

1 EINLEITUNG

1.1 Einleitung Auf dem Wege, eine Substanz zu finden, mit der sich der Knochenstoffwechsel und damit auch die Knochenbruchbehandlung pharmakologisch positiv beeinflussen läßt, nimmt in der derzeitigen wissenschaftlichen Forschung das Wachstumshormon eine besondere Stellung ein. Wir wissen heute, daß das Hormon im Zusammenspiel mit einer Vielzahl weiterer Hormone und Gewebefaktoren - neben seiner regulativen Funktion auf den Zellstoffwechsel vieler Gewebe des gesunden Organismus - eine wichtige Rolle in der Regulation von Wachstum und Heilung von verletztem Gewebe spielt. Dies gilt im besonderen Maße für das Knorpel- und für das Knochengewebe. Diese Tatsache hat das Hormon vor allem für die Forschung in der Traumatologie und in der Orthopädie interessant gemacht.

Die intensive Beforschung des Wachstumshormon in den vergangenen Jahren hat in wenigstens zweierlei Hinsicht große Fortschritte erbracht: Zum einen sind in molekularbiologischen Forschungen zahlreiche Erkenntnisse über die Abläufe auf der molekularen und zellulären Ebene der Knochenbruchheilung und des Knochenwachstums gewonnen worden. Zum anderen haben eine ganze Reihe präklinischer, tierexperimenteller Studien zu einem größeren Verständnis der Wirkungsweise der Hormone und Gewebefaktoren im lebendem Organismus beigetragen. Dies ist in Kürze in den folgenden, einleitenden Kapiteln dargestellt. Es bleibt hinzuzufügen, daß es gerade die Fortschritte in der molekularbiologischen Forschung möglich gemacht haben, daß heutzutage durch die technisch mögliche Produktion rekombinanter Hormone diese in größeren Mengen und zu akzeptablen Preisen für großangelegte Experimente zur Verfügung stehen.

Im Ergebnis ließen sich die Wirkungsweise und der stimulierende Effekt des Wachstumshormon bei der Bildung von Knorpel- und Knochengewebe sicher nachweisen. Ob und in welchem Maße dieser stimulierende Effekt auch für den heilenden Knochen zutrifft, und somit das Wachstumshormon in der Zukunft eine therapeutische Möglichkeit in der Knochenbruchbehandlung sein könnte, galt es noch festzustellen.

In vorausgehenden Studien unserer Arbeitsgruppe hatten wir einen solchen positiven Effekt mit systemisch verabreichtem Wachstumshormon im Tierexperiment anhand einer Distraktionsosteogenese zeigen können. [4;62]

1.2 Das Wachstumshormon Das Wachstumshormon (Growth Hormone [GH]; Somatotropin; STH) ist neben TSH, ACTH, FSH und LH eines der stoffwechselregulierenden Polypeptidhormone der Adenohypophyse. Die Sekretion dieser Hormone wird durch den Hypothalamus als übergeordnetem Zentrum über Releasing- bzw. inhibitorisches Hormon reguliert. [75] (Abb. 1.1)

