsschritte anwendbar.

2.2.8.2 Standardisierungsverfahren zur Bildanalyse

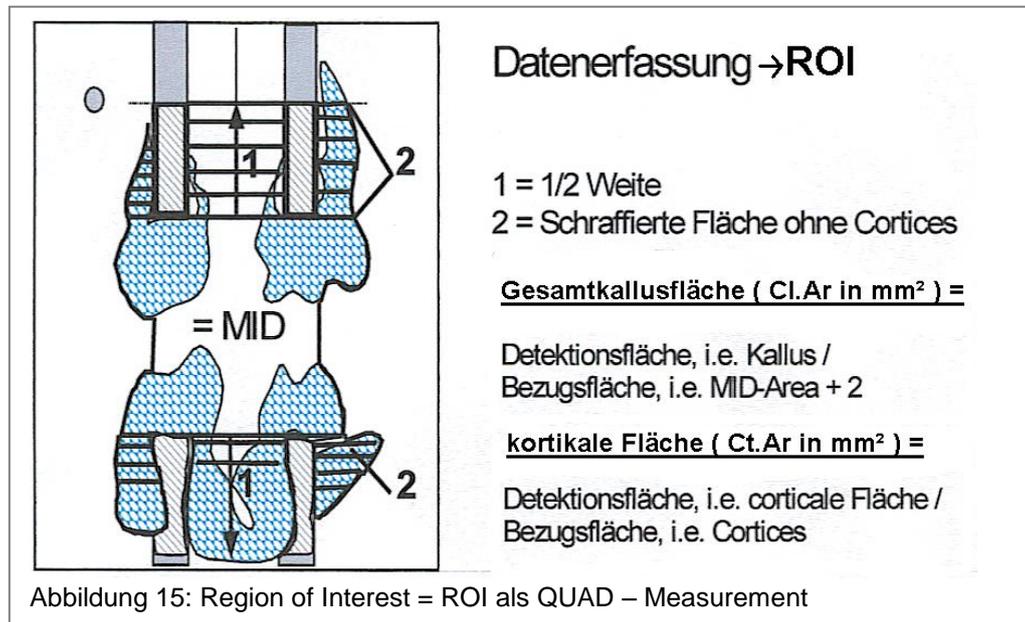
Unter dem Mikroskop werden die relevanten Abschnitte des Regenerates in einem standardisierten Verfahren mit Hilfe einer 3-Chip-CCD-Farbkamera digitalisiert und mittels des LEICA Quantimet-Bildanalysesystems (Leica, Bensheim, Deutschland) ausgewertet. Die optimale Kameraeinstellung (Vergrößerung 9x) und der Objektabstand (53 cm) werden ermittelt und für alle Schnitte beibehalten. Die Kalibrierung erfolgt derart, dass in der Software Qwin im Binärbildmodus 1 Pixel = 0,0288 µm entspricht. Die Farberkennung, basierend auf Grauwertabstufungen innerhalb eines bestimmten Gesichtsfeldes, detektiert nun eine bestimmte Struktur innerhalb festgelegter Grauwertgrenzen als Fläche innerhalb dieses Feldes. Zusätzlich sind die Primärparameter Höhe, Länge und Breite erfassbar. Ein standardisiertes Messfeld (Region of interest = ROI) wird als die Fläche zwischen der anterioren und posterioren (i. e. ventralen und dorsalen) Kallusgrenze sowie einer Linie, parallel zu den proximalen und distalen Knochengrenzen definiert (Abb. 13), (21).



Der Abstand dieser Linie zur Distraktionslücke wird als die Hälfte des Knochendiameters in mm standardisiert. Innerhalb der ROI wird im ersten Schritt nur der flächenmäßig kalzifizierte Anteil innerhalb der eigentlichen Distraktionszone (die von den Kortices proximal und distal begrenzte Fläche) als sogenannte MID-Measurement erfasst (Abb. 14).

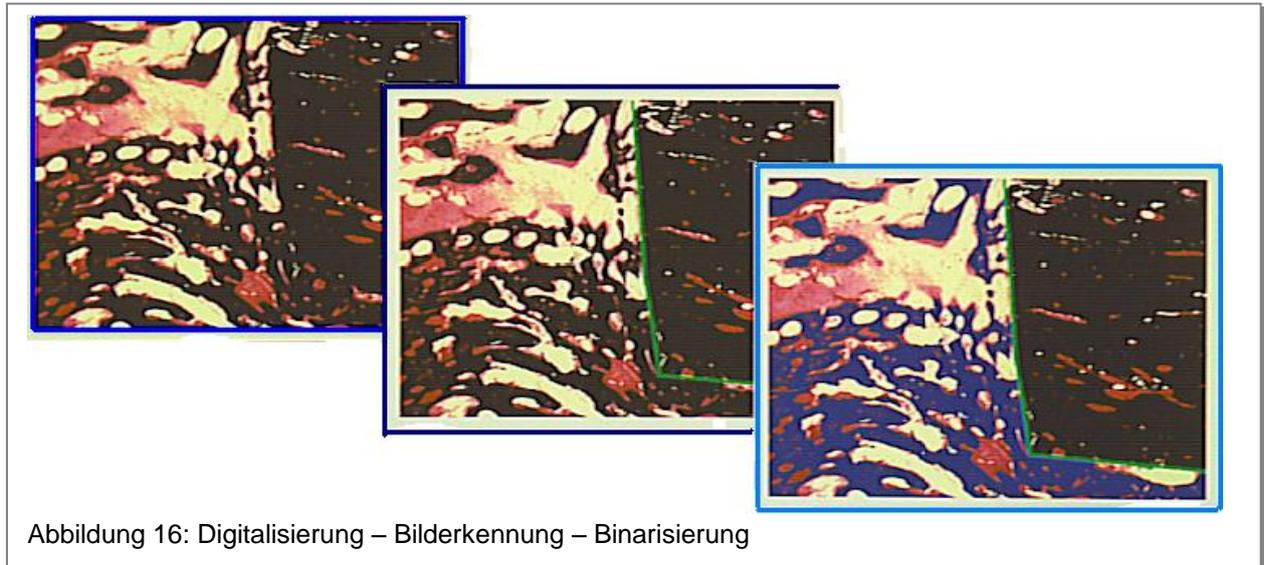


Im zweiten Schritt wird zusätzlich zur MID-Messung die Fläche des kalzifizierten Anteils distal und proximal der Distraktionszone innerhalb der ROI als QUAD-Measurement zusammengefasst (Abb. 15).



Die kortikalen Anteile werden hier nicht einbezogen, sondern erst anschließend im dritten Schritt gesondert vermessen. Somit ist eine Aussage über Prozesse in der Übergangszone (angrenzende Kallusanteile im Übergang zum kortikalen Knochen) möglich.

Da die ROI für einen einzigen Untersuchungsschritt zu groß ist, wird sie in 4-6 Teilabschnitte zerlegt. Beginnend mit dem markierten proximal anterioren Segment wird im Uhrzeigersinn die kalzifizierte Kallusfläche umfahren und so vermessen. Dazu detektiert das Programm entsprechend der im Makro eingestellten Programmalgorithmen bestimmte Grauwertanteile, hinterlegt diese mit einer Farbe und projiziert anschließend das farbige Bild der so detektierten Strukturen als binäre Maske über das Original (Abb. 16).



Dabei gilt das on-off-Prinzip der einzelnen Pixel. Graustufen oberhalb der gesetzten Grenze werden als *on*, die unterhalb als *off* registriert. Die Summe aller als *on* registrierten Pixel ergibt so die berechnete Fläche (siehe oben). Das Programm addiert anschließend die aus den Einzelmessungen errechneten Einzelflächen zu einer Gesamtfläche.

Werden aufgrund färbetechnischer Inhomogenitäten nicht alle Flächen erfasst, kann der Untersucher manuell Einfluss nehmen. Wird z. B. ein kalzifizierter Anteil nicht sicher detektiert, kann dieser durch einfachen Mausklick der detektierten Fläche zugesprochen bzw. fälschlich detektierte Areale wieder entfernt werden. In dieser Art und Weise wird jede Einzelmessung Untersucher-kontrolliert durchgeführt. Nach Abschluss aller Messungen werden die erfassten Daten in eine Microsoft®Excel Tabelle (Fa. Microsoft, USA) exportiert.

Für jedes Tier werden drei Schnittebenen untersucht. Hierzu eignen sich der Zentralschnitt entlang des Durchmessers des ursprünglichen Knochenzylinders und die beiden unmittelbar angrenzenden 3 mm lateral und medial gelegenen Schnittebenen. Für jede dieser drei Schnittebenen werden zwei Schnitte angefertigt, 30 µm voneinander entfernt als A- und B-Schnittserie. Insgesamt werden so sechs Schnitte pro Tier ausgewertet.

2.2.8.3 Erfasste Parameter des mineralisierten Kallus

Nach Digitalisierung der ROI und Binärisierung der detektierten kalzifizierten Strukturen der Bildabschnitte werden folgende spezielle Algorithmen basierend auf pixelgestützten Messungen erhoben. Es wird soweit wie möglich versucht, für Messparameter die ASBMR-Nomenklatur [s. Begriffserklärungen] anzuwenden (21, 181, 182); Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis.

Messparameter:

1. Kallusbreite (Cl.Wi in mm) und Breite des mineralisierten Kallus (Cl.Md.B.Wi in mm): Jeweils größte Kallusbreite innerhalb der Distraktionszone.
2. Kallusfläche (Cl.Ar in mm²): Gesamte Fläche des ausgebildeten Kallus.
3. Mineralisierte Kallusfläche (Cl. Md. B.Ar in mm²) und Umfang des gesamt mineralisierten Knochens (Cl. Md. B.Pm in mm): Knochengewebe innerhalb der Kallusfläche und dessen Umfang.

Von diesen Parametern wird der Anteil des mineralisierten Knochengewebes innerhalb des gesamten Kallus als Kallusknochendichte ($Cl.B.Dn = Cl.Md.Ar\%Cl.Ar$) abgeleitet. Eine Aussage über die Struktur und Form des mineralisierten Knochens lässt sich durch das Verhältnis Umfang des mineralisierten Kallus zur mineralisierten Kallusfläche treffen ($Cl.Md.B.Pm/Cl.Md.B.Ar$ in mm²).

2.2.8.4 Parameter der Kortikalis-Messungen

In einer weiteren Messung werden die kortikalen Anteile der Messfläche (ROI) erfasst (21).

4. Kortikale Fläche (Ct.Ar in mm²): Gesamtfläche der kortikalen Knochenenden
5. Mineralisierte Fläche der Kortizes (Ct.Md.B.Ar in mm²): mineralisierter Anteil an den Knochenenden
6. Umfang der mineralisierten kortikalen Fläche (Ct.Md.B.Pm. in mm)

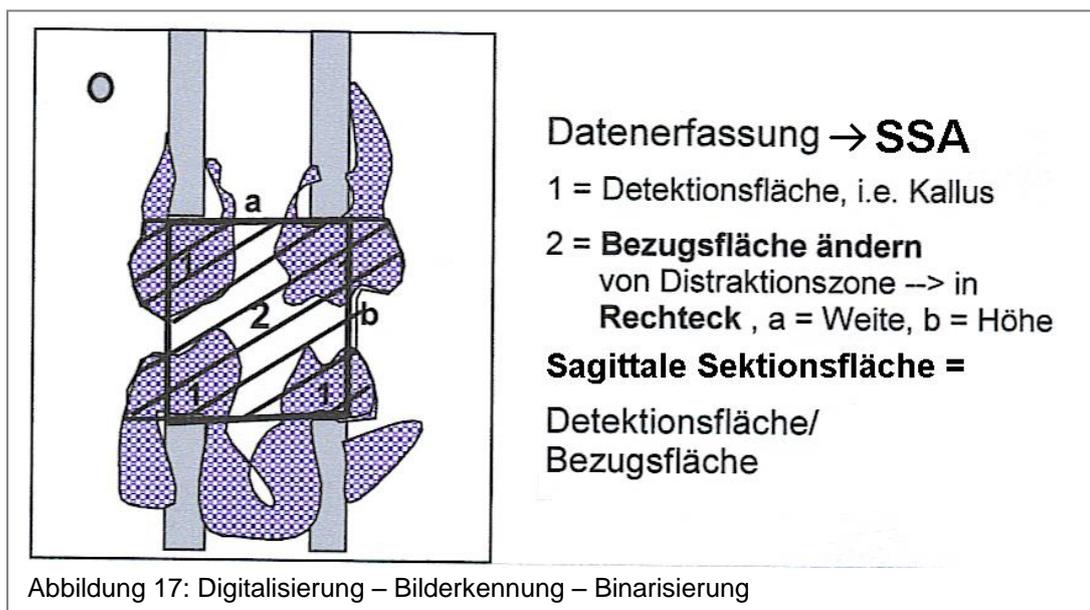
Aus den letzten beiden Parametern wird die kortikale Knochendichte ($Ct.B.Dn = Ct.Md.B.Ar\%Ct.Ar$) abgeleitet, um eine Aussage über die Struktur der osteotomienahen Kortikalis zu erhalten.

7. Der Distraktionsabstand (Dr.Ds in mm) wurde ebenfalls bestimmt, um die Bedingungen der Kallusbildung in beiden Gruppen zu untersuchen. Er wird in die Kovarianzanalyse einbezogen.

2.2.9 Statistische Analyse

2.2.9.1 Normalisierung

Aufgrund der unterschiedlichen individuellen Größe der einzelnen Tibiaknochen werden die o. g. Kallusparameter zur sogenannten Sagittalschnittfläche (Sl.Se.Area) in Beziehung gesetzt. Diese Fläche wird aus dem Knochendurchmesser und dem Distraktionsabstand errechnet. Sie dient dazu, die o. g. histomorphometrischen Parameter für die statistische Analyse zu standardisieren (Abb. 17 und modifizierte Abb. 18 nach HJ Bail et al); (21).





2.2.9.2 Statistische Tests

Alle statistischen Analysen werden mit der SPSS Software (Statistical Package for Social Sciences, SPSS® GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. Zur Überprüfung der Daten auf Normalverteilung kommt der Kolmogorov-Smirnov-Test zur Anwendung. Zudem wird eine Varianzanalyse zum Einfluss von unterschiedlichen Variablen auf die Untersuchungsergebnisse durchgeführt, i. e. Medikamente, Alter, präoperatives Gewicht, Basalrate der GH-Ausschüttung und Distraktionsabstand.

Um signifikante Unterschiede in den beiden Gruppen zu untersuchen, wird der unabhängige T-Test angewendet.

3 ERGEBNISSE

3.1 Verlauf des Versuches

3.1.1 Allgemeines

Alle Versuchstiere bleiben während des gesamten Versuchsablaufs gesund. Die Operationen werden ohne nennenswerte Komplikationen überstanden. Unmittelbar postoperativ belasten die Tiere das operierte Bein zunächst nur leicht, nach Analgesie bis zum sechsten Tag voll. Während der Distraktions- und Konsolidierungsphase wird das Bein zunehmend geschont und nur noch wenig belastet. Trotz Antibiose und täglicher gründlicher Pinpflege kommt es zu Pininfektionen vor allem der proximalen Austrittsstellen. Dies betrifft Kontroll- und Placebo-Gruppe gleichermaßen ($p > 0,05$ T-Test). Bei fast allen Tieren wurde unter Vollnarkose die Pinfestigkeit überprüft und wenn nötig eine Revision durchgeführt. Auch dies betraf die Untersuchungsgruppen gleichermaßen ($p > 0,05$ T-Test).

Für die histologisch-histomorphometrische Datenerhebung werden folgende Tiere einbezogen.

GH-Gruppe (n = 10): 5, 7, 11, 12, 15, 16, 17, 18, 23, 33

Placebo-Gruppe (n = 10): 8, 9, 10, 14, 20, 21, 22, 24, 25, 31

3.1.2 Covarianten

Keines der für Antibiose, Anästhesie bzw. Analgesie eingesetzten Medikamente hat einen signifikanten Einfluss auf die histomorphometrischen Ergebnisse. Weder für Körpergewicht, Alter noch basale GH-Rate kann ein signifikanter Einfluss auf die quantitativen oder strukturellen Parameter festgestellt werden. Die Gruppen zeigen keinen Unterschied in der durchschnittlich erreichten Distraktionsdistanz = Dr.Ds (Tab. 5 u. Tab. 6). Die Varianzanalyse zeigt ebenfalls keinen Einfluss des Distraktionsabstandes auf die gefundenen Ergebnisse beider Gruppen bezüglich der getesteten Parameter.

