

**Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

(Direktor: Prof. Dr. med. habil. W. Hein)

**Optimierung der Regeneratkonsolidierung bei der Kallusdistraction durch lokale
Applikation von Wachstumsfaktoren – tierexperimentelle Untersuchungen mit
bildgebenden, biomechanischen, histologischen und ultraschallmikroskopischen
Untersuchungsverfahren**

H a b i l i t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

Dr. med. habil.

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Dr. med. Robert Fred Walter Hube
geboren am 08.01.1968 in Berlin

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Christoph Josten (Leipzig)
2. Prof. Dr. med. Joachim Grifka (Regensburg)
3. Prof. Dr. med. Matthias Raschke (Münster)

Referat

Zielsetzung: In der vorliegenden wissenschaftlichen Studie sollte überprüft werden, ob lokal applizierte Wachstumsfaktoren die Knochenheilung bei der Distraktionsosteogenese optimieren können. Es war zu testen, ob eine zu Versuchbeginn durchgeführte Deperiostierung im Osteotomiebereich reproduzierbar eine verzögerte Knochenheilung implementieren kann. Insbesondere war zu prüfen, ob aus einer Polylaktidmembran freigesetztes IGF-I/TGF- β 1 eine verzögerte Kallusbildung therapieren kann. Es war zu evaluieren, ob diese Therapie im Vergleich zur autologen Spongiosaplastik gleichwertige oder bessere Ergebnisse erzielt.

Material und Methoden: Die linken Tibiae von 28 adoleszenten Schafen wurden mittels unilateralen Fixateur um 30 mm mittodiaphysär verlängert (1mm/d). Es erfolgte ein definierter Periostdefekt im Osteotomiebereich. Nach Abschluss der Distraktionsphase wurde ein zweiter operativer Eingriff durchgeführt. Randomisiert wurden 4 Gruppen zu je 7 Schafen mit folgenden Therapien gebildet: Gruppe A: Behandlung mit einer unbeschichteten PDLLA-Membran über der Distraktionsstrecke (Kontrollgruppe); Gruppe B: IGF-I/TGF- β 1-beschichtete Membran (100 μ g IGF-I und 20 μ g TGF- β 1); Gruppe C: autologe Spongiosaplastik im Bereich der Distraktionsstrecke; Gruppe D: Kombination aus B und C. Nach Abschluss der Konsolidierungsphase (60 d) wurden die Versuchstiere euthanasiert. An den distrahierten Tibiae fanden biomechanische, röntgenologische, computertomografische, histologische, mikroradiografische und ultraschallmikroskopische Untersuchungen statt.

Ergebnisse: Bei allen Untersuchungen ergab die Kontrollgruppe schlechtere Werte als in den Gruppen B, C, D. Die QCT-Untersuchung und die Mikroradiografie zeigten keine signifikanten gruppenspezifischen Unterschiede zwischen den Behandlungskollektiven. Das aus den CT-Daten ermittelte Elastizitätsmodul ergab eine signifikante Regression mit der Versagenslast der verlängerten Tibiae ($R^2=0,632$ $p=0,008$). In den biomechanischen Tests (4-Punkt-Biegetest) zeigte die Gruppe D höhere Versagenslasten im Vergleich zu Gruppe B und C. Im Vergleich zur Kontrolltibia wurde für diese Gruppe auch die höchste prozentuale Versagenslast ermittelt (Gruppe A 21,1%, Gruppe B 53,2%, Gruppe C 44,6%, Gruppe C 74,6%). Es bestand eine signifikante Regression der Versagenslast mit der Behandlungsmethode ($R^2=0,58$, $p<0,001$). Histologisch erscheint die Knochenheilung der Behandlungsgruppen B und D weiter ausgeprägt im Vergleich zur Gruppe C. In der ultraschallmikroskopischen Untersuchung ergab eine Kombination aus morphologischen und akustischen Parametern einen Regressionskoeffizienten mit der Versagenslast von $R^2 = 0,86$.

Schlussfolgerungen: Unter Berücksichtigung der Ergebnisse ist festzustellen, dass die zu Versuchsbeginn durchgeführte Deperiostierung eine verzögerte Knochenheilung implementierte. Die applizierten Wachstumsfaktoren beschleunigten die Knochenheilung und zeigten im Vergleich zum Standard, der autologen Spongiosaplastik, gleichwertige bzw. bessere Ergebnisse. Die Kombination beider Verfahren erzielte die besten Ergebnisse. Hierbei korrelieren die biomechanischen Ergebnisse mit den bildgebenden Verfahren. Die PDLLA-Membran ist geeignet, Wachstumsfaktoren lokal in ausreichender Dosierung freizusetzen. Durch die Stimulation der Knochenheilung kann die Behandlungszeit bei der Distraktionsosteogenese verkürzt und somit Komplikationen reduziert werden. Eine humanklinische Prüfung der verwendeten Wachstumsfaktoren erscheint sinnvoll.

Hube, Robert: Optimierung der Regeneratkonsolidierung bei der Kallusdistraktion durch lokale Applikation von Wachstumsfaktoren – tierexperimentelle Untersuchungen mit bildgebenden, biomechanischen, histologischen und ultraschallmikroskopischen Untersuchungsverfahren. Halle, Univ., Med. Fak., Habil. 150 Seiten, 2008

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1 Biologische Grundlagen des Knochenaufbaus	1
1.2 Die Kallusdistraction in der operativen Orthopädie und Unfallchirurgie	4
1.2.1 Prinzip der Kallusdistraction	4
1.2.2 Historisches zur Kallusdistraction	4
1.2.3 Biologische Grundlagen der Distractionsosteogenese	7
1.2.4 Indikationen zur Distractionsosteogenese	9
1.2.5 Probleme und Komplikationen der Kallusdistraction	11
1.3 Wachstumsfaktoren in der operativen Orthopädie	13
1.3.1 Geschichtliche Aspekte	13
1.3.2 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Knochenbildung und Applikation	15
1.3.3 IGF-I (Insulin-like growth factor I)	17
1.3.4 TGF- β (Transforming growth factor-beta)	19
1.4 Methoden zur Verlaufskontrolle der Regeneratkonsolidierung nach Distractionsosteogenese	21
1.4.1 Histologische Untersuchungen	21
1.4.2 Mikroradiografie	22
1.4.3 Biomechanische Tests	23
1.4.4 Quantitative Computertomografie	26
1.4.5 Ultraschallmikroskopie	28
2. Zielstellung	32
3. Material und Methodik	33
3.1 Versuchsmodell und Tierversuch	33
3.1.1 Versuchsmodell	33
3.1.2 Wahl des Versuchstieres und Örtlichkeiten	33
3.1.3 Vorversuch	34
3.1.4 Versuchsgruppen	35
3.1.5 Operationstechnik und perioperatives Management	36

3.1.6	Distraktionsphase	40
3.1.7	Gruppenspezifische Therapie	41
3.1.8	Fluorochrommarkierung	44
3.1.9	Tötung der Tiere	44
3.2	Untersuchungsmethoden	44
3.2.1	Aufarbeitung der Präparate	44
3.2.2	Röntgenkontrollen	45
3.2.3	Knochendichtebestimmung durch QCT-Untersuchung	46
3.2.4	Biomechanische Untersuchungen	49
3.2.5	Histologische Untersuchungen	51
3.2.5.1	Probenaufarbeitung	51
3.2.5.2	Herstellung der Dünnschliffpräparate für die histologische, histomorphometrische und ultraschallmikroskopische Untersuchung	52
3.2.6	Mikroradiografie	54
3.2.7	Ultraschallmikroskopische Untersuchungen	55
3.2.8	Auswertung der Messergebnisse und statistische Analyse	60
4.	Ergebnisse	61
4.1	Vorversuche	61
4.2	Verlauf des Tierversuches	61
4.3	Radiologische Untersuchungen	62
4.4	QCT-Untersuchungen	64
4.5	Biomechanische Untersuchungen	72
4.6	Histologische Untersuchungen	74
4.7	Mikroradiografie	84
4.8	Ultraschallmikroskopische Untersuchungen	87
5.	Diskussion	91
5.1	Tiermodell und Operationstechnik	91
5.2	Untersuchungsmethoden	97
5.2.1	Radiologische Untersuchungen	97
5.2.2	QCT-Untersuchungen	98
5.2.3	Biomechanische Untersuchungen	100
5.2.4	Histologische Untersuchungen	103

5.2.5	Ultraschallmikroskopische Untersuchungen	104
5.3	Diskussion der Ergebnisse	106
5.3.1	Röntgenuntersuchungen und Quantitative Computertomografie	106
5.3.2	Biomechanische Untersuchungen	109
5.3.3	Histologische Untersuchungen	111
5.3.4	Ultraschallmikroskopische Untersuchungen	114
6.	Schlussfolgerung	116
7.	Zusammenfassung	117
8.	Literaturverzeichnis	119
9.	Anlagen	143
10.	Thesen	150

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
BMD	Bone Mineral Density
BMP	Bone Morphogenic Protein
Bsp.	Beispiel
BV	Bildverstärker
bzw.	beziehungsweise
ca.	zirka
c_{ii}	Elastischer Koeffizient
<i>Cl.AR</i>	Kallusgewebefläche
<i>Cl.Ind</i>	Kallusindex
<i>Cl.Z</i>	Kallusimpedanz
cm	Zentimeter
CT	Computertomografie
<i>Ct.AR</i>	Kortikalisgewebefläche
<i>Ct.Po</i>	Kortikalisporosität
<i>Ct.Z</i>	Kortikalisimpedanz
d	Tag
dB	Dezibill
DEXA	Dualenergetische Röntgenstrahlenabsorptiometrie
DIN	Deutsches Institut für Normierung
DPA	Duale Photonenabsorptiometrie
F	Kraft
Fa.	Firma
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls
HA	Hydroxylapatit
HE	Hounsfieldeinheit
IGF	Insulin-like growth factor
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein
i.m.	intramuskulär
Inc.	Incorporation

ISO	International Organisation for Standardization
i.v.	intravenös
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
kV	Kilovolt
l	Abstand, Länge
LD ₅₀	Mittlere letale Dosis
μ	Micron
mAs	Milliamperesekunde
M _b	Biegemoment
μg	Mikrogramm
mg	Milligramm
MHz	Megahertz
ml	Milliliter
MLU	Martin-Luther-Universität
μm	Mikrometer
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter
MMA	Methylmethacrylat
MPa	Megapascal
Mrayl	Megarayl
mrem	Millirem
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
μSV	Mikrosievert
N	Newton
n	Anzahl
Nm	Newtonmeter
Nr.	Nummer
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PMMA	Polymethylmethacrylat
PDLLA	Poly-DL-lactic acid
Q-BAM	Quantitative B-Bild, Sonographie und akustische Mikroskopie

QCT	Quantitative Computertomografie
R ²	Korrelationskoeffizient
RANK	Receptor Activator of NF-κB
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
Rayl	Maßeinheit der Schallkennimpedanz
RF	Radiofrequenz
ROI	Region Of Interest
SAM	Scanning Acoustic Microscopy
SPA	Single Photonenabsorptiometrie
s	Sekunde
s.c.	subkutan
s.o.	siehe oben
Stabw.	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TGF-β	Transforming growth factor-beta
TOF	time-of-flight
UV	ultraviolett
Z	Akustische Impedanz
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Biologische Grundlagen des Knochenaufbaus

Histologisch besteht das Skelett aus nur wenigen Gewebsarten: kollagenes Bindegewebe, Knorpelgewebe und Knochengewebe. Knorpel und Knochen sind dabei hochspezialisierte Formen des Bindegewebes. Beim Erwachsenen findet sich Knorpel nur noch an wenigen Stellen (Gelenke, Rippen, Ohr).

Knochen besteht aus organischer Matrix und anorganischen Bestandteilen. Die Kollagenfibrillen bilden mit ca. 90% den Hauptanteil der organischen Matrix (Tab. 1.1).

Tab.1.1. Organische Bestandteile des Knochens nach Pollard und Earnshaw (2002)

Protein	Anteil	Funktion
Kollagen Typ I	90%	Bildung der Fibrillen der Matrix
Osteocalcin	1-2%	Bindung an HA und Ca ²⁺
Osteonectin	2%	Synthese bei Knochenentwicklung und -regeneration, Bindung an HA und Kollagen; Förderung von Kristallisationskeimen
Osteopontin	gering	Bindung der Osteoklastenintegrine an die Knochenoberfläche
BMP	gering	Strukturverwandt mit Transforming Growth Factor- β (TGF- β); Stimulation von Knorpel- und Knochenentwicklung
Sialoprotein	2%	Bindung von Osteoklastenintegrinen an der Knochenoberfläche
Proteoglykane	gering	Bindung von TGF- β

Der mineralische Anteil des Knochens besteht hauptsächlich aus Kalzium und Phosphat. Es wird eine dichte äußere Schicht (Kortikalis) und ein poröses inneres Netzwerk aus Knochenbälkchen (Spongiosa) unterschieden. Die Kortikalis besteht aus unterschiedlichen Lamellen (Generallamellen, Schaltlamellen und Speziallamellen), in denen Kollagenfasern in bestimmten Richtungen angeordnet sind. Das Havers'sche System in der Kortikalis bilden Osteone. Sie besitzen in der Mitte Blutgefäße sowie Nervenfasern, die in so genannten Havers'schen Kanälen verlaufen. Diese sind wiederum über Volkmann-Kanäle miteinander verbunden. Als äußerste Schicht schließt sich die Knochenhaut, das Periost an (Abb. 1.1).

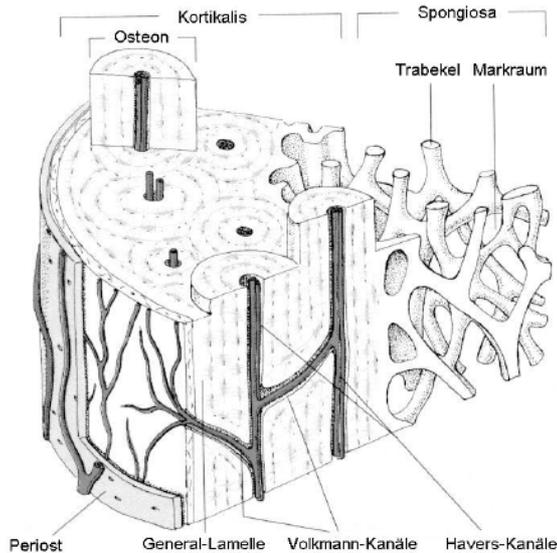


Abb. 1.1. Aufbau eines Lamellenknochens (Leonard 1971)

Die Knochenbildung verläuft nach einem festgelegten Schema. Osteoblasten sezernieren unverkalkte Knochenmatrix (Osteoid). Später erfolgt die Mineralisation des Osteoids (Bartl und Frisch 1993, Amling 2003).

Es werden zwei Arten der Knochenneubildung unterschieden, die desmale und die chondrale Ossifikation. Bei der desmalen Ossifikation entsteht das Knochengewebe direkt aus dem embryonalen Bindegewebe. Bei der chondralen Ossifikation wird der Knochen über die Zwischenstufe Knorpel gebildet. Es werden hierbei die enchondrale und die perichondrale Ossifikation unterschieden. Bei der Kallusdistraction wird noch das Auftreten einer dritten Art der Knochenneubildung diskutiert, die sogenannte transchondrale Ossifikation (Yasui et al. 1997, Choi et al. 2002, Al-Aql et al. 2008). Bei dieser Form transformieren Chondrozyten direkt zu Osteoblasten und tragen signifikant zur Knochenmatrixformation bei.

Histomorphologisch lassen sich zwei Formen von Knochengewebe unterscheiden (Marcove und Arlen 1992, Nickel et al. 1992): Geflecht- oder Faserknochen und Lamellenknochen. Der Erstere tritt als Entwicklungsstadium innerhalb des Knochenwachstums auf und der Letztere stellt dann die Endform der Knochenbildung dar.

Der Knochen ist einem ständigen Umbauprozess (Remodelling) unterworfen. Jährlich baut jeder Mensch ca. 2-10% seiner Skelettmasse um. Dabei wird der Knochen durch Osteoklasten selektiv abgebaut und im Anschluss durch Osteoblasten wieder aufgebaut (Frost 1989 a, b). Unter physiologischen Bedingungen führt das zu einem dynamischen Gleichgewicht mit Erhalt der strukturellen Integrität des Knochengewebes. Osteozyten als die Mechanosensoren des Knochens und Träger spezifischer Rezeptoren (Amling et al. 2000)

1.2 Die Kallusdistraction in der operativen Orthopädie und Unfallchirurgie

1.2.1 Prinzip der Kallusdistraction

Die Kallusdistraction ist ein Verfahren zur Knochenverlängerung. Sie dient der Überbrückung von traumatischen Defekten oder dem Ausgleich von Längenunterschieden unterschiedlicher Genese an Röhrenknochen. Das hohe Regenerationspotential des Knochens ermöglicht diese Überbrückung (Bier 1923).

Das Prinzip der Distractionosteogenese besteht in der operativen Durchtrennung eines Röhrenknochens und der anschließenden schrittweisen oder kontinuierlichen Distraction des nach einer initialen Ruhephase von 7–10 Tagen entstandenen kallusartigen Regenerates. Die Verlängerung erfolgt durch den entgegengesetzten axialen Zug an den zwei Segmenten des operativ durchtrennten Knochens mit Hilfe eines Distractionapparates. In der Distractionphase wird das Kallusgewebe meist mit einer Geschwindigkeit von 1 mm/d auseinander gezogen. Der am häufigsten angewendete Distractionapparat ist der Fixateur externe. Nachdem die gewünschte Länge des Knochens erreicht ist, verbleibt der Fixateur externe in der Konsolidierungsphase und der darauf folgenden Dynamisierungsphase am verlängerten Röhrenknochen, bis dieser eine ausreichende Belastbarkeit erreicht hat. Während der Remodellierungsphase wird das Kallusgewebe zu Röhrenknochen umgebaut und somit an die veränderte biomechanische Situation angepasst.

1.2.2 Historisches zur Kallusdistraction

Die Anfänge der Distractionosteogenese gehen auf den Anfang des 20. Jahrhunderts zurück. Allesandro Codivilla beschrieb 1905 die Verlängerung von Knochen durch Zugkräfte nach Durchführung einer Osteotomie (Codivilla 1905). Hierbei wurden in 26 Fällen Verlängerungen von 3-8 cm erreicht, die nachfolgend im Gipsapparat konsolidierten.

1913 wurde durch Ombredanne erstmals ein Fixateur externe bei der Verlängerung von Röhrenknochen eingesetzt (Ombredanne 1913). Nach Schrägosteotomie des Femur wurden Verlängerungen bis zu 4 cm erreicht. Das Verfahren war regelmäßig durch Komplikationen wie Durchblutungsstörungen und Nekrosen der Haut gekennzeichnet.

Putti hob 1921 die Wichtigkeit der graduellen kontinuierlichen Fragmentdistraction hervor. Er entwickelte ein distrahierbares Teleskoprohrsystem, das so genannte „Osteoton“, welches durch transossäre Pins mit dem Knochen verbunden wurde (Putti 1921).

August Bier erkannte 1923 die Bedeutung der Ruhephase und führte die Distraction erst im Anschluss an eine Latenzperiode von 3-5 Tagen nach der Osteotomie durch (Bier 1923). Er entdeckte die Bedeutung des Kallusregenerates für die Verlängerung von Röhrenknochen.

Die Technik der verzögerten Distraction wurde von Abbot (1927) in St. Louis, USA weiterentwickelt. Als erster Autor beschrieb er eine graduelle kontinuierliche Fragmentdistraction nach einer Ruhephase von 14 Tagen. Er verwendete dafür ein Teleskoprohr, den so genannten „Abbot-Distraktor“, der bilateral über transossäre Pins fixiert wurde.

Die bis zu diesem Zeitpunkt beschriebenen Techniken der Distractionsosteogenese waren mit hohen Komplikationsraten verbunden und wurden in der Folgezeit weder weiter entwickelt noch zur breiten klinischen Anwendung gebracht.

Erst 1952 verbesserte Anderson die Methode von Abbot und entwickelte ein klinisch akzeptiertes Behandlungsverfahren (Anderson 1952). Das von ihm verwandte semizirkuläre Fixationssystem war weit verbreitet. Nachteilig war jedoch weiterhin die Immobilisation der Patienten während der Behandlungszeit.

Wittmoser entwickelte ein Jahr später den ersten distrahierbaren Ringfixateur, mit dem ebenfalls eine graduelle kontinuierliche Fragmentdistraction durchgeführt werden konnte. Neben Längenkorrekturen wurden mit Hilfe von Schraubenspindeln auch Achsabweichungen korrigiert (Wittmoser 1953).

Der unilaterale Fixateur wurde erstmals von Wagner (1971) beschrieben. Der monolaterale Distractionssystem zur Beinverlängerung wurde über Schanz'sche Schrauben fixiert. Über ein Spindelssystem konnte graduell und kontrolliert distrahert (1,5-2 mm/d) werden. Der Vorteil lag in der jetzt möglich gewordenen Mobilisation der Patienten während der Distractionphase. Nach Erreichen der gewünschten Verlängerung erfolgten eine autologe Knochenplastik im Bereich der Defektstrecke und die Fixierung mittels stabiler Plattenosteosynthese. Dieses Verfahren wurde zum Standardverfahren der operativen Beinverlängerung im deutschsprachigen Raum und erlangte weltweit Akzeptanz. Ein wesentlicher Nachteil war die limitierte Möglichkeit der Achskorrektur.

Bei der Entwicklung der letztgenannten Verfahren konzentrierten sich die Autoren vorrangig auf die technischen Veränderungen der Verlängerungssysteme. Auf Grund der nicht ausreichend verstandenen biologischen Vorgänge während der Distraction erfolgte diese unmittelbar nach der Osteotomie ohne Beachtung der Ruhephase. Für diese Technik prägte Brug et al. (1991) den Begriff der Fragmentdistraction.

Das von Bier beschriebene Prinzip der Ruhephase wurde erst nach 3 Jahrzehnten durch Ilizarov wieder aufgenommen und weiterentwickelt (Ilizarov et al. 1984). Es verhalf dem Verfahren der Kallusdistraktion zum entscheidenden Durchbruch. Vor Distraktionsbeginn setzte Ilizarov eine postoperative Latenzzeit von 5 bis 10 Tagen, um eine ausreichende Revaskularisation sowie eine Organisation des Bindegewebes im Distraktionsspalt zu ermöglichen.

Neben dem von ihm in den fünfziger Jahren im sibirischen Kurgan entwickelten Ringfixateur, propagierte er die auf biologischen Grundlagen basierende Kortikotomietechnik. Diese beinhaltete die alleinige Durchtrennung der Kortikalis sowie die Optimierung des Distraktionszeitpunkt und -geschwindigkeit. Bei dieser Technik wird der Periostschlauch sowie die medulläre Vaskularisierung geringstmöglich zerstört (Ilizarov 1992). Vor Distraktionsbeginn wurde eine Ruhephase von 5-10 Tagen empfohlen, um eine ausreichende Revaskularisierung und Organisation des Bindegewebes nach durchgeführter Kortikotomie zur ermöglichen. Die kontinuierliche Distraktionsgeschwindigkeit betrug 1 mm/d (Ilizarov 1989a, 1989b). Außerdem beschrieb er verschiedene Techniken des Segmenttransportes und die Distraktionsepiphyseolyse. Sein Hauptverdienst liegt jedoch in der Grundlagenforschung. Er berücksichtigte die biologischen Prinzipien der Knochenregeneration. Mit Hilfe seiner tierexperimentellen Untersuchungen und der daraus resultierenden klinischen Erprobung führte er das Verfahren zur klinischen Reife (Ilizarov et al. 1984). Die von ihm postulierten Prinzipien haben sich erst Anfang der achtziger Jahr durchgesetzt, da die in russischer Sprache verfassten Publikationen von Ilizarow in der westlichen Welt nicht bekannt waren (Giebel 1987). Nach dem Erscheinen der internationalen Publikationen von Ilizarow wurden diese weltweit aufgenommen und in Behandlungskonzepte auf dem Gebiet der operativen Orthopädie und der Traumatologie implementiert. Eine Vielzahl von Autoren konzentrierte sich auf die Weiterentwicklung der Konzepte, vor allem auf die Modifizierung und Optimierung der Fixationssysteme.

Zu erwähnen sind hier insbesondere De Bastini et al. (1987), die ein dynamisierbares monolaterales Fixateursystem entwickelten, mit dem sowohl Verlängerungen als auch Achskorrekturen von Extremitätenknochen vorgenommen werden konnten. Im deutschsprachigen Raum hat sich besonders Pfeil (1994) um die Entwicklung unilateraler Systeme Verdienste gemacht.

Reichel (1998) untersuchte an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg die Korrelation von densitometrischen, biomechanischen und histologischen Methoden nach operativer Beinverlängerung mittels diaphysärer Kallusdistraktion. Hervorzuheben sind die

herausgearbeiteten Kriterien zur Bewertung der Stabilität und Länge der Konsolidierungsphase vor Entfernung des Fixateurs.

Heute ist die Knochenverlängerung durch Kallusdistraction Standard bei der Behandlung von Extremitätenverkürzungen sowie extensiven Knochendefekten in der Orthopädie und Unfallchirurgie, der Plastischen Chirurgie sowie der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie (Paley 1988, Pfeil et al. 1996). Problematisch ist der lange Zeitraum bis zur Konsolidierung des distrahierten Kallus. Dadurch weist das Verfahren eine Reihe von Risiken auf wie Pintrakt-Infektionen oder Frakturen der Verlängerungsstrecke durch ungenügende Stabilität. Außerdem ist die Behandlungszeit mit einer deutlichen Einschränkung der Lebensqualität verbunden. Aus diesem Grund beschäftigt sich die Forschung heute einerseits mit der Entwicklung einfacher Distractionssysteme mit hoher Patientenakzeptanz (Regazzoni 1989) und andererseits mit der Modulation der Distractionsosteogenese, um die Behandlungsdauer zu verkürzen (Raschke 1999). Letzteres ist auch Ziel dieser Arbeit.

1.2.3 Biologische Grundlagen der Distractionsosteogenese

In der Knochenheilung wird prinzipiell zwischen direkter und indirekter Knochenheilung unterschieden. Voraussetzung für die direkte (primäre) Knochenheilung ist die absolute Stabilität zweier Fragmentenden. Dies wird operativ durch eine interfragmentäre Kompressionsosteosynthese erreicht (Vècsei et al. 1995). Hierbei kommt es nicht zu geweblichen Zwischenstufen, sondern es erfolgt eine osteonale Vereinigung beider Fragmente. Bei direktem Kontakt der gegenüber liegenden Knochenenden (Kontaktheilung) wachsen Gefäße und Knochenzellen direkt von einem Haver'schen-Kanal in einen gegenüberliegenden Kanal oder die Osteoklasten schaffen eine osteonale Tunnelung, in die Gefäße und Osteoblasten nachfolgen. Bei der Spaltheilung wird ein mikroskopisch überbrückbarer Spalt durch das Einsprossen von endostalen und periostalen Gefäßen mit Lamellenknochen überbrückt. Osteone bilden sich und füllen den Spalt aus. Bei der direkten Knochenheilung wird kein Kallus gebildet. Für die Distractionsosteogenese durch Kallusdistraction hat diese Form der Knochenheilung keine Bedeutung.

Die indirekte (sekundäre) Knochenheilung erfolgt über eine Kallusformation. Sie ist die physiologische Form der Knochenheilung und entspricht dem typischen Verlauf der konservativen Frakturbehandlung bzw. bei dynamischen Osteosynthesen wie der Marknagelung. Durch das Vorliegen einer Instabilität zwischen den Fragmenten ist eine osteonale, direkte Knochenheilung nicht möglich, da die Dehnungstoleranz des Knochens

überschritten ist (Kenwright und Goodship 1989, Perren 1979). Das Hämatom im beweglichen Bruchspalt resorbiert und wird durch Granulationsgewebe substituiert, das zu kollagenem Bindegewebe ausreift. Im Bindegewebe bildet sich ein Faserknorpelgerüst, welches sich in Lamellenknochen umwandelt. Dieser Prozess beginnt im periostalen Bereich, während zentral die Differenzierung über Faserknorpel stattfindet. Die Verknöcherung entwickelt sich von außen nach innen. Unter funktioneller Belastung richten sich die entstandenen Knochenbälkchen zur typischen Knochenstruktur aus. Es können radiologisch Kortikalis und Spongiosa unterschieden werden. Der Kallus verschmälert sich zum Abschluss der Heilungsphase und die Knochenstruktur normalisiert sich.

Die regenerativen Prozesse der Distraktionsosteogenese und der Frakturheilung sind beide charakterisiert durch das Auftreten intramembranöser desmaler Ossifikation und enchondraler Ossifikation. Bei der Frakturheilung überwiegt die enchondrale und bei der Disktraktion die desmale Ossifikation (Yasui et al. 1997, Einhorn 1998).

Der Ablauf und die Regulationsprozesse auf zellulärer Ebene während der Distraktionsosteogenese sind bis heute nicht vollständig geklärt. Die biologischen Vorgänge sind charakterisiert durch das temporäre Vorkommen von peri- und endostalem Kallus. Dieses Ersatzgewebe stellt ein typisches Merkmal der indirekten Knochenheilung dar (s.o.).

Durch die Zugkräfte, die sich zwischen den sich entfernenden Knochenfragmenten bilden, kommt es zu einer Stimulation der Osteoblasten (Lammens et al. 1998). In der Distraktionslücke führt die Verletzung (Kortikotomie) zur Ausbildung eines Hämatoms. Es tritt eine typische akute Entzündungsreaktion mit Vasodilatation und Kapillarisation auf. Das Hämatom wird resorbiert und durch Granulationsgewebe ersetzt (Wassen et al. 2000). Dieses besteht aus Fibroblasten, neu gebildetem Kollagen und zahlreichen Kapillaren. Im Zentrum der Verlängerungsstrecke kommt es zur Ausbildung einer Wachstumszone. Das anfänglich gebildete Resorptions- und Granulationsgewebe wandelt sich durch den Distraktionsreiz zunehmend in ein longitudinal orientiertes, fibröses Bindegewebe um (Aronson et al. 1989, Kaspar 2003).

Innerhalb der ersten Tage wachsen Kapillaren in das interfragmentäre Gewebe ein (Pacicca et al. 2003). Um diese Gefäße herum formieren sich Osteoblasten und bilden mit kollagenen Fasern und Osteoid säulenartige Strukturen, die von der Osteotomieoberfläche auf das Zentrum der Verlängerungsstrecke zuwachsen (Lewinson et al. 2001, Meyer et al. 2001). Diese bilden ein Leitgerüst, in dem die Osteogenese membrangeschützt ablaufen kann.

Es kommt zur Anlagerung von Osteoblasten an die mineralisierte Bindegewebsmatrix und zur Osteoidbildung. Das Osteoid wird weiter mineralisiert und die Bedingungen für eine

intramembranös-desmale Knochenbildung sind gegeben (Ilizarov 1989a, Paley 1988). Die Reifungsvorgänge schreiten weiter fort und die fibröse Zwischenzone zwischen den distrahierten Knochenenden ossifiziert. Es entsteht ein die Knochenenden überbrückender Geflechtknochen. Dieser Vorgang beginnt in der Konsolidierungsphase, wenn keine Zugkräfte mehr auf das Kallusregenerat wirken (Aronson et al. 1989).

Zentral verbleibt zwischen den Knochenenden zunächst eine fibröse Schicht, in der keine Kapillareinsprossung stattfindet. Eine Ausrichtung und Ossifizierung findet hier erst während der Konsolidierungsphase statt (Aronson 1991, Peltonen et al. 1992).

Die Distractionsosteogenese endet mit der Phase des „Remodelling“. Durch die so genannte „Bone Metabolizing Unit“ (Frost 1989a, b), bestehend aus knochenspezifischen Zellen, Interzellulärsubstanz und Kapillaren wird einerseits durch Osteoblasten Knochen aufgebaut. Während des knöchernen Remodellings werden die Knochensäulen in Belastungsrichtung verstärkt, mechanisch nicht belasteter Geflechtknochen andererseits durch Osteoklasten abgebaut und eine neue Markhöhle ausgebildet (Aronson et al. 1989). Durch kontinuierliche Umbauprozesse werden die mechanisch stabileren Havers'schen Systeme gebildet. Am Ende entsteht wieder ein Röhrenknochen. Diese Wiederherstellung der normalen belastungsfähigen Lamellenknochenstruktur schließt den Vorgang der Distractionsosteogenese ab. Remodellierungsvorgänge können durch die Messung der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität auch noch nach 18 Monaten nachgewiesen werden (Wiedemann 1994).

Sowohl periostale als auch endostale Kallusbildung wurde in verschiedenen Studien beobachtet (Delloye et al. 1990, Kojimoto et al 1998, Yasui et al. 1997). Deren Anteil wird durch den Grad der Traumatisierung bei der Osteotomie mitbestimmt (Kojimoto et al 1998).

Bei Instabilitäten mit vermehrten interfragmentären Bewegungen, größeren Scherbelastungen oder zu hohen Distractionsgeschwindigkeiten treten im Bereich der Dehnungstoleranz Knorpelinseln im Kallusregenerat auf. Gleiches gilt für eine ungenügende Vaskularisation. In diesen Fällen tritt zusätzlich eine enchondrale Ossifikation auf (Claes et al. 2002), Jazrawi et al. 1998, Reichel 1998). Daraus resultieren Knochenheilungsstörungen die bis zur Ausbildung einer Pseudarthrose führen können.

1.2.4 Indikationen zur Distractionsosteogenese

Die Behandlung von ausgedehnten Knochendefekten stellt in der Unfall- und Tumorchirurgie ein schwer lösbares Therapieproblem dar. Die therapeutischen Optionen sind einerseits abhängig von der Größe des Defektes und andererseits von der Qualität des umgebenden

Weichteilmantels und der Trochik. Bei ausreichender Durchblutung des umgebenden Weichteilmantels und fehlenden Infektzeichen lassen sich kleinere Defekte mittels autologer Knochentransplantation aus dem Beckenkamm (Spongiosa, trikortikaler Span etc.) überbrücken. Hier kommt es dann durch die eingangs genannten Remodelling-Vorgänge zum langsamen Umbau, bis ein funktionell adäquater Knochenersatz gebildet wird. Größere Defekte erfordern entweder gestielte Knochentransplantationen (z.B. gestielter Fibulaspan) oder die oben beschriebene Kallusdistraktion. Daneben befinden sich einige künstliche Knochenersatzstoffe in der Entwicklung (Günther et al. 1998, Rueger 1998), über deren endgültige therapeutische Potenz derzeit jedoch noch keine abschließende Aussage getroffen werden kann. Bei chronischen Infekten muss zunächst die Weichteilsituation soweit konsolidiert werden, bis das Knochenlager sicher infektfrei ist.

Die Methode der ersten Wahl bei der Überbrückung ausgedehnter Knochendefekte ohne wesentliche Achsabweichung ist die Kallusdistraktion (Baumgart et al. 1994). Die Distraktionsosteogenese wird weiterhin zur Extremitätenverlängerung und additiven Achskorrektur langer Röhrenknochen eingesetzt.

Das durch die Untersuchungen von Ilizarov (1990, 1991) geprägte Verfahren mit Hilfe eines Ringfixateurs wird zunehmend mittels unilateraler Fixateursysteme angewandt, oft auch in Kombination mit intramedullären Distraktionssystemen.

Die Indikation stellt sich bei Extremitätenverkürzungen, Achsenfehlstellungen sowie größeren ossären Defekten ab 3 cm (Lavini et al. 1990, Paley und Maar 2000). Längenunterschiede bis zu 3 cm können mit orthopädischem Schuhwerk ausgeglichen werden. Ein lebenslanger Schuhausgleich stellt aber gerade bei jüngeren Patienten eine Beeinträchtigung der Lebensqualität dar (Hankemeier et al. 2004). Bei einem Ausgleich über 3 cm ergeben sich zunehmend funktionelle Probleme.

Die Ursachen von Beinlängendifferenzen sind vielfältig und können angeboren oder erworben sein. Zu den angeborenen Fehlbildungen gehören transversale und longitudinale Defekte, angeborene Pseudarthrosen und der kongenitale Minderwuchs mit symmetrischen Wachstumsstörungen, wie er bei der Achondroplasie oder dem Turner-Syndrom auftritt. Erworbene Extremitätenverkürzungen treten bei posttraumatischen Wachstumsstörungen nach epiphysären Verletzungen, nach Infektionen mit Störungen der Epiphysenfuge, nach tumorösen Erkrankungen (Neurofibromatose, fibröse Dysplasie) oder der Resektion von Knochentumoren auf. Des Weiteren können Stoffwechselerkrankungen mit Deformierung von Röhrenknochen (Rachitis, Nephropathien) oder neurologische Erkrankungen (Paresen oder Poliomyelitis) zu Beinlängendifferenzen führen (Pfeil et al. 2000, Myers et al. 2003).

Die Indikation für den Segmenttransport besteht vor allem bei Knochendefekten nach Trümmerfrakturen. In diesem Fall wird die Kortikotomie defektfern durchgeführt. Das entstandene freie Fragment wird von der Osteotomie weg in Richtung Defekt transportiert. An der entstehenden „Dockingstelle“ stellt die Knochenheilung einen kritischen Punkt dar. Zur Stimulation der Heilung sollte eine Kompression von 0,25mm/d aufgebracht werden (Paley und Maar 2000). Zusätzlich können additive Minimalosteotomien mit Anfrischung der Knochenenden und Spongiosaplastik erfolgen.

Als Kontraindikation bzw. Risikofaktor für die Anwendung der Distraktionsosteogenese gelten Kinder unter 6 Jahren aufgrund der fehlenden Compliance, unkooperative Patienten, schwere Osteoporose mit unsicherer Fixation des Fixateurs über die Schanzschrauben, Patienten mit metabolischen Osteopathien und nach Radiatio aufgrund der inhibierten Kallusbildung (Hankemeier 2004). Eingeschränkt ist die Anwendung bei älteren Patienten aufgrund verminderter Regenerationsfähigkeit des Knochens und der mit zunehmendem Alter verstärkten Kontrakturbildung (Fink et al. 1996, Maffulli et al. 1996).

1.2.5 Probleme und Komplikationen der Kallusdistraktion

Trotz kontinuierlicher Verbesserungen der Fixateure stellt die Kallusdistraktion ein relativ komplikationsreiches Behandlungsverfahren dar. Die verschiedenen Fixateursysteme mit Vor- und Nachteilen sind in Tabelle 1.2 dargestellt.

Bei bestimmten Indikationen kommen Hybridfixateure zur Anwendung, die eine Kombination der Fixateursysteme darstellen.

Die Probleme und Komplikationsmöglichkeiten sind zu einem Großteil durch die lange Therapiedauer verursacht. Die tägliche Verlängerung in der Distraktionsphase ist begrenzt, da weniger als 1 mm/d zur frühzeitigen Verknöcherung und mehr als 2 mm/d zum Abreißen des Periostschlauches führen können. Bereits bei störungsfreiem Verlauf der Kallusdistraktion muss bis zur Vollbelastung einer verlängerten Extremität ein Zeitraum von 30 – 40 Tagen pro cm Verlängerungsstrecke geplant werden. Gerade bei großen Knochendefekten sind Behandlungen von mehr als einem Jahr keine Seltenheit.

Tab. 1.2. Darstellung verschiedener Stabilisierungsverfahren mit Indikation, Vor- und Nachteilen (nach Baumgart et al. 1996)

Stabilisierungsverfahren	Indikationen	Vorteile	Nachteile
Ringfixateur	<ul style="list-style-type: none"> • Achsenfehlstellungen • Pseudarthrosen • Verkürzungen mit gelenknahen Achsenfehlstellungen • gelenknahe Knochendefekte 	<ul style="list-style-type: none"> • universell • Fixierung extrem kleiner Fragmente • praktisch unbegrenzte Korrekturmöglichkeit 	<ul style="list-style-type: none"> • Infektrisiko • Weichteilverziehung • Pflege • Misskomfort • Compliance erforderlich
Monofixateur	<ul style="list-style-type: none"> • Akutversorgung • Verkürzungen und Knochendefekte 	<ul style="list-style-type: none"> • praktisch in allen Krankenhäusern verfügbar • einfache Handhabung 	<ul style="list-style-type: none"> • Infektrisiko • Achsenabweichungen besonders am Oberschenkel • Achsenkorrekturen nur mit besonderen Systemen
Fixateur mit Marknagel	<ul style="list-style-type: none"> • Oberschenkel- und Unterschenkel-Verkürzungen mit Und ohne Achsenfehlstellungen 	<ul style="list-style-type: none"> • keine Achsenabweichungen • Fixateur externe nur während der Distraction 	<ul style="list-style-type: none"> • operativ aufwendig • Gefahr der Markrauminfektion • Infektrisiko

Limitierend sind vor allem die sog. Pintrakt-Infektionen, Infektionen an den knöchernen Insertionsstellen der Schanzschrauben, die eine Osteomyelitis hervorrufen können (Paley 1990a). Störungen der Kallusbildung und -konsolidierung sowie Probleme der Einschätzung der biomechanischen Belastbarkeit des distrahierten Knochens führen bei zu früher Entfernung des Fixateurs zu Pseudarthrosen, Deformierungen und Refrakturen der Verlängerungsstrecke. Diese werden in der Literatur mit einer Häufigkeit von 2 – 33% angegeben (Aldegheri et al. 1989, Paley 1990b, Danzinger et al. 1995, Reichel et al. 1996, Stanitski und Hahcheraghi 1996). So hat Giebel (1993) mittels Computertomografie gezeigt, dass bei der Kallusdistraction langer Röhrenknochen mitunter intrakortikal gelegene Mineralisationsverzögerungen bestehen, die röntgenologisch schwer nachweisbar sind und dann Ursache einer Refraktur sein können.

Alternativ kann ein Verfahrenswechsel mit Ersatz des Fixateursystems durch Einbringung eines intramedullären Kraftträgers durchgeführt werden. Dies birgt allerdings das Risiko einer ossären Infektion (Lai et al. 2002).

Weiterhin stellen Kontrakturen der Weichteile, verursacht durch die Distraction, sowie neurovaskuläre Schäden mit temporären Paresen ein Problem dar (Paley 1990b).

Zusätzlich zu den biologischen Risiken und Komplikationsmöglichkeiten müssen die psychosozialen Probleme einer zeitaufwendigen Behandlung unter Nutzung eines Fixateursystems adressiert werden. Der Patient ist während der Behandlungszeit deutlich in

seiner Aktivität und Lebensqualität eingeschränkt. Des Weiteren treten durch die lange Behandlungsdauer hohe Therapiekosten auf.

Eine möglichst frühzeitige Entfernung des Fixateur externe ist aus diesem Grund anzustreben. Besondere Aufmerksamkeit in der Forschung wird deshalb der Optimierung der Kallusbildung in der Distraktionsphase und der Beschleunigung des knöchernen Umbaus in der Konsolidierungsphase gewidmet. Zusätzlich ist eine Optimierung des Heilungsmonitorings zu fordern, um Störungen der physiologischen Regeneratbildung und -konsolidierung frühzeitig zu erkennen.

1.3 Wachstumsfaktoren in der operativen Orthopädie

1.3.1 Geschichtliche Aspekte

In den letzten Jahrzehnten hat sich das Gebiet der osteogenen Wachstumsfaktoren zu einem bedeutenden Forschungsbereich entwickelt. Man erhofft sich die Möglichkeit einer biologischen Regeneration und Reparatation von Knochen- und Knorpelgewebe.

Die Geschichte der Erforschung der Wachstumsfaktoren beginnt mit der Entdeckung des Zusammenhanges zwischen Hypophyse und Wachstum bei Akromegalie- oder Gigantismuspatienten. Diese wiesen einen Hypophysentumor auf. So berichteten Evans und Long Anfang der zwanziger Jahre über die Züchtung von Riesenratten durch die Applikation von Rinderhypophysenextrakten an normalen Ratten. Dies führte zu weiteren Forschungen.

1951 publizierten Raben et al. eine Methode der Gewinnung von Wachstumshormon aus humanen Hypophysen und deren erfolgreiche Nutzung bei der Behandlung von zwerghenwüchsigen Patienten (Raben et al. 1951).

Wilhelmi berichtete 1955, dass Wachstumshormone bei der gleichen Spezies und bei geringer entwickelten Tieren eine Wirkung erzielten (Wilhelmi 1955).

Nach weiteren Jahren der Forschung gelang es schließlich Ende der sechziger und Anfang der siebziger Jahre, die Struktur von Wachstumshormon zu beschreiben (Li et al. 1969, Li und Dixon 1971, Niall 1971, Wilhelmi 1974).

Das Wachstumshormon ist ein Polypeptid aus 191 Aminosäuren, welches in der Adenohypophyse synthetisiert wird (Abb. 1.3). Heute wird es gentechnisch mit Hilfe von Bakterien (*E. coli*) gewonnen. Nachfolgend wird es gereinigt und lyophilisiert und steht der therapeutischen Applikation zur Verfügung (Abdel-Meguid et al. 1986).

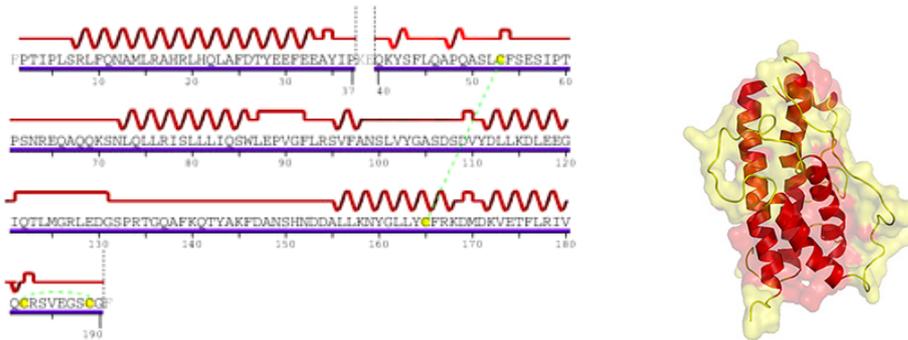


Abb. 1.3. Somatotropin Struktur mit 191 Polypeptiden
(<http://www.3dchem.com/moremolecules.asp?ID=272&othername=Somatotropin> vom 1.6.08)

Die direkte Wirkung des Wachstumshormons erklärt jedoch nicht alle Ergebnisse am Wirkort. Aus diesem Grund berichteten Salmon und Daughady über Mediatoren im Serum (Salmon und Daughady 1958). Diese Botenstoffe wurden „Sulfation Factors“ genannt, da sie im Tierexperiment den Einbau von Sulfat in Knorpelgewebe förderten. Später wurde der Name Somatomedine geprägt.

1965 entdeckte Urist eine zur Osteoinduktion fähige Substanz der Knochenmatrix und bezeichnete diese als Bone Morphogenic Protein (BMP) (Urist 1965). Schließlich wurden die physiologischen Eigenschaften der BMPs untersucht (Knutsen et al. 1993, Wozney 1992, Wozney 1989) und deren übergeordnete Bedeutung in der Embryogenese sowie im erwachsenen Organismus als Wachstums- und Differenzierungsfaktor nicht nur für Knorpelgewebe erkannt (Dean et al. 2004, Wozney 1998, Lifer et al. 1992). Bone morphogenetic proteins (BMPs) sind eine Gruppe von mindestens 15 verschiedenen Glykoproteinen, welche in geringen Konzentrationen im Knochen vorkommen und zumeist als Wachstumsfaktoren fungieren. Sie liegen als 30-38 kD Homodimere vor, haben eine Länge zwischen 100 und 140 Aminosäuren und sind sowohl innerhalb einer Spezies, als auch bei verschiedenen Spezies untereinander sehr ähnlich. Sie gehören alle außer BMP-1 mit TGF einer Superfamilie an (Rosen and Thies 1995). Die BMPs 2-9 sind Mitglieder der TGF- β -Familie und in ihrer Aminosäurefrequenz sehr homogen (Celeste et al. 1990).

1980 publizierten Svoboda et al. die Aminosäuresequenz des Somatomedins (Svoboda et al. 1980). Diese erwies sich als identisch mit dem zwei Jahre zuvor beschriebenen IGF-I, welches aus humanem Serum gewonnen wurde (Rinderknecht und Humbel 1978). In der Folgezeit wurde viel in der Forschung getan, um den Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Knochenbildung zu erklären und dies therapeutisch zu nutzen.

Heute werden rekombinant hergestellte osteogene Wachstumsfaktoren bereits klinisch eingesetzt (Ristiniemi et al. 2007, Gupta et al. 2005, Friedlaender et al. 2001).

1.3.2 Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Knochenbildung und Applikation

Störungen des physiologischen Ablaufs der Distraktionsosteogenese sind häufig (Hamanishi et al. 1992). Durch die systemische und lokale Stimulation der Knochenheilung können Komplikationen vermindert werden. Trotz vielfältiger experimenteller Ansätze gibt es bisher keine klinisch akzeptierten Methoden der lokalen Stimulation der Kallusdistraktion.

Da Komplikationen der Behandlungsmethoden erheblich durch die Langwierigkeit der Therapie geprägt sind, wird zunehmend versucht, die Behandlungsdauer durch den Einsatz osteokondaktiver Ersatzmaterialien zu verkürzen sowie osteoinduktive Eigenschaften von Wachstumshormonen und Proteinen nutzbar zu machen.

Neben dem bisher bekannten Algorithmus der Knochenheilung sind Modelle der Regulation von Mitoseaktivität, Migration, Transformation, Differenzierung und Syntheseaktivität der beteiligten Zellen hinzugekommen. Als bekannte lokal regulierende Mediatoren werden die immunmodulierenden Zytokine (z.B. Interleukin-1, Interleukin-6) und die Wachstumsfaktoren unterschieden (Einhorn et al. 1995, Bail 2004).

Die Interaktionen verschiedener Wachstumsfaktoren während der Knochenheilung und des Knochenremodelings wurden in der Vergangenheit untersucht (Goldring und Goldring 1990, Bolander 1992, Baylink et al. 1993). Ebenfalls konnte die osteoinduktive Wirkung in zahlreichen Publikationen nachgewiesen werden (Mohan 1991, Fujimoto et al. 1999, Lind 1998, Raschke 2000). In Verbindung mit speziellen Trägersystemen können Wachstumsfaktoren Knochenheilungsvorgänge signifikant beschleunigen (Windhagen et al. 2004).

Bei der experimentellen Untersuchung von rekombinanten Proteinen, wie Bone Morphogenic Protein oder Wachstumsfaktoren, wird versucht, die osteoinduktiven Eigenschaften dieser Proteine zu nutzen (Gerhart et al. 1993). Als Mediatoren spielen sie eine entscheidende Rolle in den verschiedenen Phasen der Osteogenese und Frakturheilung (Trippel et al. 1996).

Aus diesem Grund ist der Einsatz von Wachstumsfaktoren in der Behandlung von Krankheiten des Stütz- und Bewegungsapparates zunehmend Schwerpunkt experimenteller Studien im Bereich der Orthopädie und Unfallchirurgie. Besondere Aufmerksamkeit wird dabei der Modulierung und Beschleunigung ossärer Umbauprozesse gewidmet (Trippel et al.

1996). Verschiedene Studien haben gezeigt, dass es während dieser Prozesse zu einer signifikanten Erhöhung von lokalen und systemischen Wachstumsfaktoren, insbesondere Transforming growth factor-beta (TGF- β), Insulin-like growth factor-1 (IGF-1), kommt (Bolander 1992, Cotran et al. 1989).

Knochenbiopsien bei der humanen Kallusdistraction zeigten eine erhöhte Konzentration von IGF-1 und TGF- β im Regenerat der Distractionsstrecke (Eingartner et al. 1999).

Möglicherweise hat die kombinierte Gabe von IGF-1 und TGF- β einen größeren stimulierenden Effekt auf ossäre Prozesse, als die jeweiligen Einzelsubstanzen (Pfeilschifter et al. 1990, Trippel et al. 1996, Lind 1998, Schmidmaier et al. 2000).

Die systemische Gabe von Wachstumsfaktoren beinhaltet vor allem den Nachteil von systemischen Nebenwirkungen. Außerdem wurden in verschiedenen Studien unterschiedliche Ergebnisse erzielt. Dies kann auf das unterschiedliche Versuchsdesign zurückzuführen sein. Die Applikation von allogenem Wachstumshormon führt möglicherweise zu einer Antikörperbildung mit Inaktivierung (Talkowski et al. 1976, Northmore 1980, Carpenter et al. 1992, Bak 1993).

Da die Nebenwirkungen einer systemischen Applikation von Wachstumsfaktoren noch nicht vollständig bekannt sind, steht die lokale Stimulierung des Regenerates unverändert im Mittelpunkt des Interesses. Die Stimulierung zielt auf die Beeinflussung von Osteoblasten mittels Zytokinen. Diese modulieren wichtige Funktionen wie Zellteilung, Produktion von Osteoid und Gewebedifferenzierung (Windhagen et al. 2004).

Die Technik der lokalen Applikation der Wachstumsfaktoren direkt am Wirkort ist jedoch bisher nicht zufriedenstellend gelöst. In den bisherigen Studien wurden vor allem Pumpen, Katheter, wiederkehrende Injektionen oder organische und anorganische Trägermaterialien verwendet (Welch et al. 1998, Windhagen 2004). Externe Pumpen oder Katheter bergen die Gefahr einer Infektion durch die ständige Verbindung zwischen äußerem Depot und Wirkort. Verwendete Trägermaterialien lokal platzierter „Carrier“ haben die Aufgabe, eine ausreichende Wirkstoffkonzentration vor Ort freizusetzen und die schnelle Lösung der Proteine in der extrazellulären Matrix zu verzögern (Winn et al. 1999). Derzeit stehen hierfür organische Substanzen, entmineralisierte Knochenmatrix, Kollagene, nichtkollagene Proteine und Polymere zur Verfügung (Kirker-Head 2000). Ein Nachteil dieser Methode ist die Notwendigkeit der offenen chirurgischen Implantation der Materialien bei der Anwendung der lokalen Trägersystemen, um sie am Wirkort zu platzieren (Seeherman et al. 2003). Es können sekundäre Dislokationen des „Carriers“ auftreten, die Folgeeingriffe notwendig machen (Schmidmaier et al. 2000).

Beschichtete Implantate, die in Tierversuchsstudien zu guten Ergebnissen führten, stellen ebenfalls keine optimale Lösung für die Anwendung bei der Kallusdistraction dar (Raschke et al. 2002, Schmidmaier et al. 2002a).

Da insbesondere die stimulierende Wirkung bei der lokalen Applikation von IGF-I und TGF- β 1 auf die Knochenheilung nachgewiesen werden konnte (Mehrrara et al 1999, Schmidmaier et al. 2002b, Wildemann et al. 2004a, Hube et al. 2006), muss nach Möglichkeiten gesucht werden, diese Wirksubstanzen direkt an das Kallusregenerat zu platzieren. Dort begünstigen sie in hoher Wirkkonzentration die Knochenheilung, ohne Risiken bzw. Komplikationen zu verursachen.

