

**DIE ANWENDUNG VON REKOMBINANTEM  
HOMOLOGEN WACHSTUMSHORMON BEI DER  
DISTRAKTIONSOSTEOGENESE**

**RADIOLOGISCHE, HISTOMORPHOMETRISCHE, BIOMECHANISCHE  
UND SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN AM MINISCHWEIN**

Habilitationsschrift zur Erlangung  
der venia legendi für das Fach  
Unfallchirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dr. med. Hermann Josef Bail  
aus Kirchehrenbach

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

eingereicht am: 08.12.2003

öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am: 18.10.2004

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Christoph Josten  
2. Prof. Dr. med. Dieter Nast-Kolb

für Josephine, Jakob, Kilian und Petra

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1	Die Distraktionsosteogenese	6
1.1.1	Grundsätzliches und Historisches zur Distraktionsosteogenese	6
1.1.2	Histologie der Distraktionsosteogenese	8
1.1.3	Die heutige klinische Applikation der Distraktionsosteogenese	10
1.2	Wachstumsfaktoren, Wachstumshormon (GH) und Insulin-like growth factor-I (IGF-I)	13
1.2.1	Wachstumsfaktoren	13
1.2.2	Struktur und Funktion von Wachstumshormon	16
1.2.3	GH, Insulin-like Growth Factors und ihre Bindungsproteine	18
1.2.4	GH und IGF-I bei der Knochenheilung	22
1.2.5	Der Einfluss von GH auf Knochenumbauparameter	24
1.3	Methoden zum <i>in-vivo</i> Monitoring der Regeneratkonsolidierung bei der Frakturheilung und Distraktionsosteogenese	25
1.3.1	Digitale Lumineszenzradiographie (DLR)	26
1.3.2	Sonographie	27
1.3.3	Quantitative Computertomographie (QCT)	28
1.3.4	Biomechanische Methoden	29
1.4	Wissenschaftliche Fragestellung	31
<b>2</b>	<b>Experimentelle Untersuchungen</b>	<b>34</b>
2.1	Die Entwicklung eines porcinen Modelles der Distraktionsosteogenese	34
2.1.1	Histologische und biomechanische Analyse differenter Distraktionsgeschwindigkeiten	34
2.1.2	Serologische Auswirkung der GH-Gabe im Vorversuch	36
2.1.3	Die Entwicklung einer <i>in-vivo</i> Messmethode der Regeneratsteifigkeit	40
2.2	Die Validierung der biomechanischen und bildgebenden Messmethoden bei der Distraktionsosteogenese am Minischwein	42

2.2.1	Validierung der DLR-Messung	42
2.2.2	Validierung der Ultraschallmessung und der QCT	44
2.2.3	Validierung der <i>in-vivo</i> Steifigkeitsmessung	46
2.3	Die Wirkung von GH auf die Distractionsosteogenese am Minischwein zur Beschleunigung der Regeneratkonsolidierung	49
2.3.1	Die Veränderung der Bone-Turnover-Parameter und der Serumparameter der GH-IGF-I-Achse durch die Applikation von GH	49
2.3.2	Nachweis der Ossifikationsbeschleunigung anhand bildgebender Verfahren	51
2.3.3	Biomechanische Messungen der Regeneratsteifigkeit und –festigkeit	54
2.3.4	Histologische Veränderungen des Distractionsregenerates durch die Applikation von GH	56
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
3.1	Tiermodell	59
3.2	Validierung der neu entwickelten oder an das Tiermodell adaptierten Messmethoden	62
3.2.1	Digitale Lumineszenzradiographie (DLR)	62
3.2.2	Quantitative Computertomographie (QCT)	64
3.2.3	Quantitativer Ultraschall	66
3.2.4	<i>In-vivo</i> torsionale Steifigkeit (IVTS)	69
3.3	Wirkung von GH auf die Distractionsosteogenese	71
3.3.1	Serologische Untersuchungen	71
3.3.2	Histologische Untersuchungen	76
3.3.3	Bildgebende und biomechanische Untersuchungen	77
3.4	Nebenwirkungen des Wachstumshormons	81
3.5	Schlussfolgerung	83
3.6	Ausblick	84
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>85</b>

<b>5</b>	<b>Literatur</b>	<b>88</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>109</b>
6.1	Verzeichnis der Abkürzungen	109

# **1 Einleitung**

## **1.1 DIE DISTRAKTIONSOSTEOGENESE**

### **1.1.1 GRUNDSÄTZLICHES UND HISTORISCHES ZUR DISTRAKTIONSOSTEOGENESE**

Die Distractionsosteogenese ist ein Verfahren zur Verlängerung eines Knochens bei kongenitalen Längenunterschieden von Extremitäten, Minderwuchs oder zur Überbrückung von Knochendefekten unterschiedlicher Genese. Möglich wird dies durch das Potential des Knochens zur Regeneration, wie es bei fast keinem anderen Gewebe des menschlichen Körpers vorkommt.<sup>(51)</sup> Durch entgegengesetzten axialen Zug an den zwei Segmenten eines operativ durchtrennten Knochens über einen Distractionsapparat (meist als Fixateur externe) bildet sich ein Kallusgewebe, das schließlich zum Röhrenknochen umgebaut wird. Die ersten Versuche der Extremitätenverlängerung begannen im 19. Jahrhundert. Von Langenbeck (1869), Hopkins und Penrose (1889), und von Eiselsberg (1897) beschrieben verschiedene Methoden<sup>(209)</sup>, meist als einzeitige Eingriffe. Hauptindikationen für die Extremitätenverlängerung waren Poliomyelitisfolgen, Substanzdefekte nach Osteomyelitis, Kriegsverletzungen und kongenitale Missbildungen. Die Behandlung war für die Patienten schmerzhaft und mit hohen Komplikationsraten behaftet. Die moderne Distraction begann mit Codivilla 1903, der als Fixpunkt für die Extensionsbehandlung einen Nagel in den Kalkaneus einbrachte und über diesen die Zugkräfte leitete.<sup>(91)</sup> Die Distraction wurde in einer Sitzung durchgeführt, der Patient anschliessend durch Gipsverbände immobilisiert. Mit dieser Technik erreichte er bei 26 Patienten eine Beinverlängerung zwischen drei und acht Zentimeter. 1913 führte Ombredanne eine schräge Osteotomie durch und verlängerte den Femur schrittweise um bis zu 4 cm durch eine Vorform des unilateralen Fixateurs. 1924 führte L.C.Abbott in St. Louis/USA die Drahtfixation der zu distrahierenden Fragmente ein, er erkannte auch die positive Wirkung der Latenzperiode und distrahierte erst zwei Wochen nach der Osteotomie.<sup>(2)</sup> Trotz weiter Verbreitung dieser relativ fortschrittlichen Technik wurde die Distractionsosteogenese aufgrund der Vielzahl an Komplikationen vorübergehend wieder verlassen. In Europa arbeitete Anderson an Abbotts Technik weiter. Nach anfänglichen Komplikationen entwickelte er nach langjähriger Erfahrung auf diesem Gebiet ein akzeptierbares Operationsverfahren.<sup>(9)</sup> Als signifikante Neuentwicklung präsentierte Wagner 1963 einen unilateralen

Fixateur, der eine einfache Bedienung mit hohem Patientenkomfort verknüpfte.<sup>(359)</sup> Damit wurde die Mobilisierung des Patienten, vor allem bei Distraction des Femurs, deutlich vereinfacht, nachteilig war die eingeschränkte Möglichkeit der Achsenkorrektur. Sein Verfahren, das nach der Distraction (1,5-2 mm/Tag) eine autologe Knochenspantransplantation und Plattenosteosynthese vorsah, wurde lange Zeit zum Standard im deutschsprachigen Raum.

Dem Verfahren der Knochendistraction verhalf schließlich Gavril Abramov Ilizarov aus Kurgan in Sibirien zum entscheidenden Durchbruch.<sup>(272)</sup> Seine Erkenntnisse blieben der westlichen Welt lange Zeit verschlossen, zum einen aufgrund der Publikationen in russischer Sprache, andererseits auch durch die politischen Verhältnisse. Durch die Verwertung bestehender Forschungsergebnisse, aber auch großangelegter eigener experimenteller und klinischen Studien entwickelte er in den fünfziger Jahren ein auf biologischen Grundlagen beruhendes Konzept, das sich im Prinzip bis heute durchgesetzt hat und weite Verbreitung fand.<sup>(39)</sup> Ilizarov entwickelte die Techniken und Ideen verschiedener Forscher weiter und kam durch deren Synthese mit seinen eigenen tierexperimentellen und klinischen Beobachtungen in den fünfziger Jahren zu guten Resultaten. Er erkannte die Wichtigkeit der Berücksichtigung biologischer Prinzipien bei der Knochenregeneration<sup>(173)</sup>, mit denen sich August Bier in den 20er Jahren bereits befasst hatte.<sup>(51)</sup> Ilizarov forderte eine geringstmögliche Zerstörung des Periostes sowie der medullären Vaskularisierung des Knochens an der Durchtrennungsstelle<sup>(172)</sup>, da ein minimal traumatisches Vorgehen die anschließenden Reparaturvorgänge fördert.<sup>(40,127)</sup> Vor Distractionbeginn setzte Ilizarov eine postoperative Latenzzeit von 5 bis 10 Tagen, um eine ausreichende Revaskularisation sowie eine Organisation des Bindegewebes im Distractionsspalt zu ermöglichen. Die Distraction sollte etwa 1 mm pro Tag betragen und möglichst kontinuierlich sein. Durch eine kontinuierlich wirkende Zugspannung wird die fibröse Zwischenzone, die aus mesenchymalen Zellen besteht, zur funktionellen "Wachstumsfuge".<sup>(175,176,274)</sup> Ein von ihm modifizierter Ringfixateur bot eine sehr stabile Fixierung, die jedoch geringe axiale Mikrobewegungen zulässt, welche die Bildung des Regenerates stimuliert. Der Einfluss der Rigidität des Fixateursystems auf die Kallusbildung wurde in verschiedenen Studien untersucht und die positive Wirkung von minimalen Axialbewegungen im Frakturspalt bestätigt.<sup>(87,158,375)</sup> Daher ist auch der physiologische Gebrauch der Extremität Teil von Ilizarovs

Behandlungskonzept.<sup>(174)</sup> Eine begleitende physiotherapeutische Behandlung kann auch die Atrophie von Muskeln und Knochen minimieren und das Risiko von Kontrakturen und Thrombosen senken.<sup>(120)</sup> Nach der Publikation von Ilizarovs Arbeit Anfang der 80er Jahre bemühten sich viele Autoren, die Ideen Ilizarovs weiterzuentwickeln und die Fixationssysteme zu modifizieren. Als wesentliche Ergänzung zur Methode nach Ilizarov erweiterte DeBastiani die Latenzzeit vor Distraktionsbeginn auf 14 Tage, um den sich bildenden Kallus zu distrahieren: ein Verfahren, das er als "Kallotaxis" respektive "Kallusdistraktion" bezeichnete.<sup>(100)</sup>

### **1.1.2 HISTOLOGIE DER DISTRAKTIONSOSTEOGENESE**

Die biologischen Vorgänge bei der Distraktion unterscheiden sich per definitionem im Vergleich zur sekundären Frakturheilung durch das fehlende Auftreten von chondraler Ossifikation.<sup>(101)</sup> Die Bildung des sogenannten Regenerates (Zone rapider Ossifikation zwischen den auseinander wandernden Knochenenden) wird durch die ausgeübten Zugkräfte induziert.<sup>(12,201)</sup> Es wird angenommen, dass die Zugkräfte zur Stimulation der Osteoblasten führen.<sup>(220)</sup> Der Raum zwischen den Knochenfragmenten nach Osteotomie beziehungsweise Kortikotomie besteht aus Hämatom und fibrösem Exsudat, anschließend bildet sich Resorptions- und Granulationsgewebe<sup>(368)</sup>, das sich durch metaplastische Prozesse zunehmend in ein longitudinal orientiertes, fibröses Bindegewebe umwandelt.<sup>(12,270)</sup> Innerhalb der ersten Tage wachsen Kapillaren in das interfragmentäre Gewebe ein. Nach Distraktionsbeginn bilden fibroblastenartige Zellen eine fibröse Matrix, die weitgehend aus Typ I Kollagen besteht.<sup>(361)</sup> Zentral bildet sich während der ersten Distraktionswoche eine weitgehend avaskuläre fibröse Zwischenzone aus, die erst nach Abschluss der Distraktion während der Konsolidierungsphase ossifiziert.<sup>(15,276)</sup> In der zweiten Woche der Distraktion formieren sich Osteoblasten um die Gefäßsinus und bilden mit kollagenen Fasern und Osteoid säulenartige Strukturen, die von der Osteotomieoberfläche auf die sog. fibröse Zwischenzone (FIZ, "fibrous interzone") zuwachsen, beziehungsweise sich durch "de novo"-Synthese von kollagenen Fasern während der Distraktion in der FIZ bilden. Diese lagern kortikotomienah beginnend zunehmend Mineralsalze ein, durch den Distraktionsprozess entsteht somit eine intramembranöse Knochenbildung.<sup>(176,180,272)</sup> Einzelne nachgewiesene Knorpelinseln im Regenerat wurden auf eine zu schnelle

Distraktionsgeschwindigkeit<sup>(368)</sup>, Instabilität des Fixateurs beziehungsweise vermehrte interfragmentäre Bewegungen<sup>(88)</sup> oder unzureichende Vaskularisierung zurückgeführt<sup>(182)</sup>; in anderen Untersuchungen wird das Auftreten von einzelnen Knorpelinseln als regulärer Teil der Osteogenese beschrieben.<sup>(101,122,182)</sup> Sowohl periostale als auch endostale Kallusbildung wurde in verschiedenen Studien beobachtet.<sup>(101,211,381)</sup> Dabei gehen Osteoblasten aus dem Kambium des Periostes sowie des Endostes hervor.<sup>(77,250)</sup> Es handelt sich demnach um eine plurizentrische Knochenbildung.<sup>(279)</sup> Die regenerative Aktivität der Knochenhaut wird durch den Grad der Traumatisierung bei der Osteotomie mitbestimmt.<sup>(211,368)</sup> Die Reifungsvorgänge schreiten weiter fort, die FIZ wird schließlich durch Verschmelzung der Ossifikationsfronten durchbaut. Dieser Vorgang setzt nach der Distraktionsphase ein, wenn keine Zugkräfte mehr auf das Regenerat wirken.<sup>(12)</sup> Kortikotomienah beginnend werden nun die gebildeten Trabekel einem Remodellierungsprozess unterworfen, weitere Kollagenfasern werden in die Knochensäulen miteinbezogen und bilden ein spongiöses Netzwerk mit intensiver Interaktion mit dem originären Knochen.<sup>(368)</sup> In den anschließenden Wochen entstehen longitudinal ausgerichtete lamelläre Knochentrabekel. Parallel dazu treten Osteoklasten auf, die durch Resorptionsvorgänge den Markraum modellieren, so dass schließlich wieder ein Röhrenknochen entsteht. Durch kontinuierliche Umbauprozesse werden die mechanisch stabileren Haversschen Systeme gebildet, der entstandene Neokortex nimmt an Dichte zu, die Verbindungen zum ursprünglichen Knochen werden weiter ausgebaut. Der Remodellierungsprozess lässt sich noch nach 1½ Jahren durch hohe Aktivität von Osteoklasten und –blasten nachweisen.<sup>(368)</sup>

Die Distraktionsosteogenese nach der Ilizarov-Methode versucht, diese biologischen Prozesse zu nutzen und durch möglichst kontinuierliche Zugkräfte die regenerativen Eigenschaften des Gewebes zu stimulieren, ohne die Vaskularisierung im interfragmentären Spalt zu beeinträchtigen. Die kontinuierlichen Zugkräfte auf die Weichteilstrukturen verursachen während der Distraktionsphase auch histomorphologisch nachweisbare Läsionen: An Muskelgewebe fanden sich degenerative Veränderungen bis Nekrosen einzelner Muskelfasern durch Dehnung sowie Muskelfaserdenervierungen.<sup>(121,240)</sup> Histologische Untersuchungen der Nerven, welche einer Verlängerung unterzogen wurden, zeigten segmentale Demyelinisierungen, Schwellungen der Markscheiden und Querschnitts-

verdünnungen der Axone.<sup>(340)</sup> An Sehnen wurden nach Distraction lymphozytäre Zellinfiltrationen und Rupturen einzelner Fasern festgestellt, die anschließend während der Konsolidierungsphase teils narbig ausheilten.<sup>(121)</sup> Während der Distraction kommt es zur Zunahme der Vaskularisierung, die Schäden an den Gefäßen selbst sind gering.<sup>(175)</sup> Die reparativen Vorgänge setzen bald nach der Schädigung, also noch während der Distractionphase ein. Hier kommt es dann durch Histogenese zur Vermehrung und Reparatur dieser Gewebe.<sup>(121,196)</sup> Insgesamt ist die Distractionosteogenese ein Verfahren, bei welchem eine enorm hohe osteogenetische Potenz freigesetzt wird, deren Nutzen die mikrostrukturellen Schädigungen überwiegt. In vielen Fällen, vor allem nach Trauma oder Tumorsektion, ist die Distractionosteogenese das Verfahren der Wahl zum Erhalt der jeweiligen Extremität.

### **1.1.3 DIE HEUTIGE KLINISCHE APPLIKATION DER DISTRAKTIONSOSTEOGENESE**

Die Indikationsgebiete zur Verlängerung eines Knochens sind vielfältig<sup>(259,278)</sup>, hier einige Beispiele: kongenitale Hypoplasien von Extremitätenknochen, posttraumatische Wachstumsverzögerungen z.B. nach Aitken II/III Frakturen, kongenitaler Minderwuchs (Achondroplasie / Pseudoachondroplasie / Turner-Syndrom), Knochendefekte nach Osteomyelitis, Resektion von Knochentumoren oder -zysten, Beinlängendifferenzen bei neurologischen Erkrankungen wie Poliomyelitis oder Paresen, Mandibuladistraction bei Mikrognathie und hemifacialer Mikrosomie, Knochendefekte nach Trümmerfrakturen. Die häufigsten Lokalisationen zur Distraction stellen die Knochen des Achsenskeletts dar, wobei sich vor allem der Ausgleich von Beinlängendifferenzen bewährt hat. Auch bei Substanzdefekten der langen Röhrenknochen besitzt das Verfahren einen deutlichen Vorteil verglichen mit der Überbrückung durch autologe oder heterologe Spongiosa, da sich durch die Distraction ein vollwertiger Röhrenknochen entwickelt.<sup>(64)</sup> Bei Knochendefekten wird unter anderem die Methode des Segmenttransportes angewandt: dabei wird eine defektferne Osteotomie durchgeführt, das entstandene freie Fragment wird per Fixateur von dem Osteotomiespalt weg zu dem Substanzdefekt gezogen. Das entstehende Regenerat im Osteotomiespalt gleicht die Länge des Substanzverlustes aus, im "Dockingbereich" setzen die Vorgänge der

Frakturheilung ein.

Seit der ersten Beschreibung eines Fixateurs in der Literatur durch Jean Francois Malgaigne 1840 wurde an der technischen Optimierung der Fixateursysteme gearbeitet. Die heute eingesetzten gängigen Vorrichtungen wie Ring-, Mono- oder Hybridfixateur basieren weitgehend auf den Vormodellen, jedoch sind diese durch Verwendung moderner hochwertiger Materialien stabiler und zuverlässiger. Je nach Indikation kann ein für den Patienten optimales Modell ausgewählt werden. Dennoch handelt es sich um ein relativ komplikationsreiches Verfahren, das eine optimale Zusammenarbeit von Arzt und Patient erfordert. In der Literatur wird die Inzidenz von Komplikationen je nach Auswahl der Kriterien unterschiedlich angegeben. Infektionen an den Insertionsstellen von Schanzschrauben oder Befestigungsdrähten sind häufig und können eine Osteomyelitis zur Folge haben. Es erweisen sich auch die Anpassungsvorgänge der Weichteile während der Distraction nach wie vor als ein großes Problem.<sup>(273,274)</sup> Neurovaskuläre Reaktionen auf die Zugbelastung können sensible oder selten motorische oder trophische Störungen verursachen, relative Verkürzungen der Muskulatur beziehungsweise Sehnen und Faszien bergen die Gefahr von Gelenksluxationen oder Kontrakturen (häufig Extensionsdefizit am Kniegelenk oder Pes equinus) in sich. Hier wurde eine Distraction in möglichst kleinen Inkrementen als hilfreich beschrieben.<sup>(1)</sup> Aber auch das Regenerat im Distractionsspalt verursacht häufig Probleme durch zu schnelle oder zu langsame Konsolidierung oder durch die Ausbildung von Pseudarthrosen. Bei verfrühter Entfernung des Fixateurs nach der Konsolidierungsphase sind Verbiegungen oder die Fraktur des distrahierten Knochens beschrieben worden.<sup>(338)</sup> Zur sicheren Durchbauung der Distractionzone ist eine lange Tragedauer des Fixateur externe nötig. Eine Alternative stellt der sogenannte Verfahrenswechsel dar. Hierbei wird der Fixateur externe als offenes Verfahren durch einen intramedullären Kraftträger als geschlossenes Verfahren ersetzt, eine Prozedur mit dem nicht unerheblichem Risiko einer Knocheninfektion.<sup>(161,219)</sup> Bei einer besonderen Methode der Knochenverlängerung und des Segmenttransportes wird das Transportsegment über einen bereits liegenden Marknagel transportiert. Bei diesem Verfahren ist die frühzeitige Abbau des Fixateur externe bereit impliziert, bietet jedoch mehrere weitere Komplikationsmöglichkeiten.<sup>(285)</sup> Die Distractionosteogenese ist insgesamt ein ausgesprochen zeitintensives Verfahren, das dem Patienten ein hohes Maß an Compliance abverlangt. Die psychologischen Probleme bei der Akzeptanz der sehr

langwierigen Behandlung sollten daher nicht außer Acht gelassen werden. Der Patient muss nicht nur eine relativ schmerzhafte Prozedur über sich ergehen lassen, sondern ist auch im Alltag durch den Fixateur externe bei der Verrichtung einfacher Tätigkeiten wie Ankleiden, Waschen oder der Fortbewegung in hohem Maße eingeschränkt. Eine möglichst frühzeitige Entfernung des Fixateurs ist daher wünschenswert. Zusammenfassend ergeben sich daher aus der heutigen klinischen Applikation der Distractionsosteogenese folgende Anforderungen an die klinische und experimentelle Entwicklung:

- Abkürzung der Behandlungsdauer durch eine Beschleunigung der Regeneratkonsolidierung
- Optimierung des Heilungsmonitorings, um Heilungsstörungen frühzeitig zu erfassen und um eine frühzeitige und sichere Entfernung der externen Fixation zu ermöglichen

Die untenstehenden Untersuchungen wurden zur Bearbeitung beider klinischer Fragestellungen durchgeführt um Möglichkeiten aufzuzeigen, die klinische Applikation der Distractionsosteogenese zu verbessern.

## 1.2 WACHSTUMSFAKTOREN, WACHSTUMSHORMON (GH) UND INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR-I (IGF-I)

Mehrere Studien haben gezeigt, dass nach erlittenem Schädel-Hirn-Trauma die Frakturheilung verbessert ist<sup>(331,335)</sup> und Serum von derartig verletzten Patienten eine erhöhte mitogene Aktivität von Osteoblasten bewirkt.<sup>(50)</sup> Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass ein ossäres Trauma eine Stimulierung der Frakturheilung an anderer Stelle des Skelettes induziert.<sup>(107)</sup> Dies lässt vermuten, dass ein humoraler Mechanismus zur Stimulation der Ossifikation existiert.

### 1.2.1 WACHSTUMSFAKTOREN

Ein Teil des systemischen Effektes nach Schädel-Hirn-Trauma und skelettalem Trauma wird einigen Vertretern der sog. Wachstumsfaktoren zugeschrieben, deren Konzentration im Serum von Patienten mit Distraktionsosteogenese oder Fraktur erhöht ist.<sup>(166,202,364)</sup> Die bisherigen Versuche, die Frakturheilung zu beschleunigen, haben sich im wesentlichen auf die Definition und Applikation von unterschiedlichen Wachstumsfaktoren konzentriert. Neue Techniken auf dem Gebiet der Zell- und Molekularbiologie ermöglichen es zunehmend, die zugrundeliegenden Vorgänge bei der Reparatur von ossärem Gewebe zu verstehen. Zu dem bisher bekannten histologischen Algorithmus der Frakturheilung sind Modelle der Regulation von Mitoseaktivität, Migration, Transformation, Differenzierung und Syntheseaktivität der beteiligten Zellen getreten. Als bekannte lokal regulierende Substanzen werden die immunmodulierenden Zytokine (z.B. Interleukin-1, Interleukin-6) und die sog. Wachstumsfaktoren, eine Gruppe von Signalpeptiden, unterschieden.<sup>(108)</sup> Von letzteren wird angenommen, dass sie eine führende Rolle bei der Regulation der Frakturheilung spielen. Folgende fünf Gruppen von Wachstumsfaktoren scheinen bei den lokalen Regelmechanismen, der Knorpel- und Knochenformation sowie –reparation, eine wichtige Rolle zu spielen.<sup>(57,60,192,229,233,253,254,304,332,349)</sup>

- *platelet-derived growth factor* = PDGF
- *fibroblast growth factor* = FGF
- *transforming growth factor-beta* = TGF-beta
- *bone morphogenetic proteins* = BMPs
- *insulin-like growth factors* = IGFs

Vertreter aus jeder dieser Gruppen spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der embryonalen Osteogenese.