Tabelle 5 nach HJ Bail et al. (21): (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis)

	Placebo-Gruppe (n = 9)	GH-Gruppe (n = 8)	Signifikanz
Cl.Wi	22.83 ± 2.66 mm	26.38 ± 3.81 mm	n. s.
Cl.Md.B.Wi	20.67 ± 2.86 mm	24.38 ± 3.55 mm	p < 0.05
Cl.Ar	440.31 ± 56.31 mm ²	515.42 ± 47.10 mm ²	n. s.
Cl.Md.B.Ar	169.03 ± 43.81 mm ²	239.37 ± 19.74 mm ²	n. s.
Cl.B.Dn	38 ± 0.09 %	46 ± 0.07 %	n. s.
Cl.Md.B.Pm	75.50 ± 92.76 mm	26.10 ± 38.95 mm	n. s.
Cl.Md.B.Pm/ Cl.Md.B.Ar	15.33 ± 2.29	14.4 ± 2.11	n. s.
Ct.Ar	118.41 ± 27,83 mm ²	113.87 ± 12.77 mm ²	n. s.
Ct.Md.B.Ar	106.23 ± 26.00 mm ²	93.92 ± 12.46 mm ²	n. s.
Ct.B.Dn	0.89 ± 0.03	0.82 ± 0.06	p < 0.05
Ct.Md.B.Pm	304.66 ± 55.03 mm ²	369.44 ± 91.37	n. s.
Ct.Md.B.Pm/ Ct.Md.B.Ar	2.62 ± 0.45	3.25 ± 0.74	n. s.
Dr.Ds	16.16 ± 3.41 mm	13.36 ± 2.66 mm	n. s.
L.Ar	85.56 ± 29.22 mm ²	171.22 ± 36.69 mm ²	p < 0.05

Tabelle 6: Distraktionsabstand in mm

PLACEBO n = 9 Mean 16,16 ± 3,41 mm	GH n = 8 Mean 13,36 ± 2,66 mm
Tier 08 = 12,57	Tier 05 = 12,14
Tier 09 = 12,00	Tier 07 = 11,00
Tier 10 = 20,00	Tier 11 = 14,71
Tier 20 = 14,89	Tier 12 = 14,71
Tier 21 = 19,10	Tier 16 = 20,00
Tier 22 = 18,57	Tier 18 = 09,29
Tier 24 = 19,28	Tier 23 = 14,29
Tier 25 = 20,00	Tier 33 = 18,57
Tier 31 = 12,71	

3.2 Biomechanische und biochemische Ergebnisse

3.2.1 Biomechanische Steifigkeit *in vivo* und *in vitro*

Da eine Fragestellung die mögliche Korrelation der histomorphometrischen Ergebnisse mit den biomechanischen Daten einbezieht, sollen hier kurz die Ergebnisse der biomechanischen Steifigkeitsmessungen wiedergeben werden, ohne im Einzelnen darauf einzugehen.

Die torsionale nicht destruktive Steifigkeitsmessung *in vivo* ergibt eine im Durchschnitt 125 % höhere torsionale Steifigkeit bei wachstumshormonbehandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe während der Konsolidierungsphase ($p < 0.001$). Ein Maximum wird am Tag 19 mit einer 207 % höheren Steifigkeit registriert (194, 195, 198, 259).

Messungen der torsionalen Steifigkeit durch die Materialtestmaschine (Zwick 1455®, Zwick GmbH, Ulm, Deutschland) nach Präparation der Knochen ergeben ebenfalls eine statistisch signifikant höhere Steifigkeit *in vitro* bei den wachstumshormonbehandelten Tieren ($p < 0.001$). Im Vergleich zur gesunden, kontralateralen Tibia erreichen die distrahierten Tibiae der GH-Tiere bei Endpunktbelastung $79,0 \pm 23,3$ %, die Kontrollgruppe dagegen lediglich $24,4 \pm 15,4$ % (194, 195, 198, 259).

3.2.2 Biochemische Daten

Die serologisch erhobenen biochemischen Ergebnisse zeigen einen deutlichen Anstieg des Gesamt-IGF I-Serumspiegels unter systemischer r-pGH-Applikation (GH: 440 % des Basalspiegels, Placebo: 97 % des Basalspiegels) (20, 23).

3.3 Histologische Morphologie

3.3.1 Allgemeines

Zur Beurteilung der histomorphometrischen Parameter werden die mittigen Sagittalschnitte eines jeden Tieres untersucht (i. e. L 3-4). Zwischen den proximalen und distalen Kortikalisanschnitten befindet sich in der Distaktionszone das Knochenregenerat. Die kortikalen Anteile scheinen zur Distaktionszone hin aufgelockert zu sein. In etwa 2-3 cm Abstand zu dieser breitet sich wölkchenartig der aus trabekelförmig angeordneten Geflechtknochen bestehende knöcherne Kallus aus. Mittig trifft er in unterschiedlich

ausgeprägter Verzahnung auf die gegenüberliegende Kallusformation des distalen Fragments. Hier liegt ein schmaler Saum aus Bindegewebsfasern, die polarisationsoptisch entlang des Distraktionsvektors ausgerichtet sind. Dieser entspricht der von *Aronson* beschriebenen bindegewebigen Zwischenzone (fibrous interzone). Ihr schließt sich nach proximal bzw. distal die primäre Mineralisationsfront an und geht in die sogenannte „microcolumn formation zone“ über. Hier bilden zwischen Bindegewebsfasern eingebettete Osteoblasten Osteoid sowie den zunächst säulenartig angeordneten Geflechtknochen. In Kortikalisnähe zeigt sich bereits ein partielles Remodeling zu Lamellenknochen. Die Dichte der Kochensäulchen nimmt von periostal nach endostal ab. Der kleinere endostale Anteil zeigt jedoch häufig schon zusammengewachsene Säulenformationen in Markraum- bzw. Endostnähe. Dagegen findet sich im Bereich einer gedachten Verbindungslinie zwischen den gegenüberliegenden Kortices die geringste Dichte an Trabekeln. Bei einigen Tieren findet in diesem Bereich (noch) keine Kallusbildung statt. Hier befinden sich lediglich in Zugrichtung ausgerichtete Bindegewebsfasern. Das intakte periphere Periost liegt der Kalluswolke direkt an. Besonders in den knöchernen Enden im Bereich der primären Mineralisationsfront werden teils in Chondronen angeordnete, teils einzeln in der Knochenmatrix gelegene Chondrozyten gesehen. Auch zentral im endostalen Anteil des Kallus findet sich hyaliner, von kreuz und quer angeordneten Bindegewebsfasern umgebener Knorpel. (21)

3.3.2 Vergleich zwischen GH und Placebo

Bereits ohne histomorphometrische Messungen erscheint in der Übersicht der periostale Kallus der mit Wachstumshormon behandelten Tiere grösser sowie im Bereich der Fragmentenden verzahnter und teilweise schon verwachsener als in der Kontrollgruppe. Das Remodeling der Kortikalisenden scheint ebenfalls vor allem im Bereich des periostalen Kallus weiter fortgeschritten. Hier penetrieren Kalluszapfen den kortikalen Knochen, die Strukturen erscheinen aufgelockerter.

Beispiele am sagittalen Schnitt in der Mitte der Distraktionszone van Kossa/Safranin-O, (modifizierte Abb. 19 und 20 nach HJ Bail et al); (21):



Abbildung 19: Placebo-Gruppe

GH-Gruppe

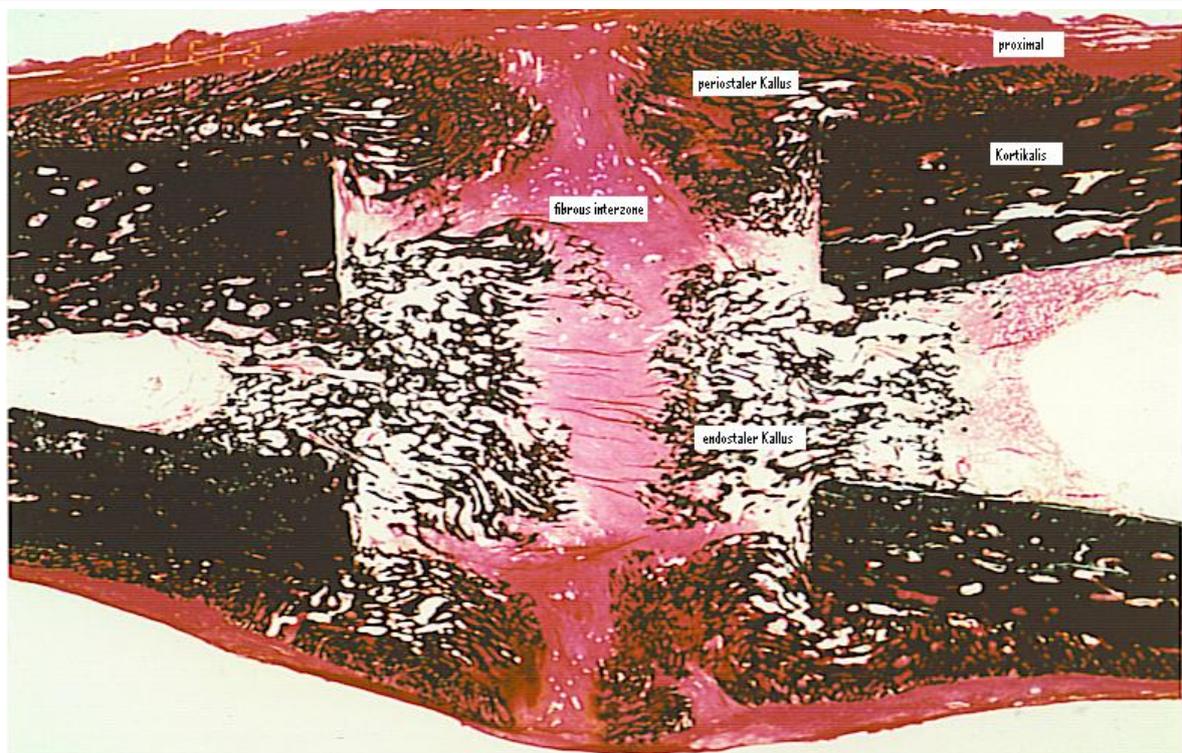


Abbildung 20: Van Kossa/Safranin-O, sagittaler Schnitt durch die Distractionszone

3.4 Histomorphometrie

3.4.1 Van Kossa-Färbung

Um den kalzifizierten Anteil der Kallusformation zu erfassen, wird die modifizierte van Kossa-Färbung angewendet. Durch diese biochemische Methode stellt sich dieser Anteil schwarz dar. Dies ermöglicht in den anschließenden histomorphometrischen Messungen eine genaue Detektierung der kalzifizierten Strukturen.

3.4.2 Einschlusskriterien

Um eine Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit der Messungen zu gewährleisten, werden nur zentral gelegene Schnitte der jeweiligen Tibia verwendet (L 3 - 4) mit der Bedingung, dass auf dem Schnitt proximal und distal jeweils zwei Kortices zur Darstellung kommen. Schräge oder versetzte Anschnitte der Distaktionszone, Teilanschnitte sowie peripher gelegene Schnitte werden ebenfalls ausgeschlossen. Bei drei der 20 Tiere ist es nicht möglich gewesen, Schnitte nach oben genannten Kriterien herzustellen. Letztendlich sind die Präparate von 17 Tieren zur endgültigen Auswertung der histomorphometrischen Daten verwertbar.

GH-Gruppe (n = 8): 5, 7, 11, 12, 16, 18, 23, 33

Placebo-Gruppe (n = 9): 8, 9, 10, 20, 21, 22, 24, 25, 31

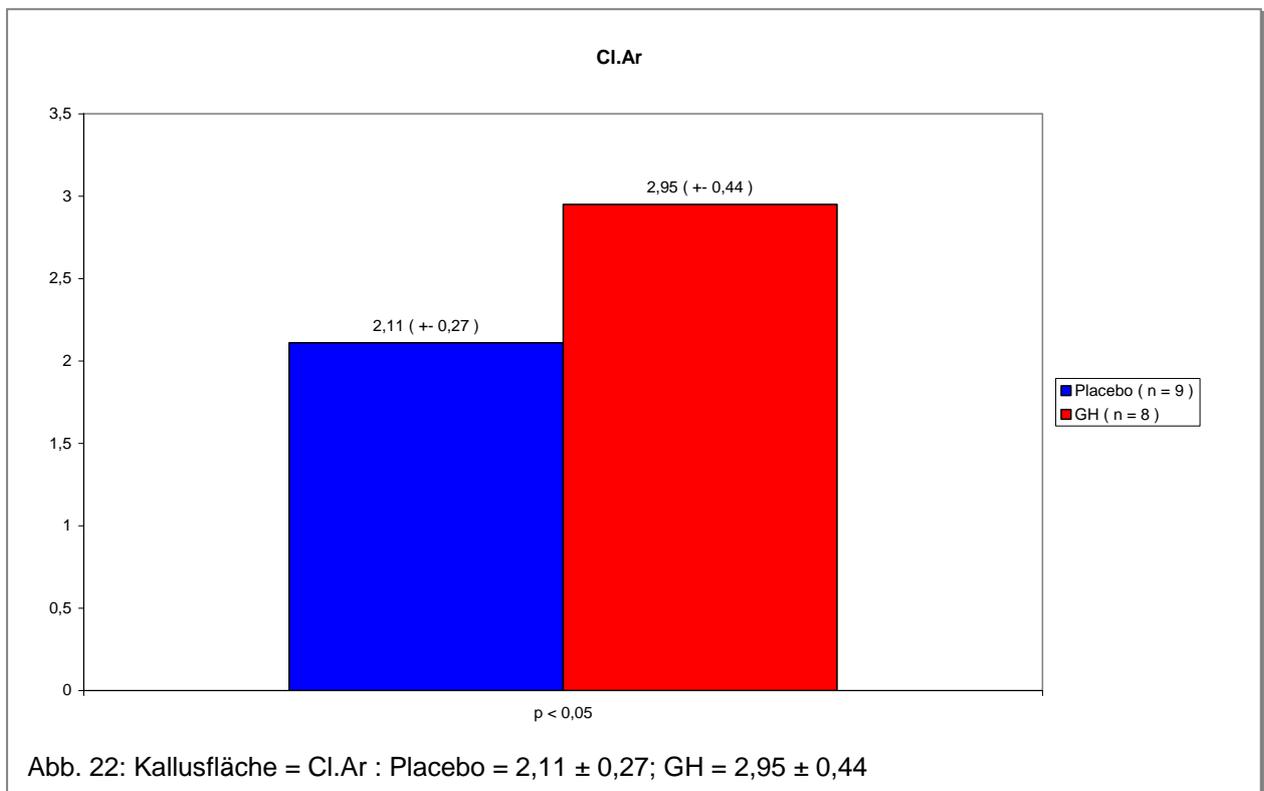
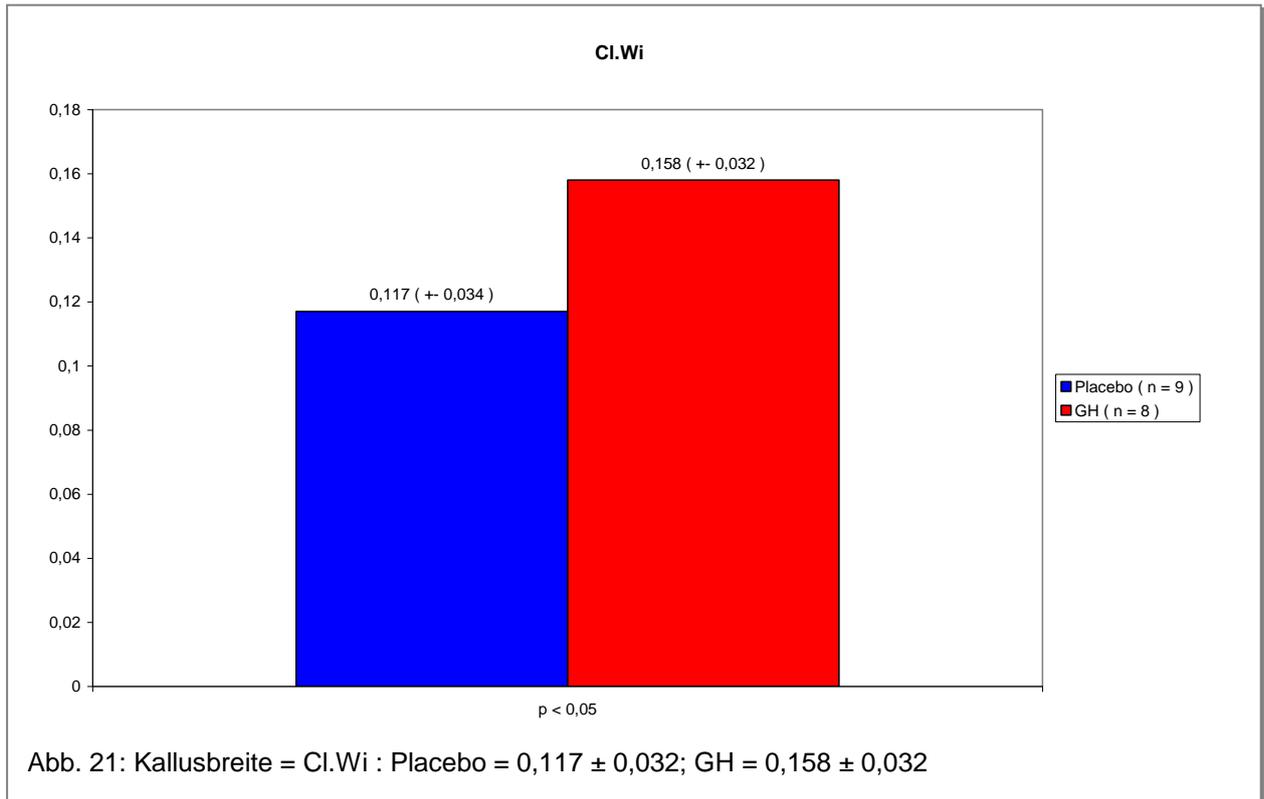
3.4.3 Histomorphometrische Ergebnisse