1.3.3 IGF-I (Insulin-like growth factor I)

IGF-I ist ein Polypeptid, bestehend aus 70 Aminosäuren. Es wird hauptsächlich in der Leber synthetisiert (Rinderknecht und Hubel 1978) (Abb.1.4).

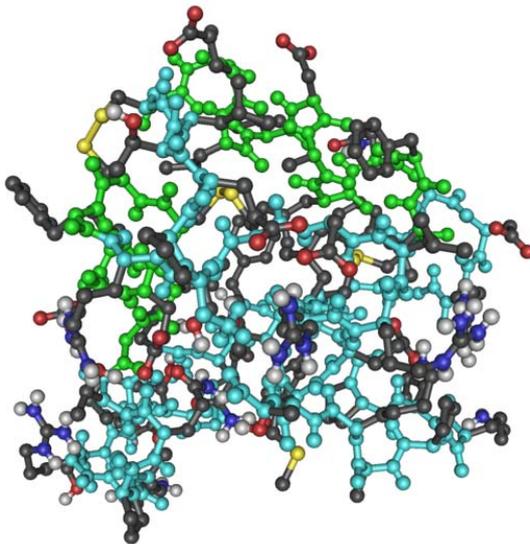


Abb. 1.4. Aminosäurestruktur des IGF (commons.wikimedia.org/wiki/Image:2GF1_Insulin vom 22.6.08)

Die Bildung wird durch Wachstumshormon reguliert (Binoux 1995). Andere, in geringerem Maße IGF-I bildende Zellen, sind Osteoblasten und Chondrozyten. Außerdem wird es in Knochenmarkzellen produziert (Andrew et al. 1993). Die Serumkonzentration von IGF-I reguliert die eigene Synthese durch negatives Feedback auf die Hypophyse und den Hypothalamus (Berelowitz et al. 1981). Der überwiegende Anteil von IGF-I im Serum und extrazellulärer Flüssigkeit ist an Bindungsproteine (IGFBPs = Insulin-like growth factor binding proteins) gebunden. Die Produktion der IGFBPs wird ebenfalls vom

Wachstumshormon reguliert (Cohen et al. 1991, Lamson et al. 1991). IGFBP-3 ist das Haupttransportprotein für IGF-I und bindet ca. 95% des gesamten IGF-I im Serum (Baxter 1994). Die Bindungsproteine transportieren den Wachstumsfaktor und modellieren seine Wirkung am Zielort. Die Zielzellen besitzen spezifische IGF-I Rezeptoren (Rosen und Thies 1995).

Neben der endokrinen Zellregulation sind die Zellen auch in der Lage sich gegenseitig über den parakrinen Weg zu beeinflussen, was die direkte Einflussnahme einer Zelle auf die Nachbarzelle bedeutet (Abb. 1.5). Auch die autokrine Beeinflussung ist möglich (Sporn und Todaro 1980, Trippel et al. 1996).

Der niedrigste Serum-Spiegel von IGF-I wurde bei Patienten mit Laron-Dwarfismus festgestellt, einem Krankheitsbild, das durch einen Wachstumshormonrezeptordefekt in der Zellmembran verursacht wird (Zapf et al. 1981).

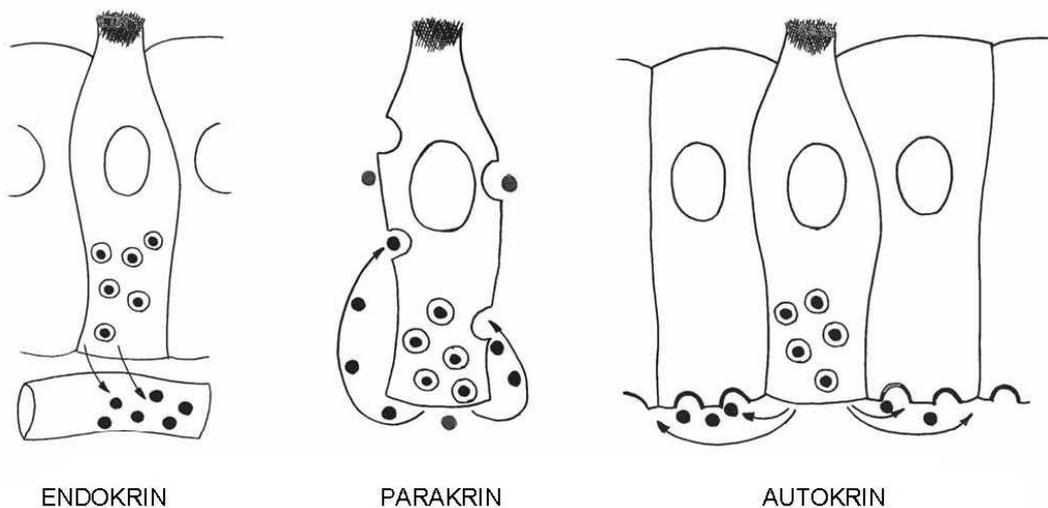


Abb. 1.5. Endokrine, parakrine und autokrine Zellregulation von Wachstumsfaktoren (nach Sporn und Todaro 1980)

IGF-I agiert als Mediator von auf den Knochen wirkenden Wachstumshormonen und stimuliert die Zellteilung und Matrixsynthese von Osteoblasten sowie anderer Zelllinien des Bindegewebes. Es modelliert direkt Wachstum, Differenzierung und Zellteilung von Osteoblasten sowie die Bildung der Knochenmatrix (Hock 1998, Scheven et al. 1991). Sowohl systemisch als auch lokal wirkt es als Agens des Knochenremodellings. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass die systemische Anwendung von IGF-1 die Fraktur- und knöchernen Defektheilung stimuliert (Thaller et al. 1993a, Schmidmaier et al. 2000). Es scheint einen positiven Effekt auf die intramembranöse Knochenformation zu bewirken (Thaller et al. 1993b). Raschke et al. (2002) konnten nach systemischer Gabe von spezies-

spezifischen rekombinanten Wachstumshormon während der Kallusdistraction an der Minischwein-Tibia einen vierfach erhöhten IGF-1 Serumspiegel nachweisen. Dieser führte zu einer signifikant schnelleren Konsolidierung und höheren Torsionsbruchfestigkeit der distrahierten Tibiae. Zudem konnte die Wirksamkeit von IGF-1 auf den humanen Knochenstoffwechsel gezeigt werden (Wilton 1992).

Bei der systemischen Anwendung von IGF-I besteht das Risiko von Nebenwirkungen, die in den genannten Studien nicht berücksichtigt wurden (Juul et al. 1995, Frystyk et al. 1998). Aus diesem Grund zeigt sich die lokale Applikation eher geeignet, vor Ort die Knochenbildung und -heilung zu stimulieren.

So zeigte die Applikation von IGF-1 mit Hilfe von Pumpensystemen bzw. Kathetern direkt in den Markraum einen positiven Effekt auf das Knochenwachstum (Isgaard et al. 1986, Nilsson et al. 1987, Thaller et al. 1993a/b). Ebenfalls wurde demonstriert, dass das Einwachsverhalten durch IGF-1 beschichtete Implantate beschleunigt wird (Hube 1998, 2000). Die Frakturheilung konnte mit Hilfe IGF-1 beschichteter Osteosynthesematerialien durch die lokal erhöhte Konzentration des Wachstumsfaktors beschleunigt werden (Raschke et al. 2000, Schmidmaier 2002b). Die kontinuierliche Infusion von IGF-1 während der Kallusdistraction am Kaninchenunterkiefer führte zu einer gesteigerten Osteoblastenaktivität und ermöglichte den knöchernen Durchbau auch bei höheren Distractionsgeschwindigkeiten (Stewart et al. 1999). Nebenwirkungen konnten bei diesen lokalen Applikationsformen nicht beobachtet werden.

1.3.4 TGF- β (Transforming growth factor-beta)

TGF- β stellt neben dem IGF-System den wichtigsten Wachstumsfaktor im Knochenstoffwechsel dar (Bätge et al. 2000). Es wird von allen skelettalen Geweben synthetisiert. TGF- β ist an der Regelung der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Synthese der Gewebematrix von verschiedenen Zelltypen (Mesenchymzellen, Chondrozyten, Osteoblasten, Osteoklasten) beteiligt, die direkt für die Knochenbildung und -heilung mitverantwortlich sind (Pfeilschifter et al. 1990, Roberts 1990).

Es reguliert die Proliferation und Expression differenzierter Phänotypen dieser verschiedenen Zelltypen. Insbesondere wurde die Steuerung der Zellexpression von osteoblastären, chondrozytären und osteoklastären Vorläuferzellen nachgewiesen (Sporn und Roberts 1988, 1989). Die größte Konzentration von TGF- β befindet sich in der extrazellulären Knochenmatrix, dem Ort der Synthese (Centrella et al. 1991).

TGF- β ist ein multifunktionelles Signal-Polypeptid, welches sowohl als Stimulator und auch Inhibitor der Zellreplikation agieren kann (Sporn und Roberts 1992). Es übernimmt als Vermittler zwischen osteoblastärer und osteoklastärer Tätigkeit die wichtige Rolle eines „Coupling Factors“ (Bonewald und Dallas 1994, Centrella et al. 1994). Es existieren 3 Isoformen TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3.

Während der enchondralen Ossifikation wird TGF- β von Osteoblasten und Chondrozyten synthetisiert. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die exogene Applikation von TGF- β die Frakturheilung und knöchernen Heilung von Defekten stimuliert (Beck et al. 1993, Lind et al. 1993, 2000, Nielsen et al. 1994, Schmidmaier et al. 2000, 2001a, Raschke et al. 2002). So führte die systemische Applikation von TGF- β zur Neubildung und Proliferation von Osteoblasten und einer Erhöhung der Knochenmatrixbildung bei Knochendefekten am Kaninchenmodell (Beck et al. 1993). Lind zeigte 1993 eine Beschleunigung der Knochenbruchheilung durch lokal appliziertes TGF- β an Rattenknochen sowie eine dosisabhängige Wirkung (Lind et al. 1993, 2000).

Ebenfalls ist bekannt, dass Transforming growth factor-beta 1 die Osteoblastenmigration, Differenzierung und extrazelluläre Matrixsynthese während der Distractionsosteogenese stimuliert (Mehrra et al. 1999).

Patienten, die sich einer Kallusdistraction unterzogen, wiesen signifikant höhere Serumkonzentrationen an TGF- β auf als Patienten, bei denen im Rahmen einer Korrekturosteotomie die Tibia durchtrennt, aber nicht distrahiert wurde (Holbein et al. 1995). TGF- β findet sich in allen Phasen des Knochenstoffwechsels in hohen Konzentrationen im skelettalen Gewebe. Es ist anzunehmen, dass es regulatorische Mechanismen gibt, die eine jeweils bedarfsgerechte Wirkung sicherstellen. Neben der komplexen TGF- β -Aktivierung eröffnet die variable Expression der TGF- β -Rezeptoren mit der daraus resultierenden unterschiedlichen Ansprechbarkeit auf den Wachstumsfaktor eine wirksame Steuerungsmöglichkeit (Bätge et al. 2000). Tierexperimentelle Untersuchungen weisen auf einen direkten Zusammenhang zwischen der intakten TGF- β -Expression und der Knochenmasse hin (Erlebacher und Derynck 1996, Filvaroff et al. 1999).

1.4 Methoden zur Verlaufskontrolle der Regeneratkonsolidierung nach Distractionsosteogenese

1.4.1 Histologische Untersuchungen

Die Histologie ist die Lehre von den Geweben des Körpers und ein Teilgebiet der Anatomie und Pathologie. Als Begründer der Histologie gilt Marie François Xavier Bichat (1771–1802), der ohne Mikroskop 21 Gewebetypen im menschlichen Körper beschrieb. Die Histologie findet allerdings erst seit dem Auftreten der Zellentheorie (Schleiden und Schwann) ihre jetzige Akzeptanz und Verbreitung (Schleiden 2003).

Die Entstehung der Histopathologie schreibt man Johannes Peter Müller zu, der 1838 ein Buch über die Natur und Struktureigenschaften von Krebs veröffentlichte. Als Vater der Histopathologie wird Rudolf Virchow (1821–1902) bezeichnet.

Untersuchungsmethoden sind Gewebezüchtung und Vitalfärbung an lebendem Gewebe, Mikrotomie, Fixierungs- und Färbeverfahren am toten Gewebe. Für die histologische Untersuchung von schneidbaren Geweben werden nur wenige μm dünne Schnitte mit Hilfe von Mikrotomen angefertigt. Für nicht schneidbare Strukturen kommt die Trenn-Dünnschlifftechnik zur Anwendung, eine Methode zur Herstellung dünner Schriffe. Zu den nicht schneidbaren Geweben zählen dicke Kortikalispräparate, implantattragende Knochen und Zähne. Die Dünnschliffpräparatherstellung ist eine Alternative zu Schnitten von Hartgeweben. Neben der guten Erhaltung weichgeweblicher und zellulärer Details können die Hartgewebsstrukturen besser erhalten und dargestellt werden. Auch die Methoden der Fluorochrommarkierung, der Mikroradiografie und die Beurteilung der Grenzfläche von Knochen und Implantat sind möglich. Als einzigen Nachteil der Trenn-Dünnschlifftechnik ist der Materialverlust anzusehen, der durch die Dicke des Trennbandes oder Sägeblattes einerseits und durch das eventuell notwendige Dünnschleifen andererseits bedingt ist.

Die Schnitte bzw. Schriffe werden nachfolgend mit chemischen Farbstoffen angefärbt. Es gibt eine Vielzahl verschiedener histologischer Färbungen, die im Laufe der letzten 120 Jahre entwickelt wurden. Der Großteil stammt aus den ersten 30 Jahren des vorigen Jahrhunderts. Die Farbstoffe besitzen spezifische Affinitäten zu verschiedenen Zellstrukturen. Bei histochemischen Methoden entwickelt sich eine farbige Substanz erst durch die Reaktion mit einem Gewebeinhaltsstoff. Des Weiteren gibt es noch enzymhistochemische Methoden, bei denen zelleigene Enzyme eine Farbentwicklung bewirken.

Das wichtigste technische Arbeitsmittel der Histologie ist das Lichtmikroskop. Histologische Präparate können damit in hoher Auflösung mit einer bis zu 1.000-fachen Vergrößerung untersucht werden.

Die Gewebeaufarbeitung wird wie folgt geplant:

- Planung von Probennahme und Auswahl geeigneter Fixiermittel
- Probenaufbereitung und Infiltration
- Einbettung in Paraffin und Kunststoff (auch für Immunhistologie und Hartschnitte)
- Probenbearbeitung mit Rotations-, Schlitten- und Großschnitt-Mikrotomen (Herstellen von Serienschnitten und Austauschserien) oder Diamantsägen (Herstellung von Dünnschliffen)
- Färben histologischer Schnitte (manuell und per Färbeautomat)
- Herstellen spezifischer Färbelösungen und Umsetzung von Färbeprotokollen
- Protokollierung und Dokumentation histologischer Präparationen
- Mikroskopische Untersuchung und Morphometrie

Histologische Untersuchungen wie z.B. Licht- oder Fluoreszenzmikroskopie erlauben eine genauere Beurteilung der morphologischen Eigenschaften von Knochengewebe (Markel et al. 1991, Reichel et al. 1998, Regauer et al. 2005, Schortinghuis et al. 2003), wobei diese Methoden nicht in vivo anwendbar sind.

Die histologische Analyse der Knochenheilung bei der Kallusdisktraktion soll Aufschluss über Veränderungen in der Kallusmorphologie und damit eine Zuordnung zu den verschiedenen Phasen der Frakturheilung ermöglichen. Sie setzt sich aus einer Kombination verschiedener Methoden zusammen: Bestimmung der Kallusfläche, Ermittlung der Knochenneubildung und Analyse des regenerativen Gewebes innerhalb der Verlängerungsstrecke einschließlich der verschiedener Zelltypen und der Ausrichtung der Gewebestrukturen.

1.4.2 Mikroradiografie

Für die Beurteilung der Knochenqualität sind Mineralgehalt und Mineralverteilung wichtige Kriterien. Im makroskopischen Bereich können Informationen darüber durch konventionelle Röntgenbilder oder osteodensitometrische Verfahren gewonnen werden. Im mikroskopischen Bereich können Mineralgehaltsbestimmungen entweder durch die Mikroradiografie, durch

rasterelektronenmikroskopische Verfahren oder mit Hilfe der Ultraschallmikroskopie durchgeführt werden.

Unter Mikroradiografie versteht man seit Goby 1913 eine Kontaktröntgenaufnahme von mineralisierten Hartgewebeschnitten auf so feinkörnigem Filmmaterial, dass auch eine mikroskopische Untersuchung der Aufnahme möglich wird. Der wesentliche Unterschied zu Makroröntgenaufnahmen von dreidimensionalen Skelettteilen liegt in der mikroskopischen Analyse von annähernd zweidimensionalen Schichtbildern. Es ist sowohl eine qualitative Auswertung in Bezug auf die Knochenstrukturen (Jowsey 1973, Boivin und Baud 1984) als auch eine quantitative Analyse im Hinblick auf Mineralgehalt und Mineralverteilung möglich (Eschberger und Hartenstein 1977). Halb- und vollautomatische Bildanalyzesysteme führten zu einer beträchtlichen Verbesserung und Akzeptanz dieser Methodik.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Mikroradiografie stellt die Herstellung planparalleler, dünner Schichten von Knochengewebe dar. Mit Hilfe der Trenn-Dünnschliff-Technik nach Donath ist es möglich, derartige Präparate herzustellen (Donath 1988). Die optimale Dicke der Schiffe beträgt zwischen 100 und 200 μm . Die Untersuchung erfolgt an speziellen Röntengeräten. Die angewendete Röntgenstrahlung ist eine weiche Strahlung mit einer Energiemenge pro Photon von ca. 26-30 kV. Die Strahlenabsorption ist dabei direkt proportional zum Kalziumgehalt des Knochens. Es lassen sich somit unterschiedliche Mineraldichten des Knochens quantitativ erfassen, d.h. neu gebildeter Knochen lässt sich von dem ursprünglichen Knochen trennen.

Die Knochenzellen (Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten) sowie das unverkalkte Osteoid werden in den Mikroradiografiebildern nicht dargestellt. Erkennbar sind nur die sie umgebenden kalkreichen Strukturen und die Osteozytenlakunen. Deren Zahl und Größe kann zu Beurteilung eines pathologischen Knochenumbaus herangezogen werden. Die Mikroradiografie stellt eine Standarduntersuchung von kalzifiziertem Gewebe dar (Bollet-Quivogne et al. 2005, Roldan et al. 2004, Qin et al. 2001, Hobson 1998, Nyssen-Behets et al. 1994).

1.4.3 Biomechanische Tests

Biomechanische Steifigkeitsmessungen stellen im Gegensatz zu den bildgebenden Untersuchungsmethoden die einzige direkte Meßmethode zur quantitativen Beurteilung des sich regenerierenden Knochens dar. Die biomechanischen Eigenschaften kennzeichnen sein

Verhalten bei Belastung durch Kräfte und Momente. Zu diesen Eigenschaften gehören Steifigkeit und Festigkeit.

Die Steifigkeit ist definiert als Quotient aus Belastung (Kraft) und Verformung und ist damit ein Maß für den Widerstand des Knochens gegenüber einer auftretenden Kraft (Burstein und Wright 1997). Das Knochenregenerat wird als ein Material betrachtet, dessen Steifigkeit während der Konsolidierung bis zum Erreichen der biomechanischen Eigenschaften eines intakten Röhrenknochens zunimmt (Jorgenson 1972).

Die Festigkeit kennzeichnet die maximale Last, die eine Struktur ohne Materialversagen widersteht und ist damit definiert als Punkt der stärksten Belastung.

Beide Eigenschaften sind von der Länge, dem Querschnitt des Knochens sowie seinen intrageometrischen Parametern gekennzeichnet. Eine Korrelation vom Steifigkeit und Festigkeit wurde experimentell in verschiedenen Studien nachgewiesen (Henry et al. 1968, Lightowler 1972, Pope und Outwater 1972). Allerdings demonstrieren neuere Studien, dass diese Korrelation phasenabhängig ist. In der Frühphase der Konsolidierung zeigt sich eine ausgeprägte Korrelation, während diese gegen Ende der ossären Heilung abnimmt (Chehade et al. 1997).

Die Formänderung bei Belastung des Knochens und anderer Materialien werden in eine elastische und eine plastische Phase unterteilt (Abb. 1.6).

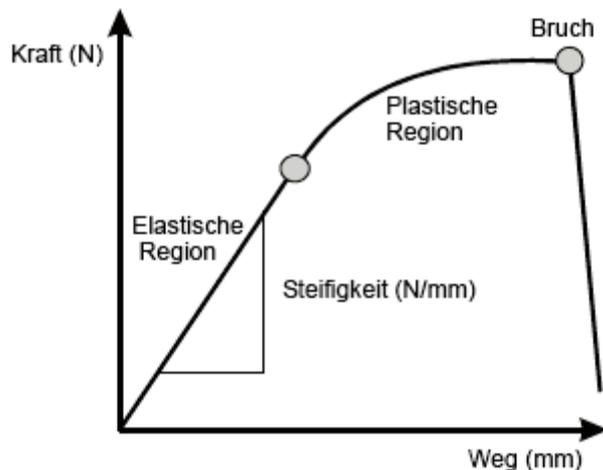


Abb. 1.6. Graphische Darstellung der elastischen und plastischen Phase bei der Formänderung von Knochen (nach Bouxsein et al. 1996)

Während der initialen Phase ist die Verformung reversibel. Die plastische Phase ist durch eine irreversible Formänderung definiert. Das Gewebe erfährt eine bleibende strukturelle Veränderung. Der Endpunkt dieser plastischen Phase ist gekennzeichnet durch den Bruch des Materials. Eine eindeutige Trennung zwischen elastischer und plastischer Verformung ist

jedoch nicht immer eindeutig erkennbar, da Knochengewebe, gerade während der Knochenheilung nicht genau definierbare elastische und plastische Eigenschaften aufweist. Des Weiteren ist Knochen anisotropes Gewebe, bei dem die biomechanischen Eigenschaften richtungsabhängig sind.

Erste biomechanische Untersuchungen zur Festigkeit von verheilenden Knochen nach Fraktur wurden in den sechziger Jahren von John Charnley durchgeführt, indem er die Relativbewegungen der Frakturrenden zueinander maß (Burny 1970). Später wurden weitere Methoden entwickelt, um die Achsabweichung und Verbiegung von Knochen als Funktion der einwirkenden Kraft zu messen (Jernberger 1970, Burny et al. 1978, Hammer et al. 1984). Zunehmend wurde versucht, die biomechanischen Veränderungen direkt über den Fixateur zu erfassen (Beaupre et al. 1983, Aronson et al. 1994).

Biomechanische Tests können je nach Krafrichtung und Angriffspunkt hinsichtlich der Knochenachse variieren. Bei der biomechanischen Untersuchung von Röhrenknochen kommen vor allem Biege- und Torsionstests zur Anwendung (Reichel 1998, Krüger 2001). Das Knochenregenerat wird Biege- bzw. Torsionskräften ausgesetzt und die resultierende Deformität bestimmt. Bei der Distractionsosteogenese wird die Steifigkeit des Knochens entweder direkt über die feste Pin-Knochen-Verbindung oder indirekt über die Deformation des Fixateur externe gemessen. Eine weitere biomechanische Untersuchungsmethode ist der Kompressionssteifigkeitstest, bei der der Röhrenknochen achsenparallel gestaucht wird. Alle drei Meßmethoden entsprechen den physiologischen Belastungskomponenten während des komplexen Geh- bzw. Laufvorganges.

Bei Biegetests (Dreipunkt-, Vierpunktbiegetest) wird eine Kraft senkrecht zur Längsachse des Extremitätenknochens eingeleitet. Es kommt zu einer Durchbiegung des Präparates bis zum Bruch. Die der Kraft zugewandten Knochenanteile werden am stärksten auf Biegedruckspannung belastet, die abgewandten auf Biegezugspannung. Die inneren Anteile werden entsprechend weniger belastet bis die Biegespannung bis zur neutralen Achse auf Null abnimmt. Die Biegebeanspruchung ist abhängig vom angreifenden Biegemoment, welches sich durch Kraft und Hebelarm definiert.

Biegetests lassen sich auch bei nichtinvasiven In-vivo-Messungen klinisch anwenden. Verschiedene Verfahren mittels 3- und 4-Punktbiegung wurden zur Beurteilung der Frakturheilung und Monitoring der Distractionsosteogenese genutzt (Evans et al. 1988, Richardson et al. 1994, Regauer et al. 2005, Nonaka et al. 2006). So konnten Richardson et al. 1994 nach der Messung an 212 Patienten mit dem „Orthometer“ (Orthofix, Bussolengo, Italien) einen biomechanischen Grenzwert für die Heilung von Tibiafrakturen postulieren.

Dwyer setzte das nichtinvasive Verfahren bei der Distraktionsosteogenese ein (Dwyer et al. 1996). Nachteilig ist die notwendige Entfernung des Fixateur externe während der Messung mit dem erhöhten Risiko von Achsabweichungen nach Wiederanlage des Fixateurs bzw. Schädigung der Frakturheilzone. Des Weiteren bewirken geringe Änderungen der Beinrotation oder der Platzierung des Goniometers signifikante Änderungen der Messwerte. Eine Alternative In-vivo-Steifigkeitsmeßmethode mit Verbleib des Fixateur externe wurde von Hente et al. 2003 beschrieben. Die an der Schafstibia angewandte Messapparatur wird über die Pins des Fixateur externe befestigt und lässt auch bei Pin-Lockerungen reproduzierbare Messungen zur Biegesteifigkeit zu (Hente et al. 2003). Diese haben sonst einen signifikanten Einfluss auf die Messergebnisse (Cunningham et al. 1989, Claes et al. 2002b).

Bei Torsionsbruchttests wird der Röhrenknochen parallel zur Längsachse einem Torsionsmoment ausgesetzt. Das Präparat verformt sich durch Torsion um einen Winkel β , der sich proportional zur Torsionskraft ändert. Knochenbereiche gleicher Torsionsspannung befinden sich auf einem Kreis um den Mittelpunkt der Querschnittsfläche. Die Torsionsspannung nimmt nach außen zu und verringert sich zur neutralen Längsachse auf Null. Experimentell wird dem Knochen eine zunehmende Torsionskraft zugeführt und der Rotationswinkel β gemessen bzw. der Übergang zur plastischen Verformung durch den Bruch des Knochens.

Auch Messungen zur Torsionssteifigkeit lassen ein In-vivo-Monitoring zu. Diese wurden bei Studien zur Distraktionsosteogenese bei Schafen angewandt und erlaubten eine quantitative Aussage über den Konsolidierungsverlauf (Windhagen et al. 1999, Thorey et al. 2000). Auch bei diesen Messungen ist eine Entfernung des Fixateurs nicht notwendig.

Der Goldstandard zur Messung der biomechanischen Kennwerte ist die Materialtestmaschine (Beaupre 1983). Mit dieser können tierexperimentelle In-vivo-Messungen nach Opferung der Versuchstiere validiert werden.

1.4.4 Quantitative Computertomographie (QCT)

Das älteste Verfahren zur Darstellung und morphologischen Beurteilung von Knochengewebe stellt die konventionelle Röntgenuntersuchung dar, wobei die Bildgebung durch Struktur und Mineralisationsgehalt des Gewebes bestimmt wird. Basierend auf diesem Verfahren wurde die Computertomographie (CT) entwickelt. Die Quantitative Computertomographie erlaubt

ein dreidimensionales Bild und ermöglicht Aussagen zum strukturellen Aufbau von Knochengewebe und dem Mineralsalzgehalt.

Trotz des Nachweises einer guten Korrelation zwischen Biomechanik und QCT bleibt letzteres nur eine indirekte Methode zur Abschätzung der biomechanischen Belastbarkeit. Es ermöglicht jedoch durch die Bestimmung der Knochendichte suffiziente Aussagen über die Knochenfestigkeit. Des Weiteren kann die Knochengeometrie evaluiert werden (Augat et al. 1996, 1997). Gegenüber der konventionellen Röntgendiagnostik ist die QCT sensitiver und spezifischer in der Lage, Kallusgewebe zu visualisieren. Dies gelingt mit dem nativen Röntgenbild nach 19 Tagen, mit der Quantitativen Computertomographie jedoch schon nach neun Tagen (Nutz und Uexkull-Guldenband 1988). Die Distraktionszone kann überlagerungsfrei dargestellt werden. Außerdem ist durch die dreidimensionale Darstellung des Knochengewebes die Visualisierung von Ossifikationsdefekten möglich (Reichel et al. 1998).

Die Knochenmineraldichte ist definiert als äquivalente Mineraldichte in Milligramm pro Milliliter $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (Hydroxylapatit). Das Ausmaß der Strahlenabsorption beim Durchtritt durch den Knochen wird durch den linearen Schwächungskoeffizienten bestimmt. Er wird einer Skala zugeordnet, die auf der Differenz der Strahlungsschwächung zwischen Wasser und Luft basiert (Hounsfield 1973). So können verschiedene Gewebsdichten ermittelt und zugeordnet werden. Zur besseren Vergleichbarkeit der Gewebe werden im CT die Hounsfield-Einheiten verwendet, die verschiedene Graustufen repräsentieren (Harp et al. 1994). Durch Messung eines kalibrierten HA-Phantoms lassen sich die bestimmten Hounsfield-Einheiten in Milligramm HA pro Milliliter umrechnen.

Mit der QCT können so quantitative Aussagen über den Zustand des Knochen- bzw. Kallusregenerates und das Ausmaß der Mineralisation getroffen werden (Schnarkowski et al. 1995, Smith et al. 1999). In verschiedenen Studien konnte eine positive Korrelation zwischen den biomechanischen Eigenschaften und den in der Quantitativen Computertomographie ermittelten Daten gezeigt werden (Aronson et al. 1990, Markel et al. 1990, Markel und Chao 1993, Augat et al. 1997, Den Boer et al. 1998, Lill et al. 2003). Diese tierexperimentellen Untersuchungen haben die Aussagekraft der QCT-Daten für die Knochenbelastbarkeit demonstriert. Die theoretischen Grundlagen für diese Untersuchungen beruhen auf der Korrelation zwischen dem quantitativ erfassten Mineralsalzgehalt und den mechanischen Eigenschaften des Knochens.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass der Kalziumgehalt des Kallusregenerates eine erklärende Variable für die Steifigkeit und das torsionale Bruchmoment des Knochens darstellt (Aro et

al. 1989). So können mit den Daten der QCT wichtige Informationen beim Monitoring der Distractionsosteogenese gewonnen werden. Dies betrifft insbesondere die Belastbarkeit des Knochens und somit den Zeitpunkt der Fixateurentfernung nach Konsolidierung des Regenerates (Rajewski 1994, Augat et al. 1997, Reichel et al. 1998). Reichel et al postulieren, dass bei Entfernung des Fixateur externe die in der QCT gemessene Knochendichte der neokortikalen Region 60% der normalen kortikalen Knochendichte entspricht.

Das limitierte Auflösungsvermögen lässt jedoch keine histomorphometrische Charakterisierung von z.B. einzelnen Trabekelstrukturen zu (Prevhral et al. 1998).

Die Nachteile der QCT sind die gegenüber der konventionellen Röntgendiagnostik höhere Strahlenbelastung des Patienten und die deutlich höheren Kosten (Sano et al. 1999, Smith et al. 1999). Bei liegendem Fixateur externe zeigen sich Artefakte, die die Auswertung der Daten erschweren (Augat et al. 1997, Kolbeck et al. 1999).

Eine Nutzung im klinischen Alltag hat sich aus diesen Gründen trotz der hervorragenden Eigenschaften zur nichtinvasiven Beurteilung der Mineralisierung von Kallusgewebe nicht durchgesetzt. Routinemäßig kommt sie bei der Diagnostik und Verlaufs- und Therapiekontrolle der Osteoporose zum Einsatz.

1.4.5 Ultraschallmikroskopie

Eine präzise Abschätzung des Frakturrisikos nach Kallusdistraction erfordert ein komplexes Verständnis struktureller und elastischer Eigenschaften des neu gebildeten Knochens. Das derzeit verfügbare räumliche Auflösungsvermögen radiologischer Techniken ist begrenzt und limitiert damit die Beurteilung der Kallusstruktur. Außerdem ist die quantitativ erfassbare Knochenmineraldichte (BMD: Bone Mineral Density) nur ein indirekter Indikator für die mechanische Knochenstabilität. Der in bisherigen Studien ermittelte Zusammenhang zwischen BMD und der mit biomechanischen Tests ermittelten Frakturfestigkeit war moderat (Markel und Chao 1993, Augat et al. 1997, Reichel et al. 1998). Aus diesem Grund ist die direkte Messung von strukturellen und mikroelastischen Gewebeeigenschaften von großer Bedeutung zum besseren Verständnis von Behandlungskonzepten (Hube et al. 2006). Aus den elastischen Eigenschaften des Knochens resultieren sowohl auf mesoskopischer als auch auf makroskopischer Ebene anisotrope (richtungsabhängige) elastische Eigenschaften.

Die Ultraschallmikroskopie (Scanning Acoustic Microscopy = SAM) wird bei der Erforschung der Knochenstruktur seit vielen Jahren eingesetzt (Hasegawa et al. 1994, Katz und Meunier 1997, Turner et al. 1999). Es stellt eine bildgebende, nicht invasive Technik dar,

die immer mehr an Bedeutung zur non destruktiven und daher beliebig wiederholbaren Untersuchung von biologischem Gewebe und dessen elastischen Eigenschaften gewonnen hat (Yu et al. 1995).

Die Methode der Scanning Acoustic Microscopy basiert auf der Verwendung von hochfrequenten Schallwellen, deren Verlauf von den elastischen Eigenschaften des zu untersuchenden Materials abhängig ist. Gemäß dem jeweiligen Anwendungsgebiet wird der passende Frequenzbereich ausgewählt. Dabei werden Frequenzen von 5 MHz bis 8 GHz verwendet (Hadimioglu und Foster 1984, Quate 1985).

Als Bilderzeugungs- und Bildanalysesystem besitzt SAM ein räumliches Auflösungsvermögen ähnlich dem des Lichtmikroskops (Yu et al. 1995, Katz et al. 2003, Liu et al. 2004). Dabei können Materialien untersucht werden, die optisch undurchsichtig sind (Bumrerraj et al. 2001). Ein bedeutender Vorteil der SAM besteht somit in der Möglichkeit, nicht nur die Oberfläche eines Präparates zu untersuchen, sondern auch tiefere, innerhalb der Probe gelegene Ebenen (Quate 1979, Briggs 1992).

Diese nicht invasive Methode wird über die Bildgebung hinaus verwendet, um biomechanische Eigenschaften homogener Substanzen und biologischer Gewebe zu charakterisieren (Hirse Korn und Pangraz 1994, Hasegawa et al. 1995, Rho 1996, Kessler et al. 2003, Hube et al. 2006). Neben der Untersuchung von Knochengewebe findet SAM auch Anwendung in der Kardiologie, Gastroenterologie und der Urologie (Jorgenson et al. 2001, Machado et al. 2002, Anderson et al. 2003). In der Ophthalmologie konnten neue Erkenntnisse bezüglich des Zusammenhangs von Skleradicke und uvealer Effusion gewonnen werden (Lam et al. 2005).

Das Verfahren basiert auf dem von Lemons und Quate (1974) beschriebenen Prinzip der akustischen Rastermikroskopie (Lemons und Quate 1974, Raum 2003).

In Abhängigkeit von den abgeleiteten akustischen Parametern lassen sich drei wesentliche Methoden unterscheiden:

- Bestimmung der akustischen Impedanz an dicken Proben
- Messung von akustischen Oberflächenwellen an dicken Proben
- Messung der Kompressionswellengeschwindigkeit in dünnen Gewebsschichten

Hierbei wird die Messung der akustischen Impedanz bei der Untersuchung von Knochengewebe angewandt, da die anderen Methoden bei Messungen von heterogenen Geweben limitiert sind (Briggs 1992, Maev et al. 2002). Bei der akustischen Impedanz wird die Laufzeit des Ultraschalls im Präparat ermittelt (Hasegawa et al. 1995, Turner et al. 1999).

Neuere Studien demonstrieren, dass die mit SAM gemessene akustische Impedanz Z die elastische Anisotropie von Knochengewebe widerspiegelt (Raum et al 2004, Hofmann et al 2005). Des Weiteren korreliert Z mit dem elastischen Koeffizienten c_{ii} in Untersuchungsrichtung bei der Ultraschallmikroskopie von Knochen (Raum et al. 2006a, 2006b).

Eine Untersuchung von Shieh et al. (1995) zu den Umbauvorgängen an Knochendefekten zeigte, dass neu gebildetes periostales wie endostales Gewebe eine große Grauwertvarianz und somit deutliche Unterschiede in der akustischen Impedanz aufweisen. Demgegenüber stellen sich intrakortikale Regionen als sehr homogen dar mit hoher akustischer Impedanz (Shieh et al. 1995).

Eine weitere Studie von Harten et al. (1997) befasste sich ebenfalls mit der Frakturheilung, indem die Kallusbildung mittels SAM quantitativ durch Bestimmung der akustischen Impedanz und zusätzlich auch im zeitlichen Verlauf beurteilt wurde. Es wurde ein signifikanter Unterschied zwischen der akustischen Impedanz des Kallusgewebes nach intramembranöser und enchondraler Ossifikation festgestellt sowie ein deutlicher linearer Zusammenhang zwischen Anstieg der durchschnittlichen Impedanz des Kallus und der Wundheilungszeit (Harten et al. 1997). Ähnliche Ergebnisse konnten an mandibulärem Knochen von Hunden nach Knochendistraktion erhoben werden. Auch hier bestand eine enge Korrelation zwischen akustischer Impedanz und Konsolidierungszeit (Adolphs et al. 2005).

Bei der Aufarbeitung von Präparaten stellt sich die Frage, inwiefern die notwendige Kunststoffeinfettung des Knochens die elastomechanischen Eigenschaften und somit die Messung der akustischen Impedanz beeinflusst. Zu diesem Zwecke verglichen Zimmerman et al. (1994) zum einen uneingebettetes Knochengewebe, zum anderen in Polymethylacrylat eingebettete Proben. Dabei stellte man fest, dass die Kunststoffeinfettung zu signifikant höheren Werten bei der Messung der akustischen Impedanz im Vergleich zu normalem Knochen führt, wobei diese Differenz konstant war, so dass durch Kalibrierung des Messsystems auch von eingebettetem Knochen der reelle Wert der akustischen Impedanz und somit die elastomechanischen Eigenschaften korrekt ermittelt werden können (Zimmerman et al. 1994).

Weiterhin wurde auch die Abhängigkeit der Grauwertdifferenzierung des Bildes vom Reflexionskoeffizienten des betrachteten Knochengewebes untersucht. In einer Studie von Qin et al. (2004) konnte eine starke lineare Abhängigkeit zwischen der durchschnittlichen Helligkeit eines Ausschnittes des SAM-Bildes und dem entsprechenden mittleren Reflexionskoeffizienten des Knochengewebes nachgewiesen werden. Somit kann von einer

dunklen Region auf einen niedrigen Reflexionskoeffizienten und auf eine geringe mittlere akustische Impedanz des betrachteten Knochengebietes geschlossen werden (Qin et al. 2004). Die Validität der Bildgenerierung und Abbildung durch SAM im Vergleich zu konventionellen Methoden zur histologischen Bildgenerierung wie der Mikroradiographie wurde bereits überprüft, das heißt es wurden quantitative Vergleiche der morphologischen Darstellung durchgeführt. Raum et al. (2004) berichten über die Abhängigkeit der Auflösung der Mikrostruktur kortikalen Knochens von der Frequenz. Des Weiteren wurde der Vergleich von ultraschallmikroskopischen Daten (SAM 50 - 200 MHz) und μ CT-Daten in mehreren Arbeiten beschrieben (Raum et al. 2005, 2006a, 2006b).

Es stellt sich die Frage, ob durch SAM Knochenstrukturen verlässlich strukturgleich abgebildet werden, inwiefern die Bildgebung von den bereits genannten Fehlerquellen sowie der Inhomogenität des Knochengewebes beeinflusst wird und somit die erstellten Bilder mit den durch etablierte Methoden erzeugten übereinstimmen.

2. Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es nachzuweisen, ob durch lokal applizierte Wachstumsfaktoren die Konsolidierungszeit verkürzt und die Kallusfestigkeit erhöht werden kann. Dies wird im Tierversuch geprüft. Die biomechanischen Ergebnisse werden mit histologischen und bildgebenden Verfahren abgeglichen, um eine humanklinische Anwendung zu ermöglichen.

Im Einzelnen ergeben sich folgende Fragen:

1. Kann man anhand des von uns verwendeten Modells die Qualität der Knochenheilung nach Kallusdistraction bestimmen und sind die daraus ermittelten Daten valide und repräsentativ?
2. Ist die lokale Applikation von IGF-I und TGF- β 1 geeignet, die Knochenheilung bei der Distractionosteogenese zu beschleunigen?
3. Wird durch die Deperiostierung im Osteotomiebereich eine verzögerte Knochenheilung ausgelöst?
4. Ist die Polylaktidmembran als Medikamententräger geeignet, Wachstumsfaktoren lokal in ausreichender Dosis freizusetzen?
5. Ist ein Vergleich mit etablierten Therapien (autologe Knochenplastik) möglich?

3. Material und Methodik

3.1 Versuchsmodell und Tierversuch

3.1.1 Versuchsmodell

Im Versuchsmodell wurde eine verzögerte Kallusbildung implementiert. Aus diesem Grund wurde die Durchtrennung der Extremität nicht mittels Kortikotomie (Reichel 1998) sondern mit ungekühltem Sägeschnitt durchgeführt. Zusätzlich wurde eine definierte Deperiostierung im Osteotomiebereich zur weiteren Inhibierung der Distraktionsosteogenese vorgenommen (Hietaniemi et al. 1995, Kokubu et al. 2003). Das Periost wurde ausgehend vom Margo anterior tibiae jeweils ein Zentimeter nach proximal und distal bis zur Sagittallinie entfernt.

Die Kallusdistraktion von täglich einem Millimeter erfolgte mittels unilateralen Fixateurs für 30 Tage. Zu Beginn der Konsolidierungsphase wurden Wachstumsfaktoren lokal appliziert, eine Spongiosaplastik durchgeführt bzw. beide Techniken kombiniert. Diese Gruppen wurden einer Kontrollgruppe gegenübergestellt. Die Konsolidierungsphase dauerte 60 Tage. Das unterschiedliche Ausmaß der Kallusfestigkeit in den verschiedenen Gruppen wurde röntgenologisch, densitometrisch, biomechanisch, histologisch und mit Hilfe der Ultraschallmikroskopie untersucht. Ein Schema des Versuchsablaufes zeigt Abbildung 3.1.

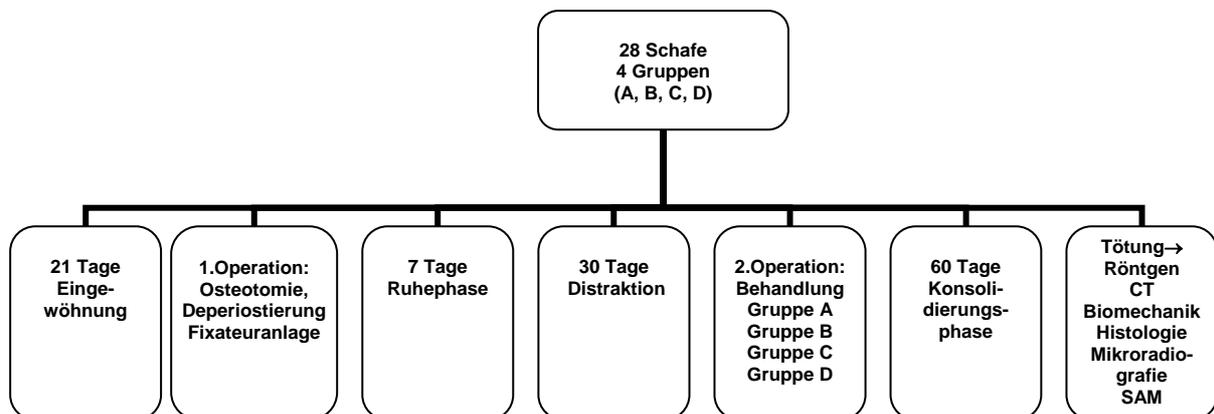


Abb. 3.1. Schematischer Ablauf des Versuches

3.1.2 Wahl des Versuchstieres und Örtlichkeiten

Für den Vor- und Hauptversuch wurden gesunde, adoleszente, weibliche Merino-Wollschafe verwendet. Die Untersuchungen wurden durch den Tierversuchsantrag AZ K7G11 vom 15.05.2002 durch das Regierungspräsidium Halle genehmigt. Alle beteiligten Untersucher

waren entsprechend §8 des Tierschutzgesetzes bei der Meldebehörde registriert. Das Durchschnittsalter der Tiere betrug zum Operationszeitpunkt 9-11 Monate bei einem durchschnittlichen Gewicht von 48,1 kg (\pm 2,9 kg). Die Skelettreife wird beim Merino-Wollschaf mit 12-15 Monaten erreicht (Michel 1977). Vor Beginn der Versuche erfolgte eine veterinärmedizinische Untersuchung. Alle Versuchstiere befanden sich in gutem körperlichem Zustand und wiesen keinerlei Krankheitsmerkmale auf. Zur Gewöhnung an die Pflegepersonen und Räumlichkeiten wurden die Tiere für insgesamt 3 Wochen vor Versuchsbeginn in den Stallungen der Tierklinik der Universität Halle untergebracht. Während des gesamten Hauptversuches hielten wir die Schafe entsprechend der Versuchseinteilung in Gruppen zu 7 Tieren (Abb. 3.2). Dies entsprach einer artgerechten Haltung eines Herdentieres (Richter et al. 1986). Hierbei konnten auch die Erfahrungen der Arbeitsgruppe Kallusdistraction an der Orthopädischen Universitätsklinik Halle genutzt werden (Reichel 1998).

Die Unterbringung und Pflege der Tiere wurden in Stallungen der Tierklinik der Universität Halle nach tiermedizinischem Standard durchgeführt. Die Pflege erfolgte unter Supervision eines Tierarztes.



Abb. 3.2. Tierhaltung während des Versuches in Gruppen zu 7 Tieren

3.1.3 Vorversuch

In den zwei durchgeführten Vorversuchen wurde das Versuchsmodell getestet.

In Zusammenarbeit mit der Unfallchirurgischen Klinik der Charité Berlin wurde zuerst eine in vitro Testung zur Freisetzung von Proteinen aus Polylaktidmembranen (PDLLA Membranen) (Fa. Stratec Medical, Oberdorf, Schweiz) durchgeführt. Die auch im Hauptversuch verwendeten porösen Membranen hatten ein Molekulargewicht von 30 kDa und eine Dicke von 0,6 mm. Die

Präparation mit einem „Ersatzprotein“ erfolgte durch Frau PD Dr. B. Wildemann, Charité Berlin. Hierbei kam Aprotinin zur Anwendung. Es weist ein vergleichbares Molekulargewicht wie IGF-I auf (7,5 kDa IGF-I, 6,5 kDa Aprotinin). In einem Freisetzungsversuch (Zeitpunkte 0h, 6h, 12h, 24h, 2d, 7d, 14d, 28d) sollte eine reproduzierbare definierte Freisetzungskinetik ermittelt werden. In einem zweiten Vorversuch wurde an 4 Tieren das Tiermodell praktisch untersucht. Hierbei sollte die Applikation der Wachstumsfaktoren mittels Polylaktidmembran, die Durchführung der autologen Spongiosaplastik und die Kombination beider Techniken auf ihre praktische Umsetzung überprüft werden. Die Kallusdistraktion an der Schaftibia als Tiermodell wurde schon durch Reichel ausführlich dargestellt (Reichel 1998).

3.1.4 Versuchsgruppen

Zur Einschätzung der Wirksamkeit der lokalen Applikation von Wachstumsfaktoren wurden die 28 Tiere vor Beginn des Hauptversuches in Versuchsgruppen eingeteilt. Nach Randomisierungsprotokoll erfolgte die Bildung von vier Versuchsgruppen zu je 7 Tieren. Dies stellte aus Gründen der Versuchssicherheit und der biostatistischen Auswertbarkeit das vertretbare Minimum dar. Die Schafe wurden gruppenweise an 4 aufeinander folgenden Tagen operiert. Die Gruppen unterschieden sich durch die Behandlung nach Beendigung der Distraktionsphase. Bei allen vier Gruppen wurde ein zweiter Eingriff im Bereich der Distraktionsstrecke durchgeführt.

Die Gruppe A wurde mit einer unbeschichteten Membran im Bereich der Distraktionsstrecke behandelt.

In der Gruppe B erfolgte die Applikation der mit einem IGF-1/TGF- β 1 angereicherten Polylaktidmembran. Die Beschichtung der porösen Membranen mit 100 μ g IGF-I und 20 μ g TGF- β 1 wurde im Vorfeld des Versuches durch Frau PD Dr. Brit Wildemann, Charité Berlin vorgenommen. Die Konzentrationen waren bei allen Implantaten gleich.

In der Gruppe C wurde eine autologe Spongiosaplastik als Standardverfahren („Goldstandard“) bei der Behandlung von verzögerten Knochenheilungen durchgeführt (Niyibizi und Kim 2000, Khan et al. 2005).

Bei der Gruppe D kam eine Kombination der Verfahren B und C zur Anwendung.

Bis auf den Eingriff zu Beginn der Konsolidierungsphase waren die Operationsverfahren, Distraktionsstrecke und die Konsolidierungszeit für alle Gruppen gleich. Alle Tiere wiesen bis zum Versuche eine gute körperliche Verfassung auf. Haltungsbedingte Komplikationen, die zur Opferung eines Tieres geführt hätten, traten nicht auf.

Weichteilinfektionen im Bereich der Pins wurden lokal antibiotisch behandelt. Weitere haltungsbedingte oder intra- und postoperative Komplikationen wurden nicht festgestellt.

Die regelmäßigen Gewichtskontrollen zeigten eine Zunahme während des Gesamtversuches um durchschnittlich 3,1 kg (\pm 2,4). Dies kennzeichnet die guten Haltungsbedingungen und Verfassung der Tiere. Die Tötung der Tiere erfolgte ebenfalls gruppenweise an 4 aufeinander folgenden Tagen.

3.1.5 Operationstechnik und perioperatives Management

Vor der Operation erfolgte eine Nahrungskarenz von 24 Stunden. Die Narkose führte der Tierarzt durch.

Zur Platzierung eines Venenkatheters (Cava-Fix, 45 cm lang) erfolgte präoperativ eine Rasur der linken Halsseite beim Schaf in der sog. Australischen Schäferhaltung. Danach wurde die Vena jugularis externa punktiert und ein Katheter eingelegt. Zur Narkoseeinleitung wurden 0,05 mg/kg Körpergewicht (KG) Atropin, 0,22 mg/kg KG Xylazin sowie 11 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid i.m. verabreicht. Nachfolgend wurden die Tiere intubiert. Hierfür kamen Gummituben (28-30 Charriere, Länge 40cm) zur Anwendung. Es erfolgte unverzüglich der Anschluss an ein Beatmungsgerät („Medimorph“ Typ 41 102 mit „Univent100“ von MLW). Die Narkose wurde mit einem Lachgas-Sauerstoff-Gemisch (3:1) sowie Repititionsdosen von 0,02 mg/kg KG Fentanyl i.v. (ca. alle 20 Minuten) fortgesetzt.

Die pulsoximetrische Steuerung der Narkosetiefe orientierte sich an der Pupillenweite, Schmerzreflexen, Lid-, Korneal- und Interdigitalreflexen. Bei Bedarf wurden Repititionsdosen von Ketamin und Xylazin gegeben. Über den zentralvenösen Zugang konnten zusätzlich Elektrolytlösungen verabreicht werden.

Der Narkoseabbruch erfolgt durch Absetzen der Fentanyl-, Atracuriumbesilat- und Lachgaszufuhr und eine dreiminütige Sauerstoffbeatmung. Bis zum Einsetzen der Spontanatmung wurde eine Raumlufbeatmung durchgeführt. Nach Rückkehr des Schluckreflexes erfolgte die Extubation.

Vor Operationsbeginn führten wir die perioperative antibiotische Abschirmung mit einer einmaligen i.v.-Gabe von Cefuroxim 750 mg durch.

Nach eingesetzter Narkose und Scherung des Unterschenkels des linken Hinterlaufes erfolgte der Eingriff am rechtsseitig gelagerten Tier. Eine dreimalige Waschung und Bürstenreinigung mit alkoholischer Seifenlösung diente der Entfettung und Reinigung der Haut. Die Desinfektion des OP-Gebietes wurde mit Betaisodona[®]-Lösung (Firma Mundipharma GmbH)

durchgeführt. Die sterile Abdeckung entsprach aseptischen Bedingungen. Nun wurde von anterolateral ein unilateraler Fixateur (Monotube blau, Firma Stryker-Howmedica) an die Tibia angelegt. Hierzu wurden 6 selbstbohrende und selbstschneidende Apex-Knochenschrauben (120 mm lang, 35 mm Gewindelänge) von 4 mm Durchmesser exakt parallel und in einer Ebene in den notwendigen Abständen angebracht. Das Einbringen der Pins erfolgte mit einem Handbohrgriff nach Stichinzision der Haut und Spreizen der tieferen Weichteile unter Nutzung einer Bohrhülse. Die Platzierung erfolgte so, dass der am weitesten proximal eingebrachte Pin 15 mm distal des Kniegelenkspaltes und der am weitesten distal eingebrachte Pin 15 mm proximal des oberen Sprunggelenkes lag (Abb. 3.3).



Abb. 3.3. Einbringen der Apex-Schrauben mit Hilfe des vorjustierten Fixateurs

Anschließend wurde die Osteotomie mit definierter Deperiostierung im diaphysären Bereich durchgeführt. Hierzu erfolgte ein ca. 3-4 cm langer Hautschnitt längs über der Tibiavorderkante. Danach wurde scharf die Unterhaut bis auf den Knochen durchtrennt. Das Periost wurde freigelegt und die Osteotomiestelle definiert. Nun wurde ausgehend vom Margo anterior tibiae und der Osteotomiestelle ein definierter, semizirkulärer Periostdefekt von 20 x 20 mm scharf präpariert. Es erfolgte das Umfahren der Tibia in diesem Bereich mit gebogenen Hebeln zum Schutz der angrenzenden Weichteile. Die Durchführung der Osteotomie mit der oszillierenden Säge erfolgte ohne Kühlung (Abb. 3.4, 3.5).