Mit dem Platelet-derived Growth Factor (PDGF) und den Fibroblast Growth Factors (FGFs) stehen Wachstumsfaktoren zur Verfügung, bei welchen eine mitogene und syntheseaktivierende Wirkung im kollagenen Bindegewebe beschrieben wurde. Es konnte gezeigt werden, dass diese mitogene und syntheseaktivierende Wirkung einen osteoinduktiven Effekt in tierexperimentellen Frakturmodellen zur Folge hat.<sup>(205,260)</sup>

Für Transforming Growth Factor-beta wurde ein breites Spektrum zellulärer Effekte nachgewiesen, insbesondere die Steuerung der Zellexpression von osteoblastären, chondrozytären und osteoklastären Vorläuferzellen.<sup>(336)</sup> Im Tierexperiment führte die Applikation von TGFs zu einer deutlichen Beschleunigung der Frakturkonsolidierung.<sup>(265,288,317)</sup> Bereits 1965 hat Urist gezeigt, dass die extraskelettale Implantation von demineralisiertem Knochen eine *de novo* Formation von Knorpel und Knochen zur Folge hat.<sup>(352)</sup> Auf der Basis dieser Entdeckung führten die nachfolgenden Untersuchungen zur Charakterisierung der Bone Morphogenetic Proteins (BMPs), von welchen derzeit zehn verschiedene Subtypen bekannt sind. BMPs haben vielfältige Aufgaben während der Embryogenese und im adulten Organismus. Vor allem BMP-2 und BMP-4 werden bei der enchondralen Ossifikation während der postnatalen Knochenformation und der Frakturheilung gefunden.<sup>(58-60,75,126,199,377,378)</sup> BMPs scheinen auch eine Rolle bei pathologischen Knochenbildungsprozessen zu spielen, so z.B. bei ektopen Ossifikationen und Knochtumoren.<sup>(135)</sup> Die Entwicklung von rekombinantem humanem BMP und die Verbindung der Substanz mit geeigneten Trägermedien (z.B. kollagene Vliese) haben nun den klinischen Einsatz ermöglicht, nachdem in tierexperimentellen Studien eine signifikante Beschleunigung der Frakturheilung durch die Applikation von BMP nachzuweisen war.<sup>(94,133,197,318)</sup> In einer Multicenter-Phase-III-Studie konnten die tierexperimentellen Ergebnisse für die Heilung von offenen Tibiafrakturen bestätigt werden.<sup>(140)</sup>

Die Wirkungsweisen und Effekte der Insulin-like growth factors werden weiter unten im Zusammenhang mit ihrer Eigenschaft als Mediatoren des Wachstumshormons besprochen.

Es ist zu erwarten, dass die lokale Applikation oben beschriebener Wachstumsfaktoren in human rekombinanter Form an z.B. offenen Frakturen oder

Pseudarthrosen bereits in naher Zukunft ein wirksames Instrument zur Behandlung und Vermeidung von Frakturheilungsstörungen bietet. Ein Nachteil der bisher beschriebenen Substanzen stellt ihre lokale Applikation dar, welche immer ein Freilegen bzw. eine Punktion der Frakturzone erfordert. Zusätzlich liegen möglicherweise inkonstante Wirkspiegel der Wachstumsfaktoren vor Ort vor und eine einmalig applizierte Dosis muss, wenn eine Revision vermieden werden soll, die Stimulation der Frakturheilung bewirken. Weitere Probleme ergeben sich aus der Definition geeigneter Trägermaterialien, welche zum einen eine gleichmäßige Freisetzung des Wachstumsfaktors gewährleisten soll und zum anderen selbst höchstmögliche Sicherheit bieten soll. Hier hat die Entscheidung, bovines Kollagen als Carrier zu verwenden, aufgrund der öffentlich geführten BSE-Diskussion, zur Verzögerung des klinischen Einsatzes von BMP-2 geführt. Neue Ansätze ergeben sich aus den Versuchen mit beschichteten Implantaten, welche in tierexperimentellen Studien zu guten Ergebnissen führten und nun in klinischen Studien ihre Sicherheit und Anwendbarkeit zeigen müssen.<sup>(318,288)</sup> Für die Distractionsosteogenese jedoch sind sowohl letztgenannte Implantate als auch die einmalige Applikation von Wachstumsfaktoren beispielsweise in den Osteotomiespalt kaum die optimale Lösung. Zum einen würde der Einsatz eines beschichteten Marknagels oder einer beschichteten Platte immer einen Verfahrenswechsel mit einer nochmaligen Operation mit all ihren nachfolgenden Risiken erfordern.<sup>(219,285,327)</sup> Zum anderen würde eine initiale lokale Applikation eines Wachstumsfaktors (beispielsweise mittels einer Kollagenvliese) möglicherweise die Regeneratbildung stören und hätte zudem ihre Wirksamkeit zum Zeitpunkt der Regeneratreifung längst verloren.<sup>(151,227,228,303)</sup>

Damit liegt der Gedanke an eine systemisch applizierbare Substanz nahe, welche kontinuierlich ihre Wirksamkeit entfaltet. Systemisch applizierte Wachstumsfaktoren haben jedoch in der Vergangenheit entweder keine Wirkung entfaltet oder zu signifikanten Nebenwirkungen geführt.<sup>(216,258)</sup>

Somit hat sich das Augenmerk der vorliegenden Studie auf die systemische Applikation von Wachstumshormon (Growth Hormone = GH) gerichtet, für dessen Einfluss auf die Frakturheilung widersprüchliche Daten vorliegen<sup>(30,74)</sup>, jedoch in wenigen klinischen Versuchen vielversprechende Ergebnisse publiziert wurden.<sup>(214,215)</sup>

Wachstumshormon (GH) ist ein systemisch zirkulierendes Hormon, welches vorwiegend über die Wirkung von Insulin-like Growth Factor I (IGF1) wachstumsstimulierend wirkt. In Zellkulturen konnte der anabole Effekt sowohl von GH als auch von IGF1 auf Osteoblasten und Chondrozyten nachgewiesen werden.<sup>(38,203)</sup>

### 1.2.2 STRUKTUR UND FUNKTION VON WACHSTUMSHORMON

Der Zusammenhang zwischen Hypophyse und Wachstum wurde entdeckt, als man feststellte, dass Patienten mit Akromegalie oder Gigantismus Hypophysentumoren aufwiesen. Anfang der zwanziger Jahre züchteten Evans und Long Riesenratten, indem sie normalen Ratten ein Extrakt aus Rinderhypophysen injizierten. Zwischen 1945 und 1960 wurde in mehreren Versuchen festgestellt, dass das Wachstumshormon bei der jeweiligen Spezies, von welcher es gewonnen wurde, und bei Tieren von geringerer Entwicklungsstufe wirkt.<sup>(370,371)</sup> 1951 entwickelte Raben eine Methode, um Wachstumshormon aus den Hypophysen Verstorbener zu isolieren und wies im Anschluss nach, dass dieses bei einem zwergenhüchsigem Patienten das Wachstum stimuliert.<sup>(281)</sup> Daraufhin wurde in den USA die *National Pituitary Agency* gegründet, welche die Gewinnung von GH aus humanen Hypophysen organisierte und lange Zeit die einzige Quelle für menschliches Wachstumshormon darstellte, um Kinder mit Wachstumsstörungen behandeln zu können. Anfang der siebziger Jahre gelang es dann schließlich, die Struktur von Wachstumshormon aufzuklären.<sup>(225,226,262,372)</sup> Das Wachstumshormon (auch: somatotropes Hormon, Somatotropin, Growth Hormone) von Mensch und anderen Säugetieren ist ein aus 191 Aminosäuren bestehendes Polypeptid und wird in der Adenohypophyse gebildet. Die der Entdeckungsgeschichte zuzuschreibenden Nomenklaturen sind noch nicht vereinheitlicht: STH = somatotropes Hormon, Somatotropin; GH = Growth Hormone. Speziesangaben, wie z.B. b = bovin, h = human, p = porcine, werden vorangestellt, ebenso die Herkunft aus gentechnologischer Produktion, die mit einem "r" für rekombinant gekennzeichnet wird. Heute wird Wachstumshormon gentechnologisch mit Hilfe von E.coli Bakterien hergestellt. Das von den Bakterien produzierte Wachstumshormon wird gereinigt und lyophilisiert.<sup>(3,4,321)</sup> Die Sekretion des Wachstumshormons durch die Adenohypophyse erfolgt über eine pulsatile Freisetzung in einem diurnalen Rhythmus, die Hauptfreisetzung findet während der

Nacht statt bzw. während des Schlafens.<sup>(374)</sup> Viele physiologische Faktoren, wie Alter, Geschlecht, Entwicklungsstadium, Ernährungszustand, Körperzusammensetzung, Trainingszustand, Stress und auch andere Hormone haben einen Einfluss auf die Amplitude und Frequenz der Wachstumshormonsekretion. Die Kontrolle der Wachstumshormonfreisetzung durch die Adenohypophyse erfolgt vor allem über zwei im Hypothalamus gebildete Peptide, das Wachstumshormon-Releasing Hormon und das Somatostatin.<sup>(56,65,132,144,145,341,363)</sup> Wachstumshormon wird von der Adenohypophyse in den Blutkreislauf abgegeben. Im Blut wurden bisher zwei verschiedene Wachstumshormon-Bindungsproteine (GHBPs = *growth hormone-binding proteins*) identifiziert. Die Bindung des Wachstumshormons an ein Bindungsprotein erhöht seine Halbwertszeit, die durchschnittliche Halbwertszeit von Wachstumshormon beträgt frei 9, an ein Bindungsprotein gebunden 29 Minuten. Mit diesen Bindungsproteinen oder auch frei gelangt das Wachstumshormon zu seinen Zielzellen, diese besitzen membranständige Glykoproteinrezeptoren für Wachstumshormon. Wachstumshormonrezeptoren wurden bisher in verschiedensten Geweben nachgewiesen, so z.B. in der Muskulatur, im Fettgewebe, im Herz, in der Leber, den Ovarien, auf Fibroblasten, Osteoblasten und Lymphozyten.<sup>(298)</sup>

Wachstumshormon wird schon seit längerer Zeit in der Medizin therapeutisch eingesetzt bei Kindern mit Wachstumshormonmangel, Turnersyndrom und chronischem Nierenversagen. Auch bei Erwachsenen mit einem Wachstumshormondefizit, z.B. nach Hypophysektomie oder Traumatisierung der Hypophyse ist die Gabe von Wachstumshormon angezeigt. Unter der Therapie kommt es zu einer Zunahme an Muskelmasse und zu der Ausbildung eines günstigeren Verhältnisses von Muskelmasse zu Fett, weshalb Wachstumshormon auch zunehmend im Sport als Dopingmittel Verwendung findet.<sup>(261)</sup> Der anabole Effekt von Wachstumshormon kann aber auch bei kachektischen Zuständen, z.B. nach großen Operationen, infolge von Polytraumata, schweren Brandverletzungen oder bei Krebspatienten ausgenutzt werden.<sup>(47,159,282)</sup> Die positive Beeinflussung von Wundheilungsstörungen oder Knochenbruchheilungen durch die Gabe von Wachstumshormon ist bereits beschrieben, ebenso ist ein experimenteller Einsatz bei Osteoporose erwähnt.<sup>(8,214,215)</sup>

### 1.2.3 GH, INSULIN-LIKE GROWTH FACTORS UND IHRE BINDUNGSPROTEINE

Mit der direkten Wirkung von Wachstumshormon auf seine Zielzelle lassen sich jedoch nicht alle Beobachtungen der GH-Wirkung zufriedenstellend erklären. 1958 postulierten Salmon und Daughaday, dass es einen Botenstoff für die Vermittlung der Effekte des Hormons im Serum geben müsste.<sup>(301)</sup> Sie stellten fest, dass Blutserum den Einbau von Sulfat ins Knorpelgewebe fördert; das Serum von hypophysectomierten Ratten löste diesen Effekt nicht aus, auch dann nicht, wenn man dem Serum Wachstumshormon hinzufügt. Wurden jedoch hypophysectomierte Ratten mit Wachstumshormon behandelt, so konnte mit deren Serum der oben genannte Effekt wieder erzielt werden.<sup>(105)</sup> Dies führte zu der Theorie, dass nicht Wachstumshormon selbst diesen Prozess auslöst sondern Mediatoren, die man zunächst aufgrund ihrer Wirkung "*Sulfation Factors*", später Somatomedine nannte. 1972 wurden aus Serum Faktoren isoliert, welche die Zellteilung stimulierten und als deren Produktionsstätte man die Leber identifizierte. Diese wurden "*MSA - Multiplication-stimulating activity*" genannt. Bei der Identifizierung der Struktur des Somatomedin C<sup>(339)</sup> stellte sich heraus, dass es mit dem von Rinderknecht und Humbel aus dem menschlichen Körper isolierten IGF-I strukturidentisch ist.<sup>(295)</sup> Schließlich zeigte sich, dass all diese Substanzen identisch sind; heute werden sie Insulin-like growth factors (IGFS) genannt.<sup>(128)</sup> IGF-I ist ein Peptid bestehend aus 70 Aminosäuren, IGF-II besteht aus 67 Aminosäuren.<sup>(170,294)</sup> IGF-I wird vor allem in der Leber gebildet, seine Produktion unterliegt dort ganz dem Einfluss von Wachstumshormon.<sup>(49,52)</sup> Während der Blutspiegel des Wachstumshormons aufgrund seiner pulsatilen Freisetzung und seiner geringen Halbwertszeit schwankt (s.o.), ist der Blutspiegel des aus der Leber freigesetzten IGF-I relativ konstant.(s.u.) Aber auch diverse andere Zellen sind in der Lage, IGF-I zu synthetisieren, so z.B. die Zellen des Knochenmarks sowie Osteoblasten und Chondrozyten.<sup>(10,154)</sup> Durch Ausschüttung von GH aus dem Hypophysenvorderlappen wird in den Leberzellen vermehrt IGF-I produziert und in die Blutbahn abgegeben.<sup>(319)</sup> In den Leberzellen sind im Vergleich zu allen anderen Geweben die höchsten Konzentrationen an IGF-I mRNA nachzuweisen. Beim Menschen ist der IGF-I Spiegel im Serum eng mit der Produktion und dem Wirksamwerden des Wachstumshormons beim Längenwachstum verbunden. Die Serumkonzentration steigt während der Kindheit

langsam an, erreicht in der Pubertät ein Maximum und fällt dann im Alter ab.<sup>(147)</sup> Die Wachstumshormonabhängigkeit der IGF-I-Konzentration zeigt sich auch an exzessiv gesteigerten Serumwerten bei Patienten mit Akromegalie bzw. an niedrigen Werten bei Patienten mit verminderter GH-Produktion. Der niedrigste IGF-I-Spiegel wurde bei Menschen mit Laron-Dwarfismus beschrieben, einem Krankheitsbild, das durch einen Wachstumshormonrezeptordefekt in der Zellmembran bedingt ist.<sup>(385)</sup> Die Serum-IGF-II-Konzentration beim Menschen ist im Gegensatz zum IGF-I nicht abhängig vom Wachstumshormon.<sup>(35)</sup> IGF-II scheint besonders beim Größenwachstum in der Fetalperiode eine Rolle zu spielen, wenn das Wachstumshormon noch ohne Einfluss bleibt und spielt beim erwachsenen Individuum eine eher untergeordnete Rolle. Die IGFs besitzen ähnliche biologische Wirkungen, doch erwies sich IGF-I in seiner stimulativen Wirkung auf Osteoblasten potenter als IGF-II.<sup>(320)</sup>

Die IGFs zirkulieren im Blut gebunden an Bindungsproteine (IGFBP = *Insulin-like growth factor binding protein*), die Plasmahalbwertszeit der Aggregate wird mit 4-18 Stunden angegeben. 80-85% des zirkulierenden IGF-I ist an IGFBPs gebunden, der Rest liegt als sogenanntes freies IGF-I vor. Die Bindungsproteine werden vor allem in der Leber und im Knochenmark gebildet, es sind sowohl hemmende als auch unterstützende Einflüsse auf die Wirkungen der IGFs bekannt.<sup>(43,49,52,111,186,251,296,316)</sup>

In der Blutbahn konnten bis heute sieben verschiedene IGF-binding Proteine isoliert und beschrieben werden (IGFBP-1-7). Von diesen liegen IGFBP-1, -2, -3 und -4 in so hohen Konzentrationen im Blut vor, dass man ihnen eine Modulationsfähigkeit der systemischen IGF-I Effekte zuspricht. Das IGFBP-3 ist das Haupttransportprotein für IGF-I im Serum und bindet ca. 95% des gesamten IGF-I im Serum. Nur einige Prozent sind mit den niedermolekularen Bindungsproteinen assoziiert und ein geringer Teil liegt ungebunden als freies IGF-I vor. Im Gegensatz zu dem an das IGFBP-3 gebundene IGF-I sind das freie IGF-I und das an die niedermolekularen IGFBPs gebundene IGF-I in der Lage, die Endothelbarriere zu passieren und ins Interstitium überzutreten. IGF-I und IGFBP-3 bilden zusammen mit der sog. Acid Labile Subunit (ALS) den 150-Kilodalton ternary-complex, der die zirkulierende Speicherform des IGF-I darstellt.<sup>(42,146)</sup> Das IGFBP-3 wird wie das IGF-I in den Leberzellen und zahlreichen anderen Geweben des Körpers gebildet. Beim gesunden Menschen gleicht der Verlauf der Serum-IGFBP-3-Konzentration über die Lebensjahre dem des IGF-I, allerdings ist das Maximum in der Pubertät nicht so

ausgeprägt wie beim IGF-I, so dass in dieser Zeit relativ mehr freies IGF-I vorliegt.<sup>(195)</sup> Die IGFBPs -1, -2 und -4 gehören zu den niedermolekularen Insulin-like Growth Factor Binding Proteinen. Wie oben angemerkt sind alle drei im Gegensatz zum IGFBP-3 in der Lage, die Endothelbarriere zu passieren und in den Extravasalraum überzutreten. Bar et al. vermuten, die Hauptaufgabe dieser Proteine bestehe darin, das IGF-I aus der Zirkulation ins Gewebe zu transportieren.<sup>(36,37)</sup>

Die Zielzellen besitzen IGF-Rezeptoren: Zwei in ihrer Struktur unterschiedliche IGF-Rezeptoren sind beschrieben, der Typ I-Rezeptor, ein Rezeptor vom Tyrosinkinase-Typ und der Typ II-Rezeptor, der keine Tyrosinkinaseaktivität besitzt. Mit diesem Unterschied geht ein Unterschied in deren Bindungsspezifität einher. Aufgrund der Beobachtung, dass ein gegen den Typ I-Rezeptor gerichteter Antikörper annähernd alle endogenen Effekte beider IGFs verhindert, vermutet man, dass der Typ I-Rezeptor bei den biologischen Antworten auf IGFs die wichtigere Rolle spielt.<sup>(297)</sup> Osteoblasten besitzen sowohl IGF-I- als auch IGF-II-Rezeptoren und sind zudem noch in der Lage, selbst IGF-I und IGF-II zu synthetisieren.<sup>(44,163,204,388)</sup> Wie oben erwähnt besitzen humane Osteoblasten gleichzeitig auch GH-Rezeptoren<sup>(38)</sup>, über welche GH die Proliferation und Syntheseleistung von humanen Osteoblasten *in-vitro* direkt anregen kann.<sup>(203)</sup> *In-vivo* Daten von Mäusen, Hunden und Menschen, lassen vermuten, dass auch Osteoklasten Wachstumshormonrezeptoren besitzen.<sup>(80,204,266,290,387)</sup> Neben dem endokrinen Weg sind die Zellen auch in der Lage, sich gegenseitig auf dem parakrinen Weg zu beeinflussen, was die direkte Einflussnahme einer Zelle auf ihre Nachbarzellen bedeutet. Sogar die autokrine Beeinflussung ist möglich, d.h. die Zelle stimuliert sich mit den ausgeschütteten IGFs selbst.<sup>(349)</sup>

Da dem Wachstumshormon primär das Längenwachstum der Extremitäten zugeschrieben wird, sind die Wirkmechanismen des Hormons in der Epiphysenfuge der langen Röhrenknochen Bestandteil vieler Forschungsarbeiten. Nach der Entdeckung des "Somatomedins" wurde ihm schnell eine Vermittlerrolle der Wirkungen des Wachstumshormons auf die Knorpelzellen der Epiphysenfuge zugeschrieben.<sup>(99,301)</sup> Bei *in-vitro* Kulturen von Knorpelzellen aus der Wachstumsfuge schien es zunächst so, als hätte das Wachstumshormon keinen direkten mitogenen Effekt und Somatomedin C (oder IGF-I) den alleinigen Anteil an der Replikation von Knorpelzellen.<sup>(162,187,357)</sup> *In-vivo*, bei der lokalen Gabe von Wachstumshormon in die Arterie einer Extremität hypophysektomierter Ratten,

wurde jedoch auch ein Effekt der alleinigen Gabe von GH nachgewiesen. Diese wachstumsfördernde Wirkung konnte jedoch durch die Gabe von Somatomedin C Antiserum aufgehoben werden, was - wie oben erwähnt - eine wachstumshormonvermittelte lokale Produktion von Somatomedin C nahelegt.<sup>(178,308,309)</sup> Die 1985 von Green et al. aufgestellte "dual effector theory" besagt, dass GH auf zwei verschiedene Art und Weisen auf die Epiphysenfuge wirkt: Es regt Chondrozytenvorstufen zur Differenzierung an und erhöht die Sensibilität der Zellen gegen IGF-I. Des Weiteren wird durch GH die lokale Freisetzung von IGF-I vermittelt.<sup>(141)</sup> Später konnte eine proliferationsfördernde Wirkung von GH auf Knorpelzellen hypophysectomierter Ratten auch *in-vitro* nachgewiesen werden.<sup>(231,236)</sup> Hierbei wurde gezeigt, dass GH in erster Linie auf die Praechondrozyten und IGF-I primär auf die differenzierteren Stufen wirkt.<sup>(230,232)</sup> Außerdem fand man heraus, dass die Wirkung von GH *in-vitro* im Gegensatz zu IGF-I mit zeitlicher Verzögerung einsetzt<sup>(307)</sup>, bei höherer Zelldichte nachlässt<sup>(268)</sup> und sich der jeweilige Effekt durch die Gabe einer höheren Konzentration nicht in dem Maße steigern lässt wie durch Erhöhung der Konzentration an IGF-I.<sup>(302)</sup> Im weiteren Zeitverlauf wiesen einzelne Arbeiten auch darauf hin, dass GH nicht nur in der Epiphysenfuge wirkt, sondern auch eine mitogene Wirkung auf Knorpel aus der Ohrmuschel<sup>(236)</sup>, aus Gelenk und Nasenseptum,<sup>(357)</sup> und aus dem Beckenkamm<sup>(299)</sup> entfaltet. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass GH *in-vivo* und *in-vitro* Knorpel der Wachstumsfuge der langen Röhrenknochen und in eingeschränkter Form auch auf Knorpel anderer Lokalisation proliferationsfördernd beeinflusst.

Auch die Wirkung von GH auf Knochenzellen wurde von vielen Autoren beschrieben. Dabei wurde *in-vitro* ein mitogener Effekt von GH auf fetale Mausosteoblasten gefunden.<sup>(329)</sup> Die Vermutung der direkten Stimulation von Osteoblasten durch GH<sup>(328)</sup> wurde später durch die Beschreibung des GH-Rezeptors bei einem Zellklon von Rattenosteoblasten bestätigt<sup>(38)</sup>, wobei man bei differenzierten Osteoblasten eine höhere Kapazität der GH-Rezeptoren fand als bei undifferenzierten.<sup>(330)</sup> Auch *in-vivo* konnte bei der neugeborenen Ratte ein Effekt auf die Proliferation festgestellt werden<sup>(255)</sup>, nicht jedoch beim fetalen Schwein.<sup>(103)</sup> Noch nicht abschließend geklärt ist dabei die Rolle des IGF-I. Bei unreifen Mausosteoblasten konnte die wachstumshormoninduzierte Sekretion von IGF-I *in-vitro* gesehen werden<sup>(376)</sup>, wohingegen dieser Effekt bei menschlicher Osteoblastenzellkulturen ausblieb.<sup>(203,222)</sup> Als Wirkung wird dem IGF-I am

Osteoblasten *in-vitro* sowohl bei der Maus als auch beim Menschen eine Stimulierung der Proliferation und Differenzierung sowie der Syntheseleistung zugeschrieben.<sup>(165,222,366)</sup> Ausgereifte, humane Osteoblasten reagierten *in-vitro* mit erhöhten Zellteilungsraten auf IGF-I.<sup>(366)</sup> IGF-I regt Osteoblasten zu einer verstärkten Knochenmatrixsynthese (Typ- I- Kollagen) an, verzögerte den Kollagenabbau<sup>(71,165)</sup> und stimulierte die Differenzierung von Präosteoblasten zu Osteoblasten.<sup>(241)</sup> Die Haupteffekte von IGF-I auf Osteoblasten sind somit:

1. Differenzierungsreiz für Osteoblastenvorläuferzellen (Osteoprogenitorzellen) zu Osteoblasten
2. Anregung der Osteoblasten zur Zellteilung (mitogener Effekt)
3. Stimulation zur verstärkten Matrixsynthese (Typ- I- Kollagen)

#### **1.2.4 GH UND IGF-I BEI DER KNOCHENHEILUNG**

Bei der Suche nach Substanzen, die den oft langwierigen Prozess der Frakturheilung beschleunigen, kam sehr früh schon die Idee, Versuche mit Wachstumshormon durchzuführen. Die Ergebnisse der mit Ratten, Mäusen, Hasen und Hunden durchgeführten Versuche sind jedoch uneinheitlich. Während einige Autoren über eine Beschleunigung und Verstärkung der Kallusbildung sowie eine verbesserte Kallushärtung und biomechanische Belastbarkeit der verheilten Knochendefekte und Frakturen berichten<sup>(22,28,31,32,34,264,350)</sup>, können andere Forscher diese Ergebnisse nicht bestätigen.<sup>(74,153,160,267)</sup> Die verschiedenen Versuche sind jedoch auch in ihrem Versuchsdesign sehr uneinheitlich, was deren Vergleichbarkeit erschwert. So arbeiteten die Forschungsgruppen mit verschiedenen Wachstumshormondosierungen und verschiedener Applikationsfrequenz. Einige Gruppen arbeiteten auch mit einer stark unterschiedlichen Anzahl von Versuchstieren in Versuchs- und Kontrollgruppe<sup>(160)</sup>, mit Tieren, die sich noch im Wachstum befanden<sup>(351)</sup>, oder achteten nicht auf Alter und Geschlecht der Tiere<sup>(213,351)</sup>, was bei der Gabe von Wachstumshormon von großer Bedeutung ist. Wie sich bei neueren Untersuchungen herausgestellt hat, ist auch die Herkunft des Wachstumshormons von großer Bedeutung. Durch Bildung von Antikörpern gegen allogenes GH kann das verabreichte Hormon unwirksam werden.<sup>(73,235,353,386,389,390)</sup> Bei einigen Autoren wird nicht weiter auf die Herkunft des Wachstumshormons eingegangen<sup>(153)</sup>, keine der Studien jedoch verwendete spezies-spezifisches Wachstumshormon, um den Effekt

der Antikörperbildung zu verhindern.