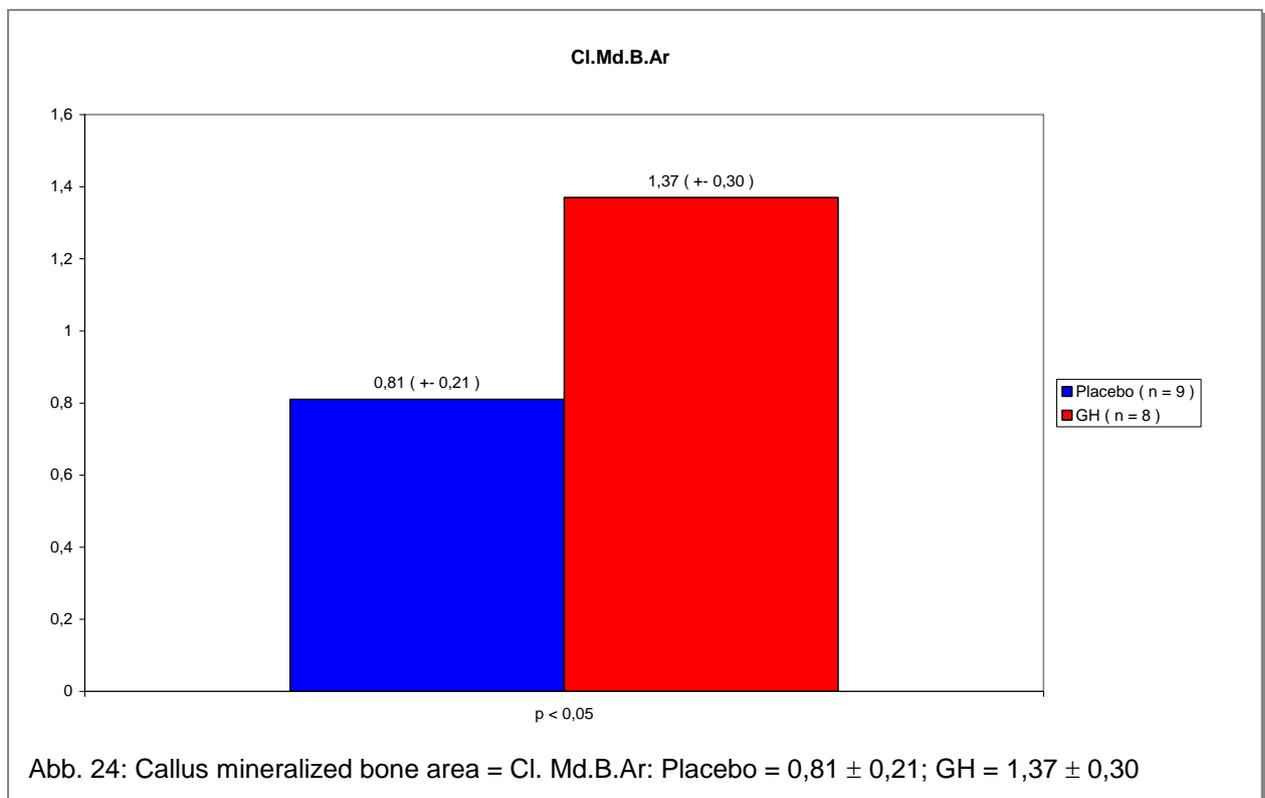
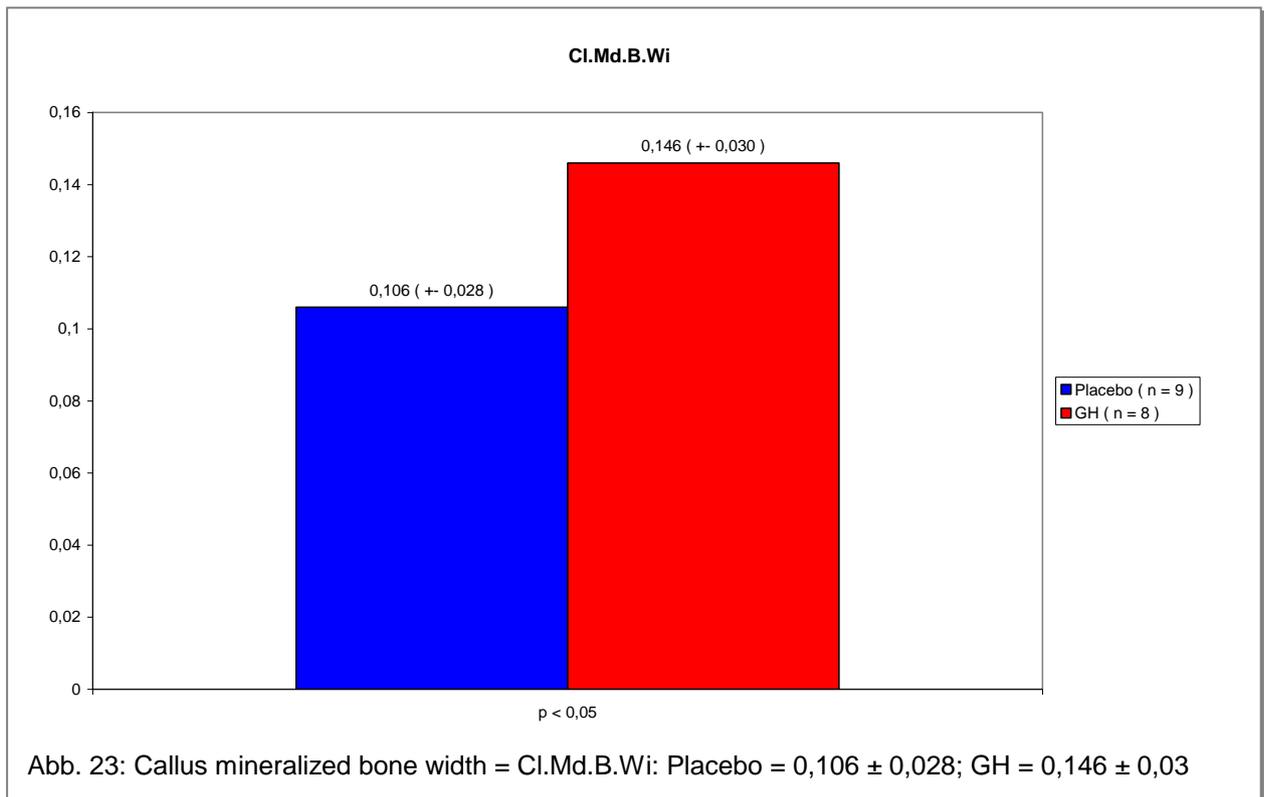
Histomorphometrische Messungen der mineralisierten Kallusanteile sowie des kortikalen Knochens bestätigen den oben beschriebenen visuellen Eindruck.

Wachstumshormonbehandelte Tiere zeigen bezogen auf die berechnete „sagittal section area“ (SI.Se.Ar.) als Bezugsfläche sowohl eine signifikant größere Kallusbreite und -fläche ($p < 0,05$, t-Test) als die der Kontrollgruppe (Abb. 21, 22 u. Tab. 7) als auch signifikant höhere Werte für die statischen Parameter i. e. die mineralisierten Kallusknochenanteile Breite und Fläche ($p < 0,05$, t-Test) (Abb. 23, 24 u. Tab. 7).

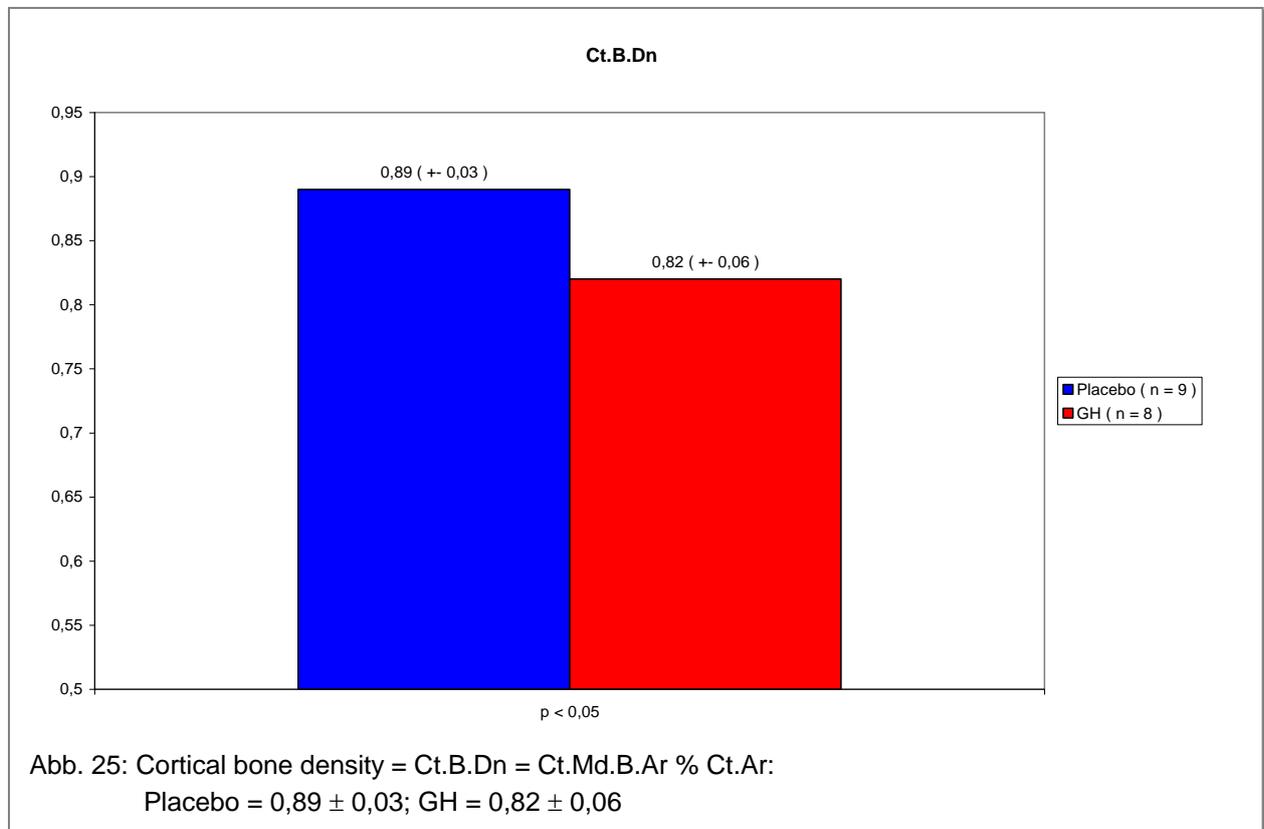
Tabelle 7 nach HJ Bail et al. (21): (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis)

	Placebo-Gruppe (n = 9)	GH-Gruppe (n = 8)	Signifikanz
SI.Se.Ar	208.68 ± 63.93 mm ²	174.72 ± 49.71 mm ²	n. s.
Cl.Wi	0.117 ± 0.034	0.158 ± 0.032	p < 0.05
Cl.Md.B.Wi	0.106 ± 0.028	0.146 ± 0.030	p < 0.05
Cl.Ar	2.11 ± 0.27	2.95 ± 0.44	p < 0.05
Cl.Md.B.Ar	0.81 ± 0.21	1.37 ± 0.30	p < 0.05
Cl.Md.B.Pm	0.39 ± 0.49	0.15 ± 0.23	n. s.
Ct.Ar	0.48 ± 0.07	0.55 ± 0.08	n. s.
Ct.Md.B.Ar	0.43 ± 0.13	0.46 ± 0.07	n. s.
Ct.Md.B.Pm	1.52 ± 0.34	2.25 ± 0.78	n. s.
L.Ar	0.41 ± 0.14	0.98 ± 0.21	p < 0.05





Des Weiteren wird ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$, t-Test) in der kortikalen Kno-
chendichte als Ausdruck des fortgeschrittenen Remodelings in der GH-Gruppe gefun-
den (Abb. 25; s. Tab. 5, Kap. 3.1.2).



Dagegen ergibt sich kein signifikanter Unterschied in der Kalluskno-
chendichte (callus bone density = Cl.B.Dn) sowie im Verhältnis des Kallusperimeter zur mineralisierten
Kallusknochenfläche (Cl.Md.B.Pm / Cl.Md.B.Ar) als Ausdruck der Kallusmikrostruktur.
(s. Tab. 5, Kap. 3.1.2 und Tab. 7, Kap. 3.4.3)

3.4.4 Ergebniszusammenfassung und Beantwortung der Fragestellung

Zusammenfassend bestätigt sich damit eine Stimulation der Kallusformation an Hand
der signifikant größeren Gesamt-Kallusfläche und -breite sowie der größeren Fläche
des mineralisierten Kallus durch systemische r-pGH-Gabe. Auf den Anteil des minerali-
sierten Knochengewebes, bezogen auf die totale Kallusfläche (Kno-
chendichte des Kal-
lus) sowie die Kallus-Mikrostruktur beider Gruppen, hat die r-pGH-Administration keinen
signifikanten Einfluss. Die höhere biomechanische Belastbarkeit in vivo und ex vivo ist
somit auf Größenzunahme und nicht auf die Qualität des gebildeten Regenerates zu-

rückzuführen. Die ausgeprägte periostale Kallusbildung mit überwiegend von hier ausgehender Penetration des kortikalen Knochens drückt sich in einer deutlich geringeren kortikalen Knochendichte als Zeichen für ein gesteigertes Remodeling in der Behandlungsgruppe aus. (21)

4 DISKUSSION

4.1 Histologie der Distractionsosteogenese unter GH-Gabe

Die Analyse der Einflüsse einer systemischen Administration von Wachstumshormon auf Konsolidierung und Struktur des Knochenregenerates bei Distractionsosteogenese ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Zum Zeitpunkt der Studie lag meines Wissens keine Literatur zu diesem Thema vor. Die Dissertationsschrift ist Bestandteil eines wissenschaftlichen Gesamtprojektes, zu welchem mittlerweile wesentliche Publikationen vorliegen (20, 21, 22, 23, 195, 198), s. auch Danksagung. Im Folgenden werden wesentliche histologische Unterschiede unter GH-Applikation aufgezeigt.