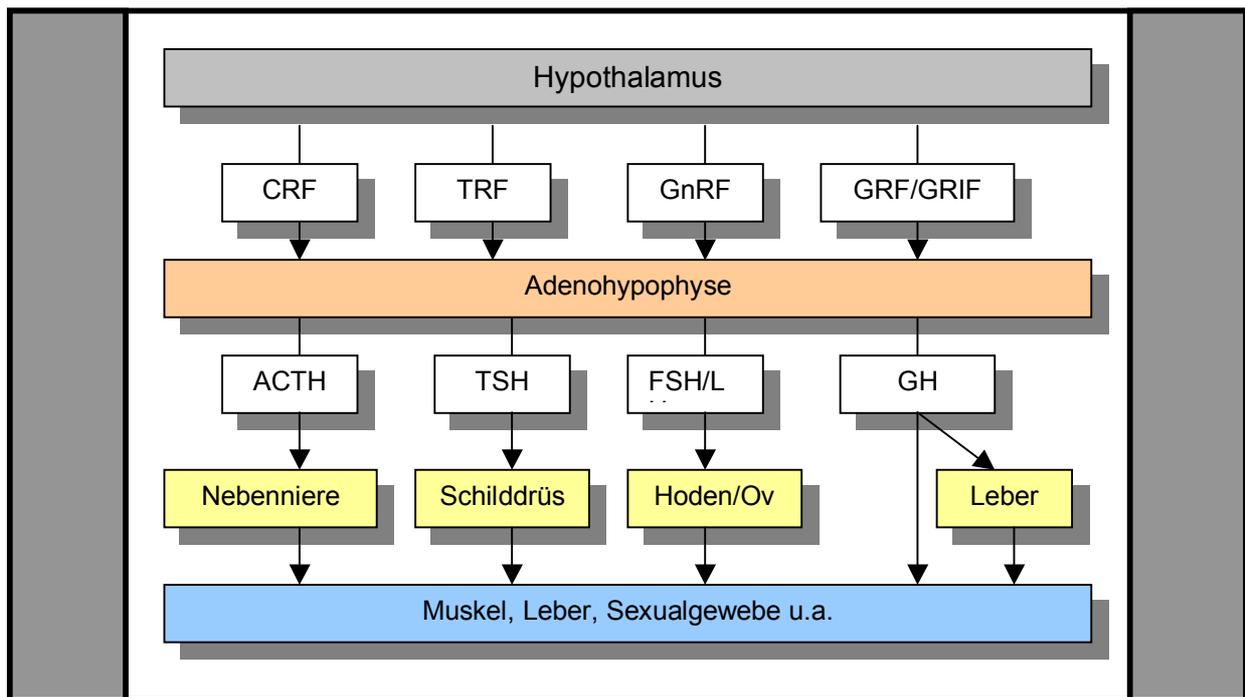


Abb. 1.1

GH wirkt beim Menschen und anderen höheren Säugetieren beschleunigend auf das allgemeine Wachstum. [15;41;76] Es zeigt dabei eine besondere Affinität zu den Knorpel- und Knochengeweben des Skelettsystems [29;51], woraus sich auch erklärt, daß besonders dieses durch krankhafte Veränderungen der normalen Hormonsekretion betroffen wird. [67;68] So ist seit langem bekannt, daß eine gesteigerte GH-Sekretion im vorpubertären Alter über eine Stimulation des Knochenlängenwachstums zum Krankheitsbild des „hypophysären Riesenwuchses“ führt, die Krankheit des Adulten – nach Schluß der Epiphysenfugen – ist die Akromegalie. [17;81] Entsprechend führt Mindersekretion zu Zwergwuchs, während sie im Alter verantwortlich für ein vermehrtes Auftreten der Osteoporose zu sein scheint. [33,47;66;71] GH wirkt aber auch auf eine

ganze Reihe anderer Gewebe wachstumsbeschleunigend und zeigt im Stoffwechsel insulinähnliche Wirkungen. [22;44]

1.3 Die GH-IGF-Achse

Wie auch die anderen Vorderlappenhormone ist das GH zum einen ein glandotropes Hormon, das seine Wirkung über die Stimulierung einer peripheren Drüse vermittelt. So wie es das frühere Konzept der „Somatomedin-Hypothese“ von Daughaday beschreibt [16], bindet GH an spezifische Rezeptoren (GHR) in der Leber und stimuliert diese zur Bildung des Wachstumsfaktors IGF-1 (insulin-like growth factor – 1; Somatomedin C) [44], das als endokrines Effektorhormon die wachstumsregulierenden Wirkungen des GH auf nahezu alle Körpergewebe überträgt. [40;41] Darüber hinaus bindet GH aber auch an Rezeptoren an den Zielorganen selbst [23;27;53] und stimuliert hier die Synthese und Sekretion von IGF-1, das in diesen Geweben dann auto- und parakrin wirkt. [47;73]

Dieses erweiterte Konzept der GH-IGF-Achse wird durch die Tatsache gestützt, daß es neben einem zentralen Feedback-Mechanismus mit der Verminderung der GH-Sekretion durch das Hypothalamus/Hypophysen-System bei erhöhten IGF-1-Serumspiegel, auch ein peripherer Feedback-Mechanismus besteht. Leung et al. [38] konnten eine Abnahme der GH-Rezeptoren und damit eine Abnahme der Bindungskapazität für das GH im peripheren Gewebe unter erhöhten IGF-1-Spiegeln nachweisen. (Abb 1.2). [1;2]