Die Auswirkung der Gabe von Wachstumshormon auf die histologischen Vorgänge bei der Frakturheilung ist am detailliertesten in der Arbeit von Mosekilde und Bak dargestellt.<sup>(257)</sup> Bei Ratten wurden Tibiafrakturen mit intramedullärer Schienung versorgt. Nach den ersten zehn Tagen zeigte sich dabei kein struktureller Unterschied zwischen den Wachstumshormon- und Kontrolltieren. Bei den GH-behandelten Tieren wurde jedoch eine vermehrte Einwanderung von Zellen aus dem Knochenmark in den Kallus beobachtet. Nach dem 30. Tag zeigte der Kallus bei den GH-behandelten Tieren eine deutlich geringere "Knochendichte" als in der Kontrollgruppe. Bei den GH- Tieren war der Kallus sowohl in der Länge, als auch im Durchmesser deutlich größer als der Kallus der Kontrolltiere. In der gesamten neu gebildeten Knochenmenge bestand kein Unterschied zwischen GH- und Kontrollgruppe. Nach 40 Tagen zeigte sich in der GH-Gruppe eine größere Menge an trabekulärer Knochenfläche als in der Kontrollgruppe. Nach 80 Tagen hatten die Placebo-Tiere den externen Kallus ganz abgebaut, während bei den GH- Tieren immer noch aufgelockerte Knochen trabekel um den Frakturspalt herum zu sehen war. Auch das phänotypisch Auftreten von Knorpelinseln war in der GH-Gruppe prolongiert. Insgesamt resultierte die höhere biomechanische Belastbarkeit aus der dem größeren Kallusvolumen. Das Remodeling in der GH-Gruppe zeigte sich jedoch deutlich verlangsamt was in einer verzögerten Wiederausbildung "normalen" Röhrenknochens resultierte.

IGF-I singular systemisch appliziert wird in Studien zur Beschleunigung der Frakturheilung seltener eingesetzt. Hierbei scheint es jedoch einen positiven Effekt auf die intramembranöse Knochenformation während der Frakturheilung zu haben. An hypophysektomierten Ratten konnte durch eine IGF-I-Infusion eine Beschleunigung der Heilung eines 5 mm großen Defektes im Os zygomaticum nachgewiesen werden.<sup>(345)</sup> In einem weiteren Versuch konnte Thaller zeigen, dass es bei spontan nicht heilenden Schädelfrakturen an Ratten unter der systemischen Applikation von IGF-I zu einer Proliferation von kortikalen Knochenzellen und zu einer Heilung kam.<sup>(343)</sup> Diese Studien berücksichtigten nicht die möglichen Nebenwirkungen des systemisch applizierten IGF-I, aufgrund derer IGF-I klinisch nur in ausgewählten Fällen und dann zusammen mit IGFBP-3 gegeben wird.<sup>(129,195)</sup> Eher geeignet zeigt sich IGF-I zur lokalen Applikation, bei welcher es heilungsfördernde Wirkung auf Knochendefekte entfaltet. Hinsichtlich des

Applikationsweges des IGF-I bei seiner lokalen Anwendung wurde unter anderem auf Infusionskatheder oder hyperosmolare Pumpen zurückgegriffen.<sup>(343,344)</sup> Neue Applikationsformen stellen hier die beschichteten Implantate dar, welche die lokale Konzentration an IGF-I in der Fraktur erhöhen können, offensichtlich ohne systemische Nebenwirkungen zu verursachen.<sup>(286,317)</sup>

### **1.2.5 DER EINFLUSS VON GH AUF KNOCHENUMBAUPARAMETER**

In vielen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Langzeit-Applikation beziehungsweise Substitution von GH bei wachstumshormondefizienten Patienten sowohl die Knochenmasse als auch die Serum-Marker der Knochenformation erhöht.<sup>(194,198,305,311)</sup> Dieser "Knochen-anabole" Effekt konnte auch nach Wachstumshormongabe an gesunden freiwilligen Erwachsenen und osteoporotischen älteren Personen festgestellt werden.<sup>(62,63,221,269)</sup> Insbesondere erbrachte auch die kurzzeitige systemische Gabe von GH eine längerfristige Erhöhung von Knochen-Formationsmarkern im Serum.<sup>(179,204)</sup> In experimentellen Studien kam es durch die Gabe von GH auch zu einer Zunahme der Knochenmasse bei "gesunden Tieren". Die Wachstumshormongabe an gesunden Freiwilligen war naturgemäß zu kurzzeitig, um einen ähnlichen Effekt auf die Knochenformation nachzuweisen.<sup>(62,179)</sup> Neben den Serummarkern der Knochenformation fanden sich sowohl in klinischen als auch in experimentellen Studien die Marker der Knochenresorption erhöht.<sup>(48,62,72,204,305)</sup> Ob dies jedoch auch zu einer signifikanten Vermehrung der Knochenresorption führt, konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Völlig unklar ist, ob die oben dargestellte systemische Erhöhung des Knochenbaus durch GH auch einen Einfluss auf den Kallus bei einer Fraktur oder bei der Distraktionsosteogenese hat. Bekannt ist, dass sich während der Frakturheilung und der Distraktionsosteogenese die Parameter des Knochenstoffwechsels verändern.<sup>(109,217)</sup> Es wurde versucht, charakteristische Verläufe von Serumparameter des Knochenstoffwechsel zu definieren, um bei einer Änderung auf Heilungsstörungen zurückschließen zu können.<sup>(210,218)</sup> Nach derzeitigem Wissensstand liegen jedoch keine klinischen oder experimentellen Studien vor, welche den Verlauf der Knochenumbauparameter während der Knochenheilung unter Einfluss von GH dokumentieren. In einzelnen Studien wurden die Serumwerte der Knochenumbauparameter mit denen von IGF-I korreliert, um

Hinweise zu finden, ob der Effekt von GH auf das Skelett eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigt und somit eventuell steuerbar ist.<sup>(63,305)</sup> Auch hierfür liegen für die Applikation von GH bei der Frakturheilung oder Distraktionsosteogenese keine Erkenntnisse vor.

### **1.3 METHODEN ZUM *IN-VIVO* MONITORING DER REGENERATKONSOLIDIERUNG BEI DER FRAKTURHEILUNG UND DISTRAKTIONSOSTEOGENESE**

Bei einer Studie zur Beschleunigung der Frakturheilung oder wie im vorliegenden Fall der Distraktionsosteogenese ist die Auswahl der Methoden, welche einen eventuellen Effekt der jeweiligen Intervention auf die Knochenformation nachweisen lassen, von besonderer Wichtigkeit. In experimentellen Publikationen werden am häufigsten *post-mortem* Untersuchungen des heilenden Knochens, wie z.B. destruktive Biomechanik oder histologische Aufarbeitung des Kallus, eingesetzt. Diese haben jedoch den Nachteil, dass sie klinisch nicht anwendbar sind und zudem einen eventuellen Vorsprung in der Frakturverheilung bei zu spätem Untersuchungszeitpunkt verpassen. Somit war es ein Schwerpunkt der vorliegenden Untersuchungen, Methoden zum *in-vivo* Monitoring der Distraktionsosteogenese zu entwickeln und in einer Großtierstudie zu evaluieren. In einigen Studien wurden die Schwierigkeiten der radiologisch-morphologischen<sup>(263)</sup> oder der manuellen<sup>(362)</sup> Beurteilung bei der Frakturheilung aufgezeigt.<sup>(55,275)</sup> Das konventionelle Röntgenbild ist zur Beurteilung der Qualität eines Regenerates nicht genügend aussagekräftig, die Untersucherabhängigkeit der Einschätzung der Knochenstabilität birgt immer ein Risiko für den Patienten.<sup>(55,123,238)</sup> Im konventionellen Röntgenbild werden die Strukturen des Kallus überlagert dargestellt, die Schwärzung des Filmes ist neben der Konzentration von Mineralsalzen auch von dem Durchmesser des Gewebes abhängig. Daher kann es neben der unsicheren klinischen Einschätzung der Regeneratstabilität auch bei der Interpretation der Röntgenbilder zu Fehlern kommen.<sup>(11,55,181,263)</sup> Analog werden Röntgenaufnahmen bei der Distraktionsosteogenese benutzt, um die Rate neu formierten Knochens und die Verheilung zu beurteilen, obwohl bekannt ist, dass Röntgenbilder hierfür nicht sensitiv genug sind. Zusätzlich können konventionelle Röntgenbilder neu gebildeten Knochen oder Kallus erst ab einer gewissen Quantität nachweisen; dies ist

normalerweise erst mehrere Wochen nach Distractionsbeginn der Fall.<sup>(277)</sup> Einige klinische und experimentelle Studien haben den prädiktiven Wert bildgebender Verfahren untersucht, die mechanischen Eigenschaften des sich konsolidierenden Regenerates zu bestimmen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Quantitative Computertomographie (QCT) und DEXA (dual energy x-ray absorptiometry) geeignet sind, die Stabilität des Regenerates zu quantifizieren.<sup>(117,152)</sup> Zu Studienzwecken und um einen radiologischen “gold standard” zu haben, wurde auch in der vorliegenden Studienreihe die Vorhersagekraft der QCT analysiert (s.u.). Auf absehbare Zeit werden jedoch QCT und DEXA aufgrund von Faktoren wie Verfügbarkeit, Kosten und Strahlenhygiene nur die Rolle zusätzlicher diagnostischer Hilfsmittel einnehmen und beim klinischen Monitoring der Distractionsosteogenese besonderen Fragestellungen vorbehalten sein.

### **1.3.1 DIGITALE LUMINESZENZRADIOGRAPHIE (DLR)**

Die Absorption von Röntgenstrahlen als indirekte Messung des Mineralgehaltes des Kallusgewebes einer Fraktur und damit dessen mechanischer Festigkeit wurde vielfach experimentell zur Evaluierung der Knochenstabilität eingesetzt und wurde in verschiedenen Studien untersucht.<sup>(11,76,156,292)</sup> Als problematisch werden dabei die nicht lineare Reaktion des Röntgenfilmes auf die Röntgenstrahlung und die Einschränkung des detektierbaren Wellenlängenspektrums gesehen. Die digitale Lumineszenzradiographie (DLR) nutzt anstelle eines konventionellen Röntgenfilmes eine photosensible Phosphorschicht als Detektor für die Röntgenstrahlung.<sup>(334)</sup> Im Vergleich zum konventionellen Röntgen bietet die DLR die Detektion eines deutlich breiteren Wellenlängenspektrums, eine lineare Reaktion des Detektors auf die Röntgenstrahlung, eine verbesserten Detektionseffizienz und die Möglichkeit zur digitalen Bildverarbeitung.<sup>(124,130)</sup> Aufgrund dieser signifikanten Vorteile sollte in den vorliegenden Untersuchungen mittels einer auf einem Vergleichsphantom basierenden “Knochendichtemessung“ erneut versucht werden, mittels Röntgenaufnahmen Aussagen zur biomechanischen Stabilität eines heilenden Knochens zu treffen.

### 1.3.2 SONOGRAPHIE

Die sonographische Verlaufskontrolle bei der Distractionsosteogenese ist erstmals von Correll 1988 beschrieben worden.<sup>(95)</sup> Sein Hauptanliegen war dabei, die Strahlenbelastung der Patienten (hauptsächlich Kinder) durch häufige Röntgenkontrollen herabzusetzen. Anwendungsmöglichkeiten sieht er in der Kontrolle der Distractionsstrecke sowie der Kalzifizierung des Regenerates, so dass sich Aussagen über die Distractionsgeschwindigkeit treffen lassen. Correll schreibt der Sonographie eine hohe Sensitivität zur Erkennung pathologischer Veränderungen im Distractions-spalt und im Weichteilmantel zu. Zusätzlich seien bis zu einem gewissen Grade auch Achsenabweichungen der Fragmente beurteilbar. Andere Autoren begründen den Einsatz von Ultraschall vor allem in der durch Röntgenaufnahmen unzureichenden Visualisierungsmöglichkeit des neu gebildeten kalzifizierten Gewebes während der Distractionsphase.<sup>(383)</sup> Bei den entsprechenden klinischen Untersuchungen konnten sonographisch echogene Schallreflexe bereits 1-3 Wochen post OP nachgewiesen werden, während neugebildetes Knochengewebe röntgenologisch frühestens 8 Wochen post OP sichtbar wurde. Mittels Sonographie sei es daher auch möglich, eine vorzeitige oder verzögerte Konsolidierung frühzeitig zu erkennen.<sup>(53)</sup> Manche Autoren betonen jedoch, dass mittels Sonographie die tatsächliche Festigkeit des neugebildeten Knochens nicht zuverlässig beurteilbar sei.<sup>(95,171)</sup> In einer klinischen Studie wurden Messungen von Ultraschall, DEXA und Röntgen während der Distractionsosteogenese von 10 Patienten miteinander verglichen.<sup>(117)</sup> Es wird festgehalten, dass Ultraschall und DEXA die Anwendung von konventionellen Röntgenaufnahmen reduzieren können und dass Ultraschall vor allem zur frühen Detektion der Mineralisierung im Distractions-spalt geeignet ist. In einem Review besprechen Hughes et al. die verschiedenen bildgebenden Verfahren bei der Knochenverlängerung.<sup>(169)</sup> Dabei wird bezüglich der Sonographie hervorgehoben, dass sie eine korrekte Spaltausmessung zulässt, dass frühzeitig der neugebildete Knochen und eventuelle Defekte bei der Ossifikation beurteilt werden können, und dass sie ein dreidimensionales Bild der Distractionszone vermitteln kann. Außerdem handele es sich um ein kostengünstiges, einfach und schnell durchzuführendes, strahlenfreies Verfahren. In der einzigen experimentellen Studie zum Vergleich biomechanischer Eigenschaften mit sonographischen Messungen bei der Distractionsosteogenese konnte nur eine schlechte Korrelation beider Methoden festgestellt werden.<sup>(148)</sup> Als sonographischer Messparameter wurde hierbei die

“Kortikaliskontinuität“ des Regenrates herangezogen. Entsprechend anderer Publikationen kommen auch die Autoren dieser Studie zu dem Schluss, dass dieses Verfahren keine weiteren Informationen liefern kann, sobald in der Sonographie eine kontinuierliche Kortikalis sichtbar ist. Bisher nicht untersucht wurde die Aussagekraft der Eindringtiefe der Schallwellen in das Regenerat. Daher wurden in der vorliegenden Studie Eindringtiefe der Schallsignale und Breite der FIZ mit den biomechanischen Messungen und CT-Messungen korreliert.

### 1.3.3 QUANTITATIVE COMPUTERTOMOGRAPHIE (QCT)

Die QCT wurde bereits in verschiedenen experimentellen und einigen klinischen Studien zur Untersuchung des Mineralisierungsgrades des gebildeten Regenerates bei der Distractionsosteogenese angewandt. Die theoretischen Grundlagen für diese Untersuchungen beruhen auf der Korrelation von mechanischen Eigenschaften des Knochens und seinem Mineralisierungsgrad. Diese Erkenntnisse werden seit geraumer Zeit routinemäßig bei der Diagnose und Therapiekontrolle der Osteoporose eingesetzt. Die QCT scheint auch für die Vorhersage biomechanischer Eigenschaften im heilenden Knochen eine erfolgversprechende Methode zu sein, da sich die Qualität des Regenerates durch die Quantifizierung des Mineralgehaltes bestimmen lässt. Im Gegensatz zum konventionellen Röntgen wird die Distractionszone überlagerungsfrei dargestellt. Die gute Korrelation von Mineralsalzgehalt und der Festigkeit des Kallus wurde in verschiedenen Untersuchungen bei der Frakturheilung bestätigt.<sup>(13,23,243-245)</sup> Diese experimentellen Untersuchungen haben die Aussagekraft der QCT für die Vorhersage der Belastbarkeit aufzeigen können. Es gibt dementsprechend einzelne klinische Studien, welche mittels QCT den Demontagezeitpunkt des Fixateur externe festlegen.<sup>(284)</sup> Problematisch erscheint einigen Autoren die Artefaktbildung durch den angelegten Fixateur externe zu sein.<sup>(23)</sup> In der vorliegenden Studie sollte die Messung des Mineralisierungsgrades der Distractionszone vorwiegend als Referenzmethode für die quantitative Sonographie und die quantitative DLR dienen. Somit wurden die Messungen am distrahierten Bein nach Demontage des Fixateur externe vorgenommen.

### 1.3.4 BIOMECHANISCHE METHODEN

Wie oben angeführt, fehlen derzeit klinische Methoden, objektive und quantitative Aussagen über die Belastungsfähigkeit des sich regenerierenden Knochens treffen zu können.<sup>(39,45,67,79,82,85,98,115,136,157,207,245,362,367)</sup> Die bildgebenden Verfahren bleiben, trotz des Nachweises guter Korrelation z.B. von QCT zur Biomechanik, indirekte Methoden zur Abschätzung der mechanischen Belastbarkeit. Einer der ersten biomechanischen Versuche zur Festigkeit verheilenden Knochens, die Messung der relativen Bewegungen von Frakturfragmenten zueinander, stammt von Charnley 1965. Er stellte fest, dass vom Zeitpunkt der operativen Intervention an die interfragmentären Bewegungen immer kleiner wurden, d.h. die Verbindung der Knochenenden immer steifer.<sup>(67)</sup> Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurden nachfolgend Methoden entwickelt, mit welchen bei konservativ behandelten Tibiafrakturen die Auslenkung bzw. Verbiegung eines Knochens als Funktion der applizierten Kraft gemessen werden konnte.<sup>(68,149,183)</sup> Der Nachteil dieser Methoden ist jedoch, dass sie einen schmerzhaften invasiven Eingriff darstellen, der direkten Knochenkontakt fordert oder aber aufgrund repetitiver Röntgenaufnahmen innerhalb kurzer Zeit eine hohe Strahlenbelastung implizieren. Sie erfordern z.T. die Applikation von Lokalanästhesie und sind nur bei konservativ therapierten Frakturen anwendbar. Jedoch kann mit diesen Methoden eine Grenze bestimmt werden, ab der ein heilender Knochen als "stabil" gilt und eine Vollbelastung toleriert. Abweichungen vom normalen Heilungsverlauf können als Hinweis auf eine eventuelle Pseudarthrosenbildung gewertet werden.

#### **Biomechanische Verfahren mit Fixateur externe:**

Die breite Anwendung des Fixateur externe vor allem in den 70er und 80er Jahren bei Frakturen der langen Röhrenknochen, sowie dessen Applikation bei der Distractionsosteogenese, ließ mehrere Autoren versuchen, die biomechanischen Veränderungen des heilenden Knochens direkt über diese externe Vorrichtung zu erfassen.<sup>(18,45)</sup> Bei diesem Osteosyntheseverfahren werden die mechanischen Belastungen, welcher der Knochen aufnimmt, zumindest zum Teil perkutan über das Fixateurgestell vom Knochen nach außen geleitet und distal von der Fraktur oder Defektzone wieder eingeleitet. In biomechanischen Studien wird die Steifigkeit des Knochens entweder "indirekt" über die Deformation des Fixateur externe erfasst oder "direkt" über die feste Pin-Knochenverbindung gemessen. Die vielfältigen

Messmethoden, welche darauf basierend entwickelt wurden, unterscheiden sich vor allem durch die Methoden der Signalaufnahme und –weiterleitung. So wurden Induktionsspulen<sup>(333)</sup>, mechanische Mikrometer<sup>(45,79,188-191)</sup>, Dehnungsmessstreifen<sup>(82,373)</sup> und Goniometer<sup>(115,293,324)</sup> eingesetzt. Zur Signaltransduktion kamen neben transkutanen Drähten und an den Fixateur mit Messzelle angeschlossene Kabel auch die Telemetrie zum Einsatz.<sup>(188-191)</sup> Bei den aufwendigeren Experimenten erfolgte die Validierung an dem “gold standard“ Materialtestmaschine.<sup>(45)</sup> Nachteilig sind die Beschränkung der Messmethoden auf z.T. typenspezifische Messanordnungen. Auch stellt das Einleiten einer definierten Kraft in den Knochen und somit in das Konstrukt ein Problem dar, welches beispielsweise in einer Versuchsreihe mittels einer modifizierten Haushaltswaage gelöst wurde.<sup>(82)</sup> Zum überwiegenden Teil kann die Messung der Pinbewegung nur in einer Ebene erfolgen. Zudem ist die Weiterverarbeitung der Messdaten bei manchen Versuchsreihen sehr komplex, unter anderem kommen Finite Elemente Methoden zum Einsatz.<sup>(45)</sup> Der größte Nachteil vieler dieser Methoden ist jedoch die Notwendigkeit der Entfernung oder Dynamisierung des Fixateur externe mit der Gefahr einer Achsenfehlstellung des Knochens nach Wiederanlage des Fixateurs oder Schädigung der Frakturheilungszone. Auch hat die Lockerung der Pin-Knochenverbindung einen signifikanten Einfluss auf die Messungen.<sup>(89,97)</sup> Als vorteilhaft hat sich bei den verschiedenen Untersuchungen herausgestellt, wenn die Messeinheit abnehmbar ist, der Fixateur externe belassen werden kann und somit Messungen relativ zeitsparend an verschiedenen Patienten durchgeführt werden können.<sup>(82,97)</sup> Kommerzielle Anwendung erfuhr unter anderem die Weiterentwicklung der Methode von Churches et al.<sup>(82)</sup> durch Evans, Richardson und Shah.<sup>(115,293,324)</sup> Das System ist an allen unilateralen Fixateuren einsetzbar und kommerziell unter dem Namen “Orthometer“ (Orthofix, Bussolengo, Italien) erhältlich. Nach Messungen an 212 Patienten mit dieser Methode postulierten Richardson et al. einen Grenzwert für die Heilung von Tibiafrakturen.<sup>(293)</sup> In einer weiteren Arbeit wurde die Reproduzierbarkeit und die Genauigkeit dieses Verfahrens anhand von 1800 Messungen bei 50 Patienten überprüft und die Fehlerquellen der Methode genauer evaluiert.<sup>(114)</sup> Dieses nicht-invasive Verfahren wurde auch an der Distraktionsosteogenese eingesetzt.<sup>(106)</sup> Nach dem Erreichen vorher definierter Grenzwerte erfolgte die Demontage der Fixateure, die Heilungsdauer konnte aus dem Verlauf der Steifigkeitszunahme extrapoliert werden. Trotz der demonstrierten

klinischen Einsetzbarkeit ist auch diese Methode noch mit gravierenden Nachteilen und vielfältigen Fehlerquellen behaftet. Geringe Änderungen der Beinrotation oder der Platzierung des Goniometers bewirken signifikante Änderungen der Messwerte.<sup>(114)</sup> Der entscheidende Nachteil besteht jedoch darin, dass, wie oben bereits angemerkt, der Fixateur externe entfernt werden muss. Eine klinisch applizierbare Messmethode ohne Fixateurdemontage stellt die Messung der Steifigkeit der heilenden Fraktur mit dem sogenannten Fraktometer dar (Fraktometer FM 100, Hug, Freiburg i. Breisgau).<sup>(84)</sup> Diese Messeinheit gibt die Belastung wieder, welche über den Fixateur aufgenommen wird; damit konnten an 100 Tibiaschaftfrakturen charakteristische Heilungsverläufe dargestellt werden.<sup>(89)</sup> Diese Messeinheit ist jedoch bisher nur an monolaterale Fixateure adaptierbar und eignet sich somit nicht für eine Messung am Ring- oder Halbringfixateur.