Das histologische Erscheinungsbild stimmt in den Grundzügen mit den Ergebnissen von *Aronson* und *Ilizarov* überein (10, 14, 116). Die bindegewebige Zwischenzone mit nach dem Distractionsvektor ausgerichteten kollagenen Fasern sowie die primäre Mineralisationsfront mit aufeinander zuwachsenden Knochsäulchen („microcolumns“) werden ebenfalls gesehen. Zu den einzelnen Zwischenstadien sind keine Aussagen möglich, da die vorliegenden Ergebnisse auf einen Zeitpunkt zwanzig Tage nach Distractionsbeginn basieren. Es liegt jedoch nahe, dass unter anderem das Osteotomiehämatom Ausgangspunkt des osteogenetischen Prozesses ist und der Mineralisationsablauf während der Distraction von transversal-longitudinal nach zentripetal fortschreitet (67, 66, 94, 187). Wie *Aronson* beobachten wir ebenfalls eine Zunahme der Säulen in longitudinaler und transversaler Richtung (7, 14). *Delloye* beschreibt ein ähnliches histologisches Bild zwei Wochen nach Distractionsbeginn (66, 67):

„Geflechtknochen trabekel füllen die Markhöhle bis zu den Knochenenden aus. Gleichzeitig beginnt die Proliferation der periostalen osteogenetischen Zellen in einigem Abstand zur Grenzzone. Junges Bindegewebe mit zahlreichen Kapillaren füllt den interfragmentären Defekt und wandert in das fibröse Exsudat und die Reste des Hämatoms ein. Diese frühen Vorgänge unterscheiden sich nicht von denen der Frakturheilung, die mittels gut durchblutetem Bindegewebe und Proliferation endostaler und periostaler osteogenetischer Zellen zur Kallusbildung führen. Als Resultat der Traktion entsteht schließlich ein Netzwerk longitudinal ausgerichteter Knochen trabekel, die stetig

aufeinander zuwachsen. An den freien Enden der Knochen trabekel sorgen Osteoblasten für deren Wachstum.“

In Übereinstimmung mit mehreren Autoren finden wir im Unterschied zu *Ilizarov* und *Aronson*, welche eine Kallusbildung ausgehend von den kortikalen Osteotomieflächen beschreiben, eine vom Periost und Endost ausgehende Kallusbildung sowie Knorpelgewebe im Regenerat (66, 85, 130, 132, 266). Letzteres wird hauptsächlich zirkulär um die Distaktionszone zwischen Mineralisationsfront und bindegewebiger Zwischenzone gesehen. Vereinzelt Chondrone stellen sich inmitten der bindegewebigen Zwischenschicht sowohl im Rand- als auch im mittleren Bereich dar. Bei der hier durchgeführten Distaktionsosteogenese am Minischwein wird sowohl überwiegend intramembranöse Ossifikation bei raschem Remodeling als auch ein nicht unerheblicher Anteil enchondraler Ossifikation nachgewiesen. Ob auch die von *Yasui* postulierte transchondroide Ossifikation stattfindet, ist nicht sicher zu beantworten (266). Es werden jedoch ebenfalls chondrozytenähnliche Zellen inmitten der kollagenen Fasern an der Grenze zwischen Bindegewebe und neugebildetem Knochen in direkter Nachbarschaft zu Osteozyten gesehen. Ob dies tatsächlich Chondrozyten oder Vorstufen der Osteozyten sind, bleibt jedoch fraglich (212).

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur und auch der vorliegenden Studie könnte die große Varianz der einzelnen Studiendesigns bieten. Durch Verwendung unterschiedlicher Tiermodelle ist eine mögliche Vergleichbarkeit nicht immer gegeben. *Aronson*, *Fink* und *Ilizarov* verwenden Hunde (9, 10, 84, 116). Das für die osteologische Grundlagenforschung geeignete Schwein unterscheidet sich möglicherweise in seiner Ossifikation unter Distaktionsosteogenese von anderen Tieren (113). Andere Parameter spielen jedoch eine nicht mindere Rolle. Wie oben schon aufgezeigt, ist die Art der Osteotomie von entscheidender Bedeutung. *Aronson* z. B. fordert zur Schonung der zentralen Blutgefäße die Verwendung eines Osteotoms (7, 16). Diese auch von *Ilizarov* geforderte Kortikotomie findet im vorliegenden Versuch keine Anwendung. Vielmehr erfolgt eine Osteotomie mittels oszillierender Säge unter Schonung des Periosts. *Delloye* und *Frierson* belegen unter diesen Bedingungen ein Ausbleiben der endostalen Kallusbildung mit histologisch nachweislich vermehrter Knorpelbildung (66, 85). Dies könnte eine Erklärung bieten, warum unsere Regeneratbildung im Gegensatz zu anderen Studien nicht von der gesamten Kortikalisschnittfläche, sondern primär vom Periost ausgeht. Im Gegensatz zu *Delloye* und *Frierson* wird in der vorliegenden Studie

jedoch zudem eine vom Endost ausgehende Kallusbildung gesehen, wenn auch geringer ausgeprägt als periostal. Die anteilige Knorpelbildung, die sich im Gegensatz zu *Ilizarovs* und *Aronsons* Arbeiten finden lässt, wäre damit begründet. *Giebel* findet chondrale Ossifikation bei mechanischer Instabilität oder vaskulärer Störung des Regenerates (94). Auch hierin könnten im vorliegenden Versuch Ursachen für die Knorpelbildung zu finden sein. Regelmäßige torsionale in vivo-Testungen, mögliche geringe Instabilitäten durch den von uns verwendeten Halbringfixateur sowie die hohe Distraktionsrate mit hieraus möglicher resultierender Minderperfusion könnten zur Störung der rein intramembranösen Ossifikation beigetragen haben. So tritt der Knorpel überwiegend im Randbereich der Distraktionszone auf, dem Bereich, der bei der biomechanischen Testung in vivo am meisten belastet wird. *Fink et al.* untersuchen den Anteil der enchondralen gegenüber der intramembranösen Ossifikation unter „regulären“ Distraktionsbedingungen und finden ebenso ein Verhältnis von 1:5 (84). Dies macht unsere Ergebnisse plausibel und zeigt, dass die Distraktionsosteogenese zwar prinzipiell intramembranös verläuft, in der Praxis aber meist mit einem Anteil enchondraler Ossifikation einhergeht.

Am Beispiel der sekundären Frakturheilung wissen wir um den Einfluss axialer Microbewegungen bzw. Scherkräften auf die Konsolidierung (18, 93, 134). Eine Untersuchung von *Claes* und *Heigeler* belegt durch den Vergleich eines „Finite Element Modells“ mit histologischen Ergebnissen eines Frakturmodells im Tierversuch den wichtigen Einfluss der lokal wirkenden Kräfte auf die Gewebsdifferenzierung im Kallus (51). In ihrer Hypothese findet ab einer bestimmten Kraftereinwirkung eine Umstellung von intramembranöser auf enchondrale Ossifikation statt. Sie wurde später durch *Gardner* zum Großteil bestätigt (90). Auch wenn sie sich auf die Heilungsprozesse implantierter Knochen nicht sicher übertragen lässt (93), bietet sie auch bei der in der vorliegenden Studie betrachteten Distraktionsosteogenese ein plausibles Erklärungsmodell für die oben geschilderten histologischen Befunde.

4.2 Einflüsse des GH auf Histomorphologie und -metrie der Distraktionsosteogenese

Es stellt sich als erstes die Frage, ob GH-Administration zu einer Stimulation der Knochenbildung im Kallus führt. Die Vermessung des mineralisierten Gewebes innerhalb des Regenerates ergibt hier einen signifikant höheren Knochenanteil. Gleichzeitig findet

sich in der GH-Gruppe ein signifikant höherer totaler sowie knöcherner Kallusdurchmesser. Entsprechend war die totale Kallusfläche ebenfalls signifikant grösser.

Da zum Zeitpunkt der Studie zum Thema der Einflussnahme von Wachstumshormonsubstitution auf die Distraktionsosteogenese diesbezüglich keine Literatur vorlag, kann sich im Folgenden nur auf Ergebnisse der Studien zum Thema der sekundären Frakturheilung bezogen werden. Obwohl sich die vorliegende Studie auf die intramembranöse Knochenbildung bei Distraktionsosteogenese bezieht, sind die Vorgänge auf zellulärer Ebene ähnlich. Transformation, Zellemigration- und Differenzierung, Osteoidablagerung und Kalzifizierung können, da sie ebenfalls zu Geflechtknochen führen, durchaus miteinander verglichen werden (72, 246).

Zahlreiche Studien befassen sich mit unterschiedlichen Ergebnissen mit der Einflussnahme auf Fraktur- oder Defektheilung durch Wachstumshormongabe (siehe Kap. 1.2.2: Tab. 3.1 u. 3.2).

Im Frakturmodell werden unterschiedlichste Versuchsdesigns sowie Wachstumshormondosen angewendet. Ein weiterer möglicher Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse dieser Studien, könnte die Verwendung artfremden Wachstumshormons sein. Zudem werden häufig Nagetiere verwendet. Beispielsweise wird bei Ratten der Heilungsprozess hauptsächlich durch non-osteonale Knochenbildung dominiert (25, 26, 27). Das Minischwein scheint dagegen sowohl bezüglich der endokrinologischen Abläufe als auch vom Ablauf der Frakturheilung mit dem Menschen vergleichbar zu sein (113). Durch das von uns verwendete speziesspezifische r-pGH wird einer möglichen Antikörperbildung (58, 149, 248) entgegengewirkt (s. u.). Außerdem werden in den meisten Studien Behandlungs- und Kontrollgruppe nicht gleichzeitig radiologisch, histologisch und biomechanisch untersucht, so dass Schlussfolgerungen schwierig zu bewerten sind. Verglichen mit den verschiedenen Frakturmodellen scheint die Distraktionsosteogenese durch standardisierte Osteotomie und standardisierte Distraction zudem ein einheitlicheres Modell der Knochenbildung zu sein.

Histologische Untersuchungen anderer Studien betrachten qualitativ die Menge des kalzifizierten Gewebes oder die Kallusmenge innerhalb der knöchernen Heilungszone mittels Scores als die relevanten Parameter, um den stimulatorischen Effekt des Wachstumshormons zu belegen. Die histomorphometrische Aufarbeitung unterbleibt zumeist. So zeigen einige Studien keine oder gar negative Einflüsse der GH-Gabe auf

die Kallusformation bei der sekundären Frakturheilung und auf die biomechanische Belastbarkeit der heilenden Knochen (47, 103, 154, 169, 174, 223). Einige beschreiben dagegen einen fördernden Einfluss des GH auf die Kallusformation (139, 136, 137, 170, 246). Diesbezüglich wurde jedoch nur eine qualitative Beschreibung der Kallusbeschaffenheit gegeben.

Die wichtigste histologische und auch histomorphometrische Studie zur Einflussnahme des Wachstumshormones auf die sekundäre Knochenheilung stammt von *Mosekilde* und *Bak*. In einem Tibia-Fraktur-Modell applizieren sie jungen Ratten humanes Wachstumshormon (2,7 mg/kgKG) über 20 Tage. Nach 30 Tagen findet sich histomorphometrisch in der GH-Gruppe ein signifikant größerer Kallusdurchmesser sowie eine signifikant größere totale Kallusfläche (161). Die Zunahme der Kallusfläche, des Knochengewebes und des Kallusdurchmessers der vorliegenden Studie wird durch diese Daten unterstützt.

Die Übereinstimmung der höheren postmortalen biomechanischen Steifigkeit mit den histologischen Ergebnissen findet sich ebenfalls. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten intravitalen Steifigkeitsmessungen weisen zudem schon kurz nach Beginn der GH-Gabe eine höhere Steifigkeit als in der Kontrollgruppe über den gesamten Versuchsablauf auf (195, 194, 198, 259).

Der große Unterschied zwischen intramembranöser Knochenbildung und sekundärer Frakturheilung besteht jedoch in der Knorpelbildung. Während diese bei der Frakturheilung sowie der chondralen Ossifikation elementar notwendig ist, läuft die rein intramembranöse Knochenbildung „achondral“ ab. Viele in vitro-Studien belegen, dass der Stimulationseffekt des GH auf das Knochenwachstum eine Aktivierung der Matrixbildung sowie der Proliferation der Chondrozyten einschließt (99, 146, 150, 171, 220, 243, 249, 256). Auf die Frage einer möglichen Einflussnahme auf die Knorpelbildung in der vorliegenden Studie soll hier nicht näher eingegangen werden, da sie Bestandteil einer anderen Arbeit ist. Insgesamt wird jedoch keine signifikante Stimulation der Knorpelfläche im Kallus unter GH-Gabe gesehen.

Wie oben schon erwähnt findet sich hier unter Gabe von homologem Wachstumshormon eine Zunahme der Knochenfläche im Kallus (hard callus). Dagegen zeigen die Kallusknochendichte und das Verhältnis des Kallusumfangs zur mineralisierten Knochenfläche des Kallus keinen signifikanten Unterschied. Die Frage nach einer mögli-

chen Veränderung der Strukturparameter des neu gebildeten Knochens unter Wachstumshormongabe kann somit verneint werden. Dies steht im Gegensatz zu der oben genannten Studie von *Mosekilde* und *Bak* (161). Diese finden ein höheres trabekuläres Knochenvolumen (TBV in % → Analog zum Parameter CI.B.Dn = Kallusknochendichte in der vorliegenden Arbeit) der Kontrollgruppe (TBV = 89 %) im Vergleich zur Versuchsgruppe nach dreißigtägiger Behandlung mit GH (TBV = 55 %). Die Autoren führen das auf eine massive Inavasion der Kallusfläche durch hämatopoetische Zellen während der Behandlung zurück. Das Ergebnis erklärt sich entweder durch ein Wachstum dieser Zellen auf Kosten des mineralisierten Gewebes oder durch dessen Zerstörung. In der vorliegenden Studie finden sich jedoch keine Unterschiede bezüglich einer Invasion der Knochenmarkszellen. Dies könnte auf das Alter der verwendeten Mikropigs zurückzuführen sein, da sich bei ihnen in den langen Röhrenknochen im Unterschied zu Ratten Fettmark befindet. Eine andere Erklärung bietet der Unterschied zwischen sekundärer Frakturheilung und Distraktionsosteogenese. Die Frakturheilung findet zum einen in zufällig gebildeten Räumen innerhalb des gebildeten Frakturhämatoms statt und geht zum anderen vom periostalen Zellgewebe aus. Die von engformatierten, fibrösen Spikulae ausgehende Knochenbildung der Distraktionsosteogenese lässt dagegen nur wenig Raum für eine Invasion der Knochenmarkszellen. Außerdem verwendeten *Mosekilde* und *Bak* eine ca. dreißigfach höhere Dosierung des GH. Diese könnte höher als die therapeutische Breite für Knochenstimulation gewesen sein und stattdessen über die massive Ausschüttung von IGF-I oder direkt durch GH eine Stimulation des Knochenmarkes bewirkt haben.

GH-Ausschüttung führt zu einer Zunahme der IGF-I-Produktion in Leber und Weichteilgewebe (81, 244). Neben einem direkten Effekt (160, 226) wirkt es über seinen Mediator somit indirekt auf mesenchymales Weichteilgewebe (225, 233, 238). Dabei mag der systemische IGF-I-Spiegel nicht den lokalen wiedergeben, ein Anstieg zeigt jedoch eine intakte GH/IGF-I-Achse und somit eine effektive Dosis an. *Yeh et al.* berichten über einen mäßigen systemischen sowie skelettalen IGF-I-Anstieg nach GH-Gabe (267, 264). Dagegen beschreiben *Carpenter et al.* einen fehlenden Effekt nach Administration von rekombinantem menschlichem Wachstumshormon in einem Kaninchenmodell (47). Der fehlende Anstieg des IGF-I-Basalspiegels in der GH-Gruppe (GH: 133 %, Placebo: 110 %) führt zur Annahme, dass Antikörper gebildet wurden. Nicht zuletzt differiert die Antwort der GH/IGF-I-Achse bei Ratten bzw. Kaninchen beträchtlich vom hier

nachgewiesenem starken Anstieg des IGF-I-Basalspiegels der Micropigs (GH: 440 %, Placebo: 97 %) (23, 29).

Zudem ist die in der vorliegenden Studie gewählte Wachstumshormondosis (100 µg/kgKG/d) lediglich so gewählt worden, dass die endogene GH-Produktion durch negativen Feedbackmechanismus gerade blockiert wird (persönliche Kommunikation Prof. Hans Orskov, Lehrstuhl für Endokrinologie, Universität Aarhus). Eine therapeutische Dosis ist damit erreicht. Sie liegt zwar höher als bei Substitution eines Hormonmangels (159, 210, 211), ist aber weit niedriger als die in anderen therapeutisch klinischen Studien verwendete. So werden beispielsweise bei polytraumatisierten oder brandverletzten Patienten zum Erhalt der GH/IGF-I-Achse 150 bis 200 µg/kgKG/d und höhere Dosen substituiert (144, 205).