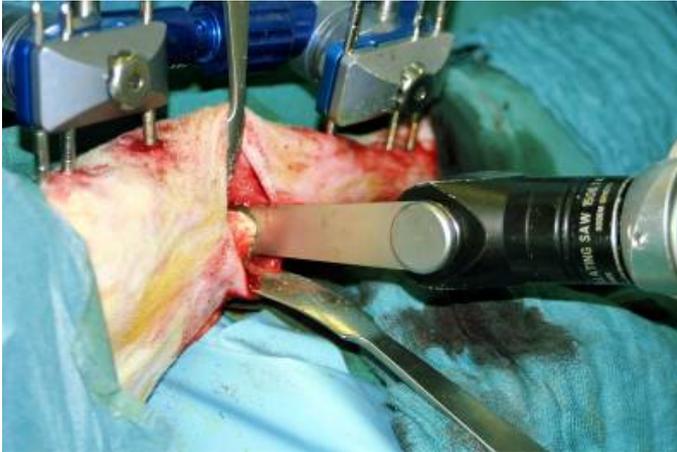


Abb. 3.4. Durchführung der Osteotomie mit der oszillierenden Säge ohne Spülung



Abb. 3.5. Operationssitus nach Deperiostierung des definierten Bereiches und Durchführung der Osteotomie

Der Fixateur wurde in ca. 6 cm Abstand zur Tibia montiert. Zur Kontrolle der Vollständigkeit der Osteotomie wurde eine Probedistraktion von mehreren Millimetern durchgeführt. Die Fixation der Fragmentenden erfolgte in einem Abstand von 1 mm Abstand.

Der Wundverschluss erfolgte mit resorbierbarem Nahtmaterial, das nicht entfernt werden musste.

Noch auf dem OP-Tisch wurde die korrekte Position von Fixateur und Osteotomie durch Röntgenaufnahmen in zwei Ebenen kontrolliert (Abb. 3.6).

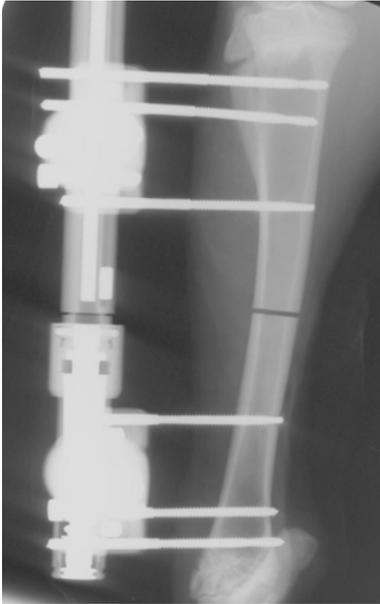


Abb. 3.6. Postoperative Röntgenkontrolle der Osteotomie und Fixateurlage im anterior-posterioren Strahlengang

Der Unterschenkel wurde danach zum Schutz vor Verunreinigung und Hängenbleiben am Fixateur mit einem wattegepolsterten sterilen Verband umwickelt.

Unmittelbar nach der Operation erhielten alle Tiere zur Analgesie 100 mg Tramalhydrochlorid subkutan injiziert. Nachfolgend wurden die Tiere im narkotisierten Zustand in den Stall zurückgebracht, wo sie unter Aufsicht des Tierarztes aus der Narkose erwachten. Alle Tiere liefen postoperativ sofort sicher im Dreipunktgang unter Schonung der operierten linken hinteren Extremität (Abb. 3.7).



Abb. 3.7. Sicherer Stand des Versuchstieres unter Schonung der operierten Extremität

Die Nahrungsaufnahme begann sofort nach Beendigung der Narkose. Zur weiteren postoperativen Analgesie wurde in den ersten 6 Tagen täglich 3 x 1 g Metamizol-Natrium verabreicht.

Verbandswechsel erfolgten während der gesamten Versuchszeit einmal wöchentlich. Hierbei wurden alle Pineintrittsstellen sowie die Operationswunde mit Polyvinyl-Jod desinfiziert. Bei drei Tieren kam es zu temporären Pintraktinfektionen im Bereich der proximal eingebrachten Pins, die unter lokal verabreichter Antibiotikasalbe zur Abheilung gebracht werden konnten. Gleichzeitig konnten während der regelmäßigen Verbandswechsel die Distraktionsstrecke, die Achsausrichtung, Pindeformierungen und die Festigkeit der Pins und der Fixateurmechanik überprüft werden. Nach Beendigung des Verbandswechsels wurde der Fixateur unter Aussparung der Längeneinstellschraube abgepolstert, um Verletzungen der anderen Gruppentiere während der Haltung zu vermeiden (Abb. 3.8).



Abb. 3.8. Abgepolsterter Verband mit Aussparung der zur Verlängerung benötigten Längeneinstellschraube

3.1.6 Distraktionsphase

Nach einer Ruhephase von 7 Tagen, in denen sich ein Regenerat (Kallusvorstufe) zwischen den Fragmentenden bilden konnte, wurde mit einer Distraktion des Kallus von 1 mm/Tag begonnen. Hierzu wurde 2 x täglich in einem Abstand von 12 Stunden mit Hilfe der Längeneinstellschraube am Fixateur um 0,5 mm distrahiert. Nach einer Gesamtdistraktionsdauer von 30 Tagen (30 mm Länge) wurde der Fixateur blockiert. Nach Beendigung der Distraktion erfolgte eine Röntgenkontrolle der operierten Extremität in 2 Ebenen zur Kontrolle der Distraktionsstrecke, der Achse und der Pintrakts.

Nach 30 Tagen wurde bei allen Tieren eine Verlängerung des Fixateur externe von 30 mm ohne signifikante Achsabweichung der distrahierten Tibia erreicht. Während der wöchentlichen Verbandswechsel erfolgte die Kontrolle der Verlängerungstrecke anhand der am Fixateur befindlichen Skala. Diese entsprach bei allen Tieren der berechneten Distraktion.

Die Versuchstiere gingen während der Distraktionsphase ohne Ausnahme vom Dreipunkt- in den Vierpunktgang über. Dies geschah unter Teilbelastung der operierten Extremität.

3.1.7 Gruppenspezifische Therapie

Nach Abschluss der Distraktionsphase wurde je nach randomisierter Gruppeneinteilung die weitere Therapie modifiziert.

Bei allen Gruppen erfolgte ein zweiter Eingriff in Narkose. Narkoseform und perioperatives Management entsprachen dem Ersteingriff, wobei die Traumatisierung beim Folgeeingriff erheblich geringer war.

Die Gruppe A wurde mit einer unbeschichteten Polylaktidmembran von 20 x 30 mm im Bereich des Periostdefektes behandelt. Diese legten wir ausgehend vom Margo anterior tibiae zentral über die 3 cm lange Distraktionsstrecke zirkulär auf. In der Gruppe B wurde die Applikation der mit IGF-I/TGF- β 1 angereicherten Polylaktidmembranen gleicher Größe durchgeführt. Die Anreicherung erfolgte mit 100 μ g IGF-I und 20 μ g TGF- β 1 bei allen verwendeten Implantaten (Abb. 3.9).

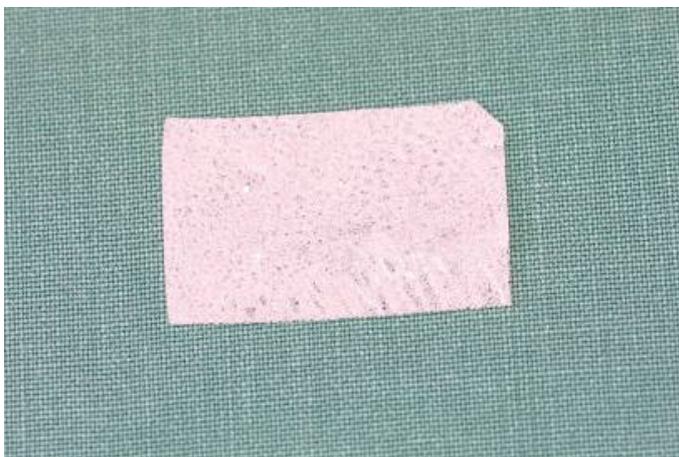


Abb. 3.9. Polylaktidmembran vor Einbringen in den Operationssitus. Die rechte obere Ecke ist abgeflacht, um die beschichtete und die unbeschichtete Seite zu unterscheiden.

Zu diesem Zweck wurde die Haut über der Verlängerungsstrecke am Margo tibiae anterior erneut längs eröffnet. Durch die Verschiebung der Haut während der Distraktion nach distal konnte die bestehende Narbe nicht verwendet werden. Die exakte Bestimmung des Operationszuganges erfolgte anhand des Abstandes zwischen den jeweils der Tibiadiaphyse zugewandten Pins. Die ermittelte Strecke wurde halbiert und entsprach dem Mittelpunkt der Verlängerungsstrecke. Unter Schonung des Kallusgewebes wurde dieses dargestellt und die Membran aufgebracht. Eine Fixierung mittels resorbierbarer Schrauben oder transossärer

Nähte war, wie im Vorversuch festgestellt, nicht notwendig. Vielmehr gelang eine exakte Fixierung auf dem Kallusgewebe durch Kompression der darüber wieder verschlossenen Weichteile.

In der Gruppe C wurde eine autologe Spongiosaplastik als Standardverfahren durchgeführt. Die autologe Spongiosa entnahmen wir aus dem Humeruskopf der unilateralen vorderen Extremität mit Hilfe einer Kürette (Abb. 3.10) (Wenzel 2002).

Die Applikation erfolgte nach der oben beschriebenen Eröffnung der Verlängerungsstrecke anterior in gleicher Weise wie die Membran (Abb. 3.11).



Abb. 3.10. Zugang zur autologen Spongiosaentnahme am unilateralen Humeruskopf



Abb. 3.11. Spongiosaplastik in situ nach Applikation über der Verlängerungsstrecke. Am rechten Bildrand befindet sich die nach distal verschobene Narbe des ersten Eingriffes.

Bei der Gruppe D kam eine Kombination beider Verfahren zur Anwendung. Zuerst wurde die autologe Spongiosaplastik eingebracht und die Polylaktidmembran nachfolgend aufgelegt

(Abb. 3.12). Die Fixierung erfolgte ebenfalls über die Kompression durch den Verschluss der Weichteile nach Beendigung des Eingriffes (Abb.3.13).



Abb. 3.12. Polylaktidmembran in situ nach Applikation über der Spongiosaplastik.



Abb. 3.13. Fixierung der Spongiosaplastik bzw. der Polylaktidmembran durch die verschlossenen Weichteile.

Der Wundverschluss wurde wie beim Ersteingriff mit resorbierbarem Nahtmaterial, das nicht entfernt werden musste, durchgeführt. Der Unterschenkel wurde danach zum Schutz vor Verunreinigung und Hängenbleiben am Fixateur mit einem wattegepolsterten sterilen Verband umwickelt, diesmal unter Einschluss der Verlängerungsschraube.

Alle Versuchstiere der einzelnen Gruppen blieben für eine Konsolidierungszeit von acht Wochen in ihren Stallungen. Diese Zeit ist bei normaler Durchführung der Kortikotomie ohne negative Einflussfaktoren auf die Kallusbildung ausreichend für eine vollständige Konsolidierung in diesem Tiermodell (Reichel 1998). Während der wöchentlichen Verbandswechsel erfolgte eine regelmäßige Kontrolle des Fixateurs, an dem keine

Veränderungen mehr vorgenommen wurden. Im Verlauf der Konsolidierungsphase gingen alle Tiere der 4 Gruppen zur Vollbelastung der operierten Extremität über.

Nach vier Wochen und zum Ende der Konsolidierungszeit erfolgte eine Röntgenkontrolle der operierten Tibia in 2 Ebenen.

3.1.8 Fluorochrommarkierung

Zur qualitativen histologischen Darstellung des Knochens nach der Distraction und der Erfassung von nachfolgenden Remodellingprozessen wurden Fluoreszenzmarkierungen durchgeführt. Nach Abschluss der Distractionsphase erfolgte die Applikation von Oxytetracyclin in einer Dosierung von 20 mg/kg Körpergewicht s.c. (Terramycin LA vet inject[®]). Für alle Gruppen war der Zeitpunkt für die subkutanen Applikationen der sterilfiltrierten Farbstofflösungen gleich. Unverträglichkeitsreaktionen wurden bei keinem der Tiere beobachtet.

3.1.9 Tötung der Tiere

Die Tötung der Tiere erfolgte nach Abschluss der Konsolidierungsphase. Sie wurde vom Tierarzt durch eine intravenöse Injektion von 10 ml T 61 ad us. vet[®] (Kombinationspräparat mit 200 mg Embutramid, 50 mg Mebezonium und 5 mg Tetracain je ml) durchgeführt. Der Tod trat nachfolgend sofort und schmerz- und exzitationsfrei durch Atemlähmung ein.

3.2 Untersuchungsmethoden

3.2.1 Aufarbeitung der Präparate

Nach Tötung der Tiere erfolgte die Explantation der Unterschenkel beider hinterer Extremitäten. Hierzu wurde eine Exartikulation im Kniegelenk und im oberen Sprunggelenk durchgeführt. Nach Durchführung der Röntgenkontrolle der Tibiae im frontalen und sagittalen Strahlengang erfolgte eine Kryofixation der Proben bei -80°. Diese wurde nur während der Durchführung der computertomografischen Untersuchung und während der biomechanischen Tests unterbrochen. Nach der Durchführung der QCT entfernten wir den Fixateur. Der Weichteilmantel wurde zur Vorbereitung der biomechanischen Tests vom Knochen gelöst.

Nach Abschluss der biomechanischen Tests kürzten wir die distrahierten linken Tibiae auf 70 mm zur Vorbereitung der histologischen Untersuchung.

3.2.2 Röntgenkontrollen

Röntgenaufnahmen der behandelten Tibiae wurden zur Verlaufskontrolle unmittelbar postoperativ, nach Beendigung der Distraktionsphase und nach Abschluss des Versuches durchgeführt. Wir röntgen die Tiere im anterior-posterioren und seitlichen Strahlengang (Abb. 3.14).

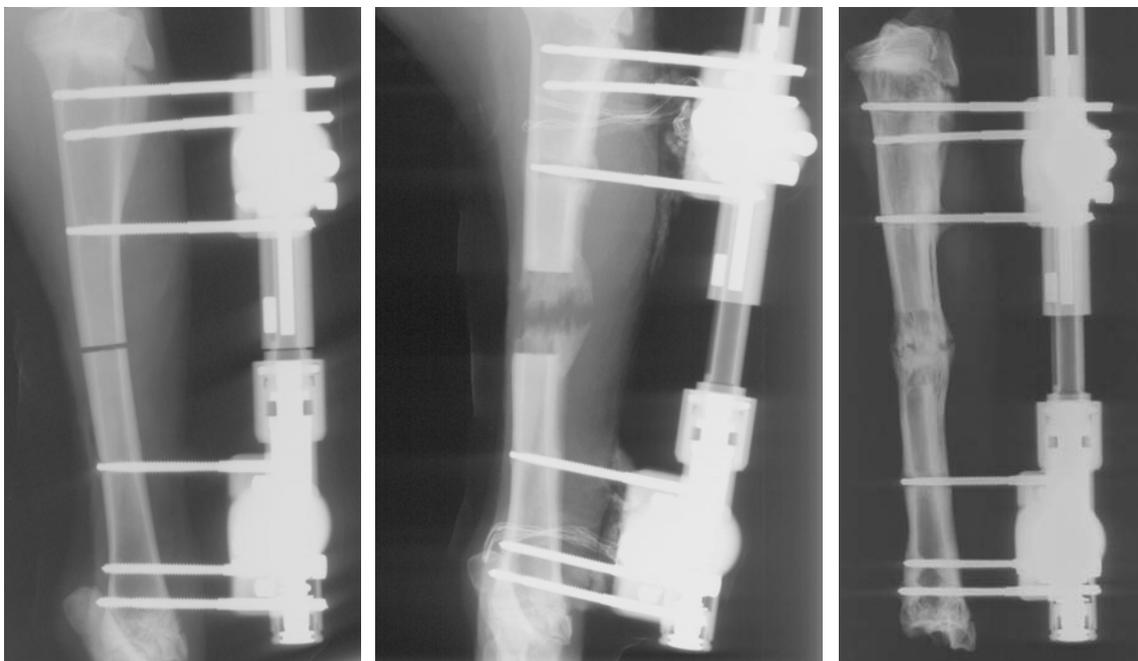


Abb. 3.14. Röntgenaufnahme der linken Schafttibia im anterior-posterioren in der Verlaufskontrolle unmittelbar postoperativ, nach Beendigung der Distraktionsphase und nach Abschluss des Versuches

Hierbei kam das mobile Röntgengerät Mobilet II (Siemens AG, Erlangen, 40 kV, 28 mAs) zur Anwendung. Während des Ersteingriffes und bei den Gruppen B, C und D wurden die Operationsnarkosen für die radiologischen Kontrollen genutzt. Bei den röntgenologischen Verlaufskontrollen nach Ende der Distraktionsphase war keine Sedierung bzw. Narkose der Tiere notwendig. Die Tiere wurden rechtsseitig gelagert und von einer den Schafen bekannten Tierpflegerin fixiert. Während der Untersuchung erfolgte die Überprüfung der Position des Fixateurs, der Achsausrichtung der Tibia und der Distraktionsstrecke. So konnten mögliche radiologisch relevante Lockerungen der Apex-Schrauben erkannt werden.

Die letzte radiologische Kontrolle nach Abschluss des Versuches wurde nach Tötung der Tiere und Exartikulation im Kniegelenk der linken unteren Extremität durchgeführt.

3.2.3 Knochendichtebestimmung durch QCT-Untersuchung

Die QCT-Messungen wurden in der Klinik Diagnostische Radiologie der MLU Halle-Wittenberg durchgeführt. Hierbei untersuchten wir die distrahierte Tibia und die kontralaterale Tibia als Kontrolle mit Weichteilmantel (SOMATOM PLUS 40, Siemens AG, Erlangen). Folgende technische Parameter wurden verwendet:

Umlaufzeit:	2 s
Strahlenmenge („mAs Produkt“):	165 mAs
Strahlenqualität:	120 kV
Schichtdicke:	2 mm
ROI:	2 mm

Die Tibiae wurden paarweise parallel auf dem Untersuchungstisch dorsal aufliegend positioniert. Die Mitte der Kontrolltibia entsprach exakt der Mitte der Verlängerungsstrecke der distrahierten Tibia.

Analysiert wurden jeweils 4 Messregionen (Regions of interest ROI's) quer zur Tibiaachse. Die Messregionen an der Tibia waren wie folgt definiert:

- ROI A: 10 mm proximal vom Mittelpunkt der Distraktionsstrecke
- ROI B: Mittelpunkt der Verlängerungsstrecke
- ROI C: 10 mm distal vom Mittelpunkt der Distraktionsstrecke
- ROI D: 25 mm distal vom Mittelpunkt der Distraktionsstrecke

Auf der Kontrollseite wurde für die Messregion B der Mittelpunkt der Gesamtlänge der Tibia definiert. Die anderen Regionen wurden wie an der verlängerten Tibia entsprechend festgelegt (Abb. 3.15).

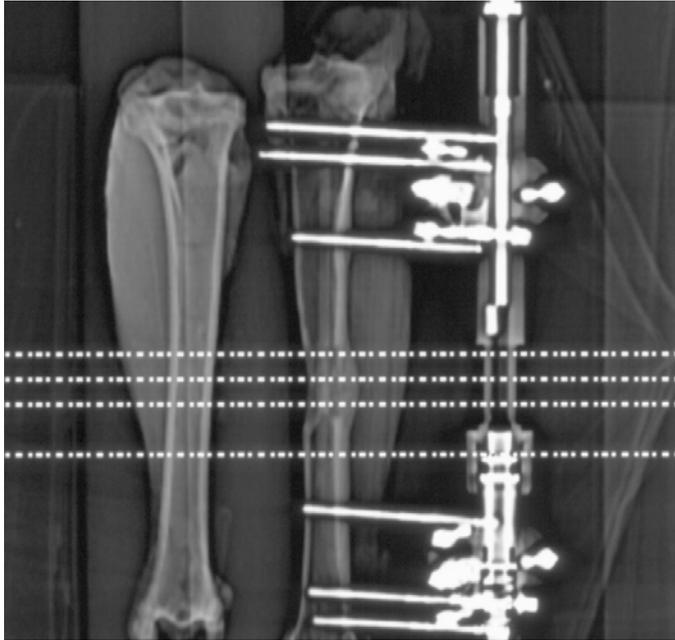


Abb. 3.15. Topogramm beider Tibiae auf dem Untersuchungstisch. Eingezeichnet sind die 4 Linien, die die verwendeten Scans für die Messregionen (ROI's) A – D darstellen.

In den CT-Querschnitten wurden jeweils 5 kreisförmige ROI's mit einem Durchmesser von 2 mm definiert (Reichel 1998):

1. Zentrum der Markhöhle = ROI c
2. anteriore Kortikalis = ROI a
3. posteriore Kortikalis = ROI p
4. mediale Kortikalis = ROI m
5. laterale Kortikalis = ROI l

Sie wurden so positioniert, dass die ROI's a, c und p sowie m, c und l auf jeweils senkrecht zueinander liegenden Linien lagen. Der Abstand der kortikalen vom zentralen Messbereich war gleich groß (Abb. 3.16).

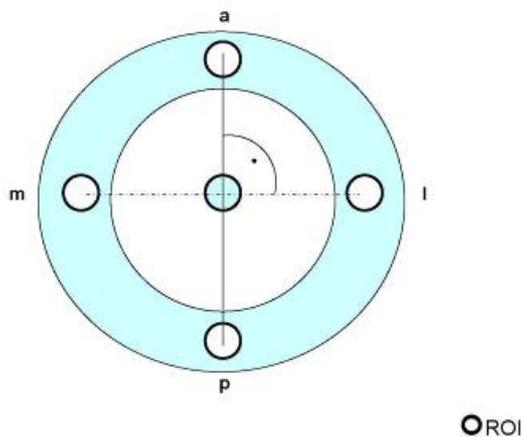


Abb. 3.16. Schematische Darstellung der anatomischen Lage der ROI's im CT-Querschnitt: a – anterior, p – posterior, m – medial, l – lateral, c – zentral (angelehnt an Reichel 1998)

Bei nicht sicher abgrenzbarer Kortikalis wurden die Messregionen in der kortikalen Zone des Kallusbereiches entsprechend positioniert. Bei einer Schichtdicke der Scans von 2 mm und einem Durchmesser der ROI's von 2 mm wurden demzufolge zylinderförmige Volumeneinheiten dieser Ausmaße gemessen.

Die Dichtewerte der Gewebe wurden in Hounsfield-Einheiten (HE) als lineare Schwächungskoeffizienten der verwendeten Strahlung gemessen und der sog. „Hounsfieldskala“ zugeordnet. Diese beruht auf der Differenz der Strahlungsschwächung zwischen Wasser und Luft, wobei Wasser die Dichte von 0 und Luft die Dichte von -1000 hat.

Das kleinste Bildelement im CT ist das Pixel, das einen bestimmten Anteil der Querschnittsfläche repräsentiert und unter Berücksichtigung der Schichtdicke auch eine Volumeneinheit (Voxel). Das Voxel ist durch einen Dichtewert charakterisiert, welcher der durchschnittlichen Schwächung der Röntgenstrahlung durch das in der Volumeneinheit enthaltene Gewebe entspricht. Durch Messung eines kalibrierten HA-Phantoms lassen sich die bestimmten Hounsfield-Einheiten in Milligramm HA pro Milliliter umrechnen (3.17).

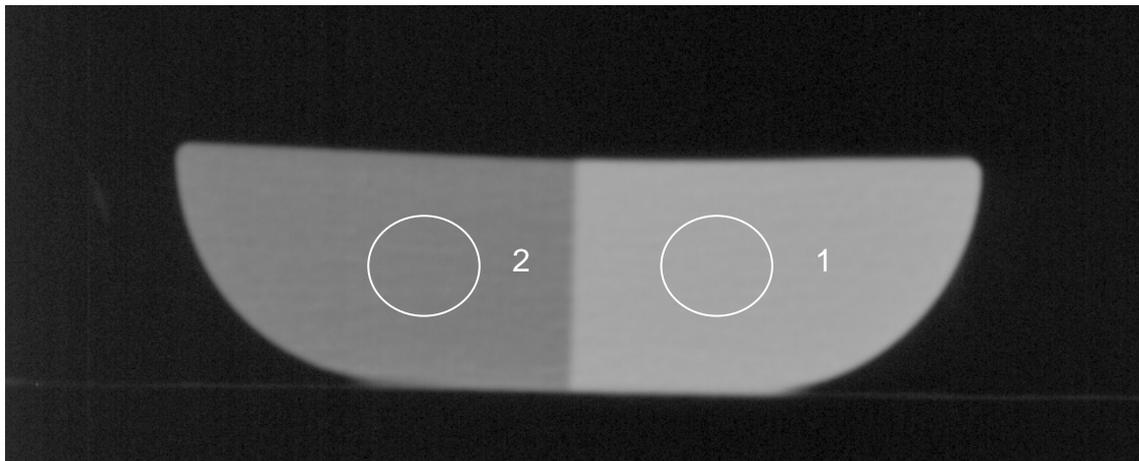


Abb. 3.17. HA-Phantom zur Umrechnung der gemessenen Hounsfield-Einheiten in mg HA/ml. Der HE-Wert linken Phantomhälfte entspricht 0 mg HA/ml, der Wert der rechten 200 mg HA/ml (Bedienungsanleitung SOMATOM Plus 40, Siemens AG, Erlangen, 1993).

Die Umrechnung der Werte für die Knochendichte in Elastizitätsmodule kann mit Hilfe verschiedener in der Literatur beschriebener Modelle erfolgen (Carter und Hayes 1977, Rice et al. 1988, Keller et al. 1990, Ciarelli et al. 1991, Snyder und Schneider 1991, van Rietbergen 1993). Die Autoren benutzen verschiedene Gleichungen, die sich in ihrer Gültigkeit unterscheiden. Im Prinzip setzen sich alle Umrechnungsverfahren aus zwei Anteilen zusammen: 1. der Umrechnung der Hounsfieldwerte in die Knochendichte und 2. die Überführung der Knochendichte in die Elastizitätsmodule. Van Rietbergen (1993) und Carter

und Hayes (1977) benutzten dafür eine Formel, die für den gesamten Knochen gilt. Rho et al. (1995) hingegen verwendeten eine Formel, die nur für den spongiösen Knochen gilt. Snyder und Schneider (1991) stellten eine Formel auf, die nur für den kortikalen Knochen zutrifft. Nur Ciarelli et al. (1991) nutzten eine Gleichung, die sowohl einen Anteil für den kortikalen Knochen beinhaltet als auch einen Anteil für den spongiösen Knochen. Die Formel hierfür lautet:

$$E = 1500/170 \times \text{Knochendichte (spongiös)} + 5501/501 \times \text{Knochendichte (kortikal)}$$

Diese Formel nach Ciarelli et al. 1991 wurde zur Umrechnung der CT-Daten in Elastizitätsmodule benutzt. Die E-Module werden dabei in MPa angegeben.

3.2.4 Biomechanische Untersuchungen

Nach Entfernen des Fixateurs und der Weichteile erfolgte die Längenbestimmung beider Tibiae mittels Messschieber mit einer Genauigkeit von 0,1 mm. Hierbei dienten die Eminentia intercondylaris und die anteriore Apophyse der distalen Tibiagelenkfläche als Referenz.

Anschließend erfolgte die biomechanische Prüfung mittels 4-Punkt-Biegetest (in Anlehnung an DIN 53457, Oktober 1987). Die Versuche erfolgten im Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Zunächst wurden alle Präparate tiefgekühlt in Thermobehältern in das Prüflabor transportiert. Nach langsamem Auftauen der Präparate wurden in die Kontrolltibiae gleichartige Gewindebohrungen als Äquivalent zu den, durch den Fixateur entstandenen Pin-Trakts, eingebracht. Hierfür wurden 6 selbstbohrende und selbstschneidende Apex-Knochenschrauben (120 mm lang, 35 mm Gewindelänge) von 4 mm Durchmesser exakt parallel und in einer Ebene in vergleichbaren Abständen eingebracht und wieder entfernt.

Der 4-Punkt-Biegeversuch wurde an einer Universalprüfmaschine (Typ: Z010/Tn2A, Fa. Zwick, Ulm) durchgeführt. Die Distanz der Biegefinnen (oberer Druckpunkt) war mit 50 mm, die zwischen den unteren Auflagepunkten (Auflager) mit 150 mm festgelegt. Die Spannlänge ergibt sich aus dem Abstand zwischen Auflager und Biegefinne und betrug ebenfalls 50 mm (Abb. 3.18).

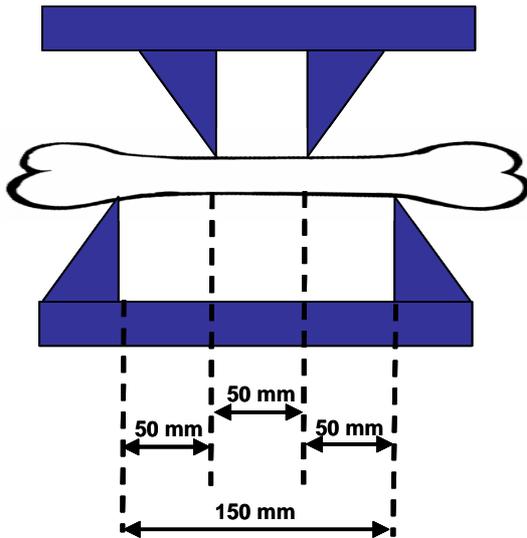


Abb. 3.18. Schematische Darstellung des 4-Punkt Biegetests mit Biegefinnen und Auflager

Die Präparate wurden für den Biegetest so positioniert, dass die anteriore Seite deckenwärts gerichtet war und die Mitte der Verlängerungsstrecke der distrahierten Tibia bzw. die Mitte der Kontrolltibia exakt mittig zwischen Biegefinnen und Auflager zum Liegen kam (Abb. 3.19). Die Mitte der Distraktionsstrecke ließ sich mittels Messschieber sicher ermitteln. Dadurch wurde im Biegetest eine immer gleichgerichtete Krafteinwirkung gewährleistet.

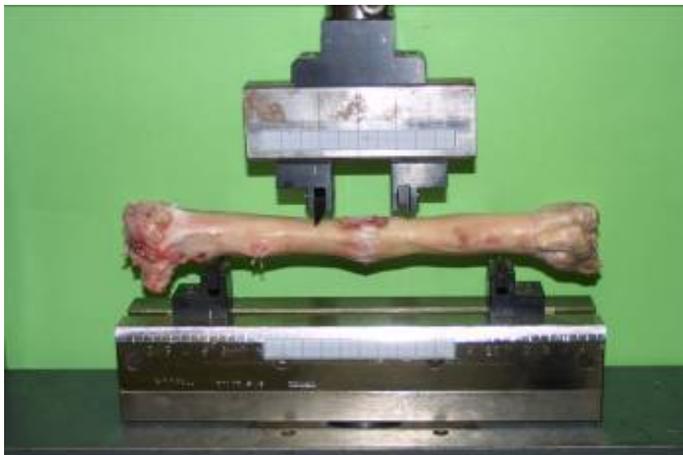


Abb. 3.19. Prüfanordnung im 4-Punkt-Biegeversuch

Mit einer Geschwindigkeit von 10 mm/min wurde die Kraft auf den Knochen ausgeübt. Der Bruch wurde bei einer Kraftänderung von 400 N definiert. Für jedes Präparat wurde ein Kraft-Weg-Diagramm ermittelt, indem die aufgewendete Kraft und der Weg (Durchbiegung des Präparates) aufgezeichnet wurden (3.20).

Die Messwerte verglichen wir mit denen der nicht verlängerten Unterschenkel.

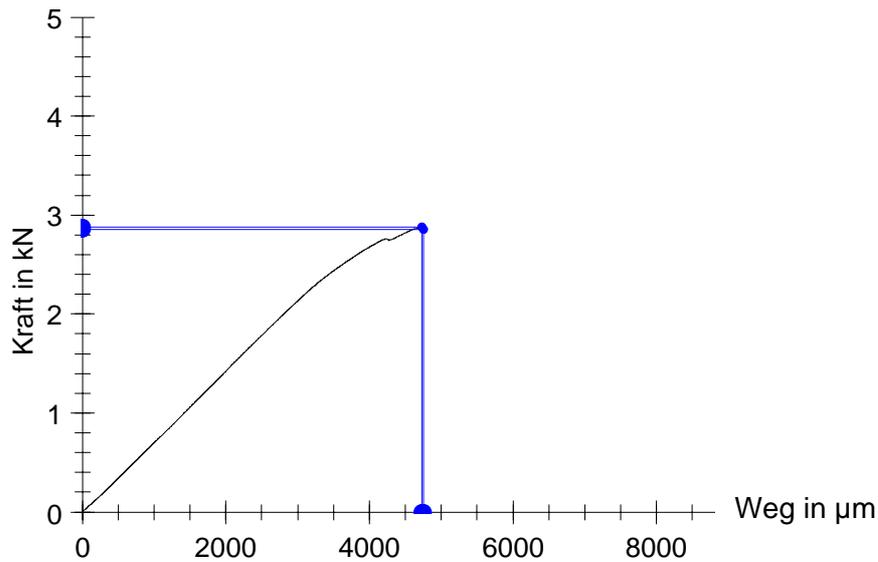


Abb. 3.20. Kraft-Weg-Diagramm (Bsp.: rechte Tibia)

Aus der ermittelten Versagenslast wurde das maximale Biegemoment M_b berechnet. Aus den Gleichgewichtsbedingungen beim Vier-Punkt-Biegetest folgt das Biegemoment zwischen den Auflagern:

$$M_b = F/2 \cdot l$$

l : Abstand der Auflagern (0,05 m)

F : Stempelkraft

3.2.5 Histologische Untersuchungen

3.2.5.1 Probenaufarbeitung

Die implantattragenden Knochen wurden nach kurzfristiger Zwischenlagerung bei -80°C zunächst einem 4-Punkt Biegeversuch unterzogen. Die Proben konnten problemlos der Anatomie entsprechend rekonstruiert und mit dünnen Fäden bzw. Plastikbändern zusammengehalten werden. Sie wurden auf eine Länge von 70 mm gekürzt, wobei der Distraktionsbereich exakt mittig verblieb. Die anterior-posteriore Ebene wurde mit Hilfe eines dünnen Drahtes markiert. Zusätzlich erfolgte die Kennzeichnung der Tiernummer. Erst danach standen die Proben zur Aufarbeitung für histologische Fragestellungen zur Verfügung.

3.2.5.2 Herstellung der Dünnschliffpräparate für die histologische, histomorphometrische und ultraschallmikroskopische Untersuchung

Die Herstellung der histologischen Präparate erfolgte mit Hilfe der Trenn-Dünnschlifftechnik nach Donath (1988). Diese erlaubt die Verarbeitung von unentkalktem Knochen. In einem ersten Schritt wird die Probe in 70%igem Alkohol fixiert. Diese Fixierung greift Fluorochrommarkierungen nicht an. Danach schließt sich eine stufenweise Dehydratation mit aufsteigender Alkoholreihe und Entfettung mit einem Xylolersatzmittel (Histo-clear[®], Firma Shandon) an. Nach dieser Prozedur wurden die Proben schrittweise in Methylmethacrylat (MMA) eingebettet, um eine vollständige Infiltration mit dem Kunststoff zu gewährleisten.

Tab. 3.1. Protokoll der Einbettung der Proben zur histologischen Untersuchung

Reagenz	Zeit (in Tagen)	Bemerkung
Ethanol 70%	3	aufsteigende Alkoholreihe zur Entwässerung
Ethanol 70%	6	
Ethanol 96%	4	
Ethanol 96%	12	
Ethanol 100%	5	
Ethanol 100%	4	
Histo-clear [®]	4	Entfettung
Histo-clear [®]	2	
MMA I (reines MMA)	4	Infiltration
MMA II (MMA mit 5% Dibuthylphthalat und 1 g BPO pro 100ml)	3	Infiltration, Vorbereitung auf Polymerisation, Dibuthylphthalat=Weichmacher, Benzoylperoxid (BPO)=Polymerisationsstarter
MMA III (MMA mit 5% Dibuthylphthalat und 3g BPO pro 100ml)	bis zur Aushärtung	Polymerisation im thermostatkontrollierten Wasserbad (28°C) in luftdicht verschließbaren Einbettformen

Nach der Polymerisation des Kunststoffes entstehen Gewebeblöcke, die für die Herstellung der Dünnschliffe für die histologische Auswertung genutzt wurden.

Dazu wurden die Proben mit einer wassergekühlten Diamant-Bandsäge (Firma Exakt, Norderstedt) in der Sagittalebene längs in zwei Hälften getrennt. Von der lateralen Hälfte gewannen wir zwei Sägeschnitte mit einer Dicke von ca. 900 µm. Diese Längsschnitte enthielten den gesamten Verlängerungsbereich einschließlich der angrenzenden originalen Diaphysensegmente. Die Oberfläche der distalen Hälfte wurde für die ultraschallmikroskopische Untersuchung poliert und sofort vermessen. Erst danach wurden die beiden Hälften des Knochens mit einem Objektträger (2 mm Dicke, Plexiglas) als Interponat mit einem lichthärtenden Methylmethacrylat-Kleber (Technovit 7210 VLC[®]) und einer Präzisionsklebepresse (Exakt-Apparatebau) zusammengeklebt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die ursprüngliche Anatomie erhalten bleibt. Anschließend wurden von den Querschnitten Sägeschnitte gewonnen. Die Querschnitte entsprachen dabei genau den Regionen, die mittels QCT gemessen worden waren (Abb. 3.21).

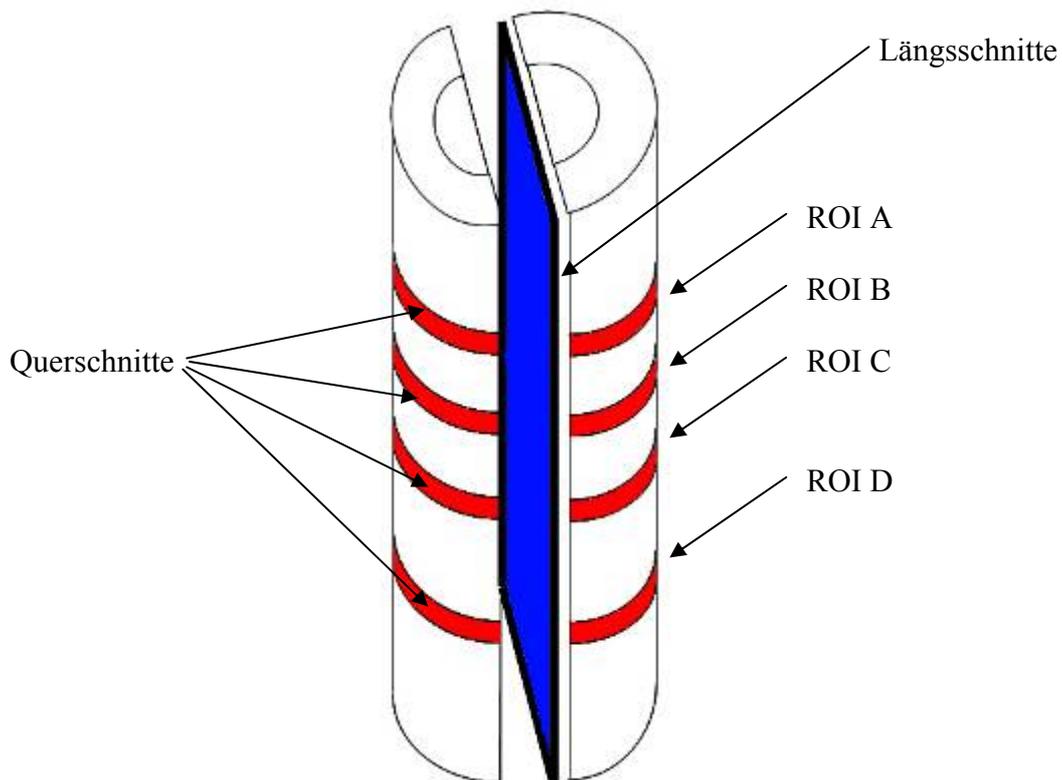


Abb. 3.21. Schematische Darstellung der Lage der Längs- und Querschnitte für die histologischen und histomorphometrischen Untersuchungen

Die Sägeschnitte wurden erst wie oben beschrieben mit einem schnellhärtenden Kunststoff auf Methylmethacrylat-Basis (Technovit 7210 VLC[®]) auf einen Plexiglasobjektträger geklebt und dann mit dem Mikroschleifsystem (Nassschleifverfahren mit Spezialschleifpapier in der Reihenfolge: Körnung 1200 → Körnung 2400 → Körnung 4000, Exakt Mikroschleifsystem)

auf eine Dicke von ca. 80-100 μm für die histologische Färbung und auf eine Dicke von ca. 200 μm für die Mikroradiografie geschliffen. Für die SAM-Untersuchung, die an den Restblöcken (Blöcke nach Abtrennung der Sägeschnitte) erfolgte, wurden die Probenoberflächen zusätzlich noch poliert. Die Politur erfolgte mit einem Logitech-WG2-Schleif-System und einem harten synthetischen Tuch (MARYLAND-Dur, Struers). Als Poliermittel wurde eine Emulsion aus 1 μ Diamantkörnern und Ethylenglykol benutzt. Dieses Verfahren sicherte eine optimale Oberflächenflachheit ohne Diffusion von Wasser in das Knochengewebe.

Die Färbung der Schliffpräparate erfolgte mit Toluidinblau (Romeis 1989). Sie ist als Übersichtsfärbung gut geeignet und ermöglicht eine Differenzierung zwischen neu gebildeten und ursprünglich vorhandenen Knochen. Neu gebildeter Knochen ist in der Toluidinblau-Färbung dunkler. Einzelne Schliffe wurden zusätzlich einer Oberflächenfärbung nach Giemsa (Romeis 1989) unterzogen. Diese Färbemethode lässt eine eingehende Beurteilung der Gewebestrukturen zu. Sie liefert einen guten Farbkontrast zwischen Zellen und der Interzellulärsubstanz auch im Hartgewebe und wurde deshalb ergänzend für die qualitative histologische Beurteilung der Präparate genutzt.

Die so hergestellten Dünnschliffe wurden auch für die fluoreszenzmikroskopische Beurteilung genutzt.

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Forschungsmikroskop (Typ Vanox AH3) der Firma Olympus durchgeführt. Es wurden Objektive mit 2-facher, 4-facher, 10-facher und 20-facher Vergrößerung und Okulare mit 10-facher Vergrößerung verwendet. Der integrierte Fluoreszenzblock bedingt einen zusätzlichen Vergrößerungsfaktor von 1,25. Bei der Fotodokumentation kam ein Projektiv mit 2,5 facher Vergrößerung zur Anwendung.

3.2.6 Mikroradiografie

Von allen Längs- und Querschnittpräparaten wurden Mikroradiografieaufnahmen angefertigt (digitales Mammographie-System Mammomat 3000 Novation DR der Firma Siemens). Die angewendete Röntgenstrahlung ist eine weiche Strahlung mit einer Energiemenge pro Photon von ca. 27 kV. Für diese Untersuchung kamen planparallele Schliffe mit einer Dicke von 200 μm zur Anwendung. Die quantitative Analyse der mikroradiografischen Bilder erfolgte mit Hilfe eines computergestützten vollautomatischen Bildanalyse-Systems KS 300 (Carl Zeiss AG, D-Jena). Die zu analysierenden Bilder lagen als Grauwertbilder vor.

Durch die Software waren für alle Präparate identische Messbedingungen gewährleistet. Das erzeugte Bild wurde mit Adobe Photoshop (Version 8.0.1) bearbeitet. Dazu erfolgte eine Tonwertkorrektur, eine Einstellung der Helligkeit und des Kontrastes. Die histomorphometrische Auswertung erfolgte über verschieden große rechteckige Makros, deren Größe in mm² bekannt war. Dieses Rechteck wurde als „Overlay“ über die interessierende ROI gelegt. Die unterschiedliche Einfärbung von Knochen, nicht mineralisierte Bereiche innerhalb des Knochens und die Bereiche außerhalb des Knochens ermöglichten die Bestimmung der absoluten und der relativen Knochenfläche. Die absolute Knochenfläche wurde definiert als Größe der mineralisierten Gebiete. Der prozentuale Anteil der absoluten Knochenfläche an der Gesamtfläche (absolute Knochenfläche plus nicht mineralisierte Gebiete innerhalb des Knochens) wurde als relative Knochenfläche bezeichnet.

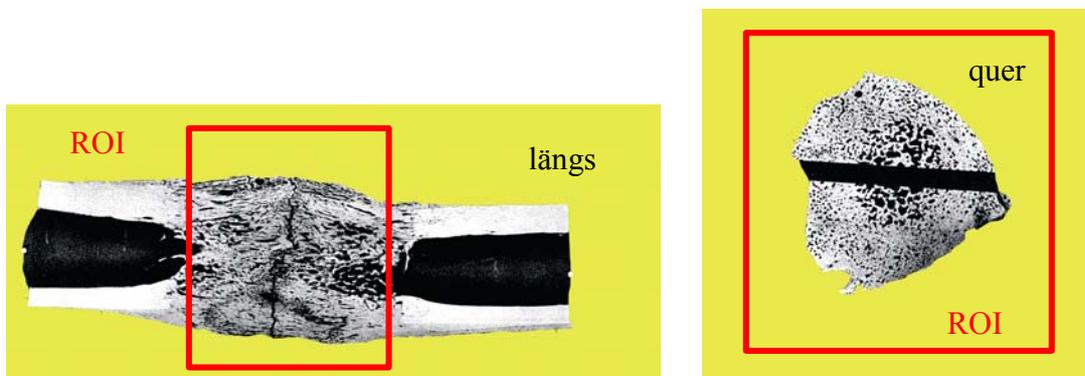


Abb. 3.22. Dünnschliffpräparate für die histomorphometrische Analyse

Die zweidimensionale Fläche der Mikroradiografie repräsentiert dabei das dreidimensionale Volumen des 200 µm dicken Knochenschliffes (Abb. 3.22).

3.2.7 Ultraschallmikroskopische Untersuchungen

Die ultraschallmikroskopischen Untersuchungen wurden an eingebetteten polierten Knochenpräparaten durchgeführt, bevor die histologischen Untersuchungen erfolgten. Die aus den QCT-Untersuchungen bekannten Messregionen wurden auch für die SAM-Untersuchungen genutzt, um eine bessere Vergleichbarkeit zu erzielen. Es wurden zunächst Längsschnitte und nachfolgend 4 Querschnitte (Cross-Sections) in folgenden Messregionen durchgeführt:

- ROI A: 10 mm proximal vom Mittelpunkt der Distractionsstrecke (C 1)
- ROI B: Mittelpunkt der Verlängerungsstrecke (C 2)

- ROI C: 10 mm distal vom Mittelpunkt der Distraktionsstrecke (C 3)
- ROI D: 25 mm distal vom Mittelpunkt der Distraktionsstrecke (C 4).

Es wurden sowohl anisotrope elastische als auch mikro- und makrostrukturelle Parameter des neu gebildeten Kallusgewebes und des angrenzenden kortikalen Knochens analysiert und mit der gemessenen Frakturkraft korreliert.

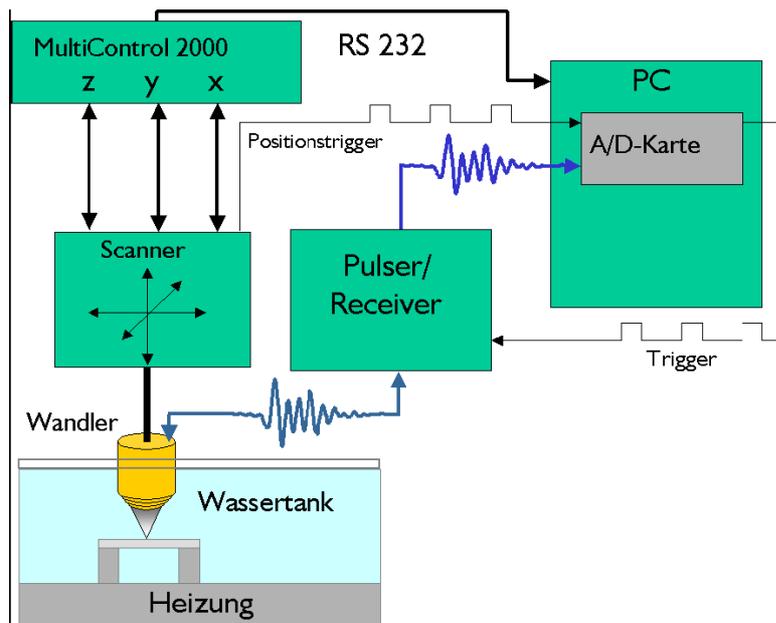


Abb. 3.23. Prinzipieller Messaufbau der verwendeten Mikroskope (aus Raum 2002)

Dies erfolgte mit Hilfe von 50-MHz Impedanzmessungen. Zur Anwendung kam ein akustisches Mikroskop, welches im Q-BAM Labor der MLU Halle-Wittenberg entwickelt wurde. Das Mikroskop besteht aus einem 3-Achsen-Scanner (xyz), einem externen Panametrics PR5900 Pulsar/Receiver (Panametrics, Waltham, MA, USA) mit einer Empfangsbandbreite von 200 MHz, der kurze Spikepulse ermöglicht. Zum Mikroskop gehört ein PC mit einer A/D Karte (Gage CS8500, 500 MS/s, 8 bit, Gage Applied Technologies, Inc., Lachine, Mon, Canada). Alle genannten Komponenten wurden durch selbstentwickelte Software des Q-BAM Labors gesteuert. Ein fokussierender Schallwandler (V605, Valpey Fisher, Hopkinton, MA, USA) mit einer zentralen Frequenz von 49 MHz und einer relativen Bandbreite von 84% lieferte eine Auflösung von 23 μm .

Für die ultraschallmikroskopischen Untersuchungen wurden die vorbereiteten Präparate in einen temperaturkontrollierten Behälter mit 25°C warmem destilliertem Wasser eingetaucht. Die Probenoberflächen wurden in der Fokusebene des verwendeten Schallwandlers platziert. Nachfolgend erfolgte die Durchführung der sogenannten C-Scans. Bei diesen bleibt die z-

Position der Linse (Transducer = Schallwandler) konstant, während sie sich in x- und y-Ausrichtung mäanderförmig über die Präparatoberfläche bewegt. Für jeden gescannten Punkt wurde das gesamte Puls-Echo-Signal gespeichert. Die von der polierten Knochenoberfläche reflektierten Echos wurden in Akustische Impedanz – Werte Z konvertiert ($Z = \rho c_p$, wobei ρ die Dichte und c_p die Schallgeschwindigkeit, 1 rayl = $\text{kg m}^{-2}\text{s}^{-1}$ darstellt). Zur Korrektur der Defokussierung wurden die von Raum et al. (2004, 2005) beschriebene laufzeitabhängige Defokussierungskorrektur und die Impedanzkalibrierung genutzt.

Alle RF-Signale wurden mit cutoff-Frequenzen von 5-90 MHz (Bandpass) gefiltert. Dabei wurde ein Nullphasen Typ II Chebyshev-Filter angewendet.

Für homogene Referenzmaterialien (TPX[®], Mitsui Chemicals, Inc., Tokio, Japan; Polystyren, PMMA; Quartzglas, Suprasil[®], Heraeus Quarzglas GmbH & Co. KG, Hanau, Deutschland; Aluminium, Titan) wurde das Puls-Echo-Signal als Funktion der Transducer-Präparat-Distanz gemessen. Die Amplitude der Hilbert-transformierten Einhüllkurve wurde in Dezibel konvertiert (0 dB entsprechen der konfokalen Echoamplitude). Für jede Transducer-Präparat-Distanz wurden die TOF und die entsprechende normale Intensität bestimmt (Abb. 3.24).

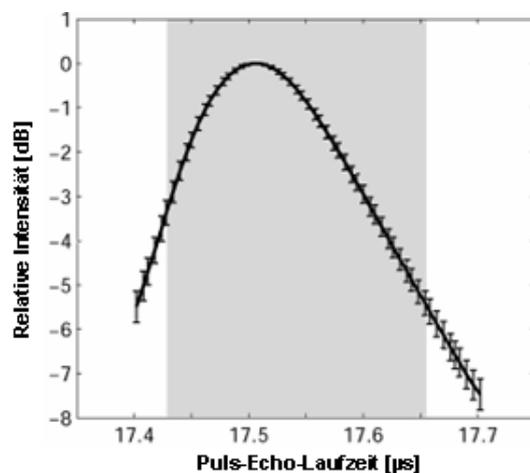


Abb. 3.24. Laufzeitabhängige Defokussierungskorrekturfunktion (TOF: Time of Flight, Puls-Echo-Laufzeit). Grau unterlegt ist der Bereich, indem die Unsicherheit der Korrektur zu einem relativen Fehler der Impedanzermittlung von weniger als 1% führt (aus Hube et al. 2006).

Der Standardfehler der Korrekturfunktion steigt dabei mit ansteigender Defokussierung. Es wurde nur der TOF- Bereich, indem die Unsicherheit der Resultate einen relativen Fehler der Impedanzermittlung von weniger als 1% aufzeigten (für eine durchschnittliche Impedanz von $Z = 8$ Mrayl in Knochengewebe), für eine Defokussierungskorrektur akzeptiert.

Die konfokale Amplitude korrelierte mit den bekannten Reflektionskoeffizienten der Referenzmaterialien (Abb. 3.25).

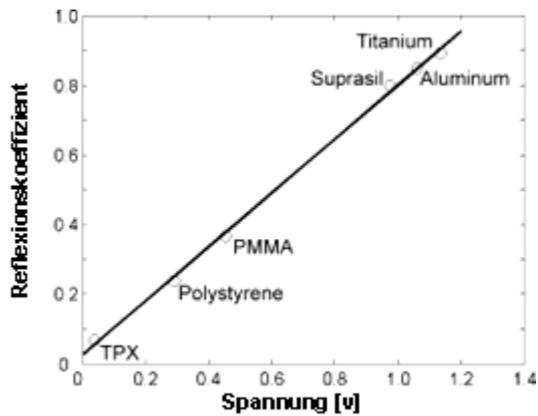


Abb. 3.25. Impedanzkalibrierung. Die Amplitude des Hilberttransformierten Puls-Echo-Signals korreliert mit den bekannten Reflexionskoeffizienten bei den Referenzmaterialien (aus Hube et al. 2006).

Die gleiche Prozedur (Bandpass Filter, Hilbert- Transformation) wurde für die ermittelten C-Scan Daten durchgeführt. Für die im akzeptierten Defokus-Bereich gemessenen Echos wurde die TOF zur Bestimmung der konfokalen Amplitude des reflektierten Signals genutzt. Aus der akustischen Impedanz lässt sich der Reflexionskoeffizient r berechnen, der direkt proportional zur Amplitude des reflektierten Signals ist (Hasegawa et al. 1995, Hirsekorn et al 1996, Kessler et al. 2003).

$$r = \frac{Z_2 - Z_1}{Z_2 + Z_1}$$

Z_1 entspricht der akustischen Impedanz des Kopplungsmediums und Z_2 der des Präparates. Die akustische Impedanz von Wasser Z_1 beträgt bei 25°C 1.493 Mrayl. Der maximale Relativfehler der Impedanzbestimmung wurde von Raum et al. (2004) mit $< 0.42\%$ beschrieben. Abbildung 3.26 zeigt ein Beispiel für Impedanzdarstellungen von Längs- und Querschnitten.