#### **1.4 WISSENSCHAFTLICHE FRAGESTELLUNG**

Wie oben dargestellt, ist die Distractionsosteogenese eine langwierige Methode, welche den Patienten eine hohe Compliance abverlangt. Bei vielen Fällen, in welchen sie eingesetzt wird, stellt sie die „ultima ratio“ dar, welche eine Amputation vermeiden lässt. Mit der Länge der Tragezeit des Fixateurs nehmen jedoch Komplikationen wie Pininfekte zu und die Leidensfähigkeit der Patienten ab. Somit ist es sinnvoll nach Möglichkeiten zur Beschleunigung der Distractionsosteogenese zu suchen. Ein weiterer Forschungsbedarf besteht hinsichtlich der Steuerung und Bestimmung des Endpunktes des Verfahrens mittel nicht-invasiver (bildgebender oder biomechanischer) Methoden. Die rechtzeitige (möglichst frühzeitige) Entfernung des Fixateur externe ohne Refrakturen oder eine Achsendeviation in Kauf zu nehmen, ist ebenso ein allfälliges klinisches Problem wie die rechtzeitige Erkennung von Komplikationen wie z.B. Regeneratversagen oder Achsenabweichung. Basierend auf den vorangegangenen Untersuchungen zur Wirkung von Wachstumshormon auf die Frakturheilung und die bisherigen Erkenntnisse zum Monitoring der Frakturheilung und Distractionsosteogenese wurden folgende Fragen formuliert:

1. Kann systemisch appliziertes Wachstumshormon (GH) die Konsolidierung des Regenerates bei der Distraktionsosteogenese beschleunigen ?
2. Welche histologisch/histomorphometrisch fassbaren Veränderungen im Regenerat (bzw. Kallus) bewirkt GH ? Hat GH einen negativen Effekt auf die Kallusmorphologie ?
3. Lässt sich ein eventuell stimulierender Effekt des Wachstumshormons an den serologischen Knochenumbauparametern ablesen ?
4. Wie wirkt sich die Applikation von Wachstumshormon bei sonst gesunden Tieren auf die Parameter der GH/IGF1 Achse aus ?
5. Lassen sich anlässlich der Versuche neue *in-vivo* Messmethoden zum biomechanischen Monitoring der Regeneratkonsolidierung evaluieren ?
6. Lassen sich die eventuellen Unterschiede hinsichtlich der Regeneratkonsolidierung zwischen den GH-behandelten Tieren und den Kontrolltieren *in-vivo* mittels bildgebender Verfahren nachweisen ?
7. Lassen sich die eventuellen Unterschiede hinsichtlich der Regeneratkonsolidierung zwischen den GH-behandelten Tieren und den Kontrolltieren *in-vivo* mittels biomechanischer Messmethoden nachweisen ?

Wie einleitend dargestellt, ist es für die Wirkung von GH wichtig, dass Wachstumshormon einer "höher entwickelten Spezies" bei einer "niedriger entwickelten Spezies" appliziert wird. So wurde in bisherigen Tierversuchen zumeist humanes oder bovines GH an Nagetieren eingesetzt. Es bleiben jedoch Zweifel, ob artfremdes GH mit Sicherheit eine Wirkung entfalten kann. Insbesondere ist, wie ebenfalls oben angeführt, die Frage der Antikörperentwicklung gegen artfremdes GH noch nicht geklärt.<sup>(73,235,353,386,389,390)</sup> In dem häufig zitierten Versuch von Carpenter et al., in welchem systemisch appliziertes humanes GH keinen Einfluß auf die Frakturheilung hat, blieb ein IGF-I Anstieg im Serum aus.<sup>(74)</sup> Somit war es nach Ansicht des Autors für den vorliegenden Versuch von besonderer Wichtigkeit, dass spezies-spezifisches (homologes) Wachstumshormon appliziert wird. Zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns, lag dieses für das Schwein, für die Ratte und für das Rind vor. Aufgrund seiner Größe schied das Rind als Versuchstier aus. Die Ratte ist zwar in vielen Versuchen zur Frakturheilung als Versuchstier verwendet worden, hat jedoch mehrere Nachteile. Erstens gelingt es bei der Ratte kaum, extreme

Frakturheilungsbedingungen zu erzeugen, Frakturen bei Ratten heilen signifikant different zum Menschen unter nahezu allen Versuchsbedingungen. Zum zweiten folgt der Gabe auch von homologem GH bei Ratten nicht immer eine IGF-I-Erhöhung. Letztere scheint beim Menschen jedoch Voraussetzung für die Entfaltung einer systemischen GH-Wirkung zu sein. Zum dritten sind die Dimensionen an den Rattenextremitäten zu gering, um ein *in-vivo* Monitoring der Regeneratkonsolidierung durchzuführen, wie es in den vorliegenden Versuchen geplant war. Ebenso sollte hinsichtlich der bildgebenden Verfahren mit klinisch eingesetzten Geräten gearbeitet werden, was entsprechende Anforderungen an die Dimensionen des Versuchstieres stellt. Da diese Voraussetzungen beim Schwein erfüllt schienen, wurde dieses als Versuchstier gewählt.

Bis zu diesem Zeitpunkt fehlte jedoch die Beschreibung eines porcinen Modells der Distraktionsosteogenese. Aufgrund der verhältnismäßig langen Extremitäten und der gut handhabbaren Körpergröße fiel die Wahl des Versuchstieres auf das Yucatan Minischwein (Yucatan Micropig®).

Für einen notwendigen Vorversuch stellten sich daher folgende Fragen:

1. Lässt sich am Minischwein eine Distraktionsosteogenese durchführen ?
2. Welche Distraktionsgeschwindigkeit ist beim Minischwein die optimale ?
3. Lassen sich die vorgesehenen Methoden zum *in-vivo* Monitoring der Frakturheilung am Minischwein durchführen ?
4. Reagiert das von uns gewählte Versuchstier auf die GH-Applikation mit einer IGF-I Erhöhung (d.h. ist die GH – IGF-I Achse intakt) ?
5. Entfaltet GH eine Wirkung auf das Skelett, welche sich an den Knochenbauparametern im Serum ablesen lässt ?

## **2 Experimentelle Untersuchungen**

### **2.1 DIE ENTWICKLUNG EINES PORCINEN MODELLES DER DISTRAKTIONSOSTEOGENESE**

#### **2.1.1 HISTOLOGISCHE UND BIOMECHANISCHE ANALYSE DIFFERENTER DISTRAKTIONSGESCHWINDIGKEITEN**

Die Distractionsosteogenese wurde in tierexperimentellen Studien bisher hauptsächlich an Schafen, Hunden und Nagetieren durchgeführt.<sup>(17,21,175,180,206,211,223,247,365,375,381)</sup> Die Gründe für den Einsatz der Distractionsosteogenese am porcinen Modell sind oben bereits erwähnt worden (siehe 1.4.). Zudem bestehen gemäß weniger Veröffentlichungen hinsichtlich der Frakturheilung und den endokrinen Rhythmen beim Schwein ähnliche Verhältnisse im Vergleich zum Menschen.<sup>(167,342,348)</sup> Es wurde von uns ein porcines Tiermodell der Distractionsosteogenese entwickelt und die Frage gestellt, ob sich mit dem gewählten Versuchsmodell eine Kallotasis durchführen lässt und ob sich die bisherigen Kenntnisse über die Ossifikationsvorgänge in der Distractionszone bestätigen oder sogar erweitern lassen. Zusätzlich sollte analog zu einem “critical size defect“ Modell bei der sekundären Frakturheilung die Distractionsosteogenese unter “Extrembedingungen“ untersucht werden. Dies erfolgte in der Annahme, dass die Wirksamkeit eines Medikamentes, welches möglicherweise die Regeneratkonsolidierung beschleunigt, am ehesten an einem “Critical Size Defect“ Modell überprüfbar ist.

**Paper 1:**

**Bail HJ**, Kolbeck S, Schaser K-D, Krummrey G, Raun K, Windhagen HJ, Raschke MJ: Distraction osteogenesis in a micropig animal model. *Osteologie*, 12(1): 12-22.

**2003**

Es konnte gezeigt werden, dass mit dem gewählten Fixationssystem am Minischwein eine Kallusdistraktion durchgeführt werden kann. Die beobachteten Inseln chondraler Ossifikation lassen eine temporäre Instabilität im Regenerat vermuten, können jedoch bei kurzer Konsolidierungszeit in Gruppe III auch als "normale" Ossifikationsform gesehen werden, welche entsprechend bei längerer Konsolidierungszeit (Gruppe I) wieder verschwindet. Die vom Periost und Endost ausgehende Regeneratformation weist auf eine Schädigung der kortikalen Knochenenden durch die oszillierende Säge hin und betont die Wichtigkeit der periostalen Integrität. In der Gruppe III findet sich trotz der extremen Versuchsbedingungen histologisch und histomorphometrisch kein Hinweis auf ein Regeneratversagen. Dies weist auf die außergewöhnlich hohe osteogene Potenz des Versuchstiers Yucatan Minischwein hin.

### **2.1.2 SEROLOGISCHE AUSWIRKUNG DER GH-GABE IM VORVERSUCH**

In einer Anzahl von Studien wurden Hinweise auf einen anabolen Effekt von GH in Knochengewebe gefunden. So konnte beispielsweise in Zellkulturen nachgewiesen werden, dass GH zu einer erhöhten IGF-I Synthese der Osteoblasten führt (siehe 1.2.4).<sup>(242)</sup> Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Osteocalcinsynthese<sup>(69)</sup>, die Aktivität der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase<sup>(313)</sup>, die Kollagen Typ I Produktion<sup>(112,249)</sup> und die Mitoserate der Osteoblasten durch die Zugabe von GH gesteigert wird (siehe 1.2.4 und 1.2.5). IGF-I ist unabhängig von GH in der Lage die Differenzierung und Replikation der Prä-Osteoblasten zu beschleunigen und hat ebenso wie GH die Fähigkeit, Osteoblasten zur erhöhten Produktion von Matrixproteinen zu stimulieren (z.B. Prokollagen Typ I). Weitere Studien haben gezeigt, dass IGF-I auch modulierend auf die Funktion der Osteoklasten wirkt (siehe 1.2.5).<sup>(163)</sup> Bis zum damaligen Zeitpunkt war noch nicht nachgewiesen worden, ob die Gabe von Wachstumshormon in einem Großtiermodell der Knochenheilung in einer Erhöhung der IGF-I Produktion resultiert. Auch musste nachgewiesen werden, dass bei Yucatan Micropigs<sup>®</sup> keine Störung der GH-IGF-I- Achse vorliegt, welche bisher als mögliche Ursache für die Kleinwüchsigkeit dieser Rassen noch nicht wissenschaftlich untersucht und ausgeschlossen war. Ebenso wurde der Einfluss von GH auf den Knochenmetabolismus in einem solchen Modell noch nicht

nachgewiesen. Es wurde daher ebenfalls in einem Vorversuch an fünf Minischweinen die Auswirkung der GH-Applikation auf die Serum-Spiegel von gesamten und freien IGF-I, sowie der Knochenbauparameter ICTP (Knochenresorption) und b-ALP (Knochenformation) bestimmt. Letztere Parameter fanden Verwendung, da die zur Verfügung stehenden kommerziellen Essays auch am Minischwein anwendbar waren.

## **Paper 2:**

**Bail H**, Windhagen H, Dahne M, Lindner T, Kolbeck S, Raschke M: Systemic application of growth hormone (GH) increases serum bone turnover markers in distraction osteogenesis of micropigs *Advances in Tissue Banking, 1: 147-155, 1997*

Die hohen Serumspiegel von IGF-I und freiem IGF-I bei den GH behandelten Tieren zeigten, dass die GH-IGF-I Achse bei diesen Micropigs intakt ist. Somit liegt bei dem Tiermodell kein Wachstumshormonrezeptordefekt vor. Ebenso konnte ein deutlicher Einfluss von GH sowohl auf Knochenresorption als auch –formation nachgewiesen werden. Dieser deutliche Effekt übersteigt weit den in anderen Studien gezeigten Einfluss des heilenden Knochens per se auf Knochenumbauparameter.<sup>(6,184,185,224,369)</sup> Anhand dieser Studie konnte nicht zwischen dem lokalen und dem systemischen Effekt des Wachstumshormons unterschieden werden. Obwohl zur Beurteilung einer Signifikanz die Fallzahl in dieser Vorstudie zu gering war, konnte nachgewiesen werden, dass das Modell der Distractionsosteogenese am Micropig sowohl bezüglich der GH-IGF-I–Achse als auch bezüglich des Knochenmetabolismus von GH deutlich beeinflussbar ist. Von dieser Seite aus erfüllte somit das gewählte Tiermodell die Voraussetzungen für eine größer angelegte Studie.

### 2.1.3 DIE ENTWICKLUNG EINER *IN-VIVO* MESSMETHODE DER REGENERATSTEIFIGKEIT

Wie oben angeführt, fehlen in der klinischen Anwendung geeignete Methoden, die biomechanische Belastbarkeit eines verheilenden Knochens zu überprüfen (siehe 1.3). Dies ist besonders bei der Distractionsosteogenese ein großes Problem, da aufgrund der Komplikationen, welche bei einer über einen langen Zeitraum bestehenden externen Fixation auftreten, ein frühestmöglicher Zeitpunkt des Fixateurabbaus anzustreben ist. Darüber hinaus wäre ein präzises Monitoring des Heilungsverlaufes, also der Festigkeitszunahme im Regenerat erstrebenswert. Zudem soll, wie oben angeführt, innerhalb der vorliegenden Versuche die Zunahme der "*in-vivo*"-Belastbarkeit gemessen werden, um einen möglichen Einfluss des Wachstumshormons auf die Regeneratkonsolidierung zuverlässig zu erkennen. Bisherige *in-vivo* Messmethoden zeigten deutliche Nachteile in ihrer klinischen Einsetzbarkeit: zumeist musste der Fixateur temporär gelockert werden mit dem Risiko, eine Achsabweichung des betreffenden Knochens zu verursachen (siehe 1.3.4).<sup>(200,293)</sup> Es wurde daher im vorliegenden Versuchsvorhaben ein Messsystem entwickelt, welches die *in-vivo* Steifigkeit des heilenden Regenerates messen kann. In einem Vorversuch erfolgte anhand von Knochenmodellen die Validierung gegen den "gold standard" einer Materialtestmaschine.

### **Paper 3:**

Windhagen H, **Bail H**, Schmeling A, Kolbeck S, Weiler A, Raschke M: A new device to quantify regenerate torsional stiffness in distraction osteogenesis. *J Biomech*, 32(8):857-60, **1999**

Die Vorstudie an den Knochensimulationsmodellen zeigte für die Messungen mit dem neu entwickelten System innerhalb eines Steifigkeitsbereiches von 0,3 bis 3,0 Nm/° eine gute Genauigkeit von 9,8%. Unter- und oberhalb dieses Bereiches verschlechtert sie sich deutlich (177% bzw. 21%). Das Messzwingensystem zeigt eine gute Wiederholungsgenauigkeit, die gemessene Präzision liegt bei 3,6% mit einer Standardabweichung von  $\pm 1,35\%$ . Im Vergleich dazu beträgt die Präzision der Materialtestmaschine 1,8% bei einer Standardabweichung von  $\pm 1,19\%$ . Im Versuch konnte gezeigt werden, dass die neue Messmethode im Vergleich mit der Materialtestmaschine mit guter Reproduzierbarkeit und Präzision die torsionale Steifigkeit eines Knochenmodells bestimmen lässt. Entsprechend diesem Ergebnis erfolgte die Weiterentwicklung der Messvorrichtung und des Fixateurs und der Einsatz am Tiermodell.

## **2.2 DIE VALIDIERUNG DER BIOMECHANISCHEN UND BILDGEBENDEN MESSMETHODEN BEI DER DISTRAKTIONSOSTEOGENESE AM MINISCHWEIN**

### **2.2.1 VALIDIERUNG DER DLR-MESSUNG**

Als klinischer Standard werden nach wie vor Röntgenaufnahmen bei der Distractionsosteogenese eingesetzt, um die Rate neu formierten Knochens und die Verheilung zu beurteilen, obwohl bekannt ist, dass Röntgenbilder hierfür nicht sensitiv genug sind (siehe 1.3). Wie oben beschrieben, bringt die DLR einige Vorteile gegenüber dem konventionellen Röntgen mit sich (siehe 1.2.1). Diese liegen vor allem im breiteren Wellenlängenspektrum, der linearen Reaktion des Detektors auf die Röntgenstrahlung, der verbesserten Detektionseffizienz und der Möglichkeit zur digitalen Bildverarbeitung begründet.<sup>(124,130)</sup> Aufgrund dieser Vorteile wurde unter Verwendung der DLR mittels einer, auf einem Vergleichsphantom aus Aluminium basierenden, Vermessung des Regenerates erneut versucht, an Hand eines bildgebenden Verfahrens, Aussagen zur biomechanischen Stabilität eines heilenden Knochens zu treffen.

#### **Paper 4:**

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):221-8, **1999**

Die auf der DLR basierende und mittels Aluminiumphantom erhobenen Werte erlauben eine gute Vorhersage der torsionalen Belastbarkeit des Distractionsregenerates. Diese Methode kann somit im weiteren Ablauf der Untersuchungen dafür herangezogen werden, den eventuellen Einfluss von GH auf die Regeneratverheilung nachzuweisen. Seitens der Verfügbarkeit und Praktikabilität eröffnet die quantitative Auswertung der DLR (v.a. im Vergleich mit dem QCT) neue Perspektiven zur Verbesserung der klinischen Stabilitätsvorhersage konsolidierender Regenerate bei der Distractionsosteogenese.

### **2.2.2 VALIDIERUNG DER ULTRASCHALLMESSUNG UND DER QCT**

Ultraschalluntersuchungen wurden bereits in den frühen 90er Jahren als Methode zur klinischen Verlaufsuntersuchung bei der Distractionsosteogenese empfohlen (siehe 1.3.2).<sup>(117,169,237)</sup> Bisher erfolgte jedoch noch keine Untersuchung, ob Ultraschalluntersuchungen einen prädiktiven Wert für die mechanische Belastbarkeit des Regenerates bei der Distractionsosteogenese haben. Als Vergleichsmessung wurde die Bestimmung des sog. Hydroxylapatit (HA)-Äquivalents mittels QCT durchgeführt. Wie oben angeführt, wurde bereits in einigen Studien in unterschiedlichen Versuchsanordnungen die Wertigkeit CT-basierter Messungen im Hinblick auf die Vorhersage der Stabilitätsverhältnisse im Distractionsregenerat und im Frakturkallus überprüft (siehe 1.3.3).<sup>(13,23,243-245,354,355)</sup> Allgemein wird die QCT als die radiologische Methode mit der stärksten Vorhersagekraft der biomechanischen Belastbarkeit bei heilenden Tibiafrakturen und distrahierte Tibiae betrachtet.<sup>(152)</sup> Nur eine dieser Studien verglich jedoch bei der Distractionsosteogenese die mittels QCT ermittelte Mineralisationsdichte direkt mit biomechanischen Messungen. Für das in der vorliegenden Studie neu entwickelte Tiermodell der Distractionsosteogenese am Yucatan Micropig mittels Halbringfixateur ist aufgrund nicht vergleichbarer Versuchsbedingungen (u.a. torsionale mechanische Testung im Gegensatz zur Dreipunkt-Biege-Belastung in anderen Studien) erneut die Vorhersagekraft QCT-basierter Mineralisationsdichtemessungen im Hinblick auf die biomechanischen Eigenschaften des Distractionsregenerates überprüft worden.

**Paper 5:**

**Bail HJ**, Kolbeck S, Krummrey G, Weiler A, Windhagen HJ, Hennies K, Raun K, Raschke MJ: Ultrasound can predict regenerate stiffness in distraction osteogenesis.

*Clin Orthop*, (404): 362-7, **2002**

Sowohl die auf der Eindringtiefe des Ultraschallsignals basierenden Werte als auch die Bestimmung des HA-Äquivalentes mit QCT erlauben eine gute Vorhersage der torsionalen Belastbarkeit des Distraktionsregenerates. Beide Methoden können somit herangezogen werden, den eventuellen Einfluss von GH auf die Regeneratverheilung nachzuweisen. Das QCT liefert von den bildgebenden Verfahren übereinstimmend mit der Literatur die beste Korrelation und kann im experimentellen Bereich somit als "gold standard" der Bildgebung bezeichnet werden. Seitens der Verfügbarkeit, Praktikabilität und der Untersuchungskosten eröffnet die Ultraschallmessung zumindest in der Anfangsphase der Verheilung eine interessante Alternative zur klinischen Einschätzung der Regeneratstabilität bei der Distraktionsosteogenese.

### **2.2.3 VALIDIERUNG DER *IN-VIVO* STEIFIGKEITSMESSUNG**

Nachdem die Messgenauigkeit der neu entwickelten Messanordnung und die Reproduzierbarkeit der Messungen gezeigt wurde (siehe 2.1.3), sollten die Messungen der *in-vivo* Steifigkeit im Tierversuch ermöglichen, einen eventuellen Einfluss von GH auf die Konsolidierung des Regenerates festzustellen. Um die Verwertbarkeit der *in-vivo* Messungen zu überprüfen, musste zunächst die Validierung der neuen Methode am Tiermodell durchgeführt werden. Um die Zahl der Versuchstiere möglichst niedrig zu halten, erfolgte diese Analyse im gleichen Versuch wie die Überprüfung des GH-Einflusses. Hierfür wurden die *in-vivo* Messungen der torsionalen Steifigkeit am Tag der Regeneratexplantation mit den *post-mortem* Messungen in der Materialtestmaschine korreliert.

## **Paper 6:**

Windhagen H, Kolbeck S, **Bail H**, Schmeling A, Raschke M: Quantitative assessment of in vivo bone regeneration consolidation in distraction osteogenesis. *J Orthop Res*, 18(6):912-9, 2000

Der Fixateur in Verbindung mit dem Messhandgriff konnte im vorliegenden Experiment seine Praktikabilität unter Beweis stellen. Es trat kein Malalignment in Folge der *in-vivo* Messung auf. Der hohe Determinationskoeffizient ( $r^2$ ) von 0.82 im Vergleich der *post-mortem* Messung zeigte eine sehr gute Anwendbarkeit des Meßsystems im vorliegenden Tierexperiment. Basierend auf diese Analyse, wurden die *in-vivo* gemessenen Steifigkeitswerte zwischen der Placebo und GH-Gruppe verglichen (siehe 2.3.3). Die breite Streuung der Steifigkeiten der explantierten 24 distrahierten Tibiae erlaubte die Aussage, dass sowohl sehr instabile, als auch nahezu verheilte Regenerate messtechnisch erfasst werden konnten. Aufgrund der unterschiedlichen individuellen Weichteilverhältnisse und niemals absolut analoger Fixateurmontage bei jedem Tier muss jedoch einschränkend angemerkt werden, dass ein Vergleich eines absoluten Steifigkeitswertes eines Regenerates mit dem bei einem anderen Individuum nicht erlaubt ist. Dem entsprechend erfolgte bei der Analyse der GH-Wirkung auf die Distraktionsosteogenese der Vergleich der Steifigkeitszunahmen, basierend auf einer Messung am Operationstag (siehe 2.3.3). Zusätzlich gelten die Aussagen zur Messgenauigkeit nur für das Gesamtmodell Rotationsfixateur mit Messhandgriff und Distraktionsosteogenese am Yucatan Micropig (siehe 3.2.4).

## **2.3 DIE WIRKUNG VON GH AUF DIE DISTRAKTIONSOSTEOGENESE AM MINISCHWEIN ZUR BESCHLEUNIGUNG DER REGENERATKONSOLIDIERUNG**

### **2.3.1 DIE VERÄNDERUNG DER BONE-TURNOVER-PARAMETER UND DER SERUMPARAMETER DER GH-IGF-I-ACHSE DURCH DIE APPLIKATION VON GH**

Die deutliche Beeinflussung sowohl des IGF-I – Spiegels im Serum als auch die Beeinflussung der Knochenbauparameter b-ALP und ICTP konnte im Vorversuch gezeigt werden. Zum einen war auf Grund der zu geringen Fallzahl und der daraus resultierenden fehlenden Signifikanz die Aussagekraft des Vorversuches reduziert. Zum anderen wurde die Rolle der IGF-Bindungsproteine nicht beleuchtet. Auch sollte in dem nachfolgenden Versuch analysiert werden, ob die Wirkung von GH auf die Boneturnover-Parameter durch IGF-I und seine Bindungsproteine reguliert wird.