Die zeitabhängige Wirkung der GH-Administration ist ebenfalls aus Studien bekannt. *Bak* findet eine Stimulation der Knochenheilung junger Ratten unter GH-Gabe während der ersten Heilungsphase (20 Tage) sowie über den gesamten Zeitraum von 40, nicht jedoch bei ausschließlicher Gabe in den letzten 20 Tagen (28). Bei älteren Ratten weist *Nielsen* ähnlich wie *Bak* einen positiven Effekt bei einer Behandlungsdauer von 2-3 Wochen, nicht jedoch bei Anwendungsdauer von nur einer Woche nach (170). *Northmore-Ball* findet einen mäßigen, nicht signifikanten Effekt während der ersten Heilungsphase (7.-10. Tag) und gar keinen Effekt bei längerer Behandlung (21.-35. Tag) (174). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass der größte Effekt möglicherweise in der sehr frühen Phase der Distraktionsosteogenese erzielt wird.

In der klinischen Anwendung der Distraktionsosteogenese findet üblicherweise keine signifikante Regeneratossifikation statt. In der vorliegenden Studie zeigen GH-behandelte Tiere bereits während der Distraktionsphase Ossifikationsprozesse. Dies deutet darauf hin, dass ein stimulatorischer Effekt mit Einbeziehung mesenchymaler Zellen und deren Differenzierung zu osteoblastischen Zellreihen besteht. Frühere in vitro-Studien belegen einen anabolen Effekt durch GH-Gabe auf Vorläuferzellen der Wachstumsfuge sowie Vorstufen der osteoblastischen Zellreihe, Chondrozyten und pluripotenten Mesenchymzellen (68, 99, 122, 124, 171, 175, 225, 226, 228, 229, 230, 233, 239, 249). Eine spätere Studie von *Stewart et al.* unterstützt unsere Ergebnisse. Sie zeigt unter IGF-I-Administration in einem Distraktionsmodell an der Mandibula an ausgewachsenen Hasen ebenfalls bereits während der Distraktionsphase eine gestei-

gerte osteoblastische Aktivität, welche zur vorzeitigen knöchernen Überbrückung führte (237).

Bei der Applikation von GH stellt sich zudem die Frage einer möglichen Stimulation der Knochenresorption. Wir haben dazu die Knochendichte, mineralisierte Fläche und Umfang der Kortikalen Knochenenden nahe der Osteotomie vermessen. Die Knochenheilung eines Röhrenknochens setzt den Umbau der Knochenenden durch Resorption und Remodeling voraus. Wir beobachten eine signifikant geringere Knochendichte der kortikalen Knochenenden in der GH-Gruppe. Dies deutet auf eine erhöhte Resorptionsrate und beschleunigtes Remodeling hin. Dabei zeigt ein Anstieg der Erosionsflächen nicht unbedingt eine erhöhte Resorptionsaktivität an. Die Flächenausdehnung ist hier von zwei Faktoren abhängig: der Lebensspanne der Resorptionslakunen sowie deren Neubildung. Eine Verlängerte Resorptionsphase als Zeichen einer verminderten Aktivität kann ebenfalls die Oberfläche vergrößern.

In vitro-Studien belegen bereits einen stimulatorischen Effekt auf die osteoklastische Resorption unter GH-Gabe (101, 109, 172). Zudem findet sich eine erhöhte systemische Resorptionsaktivität anhand erhöhter biochemischer Marker des Knochen- und Kollagenstoffwechsels, i. e. carboxyl-terminal Telopeptid des Typ-I-Kollagens (ICTP) und des murinen Hydroxyprolins (210, 211). Die vorliegende Studie unterstützt die Vermutung, dass GH direkt oder indirekt sowohl Osteoblasten als auch Osteoklasten stimuliert (40, 45, 80, 109, 131, 138). Sie zeigt klar, dass rpGH-Gabe im porcinem Modell die osteogenetische Aktivität während der Knochenheilung erhöht. Dies stimmt mit histologischen Ergebnissen anderer Studien überein, welche ebenfalls eine Stimulation der Kallusbildung bei sekundärer Frakturheilung nach GH-Gabe beschreiben (136, 139, 170, 246). Die vorliegende Studie erzielt durch Gabe von speziesspezifischen Wachstumshormonen ähnliche Ergebnisse in der Distraktionsosteogenese und erklärt zudem die in den biomechanischen Testergebnissen stabileren Regenerate (198). Auch im porcinem Frakturmodell zur sekundären Knochenheilung unserer Arbeitsgruppe findet sich eine beschleunigte Überbrückung eines knöchernen Defektes unter rpGH-Administration (22).

4.3 Die Bildanalyse

Wie oben schon aufgezeigt, ist die computergestützte Bildanalyse teilweise ein subjektives Messverfahren. Zum einen misst der Untersucher eventuell nicht unvoreingenommen genug oder aber nicht präzise. Dennoch sind die Daten aussagekräftig (53, 64). Die Bildanalyse als quantitative Messung kommt daher in der osteologischen Grundlagenforschung zum Beispiel der Osteoporose u. v. m. zum Einsatz. Mit der Zeit finden unterschiedlichste Methoden Anwendung (82, 91, 155, 241). Thomsen berichtet über die Beziehung zwischen statischen histomorphometrischen Daten und biomechanischer Belastbarkeit an menschlichen iliakalen Knochenbiopsien (242). Eine einheitliche Nomenklatur ermöglicht den Vergleich der erhobenen Daten (180, 181, 182). Diese bezieht sich jedoch ausschließlich auf die Vermessung lamellären Knochens.

Windhager et al. übertragen erstmals die Erhebung quantitativer, statischer histomorphometrischer Daten unter Verwendung der Bildanalyse auf den neu gebildeten Geflechtknochen bei Distractionsosteogenese. Zunächst verzichtet diese Arbeitsgruppe jedoch auf eine Standardisierung und berechnet die Kallusfläche in der Distractionszone ohne Bezugsfläche (261). Später quantifizieren *Windhager et al.* anhand von Mikroradiographien und polychromer Sequenzmarkierungen die totale Fläche sowie Dichte des neugebildeten Knochens während der Remodeling-Phase nach Segmenttransport in einem Schafmodell. Hierzu werden Bezugsflächen formuliert, i. e. hier die Verbindung der Kortices als kortikale Region, die gleich großen anschließenden Flächen als endost- bzw. periostale Region. Die Messungen werden jedoch nur innerhalb dieser vorgegebenen Flächen durchgeführt (260). *Fink et al.* berechnen den Anteil enchondraler zu intramembranöser Ossifikation unter Distractionsosteogenese und legen hierzu eine gleich große Bezugsfläche innerhalb des endostalen Knochengewebes fest (84).

Bezugsflächen in der Vermessung des Kallusgewebes (z. B. Geflechtknochen nach Distractionsosteogenese) festzulegen, hat sich weitgehend etabliert. Der Vorteil liegt in einer Vereinheitlichung, da hier im Gegensatz zu Knochenbiopsien kein einheitliches Volumen als Bezugsgröße vorgegeben ist. Die Daten werden somit härter und vergleichbar.

Um den Untersuchungsvorgang der vorliegenden Arbeit zu objektivieren, wird die Voreinstellung der Farbdetektion so gewählt und festgelegt, dass immer gleiche Untersuchungsbedingungen vorliegen. Bei schwarzer Färbung des vollständig kalzifizierten

Anteils wird die unterste Grauwertstufenerkennung so eingestellt, dass auch noch teilkalzifizierte Anteile als Grauwertabstufung erfasst werden. Der Untersucher kann sicher falsch detektierte Areale entweder entfernen bzw. zufügen oder die Grenze der Erkennung verstellen. Die ROI wird für jeden Schnitt in gleicher Weise festgelegt und eine Bezugsfläche aus den individuellen Breiten sowie dem Distraktionsabstand der Tibiae berechnet. Sie zeigt somit eine geringere Varianz als die berechnete Detektionsfläche (s. Abb. 17). Eine Vergleichbarkeit der Schnitte untereinander wird zudem durch Auswahl der möglichst gleichen Lokalisation im ursprünglichen Knochen erzielt. Da sich jeder Knochen individuell unterscheidet, ist auch hier eine mögliche Fehlerquelle gegeben.

Die Streubreite bei Referenzmessungen beträgt bei Mehrfachmessung durch dieselbe Person (Intraobserver Abweichung) $< 5 \%$.

Das Schneiden und Strecken der Präparate erfordert hohe Ansprüche an Material und Untersucher. Bruchstellen, Rillen- und Blasenbildung haben qualitativen und quantitativen Einfluss auf das Färbeergebnis. Auch die Färbung an sich kann durch geringgradige Abweichung der Komponenten oder des Färbeablaufes unterschiedlich ausfallen. Daher werden in der vorliegenden Arbeit die Färbungen sowie die Aufbereitung der Schnitte durch dieselben Personen durchgeführt.

Beim Vergleich der Ergebnisse mit denen anderer Studien sind daher unterschiedliche Färbemethoden sowie unterschiedliche technische Ausstattungen (Mikroskop, Computersoftware etc.) zu berücksichtigen. Unterschiedliche Voreinstellungen und nicht zuletzt unterschiedliche Untersucher können die Daten verfälschen.

4.4 Stärken und Schwächen der Arbeit

Als Teil eines Gesamtprojektes mit Erfassung mehrerer Fragestellungen stellt die vorliegende histologische Arbeit eine Endbetrachtung dar. Wir haben uns somit nicht ausschließlich auf den histologischen Aspekt fokussiert und können daher nicht wie bei *Lis Mosekilde et al.* (161) den „Verlauf“ der histologischen Vorgänge während der Distraktion aufzeigen. Das vollständige Remodeling des Knochenregenerates wird ebenfalls nicht abgewartet. Eine Aussage über die Rekortikalisierung und möglicherweise verzögertes Remodeling ist somit nicht möglich.

Der Einfluss mehrerer Doktoranden mit unterschiedlichen Interessen hatte möglicherweise Einfluss auf die Qualität. So werden durch biomechanische Testungen möglicherweise Gewebereize gesetzt, die sich auf den Regenerationsprozess auswirken. Die postmortale Steifigkeitsmessung zerstört möglicherweise trotz aller Vorsicht Gewebe. Durch Infektionen und nicht zuletzt deren notwendige medikamentöse Behandlung wird die Knochenbildung möglicherweise beeinflusst (111). Zum anderen können jedoch die übrigen erhobenen Teilergebnisse durch die histologischen Untersuchungen validiert werden.

Durch Verwendung eines speziesspezifischen Wachstumshormons wird einer eventuellen Antikörperbildung vorgebeugt. Die Dosierung entspricht in etwa der bei wachstumshormondefizienten Patienten angewandten, wohingegen andere Studien wesentlich höheren Dosen einsetzen (s. o). Das Schwein als Versuchstier scheint wegen der Vergleichbarkeit mit dem Menschen in der osteologischen Grundlagenforschung gut geeignet (113). Im Großen und Ganzen wird das *Ilizarov*-Konzept in der Durchführung der Distraktionsosteogenese umgesetzt (116). Ausnahmen bilden der speziell entwickelte Fixateur sowie die durchgeführte Osteotomie mit der oszillierenden Säge. Die unterschiedlichen Distraktionsraten und -rhythmen erklären sich aus der aus dem Vorversuch resultierenden Notwendigkeit, aussagekräftige Daten zu erlangen.

Unsere Studie lässt einen stimulatorischen Effekt von GH oder eines seiner Mediatoren auf Knochenbildung und Resorption während der Distraktionsosteogenese vermuten und kann dazu beitragen, die vielfältigen biologischen und mechanischen Einflüsse zu klären. Die systemische Applikation des GH setzt eine ausreichende Wirkung am „Wirkungsort“, i. e. mesenchymale Zellen des Knochenregenerates sowie Zellen des Periosts, voraus. Weitere Studien zur Erforschung der lokalen und systemischen Zytokinkonzentration, lokale Vaskularisation sowie Zytokinexpression unter GH-Gabe bei unterschiedlicher Dosierung sind daher notwendig. Die zeitabhängige Wirkung wäre durch Unterteilung der Behandlungsgruppen und Einschläferung zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu untersuchen. Hierzu wird jedoch ausreichende Anzahl an Versuchstieren benötigt.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Mehrere Studien belegen eine höhere biomechanische Stabilität des verheilten Knochens nach Applikation von Wachstumshormon (Somatotropin, GH) während der sekundären Frakturheilung (25, 27, 170, 224). Zudem wird eine schnellere Kallusbildung in Frakturmodellen dokumentiert. Histologisch zeigt sich unter Wachstumshormoneinfluss in früheren Versuchen jedoch eine lockere Kallusstruktur sowie ein verzögertes Model- und Remodeling (139, 161). Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss von systemisch appliziertem GH auf die Kallusstruktur und das Remodeling des Distraktionsregenerates bei der Kallusdistraktion. Bei 20 ausgewachsenen, weiblichen Yucatan Micropigs wird eine Tibia- und Fibulaosteotomie durchgeführt und anschließend mit einem Fixateur externe stabilisiert. Nach einer Latenzperiode von 4 Tagen wird über 10 Tage 2 mm/d distrahiert und eine Regenerationszeit von 10 Tagen eingehalten. Während des gesamten Versuchsablaufes erhalten Tiere der Versuchsgruppe (n = 10) täglich 100 µg/kgKG recombinantes porcines Wachstumshormon (r-pGH), Tiere der Kontrollgruppe (n = 10) zum gleichen Zeitpunkt ein Placebo (NaCl 0,9 %). Nach Einschläferung am Tag 25, biomechanischer Testung und histologischer Aufarbeitung wird eine quantitative histomorphometrische Analyse des gebildeten Kallus, des Knorpelanteils und des angrenzenden kortikalen Knochens durchgeführt (gesamt n = 17, GH-Gruppe n= 8, Placebo-Gruppe n = 9).

In vivo- sowie in vitro-Steifigkeitsmessungen ergeben signifikant höhere Werte der wachstumshormonbehandelten Tiere (195, 198, 259). In Korrelation dazu findet sich in den Knochenregeneraten der mit GH behandelten Tiere ein signifikant größerer mineralisierter Kallus ohne Unterschied in der Kallusmikrostruktur. Das Remodeling der Kortikalis scheint bei signifikant niedriger Knochendichte weiter vorangeschritten. Trotz vorherrschender intramembranöser Ossifikation werden in beiden Gruppen Knorpelinseln gesehen (20, 21, 22, 194).

Die vorliegende Arbeit zeigt in einem Modell der Distraktionsosteogenese unter Verwendung von Yucatan Micropigs und Applikation eines speziesspezifischen, recombinantem porcinem Wachstumshormons (r-pGH) eine Akzeleration der Kallusformation im Regenerat auf. Die vorliegende Studie befasst sich erstmals mit der Erhebung histomorphometrischer Parameter des Knochenregenerates im Rahmen der Distraktionsosteogenese unter GH-Substitution. Zum Zeitpunkt der Studie ist es unseres Wissens

der erstmalige Versuch, den Heilungsprozess der Distraktionsosteogenese mittels Wachstumshormon zu beschleunigen. Die histomorphometrische Analyse des Regenerates erfordert die Festlegung geeigneter Parameter zur Vermessung des gebildeten Geflechtknochens. Die Studie belegt eine Beschleunigung der Regeneratkonsolidierung, i. e. der Ossifikations- und Remodelingprozesse unter Wachstumshormonsubstitution bei Distraktionsosteogenese, ohne Veränderung der Mikrostruktur (21). Zukünftig als klinische Methode angewandt, kann es zu einer erheblichen Verkürzung der Ausheilungszeit nach Extremitätenverlängerung oder Segmenttransport beitragen. Klinisch ist die Anwendung von Wachstumshormon bereits in Erprobung.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Abbott LC. The operative lengthening of the tibia and fibula. *J. Bone Joint Surg* 1927;9:12.
2. Allan FG. Bone lengthening of the tibia and fibula. *J. Bone Joint Surg* 1948;30:490.
3. Aloia JF, Vaswani A, Meunier PJ, et al. Coherence treatment of postmenopausal osteoporosis with growth hormone and calcitonin. *Clacif Tissue Int* 1987;40:253-9.
4. Anderson WV. Leg lengthening. *J Bone Joint Surg* 1957;34:150.
5. Andrew JG, Hoyland J, Freemont AJ, Marsh D. Insulinlike growth factor gene expression in human fracture callus. *Clacif Tissue Int* 1993;53:97-102.
6. Arnold JS, Jee WSS. Embedding and sectioning undecalcified bone and its application to radioautography. *Stain Technol* 1954;29:225-239.
7. Aronson J, Good B, Stewart C, et al. Preliminary studies of mineralization during distraction osteogenesis. *Clin Orthop* 1990;250:43-9.
8. Aronson J, Harp JH. Mechanical forces as predictors of healing during tibial lengthening by distraction osteogenesis. *Clin Orthop* 1994;301:73-9.
9. Aronson J, Harrison B, Boyd CM, Cannon DJ, Lubansky HJ, Stewart C. Mechanical induction of Osteogenesis. Preliminary studies. *Ann. Clin Lab Sci* 1988;18:195-203.
10. Aronson J, Harrison BH, Stewart CL, Harp JH Jr. The histology of distraction osteogenesis using different external fixators. *Clin Orthop* 1989;241:106-16.
11. Aronson J, Johnson E, Harp JH. Local bone transportation for treatment of intercalary defects by the Ilizarov technique. Biomechanical and clinical considerations. *Clin Orthop* 1989;243:71-9.
12. Aronson J, Shen X. Experimental healing of distraction osteogenesis comparing metaphyseal with diaphyseal sites. *Clin Orthop* 1994;301:25-30.
13. Aronson J, Shen XC, Skinner RA, Hogue WR, Badger TM, Lumpkin CK Jr. Rat model of distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 1997;152:221-6.