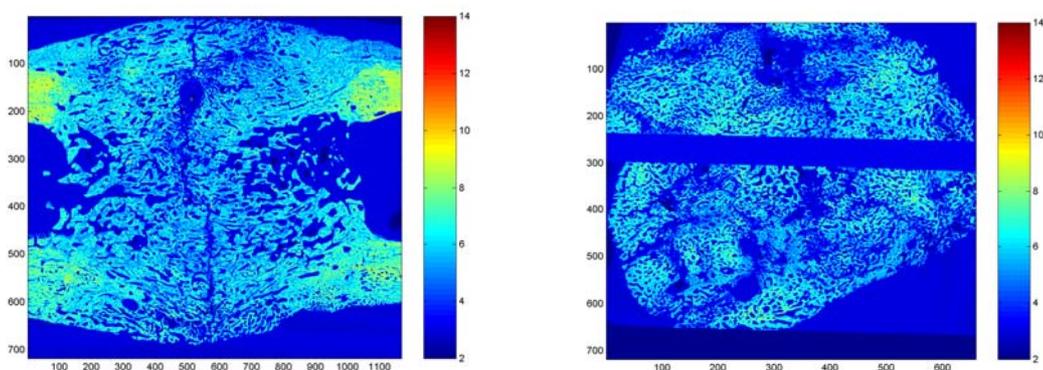


Abb.3.26. Längs- (links) und Querschnitt (rechts) von Impedanzdarstellungen

Zur Segmentierung von mineralisierten Knochen und der Umgebung (PMMA-gefüllte Leerräume) wurden Grenzimpedanzen festgelegt. Die Grenzimpedanz wurde mit 4 MRayl bestimmt ($Z_{Threshold} = 4 \text{ Mrayl}$) und ergab sich als ungefährender Mittelwert zwischen den niedrigsten gemessenen Werten für Kochengewebe ($Z_{Bone}^{low} \sim 5 \text{ Mrayl}$) und der mittleren PMMA-Impedanz ($Z_{PMMA} \sim 3.1 \text{ Mrayl}$).

Zusätzlich wurden Strukturparameter innerhalb manuell festgelegter **Regions Of Interest** (ROI) für kortikalen Knochen und Kallusgewebe bestimmt. Die durch den biomechanischen Biegetest bedingten Frakturzonen wurden bei der Analyse der Strukturparameter ausgeschlossen. Eine Übersicht der Strukturparameter, die aus den binären Darstellungen in den ROI's hergeleitet wurden, gibt Tabelle 3.2.

Tabelle 3.2. Übersicht der bestimmten morphologischen und akustischen Parameter. Die Abkürzungen sind *Ar* – area = Fläche, *B* – bone = Knochen, *Ca* – canal = Havers'scher Kanal, *Cl* – callus = Kallus, *Ct* – cortical = kortikal, *Ind* – index = Index, *Dm* – diameter = Durchmesser, *Ma* – Marrow = Knochenmark, *N* – number = Nummer, *Po* – porosity = Porosität, *Wi* – width = Breite, *Z* – impedance = Impedanz. (nach Parfitt 1988).

Abkürzung	Beschreibung	Einheit
<i>B.Ar</i>	Knochenbereich (ohne Kallus, Mittelwert der Querschnitte C 1 und C 4)	%
<i>B.Dm</i>	Knochendurchmesser ($= \sqrt{4 \cdot B.Ar / \pi}$)	mm
<i>Cl.Ar</i>	Kallusfläche (Mittelwert der Querschnitte C 2 und C 3, unter Einschluss der knochenfreien Bereiche) [†]	mm ²
<i>Cl.Ar_{tissue}</i>	Kallusgewebefläche (Mittelwert der Querschnitte C 2 und C 3, unter Ausschluss der knochenfreien Bereiche) [†]	mm ²
<i>Cl.Ind</i>	Kallusindex = $(Cl.Ar - Cl.Ar_{tissue}) / Cl.Ar \times 100$	%
<i>Cl.Po</i>	Kallusporosität, definiert als kallusfreier Bereich / Kallusgewebebereich $Cl.Po.Ar / Cl.Ar_{tissue} \times 100$	%
<i>Cl.Z</i>	Kallusimpedanz (gemessen unter Ausschluss der knochenfreien Bereiche)	Mrayl
<i>Ct.Po</i>	Kortikalisporosität, definiert als Markraumfläche / kortikale Fläche $Ct.Ca.Ar / Ct.Ar \times 100$	%
<i>Ct.Wi</i>	Kortikalisbreite (an Kallus angrenzend)	mm
<i>Ct.Ind</i>	Kortikalisindex = $(B.Ar - Ma.Ar) / B.Ar$	%
<i>Ct.Z</i>	Kortikale Impedanz	Mrayl
<i>Ma.Dm</i>	Knochenmarkdurchmesser (an Frakturzone angrenzend)	mm
<i>N.Ct.Ca/Ct.Ar</i>	Kortikale Kanaldichte	mm ⁻²
<i>N.Po./Cl.Ar</i>	Kallusporendichte	mm ⁻²

[†] Die durch die Fraktur beim Biegetest bedingten Freiräume wurden manuell von der Analyse ausgeschlossen

Für die Impedanzmessung wurden die binären ROI-Darstellungen mit einer Scheibe erodiert, die einen Radius von zwei Pixel (20 µm) aufwies. Dieses Vorgehen sichert den Ausschluss von Grenzpixeln, bei denen die Impedanzwerte künstlich durch den Partialvolumeneffekt

reduziert werden (Raum et al. 2005). Für die verbliebenen Pixel wurden Mittelwerte, Standardabweichung und Standardfehler bestimmt. Das Gewebeanisotropieverhältnis AR wurde als das Verhältnis zwischen mittlerer Impedanz im Quer- und im Längsschnitt definiert.

3.2.8 Auswertung der Messergebnisse und statistische Analyse

Bei allen bilateral entnommenen Messwerten wurde innerhalb der Gruppen ein paarweiser t-Test (Adam 1980, Grimm und Recknagel 1985) durchgeführt. Dieser Test ermittelt mögliche Unterschiede zwischen der distrahierten Tibia und der Kontrollseite. Für einen Erhalt der Übersichtlichkeit wurden im Ergebnisteil nur Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der Gruppen aufgeführt. Die Prüfung auf Normalverteilung mit dem Kolmogoroff-Smirnow-Test ergab, dass die Stichproben aufgrund der geringeren Zahl pro untersuchte Gruppe nicht normalverteilt waren (Schumacher und Schulgen 2002). Beim Vergleich von Mittelwerten von mehr als zwei Gruppen (Gruppe A, B, C und D) wurde die einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA gefolgt von dem Post-Hoc-Test nach Tukey verwendet.

Die Prüfung der Zusammenhänge zwischen den Messwerten verschiedener Analysemethoden erfolgte mittels linearer Regressionsanalysen (Grimm und Recknagel 1985, Göhler 1987). Dabei werden Beziehungen zwischen einer abhängigen und einer (bivariate lineare Regression) oder mehreren unabhängigen Variablen (multiple lineare Regression) bestimmt.

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Statistiksoftware SPSS Version 16.0 für Windows (SPSS Inc. Chicago, USA) durchgeführt.

Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant bezeichnet (Janssen und Laatz 2005).

4. Ergebnisse

4.1 Vorversuche

In-vitro-Tests bei Raumtemperatur zeigten in einem Freisetzungsversuch mit Aprotinin als „Ersatzprotein“ eine Freisetzung von 50% aus der Polylaktidmembran (PDLA-Membran) innerhalb der ersten 48 Stunden. Danach erfolgte eine langsame Freisetzung über mindestens 28 Tage, die eine gleich bleibende Gesamtkonzentration des gelösten Proteins ermöglichte (Abb. 4.1).

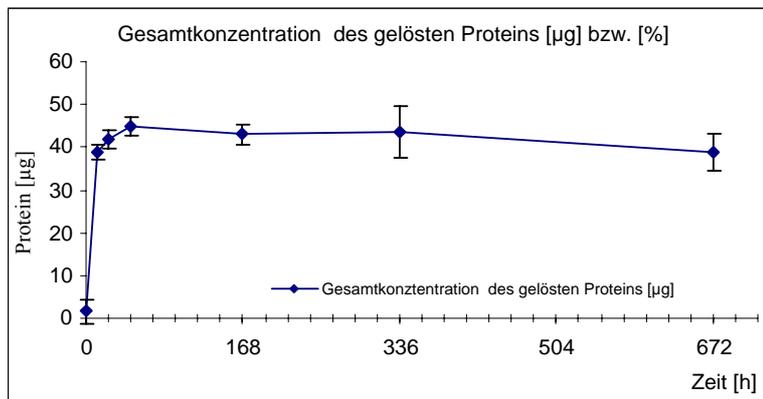


Abb. 4.1. Freisetzungskinetik der PDLA-Membran im Freisetzungsversuch mit Aprotinin (Wertetabelle im Anhang)

In einem zweiten Vorversuch wurde an 4 Tieren das Tiermodell praktisch untersucht.

Die Applikation der Wachstumsfaktoren mittels Polylaktidmembran, die Durchführung der autologen Spongiosplastik und die Kombination beider Techniken ließen sich reproduzierbar durchführen.

4.2 Verlauf des Tierversuches

Alle Versuchstiere wurden wie in Kapitel 3.1.5 und 3.1.7 dargestellt vorbereitet und operiert. Die Operationszeit betrug beim Ersteingriff am Tier durchschnittlich 46 min (35-60), beim Zweiteingriff 17 min (12-24). Intraoperative Komplikationen bzw. Narkosezwischenfälle traten nicht auf.

Nach Abschluss der Distraktionsphase liefen alle Tiere mit Teilbelastung der operierten Extremität. Ein Versuchstier (Gruppe D) musste im Verlauf euthanasiert werden, da es zu einer Materialermüdung mit Fixateurbruch kam. Die verbliebenen Tiere gingen in der Konsolidierungsphase zur Vollbelastung der linken hinteren Extremität über.

Bei drei Tieren kam es zu temporären Pintraktinfektionen im Bereich der proximal eingebrachten Pins, die unter lokal verabreichter Antibiotikasalbe abheilten. Eine lokale Abszessbildung oder systemische Reaktionen konnte nicht festgestellt werden. Fixateurlockerungen traten nicht auf.

Während der Gesamtversuchszeit kam es zu einer durchschnittlichen Gewichtszunahme der Tiere von 2,3 kg (0,8-4,1).

Nach vorzeitiger Opferung eines Tieres in der Konsolidierungsphase kamen 27 Tiere in folgenden Gruppen zur Auswertung (siehe auch Kapitel 3.2.7):

Gruppe A:	Kontrollgruppe (unbeschichtete Membran)	= 7 Tiere
Gruppe B:	Membran mit IGF-I/TGF- β 1-Beschichtung	= 7 Tiere
Gruppe C:	Spongiosaplastik	= 7 Tiere
Gruppe D:	Kombination aus Spongiosaplastik und beschichteter Membran	= 6 Tiere

4.3 Radiologische Untersuchungen

Die Röntgenuntersuchungen dienten der postoperativen Kontrolle und der Beurteilung der Distraction und Konsolidierung im Verlauf.

Die postoperativen Röntgenaufnahmen bestätigten bei allen Tieren die korrekte Lage von Fixateur, Pins und die Vollständigkeit der Osteotomie (Abb. 4.2 a). Die beiden Tibiafragmente wiesen eine korrekte Achsstellung auf. Der radiologisch sichtbare Osteotomiespalt betrug 1-2 mm. Transversale Fragmentdislokationen bzw. Achsabweichungen von $> 3^\circ$ traten nicht auf.

Die Röntgenaufnahmen am Ende der Distraktionsphase bestätigten den korrekten Verlauf der Verlängerung. Radiologisch fanden sich keine Anzeichen für Pin-Lockerungen oder Pintraktinfektionen. Signifikante Achsfehlstellungen konnten nicht festgestellt werden.

Das Ausmaß der Kallusbildung war in allen Gruppen homogen, wobei sich versuchsspezifische Änderungen gegenüber der normalen Kallusbildung ergaben (Reichel 1998). Es zeigte sich ein streifenförmiger Kallus auf der dem Periostdefekt abgewandten Seite, der sich von beiden Knochenenden nach zentral erstreckte. Dieser überragte den anschließenden Diaphysenabschnitt. Es handelt sich hierbei um einen so genannten „External callus type“ (Hamanishi et al. 1992).

Im Bereich des Periostdefektes konnte eine deutliche Minderung der Kallusbildung festgestellt werden. Im Zentrum der Verlängerungsstrecke zeigte sich noch eine röntgentransparente Zone (Abb. 4.2 b).

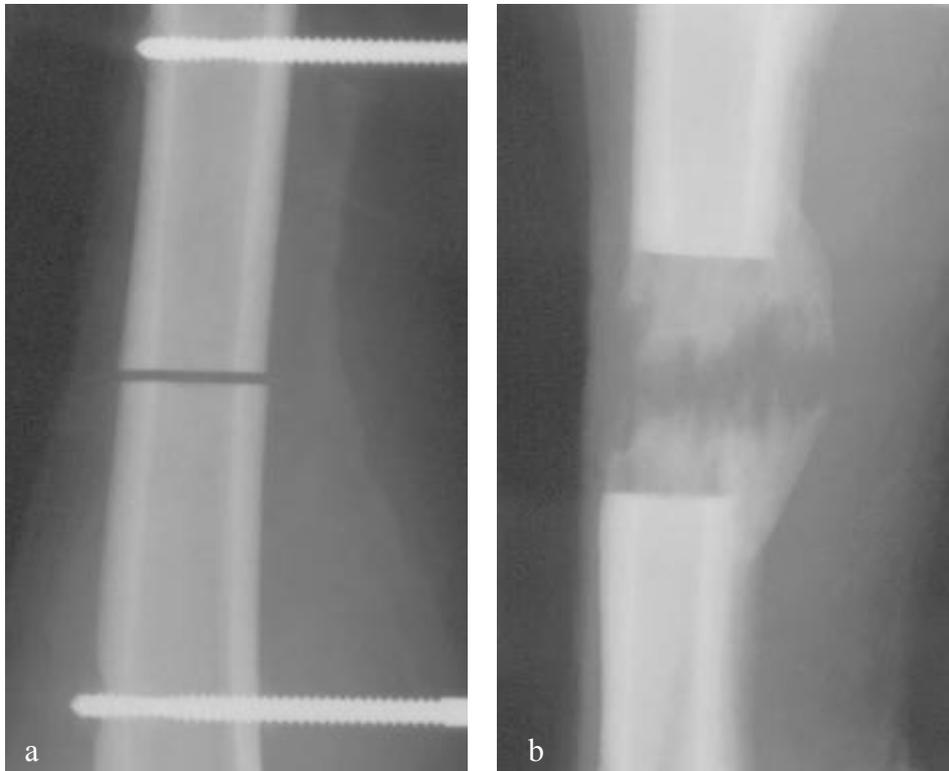


Abb. 4.2a,b. Röntgenkontrolle im mediolateralen Strahlengang postoperativ (a) und nach Ende der Distraction (b)

Nach Ende der Konsolidierungsphase zeigten die Röntgenaufnahmen ein gruppenspezifisch inhomogenes Bild. Vor allem in der unbehandelten Kontrollgruppe (Gruppe A) kam es nicht zur Verdichtung des periostalen Kallus und einer Kortikalisierung im Verlängerungsbereich wie in den anderen Gruppen. Vielmehr zeigte sich eine deutlich verzögerte Knochenheilung (Abb. 4.3 a). Die behandelten Gruppen B, C, D ließen sich im Röntgenbild nicht klar differenzieren, wobei die Kallusbildung deutlich verbessert gegenüber der Gruppe A erschien. Die zentrale Kalluszone war zumindest partiell überbrückt. Besonders in den Gruppen B und D zeigten sich mehrere Fälle mit nahezu normaler Kallusbildung (Reichel 1998). Erkennbar waren eine beginnende Verdichtung des periostalen Kallus, eine Kortikalisierung sowie eine zunehmende Durchgängigkeit des Markraumes. Zuvor teilweise überschießender periostaler Kallus bildete sich zurück und zeigte nun einen ähnlichen Durchmesser wie der normale Umgebungsknochen (Abb. 4.3 c). Bei der Gruppe C war in keinem der Fälle ein Markraumremodelling radiologisch abgrenzbar (Abb. 4.3 b).

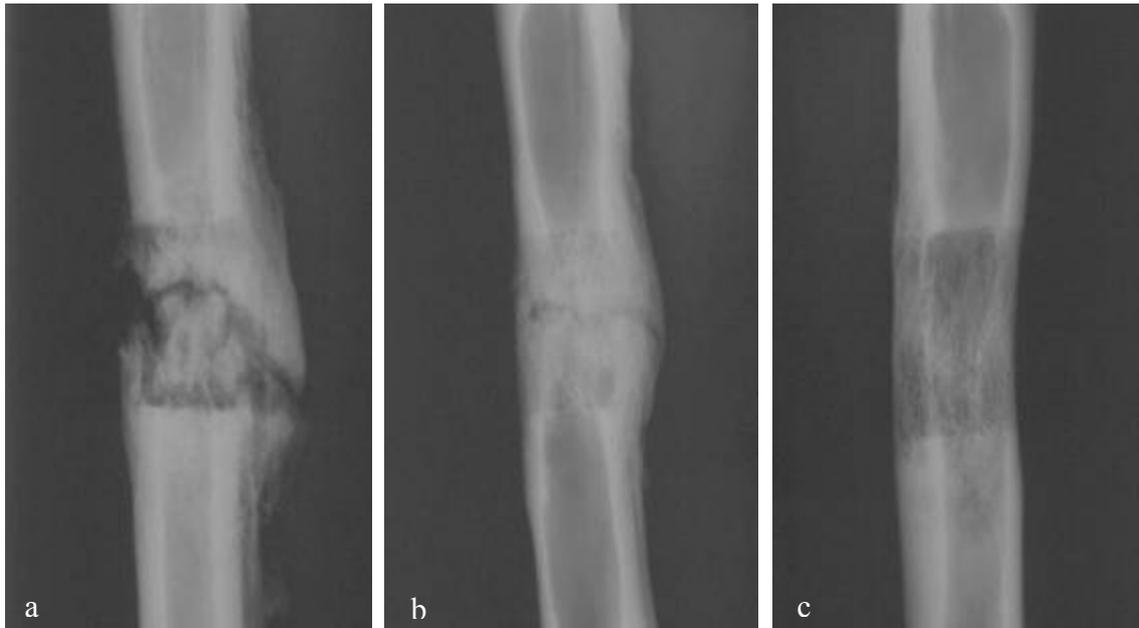


Abb. 4.3 a, b, c. Röntgenkontrolle im mediolateralen Strahlengang nach Abschluss der Distraction: unbehandelte Gruppe A (a), behandelte Gruppe C (b), behandelte Gruppe D (c)

4.4 QCT-Untersuchungen

Von jeder distrahierten Tibia und deren Kontrolltibia wurden computertomografische Querschnitte angefertigt, deren Lage den ROI's A bis D entsprach (Kapitel 3.2.3). Vor der quantitativen Analyse wurden alle Querschnitte befundet und morphologisch beschrieben. Hierbei ist das gruppenspezifische Bild nicht einheitlich ausgeprägt. Typische Befunde werden nachfolgend für jedes Therapiekollektiv deskriptiv dargestellt.

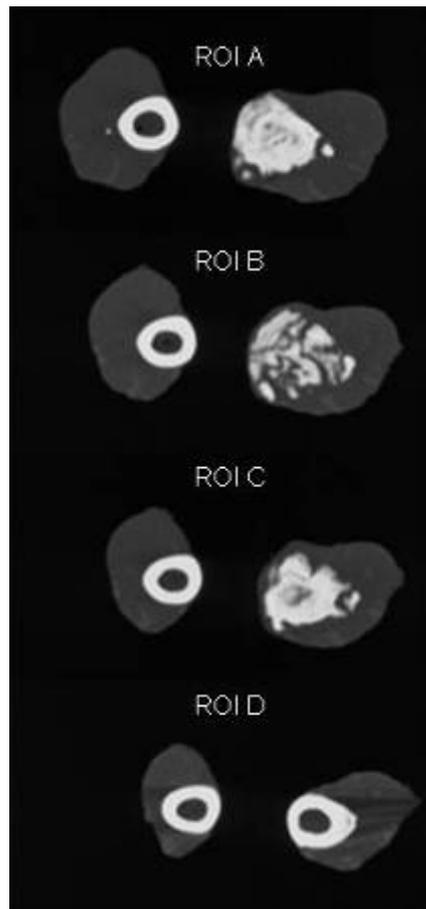


Abb. 4.4. Computertomografie der Behandlungsgruppe A nach Versuche. Die Abbildung zeigt die Querschnitte der in Kapitel 3.2.3 beschriebenen gleichnamigen Regions Of Interest (ROI) mit der dazugehörigen Kontrolltibia (links). A: Kallusgewebe peripher dezent dichter; B: verzögerte Knochenheilung mit wenig differenzierter Kallusformation; C: Kallusgewebe peripher dichter.

Bei der Therapiegruppe A ist der Kallus noch deutlich erkennbar. Allgemein zeigt sich eine wenig differenzierte Kallusformation. Es gibt kaum Unterschiede in der Mineralisation im Zentrum des Kallus und peripher (Abb. 4.4). In Zone A und C erscheint der periphere Kallus im Bereich der späteren Kortikalis geringfügig dichter. In der Zone B zeigen sich mehrere mineralisierte Kallussäulen. Dazwischen liegen Gebiete mit Mineralisationsdefekten. Die stärker mineralisierte Knochenspange im Zentrum der ROI B deutet auf eine Sklerosierung des Knochens im Sinne einer Abgrenzung vom umliegenden Knochengewebe. Der periostale Kallusmantel überragte den originären Diaphysendurchmesser.

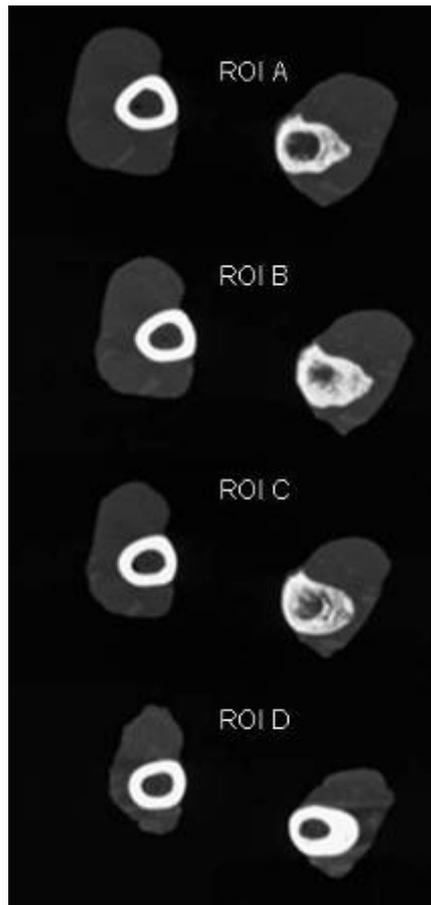


Abb. 4.5. Computertomografie der Behandlungsgruppe B nach Versuchsende. Die Abbildung zeigt die Querschnitte der in Kapitel 3.2.3 beschriebenen gleichnamigen Regions Of Interest (ROI) mit der dazugehörigen Kontrolltibia (links). ROI A: Kortikalis hat sich neu ausgebildet, Markhöhle beginnt sich zu formieren; ROI B, C: Umbauvorgänge der Kortikalis sind noch nicht abgeschlossen.

Bei der Behandlungsmethode B ist das kortikale Remodelling weiter fortgeschritten. Die Kortikalis hat sich neu ausgebildet. Form und Größe gleicht der Kortikalis der Kontrolltibia. Der Durchmesser der verlängerten Seite erscheint fast gleich groß. Die Markhöhle hat sich bereits ausgebildet und hat in ROI A nahezu eine normale Weite erreicht. Die Grenzen der Kortikalis erscheinen noch unscharf. Die Umbauvorgänge sind noch nicht abgeschlossen (Abb. 4.5).

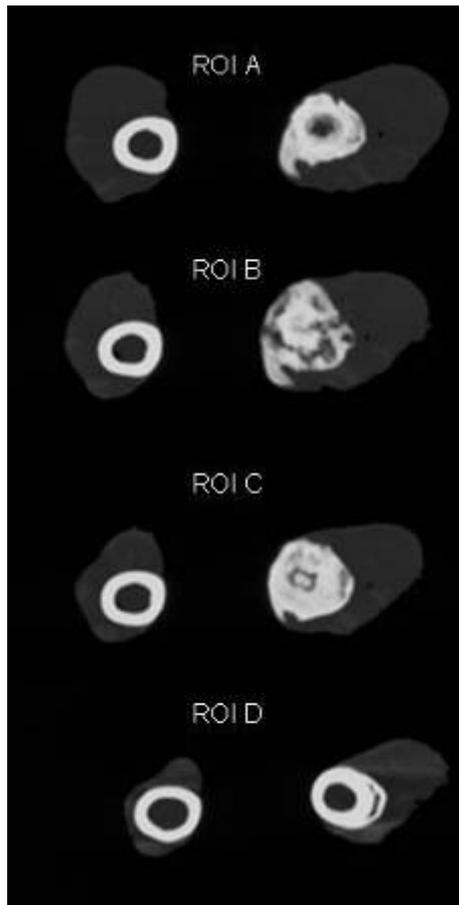


Abb. 4.6. Computertomografie der Behandlungsgruppe C nach Versuchende. Die Abbildung zeigt die Querschnitte der in Kapitel 3.2.3 beschriebenen gleichnamigen Regions Of Interest (ROI) mit der dazugehörigen Kontrolltibia (links). ROI A und C: Knochenverdichtung im Bereich der späteren Kortikalis, Remodelling des Markraumes. ROI B: Es zeigt sich eine hohe Mineraldichte in erkennbaren Knochensäulen. ROI B und C: Knochenfläche der behandelten Seite größer im Vergleich zur unbehandelten Seite.

In der Gruppe C zeigte sich bei den meisten Tieren in ROI A und C eine neu gebildete Kortikalis. Der Durchmesser der Kortikalis liegt noch über dem der Kontrollseite. Eine neue Markhöhle ist angedeutet. In der Zone B ist das Kallusgewebe noch nicht differenziert, weist jedoch eine hohe Mineraldichte mit erkennbaren Knochensäulen auf. Zwischen den Säulen finden sich kaum mineralisierte Gebiete. Auch hier überschreitet der Durchmesser des Knochens der Verlängerungsstrecke deutlich die der Kontrolltibia (Abb. 4.6).

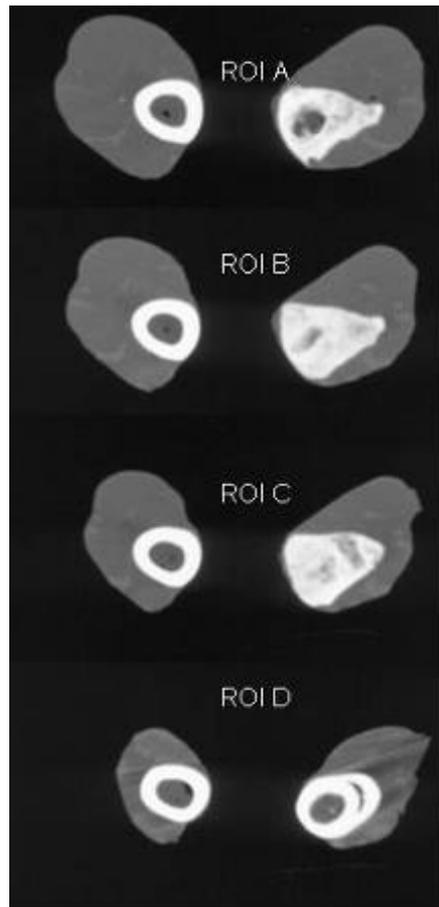


Abb. 4.7. Computertomografie der Behandlungsgruppe D nach Versuchsende. Die Abbildung zeigt die Querschnitte der in Kapitel 3.2.3 beschriebenen gleichnamigen Regions Of Interest (ROI) mit der dazugehörigen Kontrolltibia (links). ROI A bis C: Knochenverdichtung im Bereich der späteren Kortikalis, Remodelling des Markraumes. Knochenfläche der behandelten Seite geringfügig größer im Vergleich zur unbehandelten Seite.

Auch bei diesem Präparat D ist peripher eine hohe Mineraldichte vergleichbar der Gruppe B nachzuweisen. Die Kortikalisbildung hat begonnen. Die Umbauvorgänge sind jedoch noch nicht abgeschlossen, erkennbar an der unscharfen Begrenzung der Kortikalis. Der Durchmesser des behandelten Knochens nähert sich dem des unbehandelten an. Auch hier erkennt man ein Remodelling der Markhöhle in ROI A-C. In ROI B und C ist das Remodelling geringer im Vergleich zu ROI A (Abb. 4.7).

Die Knochendichten der Kontrolltibiae wiesen kaum Unterschiede zwischen den Gruppen auf. Die Werte für die kortikale Knochendichte ROI A, B, C lagen signifikant ($p < 0,001$) unter den zugehörigen Werten der Kontrolltibiae (Wertetabelle im Anhang). Es zeigten sich auch Unterschiede in den Knochendichten der ROI's bei den einzelnen Behandlungsarten (Wertetabelle im Anhang) (Abb. 4.8). Für ROI A und C wurden bei allen Implantaten die höchsten Werte für die kortikale Knochendichte ermittelt. In ROI B findet man erwartungsgemäß die niedrigsten Werte. Für die Gruppe A war die Knochendichte am

geringsten. Die Ergebnisse des Vergleichs der Mittelwerte zwischen den Gruppen befinden sich im Anhang.

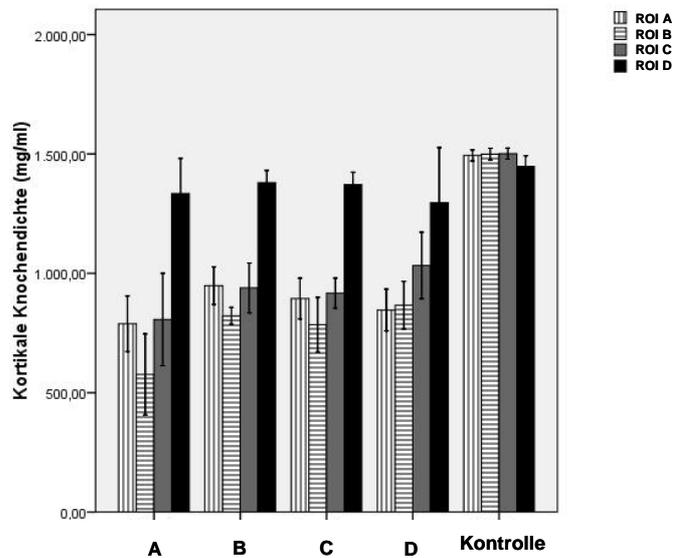


Abb. 4.8. Kortikale Knochendichte, bestimmt mittels QCT. Mittelwerte und Standardabweichungen der Gruppen A-D. Die kortikale Knochendichte ist der Mittelwert der Messregionen a, p, m und l. Messwerte und Ergebnisse der t-Tests im Anhang.

Die Messwerte im spongiösen Bereich zeigen einen gegenläufigen Trend. Niedrige Werte entsprechen einem besseren Remodelling des neuen Knochens. Das Implantat B zeigt die besten Werte. Die schlechtesten, d.h. die höchsten Werte wurden für das Implantat A ermittelt. Die Gruppen mit Spongiosa (Gruppe C und D) zeigten ebenfalls noch hohe Werte für die spongiöse Knochendichte (Abb. 4.9). Die Ergebnisse des Vergleichs der Mittelwerte zwischen den Gruppen befinden sich im Anhang.

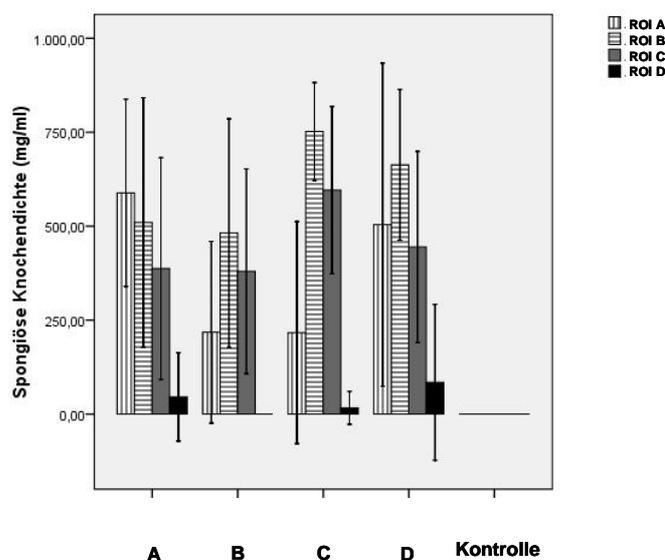


Abb. 4.9. Spongiöse Knochendichte, bestimmt mittels QCT. Mittelwerte und Standardabweichungen der verlängerten Tibiae der Gruppen A-D. Messwerte und Ergebnisse der t-Tests im Anhang.

Vergleicht man die vier Messregionen der Knochendichte im kortikalen Bereich (a, p, m, l) untereinander, so sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen feststellbar. Die Werte der jeweiligen Region sind jedoch immer signifikant verschieden ($p < 0,001$) im Vergleich verlängerte Tibia gegen Kontrolltibia (4.1).

Tab. 4.1. Vergleich der kortikalen Knochendichte a, p, m, l verlängerte Tibia gegen Kontrolltibia. Paarweiser t-Test.

	Kortikale Knochendichte (mg/ml)							
	Verlängerte Tibia				Kontrolltibia			
ROI	a	p	m	l	a	p	m	l
Gruppe A								
Mittelwert	735	776	607	776	1429	1481	1544	1524
Stabw.	161	159	171	119	24	23	19	27
p-Wert	<0,001	<0,001	<0,001	0,001				
Gruppe B								
Mittelwert	954	917	907	834	1462	1462	1549	1529
Stabw.	68	41	71	128	36	22	51	23
p-Wert	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001				
Gruppe C								
Mittelwert	899	900	852	811	1462	1456	1525	1527
Stabw.	67	95	131	101	39	50	35	31
p-Wert	<0,001	<0,001	<0,001	0,060				
Gruppe D								
Mittelwert	877	980	938	867	1473	1475	1535	1543
Stabw.	107	74	111	183	46	40	20	19
p-Wert	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001				

Zur Erfassung des Zusammenhanges zwischen der Knochendichte und der Behandlungsmethode wurden zunächst die Mittelwerte aus den Werten für die kortikale Knochendichte ROI A, B und C gebildet. Diese Werte gingen dann in den Mehrfachvergleich ein. Nur die Gruppe A unterscheidet sich signifikant von den Behandlungsgruppen B, C und D (Tab. 4.2).

Tab 4.2. Signifikanzen – Mehrfachvergleich (einfaktorielle Varianzanalyse ANOVA, Post-Hoc-Test nach Tukey) der Werte für die Knochendichte (Mittelwert der Knochendichte ROI A, B und C) der einzelnen Behandlungsgruppe gegeneinander. Werte im Anhang.

Gruppe A			Gruppe B			Gruppe C			Gruppe D		
B	C	D	A	C	D	A	B	D	A	B	C
<0.001	0,006	<0.001	<0.001	0,752	0,989	<0.001	0,752	0,591	<0.001	0,989	0,591

Die 5 QCT-Messungen (a, p, m, l, c) stellen punktuelle Bestimmungen der jeweiligen Knochendichte dar und lassen keine Aussagen über die biomechanische Belastbarkeit zu. Es war notwendig, die ursprünglichen CT-Daten in biomechanisch verwertbare Kenngrößen umzurechnen. Aus diesem Grund wurden aus den CT-Daten das jeweilige Elastizitätsmodul errechnet (Kapitel 3.2.4) (Abb. 4.10).

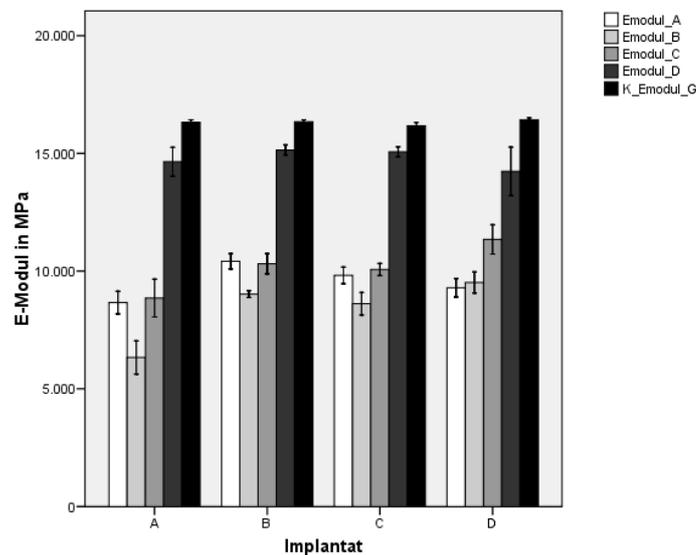


Abb. 4.10. Berechnete Elastizitätsmodule (E-Modul) aus den Werten für die kortikale und spongiöse Knochendichte. K-Emodul entspricht dem Wert des Elastizitätsmoduls für die Kontrolltibiae und wurde berechnet aus den Mittelwerten der Elastizitätsmodule aus ROI A-D. Messwerte und Ergebnisse der t-Tests im Anhang.

Die Werte für die Elastizitätsmodule zeigen die gleichen Abhängigkeiten wie die Werte für die Knochendichte. Die Werte der jeweiligen Region sind im Vergleich verlängerte Tibia gegen Kontrolltibia immer signifikant verschieden ($p < 0,001$). Die Werte der Knochendichte unterschieden sich nur für die Gruppe A signifikant im Vergleich der Gruppen untereinander (Werte im Anhang).

Mit Hilfe einer Regressionsanalyse wurde die Abhängigkeit der Versagenslast von der Knochendichtemessung getestet. Es zeigte sich eine signifikante Regression der berechneten E-Module zur Versagenslast der verlängerten Tibiae ($R^2=0,632$ $p=0,008$). Als

Einflussfaktoren gingen sowohl die Werte der E-Module für den kortikalen Knochen als auch die Werte der E-Module für den spongiösen Knochen aller untersuchter Regionen ein. Auf die Kontrollwerte haben die Regionen keine Einfluss ($R^2= 0,039$, $p=0,925$).

4.5 Biomechanische Untersuchungen

Die nach Entfernung der Weichteile durchgeführte Längenmessung der distrahierten linken Tibiae ergab eine durchschnittliche Gesamtlänge von 247,5 mm (+/- 7,2). Die mittlere Länge der rechten Kontrolltibiae betrug 219,3 mm (+/- 7,3). Die distrahierte Tibia war im Durchschnitt 28,3 mm (+/- 1,4 mm) länger.

Bei der nachfolgenden biomechanischen Untersuchung wurde die mechanische Stabilität der distrahierten linken Tibiae und der kontralateralen Kontrolltibiae mittels 4-Punkt-Biegetest untersucht.

Die rechten Tibiae zerbarsten alle im Sinne einer Berstungsfraktur, wobei die Frakturzone diaphysär lag. Die operierten linken Tibiae frakturierten alle innerhalb der Distraktionszone. Hierbei brachen sechs Präparate am Übergang zwischen kortikalem Knochen und neuformierten Kallusgewebe, bei 17 Proben zeigte sich die Fraktur im zentralen Kallusbereich. Eine spezifische Gruppenzugehörigkeit lag nicht vor.

In den Proben, bei denen die Fraktur im Übergangsbereich zwischen kortikalem Knochen und Kallusgewebe auftrat ($N=17$), war die Bruchkraft 1478 ± 147 N. Dies entspricht einem Biegemoment von $M_b = 36,95$ Nm. Die Präparate mit der zentralen Bruchstelle im Kallus ($n=6$) zeigten eine Versagenslast von 1523 ± 147 N (Biegemoment $M_b = 38,08$ Nm). Signifikante Unterschiede bestanden nicht.

Alle Tiere der nichtbehandelten Gruppe zeigten eine Knochenheilungsverzögerung, wobei bei vier der nichtbehandelten 7 Tiere jegliche ossäre Konsolidierung fehlte.

Die Versagenslast der verlängerten Tibiae war für alle Implantate signifikant kleiner im Vergleich zur Kontrollseite (Paarweiser t-Test, Tab. 4.3).

Die nicht behandelte Gruppe A zeigte im Vergleich zu allen anderen Gruppen die geringste Versagenslast. Dies wird auch im Auftreten der Fälle mit komplett fehlender Konsolidierung in dieser Gruppe demonstriert.

Die gemessenen Mittelwerte der rechten Kontrolltibiae wiesen keine gruppenspezifischen Differenzen auf.

Im Vergleich zwischen operierter und nichtoperierter Seite zeigte sich, dass in der Gruppe A nur 21,1% der Bruchkraft des gesunden Knochens notwendig ist. In der Gruppe D war die

durchschnittliche Versagenslast dagegen 74,6% im Vergleich zur Kontrolltibia (Gruppe B 53,2%, Gruppe C 44,6%).

Tab. 4.3. Versagenslast in N. Vergleich der Versagenslast der verlängerten Tibiae gegenüber den Kontrolltibiae.

Implantat	Versagenslast in N		Biegemoment (M_b) in Nm	
	Verlängerte Tibia	Kontrolltibia	Verlängerte Tibia	Kontrolltibia
A				
Mittelwert	611	2897	15,26	72,43
Stabw.	220	381	5,50	9,54
p-Wert	<0.001		<0.001	
B				
Mittelwert	1599	3008	39,96	75,21
Stabw.	232	368	5,81	9,21
p-Wert	<0.001		<0.001	
C				
Mittelwert	1340	3004	33,50	75,11
Stabw.	239	334	5,98	8,36
p-Wert	<0.001		<0.001	
D				
Mittelwert	2074	2745	51,85	68,63
Stabw.	481	609	12,03	15,23
p-Wert	0,02		0,02	

Ein Vergleich der Versagenslast zwischen den Gruppen zeigt die Abbildung 4.11.

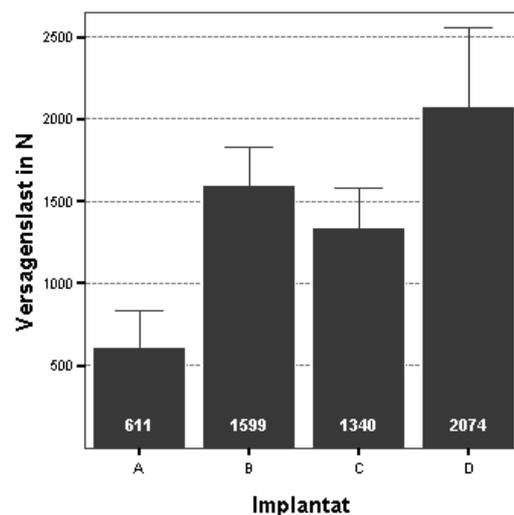


Abb. 4.11. Versagenslast der distrahierten Tibiae in den einzelnen Behandlungsgruppen. A: unbehandelte Membran; B: IGF-I/TGF- β 1-beschichtete Membran, C: Spongiosaplastik; D: Kombination von B und C.

Die höchste Versagenslast wurde in der Gruppe D (IGF-I/TGF- β 1 und Spongiosaplastik) festgestellt, gefolgt von den Gruppen B und C. Damit ergibt sich folgende Reihenfolge für die Versagenslast: $A < C < B < D < \text{Kontrolle}$.

Die Mittelwerte unterschieden sich für die Gruppe A signifikant von den Werten für die Gruppe B, C und D. Auch die Werte der Gruppe D unterschieden sich signifikant von denen der Gruppe A, B und C. Bei den Mittelwerten der Gruppen B und C hingegen besteht kein signifikanter Unterschied (Tab. 4.4).

Tab. 4.4. Signifikanzniveau (p-Werte) - Mehrfachvergleich der Werte für die Versagenslast der einzelnen Gruppen gegeneinander.

Gruppe A			Gruppe B			Gruppe C			Gruppe D		
B	C	D	A	C	D	A	B	D	A	B	C
<0.001	0,001	<0.001	<0.001	0,401	0,045	<0.001	0,401	0,001	<0.001	0,045	0,001

Mit Hilfe der Regressionsanalyse wurde die Abhängigkeit der Versagenslast von der durchgeführten Behandlung, d.h. vom Implantat, ermittelt. Es zeigt sich eine signifikante Regression zwischen diesen beiden Parametern (Abb. 4.12, $R^2 = 0,58$).

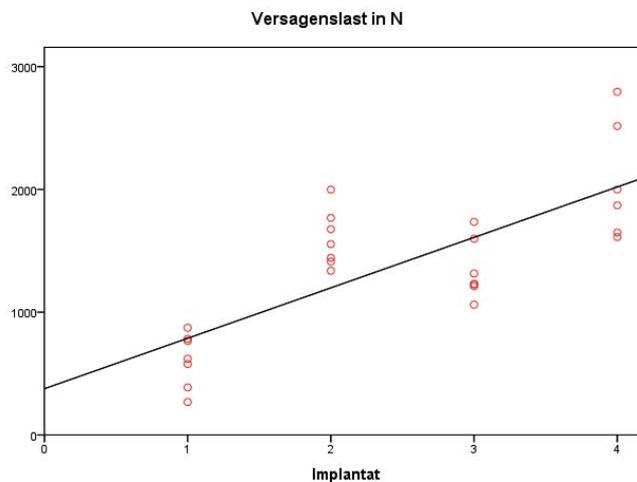


Abb. 4.12. Regression der Versagenslast mit der Behandlungsmethode, $R^2=0,58$, $p < 0,0001$.

4.6 Histologische Untersuchungen

Die indirekte Knochenheilung beginnt mit einer Primärreaktion des Periostes. Dieser Prozess ist in allen histologischen Präparaten nachweisbar. Es kam zu einer periostalen, interfragmentären und endostalen Knochenbildung, wobei der neu gebildete Knochen dem originären Knochen direkt aufliegt. Die Grenze zwischen beiden ist noch deutlich erkennbar (Abb. 4.13).

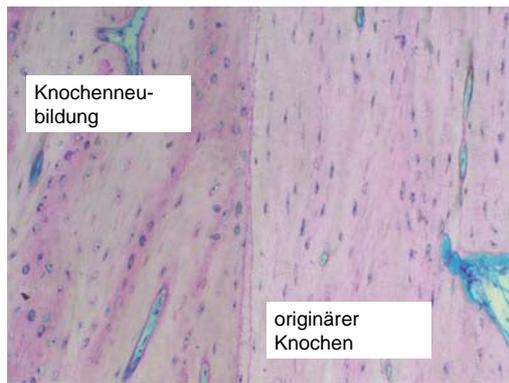


Abb. 4.13. Primärreaktion des Periostes. Knochenremodelling. Grenze originärer Knochen und periostale Knochenneubildung. Giemsa 31,25x.

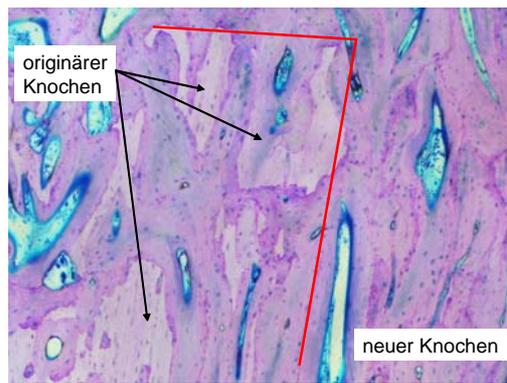


Abb. 4.14. Periostdefekt. Giemsa 31,25x.

Im Bereich des Periostdefektes (Abb. 4.14) hingegen ist diese Grenze nicht vorhanden. Hier unterliegt der Knochen einem aktiven Remodellingprozess. Die ursprüngliche Kortikalisstruktur wird zerstört und es zeigen sich vermehrt Hohlräume. Die Dicke der Kortikalis nimmt ab. Zusätzlich ist die Menge an neu gebildeten Knochen gegenüber den Gebieten mit intakter Periostschicht stark vermindert.

Gruppe A – unbeschichtete Membran

8 Wochen nach Distraktionsende erkennt man im Übersichtsbild des Längsschnittes aller 7 Versuchstiere eine verzögerte Knochenheilung. Es ist ein Spalt mit beginnender reaktiver Sklerosierung in der Umgebung zu erkennen. Dieser ist mit nicht kalzifiziertem Kallusgewebe gefüllt. Innerhalb des Spaltes verläuft auch die Bruchlinie, die durch den Vierpunktbiegeversuch verursacht wurde. Insgesamt ist das Kallusgewebe noch inhomogen und der Durchmesser überschreitet den des originären Knochens. Im Bereich des Periostdefektes sind Kallusbildung und Kortikalisdicke deutlich vermindert. Die säulenförmigen Strukturen aus neu gebildeten Knochen, die von den Osteotomieflächen auf das Zentrum der Verlängerungsstrecke zuwachsen, haben keine Verbindung miteinander erreicht. Ein neu gebildeter Markraum war in keinem der Präparate erkennbar (Abb. 4.15).

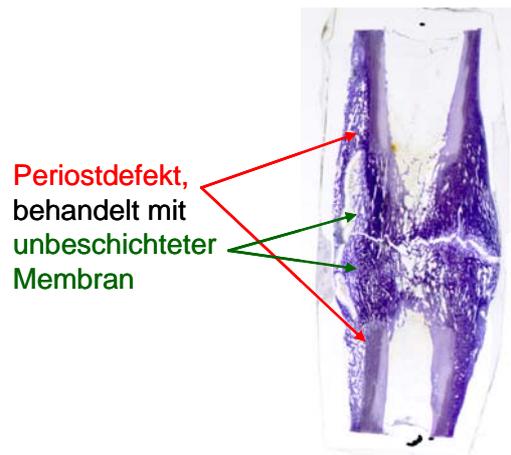


Abb. 4.15. Längsschnittbild der Gruppe A (unbeschichtete Membran) mit erkennbarer Bruchlinie aus dem Biegeversuch. Deutlich erkennbar ist eine verzögerte Knochenheilung. Das Kallusgewebe ist inhomogen. Der originäre Kallusdurchmesser wird überschritten. (Toluidinblau, 1,0x)

Die periostale Knochenneubildung überwiegt gegenüber der endostalen Knochenneubildung. (Abb. 4.16 und 4.17).

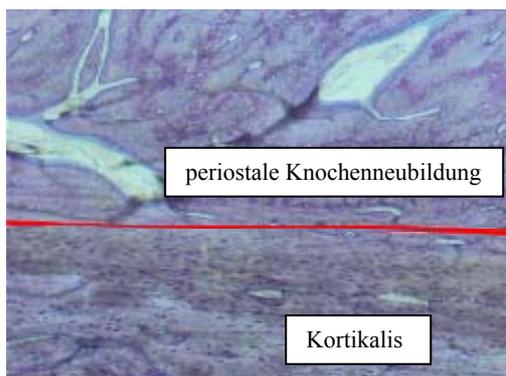


Abb. 4.16. Periostale Knochenneubildung (Toluidinblau, 12,5x)

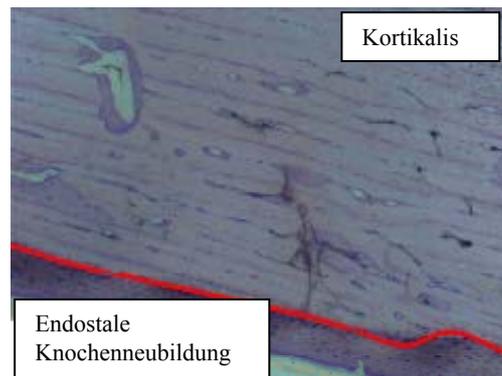


Abb.4.17. Endostale Knochenneubildung (Toluidinblau, 12,5x)

Der neu gebildete Knochen außerhalb der nicht kalzifizierten Zone in der Kallusmitte ist hauptsächlich longitudinal ausgerichtet und trägt lamellären Charakter (Abb. 4.19). In der Nähe des Spaltes ist der neue Knochen im Wesentlichen durch eine eher transversale Richtung gekennzeichnet. Es zeigt sich noch ein hoher Anteil an Geflechtknochen. Des Weiteren lassen sich Zeichen einer enchondralen Ossifikation nachweisen. In unmittelbarer Nähe der Osteotomieflächen wiesen alle Präparate einen überwiegend knöchernen, säulenförmigen Kallus auf. Die Knochenneubildung ist hier desmalen Ursprungs (Abb. 4.20). Im Bereich der Kortikotomie ist der originäre Knochen noch deutlich erkennbar. Es zeigt sich eine geringgradige Verzahnung (Abb. 4.18) zwischen neuem und originärem Knochen.

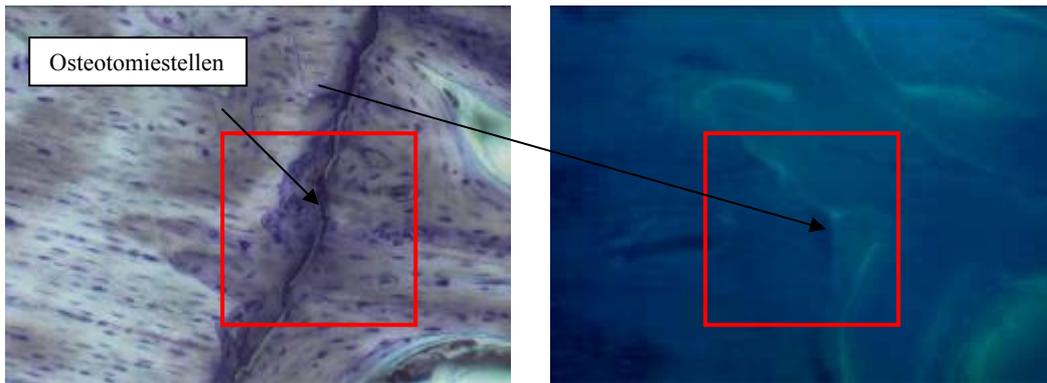


Abb. 4.18. Osteotomiestelle, beginnende Verzahnung (links Toluidinblau, rechts UV, 31,25x)

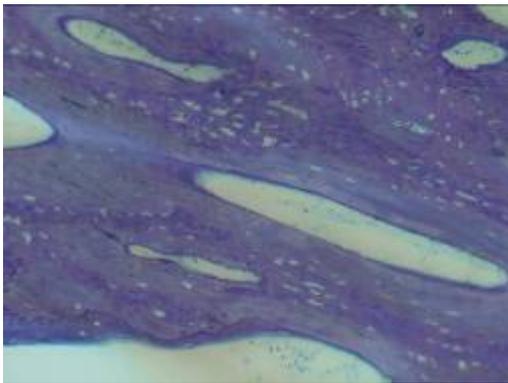


Abb. 4.19. Longitudinal ausgerichteter neuer Knochen mit lamellärem Charakter. (Toluidinblau, 31,25x)

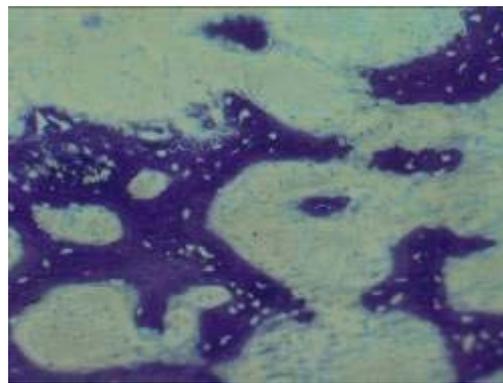


Abb. 4.20. Desmale Knochenneubildung, Geflechtknochen. (Toluidinblau, 31,25x)

In der Nähe der Membran ist die Knochenneubildung häufig chondralen Ursprungs (Abb. 4.21). In diesem Gebiet finden sich zahlreiche Howship'sche Lakunen und Osteoklasten als Zeichen einer aktiven Knochenresorption (Abb. 4.22). Vereinzelt sind Reste der Membran nachweisbar (Abb. 4.23).