## **Paper 7:**

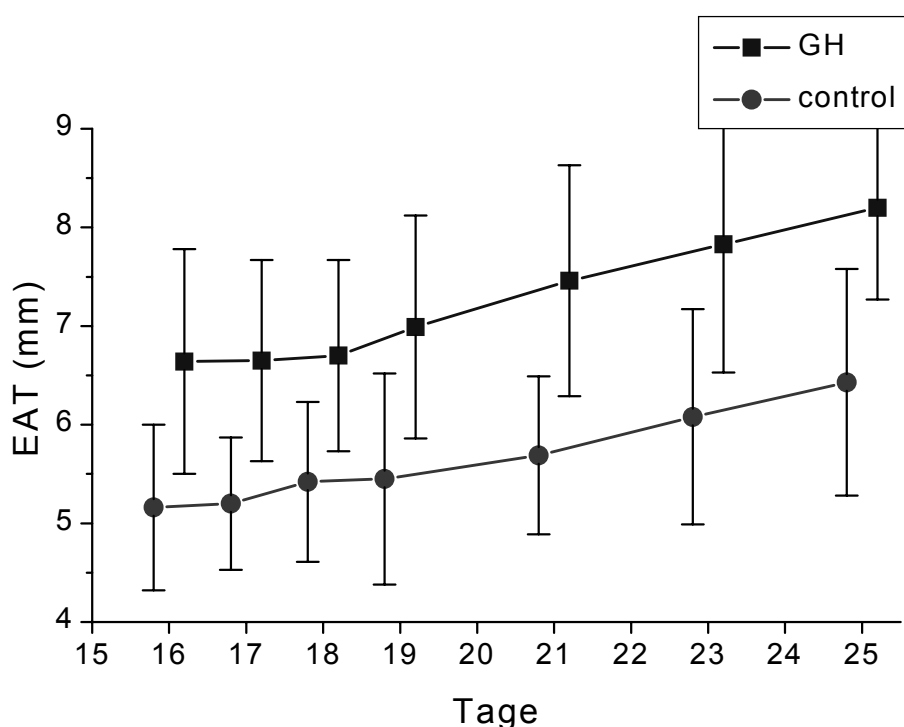
**Bail HJ**, Kolbeck S, Lindner T, Dahne M, Weiler A, Windhagen HJ, Raun K, Skjaerbaek C, Flyvbjerg A, Orskov H, Haas NP, Raschke MJ: The effect of growth hormone on insulin-like growth factor I and bone metabolism in distraction osteogenesis. *Growth Horm IGF Res*, 11(5): 314-23, **2001**

Die systemische Gabe von rekombinantem GH bewirkt in unserem Modell *in-vivo* eine Stimulation der Osteoblastenaktivität. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem IGF-I Serumspiegel und der Aktivität an b-ALP im Serum. Die Korrelation zwischen der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase und dem freien – biologisch aktiven – IGF-I ist noch deutlich höher. Dies weist den IGF-Bindungsproteinen, welche die Menge an freiem IGF-I determinieren, eine regulierende Rolle bei der Vermittlung des Wachstumshormoneffektes zu. Die Stimulation der Knochenresorption scheint in der Frühphase der Distraktionsosteogenese keine Rolle zu spielen.

### 2.3.2 NACHWEIS DER OSSIFIKATIONSBESCHLEUNIGUNG ANHAND BILDGEBENDER VERFAHREN

Diese Daten sind bisher nicht publiziert und werden in den folgenden Abschnitten für die einzelnen Messmethoden gesondert abgehandelt.

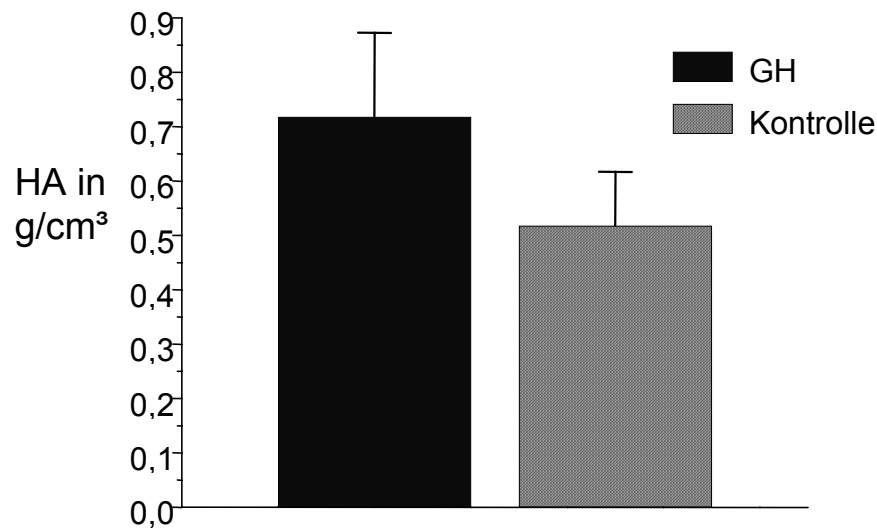
#### 2.3.2.1 Digitale Luminiszenzradiographie



Es erfolgte die Messung der sogenannten äquivalenten Aluminium Dicke (EAT) nach der oben dargestellten Methode (siehe 2.2.1). Mittels einer Varianzanalyse für

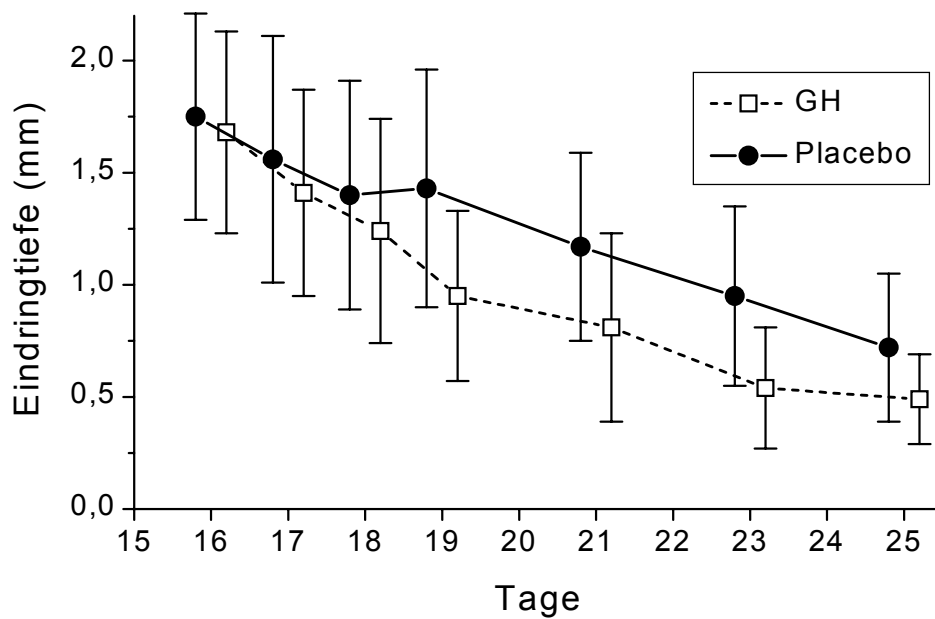
wiederholte Messungen (ANOVA) konnte über den gesamten Versuchsverlauf eine signifikant höhere EAT für die mit GH behandelten Tiere nachgewiesen werden ( $p < 0.05$ ).

### 2.3.2.2 *Quantitative Computertomographie*

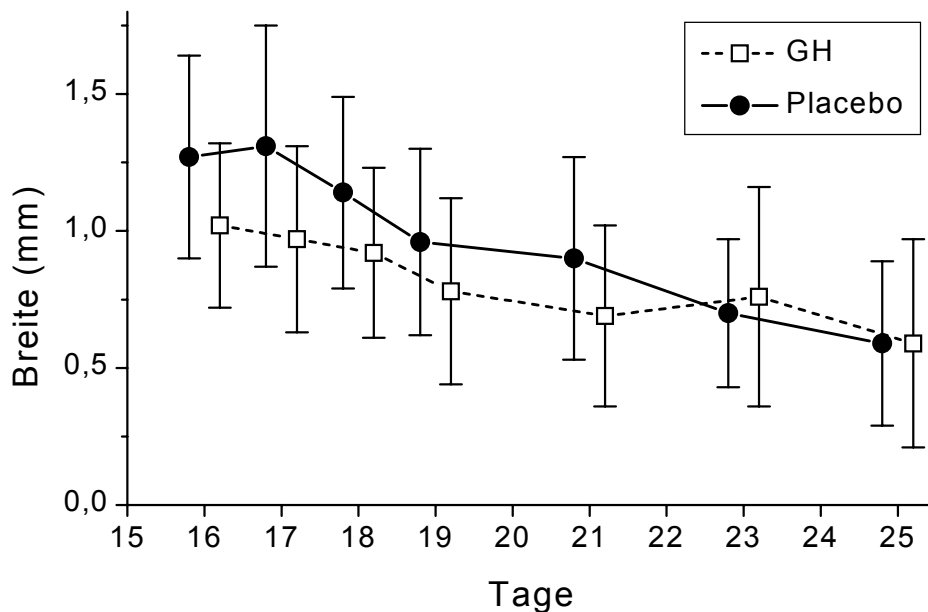


Mittels quantitativer Computertomographie wurde nach der oben beschriebenen Methode in beiden Gruppen das sogenannte Hydroxylapatitäquivalent bestimmt (siehe 2.2.2). Dieses lag für die GH-Gruppe signifikant über dem der Kontrollgruppe (Mann-Withney-Test,  $p < 0.05$ ).

### 2.3.2.3 Sonographie



Die Messung der Eindringtiefe des Ultraschalls in der Mitte des Regenerates erbrachte für die GH-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe über den Verlauf des gesamten Versuches signifikant geringere Werte (Varianzanalyse für wiederholte Messungen [ANOVA],  $p < 0,05$ ). Dies entspricht einem fortgeschrittenen Heilungszustand in der Wachstumshormon-Gruppe. Aufgrund der hohen Standardabweichungen innerhalb der Gruppen konnte für diese Messmethode an einzelnen Versuchstagen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.



Die mittels Sonographie gemessene Breite der sog. “fibrous interzone“ (siehe 2.2.2) zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Varianzanalyse für wiederholte Messungen [ANOVA], n.s.). Dies entspricht der oben bereits dargestellten Beobachtung, dass diese Messung kein valider Parameter für den Verheilungszustand des Regenerates ist (siehe 2.2.2).

### 2.3.3 BIOMECHANISCHE MESSUNGEN DER REGENERATSTEIFIGKEIT UND –FESTIGKEIT

Diese Messungen sollten die “harten“ Outcomeparameter zur Wirksamkeit der systemischen Applikation von Wachstumshormon auf die Regeneratkonsolidierung beim Yucatan Minischwein ergeben. Hierzu wurde die oben beschriebene torsionale *in-vivo* Steifigkeit und die *post-mortem* mittels Materialtestmaschine erhobene torsionale Steifigkeit und Festigkeit zwischen der hormonbehandelten und der Kontrollgruppe verglichen.

## **Paper 8:**

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(2):81-8, **1999**

Diese Studie zeigt, dass die systemische Gabe von rekombinantem porcinem Wachstumshormon die Regeneratkonsolidierung der Kallusdistraction bei Minischweinen enorm beschleunigt. Dieser Effekt konnte sowohl durch Ermittlung der torsionalen Steifigkeit *in-vivo* im Verlauf der Konsolidierungsphase, als auch durch die Bestimmung der torsionalen Steifigkeit und Versagenslast *post-mortem* nachgewiesen werden. In dieser Studie wurde erstmalig der Einfluss von homologem rekombinanten Wachstumshormon auf die Distractionsosteogenese gezeigt.

#### **2.3.4 HISTOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DES DISTRAKTIONSREGENERATES DURCH DIE APPLIKATION VON GH**

Eine histologische Studie an frakturierten Rattentibiae hat gezeigt, dass unter GH - Einfluss die Kallusstruktur lockerer ist und ein verspätetes Remodeling aufweist (siehe 1.2.4).<sup>(257)</sup> Gleichzeitig konnte nachgewiesen werden, dass der stimulierende Effekt von GH besonders in der Frühphase der Frakturheilung eintritt. Darüber hinaus ist etabliert, dass GH vor allem chondrale Zellen zur Teilung und Matrixproduktion stimuliert.<sup>(141)</sup> Bis zum Zeitpunkt der vorliegenden Studien lagen keine Untersuchungen zur Wirkung von GH auf Struktur und Kallusmenge bei der Distractionsosteogenese vor. Es wurde daher eine histomorphometrische Analyse an den Regeneraten der distrahierten Tibiae durchgeführt, um festzustellen, ob die Applikation von rekombinantem GH zu einer Beeinflussung von Kallusstruktur- und -menge führt. Weiterhin sollte überprüft werden, ob die gefundenen Veränderungen bereits in der Frühphase der Kallusdistraction auftreten.

## **Paper 9:**

**Bail HJ**, Raschke MJ, Kolbeck S, Krummrey G, Windhagen HJ, Weiler A, Raun K, Mosekilde L, Haas NP: Recombinant species-specific growth hormone increases hard callus formation in distraction osteogenesis. *Bone*, 30(1): 117-24, **2002**

Die Daten der vorliegenden Studie deuten darauf hin, dass rekombinantes GH die Knochenneubildung bei der Kallusdistraktion beschleunigt. Übereinstimmend mit der vorausgegangenen bereits mehrfach zitierten Untersuchung am Rattenmodell zum Einfluß von GH auf den Kallus bei Tibiaschaftfrakturen, wirkt sich auch in der hier präsentierten Studie diese Stimulation besonders in der Frühphase der Knochenheilung aus.<sup>(257)</sup> Im Gegensatz zur Untersuchung von Mosekilde et al.<sup>(257)</sup>, geht die Stimulation der Knochenformation nicht mit einer Veränderung der Kallusstruktur einher, sondern deutet auf eine Beschleunigung der Kallusreifung hin.

## 3 Diskussion

### 3.1 TIERMODELL

Die erfolgreiche Durchführung der Operation und Distraction sowie die histologischen Ergebnisse zeigten, dass eine Distractionsosteogenese am Minischwein vorgenommen werden kann. Die Tiere haben den Fixateur externe gut toleriert, systemische Infekte traten nicht auf. Trotz des montierten Schutzschildes, zweimal täglicher Pinpflege und systemischer Antibiose traten jedoch Pin-Infekte auf, welche teilweise zu Revisions-Operation führten. Das Auftreten von Pin-Infekten hatten zur Folge, dass routinemäßig bei allen Tieren nach der Distractionphase die Festigkeit der Pins in Narkose überprüft wurden, um die biomechanischen *in-vivo* Messungen nicht zu gefährden (siehe 3.3.3). In zwei anderen Studien an Schafen mit Voll-Ring Ilizarov-Fixateuren und Draht-Fixation heilten Pin-Infekte unter lokaler Behandlung, Revisions-Operationen waren nicht erforderlich.<sup>(90,375)</sup> In einer weiteren Studie an Schafen, in welcher ebenfalls Schanz' Schrauben zum Einsatz kamen, konnten keine Pin-Infekte beobachtet werden.<sup>(86)</sup> Eine Erklärung für die signifikante Anzahl von Pin-Infekten im vorliegenden porcinen Modell könnte der geringe Abstand der Pinstellen zum Stallboden sein. Dagegen spricht, dass die infizierten Pins die proximalen waren. Es ist daher wahrscheinlicher, dass die im Unterschied zu den Schafsmetatarsale voluminöseren Weichteile an der porcinen Tibia für die Pininfekte verantwortlich sind. Da diese an der proximalen Tibia wesentlich dicker sind als an der distalen, wäre dadurch das dortige Auftreten der Pin-Infekte erklärt. Trotzdem konnte an den Tibiae der Minischweine eine erfolgreiche Distraction durchgeführt werden, die histologisch gemessene Distractionstrecke in Gruppe I (1 mm/Tag Distraction) entsprach genau der vorherberechneten Distanz. Starker Zug auf den Weichteilen könnte dafür verantwortlich sein, dass in Gruppe 3 (2 mm/Tag Distraction) das Erreichen des Distractionzieles am weitesten verfehlt wurde. In vorangegangenen tierexperimentellen Studien wurde 10% Verlängerung eines Knochens an den unteren Extremitäten von den Weichteilen gut toleriert<sup>(17,223,381)</sup>, während andere Studien histopathologische Veränderungen nach 30%iger Verlängerung fanden.<sup>(206,223,247)</sup> In der aktuellen Studie reichte die Verlängerungstrecke von 8% in Gruppe I bis 16% in Gruppe III. Die tägliche Verlängerungsrate in Gruppe II (1,5 mm) und Gruppe III (2 mm) übertrifft alle bisher dokumentierten experimentellen und klinischen

Distraktionsgeschwindigkeiten. Bei Mäusen, Ratten und Kaninchen wird eine Rate von 0,5 mm/Tag als adäquat betrachtet.<sup>(21,180,211)</sup> Bei Ziegen werden 0,75 mm/Tag beschrieben<sup>(365)</sup>, während Ilizarov an Hunden zeigte, dass 1 mm/Tag Distraction das beste Regenerat formiert.<sup>(175)</sup> In der aktuellen Untersuchung ergeben die *in-vivo* Färbungen, dass alle Gruppen eine Kallusformation schon in der Distraktionsphase zeigen, in Gruppe I war die Distraktionsstrecke am Ende der Distraktionsphase bereits knöchern durchbaut. Unter vergleichbaren Bedingungen konnte bei anderen Tiermodellen mittels Histologie, QCT oder DEXA frühestens zehn Tage nach Ende der Distraction kalzifiziertes Gewebe im Distractionsspalt gefunden werden.<sup>(12,13,19,116,245)</sup>

Die histologischen Präparate der Gruppe II zeigen Regenerate, welche teilweise überbrückt sind, ebenso finden sich in Gruppe III keine histologischen Zeichen für ein Regeneratversagen. Zum größten Teil lässt sich bei der histologischen Befundung der Regenerate von Gruppe II und III intramembranöse Ossifikation nachweisen wie sie auch von anderen Untersuchern für die Distraktionsosteogenese beschrieben wurde.<sup>(13,101,131,175,201,356)</sup> Im Gegensatz dazu zeigt die Gruppe I einen polymorphen Kallus wie er eher für die sekundäre Frakturheilung beschrieben wird. Dies könnte mit der langen Konsolidierungszeit in dieser Gruppe zusammenhängen (25 Tage vs. 15 Tage in Gruppe II und 10 Tage in Gruppe III), welche dem Kallus wesentlich mehr Zeit zum Remodeling gibt. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass die kortikalen Knochenenden der Gruppe I ein deutlich fortgeschrittenes Remodeling im Vergleich zu den anderen Gruppen zeigten. Das Auftreten von Knorpel im Distractionsspalt wird weithin als Zeichen für Instabilität und dem Auftreten von exzessiven Scherkräften betrachtet.<sup>(20)</sup> In der von uns gewählten Versuchsanordnung könnte das Auftreten von Knorpelinseln im Regenerat mit einer eventuellen Instabilität des Halbringfixateurs zusammenhängen. Zusätzlich passt die erhöhte Menge an knorpeligem Gewebe in der Gruppe mit 2 mm Distraction am Tag zur Beobachtung anderer Untersucher, die feststellten, dass eine hohe Distraktionsgeschwindigkeit die Knorpelsynthese begünstigt.<sup>(127)</sup> Andererseits wurde die sog. transchondrale Ossifikation bei der Distraktionsosteogenese beschrieben, bei welcher Chondrozyten direkt zu Osteoblasten transformieren und signifikant zur Knochenmatrixformation beitragen.<sup>(382)</sup> Somit könnten gemäß dieser Theorie die im vorliegenden Versuch beobachteten knorpeligen Areale ein "normales" Phänomen darstellen.

Die *in-vivo* Färbungen zeigen im Unterschied zu anderen Studien, dass sich der Kallus in der vorliegenden Untersuchung nicht primär von der Oberfläche der Knochenenden, sondern vom Periost und Endost ausbildet.<sup>(12,13,175)</sup> Im Gegensatz zu den anderen Untersuchungen, in welchen eine Kortikotomie durchgeführt wurde, könnte in der vorliegenden Studie die Verwendung einer oszillierenden Säge den kortikalen Knochen thermisch geschädigt haben.<sup>(127)</sup> Während die Technik der Kortikotomie von Ilizarov und seinen Mitarbeitern stets gefordert wurde<sup>(175,176,323)</sup>, konnten andere Untersucher zeigen, dass die Nutzung einer oszillierenden Säge und die Durchführung einer Osteotomie zu gleichwertigen Ergebnissen führen kann.<sup>(12,13,19,127)</sup> Unsere Studie bestätigt, dass ein potentes Regenerat auch vom Periost und Endost alleine gebildet werden kann. Dies zeigt – wie auch schon von anderen Autoren postuliert - die Wichtigkeit, die periostale Integrität zu erhalten und ggf. wiederherzustellen.<sup>(13,19,101,211,252,381)</sup> Bei der Diskussion der vorliegenden Untersuchungen gilt es zu berücksichtigen, dass die Änderung von jeweils zwei Parametern von Gruppe zu Gruppe die einzelne Diskussion des Einflusses von Standzeit und Distraktionsgeschwindigkeit auf die Histologie des Regenerates nicht erlaubt. Vielmehr sollte die vorliegende Studie die histologischen und biomechanischen Veränderungen bei einer Distraktionsosteogenese unter zunehmend “extremen“ Bedingungen zeigen.

Die vorliegende Studie zeigte, dass eine Distraktion der Tibia am Minischwein durchgeführt werden kann. Die von uns verwendeten Tiere zeigten eine außerordentlich hohe osteogene Potenz mit einer linearen Knochenformation von 1000  $\mu\text{m}$  pro Tag, während die bisher schnellste dokumentierte Formationsrate 400  $\mu\text{m}$  pro Tag beträgt.<sup>(15,17)</sup> Insgesamt zeigte sich, dass sich am Minischwein eine zuverlässige und reproduzierbare Distraktionsosteogenese durchführen lässt.

## **3.2 VALIDIERUNG DER NEU ENTWICKELTEN ODER AN DAS TIERMODELL ADAPTIERTEN MESSMETHODEN**

### **3.2.1 DIGITALE LUMINESZENZRADIOGRAPHIE (DLR)**

Die zur Zeit übliche Methode zur Beurteilung des Regenerates bei der Distractionsosteogenese ist zum einen die Röntgenaufnahme in zwei Ebenen, zum anderen die klinische Beurteilung.<sup>(270)</sup> Therapieplanung und -verlauf werden bestimmt durch manuelle Untersuchungen der Stabilität der Extremität, die Bewertung der Schmerzsymptomatik durch den Patienten sowie empirisch gewonnene Daten über die durchschnittlich notwendigen Distractionsgeschwindigkeiten und Heilungszeiträume. In der Literatur wird der Heilungsindex, das heißt die durchschnittliche Heilungszeit des Knochens pro distrahiertem Zentimeter, mit 35-45 Tagen angegeben.<sup>(360)</sup> Nach den klinischen und radiologischen Kriterien werden gegebenenfalls notwendige Korrekturen der Distractionsgeschwindigkeit, Empfehlungen zur Belastung der Extremität und Zeitpunkt der Fixateurentfernung bestimmt.<sup>(245)</sup> In einigen Studien wurden die Schwierigkeiten der radiologisch-morphologischen<sup>(55,263,275)</sup> oder der manuellen Beurteilung bei der Frakturheilung aufgezeigt.<sup>(362)</sup> Das konventionelle Röntgenbild ist zur Beurteilung der Qualität eines Regenerates nicht genügend aussagekräftig, die Untersucherabhängigkeit bezüglich der Einschätzung der Knochenstabilität birgt immer ein Risiko für den Patienten.<sup>(123,238)</sup> Die Ansätze zur quantitativen Evaluierung des Regenerates im Distractionsspalt befinden sich im experimentellen Stadium. In einer klinischen Studie untersuchten Fink et al. die Mineraleichte von 71 Regeneraten bei der Kallusdistraction, indem sie konventionelle Röntgenbilder während der Distractions- und Konsolidierungsphase bis zur Fixateurentfernung digital auswerteten.<sup>(119)</sup> Dabei zeigte sich ein initialer Abfall der relativen radiographischen Dichte bis zum Ende der Distraction, anschließend wieder ein kontinuierlicher, logarithmischer Anstieg der Dichtewerte. Die Autoren empfehlen die Quantifizierung der zunehmenden Kallus-Kalzifizierung zur Abschätzung der Heilungsdauer des Knochens. In einer weiteren Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Absorption von Durchlicht durch die jeweils interessierende Kallusregion mit der Biegesteifigkeit veheilender Tibiae bei Hunden korreliert.<sup>(346)</sup> Mit dem Beginn der Digitalisierung von optischen Informationen wurde die auf Röntgenbilder basierende Quantifizierung von

Knochen- oder Kallusdichte erleichtert.<sup>(310)</sup> Die Basis für die Auswertung von Röntgenbildern war jedoch immer der konventionelle Röntgenfilm mit seiner sigmoiden Expositionscurve und seinem limitierten Spektrum detektierbarer Röntgenstrahlung, insbesondere im hohen und niedrigen Intensitätsbereich.<sup>(246)</sup> Demgegenüber bietet die digitale Radiographie einige Verbesserungen. Diese resultieren aus dem breiteren Wellenlängenspektrum, der linearen Reaktion des Detektors auf die Röntgenstrahlung und der verbesserten Detektionseffizienz; zudem können die Bilder direkt digital verarbeitet werden. Aufgrund der größeren Spannbreite detektierbarer Intensitäten bietet sich die digitale Radiographie besonders für die Analyse der frühen Frakturheilung und Regeneratkonsolidierung an.<sup>(125)</sup> Die Möglichkeiten zur digitalen Bildnachbearbeitung ermöglichen auch die Visualisierung geringer, für das Auge kaum nachweisbarer Signale. Dies könnte ebenfalls bei der Beurteilung der frühesten Verheilungszustände bei der Distraktionsosteogenese wertvoll sein, birgt aber auch die Gefahr des Hinzufügens von Bildinformation. In der vorliegenden Studie erwies sich die Auswertung der digitalen Lumineszenzradiographie (DLR) als sensitive Messmethode, signifikante Unterschiede der "Knochendichte" im Regenerat konnten von Messtag zu Messtag (zeitlicher Abstand ein bis zwei Tage) gefunden werden. Der Determinationskoeffizient ( $r^2$ ) von 0.8 zwischen der DLR-Messung am letzten Tag der Konsolidierungsphase und den biomechanischen Daten der Materialtestmaschine ist sowohl mit dem der eigenen QCT-Messungen (siehe 3.2.2) als auch mit den in der Literatur gefundenen Werten für DEXA und QCT vergleichbar; letztere gelten, wie oben bereits erwähnt, als "gold standard" der Bildgebung hinsichtlich der Vorhersage biomechanischer Belastbarkeit (siehe 1.3.3). Auffallend ist, dass sowohl bei der sonographischen Messung als auch bei der quantitativen DLR die erhaltenen Werte besser mit den Steifigkeitswerten der Regenerate als mit der torsionalen Festigkeit korrelieren. Eine mögliche Erklärung bietet die Beobachtung, dass bei der Verheilung, also der Zunahme der Mineralisierung belasteter langer Röhrenknochen, die Steifigkeit früher zum gesunden Knochen vergleichbare Werte erreicht als die Versagenslast.<sup>(92)</sup>

Die vorliegende Untersuchung lässt erwarten, dass die DLR in der Zukunft erweiterte Möglichkeiten zur Evaluierung der Regeneratkonsolidierung eröffnet. Ob diese Methode auch zur Analyse der Frakturheilung herangezogen werden kann, bedarf weiterer Studien, da bei der vorliegenden Evaluierung mit dem

Distractionsspalts ein breites Messfeld zur Verfügung stand, während bei der Frakturheilung ein deutlich kleineres Messareal vorliegt.