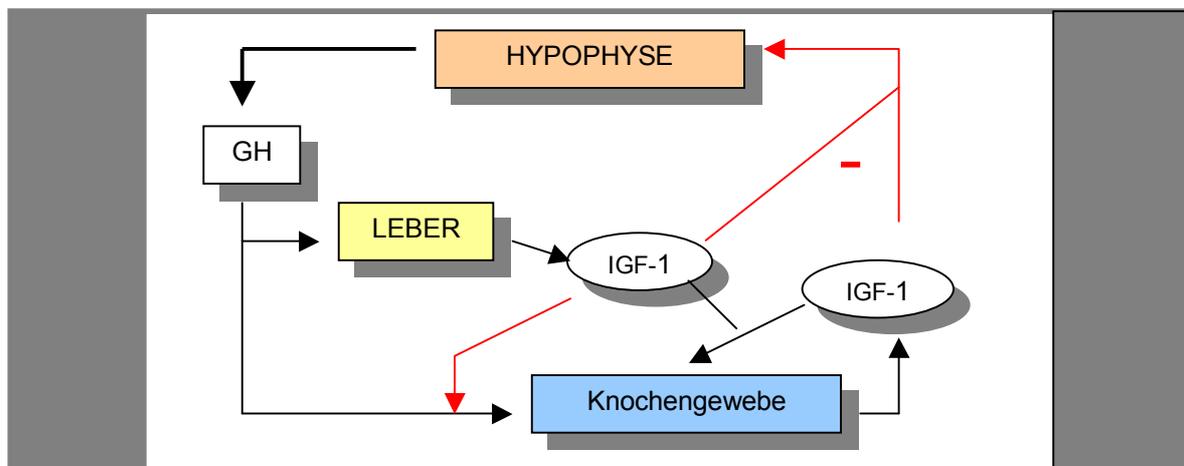


Abb1.2

1.4 Die Duale Effektor Theorie In zahlreichen tierexperimentellen Untersuchungen zeigte sich, daß das Zusammenwirken von GH und den Effektorhormonen sich in Form dieser linearen GH-IGF-Achse nicht vollständig erklären ließ.

So zeigten hypophysectomierte Ratten unter systemischer GH und IGF-1-Behandlung additive und synergistische Wachstumseffekte. Transgene Mäuse mit Überexpression von GH wuchsen zu zweifacher Größe, während eine Überexpression von IGF-1 zwar fehlende GH-Wirkungen kompensieren konnte, ansonsten aber zu normalem Körperwachstum führte. [58]

Daraus ergab sich, daß das GH und das IGF-1 auch unabhängige, von einander verschiedene Wirkungen besitzen. An *in vitro* Experimenten mit Zellreihen aus dem Fettgewebe konnten Zezulak und Green zeigen, daß GH unabhängig von IGF-1 die Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Adipozyten stimulierte, während IGF-1 die Proliferation von bereits reifen Fettgewebszellen beschleunigte, eine Wirkung, die GH allein nicht zeigte. [55;79]

Ganz ähnliche Ergebnisse brachten Untersuchungen an der Epiphysenzone von Röhrenknochen: Bei *in vitro* Experimenten zeigten auch hier in den Zonen verschieden differenzierter Knorpelzellen GH und IGF-I von einander unterscheidbare Wirkungen. [58] GH stimuliert die Differenzierung der Stammzellen in der Reservezone auch in Abwesenheit von IGF-I. [57] Dagegen wirkt IGF-I vor allem auf die Knorpelzellen der Proliferations- oder Knorpelzellsäulenzzone. [34] Die Verteilung der Rezeptortypen ist entsprechend: Die Stammzellen der Reservezone zeigen die größte Exprimierung von GH-Rezeptoren, in der Zone des proliferativen Knorpels dominiert der IGF-I – Rezeptor. [64]