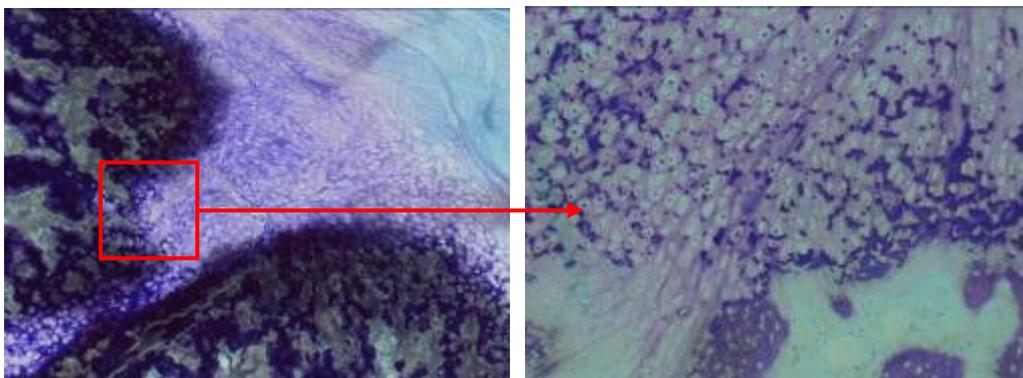


Abb. 4.21. Chondrale Ossifikation. In der Vergrößerung sind deutlich die Chondrozyten erkennbar. (Toluidinblau, links 12,5x, rechts 31,25x)

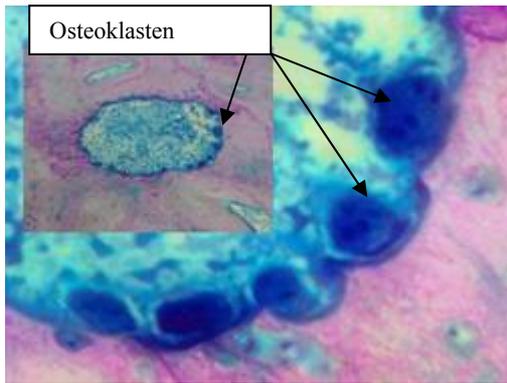


Abb. 4.22. Deutliches Remodelling. Osteoklasten sind erkennbar. (Giemsa, 312,5x)

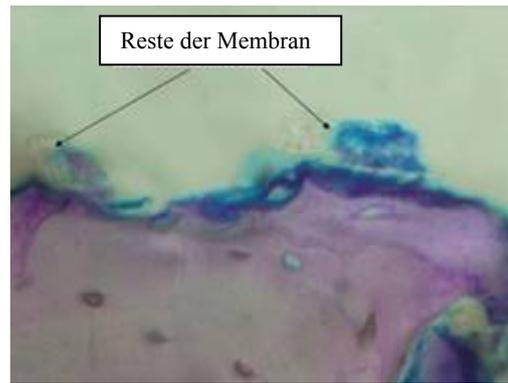


Abb. 4.23. Reste der Membran. (Giemsa, 312,5x)

In den Querschnitten erkennt man den beginnenden Umbau des neu gebildeten Knochens zu den mechanisch stabileren Havers'schen Systemen. In der fibrösen Zwischenzone (Mitte der Verlängerungsstrecke) ist dieser Umbau nicht nachweisbar (Abb. 4.24).

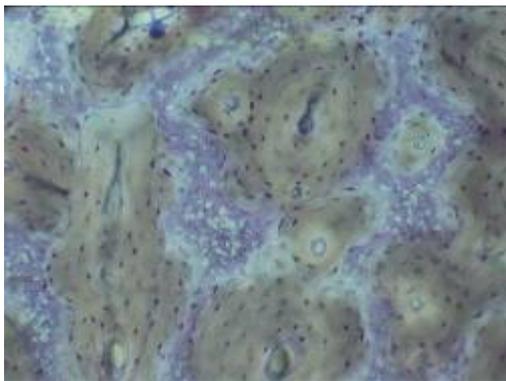


Abb. 4.24. Querschnitte. Erkennbar ist der Umbau des neu gebildeten Knochens zu Havers'schen Systemen. (links Toluidinblau, rechts UV, 31,25x)

Gruppe B – beschichtete Membran

Nach Distraktionsende sind im Längsschnittbild (Abb. 4.25) Zeichen des kortikalen Umbaus erkennbar und ein neuer Markraum bildet sich aus. Die Überbrückung der Distraktionsstrecke ist fast abgeschlossen. Das Zentrum des Verlängerungskallus ist knöchern ausgefüllt. Es findet sich kaum noch Geflechtknochen. Eine enchondrale Knochenbildung lässt sich in dieser Gruppe nur ganz vereinzelt nachweisen. Die periostale Knochenreaktion auf der nicht behandelten Seite ist nur geringfügig stärker ausgeprägt.

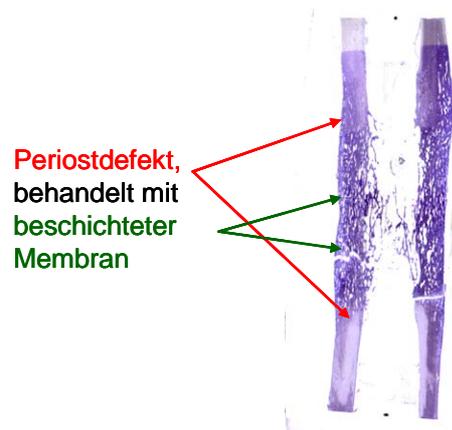


Abb. 4.25. Längsschnittbild der Gruppe B (beschichtete Membran) mit erkennbarer Bruchlinie aus dem Biegeversuch. Deutlich erkennbar sind eine normale Knochenbruchheilung und der beginnende kortikale Umbau des Verlängerungskallus. Der originäre Kallusdurchmesser wird erreicht. (Toluidinblau, 1,0x)

Es finden sich einheitliche Knochensäulen in der Mitte der Verlängerungsstrecke und zahlreiche Osteoblasten und Osteoklasten als Zeichen für einen Remodellingprozess (Abb. 4.26).

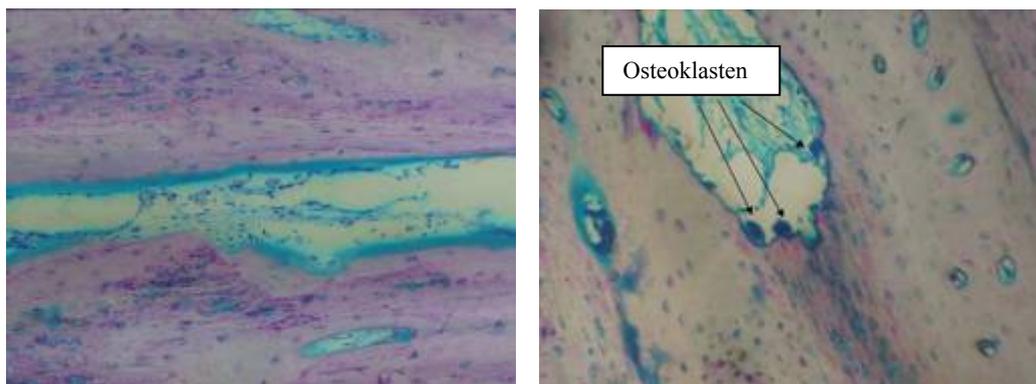


Abb. 4.26. Einheitliche Knochensäulen in der Mitte der Verlängerungsstrecke (links). Osteoklasten als Zeichen des aktiven Remodellings (rechts). (Giemsa, 31,25x)

Im Osteotomiebereich ist eine weitgehende Verzahnung zwischen neu gebildeten und ursprünglichen Knochen eingetreten (Abb. 4.27).

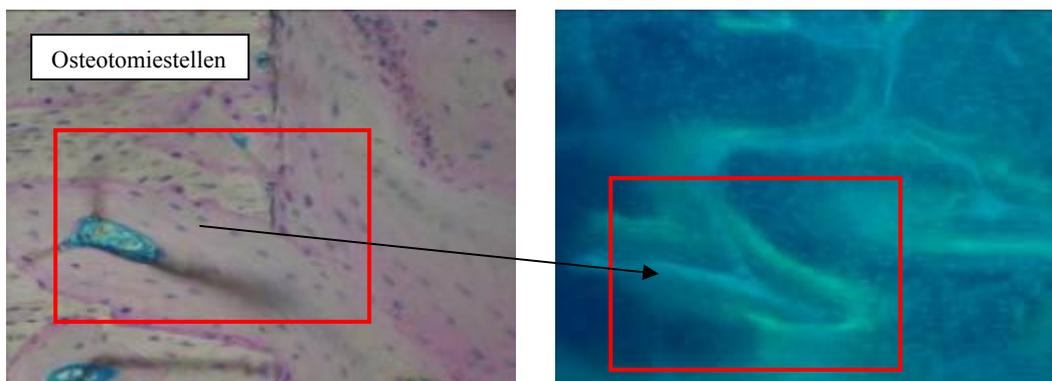


Abb. 4.27. Verzahnung der Osteotomiestellen. (links Giemsa, rechts UV, 31,25x)

Wie bei der Gruppe A lassen sich vereinzelt Reste der Membran nachweisen. Im Bereich des Periostdefektes (Abb. 4.28) unterliegt der Knochen einem starken Umbau. Die ursprüngliche Kortikalisstruktur ist fast vollständig wiederhergestellt. Die Menge an neu gebildetem Knochen zeigt sich gegenüber den Gebieten mit intakter Periostschicht nur unwesentlich kleiner.

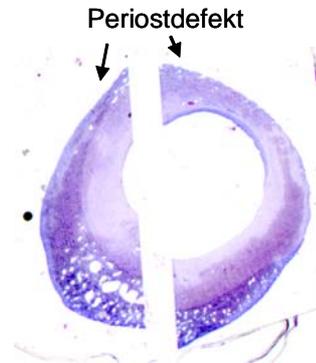
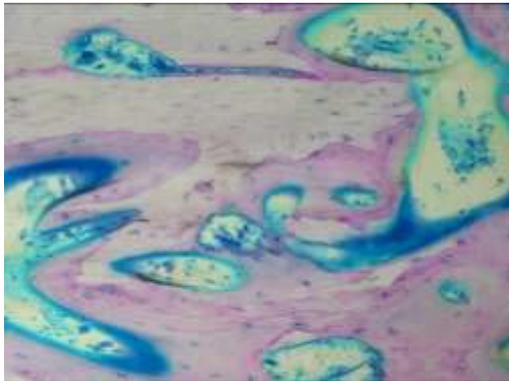


Abb. 4.28. Umbau des Knochens im Bereich des Periostdefektes (links, Giemsa 31,25x). Neugebildeter Knochen im Bereich des Periostdefektes. (rechts, Querschliff, Toluidinblau, 2x)

Gruppe C – Spongiosaplastik

Im Längsschnittbild (Abb. 4.29) sind auch bei dieser Gruppe Zeichen des kortikalen Remodellings erkennbar. Die Knochenreifung ist im Vergleich zur Gruppe B nicht so weit fortgeschritten. Es findet sich noch relativ viel Geflechtknochen. Der Kallus zeigt sich in den späteren kortikalen Zonen dichter strukturiert. Das Zentrum der Verlängerungsstrecke ist ossifiziert, wobei eine Rekonstruktion der Markhöhle noch nicht stattgefunden hat. Vereinzelt zeigen sich Stellen mit enchondraler Knochenbildung. Die periostale Knochenreaktion auf der nicht behandelten Seite und auf der behandelten Seite zeigen identische Ausmaße.

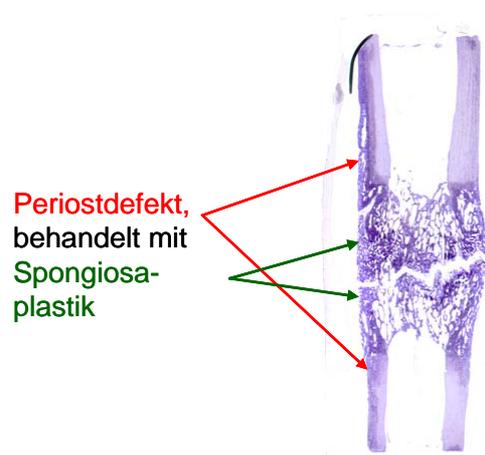


Abb. 4.29. Längsschnittbild der Gruppe C (Spongiosaplastik) mit erkennbarer Bruchlinie aus dem Biegeversuch. Deutlich erkennbar ist eine normale Knochenbruchheilung mit einer im Vergleich zur Gruppe B höherem Anteil an Geflechtknochen innerhalb der Distractionsstrecke. (Toluidinblau, 1,0x)

Reste der Spongiosaplastik sind noch deutlich zu erkennen (Abb. 4.30). Dieser Knochen ist von neu gebildetem ossären Gewebe ummantelt.

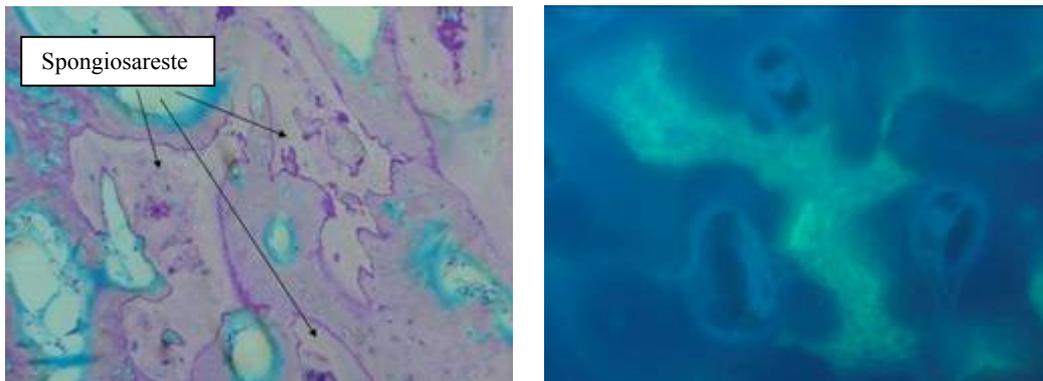


Abb. 4.30. Integration der Spongiosaplastik in den neu gebildeten Knochen. (links Giemsa, rechts UV, 31,25x)

Im Bereich des Periostdefektes, aber auch innerhalb der Distractionsstrecke, finden sich zahlreiche Osteoklasten als Zeichen von Remodellingprozessen (Abb. 4.31).

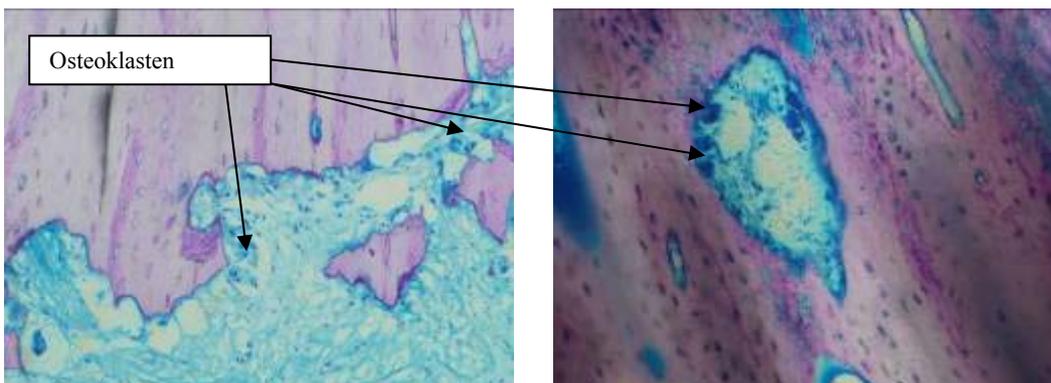


Abb. 4.31. Multiple Osteoklasten (Giemsa 31,25x)

An den Osteotomieflächen zeigt sich auch bei dieser Gruppe eine Verzahnung des neu gebildeten mit dem ursprünglichen Knochen (Abb. 4.32).

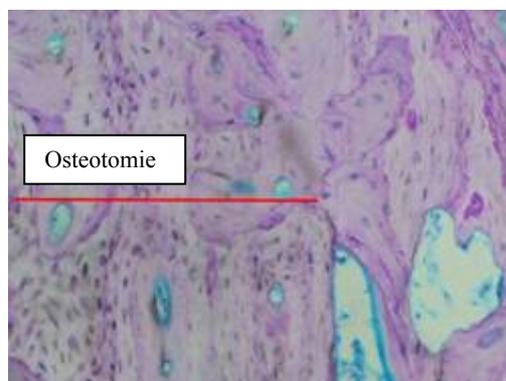


Abb. 4.32. Verzahnung des neu gebildeten Knochens mit dem originären Knochen (Giemsa 31,25x)

Insgesamt zeigt der neu gebildete Knochen eine unruhige Struktur mit Mosaikbildung und größeren Anteilen an Geflechtknochen (Abb. 4.33). Die Bilder des Quer- und Längsschliffes unterschieden sich dabei nicht.

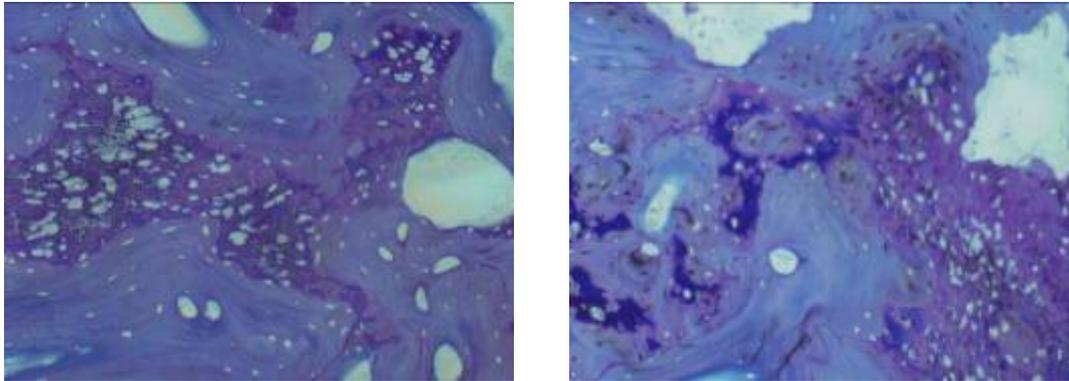


Abb. 4.33. Mosaikstrukturen des neu gebildeten Knochens. (links Querschliff, rechts Längsschliff; Toluidinblau 31,25x)

Gruppe D –beschichtete Membran kombiniert mit Spongiosaplastik

Das kortikale Remodelling ist auch bei dieser Gruppe nachweisbar. Der Fortschritt in der Knochenreifung lässt sich mit der Gruppe B vergleichen. Der neue Knochen besteht hauptsächlich aus Lamellenknochen. Die Knochenneubildung ist nur ganz vereinzelt enchondralen Ursprungs. Im Unterschied zur Gruppe B findet sich hier eine stärkere periostale Reaktion im Bereich des Periostdefektes. Das Kallusgewebe ist durchgängig ossifiziert. Die Markhöhle beginnt sich auszubilden, zeigt jedoch noch keine durchgängige Struktur. Der Durchmesser des Knochens ist im Kallusbereich im Vergleich zum originären Knochen geringgradig größer (Abb. 4.34).

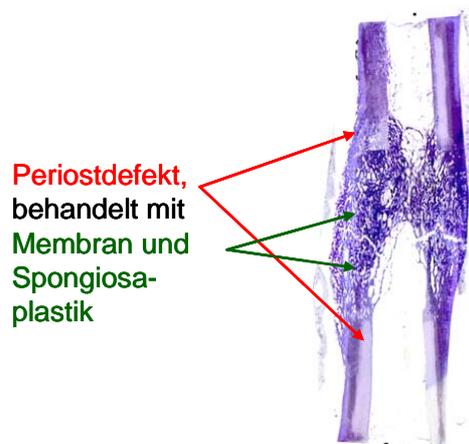


Abb. 4.34. Längsschnittbild der Gruppe D (Membran und Spongiosaplastik) mit Bruchlinie aus Biegeversuch. Deutlich erkennbar ist eine normale Knochenbruchheilung mit einer im Vergleich zur Gruppe C verstärkten periostalen Reaktion. Die Markhöhle beginnt sich auszubilden. (Toluidinblau, 1,0x)

Der Knochenreste der Spongiosaplastik sind in den neuen Knochen eingemauert (Abb. 4.35). Überall finden sich Osteoklasten und zahlreiche Osteoblasten als Zeichen eines Umbauprozesses.

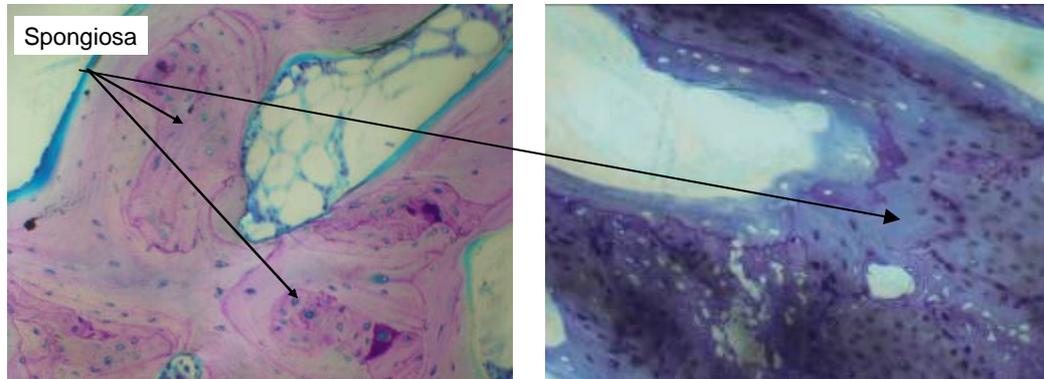


Abb. 4.35. Reste der Spongiosaplastik, ummauert von neu gebildetem Knochen. (rechts Giemsa, links Toluidinblau, 31,25x)

Der Bereich der Verlängerungsstrecke ist charakterisiert durch eine verstärkte Knochenneubildung. Es zeigen sich ungerichtete Strukturen und Zeichen eines aktiven Remodellingprozesses (Abb.4.36).

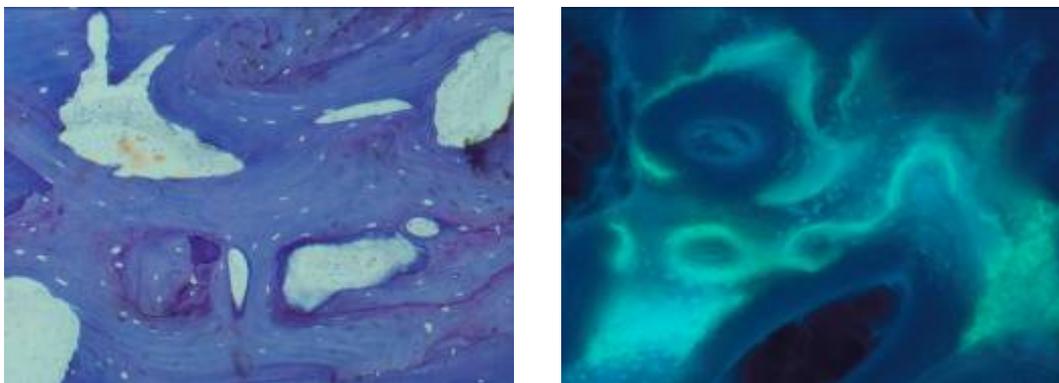


Abb. 4.36. Ungerichtete Strukturen im Längsschliffpräparat. (links Toluidinblau, rechts UV, 31,25x)

An den Osteotomieflächen ist der neue mit dem originären Knochen gut verzahnt. Es kommt überwiegend zu einer longitudinalen Ausrichtung des Knochens (Abb.4.37).

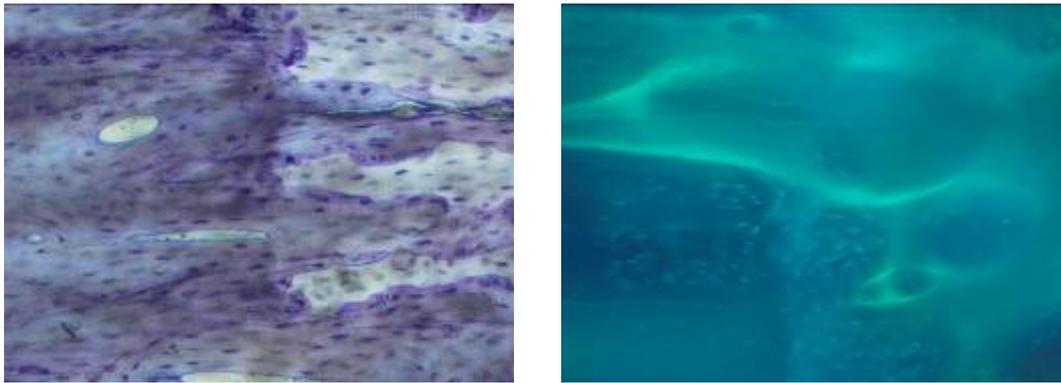


Abb. 4.37. Verzahnung neuer und originärer Knochen an den Osteotomieflächen. (links Toluidinblau, rechts UV, 31,25x)

4.7 Mikroradiografie

Mit Hilfe der Bildanalyse wurden die Mikroradiografien der Längs- und Querschnitte vermessen (Abb. 4.38, 4.39). Eine Unterscheidung zwischen Lamellen- und Geflechtknochen erfolgte nicht. Auf eine morphologische Beurteilung wurde verzichtet, da die Aussagen identisch mit der histologischen Beurteilung sind.

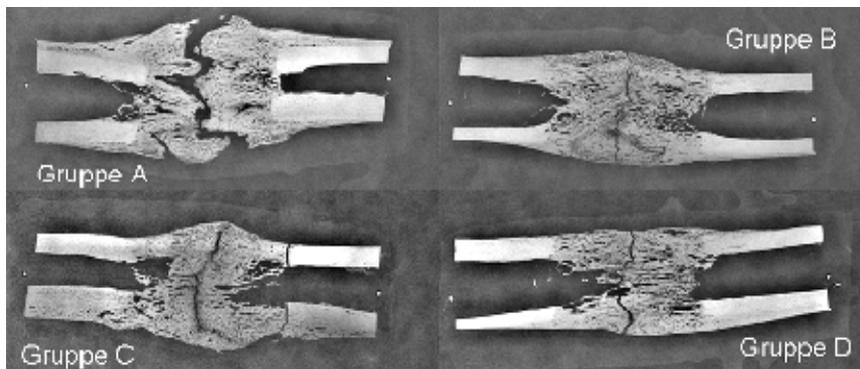


Abb. 4.38. Typische Mikroradiografien der Längsschnitte (Gruppe A: unbeschichtete Membran; Gruppe B: IGF-I/TGF- β 1, Gruppe C: Spongiosaplastik; Gruppe D: Spongiosaplastik und IGF-I/TGF- β 1).

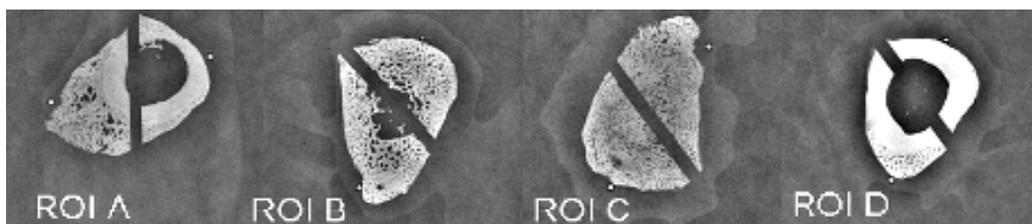


Abb. 4.39. Typische Mikroradiografien der Querschnitte (Gruppe A: unbeschichtete Membran; Gruppe B: IGF-I/TGF- β 1, Gruppe C: Spongiosaplastik; Gruppe D: Spongiosaplastik und IGF-I/TGF- β 1).

Als absolute Knochenfläche wurde die Fläche, die in der jeweilige Messregion mit Knochen bedeckt ist, bezeichnet. Die relative Knochenfläche gibt den Anteil der absoluten Knochenfläche an der Gesamtfläche der ROI in Prozent an.

Die Ergebnisse zeigen, dass die absolute Knochenfläche der Querschnitte in der Kallusmitte (ROI B) geringfügig größer war im Vergleich zu ROI A und C, die sich proximal und distal von der Osteotomiestelle befinden. Nur bei der Gruppe A (Implantat A = unbehandelte Membran) war der Wert für die absolute Knochenfläche ROI B im Vergleich zu ROI A und C kleiner. Die niedrigsten Werte für die absolute Knochenfläche wurden für ROI D außerhalb der Verlängerungsstrecke ermittelt (Abb. 4.40). Die Unterschiede zwischen den einzelnen Regions of interest waren nicht signifikant. Bei der Betrachtung der relativen Knochenfläche zeigte sich ein nahezu inverses Ergebnis. Bei großem Querschnitt der absoluten Knochenfläche war die zugehörige relative Knochenfläche klein und umgekehrt (Abb. 4.42). Der Vergleich der Behandlungsgruppen untereinander zeigte, dass die absoluten Knochenflächen für die Gruppen, die eine mit Wachstumsfaktoren beschichtete Membran enthielten (Implantat B und D), deutlich höhere Werte annehmen. Dieser Unterschied fand sich in allen ROI's (Abb. 4.41). Eine Signifikanz bestand jedoch nicht. Bei den relativen Knochenflächen ließen sich keine eindeutige Beziehung der Gruppen untereinander feststellen (Abb. 4.43).

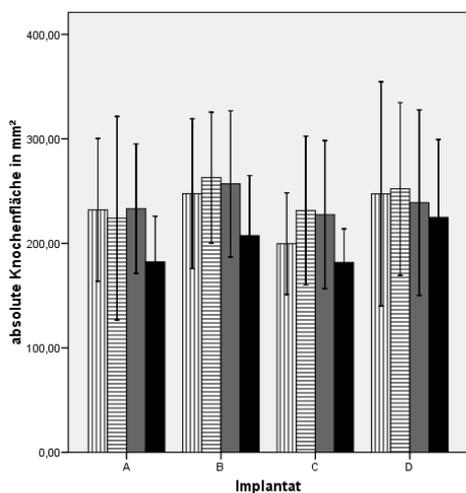


Abb. 4.40. Absolute Knochenfläche in mm² im mikroradiografischen Querschnitt. Vergleich der Regionen der Gruppen. Mittelwerte und Standardabweichungen der verlängerten Tibiae (Werte im Anhang).

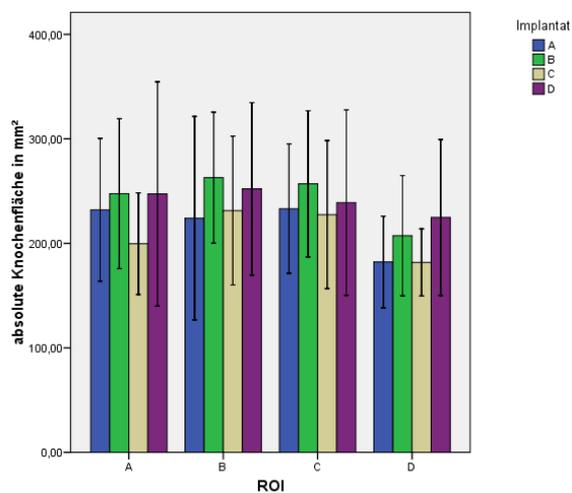


Abb. 4.41. Absolute Knochenfläche in mm² im mikroradiografischen Querschnitt. Vergleich der Gruppen in Bezug auf die ROI's. Mittelwerte und Standardabweichungen der verlängerten Tibiae (Werte im Anhang).

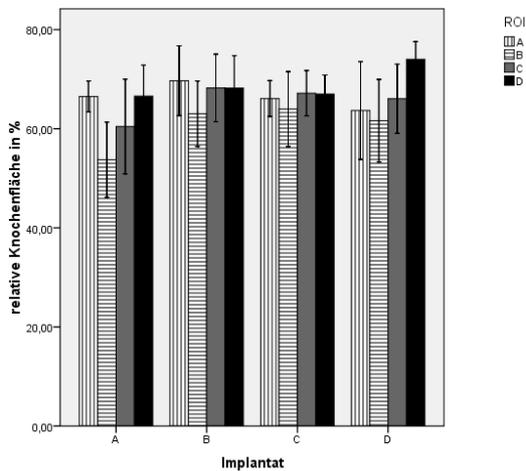


Abb. 4.42. Relative Knochenfläche in % im mikroradiografischen Querschnitt. Regionen der einzelnen Gruppen. Mittelwerte und Standardabweichungen der verlängerten Tibiae (Werte im Anhang).

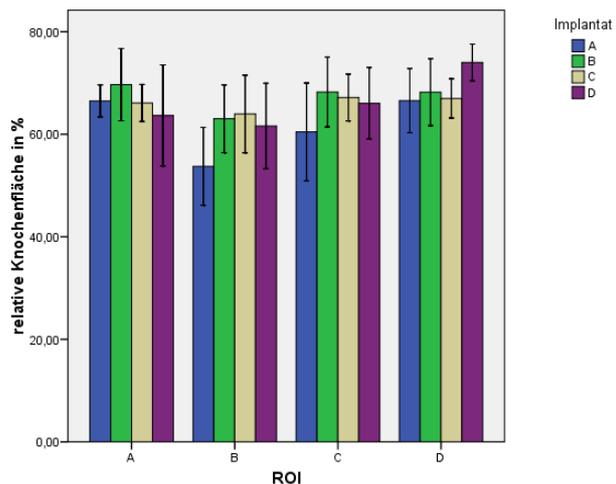


Abb. 4.43. Relative Knochenfläche in % im mikroradiografischen Querschnitt. Vergleich der Gruppen in Bezug auf die ROI's. Mittelwerte und Standardabweichungen der verlängerten Tibiae (Werte im Anhang).

Die absolute Knochenfläche der Längsschnitte der Verlängerungsstrecke wies keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen auf (Abb. 4.44).

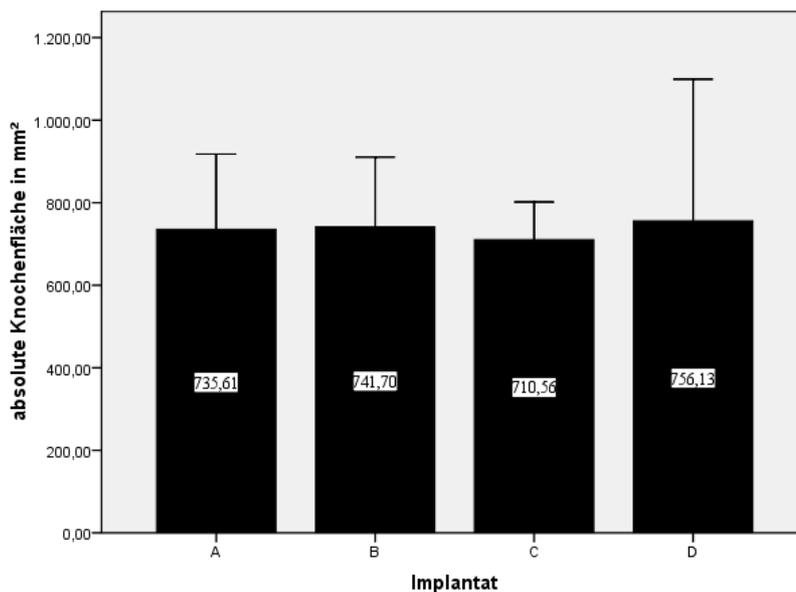


Abb. 4.44. Absolute Knochenfläche in mm² im mikroradiografischen Längsschnitt. Mittelwerte und Standardabweichungen der verlängerten Tibiae. Vergleich der Behandlungsgruppen (Werte im Anhang).

Die gemessenen Werte für die Gesamtflächen der Mittelwerte der Querschnitte (Abb. 4.44) der Regionen B und C korrelieren sehr gut mit den Flächenwerten, die sich aus den Impedanzbildern der Ultraschallmessungen ergeben ($R^2=0,93$).

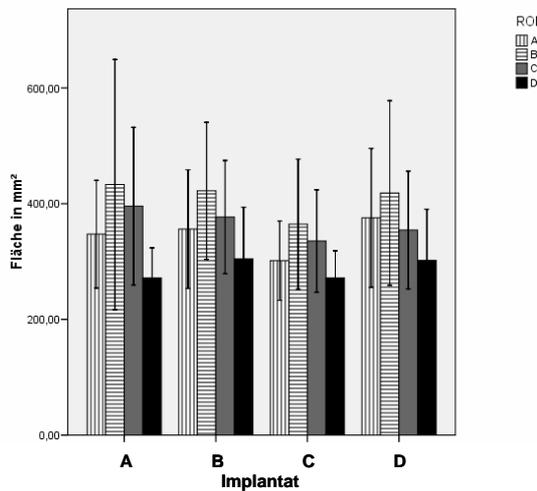


Abb. 4.45. Gesamtfläche des mit Knochen bedeckten Gebietes.

4.8 Ultraschallmikroskopische Untersuchungen

Die ultraschallmikroskopischen Untersuchungen ergaben gruppenspezifische Unterschiede. Ein Vergleich der Längsschnittimpedanzdarstellungen zeigt Abb. 4.46.

In den Gruppen C und D zeigten sich die Spongiosaplastiken komplett inkorporiert und konnten vom neugebildeten Kallusgewebe nicht unterschieden werden. In den Gruppen A, B und D wurden in einigen Präparaten Residuen der PDLLA Membran nachgewiesen.

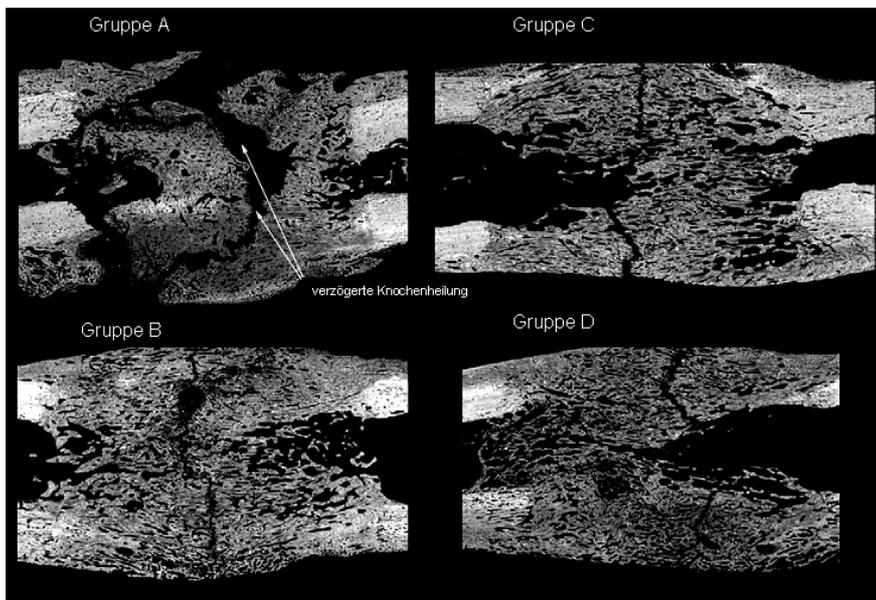


Abb. 4.46. Impedanzdarstellung mit Längsschnitten der verschiedenen Behandlungsgruppen. Darstellung der verzögerten Knochenheilung in der nichtbehandelten Kontrollgruppe (Gruppe A: unbeschichtete Membran; Gruppe B: IGF-I/TGF-β1, Gruppe C: Spongiosaplastik; Gruppe D: Spongiosaplastik und IGF-I/TGF-β1).

In allen Gruppen wiesen die akustischen Parameter (Impedanzwerte in den Quer- und Längsschnitten, Anisotropieverhältnisse) signifikant niedrigere Werte im Distraktionsbereich gegenüber dem anliegenden kortikalen Gewebe auf (paarweiser t-Test, $p < 0,001$). Ein Vergleich zwischen den Gruppen wird in Tabelle 4.5 dargestellt.

Tabelle 4.5. Akustische Impedanz Z und Anisotropieverhältnisse AR (Mittelwerte und Standardabweichung) von Kallus- und kortikalem Gewebe. Die tiefgestellten Indizes t und c bezeichnen Längsschnitte (transverse) und Querschnitte (cross).

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
$Cl.Z_t$ [Mrayl]	$5,55 \pm 0,19$	$5,59 \pm 0,15$	$5,63 \pm 0,13$	$5,49 \pm 0,17$
$Cl.Z_c$ [Mrayl]	$6,38 \pm 0,24$	$6,53 \pm 0,28$	$6,69 \pm 0,29$	$6,55 \pm 0,28$
$Cl.AR$	$1,15 \pm 0,02$	$1,17 \pm 0,04$	$1,19 \pm 0,06$	$1,19 \pm 0,02$
$Ct.Z_t$ [Mrayl]	$7,08 \pm 0,28$	$7,15 \pm 0,18$	$6,93 \pm 0,18$	$7,24 \pm 0,09$
$Ct.Z_c$ [Mrayl]	$8,91 \pm 0,48$	$9,28 \pm 0,27$	$9,19 \pm 0,45$	$9,16 \pm 0,56$
$Ct.AR$	$1,26 \pm 0,08$	$1,3 \pm 0,03$	$1,33 \pm 0,08$	$1,27 \pm 0,09$

Bei der Auswertung der akustischen Impedanz des Kallusgewebes ($Cl.Z_c$), welche in den Querschnitten ermittelt wurde, zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Gruppe D und Kontrollgruppe A. Die erhöhten akustischen Parameter der Gruppen B und C waren gegenüber der Kontrollgruppe im Trend zu erkennen jedoch nicht signifikant.

Die kortikalen Strukturparameter unterschieden sich gruppenspezifisch nicht (Tabelle 4.6).

Die Kallusgewebefläche in den Querschnitten ($Cl.Ar$) war ähnlich in allen Gruppen, jedoch zeigte sich die Dichte des Kallusgewebes geringer in den nichtbehandelten Tibiae. Dieses Merkmal spiegelte sich in verschiedenen mit SAM hergeleiteten morphologischen Parametern, z.B. der Kallusporendichte ($N.Po_c/Cl.Ar_{tissue}$) wider, die in den behandelten Gruppen 16,4% - 23,4% niedriger waren als in der nichtbehandelten Gruppe (Tabelle 4.6).

Im Kontrast zur verminderten Porendichte des Kallusgewebes zeigte die Porosität in allen Gruppen ähnliche Werte. Somit war die reduzierte Porendichte vermutlich mit einer erhöhten Porengröße assoziiert. Diese Beziehung konnte aufgrund der begrenzten Auflösung des verwendeten Schallwandlers jedoch nicht quantitativ bestimmt werden.

Der Kallusindex, definiert als relative Querschnittsfläche innerhalb des Kallus, die mit Gewebe gefüllt ist ($Cl.Ind$), war in Gruppe A 17% geringer als in Gruppe C. Die bestimmten Strukturparameter sind in Tabelle 4.6 zusammengefasst.

Tabelle 4.6. Morphologische Parameter, die von den akustischen Darstellungen hergeleitet wurden (Mittelwert und Standardabweichung). Die tiefgestellten Indizes *t* und *c* bezeichnen Längsschnitte (transverse) und Querschnitte (cross). Die letzten zwei Reihen zeigen die ANOVA Ergebnisse mit signifikanten Unterschieden.

	Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D	Sign.	p
<i>B.Dm</i> [mm]	15,9 ± 1,31	15,4 ± 0,61	15,5 ± 0,41	14,8 ± 1,45	-	0,36
<i>Ma.Dm</i> (mm)	8,65 ± 1,80	8,46 ± 0,71	8,86 ± 0,81	7,93 ± 1,36	-	0,69
<i>Cl.Dm</i> (mm)	23,4 ± 3,9	22,8 ± 3,8	21,2 ± 2,9	22,9 ± 4,4	-	0,71
<i>Cl.Ar_c</i> (mm ²)	439 ± 150	417 ± 134	358 ± 99	424 ± 152	-	0,69
<i>Cl.Po_t</i> (%)	17, ± 2,9	20,1 ± 2,7	21,9 ± 4,7	21,6 ± 2,9	-	0,15
<i>Cl.Po_c</i> (%)	19,1 ± 2,6	22,4 ± 4,9	22,9 ± 4,8	23,2 ± 4,5	-	0,31
<i>Cl.Ind</i> (%)	68 ± 12	79 ± 5	85 ± 7	81 ± 5	A<C	0,01
<i>Ct.Po_t</i> (%)	2,32 ± 0,77	3,45 ± 0,97	3,04 ± 0,84	3,24 ± 2,26	-	0,36
<i>Ct.Po_c</i> (%)	0,77 ± 0,55	1,04 ± 0,38	1,05 ± 0,88	1,23 ± 0,83		0,72
<i>N.Ca_t/Ct.Ar_t</i> [mm ⁻²]	5,21 ± 1,03	4,71 ± 0,73	4,53 ± 0,63	3,72 ± 0,94	A>D	0,07
<i>N.Ca_c/Ct.Ar_c</i> [mm ⁻²]	3,48 ± 1,81	3,29 ± 1,14	2,65 ± 1,5	3,04 ± 0,95	-	0,74
<i>N.Po_t/Cl.Ar_{tissue}</i> [mm ⁻²]	8,62 ± 1,68	6,62 ± 1,61	6,09 ± 0,97	6,28 ± 1,41	A>B	0,016
<i>N.Po_c/Cl.Ar_{tissue}</i> [mm ⁻²]	10,9 ± 0,9	9,11 ± 1,2	8,35 ± 1,1	8,86 ± 1,02	A>B, C, D	0,003

Um die Einflüsse der verschiedenen Parameter auf die resultierende Frakturfestigkeit besser einschätzen zu können, wurde eine schrittweise lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Aufgrund der geringen Fallzahl ($n = 27$), wurde die Anzahl der einfließenden Variablen eingeschränkt. Parameterkombinationen mit bis zu zehn Einflusskriterien wurden auf die Signifikanz des standardisierten individuellen Regressionskoeffizienten β getestet. Das gefundene Modell mit einer Kombination aus morphologischen und akustischen Parametern zeigte einen Regressionskoeffizienten von $R^2 = 0,86$ (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7. Multiple Regressionsanalyse für die Vorhersage der Versagenslast. Die tiefgestellten Indizes *t* und *c* bezeichnen Längsschnitte (transverse) und Querschnitte (cross). Die multiple Regressionsanalyse der akustischen Parameter mit den biomechanischen Tests war hochsignifikant ($R^2 = 0,86$, $p = 0,00013$).

Parameter	β	Partielle Korrelation	Semipartielle Korrelation	P
<i>Cl.Ind</i>	0,44	0,67	0,33	0,005
<i>Cl.Z_t</i>	-0,51	-0,70	-0,37	0,002
<i>Cl.Z_c</i>	0,53	0,71	0,38	0,002
<i>Ct.Po_t</i>	0,54	0,70	0,36	0,003
<i>Ct.Po_c</i>	-0,39	-0,53	-0,23	0,035
<i>Ct.Z_t</i>	0,34	0,59	0,27	0,016
$\Delta(Ct.Z_t)/Ct.Z_t$	0,32	0,53	0,23	0,035
$\Delta(Ct.Z_c)/Ct.Z_c$	0,31	0,60	0,28	0,014
<i>Ma.Dm</i>	-0,34	-0,61	-0,29	0,011

Alle gemessenen Versagenslasten waren innerhalb der 95% Vorhersagegrenze und die Residuen waren normalverteilt. Das Quadrat des semipartiellen Korrelationskoeffizienten stellt ein Maß für den Einfluss der einzelnen Parameter für die Varianz dar, welche durch das Modell erklärt wird. Somit belegen die Daten in Tabelle 4.7, dass 37,5% der gemessenen Bruchkräfte (Versagenslasten) durch die morphologischen Parameter (*Cl.Ind*, *Ct.Po_t*, *Ct.Po_c*, *Ma.Dm*) aus den SAM-Untersuchungen erklärt werden. 48,5% ergeben sich aus den Abweichungen der akustischen Impedanzwerte im kallösen und kortikalen Gewebe (*Cl.Z_t*, *Cl.Z_c*, *Ct.Z_t*, $\Delta(Ct.Z_t)/Ct.Z_t$, $\Delta(Ct.Z_c)/Ct.Z_c$).

5. Diskussion

Die vorliegende Arbeit zeigt wesentliche neue Ergebnisse lokal applizierter Wachstumsfaktoren am Großtier bei der Distractionsosteogenese. Die Anwendung mittels PDLLA-Membranen erfolgte an einem Modell mit verzögerter Kallusbildung. Bei der Auswertung wurden etablierte Methoden durch die Ultraschallmikroskopie komplettiert. Diese ist in der Lage, durch die Einbeziehung elastischer Parameter, die Vorhersage bildgebender Verfahren der biomechanischen Festigkeit von Röhrenknochen zu verbessern. Im Folgenden werden der Versuch, die Untersuchungsmethoden und die Ergebnisse einzeln diskutiert.

5.1 Tiermodell und Operationstechnik

Bei der Untersuchung handelte es sich um das Studium komplexer, biologischer und biomechanischer Reaktionsabläufe, die vom intakten Gesamtorganismus abhängig sind. In-vitro-Untersuchungen konnten daher nicht zur Anwendung kommen.

Die Verwendung einer größeren Tierspezies (Schaf) war notwendig, weil die geringen anatomischen Dimensionen kleinerer Tiere die Durchführung des Versuchsvorhabens mit humanklinisch anwendbaren Fixateuren und Medikamententrägern (PDLLA-Membran) unmöglich gemacht hätten.

Die Tierklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg verfügte über Erfahrungen im Umgang mit Schafen, sowohl die Pflege- und Haltungsbedingungen als auch das perioperative Management betreffend. Darüber hinaus bestehen an der Universitätsklinik für Orthopädie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg umfangreiche klinische und experimentelle Erfahrungen auf dem Gebiet der operativen Beinverlängerung (Reichel et al. 1995, 1996).

Es wurde ein Tiermodell an der Schaftibia genutzt, das bereits in mehreren Studien sicher und reproduzierbar angewendet bzw. weiterentwickelt wurde (Reichel et al. 1998, Krüger et al. 2000). Somit war eine valide und reproduzierbare Datenermittlung gesichert.

Das Schaf weist dem Menschen vergleichbare anatomische Verhältnisse an seiner hinteren Extremität auf. Außerdem ist bekannt, dass die Osteone von Mensch und Schaf nahezu identische Größe besitzen und eine vergleichbare Knochenregenerationsrate aufweisen (Schneider 1989). Bedingt durch Größe und Gewicht der Versuchstiere sind vergleichbare operative Verhältnisse wie beim Menschen gegeben. Von Vorteil ist das Fehlen der Fibula.

Dadurch entfällt die Fibuladurchtrennung bei Verlängerungsoperationen am Unterschenkel und die Traumatisierung durch die Operation wird verringert. Aufgrund der überwiegend stehenden Funktionshaltung der Tiere weisen Schafe dem Menschen nahe kommende Belastungsformen auf, die nach Abklingen der postoperativen Schmerzphase frühzeitig wieder einsetzen (Brill et al.1993). Außerdem vereinfacht dies die hygienische Situation und beugt so Infektionen vor. Es lassen sich die gleichen Fixationssysteme wie im humanklinischen Einsatz verwenden. Distraktionsgeschwindigkeit und Rhythmus können analog zum Menschen gewählt werden.

Bei der Nutzung adoleszenter, weiblicher Merino-Wollschafe lehnten wir uns an Modelle anderer Autoren an (Steen et al 1988, Reichel 1998). Dies spiegelt die humanmedizinische Anwendung in der elektiven operativen Orthopädie wider, da operative Beinverlängerungen meist vor Erreichen der Skelettreife und nach dem präpuberalen Wachstumsschub erfolgen. In der unfallchirurgischen Behandlung von Knochendefekten spielt der Zustand der Wachstumsfugen für die Distraktionsosteogenese und den Versuchsablauf keine Rolle. In der Literatur werden sowohl Versuche zur Kallusdistraktion mit adulten Tieren (Aronson et al. 1990, Krüger et al. 2000) als auch an adoleszenten Tieren beschrieben (Steen et al 1988, Reichel 1998).

Bedeutender als das Skelettalter sind die Größenverhältnisse, die die Stabilität des Fixateurs und der Schanzschrauben limitieren. Diese waren beim vorliegenden Versuch ideal, um eine humanklinische Anwendung zu simulieren.

Der zeitliche Verlauf der knöchernen Konsolidierung entspricht weitgehend den Zeitabschnitten, die bei jugendlichen Menschen zu erwarten sind. Dies wurde auch beim zeitlichen Ablauf des Gesamtversuches sowie des postulierten Heilungsindex der distrahierten Schaftibia in Diaphysenmitte von 30 d/cm berücksichtigt. Wir lehnten uns an dem von Reichel 1998 publizierten Zeitablauf an.

Bis auf die konventionellen Röntgenkontrollen wurden alle Untersuchungen nach Versuche durchgeführt. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass Einmaltestungen am Ende eines Versuches irreführend sein können, da ein etwaiger Unterschied zwischen den Gruppen zu einem früheren Zeitpunkt bestanden haben könnte. Der Untersuchungszeitpunkt wurde nach Reichel (1998) jedoch so gewählt, dass bei normaler Kallusheilung eine Entfernung des Fixateurs möglich ist. Aus diesem Grund ist der gewählte Zeitpunkt klinisch relevant und andere sind zu vernachlässigen.