14. Aronson J. Biological and clinical evaluation of distraction osteogenesis. *Clin Orthop* 1994;301:2-3.
15. Aronson J. Experimental and clinical experience with distraction osteogenesis Cleft. *Palate Craniofac J* 1994;31:473-81.
16. Aronson J. Temporal and spatial increases in blood flow during distraction osteogenesis. *Clin Orthop* 1994;301:124-31
17. Ashton IK, Dekel S. Fracture repair in the snell dwarf mouse. *Br J Exp Pathol* 1983;64:479-86.
18. Augat P, Burger J, Schorlemmer S, Henke T, Peraus M, Claes L. Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model. *J Orthop Res* 2003;21:1011-17.
19. Bab I, Gazit D, Muhlrad A, Shteyer A. Regenerating bone marrow produces a potent growth-promoting activity to osteogenic cells. *Endocrinology*. 1988;123:345-52. Erratum in: *Endocrinology* 1991;128:2638.
20. Bail HJ. Species specific growth hormone accelerates bone regenerate healing in distraction osteogenesis. 2nd Consensus Meeting European Tissue Repair Society, Freiburg 1997.
21. Bail HJ, Raschke MJ, Kolbeck S, Krummrey G, Windhagen HJ, Weiler A, Raun K, Mosekilde L, Haas NP: Recombinant species-specific growth hormone increases hard callus formation in distraction osteogenesis. *Bone* 2002; 30(1):117-24.
22. Bail HJ, Kolbeck S, Krummrey G, Schmidmaier G, Haas NP, Raschke MJ. Systemic application of growth hormone for enhancement of secondary and intramembranous fracture healing. *Hormon Res* 2002;58:39-42.
23. Bail HJ, Windhagen H, Dahne M, Lindner T, Kolbeck S, Raschke M: Systemic application of growth hormone (GH) increases serum bone turnover markers in distraction osteogenesis of micropigs. *Advanc Tissue Bank* 1997;1:147-55.
24. Bak B, Andreassen TT. Reduced energy absorption of healed fracture in the rat. *Acta Orthop Scand* 1988;59:543-51.

25. Bak B, Andreassen TT. The effect of growth hormone on fracture healing in old rats. *Bone* 1991;12:11-54.
26. Bak B, Jensen KS. Standardization of tibial fractures in the rat. *Bone* 1991;13:289-95.
27. Bak B, Jørgensen PH, Andreassen TT. Increased mechanical strength of healing rat tibial fractures treated with biosynthetic human growth hormone. *Bone* 1990;11:233-39.
28. Bak B, Jørgensen PH, Andreassen TT. The stimulating effect of growth hormone on fracture healing is dependent on onset and duration of administration. *Clin Orthop* 1991;264:295-301.
29. Bak B. Fracture healing and growth hormone. A biochemical study in the rat. *Dan Med Bull* 1993;40:519-36.
30. Banard R, Ng KW, Martin TJ, Waters MJ. Growth hormone (GH) receptors in clonal osteoblast like cells mediate a mitogenic response to GH. *Endocrinology* 1991;128:1459-64.
31. Baumgart R, Betz A, Kettler M, Zeiler C, Schweiberer L. Perspektiven der Kal-lusdistraktion. *Unfallchirurg* 1996;99:84-91.
32. Baylink DJ, Finkelmann RD, Mohan S. Growth factors to stimulate bone forma-tion. *J Bone Miner Res* 1993;8 Suppl 2: 565-72.
33. Benfer J, Struck H. Factor XIII and fracture healing. An experimental study. *Eur Surg Res* 1977;9:217-23.
34. Bier A. Die Bedeutung des Blutergusses für die Heilung des Knochenbruches. Heilung von Pseudarthrosen und von verspäteter Callusbildung durch Blutein-spritzung. *Med Klin* 1905;1:6.
35. Bier A. Über Knochenregeneration und über Pseudarthrosen. *Archiv f klin Chi-rurgie* 1923;127.
36. Boehringer ME, Beyer WF, Bail HJ, Weseloh G. Die kalzifizierte Knorpelzone im humanen Tibiakopf bei Früharthrosen. *Osteologie* 1995;4:69-79.

37. Boellard JW, von Hirsch T. Die Herstellung histologischer Schnitte von nicht entkalkten Knochen mittels Einbettung in Methaerylsäure-ester. *Mikroskopie* 1959;13:386-391.
38. Boer H, van Eek WH. The penetration of the embedding medium methyl methacrylate in undecalcified bone. *Microsc. Acta* 1979;81:181-88.
39. Bosworth DM. Skeletal distraction of the tibia. *Surg Gynaecol Obstet* 1938;66:912.
40. Brixen K, Nielsen HK, Mosekilde L, Flyvbjerg A. A short course of recombinant human growth hormone treatment stimulates osteoblasts and activates bone remodelling in normal human volunteers. *J Bone Miner Res* 1990;5:609-18.
41. Brunner U, Kessler S, Cordey J, Rahn B, Schweiberer L, Perren SM. Defektbehandlung langer Röhrenknochen durch Distractionsosteogenese (Ilizarov) und Marknagelung. Theoretische Grundlagen, tierexperimentelle Ergebnisse, klinische Relevanz. *Unfallchirurg* 1990;93:244-50.
42. Burkhardt RD. Präoperative Voraussetzung zur klinischen Histologie des menschlichen Knochenmarks. *1 Mitt: Blut* 1966;13:337-57.
43. Campbell JT, Kaplan FS. The role of morphogens in endochondral ossification. *Calcif Tissue Int* 1992;50:283-9.
44. Canalis E, Centrella M, McCarthy T. Effects of basic fibroblast growth factor on bone formation in vitro. *J Clin Invest* 1988;81:1572-7.
45. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Growth factors and the regulation of bone remodeling. *J Clin Invest* 1988;81:277-81.
46. Canalis E, McCarthy T, Centrella M. Isolation and characterization of insulin-like growth factor I (somatomedin-C) from cultures of fetal rat calvariae. *Endocrinology* 1988;122:22-7.
47. Carpenter JE, Hipp JA, Gerhart TN, Rudman CG, Hayes WC, Trippel SB. Failure of growth hormone to alter the biomechanics of fracture-healing in a rabbit model. *J Bone Joint Surg Am* 1992;74:359-67.

48. Chen MM, Yeh JK, Aloia JF, Tierney JM, Sprintz S. Effect of treadmill exercise on tibial cortical bone in aged female rats: a histomorphometry and dual energy x-ray absorptiometry study. *Bone* 1994;15:313-9.
49. Claes L, Burri C, Gerngroß H, Mutschler W. Die Beschleunigung der Frakturheilung durch Faktor XIII. *Helv Chir Acta* 1984;51:209-12.
50. Claes L, Burri C, Gerngross H, Mutschler W. Bone healing stimulated by plasma factor XIII. Osteotomy experiments in sheep. *Acta Orthop Scand* 1985;56:57-62.
51. Claes L. Heigele Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing. *J Biomech* 1999;30:255-66.
52. Codevilla A. On the means of lengthening in the lower limbs, the muscles, and tissues which are shortened through deformity. *Am J Orthop Surg* 1905;2:353.
53. Colton T. *Statistics in medicine*. Little, Brown & Co. Boston, 1974.
54. Compere EL. Indications for and against the leg lengthening operation. Use of the tibial bone graft as a factor in preventing delayed union, nonunion, or late fracture. *J Bone Joint Surg* 1936;18:692.
55. Compston JE, Mellish RW, Garrahan NJ. Age-related changes in iliac crest trabecular microanatomic bone structure in man. *Bone* 1987;8:289-92.
56. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC. Recombinant human bone morphogenetic protein-7 induces healing in a canine long-bone segmental defect model. *Clin Orthop* 1994;301:302-12.
57. Cook SD, Baffes GC, Wolfe MW, Sampath TK, Rueger DC, Whitecloud TS 3rd. The effect of recombinant human osteogenic protein - 1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76:827-38.
58. Cordoso AI, Llera AS, Iacono RF, et al. Heterologous humoral immune response in patients treated with human growth hormone from different sources. *Acta Endocrinol Kopenh* 1993;129:20-25.
59. Danielsen CC, Mosekilde L, Svenstrup B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, longterm ovariectomy, and estrogen substitution. *Calcif Tissue Int* 1993;52:26-33.

60. De Bastiani G, Aldegheri R, Renzi-Brivio L, Trivella G. Chondrodiastasis - controlled symmetrical distraction of the epiphyseal plate. *J Bone Joint Surg B* 1986;68:550.
61. De Bastiani G, Aldegheri R, Renzi-Brivio L, Trivella G. Limb lengthening by distraction of the epiphyseal plate. A comperison of two techniques in the rabbit. *J Bone Joint Surg B* 1986;68:545.
62. De Bastiani G, Aldegheri R, Renzi-Brivio L, Trivella G. Trivella Limb lengthening by callus distraction (Callotasis). *J Pediatr Orthop* 1987;7:129.
63. Delesse D. (1847): Zit. nach Weibel ER, Elias H. Introduction to Stereology and Morphology. In: *Quantitative Methods In Morphology*. Springer Verlag, Berlin 1967.
64. Delling G, Luehmann H, Baron R, Mathews CHE, Olah A. Investigation of intra- and inter-reader reproducibility. *Metab Bone Dis Rel Res* 1980;2:419-27.
65. Delling G. Simplified metacrylate embedding method for undecalcified bone sections. *Beitr Pathol* 1972;145:100-5.
66. Delloye C, Delefortrie G, Coutelier L, et al. Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthening: An experimental study. *Clin Orthop* 1990;250:34-42.
67. Delloye C. Morphological observations of a lengthened human femur with Ilizarov's technique (unpublished data).
68. Dennis LA, Birnbaum RS. A novel human insulin-like growth factor binding protein secreted by osteoblast-like cells. *Biochem Biophy Res Comm* 1991;176:213-8.
69. De Pablos J, Canadell J. Experimental physeal distraction in immature sheep. *Clin Orthop* 1990;250:73-80.
70. De Pablos J, Villas C, Canadell J. Bone lengthening by physeal distraction. An experimental study. *Int Orthop* 1986;10:163-70.
71. Donath K, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissue. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol* 1982;11:318-26.

72. Einhorn TA, Trippel SB. Growth factor treatment of fractures. *Instr Course Lect* 1997;46:483-6.
73. Einhorn TA. *The Biology of Fracture Healing*, ISFR -Symposium, Brüssel, 1992.
74. Eitenmüller J, Eisen E. Preparation of histological sections from nondecalcified cortical bone. *Z Mikrosk Anat Forsch* 1976;90:21-6.
75. Ejersted C, Andreassen TT, Oxlund H, et al. Human parathyroid hormone (1-34) and (1-84) increase the mechanical strength and thickness of cortical bone in rats. *J Bone Miner Res* 1993;8:1097-101.
76. Erben RG, Weiser H, Sinowatz F, Rambeck WA, Zucker H. Vitamin D metabolites prevent vertebral osteopenia in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int* 1992;50:228-36.
77. Erben RG. Embedding of bone samples in methylmetacrylate: an improved method suitable for bone histomorphometry, histochemistry, and immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1997;45:307-13.
78. Erben RG. Trabecular and endocortical bone surfaces in the rat: modeling or remodeling? *Anat Rec* 1996;246:39-46.
79. Eriksen EF, Charles P, Melsen F, Mosekilde L, Risteli L, Risteli J. Serum markers of type I collagen formation and degradation in metabolic bone disease: correlation with bone histomorphometry. *J Bone Miner Res* 1993;8:127-32.
80. Eriksen EF, Kassem M, Langedahl B. Growth hormone, Insulin like factors and Bone remodelling. *Europ J Clin Invest* 1996;26:525-34.
81. Eriksson A, Eden S, Fröhlander N. Continuous 24-hour secretion of growth hormone during late pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1988;67:543-7.
82. Fazzalari NL, Moore RJ, Manthey BA, Vernon-Roberts B. Comparative study of iliac crest and subchondral femoral bone in osteoarthritic patients. *Bone* 1992;13:331-5. Erratum in: *Bone* 1992;13:449.
83. Fidotti E. History of growth hormone injektion devices. *J Paediatric Endocrin Metab* 2001;14:497-501.

84. Fink B, Pollnau C, Vogel M, Skripitz R, Enderle A. Histomorphology of distraction osteogenesis during experimental tibia lengthening. *J Orthop Trauma* 2003;17:113-8.
85. Frierson M, Ibrahim K, Boles M, Boté H, Ganey T. Distraction osteogenesis. A comparison of corticotomy techniques. *Clin Orthop* 1994;301:19-24.
86. Froesch ER, Bürgi H, Ramseier EB, Bally P, Labhart A. Antibody suppressible and non-suppressible insulin-like activities in human serum and their physiological significance. *J Clin Invest* 1963;42:1816-34.
87. Frost HM. Preparations of thin undecalcified bone sections by rapid manual method. *Stain Technol* 1958;33:237.
88. Frost HM. Staining of fresh undecalcified thin bone sections. *Stain Technol* 1959;34:135.
89. Frost HM. The biology of fracture healing. An overview for clinicians. *Clin Orthop* 1989;248:283-93.
90. Gardner TN, Mishra S. The biomechanical environment of a bone fracture and its influence upon the morphology of healing. *Med Engen Phys* 2003;25:455-64.
91. Garrahan NJ, Mellish RW, Compston JE. A new method for the two-dimensional analysis of bone structure in human iliac crest biopsies. *J Microsc* 1986;142:341-9.
92. Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ, et al. Healing segmental femoral defects sheep using recombinant human morphogenetic protein. *Clin Orthop* 1993;300:317-26.
93. Geris L, van Oosterwyck H, et al. Assessment of mechanobiological models for the numerical simulation of tissue differentiation around immediately loaded implants. *Comp. Methods Biomech. Biolog Engen* 2003;6:277-88.
94. Giebel G. Kallusdistraction *Orthopäde* 1995;24:436-40.
95. Goodship AE, Kenwright J. The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fracture. *J Bone Joint Surg* 1985;67B:650-5.

96. Gördes W, Walcher K. Nachweismethoden des Knochenan- und -umbaues. Arch Orthop Unfallchir 1972;74:237-46.
97. Gotzen L, Baumgaertel F. Distraktionsosteogenese nach Ilizarov mit dem Monofixateursystem und erste klinische Erfahrungen am traumatisierten Unterschenkel. Unfallchirurg 1990;93:237-43.
98. Graves DT, Valentin-Opran A, Delgado R, Valente AJ, Mundy G, Piche J. The potential role of platelet-derived growth factor as an anautocrine or paracrine factor for human bone cells. Connect Tissue Res 1989;23:209-18.
99. Green H, Morikawa M, Nixon T. A dual effector theory of growth-hormone action. Differentiation 1985;29:195-8.
100. Grynblas MD, Alpert B, Katz I, Lieberman I, Pritzker KP. Subchondral bone in osteoarthritis. Calcif Tissue Int 1991;49:20-6.
101. Guicheux J, Heymann D, Rousselle AV, et al. Growth hormone stimulatory effects on osteoclastic resorption are partly mediated by insulin-like growth factor I: An in vitro study. Bone 1998;22:25-31.
102. Haboush EJ, Finkelstein H. Leg lengthening with new stabilizing apparatus. J Bone Joint Surg 1932;14:804.
103. Harris EH, Heaney RP, Jowsey J, et al. Growth hormone: the effect of skeletal renewal in the adult dog. I. Morphometric studies. Calcif Tissue Res 1972;10:1-13.
104. Harris IM, Bean DA, Banks HH. Effect of phosphate supplementation, thyrocalcitonin, and growth hormone on strength of fracture healing. Surg Forum 1975;26:519-21.
105. Harris SE, Bonewald S, Harris MA, et al. Effects of transforming growth factor beta on bone nodule formation and expression of bone morphometric protein 2, osteocalcin, osteopontin, alkaline phosphatase, and type I collagen mRNA in long-term cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. J Bone Miner Res 1994;9:855-63.
106. Hauschka PV, Mavrakos AE, Iafrafi MD, Doleman SE, Klagsbrun M. Growth factors in bone matrix. Isolation of multiple types by affinity chromatography on heparin - Sepharose. J Biol Chem 1986;261:12665-74.