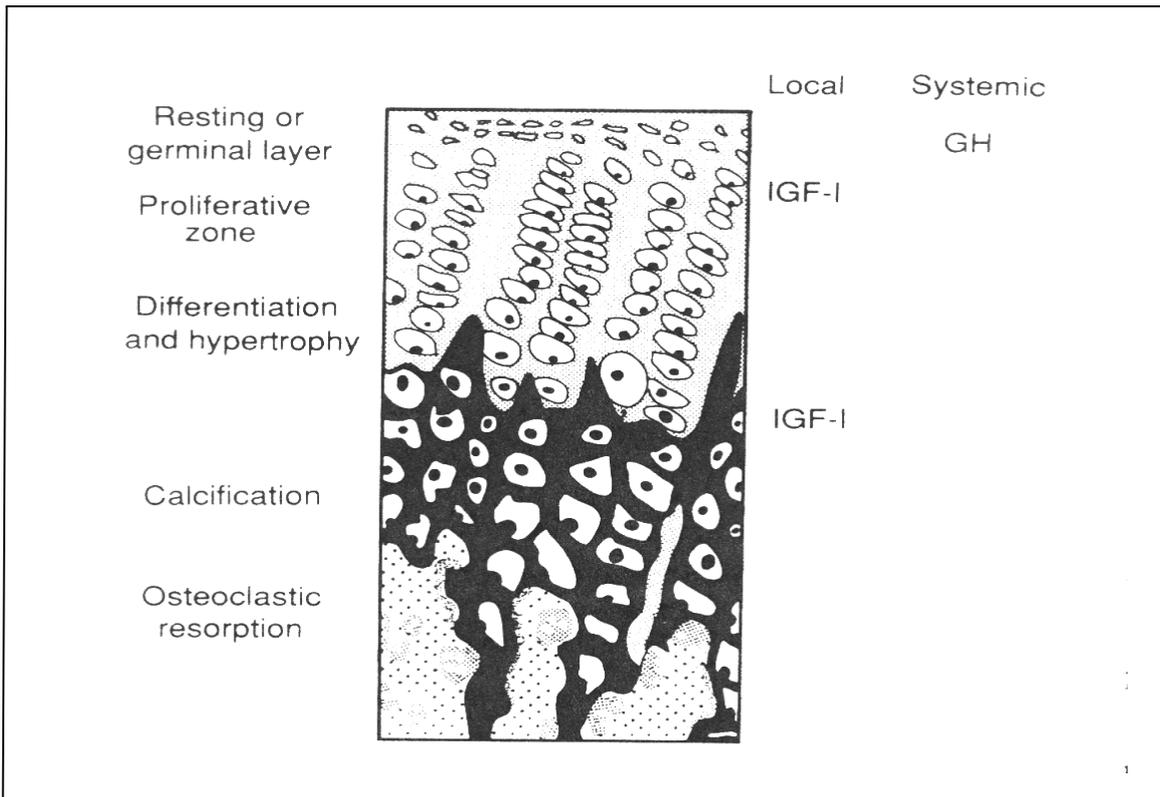


Abb. 1.3

Dieses gleichzeitige Wirken des Wachstumshormon an zwei unterschiedlichen Wirkorten wird mit dem Begriff der „dual effector theory“ beschrieben.

Diese Ergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen über die wachstumsstimulierenden Wirkungen beim Knochenlängenwachstum, die denselben Wirkungsmechanismus für die Verhältnisse *in vivo* belegen. [72] Entsprechend erfolgreich gelingen heutzutage Substitutionstherapien bei hypophysären Wachstumsstörungen. [61]

1.5 Die Wirkung von GH auf die Frakturheilung Neben der Wirkung von GH auf den wachsenden Knochen, sind die Wirkungen auf den heilenden Knochen von noch größerem Interesse im Zusammenhang mit unserer Studie. Wir wissen heute, daß das GH ein großes Stimulans für die Funktion der Zellen des Knochenstoffwechsels, sowohl der Osteoklasten [10;54], als auch der knochenbildenden Osteoblasten darstellt. [12;32;45;48;49] Da die Osteoblasten die Neubildung von Knochensubstanz auch während der Frakturheilung verantworten, ließ sich ein positiver Effekt des Wachstumshormon auf diesen Prozeß vermuten. Dies ist in in einer ganzen Reihe

tierexperimenteller Studien untersucht worden, wobei die Ergebnisse zunächst sehr unterschiedlich ausfielen. In älteren Experimenten von Herold et al. [25] und Northmore-Ball et al. [56] zeigte die systemische Gabe von GH sowohl in einem Frakturmodell an Ratten als auch in einem Defektmodell an Kaninchen keinen Einfluß auf die biomechanische Steifigkeit und Bruchfestigkeit der frakturierten Knochen. Auch Carpenter fand 1992 bei histologischen Untersuchungen keinen signifikanten Unterschied in der knöchernen Überbrückung nach Wachstumshormongabe bei einem Osteotomiemodell am Kaninchen. [13]

Im Gegensatz dazu gelang es in den letzten Jahren – auch mit besserer Verfügbarkeit artspezifischen Hormons – in zunehmendem Maße, einen positiven Effekt des Wachstumshormon auf die Frakturheilung nachzuweisen [3;7;8;27;31;50;52;69], und damit die schon früher von Koskinen et al. [35] und Zilkens et al. [80] postulierte Beschleunigung der Frakturheilung durch systemische Wachstumshormongabe zu bestätigen.