### 3.2.2 QUANTITATIVE COMPUTERTOMOGRAPHIE (QCT)

Ziel der Untersuchung war es ebenso wie bei der Sonographie und der DLR zu überprüfen, inwiefern es möglich ist, durch standardisierte Vermessung des Kallusgewebes prädiktive Aussagen über die biomechanische Festigkeit des Knochens zu treffen. In der vorliegenden Studie wurden CT-Longitudinalschnitte des Regenerates angefertigt, um die Ausbreitung des Kallus und die hypodense "fibrous interzone" genauer identifizieren zu können. 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, um daraus Rückschlüsse auf die Festigkeit und das Heilungsstadium ziehen zu können.<sup>(155)</sup> In den bisher publizierten Studien zur quantitativen CT-Auswertung des Kallus werden verschiedene Messmethoden am tierexperimentellen Modell sowohl bei der Distractionsosteogenese als auch bei der Frakturheilung verwendet. Bei der Frakturheilung im Tiermodell korrelierte die mittels dreidimensionaler QCT gemessene Mineraleichte eines Kallus nach geschlossener Fraktur sehr gut mit der Torsionsfestigkeit und -steifigkeit ( $r^2$  bis 0.82).<sup>(102)</sup> Auch die axiale Messung in einem Osteotomiespalt erbrachte im Tierexperiment ähnlich hohe Korrelationen ( $r^2=0.74$ ) zwischen Torsionssteifigkeit und durch QCT gemessener Knochendichte.<sup>(243-245)</sup> Zu vergleichbaren Ergebnissen gelangt auch eine weitere Arbeit, welche in einem auf 3 mm distrahierten Osteotomiespalt eine starke Korrelation zwischen der Knochendichte des Regenerates und der Biegefestigkeit des Knochens beschreibt ( $r^2=0.70$ ).<sup>(23)</sup> In einer anderen Arbeit wurden QCT-Messungen an axialen Schnittbildern im Distractionregenerat bei der Verlängerung von Schafstibiae durchgeführt.<sup>(291)</sup> Hierbei wurde ein Bestimmtheitsmaß bei der Korrelation der Torsionsparameter und der Mineraleichte in der QCT bis  $r^2 = 0,60$  gefunden. Die Autoren dieser Studie geben an, dass aufgrund ihrer klinischen Auswertungen an Tibiaverlängerungen der Abbau des Fixateur externe bei einer

Mineraldichte im Regenerat von 60 % der gesunden Gegenseite erfolgt; dieser Wert wird von einer weiteren Studie bestätigt.<sup>(13)</sup> In der vorliegenden Studie zeigen sich Korrelationen zwischen der QCT-Messung und den Torsionsmessungen in der Materialprüfmaschine, welche mit den oben dargestellten, bei der Frakturheilung gefundenen Werten übereinstimmen. Mit der vorliegenden Messmethode ergibt sich eine deutlich höhere Korrelation mit den mechanischen Eigenschaften des Regenerates wie in der vergleichbaren Studie an der Distraktionsosteogenese.<sup>(291)</sup> Möglicherweise besitzt die Auswertung sagittaler Schnittbilder durch das Regenerat bessere Aussagekraft wie die axialer Schnitte, wobei letztere der Schnittbildrichtung in der klinischen Applikation entsprechen. Anlässlich der vorliegenden Studie erfolgte auch die Analyse zur Aussagekraft verschiedener Messfelder innerhalb des Regenerates. Diese wird gesondert publiziert und diskutiert werden. Für die Anwendung in der jetzigen Studie wurde der gesamte sagittale Schnitt des Regenerates zwischen den Osteotomieflächen vermessen.

In diversen anderen Studien erfolgte die Vermessung des Regenerates mittels QCT zum morphologischen Monitoring der Heilungsvorgänge ohne Vergleich mit der Biomechanik.<sup>(13,354,355)</sup> 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<sup>(354,355)</sup>, geben andere an, trotz Artefaktbildung im Messfeld zuverlässige Messungen zu erhalten.<sup>(13,300)</sup> In der vorliegenden Studie erfolgte der Abbau des Fixateur externe und die Vermessung des Regenerates ohne umgebende Weichteile. Dies verbessert zum einen die Messgenauigkeit, zum anderen vermindert sich jedoch damit die klinische Übertragbarkeit.

Die quantitative Computertomographie bestätigt im vorliegenden Versuch, dass sie die Möglichkeit einer qualitativen und quantitativen Analyse des Regenerates bietet.<sup>(61,270,284,347)</sup> Nachteilig an dem Verfahren der QCT ist die zusätzliche Strahlenbelastung der Patienten (100-300 mrem).<sup>(245)</sup> Die Verbesserung der diagnostischen Sicherheit und die damit verbundene Reduzierung der Komplikationsrate würde jedoch einen deutlichen Nutzen für die Patienten darstellen. Als zusätzliches radiologisches Verfahren bei entsprechender unklarer Klinik oder nicht eindeutigen Befunden im konventionellen Röntgenbild kann die QCT wertvolle Hinweise auf ungenügend kalzifizierte Areale im Regenerat geben und somit eine Verbiegung oder Fraktur des Knochens nach Fixateurentfernung verhindern. In der

vorliegenden Studie wurde unseres Wissens erstmalig durch longitudinale Tomogramme ein repräsentativer Teil des Kallus untersucht und dieser mit den biomechanischen Torsionseigenschaften quantitativ korreliert. Die Ergebnisse weisen einen klinisch relevanten Zusammenhang zwischen dem Mineralisierungsgrad des Gewebes im Distractionsspalte und den biomechanischen Eigenschaften des Knochens nach.

### 3.2.3 QUANTITATIVER ULTRASCHALL

Um die Ergebnisse von Eindringtiefe und Breitenausmessung des Distractionsspaltes mittels Ultraschall zu erklären, sollen hier die Arbeiten von Aronson, der die Heilungsvorgänge histologisch untersucht hat, zugrunde gelegt werden.<sup>(16)</sup> Nach seinen Beobachtungen schreitet der Durchbauprozess von den Kortikotomie-rändern ausgehend zur Mitte des Distractionsspaltes fort. Dies ließe Ultraschallbilder erwarten, die zunächst eine homogene echoarme Distractionzone zeigen. Im Verlauf müssten zunehmend echoreiche Strukturen, von den Rändern beginnend zur Mitte des Spaltes fortschreitend, abgebildet werden. Die Breitenausmessung des Distractionsspaltes müsste in diesem Fall die Durchbauprozesse exakt widerspiegeln. In den Ultraschallabbildungen des vorliegenden Versuches zeigten sich jedoch im wesentlichen zwei signifikante Abweichungen dieses Verlaufs: 1. Die meisten Versuchstiere zeigten im Ultraschallbild eine ausgeprägte Kallusbildung, so dass die Kortikotomie-ränder aufgeworfen abgebildet und die Distractionstrecke von Beginn an verkleinert dargestellt wurde. 2. Bei einigen Versuchstieren waren auch in der Mitte des Distractionsspaltes echoreiche kortikalisartig reflektierende Strukturen zu erkennen, so dass ein für die Breitenausmessung relevanter Distractionsspalte nicht mehr klar zu definieren war. Die Breitenausmessung reflektiert somit den Kallusanbau an den distrahierten Knochenenden und folglich die Einengung des Distractionsspaltes. Auch bei großen Kallusmengen kann jedoch die Verzahnung derselben fehlen und weiterhin eine fibröse sehr elastische Zwischenzone vorliegen, so dass die biomechanische Stabilität gering ist. Dementsprechend korreliert in diesem Versuch die Breitenausmessung schlecht mit den Ergebnissen der Biomechanik. Um den oben beschriebenen Abweichungen vom Idealfall der Heilung Rechnung zu tragen, könnte es sinnvoll sein, die Kontinuität der Kortikalis zu berechnen. In einer entsprechenden Studie wurde die Distractionzone von allen

vier Seiten in der longitudinalen Ebene sonographisch untersucht, die Kontinuität dieses Bereichs ermittelt und in Prozentwerten angegeben.<sup>(148)</sup> Einzig in dieser experimentellen Studie erfolgte der Vergleich der sonographischen Messungen mit den biomechanischen Eigenschaften des Regenerates. Der sonographische Messparameter der "Kortikaliskontinuität" korrelierte jedoch schlecht mit den biomechanischen Daten. Die im vorliegenden Versuch bestimmte Eindringtiefe des Ultraschalls in das Regenerat hingegen korreliert sehr gut mit den Ergebnissen der Biomechanik und zeigt überraschenderweise im Vergleich mit dem "gold standard" QCT hinsichtlich der torsionalen Steifigkeit einen vergleichbaren Determinationskoeffizienten. Die biologischen Vorgänge im Distractionsspalt und ihre Abbildung im Ultraschall bieten dafür eine logische Erklärung: Im Idealfall der Heilung ist der Distractionsspalt zu Beginn der Distraction im Ultraschallbild ein noch echoarmes Gebiet, das an den Kortikotomieändern beginnend kalzifiziert. Im Ultraschallbild ist das anhand der zunehmend echoreichen Strukturen zu erkennen. Durch die Messung der Eindringtiefe wird immer die Schwachstelle des Regenerates erfasst, gleichgültig, ob sich am Rande des Regenerates Kallus findet oder nicht. Offensichtlich ist für die mechanische Stabilität entscheidend, ob in der fibrösen Zwischenzone eine echoreiche Überbrückung stattgefunden hat. Ebenso wie die quantitative DLR und die QCT zeigen die sonographisch ermittelten Werte eine bessere Korrelation mit der Steifigkeit als mit der torsionalen Versagenslast. Die möglichen Gründe hierfür wurden bereits oben diskutiert (siehe 3.2.1). Da die Tiere ausgesprochen unterschiedliche Durchbauungsstadien aufwiesen, bot sich ein breites Spektrum an Verheilungszuständen. So ist auch der Schluss zulässig, dass die Tiefenausmessung des Distractionsspalt durch Ultraschall nicht nur zu einem Zeitpunkt der Konsolidierungsphase, sondern während der gesamten Dauer der Konsolidierung bis zur Bildung einer durchgängigen Kortikalis eine Aussage über die mechanische Stabilität des Regenerates erlaubt.

Die vorliegende Untersuchung bestätigt vorhergehende Studien, welche eine sehr frühe Visualisierung der Kalzifizierung des Distractionregenerates beschreiben.<sup>(95,283,383)</sup> Somit scheint es übereinstimmend mit anderen Autoren möglich, eine vorzeitige oder verzögerte Konsolidierung zu verhindern bzw. frühzeitig zu erkennen.<sup>(53)</sup> Verschiedene Autoren haben die Regeneratbildung im Distractionsspalt mittels Ultraschallmessungen in unterscheidbare Stadien eingeteilt. Gemeinsam äußerten sie, dass ab dem Zeitpunkt der kompletten knöchernen

Überbrückung eine genaue Einschätzung des Verlängerungspaltes nicht mehr möglich sei.<sup>(104,148,237)</sup> Einzelne Autoren geben an, dass mittels Sonographie auch das Ausmaß der kortiko-medullären Differenzierung des Regenerates im Verlauf möglich sei.<sup>(168)</sup> Dieser Auffassung wird von anderen Autoren widersprochen.<sup>(148,239)</sup> Gegen Ende des vorliegenden Versuches konnte bei zwei Tieren keine Eindringtiefe der Ultraschallsignale mehr gemessen werden. In der biomechanischen Testung zeigten diese eine komplette Verheilung mit einer höheren Torsionsfestigkeit als die gesunde kontralaterale Tibia. Rückschlüsse auf die klinische Situation lassen sich daraus jedoch nicht ziehen, da die enorm beschleunigte Regeneratkonsolidierung unter dem Einfluss von GH sicherlich anderen Gesetzmäßigkeiten folgt. In einem Review-Artikel betonen Hughes et al., dass die Sonographie eine korrekte Ausmessung der Spaltbreite zulässt.<sup>(169)</sup> Für den vorliegenden Versuch kann dies nicht bestätigt werden. Dabei muss man berücksichtigen, dass eine Osteotomie mit der oszillierenden Säge unter Erhalt des Periosts durchgeführt wurde. Dies führte zu einer Mineralisierung des Regenerates vorwiegend vom Periost aus. Wie eingangs dieses Abschnittes bereits angemerkt, “überwuchert“ diese Knochenneubildung frühzeitig die kortikalen Knochenenden und lässt eine Distanzmessung zwischen denselben nicht mehr zu. In der vorliegenden Literatur handelt es sich bei den verwendeten Schallköpfen zumeist um Linearscanner, die zum Einsatz gekommenen Frequenzen reichen von 3,5 MHz über 5, 7,5 bis 10 MHz.<sup>(104,118,143,148,168,171,237,383)</sup> Wenn das distrahierte Areal subkutan liegt, wie in der vorliegenden Studie, scheint die Schallfrequenz von untergeordneter Bedeutung zu sein. Vergleichende Studien liegen nach Wissen des Autors derzeit nicht vor. Von größerer Wichtigkeit für den intraindividuellen Vergleich des Heilungsverlaufes erscheint die Verwendung der Meßschablone, um die Messung an identischen Lokalisationen durchführen zu können. Nachteilig ist hierbei, dass für eine Vermessung mehrerer Ebenen wie sie von einigen Autoren gefordert wird<sup>(148)</sup>, auch mehrere Schablonen nötig wären. Der vorliegende Versuch zeigt übereinstimmend mit anderen Autoren, daß die Sonographie die Möglichkeit zur diagnostischen Kontrolle der Regeneratbildung eröffnet.<sup>(95,171)</sup> Damit kann die Strahlenbelastung des Patienten verringert werden, da regelmäßige Röntgenkontrollen zumindest zum Teil durch Ultraschall ersetzt werden können.

### 3.2.4 *IN-VIVO* TORSIONALE STEIFIGKEIT (IVTS)

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues Messinstrument vorgestellt, welches in der Lage ist, die Torsionssteifigkeit eines heilenden Knochenregenerates bei der Distraktionsosteogenese *in-vivo* zu messen. Die Steifigkeit wurde bestimmt, indem man ein bekanntes minimales Drehmoment auf die Regeneratzzone applizierte und den resultierenden Drehwinkel bestimmte. Der Vergleich der IVTS-Messdaten mit den gemessenen Bruchfestigkeitswerten in der Materialtestmaschine ergab eine hoch signifikante Korrelation ( $r^2= 0.8$ ). Die Ergebnisse der Modellstudie und der *in-vivo* Studie zeigten die Fähigkeit des Systems, den Heilungsverlauf eines sich neubildenden Knochenregenerates zu verfolgen, sowie die torsionale Steifigkeit des Regenerates mit guter Genauigkeit und Präzision vorauszusagen. Voraussetzung ist jedoch, dass die Messung innerhalb der oben angegebenen Steifigkeitsbereiche erfolgt (siehe 2.1.3). Die Ursache der geringeren Genauigkeit in sehr niedrigen Steifigkeitsbereichen mag in der nicht optimalen Auslastung und Auflösung der Kraftmesszelle zu finden sein. In sehr hohen Steifigkeitsbereichen hingegen kommt es vermutlich zu elastischen Verformungen des Fixateurs (vor allem der Schanz-Schrauben) und der abnehmbaren Messeinheit. Dies und die nicht-lineare Kalibrierung kann bei höheren Belastungen und höheren Steifigkeiten der Testkörper für die Ungenauigkeiten der präsentierten Methode gegenüber dem "gold standard" - der Materialtestmaschine - verantwortlich sein. Diese Genauigkeits- und Präzisionswerte müssen bei klinischem oder wissenschaftlichem Einsatz des Systems in Betracht gezogen werden. Messungen unterhalb eines Bereiches von  $0.3 \text{ Nm/}^\circ$  und über  $3.0 \text{ Nm/}^\circ$  müssen zurückhaltend interpretiert werden. Entsprechend können Unterschiede der Knochenregeneratsteifigkeit von unter 6% von dieser Anordnung nicht mehr wahrgenommen werden. Genauigkeit und Präzision sowie der Messbereich könnten sich jedoch noch weiter verbessern werden, indem die Dimensionen, die verwendeten Materialien, das Gleitlager oder der Knochen-Doppelhalbring-Abstand modifiziert würden.

Wie oben angeführt, wurde das Konzept, einen vorhandenen Fixateur externe zum Monitoring der Frakturheilung zu nutzen, bereits vielfach experimentell eingesetzt. Die ersten Berichte stammten von Autoren, welche die Knochenregeneratsteifigkeit über minimale Fixateurverformungen während normaler Belastungen gemessen haben (siehe 1.3.4).<sup>(45,66,188,200)</sup> Obwohl die Anwendbarkeit der Verfahren

demonstriert wurde, konnte bisher noch keine verbreitete Akzeptanz dieser Systeme im klinischen Gebrauch beobachtet werden. Einer der Hauptgründe für die ablehnende Haltung könnte die Empfindlichkeit dieser Messanordnungen gegenüber einer Vielzahl von unterschiedlichen Einflussfaktoren sein. Zu nennen sind hier vor allem die individuelle Fixateurkonfiguration und der Einfluss der Knochen-Implantat/Schrauben-Verankerungen. Jeder montierte Fixateur stellt ein Einzelstück dar, das mit eigenen Meßsensoren und -konstruktionen versehen und jeweils individuell kalibriert ist. Die Messungen müssten auf jeden Patienten zugeschnitten werden, um die Daten individuell zu korrigieren und auf konstruktionstechnische Unterschiede der Messanordnungen eingehen zu können. Chirurgische Revisionen wie Pin-Neupositionierung bei Lockerung oder Achsenkorrekturen während der Heilungsphase bedeuten eine Änderung des Konstruktes mit der Notwendigkeit einer Neujustierung und Korrektur des Messprozesses. Die erste klinisch anwendbare Methode besitzt trotz der im Vergleich zu anderen Systemen signifikanten Verbesserungen, den entscheidenden Nachteil, dass bei dieser Messanordnung der vorhandene Fixateur externe entfernt werden muss.<sup>(96,115,293)</sup> Folglich kann das System nicht in der Frühphase der Frakturheilung eingesetzt werden. Das vorgestellte Torsionsmesssystem besitzt gegenüber den bisher angewandten deformativen Messverfahren einige Vorteile. So ist diese Methode nach derzeitigem Wissen die Erste, die eine Torsionsbewegung für die *in-vivo* Steifigkeitsmessungen benutzt. Dieses Prinzip ermöglicht ein Belassen des Fixateurs und somit die Erhaltung der Knochenachse in allen Ebenen. Lediglich die Bewegung in der Rotationsebene wird freigegeben, die jedoch kontrolliert ausgeübt und minimal gehalten wird. Dies gewährleistet einen Schutz des sich neubildenden Knochengewebes und erlaubt den Einsatz des Systems auch in der Frühphase der Knochenheilung. Dazu kommt, dass in der etwaigen klinischen Anwendung für verschiedene Patienten nur eine abnehmbare Messeinheit innerhalb einer klinischen Einrichtung benötigt werden würde. So wurden alle Tiere im vorliegenden Versuch mit der gleichen Messeinheit untersucht. Die zu erwartenden Probleme mit dem vorgestellten Meßsystem entsprechen denen bei anderen Studien beschriebenen. So stellt die glatte Osteotomie mit einem elastischen Regenerat dazwischen den Idealfall für die Testung dar. Bei unregelmäßigen Fragmentenden wie im Falle einer Fraktur können sich diese auch bei kleinen Torsionsbewegungen ineinander verzahnen. Damit ist die Messung von *absoluten* Knochensteifigkeiten sehr eingeschränkt und

würde für die Überwachung von Frakturpatienten individuell vom Frakturtyp abhängen. Gleiches gilt jedoch auch für Methoden, welche die Biegesteifigkeit frakturierter Knochen bestimmen.<sup>(89)</sup> Beim Monitoring von Frakturen mit derartigen Methoden ist es dennoch – wenn auch bei sehr kleinen Auslenkungen eingeschränkt – möglich, die *relative* Steifigkeitsänderung im Verlauf aufzuzeigen. Ebenso wie andere Verfahren hat auch die Lockerung von Pins oder Drähten oder die Verschmutzung des Fixateurs einen Einfluss auf das Messergebnis. Diese Veränderungen der Konstante “Fixateur“ muss demzufolge vermieden werden. In der vorliegenden Studie erfolgte vor Beginn der Messungen (vor der Konsolidierungsphase) in Narkose der Tiere die Überprüfung der Festigkeit aller Fixateurpins, gelockerte Pins wurden ausgetauscht.

Im vorliegenden Versuch konnten mit der Messung der Torsionssteifigkeit die Heilungsverläufe der einzelnen Tiere verfolgt werden. Die Ergebnisse demonstrieren die Anwendbarkeit des *in-vivo* Torsionssteifigkeits-Messverfahrens im Rahmen der Distraktionsosteogenese im Tierexperiment. Die Methode kann mit guter Genauigkeit und Präzision den Heilungsverlauf des sich regenerierenden Knochens verfolgen. Aufgrund der hohen Korrelation der *in-vivo* Torsionssteifigkeit und des maximalen Drehmomentes in der biomechanischen Testung am letzten Versuchstag wurde gefolgert, dass unter Berücksichtigung der oben angeführten Limitationen anhand von *in-vivo* Torsionssteifigkeitsmessungen Aussagen über die Belastbarkeit und Bruchfestigkeit heilender Knochen während der Frühphase der Regeneratkonsolidierung bei der Distraktionsbehandlung möglich sind.

### **3.3 WIRKUNG VON GH AUF DIE DISTRAKTIONSOSTEOGENESE**

#### **3.3.1 SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN**

In der hier vorliegenden Studie wurde erstmals das Verhalten der GH/IGF-I -Achse während der Distraktionsosteogenese unter Stimulation durch GH untersucht. Zahlreiche andere Studien zur Untersuchung eines stimulativen Effektes von Wachstumshormon auf die Frakturheilung hatten artfremdes GH eingesetzt. Die Ergebnisse waren widersprüchlich.<sup>(28,29,74,267)</sup> Im vorliegenden Versuch wurde ein artgleiches, rekombinantes Wachstumshormon systemisch appliziert. Bei den Tieren der GH-Gruppe kam es postoperativ zu einem signifikanten Anstieg der wachstumshormonabhängigen Parameter IGF-I und IGFBP-3. Auch erhöhte sich der

Anteil des freien IGF-I am gesamten IGF-I. Ebenso wie im Vorversuch zeigte sich, dass die GH/ IGF-I -Achse stimulierbar war.

Bei der Distraktionsosteogenese zeigten sich phasenabhängige Verläufe der IGF-I Serumkonzentration. Während der Distraktionsphase kam es im Serum der Kontrollgruppe zu einer Abnahme der Konzentration des gesamten IGF-I. Aus dieser Beobachtung und den in der Literatur beschriebenen lokalen Vorgänge kann ein Übertritt des Wachstumsfaktors ins Gewebe während der Distraktion vermutet werden.<sup>(322)</sup> Eine weitere Erklärung für den Abfall der IGF-I Konzentration in der Kontrollgruppe während der Distraktion, welcher auch begleitet war durch einen Abfall der Serumwerte des wachstumshormonabhängigen IGFBP-3, könnte ein kataboler Zustand mit einer Insensitivität auf das endogen ausgeschüttete GH sein. An brandverletzten Patienten wurden posttraumatische, katabole Stadien mit einer mangelnden IGF-I Antwort auf endogenes GH beschrieben.<sup>(5)</sup> Der Katabolismus ist charakterisiert durch niedrige IGF-I Serumkonzentrationen bei hohen endogenen GH-Spiegeln. Durch die systemische Applikation des rekombinanten porcinen Wachstumshormons war dieser Abfall nicht nur kompensierbar, es konnte sogar ein deutlicher Anstieg des IGF-I in der GH- Gruppe in dieser Phase gemessen werden. Durch die systemische GH-Applikation stand somit während der Distraktionsphase ausreichend IGF-I im Serum zur Verfügung. Am Ende des untersuchten Zeitraumes der Konsolidierungsphase wurde in beiden Gruppen die höchste Konzentration des gesamten IGF-I im Serum gemessen. Diese lag auch in der Kontrollgruppe signifikant über dem Basalwert. Eine vorangegangene Untersuchung zeigte an aus humanem Frakturkallus gewonnenen Osteoblasten, dass gerade zur Zeit des Knochenremodelings die Konzentration der mRNA für IGF-I in diesen erhöht und somit eine vermehrte lokale Produktion und Freisetzung wahrscheinlich ist.<sup>(10)</sup> Während der Konsolidierungsphase könnte ein entgegengesetzter Transport von IGF-I aus dem Kallus in die Zirkulation stattgefunden haben. Im vorliegenden Versuch konnten die lokalen molekularbiologischen Vorgänge in der Osteotomiezone im Verlauf der Distraktionsosteogenese nicht betrachtet werden. Für das Verständnis der Wachstumshormon / IGF-I -Achse ist die zusätzliche Untersuchung der Bindungsproteine wichtig. In unserem Versuch zeigte das IGFBP-3 als Haupttransportprotein und Speicher des IGF-I im Serum seinen bekannten wachstumshormonabhängigen Charakter. So ist parallel zum IGF-I in der GH-Gruppe ein signifikantes Ansteigen der IGF-I-Konzentration im Serum festzustellen.