107. Hellerer O, Bruckner WL, Frey KW, Westerburg KW, Klessinger U. Fracture healing under factor XIII medication. Arch Orthop Trauma Surg 1980;97:157-9.
108. Hessmann M, Rommes PM, Hainson K. Die Kallusdistraktion an Femur und Tibia. Unfallchirurg 1998;101:370-6.
109. Hill PA, Reynolds JJ, Meikle MC. Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and II stimulation of osteoclast formation and function. Endocrinology 1995;136:124-31.
110. Hindinger B, Büsing G. Schnelleinbettung unentkalkter Knochen von Mäusen für autoradiographische Untersuchungen kurzer wasserlöslicher Isotope durch Kontaktverfahren Mit AR 10 Strippingfilm. Histochemie 1971;26:333-42.
111. Ho ML, Chang JK, Wang GJ. Antiinflammatory drug effects on bone repair and remodeling in rabbits. Clin Orthop 1995;313:270-8.
112. Hock JM, Canalis E. Platelet-derived growth factor enhances bone cell replication, but not differentiated function of osteoblasts. Endocrinology 1994;134:1423-8.
113. Hoenig JF, Merten HA. Das Göttinger Miniaturschwein (GMS) als Versuchstier in der human-medizinischen osteologischen Grundlagenforschung. Z Zahnärztl Implantol 1993;IX:244-54.
114. Holbein O, Neidlinger Wilke C, Suger G, Kinzl L, Claes L. Ilizarov callus distraction produces systemic bone cell mitogens. J Orthop Res 1995;13:629-38.
115. Hüning M. Genexpression extrazellulärer Matrixproteine in einem Rattenmodell mit lokaler stimulierter Frakturheilung. 63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie, 1999.
116. Ilizarov GA, Barabash AP, et al. [Morphological characteristics of the formation and reconstruction of bone tissue in the replacement of extensive bone defects] Morfologicheskaja kharakteristika obrazovaniia i perestroiki kostnoi tkani pri zameshchenii obshirnogo defekta kosti. Ortop Travmatol Protez 1984;16-20. Russian.
117. Ilizarov GA. Clinical application of the tension-stress effect for limb lengthening. Clin Orthop 1990;250:8-26.

118. Ilizarov GA. The Ilizarov technique of leg lengthening. 16th Pediatric Orthopaedic International Seminar. San Francisco, California 1988.
119. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part I. The influence of stability of fixation and soft-tissue preservation. Clin Orthop 1989;238:249.
120. Ilizarov GA. The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. Clin Orthop 1989;239:263.
121. Ilizarov GA. Transosseous osteosynthesis. Theoretical and clinical aspects of the regeneration and growth of tissue. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 1992.
122. Inzucchi SE, Robbins RJ. Effects of growth hormone on human bone biology. J Clin Endocrinol Metab 1994;79:691-4.
123. Ippolito E, Peretti G, Bellocchi M, et al. Histology and ultrastructure of arteries, veins, and peripheral nerves during limb lengthening. Clin Orthop 1994;308:54-62.
124. Isaksson OG, Jansson JO, Gause IA. Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. Science 1982;216:1237-9.
125. Jingushi S, Heydemann A, Kana SK, Macey LR, Bolander ME. Acidic fibroblast growth factor (α FGF) injection stimulates cartilage enlargement and inhibits cartilage gene expression in rat fracture healing. J Orthop Res 1990;8:364-71.
126. Jingushi S, Joyce ME, Bolander ME. Genetic expression of extracellular matrix proteins correlates with histologic changes during fracture repair. J Bone Miner Res 1992;7:1045-55.
127. Jones KL, Addison J. Pituitary fibroblast growth as a stimulator of growth in cultured rabbit articular chondrocytes. Endocrinology 1975;97:359-65.
128. Jørgensen PH, Bak B, Andreassen TT. Mechanical properties and biochemical composition of rat cortical femur and tibia after long-term treatment with biosynthetic human growth hormone. Bone 1991;12:353-9.
129. Josten C, Muhr G. Der Tibiasegmenttransport. Unfallchirurg 1999;102:514-24.

130. Karaharju EO, Aalto K, Kahri A, et al. Distraction bone healing. *Clin Orthop* 1993;297:38-43.
131. Kassem M, Brixen K, Blum WF, Mosekilde L, Eriksen EF. Normal osteoclastic and osteoblastic response to exogenous growth hormone in patients with postmenopausal spinal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1994;9:1365-70.
132. Kawamura B, Hosono S, Takahashi T, et al. Limb lengthening by means of subcutaneous osteotomy: Experimental and clinical studies. *J Bone Joint Surg Am* 1968;50:851.
133. Keller J, Klamer A, Bak B, Suder P. Effects of local prostaglandin E2 on fracture callus in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1993;64:59-63.
134. Kenwright J, Goodship AE. The influence of axial micromovement on the healing of tibial fractures. *Lancet* 1988;1185-7.
135. Kirkeby OJ, Larsen TB, Nordsletten L, Skjeldal S, Ekeland A. Fracture weakens ipsilateral long bones: mechanical and metabolic changes after femoral or tibial injury in rats. *J Orthop Trauma* 1993;7:343-7.
136. Koskinen EV, Lindholm RV, Nieminen RA, Puranen J, Atila U. Humanes Wachstums-hormon bei Frakturen der langen Röhrenknochen mit verzögerter Knochen-bruchheilung. Tibiaschaftfrakturen und andere Knochenverletzungen. *Med Welt* 1975;26:1905-10.
137. Koskinen EV, Nieminen RA, Lindholm RV, Puranen J, Attila U. Human growth hormone in bone regeneration of non-healing-fracture. *Calcif Tissue Res* 1977;22 Suppl:521-3.
138. Koskinen EV, Ryöppy SA, Lindholm TS. Bone formation by induction under the influence of growth hormone and cortisone. *Isr J Med Sci* 1971;7:378-80.
139. Koskinen EV. The repair of experimental fractures under the action of growth hormone, thyrotropin, and cortisone. A tissue analytic, roentgenologic and autoradiographic study. *Ann Chir Gynaecol Fenn* 1959;90 Suppl:1-48.
140. Krompecher S. Die Beeinflussbarkeit der Gewebedifferenzierung der granulierenden Knochenoberflächen, insbesondere der Callusbildung. *Langenbecks. Arch Klin Chir* 1956;281:472-512.

141. Krompecher S. Die Knochenbildung. Gustav Fischer, Jena, 1937.
142. Krutsay M. Methode zur Darstellung einzelner Kalziumverbindungen in histologischen Schnitten. *Acta histochem* 1963;15:189-91.
143. Kuhn CD, Lutz EL. A modified polyester embedding medium for sectioning. *Stain Technol* 1958;35:261-5.
144. Lal SO, Wolf SE, Herndon DN. Growth hormone, burns and tissue healing. *Growth Horm IGF Res* 2000;10 Suppl B:39-43.
145. Li M, Mosekilde L, Søgaard CH, Thomsen JS, Wronski TJ. Parathyroid hormone monotherapy and cotherapy with antiresorptive agents restore vertebral bone mass and strength in aged ovariectomized rats. *Bone* 1995;16:629-35.
146. Lindahl A, Isgaard J, Carlsson L, Isaksson OG. Differential effects of growth hormone and insulin like growth factor I on colony formation of epiphyseal chondrocytes in suspension culture in rats of different ages. *Endocrinology* 1987;121:1061-69.
147. Lindholm RV, Koskinen EV, Puranen J, Nieminen RA, Kairaluoma M, Attila U. Human growth hormone in the treatment of fresh fractures. *Horm Metab Res* 1977;9:245-6.
148. Liu CC. A simplified technique for low temperature methyl methacrylate embedding. *Stain Technol* 1987;62:155-9.
149. Madon RJ, Panton DM, Flint DJ. Long-term effect of a sheep antiserum to rat growth hormone in vivo rats is explained by the rat anti-sheep immunoglobulin response. *J Endocrinol* 1991;128:229-37.
150. Madsen K, Friberg U, Roos P, Edén S, Isaksson O. Growth hormone stimulates the proliferation of cultured chondrocytes from rabbit ear and rib growth cartilage. *Nature* 1983;304:545-7.
151. Magnuson PB. Lengthening shortened bones of the leg by operation. Ivory screws with removable heads as a means of holding the two bone fragments. *Surg Gynaecol Obstet* 1913;17:63.
152. Malluche HH, Meyer W, Sherman D, Massry SG. Quantitative bone histology in 84 normal American subjects. *Calcif Tissue Int* 1982;34:449-455.

153. Malluche HH. *Faugere Atlas of Mineralized Bone Histology*. Chapter 8: Evaluation of Mineralized Bone Histology. Karger, Basel, 1986:37-48.
154. Markel MD, Wikenheiser MA, Chao EY. Formation of bone in tibial defects in a canine model. Histomorphometric and biomechanical studies. *J Bone Joint Surg Am* 1991;73:914-23.
155. Mellish RW, Ferguson MW, Cochran GV, Lindsay R, Dempster DW. A new manual method for assessing two-dimensional cancellous bone structure: comparison between iliac crest and lumbar vertebra. *J Bone Miner Res* 1991;6:689-96.
156. Merz WA, Schenk RK. A quantitative histological study on bone formation in human cancellous bone. *Acta Anat Basel* 1970;76:1-15.
157. Merz WA, Schenk RK. Quantitative structural analysis of human cancellous bone. *Acta Anat Basel* 1970;75:54-66.
158. Mohan S, Baylink DJ. Bone growth factors. *Clin Orthop* 1991;263:30-48.
159. Møller J, Jørgensen JO, Lauersen T, et al. Growth hormone dose regimens in adult GH deficiency: effects on biochemical growth markers and metabolic parameters. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1993;39:403-8.
160. Morel G, Chavassieux P, Barenton B, Dubois PM, Meunier PJ, Boivin G. Evidence for a direct effect of growth hormone on osteoblasts. *Cell Tissue Res* 1993;273:279-86.
161. Mosekilde L, Bak B. The effects of growth hormone on fracture healing in the rats: a histological description. *Bone* 1993;14:19-27.
162. Mosekilde L, Danielsen CC, Knudsen UB. The effect of aging and ovariectomy on the vertebral bone mass and biomechanical properties of mature rats. *Bone* 1993;14:1-6.
163. Mosekilde L, Kragstrup J, Richards A. Compressive strength, ash weight, and volume of vertebral trabecular bone in experimental fluorosis in pigs. *Calcif Tissue Int* 1987;40:318-22.
164. Mosekilde L, Søgaard CH, Danielsen CC, Tørring O. The anabolic effects of human parathyroid hormone (hPTH) on rat vertebral bone mass are also re-

- flected in the quality of bone, assessed by biomechanical testing: a comparison study between hPTH- (1-34) and hPTH- (1-84). *Endocrinology* 1991;129:421-8.
165. Mosekilde L, Weisbrode SE, Safron JA, et al. Calcium-restricted ovariectomized Sinclair S-1 minipigs: an animal model of osteopenia and trabecular plate perforation. *Bone* 1993;14:379-82.
166. Mosekilde L, Weisbrode SE, Safron JA, et al. Evaluation of the skeletal effects of combined mild dietary calcium restriction and ovariectomy in Sinclair S-1 minipigs: a pilot study. *J Bone Miner Res* 1993;8:1311-21.
167. Mosekilde L. Assessing bone quality – animal models in preclinical osteoporosis research. *Bone* 1995;17:343-852.
168. Mosekilde L. Normal age-related changes in bone mass, structure and strength – consequences of the remodelling process. *Dan Med Bull* 1993;40:65-83.
169. Mühlbach R, Hirthe D. Die Stoffwechselwirkungen des menschlichen Wachstumshormons und seine praktische Anwendung in der Orthopädie. *Beitr Orthop Traumatol* 1967;14:44-55.
170. Nielsen HM, Bak B, Jørgensen PH, Andreassen TT. Growth hormone promotes healing of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand* 1991;62:244-7.
171. Nilsson A, Isgaard J, Lindahl A, Dahlström A, Skottner A, Isaksson OG. Regulation by growth hormone of number chondrocytes containing IGF-I in rat growth plate. *Science* 1986;233:571-4.
172. Nishiyama K, Sugimoto T, Kaji H, Kanatani M, Kobayashi T, Chihara K. Stimulatory effect of growth hormone on bone resorption and osteoclast differentiation. *Endocrinology* 1996;137:35-41.
173. Nordsletten L, Kaastad TS, Obrant KJ, et al. Muscle contraction increases the vivo structural strength to the same degree in osteopenic and normal rat tibiae. *J Bone Miner Res* 1994;9:679-85.
174. Northmore Ball MD, Wood MR, Meggitt BF. A biomechanical study of the effects of growth hormone in experimental fracture healing. *J Bone Joint Surg Br* 1980;62:391-6.

175. Ohlsson C, Bengtsson BA, Isaksson OG, Andreassen TT, Słotweg MC. Growth hormone and bone. *Endocr Rev* 1998;19:55-79.
176. Olney BW, Jayaraman G. Joint reaction forces during femoral lengthening. *Clin Orthop* 1994;301:64-7.
177. Olney RC, Mougey EB. Expression of the components of the insulin-like growth factor axis across the growth plate. *Mol Cell Endocrinol* 1999;156:63-71.
178. Ombredanne L. Allongement d'un femur sur un membre trop court. *Bull Mem Soc Chirur* 1913;39:1177.
179. Paley D. Problems, obstacles and complications of limb lengthening by Ilizarov Technic. *Clin Orthop* 1990;250:81.
180. Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, et al. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987;2:595-610.
181. Parfitt AM. Bone histomorphometry: proposed system for standardization of nomenclature, symbols, and units. *Calcif Tissue Int* 1988;42:284-6.
182. Parfitt AM. Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units (summary of proposed system). *Bone* 1988;9:67-9.
183. Parfitt AM. Bone remodeling. *Henry Ford Hosp Med J* 1988;36:143-4.
184. Parfitt AM. Growth hormone and adult bone remodelling. *Clin Endocrinol Oxf* 1991;35:467-70.
185. Patterson D. Leg-lengthening procedures: A historical review. *Clin Orthop* 1990;250:27-33.
186. Peltonen J, Kahri A, Karaharju E, Alitalo I. Regeneration after physal distraction of the radius in sheep. *Acta Orthop Scand* 1988;59:675-80.
187. Peltonen J, Karaharju E, Aalto K, Alitalo I, Hietaniemi K. Leg lengthening by osteotomy and gradual distraction: an experimental study. *J Pediatr Orthop* 1988;8:509-12.
188. Perkins R, Skirving AP. Callus formation and the rate of healing of femoral fractures in patients with head injuries. *J Bone Joint Surg Br* 1987;69:521-4.