1.6 Frakturheilung Zum Verständnis der Vorgänge am heilenden Knochen folgt eine Darstellung der zellulären und geweblichen Veränderungen während der Frakturheilung wie sie heute verstanden wird. Grundsätzlich unterscheiden wir eine primäre und eine sekundäre Form der Knochenbruchheilung.

1.6.1 Primäre Frakturheilung Die primäre Frakturheilung, die eine Wiederherstellung kortikaler Knochenstrukturen durch direkte Verbindung aneinanderliegender Fraktarenden bedeutet, verlangt eine stabile, fest fixierte Fraktur. Unter diesen Bedingungen ist eine schnelle Restitution der ursprünglichen kortikalen Struktur durch das Einwandern von regenerierenden Osteonen („cutting cones“) von einem Frakturfragment in das andere möglich. An der Spitze dieser zapfenartigen Osteone liegende Osteoklasten bahnen einen Weg durch den nicht resorbierten lamellären Knochen, wobei sie den Frakturspalt überbrücken und Raum schaffen für die einwandernden Blutgefäße und Osteoblasten. [37] Diese bilden neue Haversche Systeme und bewerkstelligen somit die direkte Formation lamellären Knochens ohne die Zwischenstufe von Knorpel und Geflechtknochen. [46]

1.6.2 Sekundäre Frakturheilung Der Großteil aller Frakturen unterliegt einer sekundären Frakturheilung, an deren Ende zwar auch die Wiederherstellung der anatomisch ursprünglichen und der geforderten Belastung adäquat entsprechenden Knochenstruktur steht, bei der aber eine erste Frakturstabilisierung durch die Bildung eines transienten knorpeligen und knöchernen Frakturkallus gewährleistet wird. Dieser Kallus aus Geflechtknochen, der sich zum einen manschettenförmig um den Frakturspalt legt und zum anderen die Markhöhle im Bereich des Spaltes ausfüllt, wird im späteren Heilungsprozeß zum größten Teil wieder resorbiert, beziehungsweise an den Orten der Belastungslinien in lamellären Knochen umgewandelt. [14;60]

Die unterschiedlichen Gewebsreaktionen, die zur Bildung dieses Frakturkallus führen, sind in einer groben zeitlichen Reihenfolge wie folgt zu veranschaulichen: Initial kommt es zur Ausbildung eines Frakturhämatoms auf Höhe des Frakturspaltes, das diesen ausfüllt und sich im umliegenden Weichteilgewebe ausbreitet (Abb. 3.15). Dieser Phase kommt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Heilungsprozesses durch Gewebsmediatoren zu, da die zu diesem Zeitpunkt einwandernden Entzündungszellen wie Monozyten und Makrophagen sowie Thrombozyten, Cytokine und Wachstumsfaktoren freisetzen, die einen ersten Reiz zur Proliferation und Differenzierung der umliegenden Gewebszellen darstellen. [46] So sind erhöhte Werte der Wachstumsfaktoren TGF- β , aFGF, bFGF und PDGF bereits am ersten Tag im Frakturhämatom nachweisbar, ebenso die der Interleukine 1 und 6. [11]

1.6.2.1 Intramembranöse Ossifikation In den ersten 7 bis 10 Tagen der Frakturheilung bildet sich vom Periost ausgehend eine Manschette aus Geflechtknochen um den Frakturspalt herum. Sie entsteht ohne die vorherige Anlage von Knorpelgewebe durch direkte, intramembranöse Ossifikation. Dieser sogenannte „harte Kallus“ wird von aus osteogenetischen Vorläuferzellen differenzierten Osteoblasten der inneren Schicht des Periostes gebildet und stellt zusammen mit einem zentral in Höhe des Frakturspaltes gelegenen knorpeligen Anteil, dem „weichen Kallus“, das morphologische Substrat des externen Kallus dar. In gleicher Weise bildet sich in der Markhöhle zu beiden Seiten des Frakturspaltes ein interner, endostaler Kallus durch intramembranöse Ossifikation. [20;24;30]