Auf zellulärer Ebene sind widersprüchliche Ergebnisse über die Art und Weise der Auswirkung des IGFBP-3 auf die IGF-I-Aktivität beschrieben worden. Versuche mit einem IGFBP-3-Überschuss bewirkten eine Inhibition der IGF-I-Effekte in Osteoblastenzellkulturen.<sup>(314)</sup> Einzelne Studien sahen eine Verstärkung des Proliferationsstimulus von IGF-I auf Rattenosteoblasten nach GH Gabe *in-vitro* und führten dies auf eine erhöhte IGFBP-3 Konzentration im Medium zurück.<sup>(113)</sup> Andere fanden eine potenzierte mitogene Wirkung von IGF-I auf Rinderfibroblasten in Gegenwart von IGFBP-3.<sup>(93)</sup> Aufgrund dieser *in-vitro* Ergebnisse wurde ovariectomierten Ratten rekombinantes IGFBP-3 zusammen mit IGF-I infundiert. Diese Untersuchung zeigte, dass die Kombination beider einen stärkeren positiven Effekt auf die Knochenformation am Schenkelhals von Ratten hat, als jeweils einzeln verabreicht.<sup>(24)</sup> Entscheidend scheint das Verhältnis der Konzentration von gesamtem IGF-I zur Konzentration des IGFBP-3 zu sein, da durch dieses die Menge des freien IGF-I festgelegt wird.<sup>(193)</sup> Der Haupteffekt des Serum-IGFBP-3 auf die IGF-I Konzentration liegt in der Verlängerung der Plasma-Halbwertszeit. Wie oben dargestellt beträgt diese für freies IGF-I in humanem Serum weniger als zehn Minuten und die des im 150-kD ternary-complex gebundenen IGF-I 12-15 Stunden (siehe 1.2.3). Somit stellt der durch Wachstumshormon induzierbare 150-kD ternary-complex eine Art Speicher für IGF-I dar, aus dem bei Bedarf vermehrt IGF-I zur Verfügung gestellt werden kann.<sup>(146)</sup> In der vorliegenden Studie steigen in der GH-Gruppe auch die Serumkonzentrationen an ungebundenem (freien) IGF-I an, sie zeigen einen nahezu parallelen Verlauf zum Verlauf der IGF-I-Konzentration. Dies zeigt, dass das IGFBP-3 oder ein anderer Bestandteil des 150-kD ternary-Komplexes unter dem Einfluss von GH nicht in dem gleichen Maße produziert wird wie IGF-I. Ob dies einem physiologischen Steuerungsmechanismus unterliegt, oder ob die physiologische Kapazität zu Bildung des 150-kD ternary-Komplexes nicht ausreicht, kann anhand der vorliegenden Untersuchung nicht geklärt werden.

Hinsichtlich des IGFBP-1 zeigten im vorliegenden Versuch weder die Applikation von GH, noch die Behandlungsphasen einen Einfluss auf dessen Serum-Level. Dies bestätigt frühere Studien, in welchen IGFBP-1 als unabhängig vom GH-Spiegel<sup>(41)</sup> und ohne Beziehung zu Knochenstoffwechsel beschrieben wird.<sup>(224)</sup> Beim IGFBP-2 kam es zunächst zu einem signifikanten Abfall der Serumwerte in beiden Gruppen. Danach lagen die Werte in der GH-Gruppe signifikant unter denen der Kontrollgruppe. Es ist bekannt, dass IGFBP-2 die Aktivität von IGF-I inhibiert.<sup>(315)</sup>

Eine Suppression der IGFBP-2-Konzentration durch GH könnte somit einen weiteren, indirekten Mechanismus zur Steigerung des IGF-I Effektes darstellen. IGFBP-2 inhibierte in Osteoblastenzellkulturen eine durch IGF-I hervorgerufene Steigerung der Zellproliferationsrate und Kollagensynthese.<sup>(315)</sup> Somit lässt sich ein Effekt auf das Remodeling des Knochens vermuten. Bei Betrachtung des IGFBP-4 fiel in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg des Mittelwertes von der Basalmessung zum vierten Tag des Versuches auf. Da IGFBP-4 in erheblichem Maße im Knochen gespeichert wird, könnte die Freisetzung direkt von der Osteotomiefläche eine Erklärung dafür sein. IGFBP-4 inhibierte die Effekte von IGF-I in fast allen Studien<sup>(186,312)</sup> und könnte so zum beobachteten Status der Wachstumshormonresistenz in der Kontrollgruppe beitragen. Der inhibitorische Effekt von IGFBP-4 auf IGF-I folgt einer Sättigungskinetik.<sup>(186)</sup> In der mit GH behandelten Gruppe wird IGF-I im Übermaß zur Verfügung gestellt, und das vermehrt zirkulierende IGFBP-4 könnte nach kurzer Zeit seine inhibierende Aktivität verlieren. Dieser inhibitorische Effekt des IGFBP-4 könnte jedoch eine Erklärung für den verzögerten Anstieg von b-ALP in der GH-Gruppe sein.

In beiden Behandlungsgruppen kommt es postoperativ zu einem Abfall des Knochenformationsmarkers b-ALP, in der Kontrollgruppe ist dies signifikant. Der Abfall der b-ALP nach Frakturen und nach knochenchirurgischen Eingriffen wurde auch in anderen Studien beschrieben; erst in späteren Phasen der Frakturheilung kann dieser als Parameter der Frakturheilung herangezogen werden. Die Ursache für den initialen Abfall der b-ALP ist bisher nicht bekannt.<sup>(224,248,358)</sup> Die systemische Applikation von rekombinantem porcinen Wachstumshormon (r-pGH) führte in der vorliegenden Studie zu Beginn der Distraktionsphase zu einem signifikanten Anstieg der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase im Serum. Dies bestätigt die zahlreichen klinischen Studien an GH-defizienten Patienten, bei denen es durch die Substitution von GH sowohl zur Zunahme der Knochenmasse als auch der Serum-Marker der Knochenformation kommt.<sup>(194,198,305,311)</sup> Die Erhöhung der b-ALP wird teilweise als Parameter für eine erfolgreiche Substitutionstherapie mit Wachstumshormon genutzt.<sup>(62)</sup> Dieser "Knochen-anabole" Effekt konnte auch nach Wachstumshormongabe an gesunden freiwilligen Erwachsenen und osteoporotischen älteren Personen festgestellt werden.<sup>(62,63,221,269)</sup> Insbesondere erbrachte auch die kurzzeitige systemische Gabe von GH eine längerfristige Erhöhung von Knochen-Formationsmarkern im Serum (siehe 1.2.5).<sup>(179,204)</sup>

Wie ebenfalls oben angeführt wurde in mehreren Studien ein stimulierender Einfluss von GH auf die Serumparameter der Knochenresorption beschrieben (siehe 1.2.5).<sup>(48,62,72,204,305)</sup> Dies konnte im Vorversuch tendenziell bestätigt werden (siehe 2.1.2). In der hier vorliegenden kürzer dauernden Studie konnte zwar ein signifikanter Anstieg des ICTP zu Beginn der Konsolidierungsphase gefunden werden, dies traf jedoch auf beide Gruppen zu. Im Widerspruch dazu stehen die Ergebnisse einer klinischen Studie, bei welcher die Applikation von GH in einer sofortigen Erhöhung des ICTP im Serum resultierte.<sup>(204)</sup> Auch in der parallel durchgeführten histomorphometrischen Analyse der vorliegenden Untersuchung wurde eine signifikant geringere Knochendichte der kortikalen tibialen Knochenenden im Regenerat der mit r-pGH behandelten Tiere als Zeichen eines erhöhten Remodelings und damit höheren resorptiven Aktivität gefunden (siehe 2.3.4). Dies deutet darauf hin, dass möglicherweise eine lokal erhöhte Knochenresorption nicht zu einer Erhöhung von ICTP im Serum führen muss.

Zusammengefasst bewirkt die systemische Gabe von rekombinantem GH im vorliegenden Modell *in-vivo* eine Stimulation der Osteoblastenaktivität. Es besteht ein linearer Zusammenhang zwischen dem IGF-I-Serumspiegel und der Aktivität an b-ALP im Serum. Dies weist darauf hin, dass der eventuelle anabole Effekt von GH auf Osteoblasten möglicherweise IGF-I vermittelt ist. Verstärkt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass die Korrelation zwischen der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase und dem freien – biologisch aktiven – IGF-I noch deutlich höher ist. Dies weist auch den die biologische Aktivität von IGF-I bestimmenden IGFBPs eine regulierende Funktion zu. Die Stimulation der Knochenresorption scheint in der Frühphase der Distraktionsosteogenese keine Rolle zu spielen. Insgesamt scheint bei den Kontrolltieren initial postoperativ ein katabole Phase des Knochenmetabolismus zu bestehen, gekennzeichnet durch eine signifikante Erniedrigung der b-ALP. Gleichzeitig fallen auch IGF-I, freies IGF-I und IGFBP-3 signifikant ab, IGFBP-4 steigt an. Die systemische Applikation von GH ist in der Lage, in dieser Phase die b-ALP als Parameter der Knochenformation deutlich anzuheben. Diese Osteoblastenstimulation könnte möglicherweise auch im Regenerat zu einer vermehrten Matrixproduktion führen.

### 3.3.2 HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

In der vorliegenden Studie wurde in der mit GH behandelten Gruppe eine signifikant erhöhte Kallusmenge und Menge an kalzifiziertem Gewebe im Kallus gefunden. Gleichzeitig war in der GH-Gruppe der Kallusdurchmesser signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Die bisherigen Studien zum Einfluss von GH auf diese Parameter erbrachten widersprüchliche Ergebnisse. Während einige histologische Studien keinen Wirkungsnachweis erbrachten<sup>(325)</sup>, konnten andere eine verstärkte Kallusbildung unter GH-Applikation beschreiben<sup>(213,257,326)</sup>. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass alle bisherigen histologischen Studien an sekundärer Frakturheilung durchgeführt wurden und somit ein Vergleich zur vorliegenden Studie nur eingeschränkt möglich ist. Die sogenannte intramembranöse Ossifikation, welche bei der Distraktionsosteogenese vorliegt, ist charakterisiert durch die direkte Deposition von Osteoid durch Osteoblasten, ohne Auftreten von Knorpelzellen (siehe 1.1.2).<sup>(12,173)</sup> Da bekannt ist, dass GH sowohl *in-vitro* als auch *in-vivo* chondroide Zellen zur Proliferation und Matrixsynthese stimuliert, stand zu befürchten, dass eine Transformation des intramembranösen Kallus zur sekundären Frakturheilungszone induziert wird. Dieses konnte jedoch ausgeschlossen werden, da die histomorphometrischen Untersuchungen zeigten, dass in der mit GH behandelten Gruppe signifikant weniger Knorpel im Regenerat vorhanden ist. Diese, wenn auch geringe Menge an Knorpel kann man unterschiedlich interpretieren: zum einen kann diese auf eine gewisse Instabilität des Konstruktes hindeuten. So könnten die, wenn auch limitierten Rotationsbewegungen bei den *in-vivo* Steifigkeitsmessungen dafür verantwortlich sein. Zum anderen könnte dies ein Beleg für die Theorie der sogenannten "transchondralen Ossifikation" sein. Bei dieser käme es gerade bei der Distraktionsosteogenese zu einer Transformation von chondroiden Zellen zu Osteoblasten; somit wäre das Auftreten von Knorpelzellen in einem Distraktionsregenerat ein Normalbefund.<sup>(382)</sup> In einer früheren Untersuchung zur sekundären Frakturheilung an Ratten wurde durch den Einfluss von GH eine deutliche Veränderung der Kallusstruktur beschrieben. Diese war gekennzeichnet durch einen lockeren, aufgetriebenen Kallus der ein verzögertes Remodeling und eine große Menge an hämatopoetischen Zellen zeigte.<sup>(257)</sup> Alle diese Veränderungen konnten im vorliegenden Versuch nicht nachgewiesen werden. Die histomorphometrische Vermessung der Knochendichte der Tibiakortices proximal und distal der Osteotomie erbrachte vielmehr Hinweise auf eine Beschleunigung des Remodelings.

Eine Erklärung für diese gegensätzlichen Ergebnisse könnte unter anderem im deutlichen strukturellen Unterschied zwischen dem Kallus bei der sekundären Frakturheilung und dem bei der Distraktionsosteogenese begründet sein.<sup>(306)</sup> Zudem wurde in der zitierten Studie ein artfremdes (humanes) GH mit im Vergleich zur präsentierten Untersuchung 30-fach höherer Dosierung eingesetzt. Darüber hinaus konnte mittels der *in-vivo* Markierung der Knochenformation nachgewiesen werden, dass der stimulative Effekt des Wachstumshormons vor allem in der Anfangsphase der Distraktionsosteogenese vorhanden ist. Im Gegensatz zur klinischen Anwendung der Distraktionsosteogenese, bei welcher eine relevante Ossifikation des Regenerates erst in der Konsolidierungsphase erfolgt, konnte eine deutliche Kallusformation sogar während der Distraction gefunden werden.

### **3.3.3 BILDGEBENDE UND BIOMECHANISCHE UNTERSUCHUNGEN**

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die Applikation von porcinem Wachstumshormon bei der Distraktionsosteogenese am Yucatan Micropig<sup>®</sup> sowohl die Regeneratsteifigkeit während der Konsolidierung, als auch die torsionale Bruchfestigkeit und die Torsionssteifigkeit des Regenerates signifikant zu steigern vermag. Der stimulierende Effekt konnte in den *in-vivo* biomechanischen Untersuchungen schon am Beginn der Distraktionsphase nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den histologischen Beobachtungen überein, welche mittels *in-vivo* Markierung der Knochenformation eine relevante Kallusbildung schon während der Distraktionsphase zeigte (siehe 3.3.2). Ebenso konnten die quantitativen Ultraschalluntersuchungen und die quantitative DLR in den Messungen während der Konsolidierungsphase einen signifikanten Vorsprung der GH-behandelten Tiere darstellen. Die QCT schließlich erbrachte in Analogie zur Histomorphometrie im Regenerat eine signifikant erhöhte Mineraldichte in der Wachstumshormon-Gruppe.

Die Distraktionsosteogenese stellt ein gut reproduzierbares Modell der Frakturheilung dar, da eine standardisierte Osteotomie Verwendung findet und die Distraction gleich große “Knochendefekte” hinterlässt. Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass es sich bei der Distraktionsosteogenese um eine rein intramembranöse Frakturheilung handelt, welche im Gegensatz zur sekundären Frakturheilung ohne Knorpelbildung zur Kallusformation führt (siehe 1.1.2).<sup>(14)</sup> Grundlegende Heilungsmechanismen lassen sich jedoch bei beiden Formen der

Knochenheilung finden und erlauben einen wenn auch limitierten Vergleich der verschiedenen Studien. So kommt es bei jeder Knochenheilung zu einer Transformation, Immigration und Differenzierung von osteogenen Zellen, sowie zur Deposition von Matrix und deren Kalzifizierung, welches schlussendlich zur Formation von primären Geflechtknochen führt.<sup>(13,14)</sup>

In der Vergangenheit wurden widersprüchliche Ergebnisse zum Einfluss von GH auf die Frakturheilung publiziert: während mehrere Studien einen stimulierenden Effekt von GH zeigen konnten<sup>(33,264)</sup>, fanden andere Untersuchungen keinen Einfluss auf die Kallusbildung.<sup>(74,267)</sup> Diese widersprüchlichen Ergebnisse könnten zumindest teilweise ihre Ursache in den unterschiedlichen Methoden und Versuchsanordnungen haben, welche in den früheren Studien Verwendung fanden. Einer der wichtigsten Punkte ist die mögliche Antikörperbildung gegen allogenes GH, der damit einhergehende Wirkungsverlust des Wachstumshormons wurde in mehreren Untersuchungen nachgewiesen.<sup>(353,386)</sup> Wenn die endokrinen Regelkreisläufe intakt sind, kommt es bei systemischer Applikation von GH zum Anstieg von IGF-I im Serum. Lediglich eine vorhergehende Studie hat jedoch im Frakturheilungsmodell den Einfluss des applizierten GH auf den IGF-I-Serumspiegel überprüft.<sup>(74)</sup> In dieser Publikation wurde berichtet, dass rekombinantes humanes GH keinen Einfluss auf die Verheilung von osteotomierten Kaninchentibiae hat; gleichzeitig konnte jedoch in der GH-behandelten Gruppe kein IGF-I-Anstieg im Serum verzeichnet werden.<sup>(74)</sup> Die Ausschüttung von GH aus der Hypophyse bewirkt die Produktion von IGF-I in der Leber und eventuell auch im mesenchymalen Bindegewebe.<sup>(110,349)</sup> Es ist etabliert, dass zusätzlich zum direkten Effekt von GH auf mesenchymales Gewebe<sup>(255)</sup> auch ein indirekter, IGF-I vermittelter, Einfluss existiert.<sup>(70,141,178)</sup> Obwohl die IGF-I-Serumspiegel die lokalen IGF-I Spiegel in der Zone der Frakturheilung nicht widerspiegeln müssen, so bedeutet ein systemischer Anstieg des IGF-I nach Applikation von GH doch, dass ein IGF-I-vermittelter Effekt auf die Zone der Knochenheilung zumindest theoretisch möglich ist. Unseres Wissens ist die vorliegende Studie die erste, welche homologes, synthetisches GH in einem Tierversuch zur Frakturheilung einsetzt. Der signifikante Anstieg von IGF-I (440 %) weist darauf hin, dass im vorliegenden Model das eingesetzte GH sowohl biokompatibel als auch ausreichend dosiert war.

Zusätzlich zur möglichen Antikörperbildung gegen allogenes GH könnten weitere Faktoren zu den widersprüchlichen Ergebnissen früherer Studien geführt haben. In

den meisten Studien wurden Nagetiere verwendet; es gibt Hinweise, dass im Vergleich zur humanen Frakturheilung bei Nagetieren signifikant mehr Knorpel im Kallus exprimiert wird.<sup>(280)</sup> So wird z.B. die Frakturheilung bei der Ratte von nicht-osteonaler Knochenformation dominiert.<sup>(32)</sup> Verglichen mit Kaninchen und Ratten könnte das Minischwein-Modell hinsichtlich endokriner Zyklen und den Vorgängen bei der Frakturheilung der humanen Situation ähnlicher sein. Weiterhin liegt bei älteren Studien eine Inhomogenität der Versuchs- und Kontrollgruppen vor<sup>(160,384)</sup>, die Spezifität des Wachstumshormons ist unbekannt<sup>(153)</sup>, juvenile Tiere werden verwendet oder das Geschlecht und Alter der Tiere wurden überhaupt nicht kontrolliert.<sup>(351,379,384)</sup>

Einige Studien untersuchten den möglichen Unterschied zwischen den Gruppen durch eine mechanische Testung der verheilten Knochen.<sup>(351,379)</sup> Es gilt jedoch zu berücksichtigen, dass Einmaltestungen am Ende des Versuches irreführend sein können, da ein etwaiger Unterschied zwischen den Gruppen zu einem früheren Zeitpunkt bestanden haben könnte. Um dieses Problem zu vermeiden, wurde in einigen Studien die gesamte Untersuchungsgruppe zu verschiedenen Zeitpunkten gemessen, welches bei einer destruktiven biomechanischen Testung zu einer entsprechenden Erniedrigung der Fallzahl führte. Die neu entwickelte, nicht destruktive *in-vivo* Messung der Steifigkeit ermöglichte in der vorliegenden Untersuchung die kontinuierliche Erfassung der Regeneratfestigkeit bereits während des Versuches. Hier konnte bereits zu Beginn der Konsolidierungsphase ein signifikanter Unterschied zwischen der GH-Gruppe und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Dies weist auf einen stimulierenden Einfluss von GH bereits in der Distraktionsphase hin. Der Verlauf der *in-vivo* Steifigkeit aufgetragen gegen die Zeit zeigt während der Regeneratkonsolidierung einen Vorsprung der behandelten Gruppe von einer Woche gegenüber der Kontrollgruppe. Um die im vorliegenden Experiment erstmals eingesetzte *in-vivo* Steifigkeitsmessung zu validieren, wurde das Versuchsende so geplant, dass mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit auch in der destruktiven *post-mortem* Testung eventuelle Unterschiede zwischen den Gruppen gemessen werden können. Im Unterschied zu einer sogenannten kritischen Defektgröße ist basierend auf den Vorversuch zu erwarten, dass beide Gruppen verheilen und somit nach einer genügend langen Versuchszeit keine Differenz in den mechanischen Eigenschaften mehr vorliegt. Im vorliegenden Versuch konnten die Werte der *in-vivo* Messung durch die Testung in der Materialtestmaschine bestätigt werden.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass rekombinantes GH möglicherweise eine Option zur Verbesserung der Frakturheilung darstellt. Insbesondere die systemische Anwendbarkeit bietet Vorteile gegenüber den derzeit propagierten Ansätzen. Sowohl autologe und allogene Knochentransplantation als auch synthetische Implantate und die Applikation von Wachstumsfaktoren erfordern es, die Frakturzone bzw. Distaktionszone operativ darzustellen. Die vorliegende Studie lässt jedoch wichtige Fragen unbeantwortet: Studien zur Beziehung zwischen Dosis und Wirkung von GH stehen noch aus, ebenso muss die komplette Verheilung einer Fraktur oder Distaktionszone und das Remodeling der Kallusmanschette unter GH-Medikation abgewartet werden. Auch die in dem vorliegenden Versuch gefundene Erhöhung des IGF-I Serumspiegels um mehr als des vierfache ist für die klinische Applikation zurückhaltend zu betrachten. Die Dosierung von 100 µg/kgKG/Tag ist gewählt worden, weil sie die Ausschüttung von endogenem Wachstumshormon beim Schwein sicher unterdrückt und somit interindividuelle Schwankungen des GH-Spiegels bei den Versuchstieren limitiert.<sup>(271)</sup> Ob ein derart hoher IGF-I Spiegel in der klinischen Anwendung signifikante Nebenwirkungen hervorrufen würde, ist derzeit nicht geklärt. Trotz dieser noch ausstehenden Untersuchungen stellt jedoch die Gabe von GH nach Ansicht des Autors zumindest bei der Distaktionsosteogenese eine lohnende Therapieoption dar, welcher weiter klinisch und experimentell nachgegangen werden sollte.