Die Anlage des für die Distraktion verwendeten monolateralen Fixateur externe mit Hilfe von 6 Schanzschrauben und die Durchführung der Osteotomie sind in der Hand eines geübten

Operateurs relativ kleine Eingriffe von geringer Zeitdauer (ca. 45 Minuten). Intraoperative Komplikationen bei groben Operationsfehlern wie Ausbrechen des Fixateurs, Nerven- und Gefäßverletzungen waren nahezu völlig ausgeschlossen. Möglich sind Weichteil- und Knocheninfektionen an den Schraubeneintrittsstellen. Bei sorgfältiger Hautpflege (schonende Rasur, Nachrasur, Verbandswechsel, Trockenhalten der Hautdurchtrittsstellen) konnten diese Schäden auf ein Minimum begrenzt werden. Lediglich bei drei Tieren kam es zu temporären Pintraktinfektionen ohne Lockerungszeichen, die unter lokal applizierter Antibiose zur Abheilung gebracht wurden.

Die Fixateurmontage war belastungsstabil. Es kam zu nur minimalen Transversal- und Axialbewegungen der Fragmentenden. Der Fixateur entsprach in seinen technisch-mechanischen Eigenschaften denen von Ringfixateuren. Dies spiegelt sich auch in den Ergebnissen anderer Autoren wider (Chao und Hein 1988, Paley et al 1990a). Das verwendete Monotube-System vereint nach Canadell und Forriol (1993) die Vorzüge dreier externer Fixateure in sich: die Verlängerungskapazität des Wagner-Apparates, die Vielseitigkeit des Orthofix und – aufgrund eines Biokompressionsmechanismus im Zentralkörper – die Möglichkeit einer axial elastischen Fragmentfixierung ähnlich dem Ilizarov-Ringfixateur. Auf den Einsatz des Biokompressionsmoduls wurde in diesem Versuch verzichtet, da das Belastungsausmaß und damit die Wirkung des Biokompressionsmechanismus im Tierversuch nicht zu kontrollieren sind.

Die in der humanmedizinischen Anwendung übliche viermalige tägliche Distraction war aus logistischen Gründen nicht möglich. Die Verlängerung erfolgte in zwei Teilschritten alle 12 Stunden, um eine vorzeitige Verknöcherung zu vermeiden. Diese Vorgehensweise geht einher mit experimentellen Untersuchungen vieler anderer Autoren (Kojimoto et al. 1988, Aronson und Chen 1994, Raschke et al. 2000, Claes et al. 2008).

Nach Erfahrungen von Reichel 1998 schonen die Tiere zunächst die operierte Extremität, treten aber nach ca. 10 Tagen unter Lastübernahme auf. Dies ist mit humanen Bedingungen zu vergleichen, so dass Muskelatrophien minimiert wurden. In unserem Versuch sahen wir gleiche Ergebnisse bezüglich der Belastung des operierten Beines.

Um Aggressionen bzw. Fluchtreaktionen zu verhindern, die zum Ausbruch des Fixateurs führen könnten, wurden die Tiere in der Herde gehalten.

Im vorliegenden Versuch wurde ein Modell zur verzögerten Kallusbildung erarbeitet. Die Verlängerung erfolgte mittlediaphysär, da eine diaphysäre Lokalisation auch bei korrekter Technik eine schlechtere Heilungsrate aufweist (Ilizarov 1989a, Aronson und Shen 1994). Die

Durchtrennung des Knochens erfolgte nicht durch Kortikotomie sondern Osteotomie ohne Kühlung mit lokaler Zerstörung der medullären Vaskularisierung. Des Weiteren führten wir eine definierte, semizirkuläre Deperiostierung von 2 x 2 mm ausgehend von der Osteotomie durch. So zeigten die Versuchstiere in der Kontrollgruppe A nach Versuchsabschluss eine deutlich verzögerte Knochenheilung und als Gruppe signifikant schlechtere Werte in den biomechanischen und bildgebenden Verfahren gegenüber den behandelten Kollektiven. Dies demonstriert, dass das Modell in der Lage ist, eine verzögerte Kallusbildung zu implementieren. Die Deperiostierung zur Implementierung einer verzögerten Knochenheilung, ohne einen kritischen Knochendefekt zu setzen, wurde von Kokubu et al. (2003) und Hietaniemi et al. (1995) an Rattenfemora beschrieben. Hierbei kam allerdings eine Thermodestruktion des Periostes zur Anwendung. Kaspar et al. (2008) beschreibt ein anderes Modell zur Implementierung von Pseudarthrosen im Kleintierversuch durch Entfernung des Knochenmarks nach durchgeführter Osteotomie. Ein Modell zu verzögerten Kallusbildung am Großtier ist in der Literatur bisher nicht veröffentlicht.

Die in unserer Versuchsdurchführung verwendeten vier Behandlungsgruppen erklären sich aus der Zielstellung der Arbeit: Die Frage, ob durch lokal applizierte Wachstumsfaktoren die Konsolidierungszeit verkürzt und die Kallusfestigkeit erhöht werden kann, wurde an einem Modell mit verzögerter Kallusbildung evaluiert und dem „Goldstandard“, der autologen Knochenplastik gegenübergestellt. Außerdem sollte geklärt werden, ob eine Kombination beider Verfahren zu einer weiteren Verbesserung des Therapieerfolges führt. Diese drei Behandlungsgruppen wurden einem Kontrollkollektiv gegenübergestellt.

Der Therapiezeitpunkt für die Modulation der Distraktionsosteogenese wurde nach Zusammenschau der Literatur in Anlehnung an andere Autoren (Hamanishi et al. 1994, Tsubota et al. 1997, Krüger et al. 2000) zum Abschluss der Distraktionsphase gewählt. Bei weiterführenden Untersuchungen ist jedoch zu klären, ob die Behandlung nicht zum Zeitpunkt der Osteotomie erfolgen kann, um bei der humanklinischen Anwendung das Risiko eines zweiten Eingriffes zu verhindern.

In-vitro- und In-vivo-Studien haben den osteoinduktiven Effekt von IGF-I und TGF- β 1 demonstriert (Mohan und Baylink 1991, Thaller et al. 1993, Trippel et al. 1996, Lind 1998). IGF-I stimuliert die Angiogenese, die Replikation von Osteoblasten und die Synthese der Knochenmatrix (Hock et al. 1998, Thaller et al. 1993). TGF- β 1 reguliert die Differenzierung und Proliferation von mesenchymalen Zellen, Chondrozyten, Osteoblasten und Osteoklasten (Pfeilschifter et al. 1990, Kveiborg et al. 2001). Die synergistischen Effekte der beiden

Wachstumsfaktoren auf die Knochenheilung wurden von mehreren Autoren beschrieben (Pfeilschifter et al. 1995, Schmidmaier et al. 2001a, Ma et al. 2001). Sie sind auf Wechselwirkungen der IGF-1- und TGF- β 1 Systeme zurückzuführen.

Gegenüber BMP's induzieren IGF-I und TGF- β 1 keine Knochenbildung außerhalb des Knochens, so dass das Risiko der ektopen Knochenbildung vermieden wird (Steinbrech et al. 2000, Schmidmaier et al. 2001a).

Die von uns ermittelten Ergebnisse bestätigen vorhergehende Studien an Kleintiermodellen, in welchen die lokale Applikation von IGF-I und TGF- β 1 die Kallusheilung beschleunigt (Schmidmaier et al. 2001a, b, 2002a, 2003, Kandziora et al. 2003, Wildemann et al. 2004a). Gerade die Kombination beider Faktoren scheint die Knochenheilung besonders zu stimulieren (Schmidmaier et al. 2006a). Die Konzentrationsverhältnisse der applizierten Wachstumsfaktoren (Beschichtung mit 100 μ g IGF-I und 20 μ g TGF- β 1) sind durch diese bisherigen experimentellen Untersuchungen validiert. Kandziora et al (2003) zeigen in einem Großtierversuch am Schaf, dass zur Knochenstimulierung die optimale Dosierung (Beschichtung der Membran) von IGF-I zwischen 75 und 150 μ g und die von TGF- β 1 zwischen 15 und 30 μ g liegt. Das Konzentrationsverhältnis soll 5:1 betragen.

Im Kontrast zu diesen Studien wurden die Wachstumsfaktoren in der vorliegenden Untersuchung von einer beschichteten PDLLA-Membran freigesetzt und nicht von beschichteten Osteosynthesematerialien. Die Nutzung biodegradierbarer Membranen hat den Vorteil, dass eine zusätzliche Operation zur Entfernung des Medikamententrägers nicht notwendig und der Applikationszeitpunkt frei wählbar ist. Durch eine definierte Freisetzungskinetik wird eine gleichmäßige Freisetzung über mindestens 42 Tage gewährleistet (Schmidmaier et al. 2001b). Es wurde weiterhin gezeigt, dass eine gute Biokompatibilität ohne negativen Effekt auf die Geweberegeneration besteht (Schmidmaier et al. 2006b). Dies und die erfolgreiche Applikation der Trägermembran erhöht das klinische Potential von Wachstumsfaktoren zur Stimulation der Kallusheilung.

Gegenüber dem Einsatz der ursprünglich geplanten Implantation der Minipumpen besitzt die PDLLA-Membran ebenfalls deutliche Vorteile als Behandlungsmethode. Diese liegen in der verbesserten Bioverfügbarkeit der applizierten Wachstumsfaktoren und der klinischen Anwendung. Eine extern zu tragende oder eine wieder zu entfernende Pumpe entfallen. Bisher wurde sich mit diesen Pumpen- oder Injektionssystemen beholfen, da kein lokal applizierbares Medium zur Verfügung stand, welches eine definierte Freisetzungskinetik aufweist (Welch et al. 1998, Li et al. 2003, Windhagen 2004). Durch die verbesserte Bioverfügbarkeit bei Nutzung

einer solchen Membran kann außerdem die Dosierung der Wachstumsfaktoren deutlich reduziert werden. Dies senkt die Kosten der Behandlung.

Nachteilig bei lokal applizierbaren Trägermaterialien sind immer der damit verbundene chirurgische Eingriff und das entstehende Infektionsrisiko. Sowohl autologe und allogene Knochentransplantation als auch synthetische Implantate und die Applikation von Wachstumsfaktoren erfordern es, die Fraktur- bzw. Distraktionszone operativ darzustellen. Außerdem erfolgt die unmittelbare Verstoffwechslung der Proteine mit unsicheren lokalen Konzentrationsverhältnissen (Raschke et al 2000).

So stellt sich die Frage nach Nebenwirkungen durch die lokale Freisetzung der Wachstumsfaktoren. Wildemann et al. (2004b) konnten zeigen, dass keine ektope Knochenbildung in der Muskulatur von Schafen durch die lokale Freisetzung von IGF-I und TGF- β 1 auftrat. Aufgrund der Freisetzungskinetik wird während der ersten 48 Stunden 50% und in den nachfolgenden 40 Tagen weitere 30% aus der PDLLA-Beschichtung freigesetzt (Schmidmaier et al.2001b). Diese Dosierung scheint zu gering, um ektope Ossifikationen hervorzurufen aber ausreichend zur beschleunigten Mineralisierung des Knochens.

Ein weiterer Diskussionspunkt ist, ob eine Therapie mit Wachstumsfaktoren zum Auftreten von Malignomen oder Leukämie führt. Beim Menschen wird ein erhöhter Blutspiegel an IGF-I mit der Entstehung von Brustkrebs bei prämenopausalen Frauen, Prostata- und Lungenkrebs sowie der Entstehung von kolorektalen Tumoren in Verbindung gebracht (Giovannucci 1999, Grimberg et al. 2000, Khandwala et al. 2000, Wu et al. 2000). Auch dies demonstriert die Wichtigkeit der lokalen Applikation, um die bei systemischer Gabe entstehenden hohen Serumkonzentrationen zu vermeiden.

Der Versuchsablauf und die Verlängerung waren bis auf einen Fixateurbruch in allen Fällen komplikationslos. Der Bruch ist auf eine Materialermüdung durch das mehrmalige Verwenden des Fixateurs zurückzuführen, was in der humanklinischen Anwendung ausgeschlossen ist. Ansonsten wurde die durchschnittliche Verlängerung von 12,6% von allen Tieren gut toleriert, was sich auch in anderen Studien zeigt (Yasui et al. 1993, Aronson 1994, Reichel 1998, Krüger et al. 2000).

Insgesamt ist das Tiermodell für die Fragestellung der Arbeit in vollem Umfang geeignet. Am Schaf lässt sich zuverlässig eine Kallusdistraktion durchführen. Die Distraktionsosteogenese selbst stellt ein gut reproduzierbares Modell der Knochenheilung dar, da eine standardisierte Osteotomie Verwendung findet und die Distraktion gleich große "Knochendefekte" hinterlässt. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass es sich bei der Distraktionsosteogenese um

eine intramembranöse Frakturheilung handelt, bei welcher im Gegensatz zur sekundären Frakturheilung die enchondrale Ossifikation eine untergeordnete Rolle spielt (Aronson et al. 1990).

Zusammen mit den bestehenden In-vitro-Simulationen der Frakturheilung und Gewebeadaptation des Knochens in der Literatur (Ament 1997, Ament et al. 2000) können durch die tierexperimentellen Daten (Knochendichtemessungen, Ultraschallmikroskopie, Biegetests) direkte Aussagen zur In-vivo-Situation nach Defektheilung gemacht werden. Dies lässt eine patientenspezifische Prognose bei der Behandlung ausgedehnter Knochendefekte möglich erscheinen.

Die lokale Applikation von IGF-I und TGF- β 1 mittels PDLLA-Membran als Trägersubstanz stellt nach Ansicht des Autors zumindest bei der Distraktionsosteogenese eine lohnende Therapieoption dar, welcher weiter klinisch und experimentell nachgegangen werden sollte.

5.2 Untersuchungsmethoden

5.2.1 Radiologische Untersuchungen

Die radiologischen Kontrollen dienten der grobmorphologischen Beschreibung im Versuchsverlauf. Mit den postoperativ durchgeführten Röntgenbildern ließ sich das Operationsergebnis kontrollieren. Alle durchgeführten Eingriffe zeigten ein korrektes Ergebnis. Dies stellte sicher, dass die Voraussetzungen für die Distraktionsosteogenese bei sämtlichen Tieren gleich war. Weitere Röntgenkontrollen wurden nach Ende der Distraktionsphase sowie Ende der Konsolidierungsphase angefertigt. Die nach Abschluss der Verlängerung angefertigten Aufnahmen dienten der Erkennung von Achsabweichungen, Pinlockerungen und Ossifikationsstörungen. Die Untersuchungsform lässt eine ausreichende qualitative Beurteilung von Kallusform und Mineralisationsabschnitten zu (Yasui et al. 1993, Ohyama et al. 1994).

Ossifikationsverzögerungen zeigten sich bei allen Tieren vor allem im Bereich des Periostdefektes (anterior), was das Versuchsmodell der Implementierung einer verzögerten Kallusbildung durch Deperiostierung bestätigte. Ein engmaschigeres Monitoring der Kallusbildung war nicht Ziel der Röntgenkontrollen, da eine semiquantitative Beurteilung der ossären Konsolidierung auch durch qualifizierte Untersucher nicht reproduzierbar ist. Eine verwertbare Aussage über die mechanische Belastbarkeit eines Röhrenknochens ist damit nicht möglich. So fanden Nicholls et al. (1979) und Panjabi et al. (1985) große Unterschiede

zwischen der radiologischen Bewertung der Frakturheilung und den durchgeführten biomechanischen Untersuchungen an der Kaninchentibia.

Die korrekte Lage der Fragmentenden und des Fixateur externe konnte während der Verbandswechsel makroskopisch anhand von Parallelität und Distanz der drei proximalen und drei distalen Schanzschrauben überprüft werden. Da bis auf einen Fixateurbruch keine Veränderungen auftraten, war auch im Einzelfall keine außerplanmäßige Röntgenkontrolle notwendig.

5.2.2 QCT-Untersuchungen

Der Bildkontrast mit radiographischen Methoden wird durch die Schwächung der Röntgenstrahlen bestimmt und dem zugrunde liegenden physikalischen Prinzip, dass diese mit der vierten Potenz der Kernladungszahl ansteigt, wodurch Weichgewebe sehr gut von Hartgewebe unterschieden werden kann. Im Gegensatz zu den planaren absorptiometrischen Verfahren (SPA, DPA, DEXA) ermöglicht das QCT die dreidimensionale Bestimmung des Mineralsalzgehaltes. Dies ist vorteilhaft, da die räumliche Darstellung mittels zweidimensionaler Messungen immer einen systematischen Fehler beinhaltet (Schneider und Börner 1990).

Ein weiterer Vorteil der Computertomografie ist, dass im CT-Bild Flächenbereiche definierter Lokalisation, Form und Größe (Regions Of Interest – ROI) abgrenzbar sind. Es können Mittelwerte und Standardabweichungen der Dichtewerte aller Bildelemente der ROI's berechnet werden (Reinbold 1987, Reichel 1998).

Ziel war es, durch standardisierte Vermessung des Kallusgewebes Aussagen über die biomechanische Festigkeit des Knochens zu treffen. Das genutzte Ein-Energie QCT (single energy quantitative computed tomography = SEQCT) unterscheidet einerseits Knochenmineralanteile und andererseits nicht mineralisierte Strukturen (einschließlich Knochenmark- und Fettanteile). Hohe Röhrenspannungen können zu sog. „Fettfehlern“ führen, da der Schwächungsunterschied zwischen Mineralsalz und Fett gering ist (Mazess 1983, Burgess et al. 1987). Deshalb werden, wie auch in der vorliegenden Arbeit verwendet (120 kV), niedrige Röhrenspannungen von 100-140 kV empfohlen (Hvid et al 1989).

Wir entschieden uns für das SEQCT, da sie exakte, dreidimensionale Werte der Knochenmineraldichte liefert. Die Präzision des SEQCT beträgt 2-4%. Die Zwei-Energie QCT (dual energy quantitative computed tomography = DEQCT) ist aufgrund der geringeren

Präzision (3-5%) sowie dem größeren apparativen Aufwand klinisch weniger bedeutsam (Prevhral und Genant 1999).

Ein Nachteil der angewendeten Ein Energie QCT ist die hohe Strahlenbelastung. So liegt die Ganzkörperäquivalentdosis von CT-Geräten bei ca. 30 μ SV (Kalender 1991).

Die Assoziation von Mineralgehalt und biomechanischen Eigenschaften wird in der klinischen Routine seit Jahren zur Einschätzung des osteoporotischen Knochens genutzt. Da sich die quantitative Computertomographie hier bereits als Standard etabliert hat, wurde diese Methode auch von vielen Untersuchern in experimentellen Studien zur Beurteilung des Mineralisierungsgrades von Kallusgewebe eingesetzt. Es lassen sich so Rückschlüsse auf die biomechanische Festigkeit und den Zustand der Knochenheilung ziehen (Hayes et al. 1991, Bail 2004).

In bisher publizierten Studien zur quantitativen CT-Auswertung des Kallus wurden verschiedene Messmethoden am tierexperimentellen Modell sowohl bei der Distractionsosteogenese als auch bei der Frakturheilung verwendet. Hierbei wurden Korrelationen mit der biomechanischen Belastbarkeit von $R^2=0,6-0,82$ ermittelt, wobei homogenerer Knochen bessere Korrelationswerte aufweist (Markel et al. 1990, 1991, Markel und Chao 1993, Augat et al. 1997, Reichel et al 1998, Lill et al. 2003). Reichel et al. (1998) gaben an, dass aufgrund ihrer klinischen Auswertungen von Distractionen an der Schafttibia der Abbau des Fixateur externe bei einer Mineraldichte im Regenerat von 60% der gesunden Gegenseite erfolgen kann. Dieser Wert wird von einer weiteren Studie bestätigt (Aronson et al 1990). Insgesamt stimmen die Autoren überein, dass das nichtinvasive und quantitative Verfahren für das Monitoring der Distractionsosteogenese geeignet ist.

In unserem Versuch war die Positionierung der Präparate sowie der Schnittebenen mit den festgelegten ROI's anhand der sagittalen Topogramme sicher möglich. Die Ebenen der auszuwertenden Transversalschnitte wurden wie in Kapitel 3.2.3 beschrieben festgelegt. Die fünf ROI's in jedem Transversalschnittbild konnten mit Hilfe eines rechtwinkligen Fadenkreuzes positioniert werden. Der Durchmesser war für alle Regions Of Interest und der Abstand vom Mittelpunkt für die jeweils vier kortikalen ROI's identisch. Die spongiöse ROI befand sich exakt im Fadenkreuz. Da alle Tibiae mit der Medialseite deckenwärts auf dem Untersuchungstisch ausgerichtet worden waren, wird trotz dieser manuellen Methode der Positionierung der ROI's eine relativ hohe Reproduzierbarkeit der Messregionen erreicht, die eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet (Reichel 1998). Ein weiterführender

Vergleich mit der Kontrollseite war nicht sinnvoll, da kortikale und spongiöse Knochendichte bei allen Kontrolltibiae gleiche Werte aufwiesen.

Strittig ist, ob bei der Applikation der QCT ein Abbau des Fixateur externe erfolgen muss. Während einige Autoren versuchen, dieses Problem durch den Einsatz strahlendurchlässiger Kunststofffixateure zu umgehen (Van Roermund 1991), geben andere an, trotz Artefaktbildung im Messfeld zuverlässige Messungen zu erhalten (Aronson 1990, Salmas et al. 1998, Reichel et al. 1998, Krüger et al. 2000). Dies geht einher mit unserer Untersuchung, in der sich produzierbare Ergebnisse ermitteln ließen.

Die quantitative Computertomographie bestätigt im vorliegenden wie auch in vorherigen Versuchen, dass sie die Möglichkeit einer qualitativen und quantitativen Analyse des Regenerates ermöglicht (Braunstein et al. 1986, Orbay et al 1992, Tjernstrom et al 1992). Nachteilig an dem Verfahren der QCT ist die zusätzliche Strahlenbelastung (100-300 mrem) der Patienten (Markel und Chao 1993). Trotzdem kann die QCT eine Verbesserung der diagnostischen Sicherheit und damit die Reduzierung möglicher Komplikationen erzielen. So stellt die Untersuchungsmethode einen deutlichen Nutzen für die Patienten dar. Bei unklarer Klinik und uneindeutigen Befunden in der konventionellen Röntgendiagnostik ist sie in der Lage, Hinweise auf ungenügend kalzifizierte Areale im Kallusregenerat zu geben und kann somit eine Achsabweichung oder Fraktur des Knochens nach Fixateurentfernung verhindern (Bail 2004).

5.2.3 Biomechanische Untersuchungen

Für die mechanische Testung von Materialien gibt es akzeptierte Normen (z.B. DIN, ISO). Diese normierten Tests setzen eindeutig definierte Probengeometrien und eine homogene Materialzusammensetzung voraus. Bei der Materialprüfung des Knochens müssen aufgrund seiner Amorphität weitreichende Kompromisse akzeptiert werden. Da Knochen ein heterogenes, anisotropes Material ist, hängen experimentelle Ergebnisse von vielen Faktoren wie der geometrischen Form, der Fixierung und Positionierung in der Testmaschine und der Krafrichtung bei der mechanischen Testung ab. So können bei anisotropen Strukturen die mechanischen Eigenschaften je nach Belastungsrichtung stark variieren.

Versuchsbedingte Parameter wie Größe des Prüfstückes, Vorbehandlung, Temperatur, Feuchtigkeitsgrad und technische Größen wie Frequenz und Dauer der Belastung haben

ebenso Einfluss auf die Resultate wie biologische Variablen, Alter, Geschlecht etc. (Bouxsein 1996).

Laut Borchers et al. (1995) sind keine wesentlichen Einflüsse durch mehrfaches Gefrieren und Auftauen der Knochenproben, wie es in der vorliegenden Studie erfolgte, im Bezug auf die Eigenschaften bei der mechanischen Testung zu erwarten. So konnten Linde und Sorenson (1993) zeigen, dass mehrfache Kryokonservierung mit nachfolgend langsamem Auftauen keine Änderung in biomechanischen Tests von Hundefemora bewirkte. Pelker et al. (1994) konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen frischen und tiefgefrorenen Femora im Kleinterversuch an Ratten bei Torsionsbruchtests feststellen. Durch die sofortige Kryokonservierung unserer Präparate nach Versuchsabschluss und nur kurzzeitiges Auftauen zur Durchführung der QCT wurden die biomechanischen Eigenschaften weitgehend erhalten.

Die mechanischen Eigenschaften langer Röhrenknochen werden mit Biege-, Torsions- Zug- und Kompressionstests bestimmt, wobei Biege- und Torsionsversuche am Häufigsten zur Anwendung kommen (Christofolini et al. 1996, Bramer et al. 1998). Hierbei ergibt die Ex-vivo-Testung intakter Röhrenknochen klinisch relevantere Ergebnisse als biomechanische Untersuchungen von Knochenanteilen wie z.B. Knochenzylindern (Hayes und Carter 1979).

Der Vorteil von Torsionsbruchtest ist die geringere Abhängigkeit der Ergebnisse von der Geometrie des Präparates. Nachteilig ist jedoch die Notwendigkeit der rigiden Einspannung der Knochenenden im Versuchsaufbau. Dies führt zur unregelmäßigen Kraftverteilung, wobei die geringsten Werte in der Probenmitte und Spitzenwerte in der Nähe der Fixation ermittelt werden (Bramer et al. 1998). Deshalb führten wir den Biegeversuch in unserer Versuchsanordnung (DIN 53457) nur mit unterstützenden Auflagern ohne Fixierung des Präparates durch.

Vorteil der Drei- Punkt- Biegung liegt in der Einfachheit, der Nachteil in hohen Scherkräften unter dem belasteten Pol. Der 3-Punkt-Biegeversuch begünstigt bei zentraler Auflage den Anriss im geometrischen Biegescheitel. Bei dem von uns durchgeführten 4-Punkt-Biegeversuch sind die Biegemomente gleichmäßiger verteilt. Der Anriss bildet sich während der Krafteinwirkung im Prüfkörper daher nicht zwingend im geometrischen Biegescheitel. Aus diesem Grund wird er häufig zur Bestimmung der mechanischen Eigenschaften von Knochenproben angewendet (Burstein und Frankel 1971, Krüger et al. 2000, Draper und Goodship 2003, Pehlivan et al. 2005, Zhou et al. 2008).

Für einen Biegetest sollen bestimmte Kriterien beachtet werden. Dazu gehört das Spannweiten-Knochendicken-Verhältnis. Die Spannweite einer Knochenprobe soll das

Mehrfache der Knochendicke betragen. Turner und Burr (1993) fordern eine Mindestlänge von 20 mm. Aufgrund des Längen/Dickenverhältnis der untersuchten Knochenpräparate war im vorliegenden Versuch der größtmögliche Abstand der unteren Auflager 150 mm. Die Biegefinnen hatten einen Abstand von 50 mm. Mit dieser gewählten Auflagerdistanz waren der Distraktionsabschnitt komplett sowie der gesamte Knochen der verlängerten als auch der Kontrolltibia eingeschlossen (s. Abb. 3.19, Kapitel 3.2.4). Hierbei lehnten wir uns an die von Krüger et al. (2000) durchgeführten experimentellen Untersuchungen an Schaftibiae an.

Eine weitere Forderung für die Durchführung von Biegetests ist die Prüfung linear elastischer, isotroper, homogener und gerader Proben, wobei keine dieser Anforderungen auf den Knochen zutrifft. Da jedoch alle von uns getesteten Proben ähnliche Abweichungen vom Ideal der Geometrie und der Materialeigenschaften aufwiesen und eine reproduzierbare dorsale Lagerung auf den unteren Auflagern erfolgte, erscheint ein Quervergleich zwischen verschiedenen Gruppen zulässig. So wurden bei allen Präparaten die Biegetests in antero-posteriorer Richtung vorgenommen und somit die Richtung der Krafteinleitung standardisiert festgelegt. Der Biegekraftvektor im Stand wird so am Besten simuliert (Cristofolini et al. 1996). Bramer et al. (1998) beschreiben, dass die von runden Probekörpern abweichende Form von Röhrenknochen unter Vernachlässigung des Kraftvektors einen nur kleinen Fehler einschließt. Dies wird von den experimentellen Untersuchungen von Cristofolini et al. (1996) bestätigt, die bei non-destruktiven Biegetests an humanen Femora gleiche Biegesteifigkeitswerte für verschiedene Kraftrichtungen ermittelten. Trotzdem ist Knochen ein anisotropes Material, dessen mechanische Eigenschaften bei veränderter Lage variieren können (Hanson et al. 1995).

Für die vergleichenden Untersuchungen mit der Kontrollseite (Ermittlung der prozentualen Versagenslast) müssen gleiche Voraussetzungen geschaffen werden. Aus diesem Grund wurden entsprechende Bohrungen der Kontrolltibia entsprechend den transkortikalen Pinverankerungen der distrahierten Tibiae vorgenommen.

Aufgrund der durch den Versuch entstandenen Amorphität und biomechanischen Inhomogenität des untersuchten Knochenmaterials war eine aussagekräftige Ermittlung des Elastizitätsmoduls nicht möglich.

5.2.4 Histologische Untersuchungen

Eine optimale Erhaltung der Zellen und Weichgewebe wird nur durch geeignete Einbettmethoden erzielt. Eine geeignete Methode ist die Dünnschliffmethode, die bei in Kunststoff eingebetteten Proben eine den Mikrotomschnitten vergleichbare Zell- und sogar verbesserte Strukturhaltung gewährleistet.

Bei der unentkalkten Dünnschnitt- bzw. Dünnschliffherstellung bleibt der Mineralgehalt des Knochens erhalten. Dies ermöglicht die exakte Beurteilung des Funktionszustandes von Knochengeweben.

Das weitestverbreitete Einbettmedium bei der Dünnschlifftechnik besteht in einer Kombination von Methylmethacrylat mit Weichmachern (Lang 2006, Romeis 1989). So können große Knochenpräparate gleichmäßig durchtränkt werden. Nach Aushärtung des Kunststoffes können Knochenschliffe mittels der Trenn-Dünnschlifftechnik nach Donath (1988) gewonnen werden. Eine sorgfältige Entfettung und Entwässerung der Proben ist dabei zwingend notwendig. Die Schliffe sind nachfolgend für Oberflächenfärbungen, für eine Darstellung von Fluorochrommarkierungen und die Anfertigung von Mikroradiografien geeignet. Infolge der hohen Polymerisationswärme sind immunhistochemische Markierungen an unentkalkten Sägeschnitten nach PMMA Einbettung nicht mehr möglich.

Wir nutzten für die Aufarbeitung der Proben eine Methode nach Reichel (1998). Dazu wurden die Proben in Methylmethacrylat mit Dibutylphthalat als Weichmacher (Schenk 1965) eingebettet. Anschließend fertigten wir von jeder Probe je einen Längsschnitt und – nach Rekonstruktion des Diaphysensegmentes – je vier Querschnitte an. Mit Hilfe dieser Methode war es möglich, an identischen Knochenregionen einen Vergleich zwischen histologischen Daten, QCT-Daten, Ultraschalldaten und mikroradiografischen Daten vorzunehmen. Zusätzlich ermöglicht die Orientierung an diesem Modell auch einen Vergleich der Ergebnisse von verschiedenen Behandlungsmethoden bei der Kallusdistraktion.

Die Färbung der Dünnschliffe erfolgte zum einen mit Toluidinblau und zum anderen mittels einer Giemsa Färbung (Lang 2006, Romeis 1989). Die Toluidinblaufärbung zeichnet sich dabei durch Einfachheit und gute Standardisierung aus. Sie bietet gute Differenzierungsmöglichkeiten der verschiedenen Gewebe durch metachromatische Farbeffekte und stellt eine gute Übersichtsfärbung für Knochenpräparate dar. Die Färbung nach Giemsa liefert gute Farbkontraste zwischen Zellen und Interzellulärsubstanz der Weich- und Hartgewebe und lässt zusätzlich, genau wie die Toluidinblaufärbung, Veränderungen der mineralisierten Hartgewebe erkennen.

Tetracycline, die als Antibiotika Verwendung finden, waren die ersten Fluorochrome für die Hartgewebemarkierung (Milch et al. 1958). Zeitliche Umbauwirkungen des Knochens konnten aufgrund der in vivo durchgeführten Fluorochrommarkierung mit Tetracyclin nachvollzogen werden. Aktiv mineralisierter Knochen baut bereits nach wenigen Minuten der Verabreichung Tetracycline ein und erreicht den Höhepunkt der Einlagerung nach 2 Tagen. Im Dünnschliff zeigen sich gelb fluoreszierende Banden unter UV-Anregung. Entsprechend dem Auftreten bzw. dem Verlust der Banden können Aussagen zum Remodelling des Knochens getroffen werden. Rahn (1989) hat die für eine polychrome Sequenzmarkierung des Knochens geeigneten Farbstoffe auf ihre Toxizität hin getestet. Die von uns applizierten Dosen für das Tetracyclin betragen 10-16,7% der LD₅₀ i. v. Aus der Literatur ist bekannt, dass erst Dosen ab 60 mg/kg Körpergewicht nachweislich einen Einfluss auf die Knochenbildung haben (Harris et al. 1968). Die von uns applizierten Dosen lagen weit darunter.

Aus der Flächendichte eines zweidimensionalen Bildes lassen sich Aussagen zur Volumendichte eines dreidimensionalen Bildes machen (Olah 1974). Vollautomatische Bildanalysensysteme (Baak 1984, Oberholzer et al. 1987, Thompson et al. 1985) ermöglichen die Beantwortung morphometrischer Fragestellungen. Die angefertigten Mikroradiografien dienen der Bestimmung der absoluten und relativen Knochenfläche. Die ermittelte relative Knochenfläche entspricht dabei dem Quotienten BV/TV (bone volume/tissue volume) der histomorphometrischen Nomenklatur von Parfitt et al. (1987). Mikroradiografien nach Kallusdistraction zur Bestimmung von Knochenflächen wurden ebenfalls von White und Kenwright (1990), von Aronson (1990) und Reichel (1998) verwendet.

5.2.5 Ultraschallmikroskopische Untersuchungen

Vorangegangene Studien bestimmten die Knochenmineraldichte (Bone Mineral Density *BMD*) als Vorhersageparameter für die Knochenstabilität. Jedoch zeigen diese Untersuchungen moderate Korrelationskoeffizienten zwischen biomechanischen Tests und bildgebenden radiologischen Verfahren, z.B.: DEXA: $R^2 = 0.60$ (Reichel et al. 1998); QCT: $R^2 = 0.60$ (Markel and Chao 1993); pQCT: $R^2 = 0.70$ (Augat et al. 1997). Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Knochenmineraldichte nicht die einzige Determinante für die biomechanische Festigkeit darstellt. Außerdem messen diese Techniken aufgrund der begrenzten Auflösung eine Kombination aus Knochenstruktur (z.B. Porosität) und Gewebemineralisation.

Die mechanische Stabilität des distrahierten Knochens wird nicht nur durch die Struktur von Kallus und angrenzendem kortikalem Knochen, sondern auch von deren jeweiligen elastischen Materialeigenschaften und dem Durchmesser im distrahierten Bereich bestimmt. So leitet z.B. ein weicher kortikaler Knochen bereits einen großen Teil der aufgetragenen mechanischen Spannung ab. Um eine durchmesserunabhängige, spezifische Prädiktion der Frakturresistenz des Kallus/Knochen-Konstrukts zu ermöglichen, müssen demnach sowohl Struktur- als auch Elastizitätsparameter ermittelt werden. Es gibt eine Vielzahl von Modellen, die versuchen, elastische Eigenschaften anhand von BMD-Messungen zu beschreiben, die in Ihrer Validität jedoch alle limitiert sind (Carter und Hayes 1977, Lotz et al. 1990, 1991, Snyder und Schneider 1991, Keller 1994, Wirtz et al. 2000, Morgan et al. 2003).

Die mit hochfrequentem SAM gemessene akustische Impedanz Z kann zweidimensional bis zu einer räumlichen Auflösung von $1\ \mu\text{m}$ beurteilt werden und direkt Elastizitätsparameter erfassen (Raum et al. 2003, Hofmann et al. 2005). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die akustische Impedanz sensitiv auf die elastische Anisotropie des Knochens reagiert (Hofmann et al. 2004, Raum et al. 2004) und mit dem elastischen Koeffizienten hoch korreliert ($R^2 = 0.99$) (Raum et al. 2006a). Knochengewebe ist elastisch anisotrop, das heißt das Material wird durch einen elastischen Tensor beschrieben, der aus mindestens 5 unabhängigen elastischen Konstanten besteht. In einer aktuellen Untersuchung wurde gezeigt, dass die elastischen Koeffizienten direkt von winkelabhängigen akustischen Messungen zylindrischer kortikaler Knochenpräparate hergeleitet werden können (Lakshmanan et al. 2006).

Folglich können die Impedanzdarstellung der Quer- und Längsschnitte die Verteilung der elastischen Koeffizienten direkt messen. Außerdem zeigte Raum et al. (2006b), dass die Korrelation zwischen akustischer Impedanz und Mineralisationsgrad des Gewebes gering ist ($R^2 = 0.39$).

Während der Knochenheilung durchläuft der Kallus verschiedene konsekutive Phasen der Knochenbildung, der Resorption und des Remodellings (s. Kapitel 1.2.3). In der letzten Phase des Remodellings adaptiert das kortikale Knochengewebe mit einer charakteristischen elastischen Anisotropie an seine mechanische Funktion. So können die akustische Impedanz und teilweise auch das Anisotropieverhältnis Hinweise auf die funktionelle Eigenschaften des neu formierten Knochens geben.

Für die Einschätzung der Knochenqualität werden üblicherweise röntgenologische Techniken genutzt. Abgesehen von den ermittelten radiologischen Parametern zeigt auch der daraus hergeleitete Mineralgehalt nur moderate Korrelationen mit den elastischen und

biomechanischen Eigenschaften des Knochens. Im Gegensatz dazu kann die Elastizität des Knochens mit ultraschallbasierten Techniken bestimmt werden. Niederfrequente Ultraschallwellen, z.B. die axiale Transmission sind geeignet, die strukturelle Elastizität von Knochen zu untersuchen (Bossy et al. 2004, Raum et al. 2005). Dem gegenüber ist hochfrequenter Ultraschall in der Lage, die Materialelastizität direkt auf mesoskopischer (Gewebe-) Ebene zu bestimmen. Die experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Wirkung von strukturellen und elastischen Eigenschaften der mikroskopischen (lamellären) Ebene auf die biomechanische Festigkeit mit Hilfe von hochfrequenten SAM-Messungen bestimmt werden kann. Obwohl eine In-vivo-Anwendung dieser Technik nicht möglich ist, liefert sie einmalige Informationen über die elastischen Eigenschaften von Knochen in Tierstudien, bei denen das Knochengewebe isoliert werden kann. Abgesehen von der Heterogenität der Gewebeeigenschaften verdeutlicht vor allem die elastische Anisotropie die Wichtigkeit von „real life“-Daten für zahlreiche Simulationen, z.B. Finite-Elemente Analysen oder Simulationen zur Ausbreitung von niederfrequentem Ultraschall.

Für diese Modelle werden normalerweise CT-Werte und vereinfachte Beziehungen zwischen Knochendichte und elastischen Parametern genutzt, um elastische Eigenschaften zu implementieren (Shefelbine et al. 2005). Neuere Studien haben demonstriert (Raum et al. 2006a, 2006b), dass die Elastizität von Knochen stärker mit der akustischen Impedanz korreliert ($R^2 = 0,996$) als mit der Knochendichte ($R^2 = 0,310$). SAM ist aus diesen Gründen ideal geeignet, da frakturrelevante Struktur- und anisotrope Elastizitätsparameter direkt aus den Impedanzbildern extrahiert werden können.

Es ist davon auszugehen, dass Modelle, die auf zweidimensionalen akustischen Impedanzwerten basieren, eine realistische Simulation erzielen und deshalb in einer besseren Konvergenz mit experimentellen Ergebnissen resultieren.

Letztlich könnte Hochfrequenz SAM eine ergänzende Methode bei der Entwicklung und Evaluierung nichtinvasiver niederfrequenter axialer Transmissionstechniken sein, um die Knochenheilung in vivo zu überwachen.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Röntgenuntersuchungen und Quantitative Computertomographie

Die Ergebnisse der Röntgenkontrolluntersuchungen zeigen in allen Fällen, dass es während der Distractionsphase zwischen den Knochenenden zu einer periostalen Kallusbildung

kommt. Nach Abschluss der Distraction bildet sich ein röntgenologisch erfassbarer sogenannter „external callus type“, eine tonnenförmige Kallusform (Hamanishi et al. 1992). Im Bereich des Periostdefektes war der normalerweise den Kortikalisdurchmesser überragende Kallus nicht ausgeprägt. Gegenüber der bei Reichel (1998) beschriebenen normalen Kallusheilung an der Schafttibia zeigte sich in den vorliegenden Untersuchungen eine deutliche Hemmung der Knochenbildung. Der normalerweise stattfindende Übergang des „external callus type“ in einen „straight callus“, wobei die Kallusstrecke im Röntgenbild und QCT während der Konsolidierungsphase eine gerade Form annimmt, wurde im vorliegenden Versuch nur in einzelnen Fällen in Gruppe B und D erreicht. Es kommt vor allem in der Kontrollgruppe A nicht zu einer kortikalen Dichtezunahme im Sinne eines röntgenologisch erfassbaren funktionellen Umbaus (Remodelling). Hier zeigen sich deutliche Mineralisationsstörungen. Die normalerweise ablaufende Abnahme der Röntgendichte im Markraum findet nicht statt.

In den behandelten Gruppen ist dieses Remodelling unterschiedlich ausgeprägt und deutlich verbessert gegenüber dem unbehandelten Kollektiv. Es scheinen Vorteile bei der alleinigen Behandlung mit Wachstumsfaktoren bzw. der Kombination von Wachstumsfaktoren mit autologer Spongiosaplastik zu liegen, wobei eine quantitative Auswertung der Unterschiede nicht möglich war. Dies widerspiegelt die Grenzen der röntgenologischen Bewertung (Paley 1990b, Giebel 1993) bei der Auswertung experimenteller Ergebnisse. Trotzdem stellt die konventionelle Röntgendiagnostik in der Verlaufskontrolle der Knochenheilung weiterhin die wichtigste nichtinvasive Untersuchungsform dar (Pfeil et al. 1996). Ob durch alternative Methoden wie der Ultraschalldiagnostik die Frequenz der Röntgenaufnahmen und damit die Strahlenbelastung vermindert werden kann, bleibt abzuwarten (Correll 1988, Eyres et al. 1993).

Die QCT zeigte in Analogie zur Histomorphometrie im Regenerat eine signifikant erhöhte Mineraleichte in den behandelten Gruppen im Vergleich zum Kontrollkollektiv ($p < 0,001$). Die wenig differenzierte Kallusbildung in der nichtbehandelten Gruppe entspricht dem Tierversuchsmodell einer verzögerten Kallusbildung. So sind in dieser Gruppe kaum Unterschiede zwischen peripherem und zentralem Kallus zu sehen, die einem normalen Knochenremodelling nach Abschluss der Konsolidierungsphase entsprechen. Im Gegensatz zur konventionellen Röntgendiagnostik ließen sich die behandelten Gruppen quantitativ bezüglich der Mineraleichte unterscheiden. Die Gruppen B (Wachstumsfaktoren) und D (Wachstumsfaktoren und Spongiosaplastik) glichen sich deskriptiv der bei Hamanishi et al.

(1992) und Reichel 1998 beschriebenen normalen Kallusbildung am meisten an. Durch Dichtezunahme im kortikalen Bereich und Resorption des Kallus in der Markhöhle entsteht schließlich wieder die für diaphysäre Regionen typische röhrenförmige Konfiguration. Quantitativ zeigte sich dies in den im Vergleich auch zur Gruppe C (Spongiosaplastik) höheren Werten für die kortikale Knochendichte. Diese beschleunigte Kalluskonsolidierung durch Applikation von IGF-I und TGF- β 1 wird auch durch Schmidmaier et al. (2006a) beschrieben. Der Vergleich der einzelnen ROI's im kortikalen Bereich (anterior, posterior, medial, lateral) ergab keine signifikanten Unterschiede. Hier wäre zu erwarten gewesen, dass zumindest in der unbehandelten Gruppe die Knochendichte im Zentrum des Periostdefektes (anterior) geringer ist, als in der dem Periostdefekt gegenüberliegenden kortikalen Region (posterior). Dies zeigt die, auch bei Lill et al. (2003) beschriebene Limitierung der Methode bei amorphen inhomogenen Knochenqualitäten. Auch sind die 4 Messregionen im kortikalen Bereich punktuelle Bestimmungen der jeweiligen Knochendichte und damit ein Kompromiss. Gleiches gilt für die spongiöse ROI im Zentrum des Kallus. Da nach Burstein und Wright (1997) die Biegefestigkeit eines Probekörpers von dessen Querschnittsfläche und Materialeigenschaften charakterisiert wird gibt es Modelle der mehr flächigen Bestimmung der Knochendichte. Diese ergaben jedoch auch keine besseren Regressionskoeffizienten für die biomechanische Stabilität (Krüger et al. 2000).

Um bessere biomechanisch verwertbare Kenngrößen zu ermitteln, wurden die CT-Daten in Elastizitätsmodulwerte umgerechnet. Mit diesen ließ sich eine signifikante Regression zur biomechanischen Versagenslast von $R^2=0,632$ ($p=0,008$) ermitteln, die im Vergleich zur ultraschallmikroskopischen Untersuchung ($R^2=0,86$) deutlich geringer war. Nach Hüsler und Zimmermann (2000) stellen jedoch Werte von $R^2>0,5$ einen „starken“ Zusammenhang dar.

Neben den bei beiden Methoden auftretenden Messunsicherheiten und Artefakten bei der örtlichen Überlagerung der Messwerte ist zu vermuten, dass ein beträchtlicher Anteil der nicht durch das Regressionsmodell erklärten Varianz durch die für die Ableitung des Elastizitätsmoduls gemachten Annahmen hervorgerufen wurde.

Trotzdem weisen die Ergebnisse einen klinisch relevanten Zusammenhang zwischen dem Mineralisierungsgrad des Gewebes im Distractionsspalt und den biomechanischen Eigenschaften des Knochens nach.

Die vorliegenden radiologischen Ergebnisse zeigen, dass die lokale Applikation von IGF-I und TGF- β 1 eine Option zur Verbesserung der Frakturheilung darstellt.

5.3.2 Biomechanische Untersuchungen

Die Ergebnisse der biomechanischen Untersuchungen zeigen, dass die lokale Applikation von IGF-I und TGF- β 1 bei der Distractionsosteogenese am Schaf die Bruchfestigkeit auf Biegebelastung signifikant steigert. Das vorliegende Modell der gestörten Kallusheilung demonstriert weiterhin, dass sich durch die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren eine verzögerte Knochenheilung behandeln lässt. Dies wird durch die Ossifikationsstörungen bei allen Tieren der Kontrollgruppe A charakterisiert, die bei den Therapiegruppen nicht auftraten. Gerade bei Biege- und Torsionsbelastungen kommt der periostalen Knochenbildung besondere Bedeutung zu (Kojimoto et al. 1988). Diese wurde im vorliegenden Versuch durch den operativ hergestellten Periostdefekt inhibiert.

Die alleinige Behandlung mit IGF-I und TGF- β 1 zeigt vergleichbare und sogar bessere biomechanische Stabilitätswerte (Versagenslast) im Vergleich mit dem Goldstandard, der autologen Spongiosaplastik.

Obwohl die größte biomechanische Stabilität mit einer Kombination aus beiden Therapieverfahren erreicht wurde (Gruppe D), benötigt die autologe Knochenplastik einen zusätzlichen Eingriff zur Gewinnung des autologen Knochens. Dieser ist immer mit einer Entnahmemorbidität unterschiedlicher Ausprägung assoziiert. Die höhere Festigkeit der distrahierten Tibiae in der Gruppe D gegenüber der Behandlungsgruppe B basiert auch auf einer Querschnittsvergrößerung der Distractionsstrecke durch die Spongiosaplastik. Durch diese nimmt die biomechanische Belastbarkeit des Kallus exponentiell zu (Perren 1992).

Die Wirkung der Kombination beider Wachstumsfaktoren spiegelt sich auch in anderen Untersuchungen wider. So beschreibt Schmidmaier et al. (2006) im Torsionstest eine höhere Versagenslast osteosynthetisch versorgter Tibiafrakturen im Kleintiersversuch nach lokaler Applikation von IGF-I und TGF- β 1 gegenüber BMP-2. Auch die alleinige Anwendung von IGF-I bzw. TGF- β 1 zeigt im Vergleich schlechtere Werte (Abb.5.1). Dies demonstriert die synergistische Wirkung der applizierten Wachstumsfaktoren.

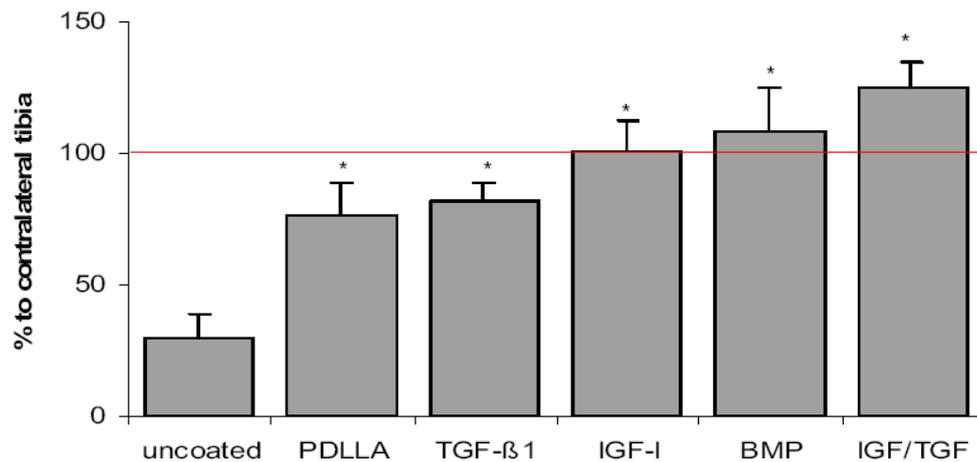


Abb. 5.1. Ergebnisse der biomechanischen Tests 28 Tage nach Fraktur. Die Werte repräsentieren die prozentuale Versagenslast im Vergleich mit der unfrakturierten kontralateralen Tibia für jede Behandlungsgruppe. Alle Gruppen zeigten gegenüber der unbeschichteten Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Versagenslast. * $p < 0.05$ verglichen mit der Kontrollgruppe (ANOVA, Bonferroni). (aus Schmidmaier et al. 2006)

Die knochenstimulierende Wirkung wurde von Raschke et al. 2002 auch im Großtierversuch an Minischweinen nachgewiesen. Nach Osteotomie der Tibia wurde mit einem PDLLA beschichteten Verriegelungsnagel osteosynthetisiert. PDLLA diente als Trägersubstanz von IGF-1 und TGF-β1. Die freigesetzten Wachstumsfaktoren beschleunigten die Knochenheilung, wie in biomechanischen Tests und in der Histologie nachgewiesen wurde. Eine dosisabhängige Wirkung von IGF-1 und TGF-β1 wurde in biomechanischen Tests und histologischen Untersuchungen durch Kandziora et al. (2003) beschrieben. Die optimale Dosierung entsprach der, in unserem Versuch verwendeten Kombination.

Die Bewertung der tatsächlichen Belastungsstabilität der verlängerten Extremität ist nicht sicher möglich, da in keiner Gruppe die Kontrollseitenergebnisse erreicht wurden. Die Angabe von Reichel et al. 1998, dass aufgrund ihrer klinischen Auswertungen von Distractionen an der Schafttibia der Abbau des Fixateur externe bei einer Mineraleichte im Regenerat von 60% der gesunden Gegenseite erfolgen kann, ist nicht a priori auf die Biomechanik anwendbar. So ist eine Versagenslast von 74,6% im Vergleich zur Kontrolltibia (Gruppe D) nicht selbstverständlich als stabil anzusehen. Erschwert wird die Beurteilung weiterhin durch die Tatsache, dass in keiner Gruppe Hohlzylinderformen als Probekörper vorlagen. Die biomechanischen Vergleichsergebnisse zwischen distrahierter und Kontrolltibia widerspiegeln demnach den Vergleich zweier unterschiedlicher Prüfkörpergeometrien, wobei die Kontrollseite eher einem Hohlzylinder gleichkommt.

Für die biomechanische Evaluierung der verschiedenen Behandlungsmethoden sind die Ergebnisse aussagekräftig.

5.3.3 Histologische Untersuchungen

In der vorliegenden Studie wurde im Vergleich zu den Ergebnissen von Reichel (1998) in allen Behandlungsgruppen eine verringerte absolute Kallusfläche innerhalb der Verlängerungsstrecke gefunden (Tab 5.1). Damit kann die Wirksamkeit des Modells in Bezug auf eine verzögerte Knochenbildung bestätigt werden.

Die beiden Gruppen, die eine mit Wachstumsfaktoren beschichtete Membran enthielten, zeigten deutlich höhere Werte für die relative Knochenfläche gegenüber den Gruppen, die mittels unbeschichteter Membran bzw. mit einer Spongiosaplastik versorgt wurden. Beide Wachstumsfaktoren TGF- β 1 und IGF-1 sind in der Lage, die Proliferation von Osteoblasten und damit die Synthese der Knochenmatrix zu steigern (Lieberman et al. 2002, Farhadieh et al. 1999, Hock et. al 1998, Thaller et al. 1993, Pfeilschifter et al. 1990, Kveiborg et al 2001).

Tab. 5.1. Absolute Knochenfläche in mm² im mikroradiografischen Querschnitt. Vergleich der Werte von Reichel (1998) versus vorliegende Arbeit.

Querschnitte	Absolute Kallusfläche in mm ²				
	Reichel 1998	vorliegende Arbeit			
		Gruppe A	Gruppe B	Gruppe C	Gruppe D
ROI A	307,14	232,10	224,10	233,21	182,21
ROI B	393,82	247,50	282,94	257,01	207,40
ROI C	383,96	199,75	231,40	227,52	181,82
ROI D	263,56	247,33	252,16	238,99	224,77

Die Reaktionen des Periosts sind entscheidend während der Knochenheilung (Einhorn 1998, Vögelin et al. 2000). Auf der Oberfläche des Knochens bildet sich ein Gerüst aus Geflechtknochen, dessen Strukturdicke und Ausmaß in der Nähe der Osteotomieflächen am höchsten ist (Abb. 5.2). Dieser Knochen wird direkt durch Osteoblasten der Kambiumschicht des Periosts über die intramembranöse Ossifikation gebildet (Webb et al. 2000, Ito 2001).