1.6.2.2 Chondrogenese Im Gegensatz dazu vollzieht sich die Bildung des weichen Kallus unter der Ausdifferenzierung von pluripotenten mesenchymalen Zellen aus dem

Granulationsgewebe des Frakturhämatoms zu reifen Chondrozyten und der Anlage hyalinen Knorpels. Nach Proliferation und Bildung basophiler Matrix gleicht das histologische Bild dem der Epiphysenfuge langer Röhrenknochen. [11]

1.6.2.3 Enchondrale Ossifikation Die Knochenneubildung in diesem Teil des Kallus geschieht durch enchondrale Ossifikation ähnlich dem der Wachstumszone. Die unterschiedlichen Vorgänge wie der proliferative Umbau des anfangs hyalinen Knorpels zu hypertrophem Knorpel, die Kalzifizierung der Zwischenzellsubstanz, schließlich der Abbau des Knorpelgewebes durch Chondroklasten und das Einwandern von Blutgefäßen und Osteoblasten beginnen in den dem neugebildeten intramembranösen Knochen anliegenden Regionen und schreiten zum Zentrum des weichen Kallus vor, bis endlich der Frakturspalt vollständig knöchern überbrückt ist. [26] Zu diesem Zeitpunkt muß man die Fraktur als stabilisiert ansehen, und das sich anschließende Remodeling, d.h. die Resorption des gebildeten Geflechtknochens und der nekrotischen Randzonen des kortikalen Knochens sowie der Umbau zu lamellären Knochen zur Wiederherstellung der ursprünglichen Gesamtstruktur, schließt in den folgenden Wochen und Monaten die Frakturheilung ab. [11;77]

2 FRAGESTELLUNG

Bezüglich der Wirkung von Wachstumshormon auf die sekundäre Frakturheilung zeigen tierexperimentelle Kleintierstudien widersprüchliche Ergebnisse. Im Großtiermodell am Yucatan Minipig konnte die Stimulation der Distraktionsosteogenese gezeigt werden. In der vorliegenden Untersuchung wurde die Wirkung von rekombinantem Wachstumshormon auf die sekundäre Frakturheilung in einem Osteotomiemodell am Großtier untersucht.

Die beschleunigende Wirkung von systemisch appliziertem Wachstumshormon auf die Frakturheilung ist – wie in Kapitel 1.5 beschrieben – neben zahlreichen *in vitro* Versuchen in einer ganzen Reihe unterschiedlicher tierexperimenteller Modelle gezeigt worden. Die vorliegende Studie ist angelegt festzustellen, ob eine intakte GH-IGF-Achse auch in einem Großtierexperiment mit Yucatan-Minipigs anhand eines Osteotomiemodells nachzuweisen, und durch die qualitative und quantitative Beschreibung der histomorphologischen Veränderungen an der Frakturstelle aufzuzeigen ist. Um diese Kennzeichen des Heilungsprozesses an histologischen Schnittpräparaten möglichst präzise zu erfassen, soll ein digitales Bildverarbeitungsverfahren eingesetzt werden, bei dem die geweblichen Strukturen computergestützt erfaßt und ausgewertet werden können.

Um die Wirkung von GH auf die sekundäre Frakturheilung zu untersuchen, wurde ein Studienansatz gewählt, der dem Bild eines klinischen Frakturereignisses vergleichbar ist.

Entsprechend der heutigen Kenntnis der geweblichen Veränderungen am heilenden Knochen sollen folgende morphologische Korrelate der Frakturheilung zur Untersuchung herangezogen werden: die Bildung einer Knochenmanschette in Form eines durch direkte, desmale Ossifikation entstandenen periostalen Kallus und einem zentralen Knorpelkallus auf Höhe des Frakturspaltes, die endostale Kallusbildung durch direkte Ossifikation, die enchondrale Ossifikation des knorpeligen Kallus mit knöcherner Überbrückung des Frakturspaltes und schließlich ein beginnendes Remodeling kortikaler Strukturen.