189. Perren SM, Rahn B, Cordey J. Mechanik und Biologie der Frakturheilung. Fortschr. Kiefer Gesichtschir. 1975;19:33-7.
190. Petersdorff VV, Buchartowski WD, et al. Arbeitsanweisung für die Methylmethacrylateinbettung unentkalkter Knochenkompakta für polarisationsoptische Untersuchungen. Z wiss Mikrosk 1971;70:213-7.
191. Putti V. Operative lengthening of the femur. Surg Gynaecol Obstet 1934;58:318.
192. Putti V. The classic: The operative lengthening of the femur. Clin Orthop 1990;250:4-7.
193. Raff T, Germann G. Wachstumshormon in der Chirurgie – Eine Standortbestimmung. Chirurg 1997;68:995-1003.
194. Raschke M, Bail H. Beschleunigtes Remodeling osteochondraler Defekte unter systemischer Applikation von Wachstumshormon – Eine histomorphologische Untersuchung am Miniaturschwein. 62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Unfallchirurgie. 1998
195. Raschke M, Bail H, Windhagen HJ, et al. Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis. Proc Orthop Res Soc 1997;162-72.
196. Raschke M, Ficke J, Freisleben C, Jansen D, Oedekoven G. Posttraumatic segmental and soft tissue defects of the tibia treated with Ilizarov Method. Injury 1993;24 Suppl 2:45-53.
197. Raschke M, Oedekoven G, Ficke J, Claudi BF. The monorail method for segment bone transport. Injury 1993;24 Suppl 2:54-61.
198. Raschke MJ, Bail H, Windhagen HJ, et al. Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis. Bone 1999;24:81-8.
199. Reeve J, Zanelli JM, Garrahan N, et al. Bone remodelling in hip fracture. Calcif Tissue Int 1993;53:108-12.
200. Richards A, Mosekilde L, Sogaard CH. Normal age-related changes in fluoride content of trabecular bone – relation to bone quality. Bone 1994;15:21-6.

201. Rinderknecht E, Humbel RE. Polypeptides with nonsuppressible insulin-like and cell-growth promoting activities in human serum: isolation, chemical characterisation, and some biological properties of form I and II. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1976;73:2365-9.
202. Rinderknecht E, Humbel RE. Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Letters* 1978;89:283-6.
203. Rinderknecht E, Humbel RE. The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 1978;253:2769-76.
204. Ring PA. Experimental bone lengthening of the femur. *Br J Surg* 1958;49:169.
205. Rockich KT, Hatton JC, Kryscio RJ, Young BA, Blouin RA. Effect of recombinant human growth hormone and insulin-like growth factor I administration on IGF-I and IGF-binding protein-3 levels in brain injury. *Pharmacotherapy* 1999;19:1432-6.
206. Romeis B. Untersuchung des Binde- und Stützgewebes. In: Boeck P (ed.). *Mikroskopische Technik*. Munich, Vienna, Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1989:559-61.
207. Rosival A. Über geometrische Gesteinsanalysen. Ein einfacher Weg zur ziffernmäßigen Feststellung des Quantitätsverhältnisses der Mineralbestandteile gemengter Steine. *Verh K K Geolog Reichsanst Wien*, 1968:5.
208. Salmon WD, Daughaday WH. A Hormonally controlled serum factor which stimulates sulphate incorporation by cartilage in vitro. *J Lab Clin Med* 1957;49:825-36.
209. Sandberg MM, Aro HT, Vuorio EI. Gene expression during bone repair. *Clin Orthop* 1993;289:292-312.
210. Sartorio A, Conti A, Monzani M, Morabito F, Faglia G. Growth hormone treatment in adults with GH deficiency: effects on new biochemical markers of bone and collagen turnover. *J Endocrinol Invest* 1993;16:893-8.
211. Sartorio A, Conti A, Monzani M. New markers of bone and collagen turnover in children and adults with growth hormone deficiency. *Postgrad Med J* 1993;69:846-50.

212. Schaser K, Bail H, Kolbeck S, Windhagen H, Strassmüller T, Raschke, M. Eine alternative Form der Regeneratbildung bei der Kallotasis: Eine histologische Untersuchung am Minischwein. *Unfallchirurg* 1997;268:734-5.
213. Schelling SH. Secondary (classical) bone healing. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1991;6:16-20.
214. Schenk RK, Merz WA, Müller J. A quantitative histological study on bone resorption in human cancellous bone. *Acta Anat Basel* 1969;74:44-53.
215. Schenk RK, Olch AJ, Herrmann W. Preparation of calcified tissue for light microscopy. In: Dickson GR (ed). *Methods of calcified tissue preparation*. Elsevier Science Publisher B. V., Amsterdam, New York, 1984:1-56.
216. Schenk RK, Perren SM. Biologie und Biomechanik der Frakturheilung am Röhrenknochen als Grundlage der Osteosynthese. *Hefte Unfallheilkd* 1977;129:29-41.
217. Schenk RK, Willenegger HR. Zur Histologie der primären Knochenheilung. Modifikation und Grenzen der Spalthheilung in Abhängigkeit der Defektgröße. *Hefte Unfallheilkd* 1977;80:155-60.
218. Schenk RK. Morphometrische Analyse der Umbauvorgänge in der Kompakta des Knochens. In: *Quantitative Methods in Morphology*, Springer Verlag, Berlin, 1967.
219. Schenk RK. Zur histologischen Verarbeitung von unentalktem Knochen. *Acta Anatom* 1965;60:3-19.
220. Schlechter NL, Russell SM. Evidence suggesting that the direct growth promoting effect of growth hormone on cartilage in vivo is mediated by local production of somatomedin. *Proc Natl Acad Sci* 1986;83:7932-4.
221. Schumacher B, Albrechtsen J, Keller J, Flyvbjerg A, Hvid I. Periosteal insulin-like growth factor I and bone formation. Changes during tibial lengthening in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1996;67:237-41.
222. Seibold R, Eitel F, Waldner H, Brunner U, von Hagens G. Neuartige Anwendung der Plastination in der Knochenhistologie. *Unfallchirurg* 1991;94:624-33.

223. Shepanek L. The effect of endocrine substances (ACTH and growth hormone) on experimental fractures. *Surg Gynaecol Obstet* 1953;96:200-4.
224. Silberberg M, Silberberg R. Influence of acid extract of cattle pituitary gland on bone repair in young guinea pigs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1935;33:113-9.
225. Slootweg MC, Hoogerbrugge CM, de Poorter TL, Duursma SA, van Buul-Offers SC. The presence of classical insulin-like growth factor (IGF) type-I and-II receptors on mouse osteoblasts: autocrine / paracrine growth effect of IGFs? *J Endocrinol* 1990;125:271-7.
226. Slootweg MC, Salles JP, Ohlsson C, de Vries CP, Engelbregt MJ, Netelenbos JC. Growth hormone binds to a single high affinity receptor site on mouse osteoblast: modulation by retinoic acid and cell differentiation. *J Endocrinol* 1996;150:465-72.
227. Slootweg MC, van Buul-Offers SC, Hoogerbrugge CM, et al. Characterization of growth factor activity produced by fetal mouse osteoblasts. *J Endocrinol* 1990;124:301-9.
228. Slootweg MC, van Buul-Offers SC, Herrmann-Erlee MP, Duursma SA. Direct stimulatory effect of growth hormone on DNA synthesis of fetal chicken osteoblasts in culture. *Acta Endocrinol Copenh* 1988;118:294-300.
229. Slootweg MC, van Buul-Offers SC, Herrmann-Erlee MP, van der Meer JM, Duursma SA. Growth hormone is mitogenic for fetal mouse osteoblasts but not for undifferentiated bone cells. *J Endocrinol* 1988;116:11-3.
230. Slootweg MC. Growth hormone and bone. *Horm Metab Res* 1993;25:335-43.
231. Sofield HA, Blair SJ, Millar EA. Leg lengthening: A personal follow-up of 40 patients some years after operation. *J Bone Joint Surg Am* 1958;40:311.
232. Søggaard CH, Danielsen CC, Thorling EB, Mosekilde L. Long-term exercise of young and adult female rats: effect on femoral neck biomechanical competence and bone structure. *J Bone Miner Res* 1994;9 Suppl 3:409-16.
233. Sørensen MT, Chaudhuri S, Louveau I, Coleman ME, Etherton TD. Growth hormone binding proteins in pig adipose tissue: number, size, and effects of pGH treatment on pGH and bGH binding. *Domest Anim Endocrinol* 1992;9:13-24.

234. Spencer EM, Liu CC, Si EC, Howard GA. In vivo actions of insulin-like growth factor I (IGF I) on bone formation and resorption in rats. *Bone* 1991;12:21-6.
235. Stanitski DF. The effect of limb lengthening on articular cartilage. An experimental study. *Clin Orthop* 1994;301:68-72.
236. Stanitski DF. Treatment of deformity secondary to metabolic bone disease with the Ilizarov technique. *Clin Orthop* 1994;301:38-41.
237. Stewart KJ, Weyand B, van't Hof RJ, et al. A quantitative analysis of the effect of insulin-like growth factor-1 infusion during mandibular distraction osteogenesis in rabbits. *Br J plast Chir* 1999;52:343-50.
238. Strobl JS, Thomas MJ. Human growth hormone. *Pharmacol Rev* 1994;46:1.
239. Syftestad GT, Urist MR. Growth hormone dependent matrix-induced heterotopic bone formation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1980;163:411-5.
240. Thaller SR, Hoyt J, Tesluk H, Holmes R. Effect of insulin-like growth factor-I on zygomatic arch bone regeneration: a preliminary histological and histometric study. *Ann Plast Surg* 1993;31:421-8.
241. Thomsen JS, Ebbesen EN, Mosekilde L. Relationships between static histomorphometry and bone strength measurements in human iliac crest bone biopsies. *Bone* 1998;22:153-63.
242. Thomsen JS, Mosekilde L, Boyce RW, Mosekilde E. Stochastic simulation of vertebral trabecular bone remodeling. *Bone* 1994;15:655-66.
243. Trippel SB, Wroblewski J, Makower AM, Whelan MC, Schoenfeld D, Doctrow SR. Regulation of growth-plate chondrocytes by insulin-like growth factor-I and basic fibroblast growth factor J *Bone Joint Surg Am* 1993;75:177-89.
244. Trippel SB. Growth factors as therapeutic agents. *Instr Course Lect* 1997;46:473-6.
245. Turner CH. Functional determinants of bone structure: beyond Wolff's law of bone transformation [editorial]. *Bone* 1992;13:403-9.
246. Udupa KN, Gupta LP. The effect of growth hormone and thyroxine in healing of fracture. *Indian J Med Res* 1965;53:623-8.

247. Ueckert E. Polyester resin embedding for sectioning of hard and soft tissue. *Stain Technol* 1960;35:261-5.
248. Van Herpen H, Rijnberk A, Mol JA. Production of antibodies to biosynthetic human growth hormone in the dog. *Vet Rec* 1994;134:171.
249. Vetter U, Zapf J, Heit W, et al. Human fetal and adult chondrocytes. Effect of insulinlike growth factor I and II, insulin, and growth hormone on clonal growth. *J Clin Invest* 1986;77:1903-8.
250. Vitalli HP. Knochenerkrankungen. Histologie und Klinik. Sandoz-Monographien, Nürnberg, 1970.
251. Von Hirsch T, Boellard JW. Methacrylsäure-ester als Einbettungsmittel in der Histologie. *Z wiss Mikr* 1958;64:24-9.
252. Wagner H. Operative Beinverlängerung. *Chirurgie* 1971;42:260.
253. Wang JS. Basic fibroblast growth factor for stimulation of bone formation in osteoinductive or conductive implants. *Acta Orthop Scand* 1996;269:1-33.
254. Wasserstein I. Distraktions-Kompressionsmethode zur Verlängerung von verkürzten Extremitäten unter Verwendung von zylindrischen homologen Knochentransplantaten. Presented at the 16th Pediatric. Orthopaedic. International Seminar, San Francisco, 1988.
255. Wergedal IE, Mohan S, Lundy M, Baylink DJ. Skeletal growth factor and other growth factors known to be present in bone matrix stimulate proliferation and protein synthesis in human bone cells. *J Bone Miner Res* 1990;5:179-86.
256. Werther GA, Haynes KM, Barnard R, Waters MJ. Visual demonstration of growth hormone receptors on human growth plate chondrocytes. *J Clin Endocrinol Metab* 1990;70:1725-31.
257. Wiedemann M. Morphologische Grundlagen der Kallusdistraktion. *Zentralbl Chir* 1994;119:587-93.
258. Wiedemann M. Callus distraction: a new method? A historical review of limb lengthening. *Clin Orthop* 1996;327:291-304.

259. Windhagen H, Bail H, Kolbeck S, Weiler A, Blaschke R, Raschke M. Bone regenerate strength can be quantitatively assessed with in-vivo torsional stiffness measurements. *Proc Soc Orth Res Soc* 1997;228.
260. Windhager R, Groszschmidt K, Tsuboyama T, et al. Recorticalization after bifocal internal bone transport in the double-plated sheep femur. *J Orthop Res* 1996;14:94-101.
261. Windhager R, Tsuboyama T, Siegl H, et al. Effect of bone cylinder length on distraction osteogenesis in the rabbit tibia. *J Orthop Res* 1995;13:620-8.
262. Wong GL, Kotliav D. IGF-I production by mouse osteoblasts. *J Bone Miner Res* 1990;5:133-140.
263. Wuester C. Growth hormone and bone metabolism. *Acta Endocrinol Copenh* 1993;128:14-8.
264. Yasui N, Kojimoto H, Sasaki K, Kitada A, Shimizu H, Shimomura Y. Factors affecting callus distraction in limb lengthening. *Clin Orthop* 1993;293:55-60.
265. Yasui N, Kojimoto H, Shimizu H, Shimomura Y. The effect of distraction upon bone, muscle, and periosteum. *Orthop. Clin North Am* 1991;22:563-7.
266. Yasui N, Sato M, Ochi T, et al. Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. *J Bone Joint Surg Br* 1977;9:824-30.
267. Yeh JK, Aloia JF, Chen M, Ling N, Koo HC, Millard WJ. Effect of growth hormone administration and treadmill exercise on serum and skeletal IGF-I in rats. *Am J Physiol* 1994;266:129-35.
268. Yeh JK, Aloia JF, Chen M. Growth hormone administration potentiates the effect of treadmill exercise on long bone formation but not on the vertebrae in middle-aged rats. *Calcif Tissue Int* 1994;54:38-43.
269. Zheng MH, Wood DJ, Papadimitriou JM. What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation. *Pathol Res Pract* 1992;188:1104-21.

LEBENS LAUF

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

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

DANKSAGUNG

Herrn Prof. Dr. med. N. P. Haas, ehemals Direktor der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der Charité / Campus Virchow Klinikum und Herrn Prof. Dr. med. J. Bail, Chefarzt der Klinik Unfall- und orthopädische Chirurgie am Klinikum Nürnberg Süd, möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die mir zu jeder Zeit gewährte Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit meinen Dank aussprechen. Letzterem vor allem im Rahmen der Betreuung des histologischen Teils für die Hilfe bei der Herstellung und Auswertung der histologischen Schnitte sowie bei der statistischen Auswertung und kritischen Durchsicht meiner Arbeit. Die von mir maßgeblich erbrachten vorliegenden Ergebnisse waren zudem Bestandteil seiner Veröffentlichungen, i.e. Bail HJ, Raschke MJ, Kolbeck S, Krummrey G, Windhagen HJ, Weiler A, Raun K, Moseklide L, Haas NP: Recombinant species-specific growth hormone increases hard callus formation in distraction osteogenesis. Bone 2002; 30(1):117-24, (21). Aufgrund einer erkrankungsbedingten längeren Abwesenheit wurde mein Name damals nicht als Autorin benannt.

Die Operationen an den Versuchstieren, die Aufbereitung des Sektionsgutes wurden gemeinsam mit der DOG (Distraction Osteogenesis Group) des Zentrums für Muskuloskeletale Chirurgie der Medizinischen Fakultät der Charité Berlin durchgeführt. Herrn Prof. Dr. med. H. Windhagen, Herrn Dr. med. S. Kolbeck und Herrn Dr. med. A. Weiler danke ich für die gute Zusammenarbeit ohne die ein Gelingen der Studie nicht möglich gewesen wäre.

Mein besonderer Dank gilt im Rahmen der histologischen Aufarbeitung meinen Kommilitoninnen Frau Simonetta Niendorf und Frau Renate Marder sowie meinem Kommilitonen Herrn Dr. med. Thomas Straßmüller und den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Gabriele Hardung und Frau Marzena Princ zur gegenseitigen Motivation und jederzeit hilfreichen Zusammenarbeit.

Für die Bereitstellung des für die dieser Arbeit zugrunde liegenden histomorphometrischen Untersuchungen benötigten Bildanalysesystems, sowie der Erstellung der erforderlichen Programme möchte ich Frau Julie Steege ebenfalls meinen Dank aussprechen.

Ebenso dem Tierschutzbeauftragten, den Tierpflegern und Tierärzten der tierexperimentellen Abteilung der Charité, Campus Virchow Klinikum.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich versichere an Eides Statt, dass ich das benutzte Schrifttum vollständig erwähnt habe und die Dissertation noch von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist. Sie wurde selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und stellt auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dar.

Soest, den 25.08.2017

Silke Eckelt