Bei Insuffizienz des Periosts finden diese zellbiologischen Vorgänge nicht statt. So führte die Implantation künstlicher Membranen zwischen Periost und Knochen durch die funktionelle Abwesenheit des Periosts zu einer Verzögerung der Knochenheilung (Würzler et al. 2000). Wird das Periost thermisch zerstört (Kokubu et al. 2003, Hietaniemi et al. 1995) oder durch Ablösen entfernt (Takushima et al. 1998, Volpon 1994) findet ebenfalls eine Verzögerung oder ein Ausbleiben der Knochenheilung statt. Diese Ergebnisse spiegeln sich auch im

vorliegenden Versuch wider. In den histologischen Bildern der mit einer unbeschichteten Membran behandelten Gruppe zeigte sich im Bereich des Periostdefektes ein Ausbleiben (Abb. 5.3) bzw. eine Verzögerung der Knochenheilung.

In allen anderen Gruppen wurde der Periostdefekt mit Geflechtknochen überzogen. Das histologische Bild glich in diesen Fällen bis auf eine unregelmäßige Trennlinie zwischen originärem und neu gebildetem Knochen infolge direkt nach der Osteotomie stattfindender Knochenresorptionsvorgänge dem histologischen Bild bei intaktem Periost. Bei der Deperiostierung ist initial auch die periostale Durchblutung gestört, so dass primär avitale Knochenabschnitte vorliegen (Kutscha-Lissberg et al. 2003). Diese avitalen Knochenabschnitte werden dann durch Osteoklasten resorbiert, was sich auch in unseren histologischen Schnitten durch das vermehrte Auftreten von Osteoklasten zeigt (Abb. 5.3).

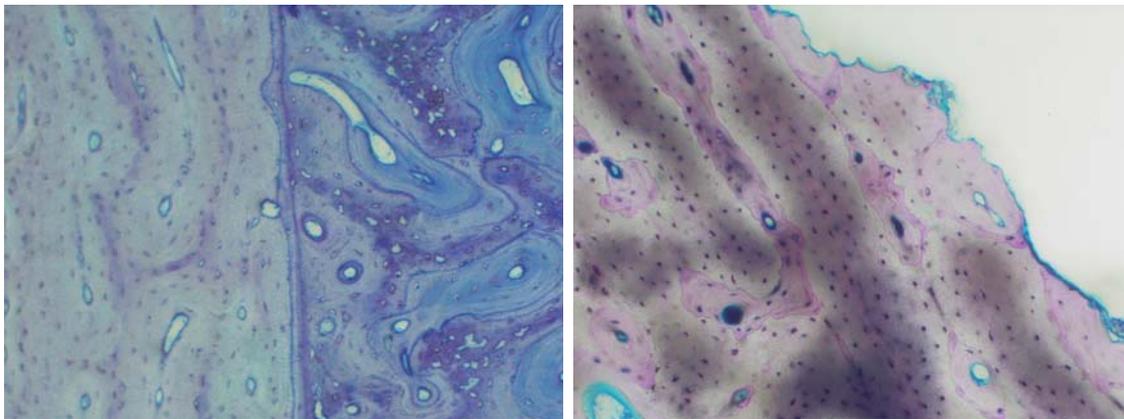


Abb. 5.2. Querschnitt ohne Periostdefekt. Aufgelagerter Knochen ist dunkler gefärbt. (Toluidinblaufärbung 31,25x)
Abb. 5.3. Querschnitt mit Periostdefekt. Keine Knochenneubildung. (Giemsa-Färbung 31,25x)

Bei allen Präparaten der Gruppe, die nur mit einer nicht beschichteten Membran behandelt wurden, kam es nicht zu einer knöchernen Überbrückung der Fragmentenden. Die Knochenheilung war 8 Wochen nach Distraktionsende stark verzögert. In der Kallusmitte fand zeigte sich ein mit nicht kalzifiziertem Gewebe gefüllter Bezirk. Von einer Pseudarthrose wird erst bei Ausbleiben der Knochenheilung nach mehr als sechs Monaten gesprochen (Rüter und Mayr 1999, Jones et al. 2005).

Der überwiegende Anteil der Ossifikation der Distraktionsstrecke war desmalen Ursprung wie dies auch von anderen Autoren für die Distraktionsosteogenese beschrieben wurde (Aronson et al. 1990, Delloye et al. 1990, Ganey et al. 1994, Ilizarov 1989b, Karaharju et al. 1993, Vauhkonen et al. 1990). Insbesondere bei den Präparaten der Gruppe A zeigte sich Knorpel im Distraktionsspalt. Knorpel tritt durch die Einwirkung von Scherkräften auf und ist als Zeichen für eine Instabilität zu werten (Aronson et al. 1997). Vereinzelt fanden sich auch

Zeichen einer enchondralen Ossifikation in den anderen Behandlungsgruppen. Hier traten diese Knorpelinseln wie auch bei Reichel (1998) beschrieben nicht zentral sondern ausschließlich in den peripheren Regionen auf. Die periphere enchondrale Ossifikation dient der Bildung einer periostalen Kallusmanschette (Perren 1992, Al-Aql et al. 2008) und tritt nur in den ersten beiden Monaten nach Verlängerungsbeginn auf.

In Bezug auf die Ossifikation bei der Distractionsosteogenese wird noch eine dritte Art der Verknöcherung diskutiert, die transchondrale Ossifikation, bei welcher der Knochen direkt durch „chondrozyte-like cells“ gebildet wird (Yasui et al. 1997, Choi et al. 2002). Diese Art der Knochenbildung war bei den hier vorliegenden Präparaten nicht auszuschließen.

Im Rahmen des normalen Remodelling hatte sich in allen Gruppen Lamellenknochen ausgebildet. Bei den Behandlungsgruppen B und D ließ sich der Beginn der Wiederherstellung der normalen Knochenstruktur mit gleichzeitiger Ausbildung einer Markhöhle histologisch bestätigen. Dabei wurde das Kallusgewebe im Rahmen des Havers-Remodellings über sogenannte Umbaueinheiten (basic multicellular units BMU, Frost 1989a, b, Klaushofer et al. 1994) durch aus Lamellenknochen bestehende sekundäre Osteone ersetzt. Entsprechend der mechanischen Belastung waren diese longitudinal ausgerichtet. Der medulläre Kallus wurde degradiert (Frost, 1989a, b, Cruess et al. 1975). Diese Umbaueinheiten ließen sich auch histologisch nachweisen. Sie bestehen aus Osteoblasten, Osteoklasten, der diese Zellen umgebenden Interzellulärsubstanz und aus Kapillaren. Zunächst werden Osteoklasten aktiviert, die den Knochen resorbieren. Danach folgen aktive Osteoblasten und Gefäße sprießen ein (Abb. 5.4).

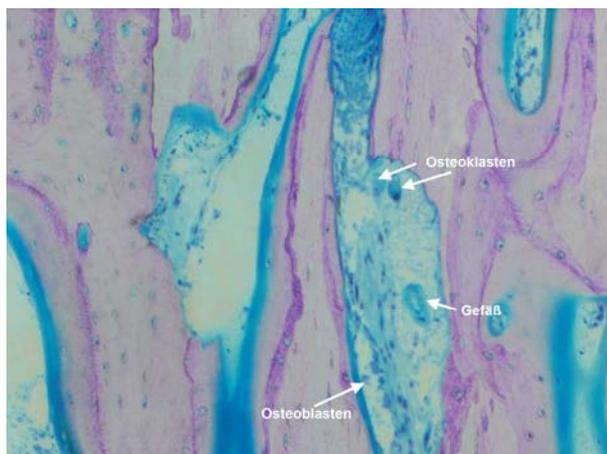


Abb. 5.4. BMU (basic multicellular units). (Giemsa-Färbung 31,25x)

In der Behandlungsgruppe C und D waren Reste der Spongiosa noch deutlich nachweisbar. Diese wurden in den Knochen ohne trennende Bindegewebsschicht integriert. In den

Präparaten der Gruppe A, B und D ließen sich zusätzlich geringfügige Reste der PDLLA-Membran nachweisen.

Die In-vivo-Färbungen zeigen, dass es gelungen ist, ein Modell der verzögerten Knochenheilung zu etablieren. Die lokale Applikation der Wachstumsfaktoren IGF-1 und TGF- β 1 mit Hilfe einer degradierbaren Membran führte zu einer im Vergleich zum „Goldstandard“ -der Spongiosaplastik- weiter fortgeschrittenen Knochenheilung.

5.3.4 Ultraschallmikroskopische Untersuchungen

In der vorliegenden Studie wurden zum ersten Mal biomechanische Eigenschaften von distrahierten Schafttibiae mit den durch hochfrequenten SAM gemessenen mikrostrukturellen und mikroelastischen Gewebeeigenschaften verglichen. Impedanzdarstellungen der Quer- und Längsschnitte weisen darauf hin, dass die Auflösung des akustischen Darstellungssystems geeignet erscheint, die Mikroarchitektur des neuformierten Knochengewebes zu beschreiben.

Die Impedanzwerte wie auch das Anisotropieverhältnis zeigten sich in der vorliegenden Untersuchung kleiner im Kallus verglichen mit kortikalem Gewebe. Diese Ergebnisse demonstrieren nicht nur eine geringere Gewebedichte aufgrund eines niedrigeren Mineralisationsgrades im neuformierten Knochen, sondern auch Unterschiede in der elastischen Anisotropie.

Des Weiteren konnte der Zusammenhang zwischen der biomechanischen Versagenslast distrahierter Tibiae und einer Kombination von ultraschallmikroskopisch ermittelten charakteristischen strukturellen und elastischen Merkmalen gezeigt werden. Ausgehend von den akustischen Impedanzdarstellungen wurde eine Kombination von Parametern beschrieben, die eine Vorhersage der Versagenslast mit einer im Vergleich zur früheren Studien höheren Genauigkeit zulässt ($R^2 = 0.86$). Aufgrund der Einbeziehung auch elastischer Parameter (Raum et al. 2003, Hofmann et al. 2005) zeigte sich eine deutliche Überlegenheit gegenüber den anderen bildgebenden Verfahren wie die QCT ($R^2 = 0.63$). Auch andere Autoren bestätigen die im Vergleich zur Ultraschallmikroskopie geringeren Regressionen mit osteodensitometrischen und radiologischen Verfahren (Reichel et al. 1998, Markel and Chao 1993, Augat et al. 1997, Krüger et al. 2000)

Das Fehlen einfacher Parameter zur Vorhersage der biomechanischen Belastbarkeit betont die Komplexität von strukturellen und Gewebemerkmale, die die mechanische Stabilität des konsolidierenden Knochens bestimmen. Nicht nur die Eigenschaften des Kallusgewebes

sondern auch die des angrenzenden kortikalen Knochens hatten einen Einfluss auf die Versagenslast. Hierbei sollte bemerkt werden, dass die Regressionsanalyse zwischen Versagenslast und akustischer Impedanz des Kallusgewebes ($Cl.Z_t$) in den Längsschnitten allein keinen signifikanten Zusammenhang ergab. Dies stellt ein erklärbares Ergebnis dar, da ein biegsameres Gewebe die Stressableitung unterstützt und deshalb die mechanische Belastung am Kallus geringer ist (Hube et al. 2006).

Die kleine Anzahl von Großtieren begrenzt die Aussagekraft der Studie. Dies wurde teilweise durch die Auswertung von zwei Längs und vier Querschnitten kompensiert. Trotzdem müssen die Ergebnisse und das Korrelationsmodell für die ultraschallmikroskopisch ermittelten Werte in einer Studie mit größeren Gruppen bestätigt werden.

6. Schlussfolgerung

Zur Behandlung einer verzögerten Knochenheilung bei der Distractionsosteogenese wurde eine Kombination von Wachstumsfaktoren (IGF-I, TGF- β 1) lokal über eine Polylaktidmembran appliziert. Die Freisetzungskinetik des Medikamententrägers garantierte die gewünschte lokale Dosis am Wirkort. Seine Implantation war reproduzierbar. Die Membran ist als Medikamententräger geeignet, Wachstumsfaktoren in ausreichender Dosierung freizusetzen.

Die zu Versuchsbeginn durchgeführte Deperiostierung im Osteotomiebereich implementierte eine verzögerte Knochenheilung

Die applizierten Wachstumsfaktoren beschleunigten die Knochenheilung und erreichten im Vergleich zu etablierten Behandlungsmethoden (autologe Spongiosaplastik) mindestens gleichwertige Ergebnisse. Die Kombination beider Verfahren erzielte die besten Resultate.

Die biomechanischen Resultate korrelierten mit den bildgebenden Verfahren. Eine humanmedizinische, klinische Prüfung scheint bei Zulassung der angewandten Wachstumsfaktoren sinnvoll. Durch die Stimulation der Knochenheilung kann die Behandlungszeit bei der Distractionsosteogenese verkürzt werden. Das zeitbedingte Komplikationsrisiko würde dadurch reduziert.

7. Zusammenfassung

Die Kallusdistraction wird als Standardverfahren zur operativen Beinverlängerung und bei der Behandlung von Knochendefekten durch Segmenttransport angewandt. Trotz kontinuierlicher Verbesserung der Fixateursysteme stellt sie weiterhin ein komplikationsträchtiges Behandlungsverfahren dar. Die Probleme und Komplikationsmöglichkeiten sind zu einem Großteil durch die lange Therapiedauer verursacht. Ziel ist die schnelle Wiederherstellung der Belastungsfähigkeit der behandelten Extremität.

Wachstumsfaktoren können durch ihre osteoinduktive Wirkung auf der Grundlage zellbiologischer Mechanismen die Osteogenese stimulieren. Aufgrund der synergistischen Wirkung von IGF-I und TGF- β 1 scheint eine Kombination der beiden Wachstumsfaktoren bei der Beeinflussung der Knochenheilung am Besten geeignet. Dies ist in der Literatur vielfach validiert.

In der vorliegenden Studie wurden zum ersten Mal Wachstumsfaktoren von beschichteten Polylaktidmembranen an Großtieren appliziert. Dies verbessert die klinische Anwendung lokal applizierter Wachstumsfaktoren und deren knochenstimulierende Wirkung.

Anhand eines validierten Schafmodells wurden die linken Tibiae von 28 adoleszenten Schafen unter Verwendung eines unilateralen Fixateurs um 3 cm verlängert. Zuvor wurde eine verzögerte Knochenheilung durch eine definierte Deperiostierung im Osteotomiebereich implementiert.

Es erfolgte eine randomisierte Gruppeneinteilung in vier Kollektive zu je sieben Tieren. Die Gruppen unterschieden sich durch die Behandlung nach Beendigung der Distractionsphase. Bei allen vier Gruppen wurde ein zweiter Eingriff im Bereich der Distractionsstrecke durchgeführt. Die Gruppe A wurde mit einer unbeschichteten PDLLA-Membran im Bereich der Distractionsstrecke behandelt und den anderen Gruppen als Kontrollkollektiv gegenübergestellt. In der Gruppe B erfolgte die Applikation der mit einem IGF-1/TGF- β 1 angereicherten Polylaktidmembran. In der Gruppe C wurde eine autologe Spongiosaplastik als Standardverfahren bei der Behandlung von verzögerten Knochenheilungen durchgeführt. Bei der Gruppe D kam eine Kombination der Verfahren B und C zur Anwendung.

Die distraherten Tibiae wurden röntgenologisch (Verlaufskontrolle), computertomografisch (Knochendichte), biomechanisch (4-Punkt-Biegetest), histologisch (Mikromorphologie, Fluorochrommarkierung, Histomorphometrie) und ultraschallmikroskopisch untersucht.

Bei den QCT-Untersuchungen zeigten alle Behandlungsgruppen gegenüber dem Kontrollkollektiv eine größere Knochendichte im kortikalen Bereich. Bei der Gruppe A konnte eine deutliche Mineralisationsstörung nachgewiesen werden. Die Gruppen B, C und D zeigten keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Knochendichte im Gruppenvergleich. Das aus den CT-Daten ermittelte Elastizitätsmodul ergab eine signifikante Regression mit der Versagenslast der verlängerten Tibiae ($R^2=0,632$, $p=0,008$).

Im Vier-Punkt-Biegetest wurden die Versagenslasten der einzelnen Gruppen verglichen. Die Mittelwerte der Versagenslast für die Gruppe A waren signifikant kleiner als für die Gruppe B, C und D. Die Gruppe D zeigte die höchsten Werte im Gruppenvergleich. Im Vergleich zur Kontrolltibia wurde für diese Gruppe auch die höchste prozentuale Versagenslast ermittelt (Gruppe A 21,1%, Gruppe B 53,2%, Gruppe C 44,6%, Gruppe D 74,6%). Es bestand eine signifikante Regression der Versagenslast mit der Behandlungsmethode ($R^2=0,58$, $p<0,0001$). Auch die histologischen Untersuchungen demonstrierten eine verzögerte Knochenheilung im Kontrollkollektiv, vor allem im Bereich des Periostdefektes. Die Knochenreifung der Gruppen B und D war auch im Vergleich zur Gruppe C weiter ausgeprägt. Die mikroradiographischen Untersuchungen zeigten keine Abweichungen bezüglich der Knochenfläche zwischen den Gruppen.

Die ultraschallmikroskopischen Untersuchungen ergaben gruppenspezifische Unterschiede. Bei der Auswertung der akustischen Impedanz des Kallusgewebes, welche in den Querschnitten ermittelt wurde, zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Gruppe D und Kontrollgruppe A. Ein Modell mit einer Kombination aus morphologischen und akustischen Parametern ergab einen Regressionskoeffizienten mit der Versagenslast von $R^2 = 0,86$.

Da die Risiken bei der Distractionsosteogenese mit der Therapiezeit ansteigen, hat die lokale Applikation von Wachstumsfaktoren große klinische Relevanz. Die bei systemischer Gabe beschriebenen Nebenwirkungen aufgrund hoher Serumkonzentrationen können vermieden werden

Es konnte nachgewiesen werden, dass der Behandlungserfolg bei Fällen mit verzögerter Kallusbildung verbessert wird. In der Behandlung von Beinlängendifferenzen und Knochendefekten hat die Therapie mit lokal applizierten IGF-I und TGF- β 1 ein hohes Potential. Die Behandlungszeit kann durch eine Stimulation der Knochenheilung verkürzt und die Ausbildung von Pseudarthrosen vermieden bzw. minimiert werden. Das Konzept der Kallusdistraction wird so weiter optimiert.

8. Literaturverzeichnis

1. Abbott L: The operative lengthening of the tibia and the fibula. *J Bone Joint Surg* 9 (1927) 128-152
2. Abdel-Meguid SS, Smith WW, Violand BN, Bentle LA: Crystallization of methionyl porcine somatotropin, a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *J Mol Biol* 192 (1986) 159-160
3. Adolphs N, Kunz C, Pyk P, Hammer B, Rahn B: Callus mineralization following distraction osteogenesis of the mandible monitored by scanning acoustic microscopy (SAM): *J Craniomaxillofac Surg* 33 (2005) 314-317
4. Al-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, and. Einhorn TA: Molecular Mechanisms Controlling Bone Formation during Fracture Healing and Distraction Osteogenesis. *J Dent Res* 87 (2008) 107-118
5. Aldegheri R, Renzi-Brivio L, Agostino S: The callotasis method of limb lengthening. *Clin Orthop* 241 (1989) 137-165
6. Ament C: Mathematische Modellbildung und Simulation der Knochenheilung. *Fortschr.-Ber. VDI-Reihe 17, Nr. 158, VDI-Verlag, Düsseldorf, 1997*
7. Ament C, Hofer EP: A fuzzy logic model of fracture healing. *J Biomech* 33 (2000) 961-968
8. Amling M, Takeda S, Karsenty G: A neuro (endo)crine regulation of bone remodeling. *BioEssays* 22 (2000) 970-975
9. Amling M: Physiologie und Pathophysiologie des Skelettsystems. 3. Jahrestagung Deutsche Gesellschaft für Biomechanik. Instructional Course II: Biologie und mechanische Kompetenz des Knochens. 2003, 2-15
10. Anderson WV: Leg lengthening. *J Bone Joint Surg.* 34-B (1952) 150-153
11. Andersen T, Jensen AS, Lalla M, Jorgensen CS, Jorgensen TM: A new method to correlate histology with biomechanical properties in urethral tissue. An in-vitro study using light microscopy and scanning acoustic microscopy. *APMIS Suppl* 109 (2003) 35-38
12. Andrew JG, Hoyland J, Freemont AJ, Marsh D: Insulin-like growth factor gene expression in human fracture callus. *Calcif Tissue Int* 53 (1993) 97-102
13. Aro HT, Wippermann BW, Hodgson SF, Wahner HW, Lewallen DG, Chao EY: Prediction of properties of fracture callus by measurement of mineral density using micro-bone densitometry. *J Bone Joint Surg* 71-A (1989) 1020-1030
14. Aronson J, Harrison BH, Stewart CL, Harp JH Jr: The histology of distraction osteogenesis using different external fixators. *Clin Orthop* 241 (1989) 106-116
15. Aronson J, Good B, Stewart C, Harrison B, Harp J: Preliminary studies of mineralization during distraction osteogenesis. *Clin Orthop* 250 (1990) 43-49

16. Aronson J. The biology of distraction osteogenesis. In: Bianchi A, Maiocchi J (Eds): Operative Principles of Ilizarov. Fracture Treatment, Nonunion, Osteomyelitis, Lengthening, Deformity Correction. Williams and Wilkins, Baltimore, 1991 S. 42-52
17. Aronson J: Experimental assessment of bone regenerates quality during distraction osteogenesis. In: Brighton CT, Friedlaender GE, Lane JM (Eds): Bone Formation and Repair. The American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, Illinois, 1994 S. 441-463
18. Aronson J, Shen X: Experimental healing of distraction osteogenesis comparing metaphyseal with diaphyseal sites. Clin Orthop 301 (1994) 25-30
19. Aronson J, Harp JH: Mechanical forces as predictors of healing during tibial lengthening by distraction osteogenesis. Clin Orthop 301 (1994) 73-79
20. Aronson J: Limb-lengthening, skeletal reconstruction, and bone transport with the Ilizarov method. J Bone Joint Surg 79-A (1997) 1243-1258
21. Asada N, Tsuchiya H, Kitaoka K, Mori Y, Tomita K: Massive autoclaved allografts and autografts for limb salvage surgery. A 1-8 year follow-up of 23 patients. Acta Orthop Scand 68 (1997) 392-395
22. Augat P, Reeb H, Claes LE: Prediction of fracture load at different skeletal sites by geometric properties of the cortical shell. J Bone Miner Res 11 (1996) 1356-1363
23. Augat P, Merk J, Genant HK, Claes L: Quantitative assessment of experimental fracture repair by peripheral computed tomography. Calcif Tissue Int 60 (1997) 194-199
24. Baak JPA: Basic points and practical aspects of the application of diagnostic morphometry. Path Res Prac 179 (1984) 193-199
25. Bail HJ: Die Anwendung von rekombinantem homologem Wachstumshormon bei der Distractionsosteogenese. Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät, Humboldt-Universität zu Berlin, 2004
26. Bak B, Jorgensen P, Andreassen T: Increased mechanical strength of healing rat tibial fracture treated with biosynthetic human growth hormone. Bone 11 (1990) 233-239
27. Bartl R, Frisch B: Biopsy of Bone in Internal Medicine. An Atlas and Sourcebook. In: Gresham GA (Ed.): Current Histopathology. Volume 21, Dordrecht: Kluwer Academic Publishers (1993)
28. Baumgart R, Betz A, Kessler S, Kettler M, Schweiberer L: Möglichkeiten der Rekonstruktion von Knochendefekten. Orthopäde 23 (1994) 396-403
29. Baumgart R, Betz A, Kettler M, Zeiler C, Schweiberer L: Perspektiven der Kallusdistraction. Unfallchirurg 99 (1996) 84-91
30. Baxter RC: Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation: a review. Horm Res 42 (1994) 140-144
31. Baylink DJ, Finkelman RD, Mohan S: Growthfactors to stimulate bone formation. J Bone Miner Res 8 [Suppl 2] (1993) 565-572

32. Beaupre GS, Hayes WC, Jofe MH, White AA: Monitoring fracture site properties with external fixation. *J Biomech Eng* 105 (1983) 120-126
33. Beck LS, Amento EP, Xu Y, Deguzman L, Lee WP, Nguyen T, Gillet NA: FGF-b induces bone closure of skull defects: temporal dynamics of bone formation in defects exposed to rhTGF-beta 1. *J Bone and Min Res* 8 (1993) 753-761
34. Berelowitz M, Szabo M, Frohmann LA et al: Somatomedin-C mediates growth hormone negative feedback by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science* 212 (1981) 1279-1281
35. Bichat X: *Recherches physiologiques sur la vie et la mort*. Brosson, Gabon et Co., Paris, 1800
36. Bier A: Über Knochenregeneration, über Pseudarthrosen und über Knochentransplantate. *Arch Klin Chir* 127 (1923) 1-136
37. Binoux M.: The IGF system in metabolism regulation. *Diabete Metab* 21 (1995) 330-337
38. Boivin G, Baud CA: Microradiographic Methods for Calcified Tissue. In: Dickson GR (Ed): *Methods for Calcified Tissue Preparation*. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, 1984, S. 391-412
39. Bolander ME: Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exper Biol and Med* 200 (1992) 165-170
40. Bollet-Quivogne FR, Anderson P, Dowker SE, Elliott JC: Scanning microradiographic study on the influence of diffusion in the external liquid on the rate of demineralization in hydroxyapatite aggregates. *Eur J Oral Sci* 113 (2005) 53-59
41. Bonewald LF, Dallas SL: Role of active and latent transforming growth factor β in bone formation. *J Cell Biochem* 55 (1994) 350-357
42. Borchers RE, Gibson JL, Burchardt H, Hayes WC: Effects of selected thermal variables of the mechanical properties of trabecular bone. *Biomaterials* 16 (1995) 545-551
43. Bossy E, Talmant M, Peyrin F, Akrou L, Cloetens P, Laugier P: An in vitro study of the ultrasonic axial transmission technique at the radius: 1-MHz velocity measurements are sensitive to both mineralization and intracortical porosity. *J Bone Miner Res* 19 (2004) 1548-1556
44. Bouxsein ML, Myers ER, Hayes WC: *Biomechanics of age-related fractures*. Osteoporosis, Academic Press, Inc (1996) 373-393
45. Bramer JAM, Barentsen RH, Van der Elst E, DE Lange ESM, Patka P, Haarman JTM: Representative assessment of long bone shaft biomechanical properties: An optimized testing method. *J Biomech* 31 (1998) 741-745
46. Braunstein EM, Goldstein SA, Ku J, Smith P, Matthews LS: Computed tomography and plain radiography in experimental fracture healing. *Skeletal Radiol* 15 (1986) 27-31
47. Briggs GA: *Acoustic Microscopy*. Clarendon Press, Oxford, 1992

48. Brill TH, Eckhardt W, Henke J, Scharvogel S, Scherer MA: Das Schaf als Versuchstier in der chirurgischen Forschung. *Tierschutzbeauftragt* 2 (1993) 7-10
49. Brug E, Klein W, Baranowski D, Winckler St: August Bier – ein Pionier der Kallusdistraktion. In: Wolter D, Zimmer W (Hrsg): *Die Plattenosteosynthese und ihre Konkurrenzverfahren: von Hausmann bis Ilizarov*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1991, S. 47-52
50. Bumrerraj S, Katz JL: Scanning acoustic microscopy study of human cortical and trabecular bone. *Ann Biomed Eng* 29 (2001) 1034-1042
51. Burgess AE, Calborne B, Zoffmann E: Vertebral trabecular bone: comparison of single and dual-energy CT measurements with chemical analysis. *J Comput Assist Tomogr* 11 (1987) 505-515
52. Burny F: [Methods of evaluation of fracture consolidation]. *Acta Chir Belg* 69 (1970) 658-81
53. Burny F, Bourgois R, Donkerwolcke M, Moulart F: [Clinical use of strain gauges. Current situation and future prospects]. *Acta Orthop Belg* 44 (1978) 895-920
54. Burstein AH, Frankel VA: A standard test for laboratory animal bone. *J Biomech* 4 (1971) 155-158
55. Burstein AH, Wright M: *Biomechanik in Orthopädie und Traumatologie*. Thieme, Stuttgart, New York, 1997
56. Canadell J, Forriol F: *Unilateral external fixation*. University of Navarra Press, Pamplona, 1993
57. 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* 74-A (1992) 359-367
58. Carter DR, Hayes WC: The compressive behaviour of bone as a two-phase porous structure. *J Bone Joint Surg* 59-A (1977) 954-962
59. Carter DR, Beaupre GS, Giori NJ, Helms JA: Mechanobiology of skeletal regeneration. *Clin Orthop* 355 (1998) 841-855
60. Chao EYS, Inoue N: Biophysical stimulation of bone fracture repair, regeneration and remodelling. *European Cells and Materials* 6 (2003) 72-85
61. Chao EYS, Hein TJ: Mechanical performance of the standard Orthofix external fixator. *Orthopedics* 11 (1988) 1057-1069
62. Chehade MJ, Pohl AP, Percy MJ, Navana N: Clinical implication of stiffness and strength changes in fracture healing. *J Bone Joint Surg* 79-B (1997) 9-12
63. Choi IH, Chung CY, Cho TJ, Yoo WJ: Angiogenesis and mineralization during distraction osteogenesis. *J Korean Med Sci* 17 (2002) 435-447

64. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, Wozney JM: Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci* 24 (1990) 9843-9847
65. Centrella M, Mc Carthy TL, Canalis E: Transforming growth factor-beta and remodeling of bone. *J Bone Joint Surg* 73-A (1991) 1418-1428
66. Centrella M, Horowitz MC, Wozney JM, McCarthy TL: TGF- β gene family members and bone. *Endocr Rev* 15 (1994) 27-39
67. Ciarelli MJ, Goldstein SA, Kuhn JL, Cody DD, Brown MB: Evaluation of orthogonal mechanical properties and density of human trabecular bone from the major metaphyseal regions with materials testing and computed tomography. *J Orthop Res* 9 (1991) 674-682
68. Claes L, Eckert-Hübner K, Augat P: The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *J Orthop Res* 20 (2002) 1099-1105
69. Claes L, Grass R, Schmickal T, Kisse B, Eggers C, Gerngross H, Mutschler W, Arand M, Wintermeyer T, Wentzensen A: Monitoring and healing analysis of 100 tibial shaft fractures. *Langenbecks Arch Surg* 387 (2002) 146-152
70. Claes L, Augat P, Schorlemmer S, Konrads C, Ignatius A, Ehrnthaller C: Temporary distraction and compression of a diaphyseal osteotomy accelerates bone healing. *J Orthop Res* 26 (2008) 772-777
71. Codivilla A: On the means of lengthening, in the lower limbs, the muscles and tissues which are shortened through deformity. *Am J Orthop Surg* 2 (1905) 353-369
72. Cohen P, Fielder PJ, Hasegawa Y, Frisch H, Giudice LC, Rosenfeld RG: Clinical aspects of insulin-like growth factor binding proteins. *Acta Endocrinol* 124 (1991) 74-85
73. Correll J: Die sonographische Verlaufskontrolle bei der Extremitätenverlängerung nach Ilizarov. In: Eyb FR (Hrsg): *Die Sonographie in der Orthopädie*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1988, S. 97-101
74. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL: Healing repair. In Cotran (Ed): *Robbins Pathologic Basis of Disease*. Saunders, Philadelphia, 1989 S. 71-86
75. Cristofolini L, Viceconti M, Capello A, Toni A: Mechanical validation of whole bone composite femur models. *J Biomech* 29 (1996) 525-535
76. Cruess RL, Dumont J: Fracture healing. *Can J Surg* 18 (1975) 403-413
77. Cunningham JL, Evans M, Kenwright J: Measurement of fracture movement in patients treated with unilateral external skeletal fixation. *J Biomed Eng* 11 (1989) 118-22
78. Danzinger MB, Kumar A, DeWeese J: Fractures after femoral lengthening using the Ilizarov method. *J Pediatr Orthop* 15 (1995) 220-223
79. Dean C, Ito M, Makarenkova HP, Faber SC, Lang RA: Bmp7 regulates branching morphogenesis of the lacrimal gland by promoting mesenchymal proliferation and condensation. *Development* 131 (2004) 4155-4165

80. De Bastiani G, Aldegheri R, Trivella G: Lengthening of the lower limbs in achondroplastics. *Basic Live Sci* 48 (1988) 353-355
81. Delloye C, Delefortrie G, Coutelier L, Vincent A: Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthening. An experimental study. *Clin Orthop* (1990) 34-42
82. Den Boer FC, Brammer JA, Patka P, Bakker FC, Barentsen RH, Feilzer AJ, De Lange ES, Haarman HJ: Quantification of fracture healing with three-dimensional computed tomography. *Arch Orthop Trauma Surg* 117 (1998) 345-350
83. Donath K: Die Trenn-Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien. *Exakt-Kulzer-Druckschrift*, Norderstedt, 1988, S. 1-16
84. Draper ER, Goodship AE: A novel technique for four-point bending of small bone samples with semi-automatic analysis. *J Biomech* 36 (2003) 1497-1502
85. Dwyer JS, Owen PJ, Evans GA, Kuiper JH, Richardson JB: Stiffness measurements to assess healing during leg lengthening. A preliminary report. *J Bone Joint Surg* 78-B (1996) 286-289
86. Einhorn TA: The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop* 355 (1998) S7-S21
87. Einhorn TA, Majeska RJ, Rush EB, Levine PM, Horowitz MC: The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 10 (1995) 1272-1281
88. Erlebacher A, Derynck R: Increased expression of TGF- β 2 in osteoblasts result in an osteoporosis-like phenotype. *J Cell Biol* 132 (1996) 195-210
89. Eschberger J, Hartenstein H: Bestimmung der quantitativen Verteilung von Hydroxylapatit im Knochengewebe. *Mikroskopie* 33 (1977) 2-10
90. Estough-Waring SJ, Hardy JR, Cunningham JL: Fracture stiffness measurement using the orthometer: reproducibility and sources of error. *Clin Biomech* 15 (2000) 140-142
91. Evans M, Kenwright J, Cunningham JL: Design and performance of a fracture monitoring transducer. *J Biomed Eng* 10 (1988) 64-69
92. Eyres KS, Bell MJ, Kanis JA: Methods of assessing new bone formation during limb lengthening. Ultrasonography, dual energy X-ray absorptiometry and radiography compared. *J Bone Joint Surg* 75-Br (1993) 358-364
93. Farhadieh RD, Gianoutsos MP, Yu Y, Walsh WR: The role of bone morphogenetic proteins BMP-2 and BMP-4 and their related postreceptor signaling system (Smads) in distraction osteogenesis of the mandible. *J Craniofac Surg* 15 (2004) 714-718
94. Filvaroff EH, Erlebacher A, Ye J, Gitelmann SE, Lotz J, Heilmann M, Derynck R: Inhibition of TGF-beta receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass. *Development*. 126 (1999) 4267-4279

95. Fink B, Krieger M, Strauss J M, Opheys C, Menkhaus S, Fischer J, Ruther W: Osteoneogenesis and its influencing factors during treatment with the Ilizarov method. *Clin Orthop* 323 (1996) 261-272
96. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, Yin S: Osteogenic Protein-1 (Bone Morphogenetic Protein-7) in the Treatment of Tibial Nonunions: A Prospective, Randomized Clinical Trial Comparing rhOP-1 with Fresh Bone Autograft. *J Bone Joint Surg* 83-A (2001) 151-158
97. Frost HM: The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. *Clin Orthop* 248 (1989a) 283-293
98. Frost HM: The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part II. *Clin Orthop* 248 (1989b) 294-309
99. Frystyk J, Gronbaek H, Skjaerbaek C, Flyvbjerg A, Orskov H, Baxter RC: Developmental changes in serum levels of free and total insulin-like growth factor I (IGF-I), IGF-binding protein-1 and -3, and the acid-labile subunit in rats. *Endocrinology* 139 (1998) 4286-4292
100. Fujimoto R, Tanizawa T, Nishida S, Yamamoto N, Soshi S, Endo N, Takahashi HE, Fujimoto R, Hori M: Local effects of transforming growth factor-beta 1 on rat calvaria: changes depending on the dose and the injection site. *J Bone Miner Metab* 17 (1999) 11-18
101. Ganey TM, Klotch DW, Sasse J, Ogden JA, Garcia T: Basement membrane of blood vessels during distraction osteogenesis. *Clin Orthop* 301 (1994) 132-138
102. Gerhart TN, Kirker-Head CA, Kriz MJ, Holtrop ME, Hennig GE, Hipp J, Schelling SH, Wang E: Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 293 (1993) 317-326
103. Giebel G: Extremitäten-Verlängerung und die Behandlung von Segment-Defekten durch Kallus-Distraktion. *Chirurg* 58 (1987) 601-606
104. Giebel G: Kallusdistraktion: Klinische Anwendung. 2. Aufl. Thieme, Stuttgart, New York, 1993
105. Giovannucci E: Insulin-like growth factor-I and binding protein-3 and risk of cancer. *Horm Res* 51 (1999) 34-41
106. Goby P: Micro-Radiographie. *Arch Roentg Rays (London)* 18 (1913) 247-250
107. Goldring MB, Goldring SR: Skeletal tissue response to cytokines. *Clin Orthop* 258 (1990) 245-278
108. Goodman SB: The effects of micromotion and particulate materials on tissue differentiation. Bone chamber studies in rabbits. *Acta Orthop Scand* 65 (1994) 1-43
109. Grimberg A, Cohen P: Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J Cell Physiol* 183 (2000) 1-9
110. Günther KP, Scharf H-P, Pesch H-J, Puhl W: Einsatzverhalten von Knochenersatzstoffen. *Orthopäde* 27 (1998) 105-117

111. Gupta MC, Khan SF: Application of bone morphogenetic proteins in spinal fusion. *Cytokine & Growth Factor Rev* 16 (2005) 347-355
112. Hadimioglu B, Foster JS: Advances in superfluid helium acoustic microscopy. *J Appl Phys* 56 (1984) 1976-1980
113. Hamanishi C, Yasuwaki Y, Kikushi H, Tanaka S, Tamura K: Classification of the callus in limb lengthening. Radiographic study of 35 limbs. *Acta Orthop Scand* 63 (1992) 430-433
114. Hamanishi C, Kawabuta T, Yoshii T, Tanka S: Bone mineral density changes in distracted callus stimulated by pulsed direct electrical current. *Clin Orthop* 312 (1995) 247-252
115. Hammer R, Edholm P, Lindholm P: Stability of union after tibial shaft fracture. Analysis by a non-invasive technique. *J Bone Joint Surg* 66-B (1984) 529-534
116. Hankemeier S, Bastian L, Gosling T, Krettek C: Prinzipien der Kallusdistraction. *Unfallchirurg* 10 (2004) 945-958
117. Hanson PD, Markel MD, Vanderby R: Diaphyseal structural properties of equine long bones. *Am J Vet Res* 56 (1995) 233-240
118. Harp JH, Aronson J, Hollis M: Noninvasive determination of bone stiffness for distraction osteogenesis by quantitative computed tomography scans. *Clin Orthop* 301 (1994) 42-48
119. Harris WH, Lavorgna DL, Hamblen EA, Haywood EA: The inhibition of ossification in vivo. *Clin Orthop* 61 (1968) 52-60
120. Harten RD Jr., Lee FY, Zimmerman MC, Hurowitz E, Arakal R, Behrens FF: Regional and temporal changes in the acoustic properties of fracture callus in secondary bone healing. *J Orthop Res* 15 (1997) 570-576
121. Hasegawa K, Turner CH, Burr DB: Contribution of collagen and mineral to the elastic anisotropy of bone. *Calcif Tissue Int* 55 (1994) 381-386
122. Hasegawa K, Turner CH, Recker RR, Wu E, Burr DB: Elastic properties of osteoporotic bone measured by scanning acoustic microscopy. *Bone* 16 (1995) 85-90
123. Hayden JM, Mohan S, Baylink DJ: The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption. *Bone* 17 (1995) 93-98
124. Hayes WC, Carter DR: Biomechanics of bone. In: Simmons DJ, Kunin AS (Eds): *Skeletal research: An experimental approach*. Academic Press, New York, San Francisco, London, 1979, S. 263-300
125. Hayes WC, Piazza SJ, Zysset PK: Biomechanics of fracture risk prediction of the hip and spine by quantitative computed tomography. *Radiol Clin North Am* 29 (1991) 1-18
126. Henry AN, Freeman MA, Swanson SA: Studies on the mechanical properties of healing experimental fractures. *Proc R Soc Med* 61 (1968) 902-906
127. Hente R, Cordey J, Perren SM: In vivo measurement of bending stiffness in fracture healing. *BioMedical Engineering* 2 (2003) 8-13

128. Hietaniemi K, Peltonen J, Paavolainen P: An experimental model for non-union in rats. *Injury* 26 (1995) 681-686
129. Hirsekorn S, Pangraz S: Materials characterization with the acoustic microscope. *Appl Phys Lett* 64 (1994) 1632-1634
130. Hobson RS, Beynon AD: Preliminary quantitative microradiography study into the distribution of bone mineralization within the basal bone of the human edentulous mandible. *Arch Oral Biol* 42 (1997) 497-503
131. Hock J, Centrella M, Canalis E: Insulin like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 122 (1998) 254-260
132. Hofmann T, Heyroth F, Meinhard H, Franzel W, Raum K: Assessment of composition and anisotropic elastic properties of secondary osteon lamellae. *J Biomech* 39 (2006) 2282-2294
133. Holbein O, Neidlinger-Wilke C, Suger G, Kinzl L, Claes L: Ilizarov callus distraction produces systemic bone cell mitogenesis. *J Orthop Res* 13 (1995) 625-638
134. Hounsfield GN: Computerized transverse axial scanning (tomography): Part I. Description of system. *Br J Radiol* 46 (1973) 1016-1022
135. Hube R, Hayes Jr JD, Rudert MJ, Loebig TG, Sotereanos NG, Campbell PG: IGF-I Covalently attached to metal implant surfaces improves bone growth in vitro and implant fixation in vivo. *Journal of Orthopedic Research* day. AUHS, Pittsburgh (1998) 9-10
136. Hube R, Birke A, Krüger T: Einfluss von IGF-1 als osteoinduktive Substanz in der Oberflächenbeschichtung von Implantaten – tierexperimentelle Ergebnisse. Vortrag DGOT-Jahrestagung, Wiesbaden (2000)
137. Hube R, Mayr H, Hein W, Raum K: Prediction of biomechanical stability after callus distraction by high resolution scanning acoustic microscopy. *Ultrasound in Medicine and Biology* 32 (2006) 1913-1921
138. Hüsler J, Zimmermann H: Statistische Prinzipien für medizinische Projekte. Huber, Bern, Göttingen, Toronto, Seattle, 2000
139. Hunt JA, Williams, DF: Quantifying the soft tissue response to implanted materials. *Biomaterials* 16 (1995) 167-170
140. Hvid I, Bentzen SM, Linde F, Mosekilde L, Pongsoipetch B: X-ray quantitative computed tomography: The relations to physical properties of proximal tibial trabecular bone in specimens. *J Biomech* 22 (1989) 837-844
141. 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* 238 (1989a) 249-281
142. 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* 239 (1989b) 263-285

143. Ilizarov GA: Clinical application of the tension-stress effect of limb lengthening. *Clin Orthop* 250 (1990) 8-26
144. Ilizarov GA: Klinische Aspekte der allgemeinbiologischen Gesetzmäßigkeiten der Einwirkung von Zugspannung auf die Genese und das Wachstum des Gewebes. In: Wolter D, Zimmer W (Hrsg): *Die Plattenosteosynthese und ihre Konkurrenzverfahren: Von Hansmann bis Ilizarov*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1991, S. 67-115
145. Ilizarov GA: *Transosseous osteosynthesis. Theoretical and clinical aspects of the regeneration and growth of tissue*. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1992
146. Ilizarov GA, Barabash AP, Imerlishvili IA, Larionov AA, Ius K: [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* 1 (1984) 16-20
147. Isgaard J, Nilsson A, Lindahl A, Jansson J, Isaksson O: Effects of local administration of GH and IGF-1 on longitudinal bone growth in rats. *Am J Physiol* 250 (1986) 367-372
148. Ito Y, Fitzsimmons JS, Sanyal A, Mello MA, Mukherjee N, O'Driscoll SW: Localization of chondrocyte precursors in periosteum. *Osteoarthritis Cartilage* 9 (2001) 215-223
149. Jazrawi LM, Majeska RJ, Klein ML, Kagel E, Stromberg L, Einhorn TA: Bone and cartilage formation in an experimental model of distraction osteogenesis. *J Orthop Trauma* 12 (1998) 111-116
150. Jernberger A: Measurement of stability of tibial fractures. A mechanical method. *Acta Orthop Scand Suppl* 135 (1970) 1-88
151. Jones CB, Mayo KA: Nonunion treatment: iliac crest bone graft techniques. *J Orthop Trauma* 19 (2005) 11-13
152. Jorgensen TE: Measurements of stability of crural fractures treated with Hoffmann osteotaxis. 4. The complicated, terminal phase of healing of crural fractures. *Acta Orthop Scand* 43 (1972) 280-291
153. Jorgensen CS, Assentoft JE, Knauss D, Gregersen H, Briggs GA (2001): Small intestine wall distribution of elastic stiffness measured with 500 MHz scanning acoustic microscopy. *Ann Biomed Eng* 29 (2001) 1059-1063
154. Juul A, Dalgaard P, Blum WF, Bang P, Hal, K, Michaelsen KF, Muller J, Skakkebaek NE: Serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-3 (IGFBP-3) in healthy infants, children, and adolescents: the relation to IGF-I, IGF-II, IGFBP-1, IGFBP-2, age, sex, body mass index, and pubertal maturation. *J Clin Endocrinol Metab* 80 (1995) 2534-2542
155. Kaiser E, Delling G: Osteozyten - ein Organ im Aufwind morphologischer und zellbiologischer Forschung. *Osteologie* 11 (2002) 219-236

156. Kalender WA: Abschätzung der effektiven Dosis bei Knochenmineralmessungen mit Photonenspektrometrie und Computertomographie. *Fortschr Röntgenstr* 155 (1991) 149-154
157. Kandziora F, Pflugmacher R, Scholz M, Schäfer J, Schollmeier G, Schmidmeier G, Duda G, Raschke M, Haas NP: Dose-dependent effects of combined IGF-I and TGF- β 1 application in a sheep cervical spine fusion model. *Eur Spine J* 12 (2003) 464-473
158. Karaharju EO, Aalto K, Kahri A, Lindberg LA, Kallio T, Karaharju-Suvanto T, Vauhkonen M, Peltonen J: Distraction bone healing. *Clin Orthop* 297 (1993) 38-43
159. Kaspar D, Neidlinger-Wilke C, Holbein O, Claes L, Ignatius A: Mitogens are increased in the systemic circulation during bone callus healing. *J Orthop Res* 21 (2003) 320-325
160. Kaspar K, Matziolis G, Strube P, Sentürk U, Dormann S, Bail HJ, Duda GN: A New Animal Model for Bone Atrophic Nonunion: Fixation by External Fixator. *J Orthop Res* (2008) 1-7
161. Katz JL, Meunier A: Scanning Acoustic Microscopy of human and canine cortical bone microstructure at high frequencies. *Stud Health Technol Inform* 40 (1997) 123-137
162. Katz JL, Spencer P, Nomura T, Wagh A, Wang Y: Micromechanical properties of demineralized dentin collagen with and without adhesive infiltration. *J Biomed Mater Res* 66 (2003) 120-128
163. Keller TS: Predicting the compressive mechanical behavior of bone. *Journal of Biomechanics* 27 (1994) 1159-1168
164. Keller TS, Mao Z, Spengler DM: Young's modulus, bending strength, and tissue physical properties of human compact bone. *J Orthop Res* 8 (1990) 592-603
165. Kenwright J, Goodship AE: Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures. *Clin Orthop* 241 (1989) 36-47
166. Kessler L, Adams T: Full-Volume Analysis of Material by Acoustic Microimaging. *Microscopy And Analysis (Euro)* 86 (2003) 9-11
167. Khan SM, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM: The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg* 13 (2005) 77-86
168. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE: The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 21 (2000) 215-244
169. Kirker-Head CA: Potential applications and delivery strategies for bone morphogenic proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 1 (2000) 65-92
170. Klaushofer K, Peterlik M: Pathophysiologie der Frakturheilung. *Radiologe* 34 (1994) 709-714
171. Knutsen R, Wergedal JE, Sampath TK, Baylink DJ, Mohan S: Osteogenic protein-1 stimulates proliferation and differentiation of human bone cells in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 194 (1993) 1352-1358

172. Kojimoto H, Yasui N, Goto T, Matsuda S, Shimomura Y: Bone lengthening in rabbits by callus distraction. The role of periosteum and endosteum. *J Bone Joint Surg* 70-Br (1988) 543-549
173. Kokubu T, Hak DJ, Hazelwood SJ, Reddi AH: Development of an atrophic nonunion model and comparison to a closed healing fracture in rat femur. *J Orthop Res* 21 (2003) 503-510
174. Kolbeck S, Bail H, Weiler A, Windhagen H, Haas N, Raschke M: Digital radiography. A predictor of regenerate bone stiffness in distraction osteogenesis. *Clin Orthop* 366 (1999) 221-228
175. Kornak U, Delling G, Mundlos S: Molekulare Mechanismen der Regulation der Knochendichte durch Osteoklasten. *Deutsches Ärzteblatt*. 100 (2003) 1258-1268
176. Krüger T, Reichel H, Madaj-Sterba P, Gräfe G: Extremitätenverlängerung und elektromagnetische Knochenstimulation an der Schafttibia - Tiermodell und Versuchsablauf. *Tierschutzbeauftragte* 9,1 (2000) 30-34
177. Kutscha-Lissberg F, Hopf KF: Warum versagen Osteosynthesen? Das Kreuz mit der Biomechanik und der Biologie. *Unfallchirurg* 106 (2003) 708-721
178. Kveiborg M, Flyvberg A, Eriksen EF, Kaasem M: Transforming growth factor β 1 stimulates production of insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor-binding protein-3 in human bone marrow stromal osteoblast progenitors. *J Endocrinol* 169 (2001) 549-561
179. Jowsey J: Die mikroradiographische Beurteilung der Knochenstruktur. *Triangel (Sandoz)* 12/3 (1973) 93-102
180. Lai KA, Lin CJ, Chen JH: Application of locked intramedullary nails in the treatment of complications after distraction osteogenesis. *J Bone Joint Surg* 82-B (2002) 659-665
181. Lakshmanan S, Bodi A, Raum K: Assessment of microstructure and anisotropic tissue elasticity of cortical bone from high resolution angular acoustic measurements. *IEEE Trans Ultrason Ferroelect Freq Quality Control* 54 (2007)1560-1570
182. Lam A, Sambursky RP, Maguire JI: Measurement of scleral thickness in uveal effusion syndrome. *Am J Ophthalmol* 140 (2005) 329-321
183. Lammens J, Liu Z, Aerssens J, Dequeker J, Fabry G: Distraction bone healing versus osteotomy healing: a comparative biochemical analysis. *J Bone Miner Res* 13 (1998) 279-286
184. Lamson G, Giudice LC, Rosenfeld RG: Insulin-like growth factor binding proteins: Structural and molecular relationship. *Growth factors* 5 (1991) 19-28
185. Lang G: *Histotechnik*. Springer, Wien, New York, 2006
186. Lavini F, Renzi-Brivio L De Bastiani G: Psychologic, vascular and physiologic aspects of lower limb lengthening in achondroplasties. *Clin Orthop* 250 (1990) 138-142
187. Lefer AM, Tsao PS, Ma XL, Sampath TK: Anti-ischaemic and endothelial protective actions of recombinant human osteogenic protein (hOP-1): *J Mol Cell Cardiol* 24 (1992) 585-593

188. Lemons RA, Quate CF: Acoustic microscope – scanning version. *Appl Phys Lett* 24 (1974) 163-165
189. Leonhardt H: *Histologie und Zytologie des Menschen*. 3. Auflage, Thieme, Stuttgart, 1971
190. Lewinson D, Maor G, Rozen N, Rabinovich I, Stahl S, Rachmiel A: Expression of vascular antigens by bone cells during bone regeneration in a membranous bone distraction system. *Histochem Cell Biol* 116 (2001) 381-388
191. Li CH, Dixon JS, Liu WK: Human pituitary growth hormone. XIX. The primary structure of the hormone. *Arch Biochem Biophys* 133 (1969) 70-91
192. Li CH, Dixon JS: Human pituitary growth hormone. 32. The primary structure of the hormone: revision. *Arch Biochem Biophys* 146 (1971) 233-236
193. Li RH, Bouxsein ML, Blake CA; D'Augusta D, Kim H, Li XJ, Wozney JM, Seeherman HJ: rh BMP-2 injected in a calcium phosphat paste (alpha-BSM) accelerates healing in the rabbit ulnar osteotomy model. *J Orthop Res* 6 (2003) 997-1004
194. Lieberman JR, Daluiski A, Einhorn TA: The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* 84-A (2002) 1032-1044
195. Lightowler CD: Recovery of strength and stiffness in healing of experimental fractures. *Proc R Soc Med* 65 (1972) 738-739
196. Lill CA, Hessel J, Schlegel U, Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E: Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. *J Orthop Res* 21 (2003) 836-842
197. Lind M.: Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl* 283 (1998) 2-37
198. Lind MC, Schumacher B, Soballe K, Keller J, Melsen F, Bunger CE: Transforming growth factor-beta enhances fracture healing in rabbit tibiae. *Acta Orthop Scand* 64 (1993) 553-556
199. Lind MC, Laursen M, Jensen TB, Overgaard S, Soballe K, Bunger CE: Stimulation of bone healing with growth factors in orthopedic surgery. *Ugeskr Laeger* 47 (2000) 6399-6403
200. Linde F, Sorenson HCF: The effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone. *J Biomech* 26 (1993) 1249-1252
201. Liu JB, Peterson JN, Forsberg F, Jaeger MD, Kynor DB, Kline-Schoder RJ: Acoustic microscopy system: design and preliminary results. *Ultrasonics* 42 (2004) 337-341
202. Lotz JC, Gerhart TN, Hayes WC: Mechanical properties of trabecular bone from the proximal femur: a quantitative CT study. *Journal of Computer Assisted Tomography* 14 (1990) 107-114
203. Lotz JC, Gerhart TN, Hayes WC: Mechanical properties of metaphyseal bone in the proximal femur. *Journal of Biomechanics* 24 (1991) 317-329
204. Ma ZJ, Misawa H, Yamaguchi M: Stimulatory effect of zinc on insulin-like growth and transforming growth factor beta 1 production with bone growth of new-born rats. *Int J Mol Med* 8 (2001) 623-628

205. Machado JC, Foster FS, Gotlieb AI: Measurement of the ultrasonic properties of human coronary arteries in vitro with a 50-MHz acoustic microscope. *Braz J Med Biol Res* 35 (2002) 895-903
206. Maev RG, Denisova LA, Maeva EY, Denisov A: New data on histology and physio-mechanical properties of human tooth tissue obtained with acoustic microscopy. *Ultrasound Med Biol* 28 (2002) 131-136
207. Maffulli N, Lombardi C, Matarazzo L, Nele U, Pagnotta G, Fixsen JA: A review of 240 patients undergoing distraction osteogenesis for congenital posttraumatic or postinfective lower limb length discrepancy. *J Am Coll Surg* 182 (1996) 394-402
208. Marcove RC, Arlen M. Atlas of bone pathology: with clinical and radiographic correlations: based on Henry L. Jaffe's course. Lippincott, Philadelphia, 1992
209. Markel MD, Wikenheiser MA, Morin RL, Lewallen DG, Chao EYS: Quantification of bone healing: Comparison of QCT, SPA, MRI, and DEXA in dog osteotomies. *Acta Orthop Scand* 61 (1990) 487-498
210. Markel MD, Wikenheiser MA, Chao EY: Formation of bone in tibial defects in a canine model. Histomorphometric and biomechanical studies. *J Bone Joint Surg* 73-A (1991) 914-923
211. Markel MD, Chao EY: Noninvasive monitoring techniques for quantitative description of callus mineral content and mechanical properties. *Clin Orthop* 293 (1993) 37-45
212. Mazess RB: Errors in measuring trabecular bone by computed tomography to marrow and bone composition. *Calcif Tissue Int* 35 (1983) 148-152
213. Mehrara BJ, Rowe NM, Steinbrech DS, Dudziak ME, Saadeh PB, McCarthy JG, Gittes GK, Longaker MT: Rat mandibular distraction osteogenesis: II. Molecular analysis of transforming growth factor beta-1 and osteocalcin gene expression. *Plast Reconstr Surg* 103 (1999) 536-547
214. Meyer U, Meyer T, Wiesmann HP, Kruse-Lösler B, Volmer D, Stratmann U, Joos U: Mechanical tension in distraction osteogenesis regulates chondrocytic differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg* 30 (2001) 522-530
215. Michel G: *Kompendium der Embryologie der Haustiere*. 2. Aufl., Fischer, Jena, 1977
216. Milch RA, Rall DP, Tobie JE: Fluorescence of tetracycline antibiotics in bone. *J Bone Joint Surg* 40A (1958) 897-910
217. Mohan S, Baylink DJ: Bone growth factors. *Clin Orthop* 17 (1991) 30-48
218. Morgan EF, Bayraktar HH, Keaveny TM: Trabecular bone modulus-density relationships depend on anatomic site. *Journal of Biomechanics* 36 (2003) 897-904
219. Müller J: *Handbuch der Physiologie des Menschen für Vorlesungen*. Erster Band, dritte verbesserte Auflage. Hölscher, Coblenz, 1837
220. Myers G, Bache C, Brandish C: Use of Distraction Osteogenesis Techniques in Skeletal Dysplasias. *J Pediatr Orthop* 23 (2003) 41-45

221. Niall HD: Revised primary structure for human growth hormone. *Nat New Biol* 230 (1971) 90-91
222. Nicholls PJ, Berg E, Bliven FE, Kling JM: X-ray diagnosis of healing fractures in rabbits. *Clin Orthop* 142 (1979) 234-236
223. Nickel R, Schummer A, Seiferle E: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band I: Bewegungsapparat. 6. Aufl, Paul Parey, Berlin, Hamburg, 1992*
224. Nielsen HM, Andreassen TT, Ledet T, Oxlund H: Local injection of TGF-beta increases the strength of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand* 65 (1994) 37-41
225. Nilsson H, Isgaard J, Lindahl A, Peterson L, Isaksson O: Effects of unilateral arterial infusion of GH and IGF-I on tibial longitudinal bone growth in hypophysectomized rats. *Calcif Tissue Int* 40 (1987) 91-96
226. Niyibizi C, Kim M: Novel approaches to fracture healing. *Expert Opin Investig Drugs* 9 (2000) 1573-1580
227. Nonaka K, Fukuda S, Aoki K, Yoshida T, Ohya K: Regional distinctions in cortical bone mineral density measured by pQCT can predict alterations in material property at the tibial diaphysis of the Cynomolgus monkey. *Bone* 38 (2006) 265-272
228. Northmore-Ball MD, Wood MR, Meggitt BF: A biomechanical study of the effects of growth hormone in experimental fracture healing. *J Bone Joint Surg* 62-B (1980) 391-396
229. Nutz V, von Uexküll-Güldenband V: Computertomographische Untersuchungen der Frakturheilung. *Rofo* 149 (1988) 396-401
230. Nyssen-Behets C, Arnould V, Dhem A: Hypermineralized lamellae below the bone surface: a quantitative microradiographic study. *Bone* 15 (1994) 685-689
231. Oberholzer M, Kühn H, Christen H, Ettlin R, Meyer H, Heitz PhU: A semiautomatic image analyzing system based on an APPLE II or IIc personal computer. *Virchows Arch B* 54 (1987) 111-118
232. Ohyama M, Miyasaka, Sakurai M: The mechanical behaviour and morphological structure of callus in experimental callostasis. *Bio Med Mat Eng* 4 (1994) 273-281
233. Olah AJ: Histomorphometrie des Knochens. *Verh Dtsch Ges Pathol* 58 (1974) 104-113
234. Ombredanne L: Allongement d'un fémur sur un membre trop court. *Bull Mem Soc Chir* 39 (1913) 1177-1180
235. Orbay JL, Frankel VH, Finkle JE, Kummer FJ: Canine leg lengthening by the Ilizarov technique. A biomechanical, radiologic, and morphologic study. *Clin Orthop* 278 (1992) 265-273
236. Pacicca DM, Patel N, Salisbury K, Lehmann W, Carvalho R et al. : Expression of angiogenic factors during distraction osteogenesis. *Bone* 333 (2003) 889-898
237. Paley D: Current techniques in limb lengthening. *J Pediatr Orthop* 8 (1988) 73-92

238. Paley D, Fleming B, Catagni M, Kritiansen T, Pope M: Mechanical evaluation of external fixators used in limb lengthening. *Clin. Orthop* 250 (1990a) 50-57
239. Paley D: Problems, obstacles, and complications of limb lengthening using the Ilizarov technique. *Clin Orthop* 250 (1990b) 81-104
240. Paley D, Maar DC: Ilizarov bone transport treatment for tibial defects. *J Orthop Trauma* 14 (2000) 76-85
241. Panjabi MM, Walter SD, Karuda M, White AA, Lawson JP: Correlations of radiographic analysis of healing fractures with strength: A statistical analysis of experimental osteotomies. *J Orthop Res* 3 (1985) 212-218
242. Pehlivan O, Kiral A, Mahirogullari M, Koksal O, Kaplan H: Four-point bending strength of transverse osteotomies stabilized with various Kirschner wire and tension wire band configurations. *J Hand Surg* 30-Br (2005) 428-431
243. Pelker RR, Friedlaender GE, Markham TC, Panjabi MM, Moen CJ: Effects of freezing and freeze-frying on the biomechanical properties of rat bone. *J Orthop Res* 1 (1984) 405-411
244. Peltonen JI, Kahri AI, Lindberg LA, Heikkila PS, Karaharju EO, Aalto KA: Bone formation after distraction osteotomy of the radius in sheep. *Acta Orthop Scand* 63 (1992) 599-603
245. Perren SM: Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation. *Clin Orthop* 138 (1979) 175-195
246. Perren SM: Biomechanische Grundlagen der Frakturbehandlung. *Orthopäde* 21 (1992) 3-10
247. Pfeil J: Technik der unilateralen Kallusdistraction an Femur und Tibia. *Operat Orthop Traumatol* 6 (1994) 1-28
248. Pfeil J, Grill F, Graf R: Extremitätenverlängerung, Deformitätenkorrektur, Pseudarthrosenbehandlung. Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 1996
249. Pfeil J, Heijens E, Brunnengraber G: Verlängerungsosteotomien bei Beinlängendifferenzen. *Orthopäde* 29 (2000) 775-86
250. Pfeilschifter J, Oechsner M, Naumann A, Gronwald R: Stimulation of bone matrix apposition in vitro by local growth factors: a comparison between Insulin-like growth factor and transforming growth factor beta. *Endocrinology* 127 (1990) 69-73
251. Pfeilschifter J, Laukhuf F, Muller-Beckmann B, Blim WF, Pfister H, Ziegler R: Parathyroid hormone increases the concentration of insulin-like growth factor-I and transforming growth factor beta 1 in rat bone. *J Clin Invest* 96 (1995) 767-774
252. Pollard TD, Earnshaw WC: *Cell Biology*. Saunders, Philadelphia, 2002
253. Pope MH, Outwater JO: The fracture characteristics of bone substance. *J Biomech* 5 (1972) 457-462
254. Prevrhal S, Genant HK: Quantitative Computertomographie. *Radiologe* 39 (1998) 194-202
255. Putti V: The operative lengthening of the femur. *J Am Med Ass* 17 (1921) 934-941

256. Qin L, Hung L, Leung K, Guo X, Bumrerraj S, Katz L: Staining intensity of individual osteons correlated with elastic properties and degrees of mineralization. *J Bone Miner Metab* 19 (2001) 359-364
257. Qin L, Bumrerraj S, Leung K, Katz L: Correlation study of scanning acoustic microscope reflection coefficients and image brightness intensities of micrographed osteons. *J Bone Miner Metab* 22 (2004) 86-89
258. Quate CF: Scanning Acoustic Microscopy. *Physics Today* 32 (1979) 20-21
259. Quate CF: Acoustic Microscopy. *Physics Today* 38 (1985) 34-42
260. Raben MS, Westermeyer VM: Recovery of Growth Hormone in Purification of Corticotropin. *Proc Soc exper Biol & Med* 78 (1951) 550-551
261. Rajewski F: [The value of computed tomography in evaluation of newly formed bone remodeling after lengthening] *Wartosci komputerowej tomografii wocenie przebudowy nowo powstalej kosci po wydłużeniu. Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol* 59 (1994) 73-79
262. Raschke MJ, Bail H, Windhagen HJ, Kolbeck SF, Weiler A, Raun K, Kappelgard A, Skiaerbaek C, Haas NP: Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis. *Bone* 24 (1999) 81-88
263. Raschke M, Wildemann B, Inden P, Bail H, Flyvbjerg A, Hoffmann J, Haas NP, Schmidmaier G: Bioactive implants accelerate fracture healing in pigs. *Trans Orthop Res Soc* 46 (2000)144-151
264. Raschke M, Wildemann B, Inden P, Bail H, Flyvbjerg A, Hoffmann J, Haas NP, Schmidmaier G: Insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta1 accelerates osteotomy healing using polylactide-coated implants as a delivery system: a biomechanical and histological study in minipigs. *Bone* 30 (2002) 144-151
265. Rauch F, Lauzier D, Travers R, Glorieus F, Hamdy R: Effects of locally applied transforming growth factor-beta 1 on distraction osteogenesis in a rabbit limb-lengthening model. *Bone* 26 (2000) 619-624
266. Raum K, Reissshauer J, Brandt J: Frequency and resolution dependence of the anisotropic impedance estimation in cortical bone using time-resolved scanning acoustic microscopy. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 71A (2004) 430-438
267. Raum K: Ultrasonic characterization of hard tissues. In Kundu T (Ed): *Ultrasonic Nondestructive Evaluation: Engineering and Biological Material Characterization*. CRC Press, Boca Raton, 2003, S. 761-781
268. Raum K, Leguerney I, Chandelier F, Bossy E, Talmant M, Saied A, Peyrin F, Laugier P: Bone microstructure and elastic tissue properties are reflected in QUS axial transmission measurements. *Ultrasound Med Biol* 31 (2005) 1225-1235
269. Raum K, Cleveland RO, Peyrin F, Laugier P: Derivation of elastic stiffness from site-matched mineral density and acoustic impedance maps. *Phys Med Biol* 51 (2006a) 747-758

270. Raum K, Leguerney I, Chandelier F, Talmand M, Saied A, Peyrin F, Laugier P: Site-matched assessment of structural and tissue properties of cortical bone using scanning acoustic microscopy and synchrotron radiation μ CT. *Phys Med Biol* 51 (2006b) 733-746
271. Regauer M, Jürgens I, Kotsianos D, Stützle H, Mutschler W, Schieker M: Knochenneubildung durch Osteogenic Protein-1 und autogenes Knochenmark im Problemdefektmodell der Schafstibia. *Zentralbl Chir* 130 (2005) 338-345
272. Reichel H, Krüger T, Bernstein A, Hein W: Stellenwert der Hydroxylapatitbeschichtung in der zementfreien Hüftendoprothetik: Eine Standortbestimmung. *Jahrb Orthop* 6 (1995) 169-177
273. Reichel H, Haunschild M, Krüger T, Hein W: Tibial lengthening by epiphyseal or callus distraction: 23 distraction epiphyseolyses compared to 16 corticotomies with 3-14 years follow-up. *Acta Orthop Scand* 67 (1996) 355-358
274. Reichel H: Der diaphysäre Knochen nach Kallusdistraction: Densitometrische, biomechanische und histologische Untersuchungen zur operativen Beinverlängerung. Zuckschwerdt, München, Bern, Wien, New York, 1998, zugl.: Halle, Univ, Med Fak, Habil-Schrift, 1996
275. Reichel H, Lebek S, Alter C, Hein W: Biomechanical and densitometric bone properties after callus distraction in sheep. *Clin Orthop* 357 (1998) 237-246
276. Reinbold WD: Osteodensitometrie – Wertigkeit radiologischer Verfahren: Experimentelle und klinische Erfahrungen mit der Zwei-Energie quantitativen Computertomographie. Freiberg, Univ, Med Fak, Habil-Schrift, 1987
277. Richardson JB, Cunningham JL, Goodship AE, O'Connor BT, Kenwright J: Measuring stiffness can define healing of tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br* 76 (1994) 389-394
278. Richter W, Werner E, Bär H: Grundwerte der Tiergesundheit und Tierhaltung. 2. Aufl., Fischer, Jena, 1986
279. Rinderknecht E, Humbel RE: The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253 (1978) 2769-2776
280. Ristiniemi J, Flinkkila T, Hyvonen P, Lakovaara M, Pakarinen H, Jalovaara P: Rh-BMP-7 accelerates the healing in distal tibial fractures treated by external fixation. *J Bone Surg* 89-B (2007) 265-272
281. Rho JY, Hobatho MC, Ashman RB: Relations of mechanical properties to density and CT numbers in human bone. *Medical Engineering & Physics* 17 (1995) 347-355
282. Rho JY: An ultrasonic method for measuring the elastic properties of human tibial cortical and cancellous bone. *Ultrasonics* 34 (1996) 777-783
283. Roberts A, Sporn M, Bolander M: Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis in the rat femur. *J Cell Biol* 110 (1990) 2195-2201
284. Roldan JC, Jepsen S, Schmidt C, Knuppel H, Rueger DC, Acil Y, Terheyden H: Sinus floor augmentation with simultaneous placement of dental implants in the presence of platelet-rich

- plasma or recombinant human bone morphogenetic protein-7. *Clin Oral Implants Res* 15 (2004) 716-723
285. Romeis B, Böck P: *Mikroskopische Technik*. 17. Auflage, Urban-Schwarzenberg, München, 1989
 286. Rosen V, Thies RS: *The Cellular and Molecular Basis of Bone Formation and Repair*: PG Landes Co, 1995
 287. Rueger JM: Knochenersatzmittel: Heutiger Stand und Ausblick. *Orthopäde* 27 (1998) 72-79
 288. Rüter A, Mayr E: Pseudarthrosen. *Chirurg* 70 (1999) 1239-1245
 289. Salmas MG, Nikiforidis G, Sakellaropoulos G, Kosti P, Lambiris E: Estimation of artefacts induced by the Ilizarov device in quantitative computed tomographic analysis of tibiae. *Injury* 29 (1998) 711-716
 290. Salmon WD, Daughaday WH: The importance of amino acids as dialyzable components of rat serum which promote sulfate uptake by cartilage of hypophysectomized rats in vitro. *J Lab Clin Med* 51 (1958) 167-173
 291. Sano H, Uthoff HK, Backman DS, Yeadon A: Correlation of radiographic measurements with biomechanical test results. *Clin Orthop* 368 (1999) 271-278
 292. Schenk RK: Zur histologischen Verarbeitung von unentkalkten Knochen. *Acta anat* 60 (1965) 3-19
 293. Scheven BA, Hamilton NJ, Fakkeldij TM, Duursma SA: Effects of recombinant human insulin-like growth factor I and II (IGF-I/-II) and growth hormone GH on the growth of normal adult human osteoblast-like cells and human osteosarcoma cells. *Growth Regulation* 1 (1991) 160-167
 294. Schleiden MJ: *Klassische Schriften zur Zellenlehre*: Matthias Jakob Schleiden, Theodor Schwann u. Max Schulze. Eingel. und bearb. von Ilse Jahn. 2. Aufl., Frankfurt a.M., 2003
 295. Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, Lucke M, Stemberger A, Flyvbjerg G, Raschke M: Die lokale Freisetzung von IGF-1 und TGF- β 1 aus einer biodegradierbaren Poly (D,L-Lactid) Beschichtung von Implantaten beschleunigt die Frakturheilung. *Unfallchirurg* 71 (2000) 1016-1022
 296. Schmidmaier G, Wildemann B, Bail H, Lucke M, Stemberger A, Flyvbjerg A, Haas NP, Raschke M: Local application of growth factors (IGF-I and TGF- β 1) from a biodegradable osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone* 28 (2001a) 341-350
 297. Schmidmaier G, Wildemann B, Stemberger A, Haas NP, Raschke M: Biodegradable Poly(D,L-lactide) coating of Implants for Continuous Release of Growth Factors. *J Biomed Mater Res* 58 (2001b) 449-455
 298. Schmidmaier G, Wildemann B, Cromme F, Kandziora F, Haas NP, Raschke M: Bone morphogenetic protein-2 coating of titanium implants increases biomechanical strength and

- accelerates bone remodeling in fracture treatment: a biomechanical and histological study in rats. *Bone* 30 (2002a) 816-822
299. Schmidmaier G, Wildemann B, Heeger J, Gäbelein T, Flyvberg A, Bail HJ, Raschke M: Improvement of fracture healing by systemic administration of growth hormone and local application of insulin-like growth factor-1 and transforming growth factor-beta 1. *Bone* 31 (2002b) 165-172
 300. Schmidmaier G, Wildemann B, Gäbelein T, Heeger J, Kandziora F, Haas NP, Raschke M: Synergistic effect of IGF-I and TGF-beta 1 on fracture healing in rats - Single versus combined application of IGF-I and TGF-beta 1. *Acta Orthop Scand* 74 (2003) 604-610
 301. Schmidmaier G, Lucke M, Schwabe P, Raschke M, Haas NP, Wildemann B: Collective Review: Bioactive Implants Coated with Poly(D,L-Lactide) and Growth Factors IGF I, TG- β 1, or BMP-2 for Stimulation of Fracture Healing. *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants* 16 (2006a) 63-71
 302. Schmidmaier G, Baer K, Mohr S, Kretschmar M, Beck St, Wildemann B: Biodegradable polylactide membranes for bone defect coverage: biocompatibility testing, radiological and histological evaluation in a sheep model. *Clin Oral Impl Res* 17 (2006b) 439-444
 303. Schnarkowski P, Redei J, Peterfy CG, Weidenmaier W, Mutschler W, Arand M, Reiser MF: Tibial shaft fractures: assessment of fracture healing with computed tomography. *J Comput Assist Tomogr* 19 (1995) 777-781
 304. Schneider W: Die Bedeutung der osteogenen Potenz des Rippenperiostes. Medizinische Hochschule Hannover, Habil-Schrift, 1989
 305. Schneider P, Börner W: Indikation zur Knochendichtemessung und kritische Bewertung. *Nuklearmediziner* 13 (1990) 83-91
 306. Schortinghuis J, Ruben JL, Meijer HJ, Bronckers AL, Raghoobar GM, Stegenga B: Microradiography to evaluate bone growth into a rat mandibular defect. *Arch Oral Biol* 48 (2003) 155-160
 307. Schumacher M, Schulgen G: Methodik klinischer Studien. Methodische Grundlagen der Planung, Durchführung und Auswertung. Reihe: Statistik und Ihre Anwendungen, Springer, Heidelberg, 2002, S. 377
 308. Seeherman H, LI R, Wozney J: A review of preclinical program development for evaluating injectable carriers for osteogenic factors. *J Bone Joint Surg* 85-A (2003) 96-108
 309. Shefelbine SJ, Simon U, Claes L, Gold A, Gabet Y, Bab I, Müller R, Augat P: Prediction of fracture callus mechanical properties using micro-CT images and voxel-based finite element analysis. *Bone* 36 (2005) 480-488
 310. Shieh SJ, Zimmerman MC, Langrana NA: The application of scanning acoustic microscopy in a bone remodeling study. *J Biomech Eng* 117 (1995) 286-292

311. Smith SW, Sachdeva RC, Cope JB: Evaluation of the consolidation period during osteodistraction using computed tomography. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 116 (1999) 254-263
312. Snyder SM, Schneider E: Estimation of mechanical properties of cortical bone by computed tomography. *J Orthop Res* 9 (1991) 422-431
313. Sporn MB und Todaro GJ: Autocrine secretion and malignant transformation of cells. *New England J Med* 303 (1980) 878-880
314. Sporn MB, Roberts AB: Peptide growth factors are multifunctional. *Nature* 332 (1988) 217-219
315. Sporn MB, Roberts AB: Transforming growth factor-beta. Multiple actions and potential clinical applications. *JAMA* 262 (1989) 938-941
316. Sporn MB, Roberts AB: Transforming growth factor-beta: recent progress and new challenges. *J Cell Biol* 119 (1992) 1017-1021
317. Stanitski DF, Hahcheraghi H: Results of tibial lengthening with the Ilizarov technique. *J Pediatr Orthop* 16 (1996) 168-172
318. Steen H, Fjeld TO: Lengthening osteotomy in the metaphysis and diaphysis: An experimental study in the ovine tibia. *Clin Ortho* 247 (1989) 297-305
319. Steinbrech DS, Mehrana BJ, Rowe NM, Dudziak ME, Luchs JS, Saadeh PB, Gittes GK, Longaker MT: Gene expression of TGF-beta, TGF-beta receptor, and extracellular matrix proteins during membranous bone healing in rats. *Plast Reconstr Surg* 105 (2000) 2028-2038
320. Svoboda ME, Van Wyk JJ, Klapper DG, Fellows RE, Grissom FE, Schlueter RJ: Purification of somatomedin-C from human plasma: chemical and biological properties, partial sequence analysis, and relationship to other somatomedins. *Biochemistry* 19 (1980) 790-797
321. Takushima A, Kitano Y, Harii K: Osteogenic potential of cultured periosteal cells in a distracted bone gap in rabbits. *J Surg Res* 78 (1998) 68-77
322. Thaller SR, Hoyt J, Tesluk H, Holmes R: Effect of insulin-like growth factor-1 on zygomatic arch bone regeneration: a preliminary histological and histometric study. *Ann Plast Surg* 31 (1993) 421-428
323. Thaller S, Dart A, Tesluk H: The effect of insulin-like growth factor- I on critical size calvarial defects in Sprague- Dawley rats. *Ann Plast Surg* 31 (1993) 429-433
324. Thompson EM, Price AB, Altman DG, Sowter C, Slavin G: Quantification in inflammatory bowel disease using computerised interactive image analysis. *J Clin Pathol* 38 (1985) 631-638
325. Thorey F, Windhagen H, Linnenberg D, Nolle O, Maciejowski O, Spies C: Erfassung der Knochenheilung während der Kallusdistraction durch ein automatisiertes torsionales Steifigkeitssystem. *Biomed Tech* 45 (2000) 343-348

326. Tjernstrom B, Thomas KA, Pech P: Bone remodelling after leg lengthening: evaluation with plain radiographs, and computed tomography and magnetic resonance imaging scans. *J Pediatr Orthop* 12 (1992) 751-755
327. Trippel SB, Coutts RD, Einhorn TA, Mundy GR, Rosenfeld RG: Growth factors as therapeutic agents. *J Bone Joint Surg* 78-A (1996) 1272-1286
328. Tsubota S, Tsuchiya H, Shinokawa Y, Tomita K, Minato H: Transplantation of osteoblast-like cells to the distracted callus in rabbits. *J Bone Joint Surg* 81-B (1999) 125-129
329. Turner CH, Rho JY, Takano Y, Tsui TY, Pharr GM: The elastic properties of trabecular and cortical bone tissues are similar: results from two microscopic measurement techniques. *J Biomech* 32 (1999) 437-441
330. Tylkowski CM, Wezeman H, Ray RD: Hormonal effects on the morphology of bone defect healing. *Clin Orthop* 115 (1976) 274-285
331. Urist MR: Bone formation by autoinduction. *Science* 150 (1965) 893-899
332. Van Rietbergen B, Huiskes R, Weinans H, Summer DR, Turner TM, Galante JO: The mechanism of bone remodelling and resorption around press-fitted THA stems. *J Biomech* 26 (1993) 369-382
333. Van Roermund PM: Bone growth and remodeling after distraction epiphysiolyis of the proximal tibia of the rabbit. *Clin Orthop* 266 (1991) 304-312
334. Vauhkonen M, Peltonen J, Karaharju E, Aalto K, Alitalo I: Collagen synthesis and mineralization in the early phase of distraction bone healing. *Bone Miner* 10 (1990) 171-181
335. Vecsei V, Nonnenmann HC, Klemm K, Kempf I: *Knochenbruchbehandlung*. Thieme, Stuttgart, 1995
336. Virchow R: *Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre*. August Hirschwald, Berlin, 1858
337. Vögelin E, Brekke JH, Jones NF: Heterotope und orthotope Knochenbildung mit einem vaskularisierten Periostlappen, einer Matrix und rh-BMP-2 (bone morphogenetic protein) im Rattenmodell. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4 [Suppl] (2000) 454-458
338. Volpon JB: Nonunion using a canine model. *Arch Orthop Trauma Surg*, 113 (1994) 312-7
339. Wagner H: Operative Beinverlängerung. *Chirurg* 6 (1971) 260-266
340. Wassen M, Lammens J, Tekoppele J: Collagen structure regulates fibril mineralization in osteogenesis as revealed by cross-link patterns in calcifying callus. *J Bone Miner Res* 15 (2000) 1776-1785
341. Webb JCJ, Tricker J: Bone biology - a review of fracture healing. *Current Orthopaedics* 12 (2000) 457-463
342. Welch RD, Jones AL, Bucholz RW, Reinert CM: Effect of recombinant humane bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model. *J Bone Min Res* 1 (1998) 1483-1489

343. Wenzel R: Persönliche Mitteilung, 2002
344. White SH, Kenwright J: The timing of distraction of an osteotomy. *J Bone Joint Surg* 72-B (1990) 356-361
345. Wiedemann M: Morphologische Grundlagen der Kallusdistraction. *Zentralbl Chir* 119 (1994) 587-593
346. Wildemann B, Bamdad P, Holmer C, Haas NP, Raschke M, Schmidmaier G: Local delivery of growth factors from coated titanium plates increases osteotomy healing in rats. *Bone* 34 (2004a) 862-868
347. Wildemann B, Kandziora F, Krummrey G, Palaschies N, Haas NP, Raschke M, et al: Local and controlled release of growth factors (combination of IGF-I and TGF-beta I, and BMP-2 alone) from a polylactide coating of titanium implants does not lead to ectopic bone formation in sheep muscle. *J Control Release* 95 (2004b) 249-256
348. Wilhelmi AE: Comparative Biochemistry of Growth hormone from Ox, Sheep, Pig, Horse and Fish Pituitaries. In: Smith RW, Gaebler OH (Eds): *The hypophyseal growth hormone, nature and actions*. McGraw-Hill Book Comp, New York, 1955, S. 59-69
349. Wilhelmi AE: Chemistry of Growth Hormone. In: Greep RO, Astwood EB (Eds.): *Handbook of Physiology*. Sect 7 4, Washington DC, 1974, S. 59-78
350. Wilton P: Treatment with recombinant human Insulin-like growth factor I of children with growth hormone receptor deficiency (Laron syndrome). *Acta Paediatr* 383 [Suppl] (1992) 137-142
351. Windhagen H, Witte F, Thorey F, Hurschler C, Wirth CJ: Injizierbare Trägersysteme für die Wachstumsfaktorapplikation zu minimalinvasiven Knochenheilungsstimulation. *Orthopäde* 33 (2004) 1378-1385
352. Winn SR, Uludag H, Hollinger JO: Carrier systems for bone morphogenic proteins. *Clin Orthop* 367 (1999) 95-106
353. Wirtz DC, Schiffers N, Pandorf T, Radermacher K, Weichert D, Forst R: Critical evaluation of known bone material properties to realize anisotropic FE-simulation of the proximal femur. *J Biomech* 33 (2000) 1325-1330
354. Wittmoser R: Zur Druckosteosynthese. *Langenbecks Arch Chir* 276 (1953) 229-231
355. Wolff J: *Das Gesetz der Transformation des Knochens*. Hirschwald, Berlin, 1892
356. Wozney JM: Bone morphogenetic proteins. *Prog Growth Factor Res* 1 (1989) 267-280
357. Wozney JM: The bone morphogenetic protein family and osteogenesis. *Mol Reprod Dev* 32 (1992) 160-167
358. Wozney JM: The bone morphogenetic protein family: multifunctional cellular regulators in the embryo and adult. *Eur J Oral Sci* 106 (1998) 160-166
359. Wu X, Yu H, Amos CI, Hong WK, Spitz MR: Joint effect of insulin-like growth factors and mutagen sensitivity in lung cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 92 (2000) 737-743

360. Würzler KK, Kübler NR, Reuther JF: Einfluss des Periosts auf die induzierte Knochenneubildung durch autolysierten, antigenextrahierten, allogenen Knochen - Bestimmung des Ausmaßes der Knochenneubildung mittels quantitativer Computertomographie. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4 [Suppl] (2000) 459-464
361. Yasui N, Kojimoto H, Sasaki K, Kitada A, Shimizu H, Shimomura Y: Factors affecting callus distraction in limb lengthening. *Clin Orthop* 293 (1993) 55-60
362. Yasui N, Sato M, Ochi T, Kimura T, Kawahata H, Kitamura Y, Nomura S: Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. *J Bone Joint Surg* 79-B (1997) 824-830
363. Yu Z, Boseck S: Scanning acoustic microscopy and its applications to material characterization. *Reviews of Modern Physics* 67 (1995) 863-891
364. Zapf J, Walter H, Froesch ER: Radioimmunological determination of insulin- like growth factors I and II in normal subjects and in patients with growth disorders and extrapancreatic tumour hypoglycemia. *J Clin Invest* 68 (1981) 1321-1330
365. Zhou XZ, Zhang G, Dong QR, Chan CW, Liu CF, Qin L: Low-dose X-irradiation promotes mineralization of fracture callus in a rat model. *Arch Orthop Trauma Surg.* (2008) Epub
366. Zimmerman MC, Prabhakar A, Chokshi BV, Budhwani N, Berndt H: The acoustic properties of normal and imbedded bovine bone as measured by acoustic microscopy. *J Biomed Mater Res* 28 (1994) 931-938

9. Anlagen

Wertetabellen des Vorversuches

Tab. 1. Konzentration des Ersatzproteins in [$\mu\text{g/ml}$] verdünnt durch Probenname

Zeit [h]	Membran 1	Membran 2	Membran 3	Membran 4	Mittelwert	Stabw.
0	3,20	0,00	0,00	0,00	0,80	1,38
12	18,94	18,82	20,92	18,82	19,38	0,89
24	21,30	20,05	18,20	20,18	19,93	1,11
48	21,30	20,05	19,07	21,17	20,40	0,91
168	19,68	18,57	17,09	19,44	18,70	1,01
336	18,20	16,60	15,61	22,17	18,15	2,50
672	17,34	13,26	14,50	16,97	15,52	1,70

Tab. 2. Konzentration des Ersatzproteins in $\mu\text{g/ml}$ korrigiert.

Zeit [h]	Membran 1	Membran 2	Membran 3	Membran 4	Mittelwert	Stabw.
0	3,20	0,00	0,00	0,00	0,80	1,38
12	18,94	18,82	20,92	18,82	19,38	0,89
24	22,36	21,06	19,11	21,19	20,93	1,17
48	23,42	22,06	20,97	23,29	22,44	1,00
168	22,64	21,36	19,66	22,35	21,50	1,16
336	21,84	19,92	18,74	26,60	21,78	3,00
672	21,68	16,57	18,13	21,21	19,40	2,13

Tab. 3. Gesamtkonzentration des gelösten Proteins in μg

Zeit [h]	Membran 1	Membran 2	Membran 3	Membran 4	Mittelwert	Stabw.
0	6,39	0,00	0,00	0,00	1,60	2,77
12	37,88	37,64	41,84	37,64	38,75	1,79
24	44,72	42,11	38,22	42,37	41,86	2,33
48	46,85	44,12	41,94	46,57	44,87	2,00
168	45,27	42,72	39,32	44,70	43,00	2,33
336	43,68	39,84	37,47	53,20	43,55	6,00
672	43,35	33,14	36,25	42,43	38,79	4,25

Tab. 4. Knochendichte (QCT). Vergleich der Mittelwerte und Standardabweichungen beider Seiten. Paarweiser t-Test. Die kortikale Dichte entspricht dem Mittelwert der 4 peripheren Messungen a, p, m, l. Die spongiöse Dichte entspricht dem Messwert der ROI's.

	Knochendichte (mg/ml)							
	Verlängerte Tibia				Kontrolltibia			
ROI	A	B	C	D	A	B	C	D
Gruppe A								
Kortikalis A								
MW± Stabw.	789±116 116	577±170	806±194	1334±148	1487±18	1495±25	1502±17	1464±39
p-Wert	<0,001	<0,001	<0,001	0,001				
Spongiosa A								
MW± Stabw.	589±249	510±332	387±295	20±130	0	0	0	0
p-Wert	0,001	0,007	0,013	0,342				
Gruppe B								
Kortikalis								
MW± Stabw.	948±79	822±35	939±104	1379±52	1494±13	1499±23	1509±23	1452±32
p-Wert	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001				
Spongiosa								
MW± Stabw.	202±259	476±306	367±295	0±40	0	0	0	0
p-Wert	0,055	0,006	0,010	1				
Gruppe C								
Kortikalis								
MW± Stabw.	894±85	785±115	917±62	1372±51	1493±32	1494±26	1488±31	1415±60
p-Wert	<0,001	<0,001	<0,001	0,060				
Spongiosa								
Mittelwert	213±299	752±130	596±222	0±65	0	0	0	0
p-Wert	0,100	<0,001	<0,001	0,356				
Gruppe D								
Kortikalis								
MW± Stabw.	846±87	867±100	1033±139	1296±230	1503±28	1509±28	1508±18	1462±31
p-Wert	<0,001	<0,001	<0,001	0,011				
Spongiosa								
MW± Stabw.	503±432	663±201	437±271	37±232	0	0	0	0
p-Wert	0,065	0,003	0,025	0,374				

Tab. 5. Knochenmineraldichte (QCT)-Signifikanzniveau *p*. Vergleich der Mittelwerte zwischen den Gruppen. Ergebnisse der t-Tests für Stichproben mit gleicher Varianz, Angaben der t-Tests bei ungleicher Varianz kursiv. Bei nicht messbarer spongiöser Knochendichte entfiel dieser Wert.

	Knochendichte (mg/ml)							
	Verlängerte Tibia				Kontrolltibia			
ROI	A	B	C	D	A	B	C	D
Kortikalis								
Gruppe A vs. Gruppe B	0,001	<0,001	0,036	0,212	<i>0,639</i>	<i>0,786</i>	<i>0,632</i>	<i>0,551</i>
Gruppe A vs. Gruppe C	0,025	<0,001	0,073	0,296	<i>0,651</i>	<i>0,924</i>	<i>0,344</i>	<i>0,039</i>
Gruppe A vs. Gruppe D	<i>0,777</i>	<0,001	<i>0,036</i>	0,262	<i>0,253</i>	<i>0,350</i>	<i>0,633</i>	<i>0,936</i>
Gruppe B vs. Gruppe C	<i>0,096</i>	<i>0,304</i>	<i>0,563</i>	<i>0,781</i>	<i>0,979</i>	<i>0,709</i>	<i>0,166</i>	<i>0,120</i>
Gruppe B vs. Gruppe D	0,004	0,857	0,476	0,067	<i>0,540</i>	<i>0,484</i>	<i>0,989</i>	<i>0,622</i>
Gruppe C vs. Gruppe D	<i>0,080</i>	<i>0,401</i>	0,289	0,083	<i>0,511</i>	<i>0,298</i>	<i>0,165</i>	<i>0,058</i>
Spongiosa								
Gruppe A vs. Gruppe B	<i>0,015</i>	<i>0,871</i>	entfällt	0,322	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt
Gruppe A vs. Gruppe C	<i>0,026</i>	0,098	entfällt	<i>0,548</i>	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt
Gruppe A vs. Gruppe D	<i>0,803</i>	<i>0,418</i>	<i>0,743</i>	<i>0,588</i>	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt
Gruppe B vs. Gruppe C	<i>0,995</i>	0,051	entfällt	<i>0,337</i>	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt
Gruppe B vs. Gruppe D	<i>0,155</i>	<i>0,306</i>	entfällt	0,255	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt
Gruppe C vs. Gruppe D	<i>0,179</i>	<i>0,362</i>	entfällt	0,349	entfällt	entfällt	entfällt	entfällt

Tab. 6. Mittelwertvergleich E-Module. Einfaktorielle Anova, post-Hoc, Tukey.

Abhängige Variable	(I) Implantat	(J) Implantat	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall		
						Untergrenze	Obergrenze	
ROI A	A	B	-159,80000*	49,89572	,019	-297,8767	-21,7233	
		C	-105,69429	49,89572	,177	-243,7709	32,3824	
		D	-57,71429	51,93311	,686	-201,4290	86,0004	
	B	A	159,80000*	49,89572	,019	21,7233	297,8767	
		C	54,10571	49,89572	,702	-83,9709	192,1824	
		D	102,08571	51,93311	,230	-41,6290	245,8004	
	C	A	105,69429	49,89572	,177	-32,3824	243,7709	
		B	-54,10571	49,89572	,702	-192,1824	83,9709	
		D	47,98000	51,93311	,792	-95,7347	191,6947	
	D	A	57,71429	51,93311	,686	-86,0004	201,4290	
		B	-102,08571	51,93311	,230	-245,8004	41,6290	
		C	-47,98000	51,93311	,792	-191,6947	95,7347	
ROI B	A	B	-245,22857*	62,02302	,003	-416,8652	-73,5920	
		C	-208,06571*	62,02302	,014	-379,7023	-36,4291	
		D	-290,05714*	64,55560	,001	-468,7022	-111,4121	
		A	245,22857*	62,02302	,003	73,5920	416,8652	
	B	C	37,16286	62,02302	,931	-134,4737	208,7994	
		D	-44,82857	64,55560	,898	-223,4736	133,8164	
		A	208,06571*	62,02302	,014	36,4291	379,7023	
	C	B	-37,16286	62,02302	,931	-208,7994	134,4737	
		D	-81,99143	64,55560	,590	-260,6364	96,6536	
		A	290,05714*	64,55560	,001	111,4121	468,7022	
	D	B	44,82857	64,55560	,898	-133,8164	223,4736	
		C	81,99143	64,55560	,590	-96,6536	260,6364	
B		-132,77143	71,34292	,272	-330,1990	64,6562		
ROI C	A	C	-110,57143	71,34292	,426	-307,9990	86,8562	
		D	-226,77143*	74,25606	,027	-432,2606	-21,2823	
		B	132,77143	71,34292	,272	-64,6562	330,1990	
		C	22,20000	71,34292	,989	-175,2276	219,6276	
	B	D	-94,00000	74,25606	,593	-299,4892	111,4892	
		A	110,57143	71,34292	,426	-86,8562	307,9990	
		B	-22,20000	71,34292	,989	-219,6276	175,2276	
	C	D	-116,20000	74,25606	,417	-321,6892	89,2892	
		A	226,77143*	74,25606	,027	21,2823	432,2606	
		B	94,00000	74,25606	,593	-111,4892	299,4892	
	ROI D	A	C	116,20000	74,25606	,417	-89,2892	321,6892
			B	-45,34286	72,82122	,924	-246,8614	156,1756
C			-38,14286	72,82122	,952	-239,6614	163,3756	
B		D	37,54286	75,79473	,959	-172,2043	247,2900	
		A	45,34286	72,82122	,924	-156,1756	246,8614	
		C	7,20000	72,82122	1,000	-194,3185	208,7185	
C		D	82,88571	75,79473	,697	-126,8614	292,6328	
		A	38,14286	72,82122	,952	-163,3756	239,6614	
		B	-7,20000	72,82122	1,000	-208,7185	194,3185	
D	D	75,68571	75,79473	,752	-134,0614	285,4328		
	A	-37,54286	75,79473	,959	-247,2900	172,2043		
	B	-82,88571	75,79473	,697	-292,6328	126,8614		
		C	-75,68571	75,79473	,752	-285,4328	134,0614	

*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau 0.05 signifikant.

Tab. 7. Berechnete Elastizitätsmodule. In die Berechnung der E-Module gingen ein Anteil für den kortikalen Knochen und ein Anteil für den spongiösen Knochen ein.

	Berechnetes Elastizitätsmodul (MPa)							
	Verlängerte Tibia				Kontrolltibia			
Implantat	A	B	C	D	A	B	C	D
Gruppe A								
Kortikalis								
E-Modul	8660	6330	8855	14647	16323	16414	16490	16076
Stabw.	1277	1863	2125	1620	199	277	188	432
p-Wert	<0,001	<0,001	<0,001	0,090				
Spongiosa								
E-Modul	5194	4498	3417	404	0	0	0	0
Stabw.	2200	2930	2600	1036	0	0	0	0
p-Wert	0,001	0,007	0,013	0,342				
Gruppe B								
Kortikalis								
E-Modul	10414	9023	10312	15145	16401	16457	16564	15947
Stabw.	868	385	1142	566	138	256	250	349
p-Wert	<0,001	<0,001	<0,001	0,16				
Spongiosa								
E-Modul	1921	4248	3354	0	0	0	0	0
Stabw.	2133	2682	2402	0	0	0	0	0
p-Wert	0,055	0,006	0,10	<0,001				
Gruppe C								
Kortikalis								
E-Modul	9820	8615	10068	15065	16503	16570	16333	15541
Stabw.	937	1262	687	558	307	312	335	663
p-Wert	<0,001	<0,001	<0,001	0,092				
Spongiosa								
E-Modul	1913	6636	5258	146	0	0	0	0
Stabw.	2606	1149	1964	386	0	0	0	0
p-Wert	0,100	<0,001	<0,001	0,356				
Gruppe D								
Kortikalis								
E-Modul	9293	9515	11344	14235	16503	16570	16562	16058
Stabw.	958	1100	1526	2526	307	312	199	341
p-Wert	<0,001	<0,001	<0,001	0,157				
Spongiosa								
E-Modul	4447	5852	3924	747	0	0	0	0
Stabw.	3793	1770	2245	1829	0	0	0	0
p-Wert	0,035	<0,001	0,008	0,363				

Tab. 8. Mittelwertvergleich E-Module. Einfaktorielle Anova, post-Hoc, Tukey.

Abhängige Variable	(I) Implantat	(J) Implantat	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
						Untergrenze	Obergrenze
Emodul_A	A	B	-1754,61038*	547,85696	,019	-3270,6975	-238,5232
		C	-1160,52748	547,85696	,177	-2676,6146	355,5597
		D	-633,70516	570,22760	,686	-2211,6987	944,2884
	B	A	1754,61038*	547,85696	,019	238,5232	3270,6975
		C	594,08290	547,85696	,702	-922,0042	2110,1700
		D	1120,90522	570,22760	,230	-457,0883	2698,8987
	C	A	1160,52748	547,85696	,177	-355,5597	2676,6146
		B	-594,08290	547,85696	,702	-2110,1700	922,0042
		D	526,82232	570,22760	,792	-1051,1712	2104,8158
	D	A	633,70516	570,22760	,686	-944,2884	2211,6987
		B	-1120,90522	570,22760	,230	-2698,8987	457,0883
		C	-526,82232	570,22760	,792	-2104,8158	1051,1712
Emodul_C	A	B	-1457,83559	783,34810	,272	-3625,5985	709,9273
		C	-1214,07870	783,34810	,426	-3381,8416	953,6842
		D	-2489,95934*	815,33455	,027	-4746,2385	-233,6802
		A	1457,83559	783,34810	,272	-709,9273	3625,5985
	B	C	243,75689	783,34810	,989	-1924,0060	2411,5198
		D	-1032,12375	815,33455	,593	-3288,4029	1224,1554
		A	1214,07870	783,34810	,426	-953,6842	3381,8416
	C	B	-243,75689	783,34810	,989	-2411,5198	1924,0060
		D	-1275,88064	815,33455	,417	-3532,1598	980,3985
		A	2489,95934*	815,33455	,027	233,6802	4746,2385
	D	B	1032,12375	815,33455	,593	-1224,1554	3288,4029
		C	1275,88064	815,33455	,417	-980,3985	3532,1598
B		-2692,61950*	681,01519	,003	-4577,1960	-808,0430	
Emodul_B	A	C	-2284,56985*	681,01519	,014	-4169,1464	-399,9933
		D	-3184,83901*	708,82308	,001	-5146,3684	-1223,3096
		A	2692,61950*	681,01519	,003	808,0430	4577,1960
	B	C	408,04965	681,01519	,931	-1476,5269	2292,6262
		D	-492,21950	708,82308	,898	-2453,7489	1469,3099
		A	2284,56985*	681,01519	,014	399,9933	4169,1464
	C	B	-408,04965	681,01519	,931	-2292,6262	1476,5269
		D	-900,26916	708,82308	,590	-2861,7986	1061,2603
		A	3184,83901*	708,82308	,001	1223,3096	5146,3684
	D	B	492,21950	708,82308	,898	-1469,3099	2453,7489
		C	900,26916	708,82308	,590	-1061,2603	2861,7986
		B	-497,86638	799,57991	,924	-2710,5476	1714,8149
Emodul_D	A	C	-418,81009	799,57991	,952	-2631,4913	1793,8711
		D	412,22207	832,22915	,959	-1890,8096	2715,2537
		A	497,86638	799,57991	,924	-1714,8149	2710,5476
	B	C	79,05629	799,57991	1,000	-2133,6249	2291,7375
		D	910,08845	832,22915	,697	-1392,9432	3213,1201
		A	418,81009	799,57991	,952	-1793,8711	2631,4913
	C	B	-79,05629	799,57991	1,000	-2291,7375	2133,6249
		D	831,03216	832,22915	,752	-1471,9995	3134,0638
		A	-412,22207	832,22915	,959	-2715,2537	1890,8096
	D	B	-910,08845	832,22915	,697	-3213,1201	1392,9432
		C	-831,03216	832,22915	,752	-3134,0638	1471,9995

*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau 0.05 signifikant.

Tab. 9. Knochenflächen im mikroradiografischen Längs- und Querschnitt. Mittelwerte und Standardabweichungen der verlängerten Tibiae. GFl.=Gesamtfläche, AKfl.= absolute Knochenfläche, RKfl.= relative Knochenfläche.

ROI	Gruppe	Längsschnitt verlängerte Tibiae	Querschnitt verlängerte Tibiae			
			A	B	C	D
GFl. In mm ²						
Mittelwert	A	529,21	347,28	433,00	395,74	271,67
Stabw.	A	107,68	92,94	216,29	136,10	51,96
AKfl. in mm ²						
Mittelwert	A	320,03	232,10	224,10	233,21	182,21
Stabw.	A	107,85	68,29	97,42	61,84	43,81
RKfl. in %						
Mittelwert	A	59,25	66,51	53,76	60,46	66,57
Stabw.	A	9,06	3,13	7,60	9,55	6,27
GFl. In mm ²						
Mittelwert	B	525,82	355,96	422,18	376,86	304,83
Stabw.	B	90,81	102,54	118,44	97,74	89,03
AKfl. in mm ²						
Mittelwert	B	321,50	247,59	262,94	257,01	207,40
Stabw.	B	81,52	71,76	62,69	70,03	57,53
RKfl. in %						
Mittelwert	B	61,41	69,68	63,02	68,23	68,21
Stabw.	B	12,63	7,05	6,60	6,82	6,53
GFl. In mm ²						
Mittelwert	C	535,74	301,46	364,49	335,39	271,67
Stabw.	C	74,81	68,62	112,40	88,52	46,82
AKfl. in mm ²						
Mittelwert	C	313,92	199,75	231,40	227,52	181,82
Stabw.	C	61,38	48,62	71,18	70,90	32,02
RKfl. in %						
Mittelwert	C	58,75	66,10	63,96	67,17	67,00
Stabw.	C	9,85	3,60	7,57	4,57	3,83
GFl. In mm ²						
Mittelwert	D	502,57	375,51	418,39	354,43	301,95
Stabw.	D	120,16	120,23	159,52	101,76	88,57
AKfl. in mm ²						
Mittelwert	D	319,12	247,33	252,16	238,99	224,77
Stabw.	D	147,13	107,23	82,59	88,79	74,61
RKfl. in %						
Mittelwert	D	61,38	63,67	61,62	66,06	74,01
Stabw.	D	15,68	9,86	8,32	6,97	3,56

10. Thesen

1. Aufgrund der langen und komplikationsreichen Behandlungsdauer bei der Distractionsosteogenese besteht die Optimierung des Verfahrens in der Beschleunigung der Knochenheilung.
2. Das Ziel bei der Modulation der Kallusdistraction ist die schnelle Wiederherstellung der Belastungsfähigkeit der verlängerten Extremität; um Komplikationen wie Refrakturen, Achsabweichungen und Pintrakt-Infektionen zu reduzieren bzw. zu vermeiden.
3. Mit Hilfe eines definierten Periostdefektes lässt sich an der mittlediaphysären Schafttibia eine verzögerte Knochenheilung implementieren. Ohne Therapie zeigen so behandelte Tiere eine deutlich verzögerte Osteogenese. Diese spiegelt sich in allen genutzten Untersuchungsverfahren wider.
4. Auf der Grundlage zellbiologischer Mechanismen kann die Osteogenese durch Wachstumsfaktoren beeinflusst werden.
5. Die lokale Applikation von IGF-I und TGF- β 1 ist geeignet, die Distractionsosteogenese zu beschleunigen. Es ergeben sich synergistische Effekte der beiden Wachstumsfaktoren. Im Vergleich zum Standardverfahren, der autologen Knochenplastik, zeigt das Behandlungskonzept gleichwertige bzw. bessere Ergebnisse bezüglich der biomechanischen Stabilität.
6. Eine Kombination aus autologer Spongiosaplastik und applizierten Wachstumsfaktoren (IGF-I und TGF- β 1) zeigt bessere Ergebnisse als die alleinige Behandlung mit Wachstumsfaktoren oder autologer Spongiosaplastik.
7. Die Polylaktidmembran ist geeignet, Wachstumsfaktoren lokal in ausreichender Dosierung freizusetzen. Sie lässt sich sicher und reproduzierbar implantieren und garantiert eine definierte Freisetzungskinetik am Wirkort.
8. Mit bildgebenden Verfahren (QCT) lässt sich eine Vorhersage der biomechanischen Stabilität mit einer deutlichen Regression berechnen. ($R^2=0,632$, $p=0,008$).
9. Die Ultraschallmikroskopie ergänzt etablierte Verfahren zur Verlaufskontrolle der Distractionsosteogenese. Aufgrund der Ermittlung von Struktur- und elastischen Parametern ist die Vorhersage der mechanischen Versagenslast im Vergleich zu den anderen Verfahren größer ($R^2=0,86$).

11. Tabellarischer Lebenslauf

Dr. med. Robert Fred Walter Hube, geb. am 08.01.1968 in Berlin

1974-1986	Schulbildung
1986	Abitur
1986-1989	Wehrdienst
1989-1995	Studium der Humanmedizin an der Humboldt-Universität zu Berlin und der University of Natal, Durban, South Africa
1995-2001	Weiterbildung zum Facharzt für Orthopädie an der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1997-1998	Einjähriges klinisches und Forschungs-Fellowship im Department of Orthopaedic Surgery, Allegheny University of the Health Sciences, Pittsburgh, USA
1998	Promotion zum Dr. med.
1999	Einjähriges chirurgisches Praktikum in der Unfallchirurgischen Klinik an den Berufsgenossenschaftlichen Kliniken Halle
2001	Anerkennung der Gebietsbezeichnung Orthopädie
2002	Anerkennung der Zusatzbezeichnung Chirotherapie
2003	Anerkennung der Zusatzbezeichnung Spezielle Orthopädische Chirurgie
2003-2004	OCM Klinik München
seit 2005	Leitender Arzt im Kollegialsystem der leitenden Ärzte der Klinik für Orthopädische Chirurgie München
2007	Anerkennung der Gebietsbezeichnung Orthopädie und Unfallchirurgie

München, 16.07.08

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Habilitationsschrift selbständig angefertigt habe und versichere, dass ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

München, den 16.07.2008

Dr. Robert Hube

Erklärung über frühere Habilitationsversuche

Hiermit erkläre ich, dass es keine früheren Habilitationsversuche gab, weder mit dieser Arbeit noch mit einer anderen, weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Universität.

München, den 16.07.2008

Dr. Robert Hube

Danksagung

Besonderer Dank gebührt meinem Lehrer, dem Direktor der Universitätsklinik und Poliklinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Herrn Prof. Dr. med. habil. W. Hein, der mir eine klinisch-wissenschaftliche Ausbildung ermöglichte. Ich danke Ihm für die Freiräume bei der Durchführung der Versuche und experimentellen Untersuchungen und die immerwährende Unterstützung.

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. habil. H. Reichel für die freundschaftliche Ermunterung zur Weiterentwicklung seiner Forschungsarbeiten zur Distractionsosteogenese und die vielen Ratschläge bei der Entwicklung und Durchführung des Versuchsmodells.

Herrn Dr. R. Wenzel und den Mitarbeitern der Tierklinik der Martin-Luther-Universität danke ich für die große Einsatzbereitschaft bei der Durchführung der Tierversuche und der liebevollen Pflege der Versuchstiere.

Bei Herrn Dr. Ch. Alter möchte ich mich für die zahlreichen Hinweise und Ratschläge bei der radiologischen Auswertung bedanken.

Herrn Prof. Dr. med. habil. Dr. Ing. W. Plitz, dem Leiter des Labors für Biomechanik und experimentelle Orthopädie an der Ludwig-Maximilians-Universität, möchte ich mich für die Unterstützung bei der Durchführung der biomechanischen Versuche in seinem Institut herzlich bedanken.

Mein Dank gilt meinem Freund PD Dr. med. H. Mayr, dessen ständige emotionale Aufmunterung diese Arbeit ermöglicht hat.

Besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. A. Bernstein, die mich mit großem Einsatz bei der Aufarbeitung der histologischen Ergebnisse und bei der statistischen Auswertung unterstützte und beriet.

Mehr als allen anderen danke ich meiner Frau Antje und meinen Kindern Willy, Clara und Lilly, ohne deren Toleranz und Liebe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.