### 3.4 NEBENWIRKUNGEN DES WACHSTUMSHORMONS

Die Tatsache, dass die Therapie mit Wachstumshormon im Rahmen einer Frakturheilung oder Distraktionsosteogenese an sonst gesunden Erwachsenen durchgeführt würde, wirft natürlich die Frage nach eventuellen unerwünschten Nebenwirkungen auf. Ein Überschuss an Wachstumshormon im Erwachsenenalter führt zur Ausbildung einer Akromegalie. Infolge vermehrten Wachstums insbesondere von Gesichtsteilen und -skelett sowie der Extremitäten kommt es bei den Betroffenen zu einer selektiven Vergrößerung der Akren. Dies ist besonders bei chronischer Erhöhung der endogenen GH-Freisetzung (insbesondere bei Hypophysentumoren) der Fall. Für die kurzzeitige Anwendung von GH bei Frakturen oder der Distraktionsosteogenese sind derartige Nebenwirkungen nicht zu erwarten. Als weitere mögliche Nebenwirkungen einer Therapie mit Wachstumshormon beim Erwachsenen sind diskutiert worden: Manifestierung latenter Hypothyreosen, Epiphyseolyse des Femurkopfes, die Bildung von Antikörpern gegen Wachstumshormon, das Entstehen einer Insulinresistenz, die Retention von Wasser, Hypertension, Arthralgie sowie die Auslösung eines Karpaltunnelsyndroms. Ein weiterer Diskussionspunkt ist, ob eine Therapie mit Wachstumshormon zum Auftreten von Malignomen oder Leukämie führt.<sup>(164,177)</sup> 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.<sup>(78,134,142,150,208,234,380)</sup> Patienten mit Wachstumshormonmangel weisen auch ohne eine Therapie mit diesem Hormon ein erhöhtes Risiko auf, an Leukämie zu erkranken. Bei Patienten, die an einem Wachstumshormonmangel leiden und ein Malignom oder Leukämie überstanden haben, weisen die mit Wachstumshormon behandelten nicht häufiger ein Rezidiv auf als die ohne Therapie.<sup>(7,54,337)</sup> Insgesamt ließ sich bisher kein Nachweis erbringen, dass GH das Auftreten von Malignomen hervorruft oder begünstigt. Klinisch weit bedeutender ist ein möglicher diabetogener Effekt des Wachstumshormons bei einer Langzeittherapie. Es wird berichtet, dass Patienten unter Wachstumshormongabe eine insulinpflichtige Hyperglykämie entwickelten.<sup>(139)</sup> Dieser diabetogene Effekt wurde ebenfalls in Tierversuchen mit Schweinen beobachtet.<sup>(137,138)</sup> Kurz nach einer einmaligen Gabe von Wachstumshormon fällt der Blutzucker ab, steigt dann aber deutlich an. Es kommt zu einer vermehrten

Insulinausschüttung, um den erhöhten Blutzuckerspiegel zu kompensieren, dies führt zu einer Insulinresistenz bzw. möglicherweise zu einer Erschöpfung der insulinproduzierenden Zellen im Pankreas und damit zu einem Diabetes, der allerdings nach Absetzen der Wachstumshormontherapie meist reversibel ist. Eine Insulinresistenz wie auch die Ausbildung von akromegalieähnlichen Erscheinungsbildern sind eindeutig dosisabhängig bzw. abhängig von der Dauer der Therapie. Es sollten Patienten mit grenzwertigem oder manifestem Diabetes mellitus vor einer GH-Applikation identifiziert werden und von der Behandlung ausgeschlossen sein. Die weiteren, für die Akutgabe beschriebenen unerwünschten Nebenwirkungen betreffen vor allem die Flüssigkeitsretention mit ihren Folgen (Carpaltunnel-Syndrom, Impingementsyndrom der Schulter). Diese Symptome können in der Regel mit einer Dosisreduktion beherrscht werden.<sup>(81)</sup> Im vorliegenden Versuch konnte kein offensichtlicher Unterschied im Verhalten (Belastung der operierten Extremität, Fressverhalten, Gesundheitszustand) zwischen den Kontrolltieren und den mit GH behandelten Tieren gesehen werden.<sup>(289)</sup> Serologisch zeigte sich jedoch eine durchschnittliche Erhöhung des Glucose-Spiegels um 10%. In einem weiteren Experiment zur Verheilung osteochondraler Defekte erfolgte ebenfalls am Yucatan Micropig<sup>®</sup> über einen längeren Zeitraum (6 Wochen) die Gabe der gleichen Dosis r-pGH wie im vorliegenden Versuch. Das Verhalten der Tiere (Schmerz, Fressverhalten, Stress usw.) wurde tierärztlich nach dem Score von Morton und Griffiths bewertet; es ergab sich kein Unterschied zwischen den Kontrolltieren und der mit GH behandelten Gruppe.<sup>(26,256)</sup> Ebenso waren die erhöhten Serum-Glucosewerte gegen Ende des Versuches bei nahezu allen Tieren wieder normalisiert. Aufgrund der oben angeführten Publikationen ergeben sich bestimmte Ausschlußkriterien, welche bei der klinischen Anwendung von Wachstumshormon im Falle einer Fraktur oder Distractionsosteogenese sorgfältig überprüft werden müssen. Um so mehr, da es sich bei diesen Indikationen in der Regel hinsichtlich des endokrinen Zustandes um eine elektive Situation handelt.

### 3.5 SCHLUSSFOLGERUNG

Die vorliegenden Studien konnten zeigen, dass eine Distractionsosteogenese am Minischwein durchführbar ist. Es erwies sich, dass das Tiermodell Yucatan Micropig® eine enorme osteogene Potenz besitzt. Die angewandten bildgebenden Verfahren (QCT, quantitative Sonographie, quantitative DLR) eignen sich, teilweise unter speziellen Bedingungen, auch zur Vorhersage biomechanischer Eigenschaften des Regenerates. Mittels der Applikation von rekombinantem porcinen Wachstumshormon lässt sich bei der Distractionsosteogenese am Yucatan Minischwein die Konsolidierung des Regenerates stark beschleunigen. Die biomechanischen *in-vivo* als auch die *post-mortem* Messungen zeigen, dass es unter dem Einfluss von GH sowohl zu einer schnelleren Zunahme der Regeneratsteifigkeit als auch zu einem deutlichen Vorsprung in der Regeneratfestigkeit kommt. Mittels bildgebender Verfahren und Histomorphometrie konnte eine schnellere Mineralisierung des Distractionsregenerates nachgewiesen werden. Letztere Messungen zeigen auch, dass der Effekt der Regeneratmineralisierung bereits während der Distractionsphase beginnt und die Kallusqualität unter dem Einfluss von GH nicht verändert ist. Histomorphometrisch findet sich unter GH-Einfluss ein verstärktes Remodeling der kortikalen Knochenenden, dies findet jedoch keine Entsprechung im gemessenen Serumparameter der Knochenresorption. Der vermehrten Mineralisierung des Regenerates könnte die gefundene signifikante Erhöhung des gemessenen Serum-Markers der Knochenformation unter GH-Einfluss entsprechen. Dieser Marker korreliert signifikant mit dem Serumspiegel des IGF-I. Dies legt nahe, dass dieser zirkulierende Wachstumsfaktor den knochen-anabolen Effekt des GH vermittelt. Die Analyse der Serumspiegel der Bindungsproteine des IGF-I macht deutlich, dass diese zum Teil sowohl von GH beeinflusst sind als auch wiederum die Verfügbarkeit des IGF-I im Serum steuern und somit Einfluss auf den Effekt des applizierten Wachstumshormons nehmen.

### 3.6 AUSBLICK

Heutzutage etablierte Indikationen für eine Wachstumshormontherapie sind der hypophysäre Minderwuchs, das Turnersyndrom und andere Formen des Minderwuchses. Ebenso wird es eingesetzt bei renaler Insuffizienz im Kindesalter und als Substitutionstherapie bei Erwachsenen mit Wachstumshormonmangel. Die Ergebnisse der klinischen Studien an Patienten mit hoher metabolischer Belastung, wie es bei Verbrennungsoptionen, Polytraumapatienten und Patienten mit einer Sepsis der Fall ist, sind widersprüchlich. Die Wachstumshormongaben scheinen hier vor allem Substrate zu mobilisieren und sich nicht positiv auf den Proteinhaushalt auszuwirken.<sup>(46,83)</sup> Wie oben bereits angemerkt, können basierend auf den vorliegenden Studien, keine Aussagen zu den lokalen Vorgängen im Regenerat hinsichtlich des Einflusses von GH auf Zelldifferenzierung, Matrixproduktion, Rezeptorexpression oder Wachstumsfaktorensynthese getroffen werden. Dies wird derzeit in einer DFG-geförderten Untersuchung an einem Osteotomiemodell der Ratte auf molekularbiologischer Grundlage untersucht. Einzelne Kongressveröffentlichungen aus dieser Untersuchung zeigen *in-vivo*, dass lokal im Kallus sowohl IGF-I als auch GH selbst eine Stimulation der Matrixsynthese bewirkt.<sup>(25)</sup> Durch weitere Untersuchungen auch bei Defektfrakturen und Osteotomien konnte unsere Arbeitsgruppe die Wirksamkeit des GHs auch auf andere Situationen der Knochenheilung wie Defektfrakturen und Osteotomien nachweisen.<sup>(27,212,287)</sup> Dies hat mittlerweile zu einer klinischen Phase-II-Studie geführt, in welcher bei über 450 Tibiaschaftfrakturen die klinische Einsetzbarkeit und Wirksamkeit von Wachstumshormon überprüft wird. Ebenso wurde in einer weiteren Studie eine positive Wirkung der systemischen Applikation von Wachstumshormon auf die Verheilung osteochondraler Defekte am Großtiermodell gezeigt.<sup>(26)</sup>

Es ist zu erwarten, dass systemisch applizierbare osteogenetisch wirksame Substanzen mit ihrem erweiterten Indikationsspektrum in Zukunft die Liegedauer bei Frakturen verkürzen helfen und bei der Behandlung von Frakturheilungsstörungen weitere potente Behandlungsoptionen bieten werden.

## 4 Zusammenfassung

Grundlage für die vorliegenden Arbeiten bildet das Bemühen, die sehr lange Behandlungsdauer bei der Distractionsosteogenese und die damit verbundene lange Tragezeit der externen Fixation zu verkürzen. Es sollte überprüft werden, ob die systemische Applikation von Wachstumshormon (GH) in der Lage ist, die Regeneratkonsolidierung signifikant zu beschleunigen. Um die Wirksamkeit des Wachstumshormons zu gewährleisten, sollte rekombinantes, spezie-spezifisches GH Verwendung finden. Als Versuchstier wurde das Yucatan Micropig® gewählt, da es sowohl von seinen konstitutionellen Voraussetzungen für eine Distractionsosteogenese geeignet schien, als auch rekombinantes porcines Wachstumshormon kommerziell erhältlich war. In Vorversuchen erfolgte die Entwicklung und der Einsatz eines Halbringfixateurs, welcher die *in-vivo* Messung der Steifigkeitszunahme im Distractionsregenerat ermöglichen sollte. Diese *in-vivo* Messung wurde als erforderlich betrachtet, da bei der Distractionsosteogenese die Wirksamkeit einer Therapie nicht wie bei "critical size"- Defekten durch Verheilen oder Nicht-Verheilen des Knochens validiert werden kann. Es konnte mittels biomechanischer und histologischer Untersuchungen gezeigt werden, dass sowohl mit dem entsprechenden Fixateur, als auch an dem vorliegenden Tiermodell eine Distractionsosteogenese durchgeführt werden kann. Als Distractionsgeschwindigkeit für die späteren Versuche wurden 2 mm / Tag gewählt; zum einen um den Einsatz von GH an "extremen" Versuchsbedingungen zu testen, zum anderen da sich das Yucatan Micropig® als osteogen äußerst potentes Tiermodell erwies. Ebenfalls an Vorstudien konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Wachstumshormon in der gewählten Dosierung (100 µg/kgKG/Tag) sowohl eine deutliche Erhöhung des zirkulierenden IGF-I (gesamtes und freies IGF-I) als auch einen signifikanten Einfluss auf die Knochenbauparameter im Serum aufweist. Da die klinische Beurteilung des Verheilungszustandes eines Distractionsregenerates bisher als Standardverfahren das konventionelle Röntgen nutzt und dieses eine fragwürdige Aussagekraft besitzt, wurde eine standardisierte Form der quantitativen Regeneratsonographie mit Hilfe einer speziell angepassten Schablone entwickelt. Gleichfalls wurde an Hand eines Aluminiumphantoms mittels Digitaler Lumineszenzradiographie (DLR) eine Äquivalenzdichte des Regenerates zu dessen vergleichender Quantifizierung bestimmt. Als "gold standard" der bildgebenden

Verfahren erfolgte der Einsatz von Quantitativer Computertomographie (QCT), welche mittels eines Hydroxylapatitphantoms zum Vergleich verwendbare Daten erheben ließ. Als "härtester" Parameter des Verheilungszustandes der Regenerate wurde eine torsionale biomechanische Testung in einer Materialtestmaschine durchgeführt. Desweiteren wurden die Regenerate histomorphometrisch an Hartschnittpräparaten aufgearbeitet. Nachdem die bildgebenden Verfahren an den biomechanischen Messungen der Materialtestmaschine validiert worden waren und hohe Korrelationen zeigten, konnten auch diese zur Bewertung des Einflusses von systemisch applizierten GH auf die Distractionsosteogenese herangezogen werden. Überraschenderweise bot auch die Messung der Eindringtiefe der Ultraschallwellen in die Mitte des Regenerates (Lokalisation der sog. "fibrous interzone") eine sehr gute Korrelation zu den biomechanischen Messungen. Diese Tatsache stellt in Aussicht, dass zukünftig die überall verfügbare Sonographie in der klinischen Bewertung der Regeneratfestigkeit eine größere Rolle spielen sollte.

Die Applikation von rekombinantem spezies-spezifischen Wachstumshormon bei der Distractionsosteogenese zeigte bei dem von uns gewählten Tiermodell eine signifikante Beschleunigung der Regeneratkonsolidierung. Die Messungen in der Materialtestmaschine ergaben eine mehr als verdoppelte Steifigkeit und Festigkeit der distrahierten Tibiae nach nur 10 Tagen Konsolidierungszeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. In den *in-vivo* Messungen zeigten die Regenerate der mit GH behandelten Tiere im Mittel bereits zu Beginn der Konsolidierungszeit eine torsionale Steifigkeit wie die Kontrolltiere zum Ende des Versuches. Dieser Unterschied war über den gesamten Verlauf des Versuches signifikant. Die QCT erbrachte für die mit GH behandelten Tiere einen signifikant erhöhten Mineralisierungsgrad im Regenerat, zum gleichen Ergebnis kam die quantitative digitale Lumineszenzradiographie und die sonographische Vermessung des Regeneratdurchbaus. In der histomorphometrischen Aufarbeitung waren die Kallusmenge und die Knochenmenge in der Versuchsgruppe signifikant höher, während die Knorpelmenge im Regenerat deutlich niedriger war. Eine Veränderung der Kallusqualität durch die Gabe von Wachstumshormon konnte nicht gesehen werden. Die Auswertung der *in-vivo* Färbungen hatten zum Ergebnis, dass eine signifikante Menge an Kallus im Regenerat unter dem Einfluss von GH bereits während der Distraction gebildet wird, während in der Kontrollgruppe die Ossifikation des Regenerates erst während der Konsolidierungsphase beginnt. Unter

dem Einfluss von GH kommt es zu einer signifikanten Anhebung der knochen-spezifischen alkalischen Phosphatase (b-ALP) im Serum, einem Marker der Knochenformation, während zu diesem frühen Zeitpunkt der Distractions-osteogenese das ICTP im Serum, ein Marker der Knochenresorption, keine signifikante Änderung erfährt. Einen Hinweis, dass GH auch das Kallusremodeling beschleunigen kann, gibt ein Vorversuch mit einer Versuchsdauer von 40 anstatt 25 Tagen. Hier kommt es in der zweiten Versuchsphase zu einem deutlichen Anstieg des ICTP. Zudem zeigen auch im kürzeren Hauptversuch in der histomorpho-metrischen Auswertung die kortikalen Knochenenden, welche voneinander distrahiert werden, in der GH-Gruppe eine signifikant geringere Dichte. In den serologischen Untersuchungen fand sich eine signifikante Korrelation zwischen dem Serumspiegel der b-ALP und dem des IGF-I. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Wirkung des Wachstumshormons auf das Regenerat durch seinen Mediator IGF-I bedingt ist.

Nach Ansicht des Verfassers sollten die vorliegenden Untersuchungen dazu führen, den klinischen Nutzen von Wachstumshormon zu überprüfen. Bei ähnlicher Wirksamkeit des GHs könnte dies zu einer signifikanten Verkürzung der Behandlungszeit bei der Distractionsosteogenese führen.

## Literatur

1. Aarnes, G. T., Steen, H., Ludvigsen, P., Kristiansen, L. P., Reikeras, O.: High frequency distraction improves tissue adaptation during leg lengthening in humans. *J Orthop Res* 20:789-92.; 2002.
2. Abbott, L.: The operative lengthening of the tibia and the fibula. *J Bone Joint Surg* 9:128-152; 1927.
3. Abdel-Meguid, S. S., Smith, W. W., Violand, B. N., Bentle, L. A.: Crystallization of methionyl porcine somatotropin, a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *J Mol Biol* 192:159-60; 1986.
4. Abdel-Meguid, S. S., Shieh, H. S., Smith, W. W., Dayringer, H. E., Violand, B. N., Bentle, L. A.: Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:6434-7; 1987.
5. Abribat, T., Brazeau, P., Davignon, I., Garrel, D. R.: Insulin-like growth factor-I blood levels in severely burned patients: effects of time post injury, age of patient and severity of burn. *Clin Endocrinol Oxf* 39:583-589; 1993.
6. Akesson, K.: Biochemical markers of bone turnover. A review. *Acta Orthop Scand* 66:376-386; 1995.
7. Allen, D. B., Rundle, A. C., Graves, D. A., Blethen, S. L.: Risk of leukemia in children treated with human growth hormone: review and reanalysis. *J Pediatr* 131:S32-6; 1997.
8. Aloia, J. F., Vaswani, A., Meunier, P. J., Edouard, C. M., Arlot, M. E., Yeh, J. K., Cohn, S. H.: Coherence treatment of postmenopausal osteoporosis with growth hormone and calcitonin. *Calcif Tissue Int* 40:253-259; 1987.
9. Anderson, R.: Femoral bone lengthening. *Am J Surg* 34B:150-57; 1936.
10. Andrew, J. G., Hoyland, J., Freemont, A. J., Marsh, D.: Insulinlike growth factor gene expression in human fracture callus. *Calcif Tissue Int* 53:97-102; 1993.
11. Aro, H. T., Wippermann, B. W., Hodgson, S. F., Wahner, H. W., Lewallen, D. G., Chao, E. Y.: Prediction of properties of fracture callus by measurement of mineral density using micro-bone densitometry. *J Bone Joint Surg Am* 71:1020-1030; 1989.
12. Aronson, J., Harrison, B. H., Stewart, C. L., Harp, J. H., Jr.: The histology of distraction osteogenesis using different external fixators. *Clin Orthop* 241:106-116; 1989.
13. Aronson, J., Good, B., Stewart, C., Harrison, B., Harp, J.: Preliminary studies of mineralization during distraction osteogenesis. *Clin Orthop* 250:43-49; 1990.
14. Aronson, J., Harp, J. H., Jr.: Factors influencing the choice of external fixation for distraction osteogenesis. *Instr Course Lect* 39:175-183; 1990.
15. Aronson, J. The biology of distraction osteogenesis. In: A. a. A. Bianchi Maiocchi, J. (ed.), *Operative Principles of Ilizarov. Fracture Treatment, Nonunion, Osteomyelitis, Lengthening, Deformity Correction*, pp. 42-52. Baltimore: Williams and Wilkins; 1991.
16. Aronson, J. The biology of distraction osteogenesis. In: M. W. Chapman (ed.), *Operative Orthopedics* 2, pp. 873-882. Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1993.
17. Aronson, J. Experimental assessment of bone regenerate quality during distraction osteogenesis. In: C. T. Brighton, Friedlaender, G.E., and Lane J.M. (ed.), *Bone Formation and Repair*, pp. 441-463. Rosemont, Illinois: The American Academy of Orthopaedic Surgeons; 1994.
18. Aronson, J., Harp, J. H.: Mechanical forces as predictors of healing during tibial lengthening by distraction osteogenesis. *Clin Orthop* 301:73-79; 1994.
19. Aronson, J., Shen, X.: Experimental healing of distraction osteogenesis comparing

- metaphyseal with diaphyseal sites. *Clin Orthop* 301:25-30; 1994.
20. Aronson, J.: Limb-lengthening, skeletal reconstruction, and bone transport with the Ilizarov method. *J Bone Joint Surg Am* 79:1243-1258; 1997.
  21. Aronson, J., Shen, X., Skinner, R., Hogue, W., Badger, T., Lumpkin, J.: Rat model of distraction osteogenesis. *J Orthop Res* 15:222-226; 1997.
  22. Ashton, I. K., Dekel, S.: Fracture repair in the Snell dwarf mouse. *Br J Exp Pathol* 64:479-486; 1983.
  23. Augat, P., Merk, J., Genant, H. K., Claes, L.: Quantitative assessment of experimental fracture repair by peripheral computed tomography. *Calcif Tissue Int* 60:194-9.; 1997.
  24. Bagi, C. M., DeLeon, E., Brommage, R., Rosen, D., Sommer, A.: Treatment of ovariectomized rats with the complex of rhIGF-I/IGFBP- 3 increases cortical and cancellous bone mass and improves structure of the femoral neck. *Calcif Tissue Int* 53:97-102; 1995.
  25. Bail, H., Huening, M., Lindner, T., Krummrey, G., Flyvbjerg, A., Raschke, M. Locally administered Growth Hormone and its mediator insulin-like growth factor exert similar effect on callus formation in a femur osteotomy model in rats. *Transactions of 49th Annual Meeting Orthopaedic Research Society* 28. New Orleans; 2003.
  26. Bail, H., Klein, P., Kolbeck, S., Krummrey, G., Weiler, A., Schmidmaier, G., Haas, N. P., Raschke, M. J.: Systemic application of growth hormone enhances the early healing phase of osteochondral defects--a preliminary study in micropigs. *Bone* 32:457-67; 2003.
  27. Bail, H. J., Kolbeck, S., Krummrey, G., Schmidmaier, G., Haas, N. P., Raschke, M. J.: Systemic application of growth hormone for enhancement of secondary and intramembranous fracture healing. *Horm Res* 58:39-42; 2002.
  28. Bak, B., Jorgensen, P., Andreassen, T.: Increased mechanical strength of healing rat tibial fracture treated with biosynthetic human growth hormone. *Bone* 11:233-239; 1990.
  29. Bak, B., Jorgensen, P., Andreassen, T.: Dose response of growth hormone on fracture healing in the rat. *Acta Orthop Scand* 61:54-57; 1990.
  30. Bak, B., Jorgensen, P. H., Andreassen, T. T.: Increased mechanical strength of healing rat tibial fractures treated with biosynthetic human growth hormone. *Bone* 11:233-239; 1990.
  31. Bak, B., Jorgensen, P. H., Andreassen, T. T.: Dose response of growth hormone on fracture healing in the rat. *Acta Orthop Scand* 61:54-57; 1990.
  32. Bak, B., Jorgensen, P., Andreassen, T.: The stimulating effect of growth hormone on fracture healing is dependent on onset and duration of administration. *Clin Orthop* 264:295-301; 1991.
  33. Bak, B.: Fracture healing and growth hormone. A biochemical study in the rat. *Dan Med Bull* 40:519-536; 1993.
  34. Bak, B.: Fracture healing and growth hormone - A biochemical study in the rat. *Dan Med Bull* 40:519-536; 1993.
  35. Bang, P., Brandt, J., Degerblad, M., Enberg, G., Kaijser, L., Thoren, M., Hall, K.: Exercise-induced changes in insulin-like growth factors and their low molecular weight binding protein in healthy subjects and patients with growth hormone deficiency. *Eur J Clin Invest* 20:285-92.; 1990.
  36. Bar, R. S.: Transcapillary permeability and subendothelial distribution of endothelial and amniotic fluid insulin- like growth factor binding proteins in the rat heart. *Endocrinology* 127; 1990.
  37. Bar, R. S.: Tissue localisation of perfused endothelial cell IGF binding protein is markedly altered by association with IGF- I. *Endocrinology* 127:3243-45; 1990.

38. Barnard, R., Ng, K., Martin, T., Waters, M. J.: Growth hormone (GH) receptors in clonal osteoblast-like cells mediate a mitogenic response to GH. *Endocrinology* 128:1459-64; 1991.
39. Baumgart, R., Betz, A., Kettler, M., Zeiler, C., Schweiberer, L.: [Perspectives in callus distraction] Perspektiven der Kallusdistraction. *Unfallchirurg* 99:84-91; 1996.
40. Baumgart, R.: Möglichkeiten der Knochendurchtrennung. *Unfallchirurg* 100:797-804; 1997.
41. Baxter, R. C., Martin, J. L.: Binding proteins for insulin-like growth factors in adult rat serum. Comparison with other human and rat binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 147:408-415; 1987.
42. Baxter, R. C.: Characterization of the Acid- Labile Subunit of the Growth Hormone-Dependent Insulin- Like Growth Factor Binding Protein Complex. *J Clin Endocrinol Metab* 67:265-72; 1988.
43. Baxter, R. C.: Insulin-like growth factor binding proteins in the human circulation: a review. *Horm Res* 42:140-144; 1994.
44. Baylink, D., Finkelman, R., Mohan, S.: Growth factors to stimulate bone formation. *J Bone Miner Res* 8,Supplement 2:565-572; 1993.
45. Beaupre, G. S., Hayes, W. C., Jofe, M. H., White, A. A., 3d: Monitoring fracture site properties with external fixation. *J Biomech Eng* 105:120-126; 1983.
46. Belcher, H. J., Ellis, H.: An investigation of the anabolic activity of somatropin in normal and burned rats. *Burns* 16:17-20; 1990.
47. Belcher, H. J., Ellis, H.: Somatropin and wound healing after injury. *J Clin Endocrinol Metab* 70:939-43; 1990.
48. Beshyah, S., Kyd, P., Thomas, E., Fairney, A., Johnston, D.: The effects of prolonged growth hormone replacement on bone metabolism and bone mineral density. *Clin Endocrinol* 42:249-254; 1995.
49. Bestetti, G. E., Blum, J. W., Rossi, G. L.: Immunohistochemistry of hepatic IGF-I in calf, pig, and rat. *Zentralbl Veterinarmed [A]* 39:747-51; 1992.
50. Bidner, S. M., Rubins, I. M., Desjardins, J. V., Zukor, D. J., Goltzman, D.: Evidence for a humoral mechanism for enhanced osteogenesis after head injury [see comments]. *J Bone Joint Surg Am* 72:1144-1149; 1990.
51. Bier, A.: Über Knochenregeneration, über Pseudarthrosen und über Knochentransplantate. *Arch Klin Chir*:127; 1923.
52. Binoux, M.: The IGF system in metabolism regulation. *Diabete Metab* 21:330-7; 1995.
53. Blane, C. E., Herzenberg, J. E., DiPietro, M. A.: Radiographic imaging for Ilizarov limb lengthening in children. *Pediatr Radiol* 21:117-120; 1991.
54. Blethen, S. L.: Leukemia in Children Treated with Growth Hormone. *TEM* 9:367-370; 1998.
55. Blokhuis, T. J., de Bruine, J. H., Bramer, J. A., den Boer, F. C., Bakker, F. C., Patka, P., Haarman, H. J., Manoliu, R. A.: The reliability of plain radiography in experimental fracture healing. *Skeletal Radiol* 30:151-6.; 2001.
56. Bohlen, P., Esch, F., Brazeau, P., Ling, N., Guillemin, R.: Isolation and characterization of the porcine hypothalamic growth hormone releasing factor. *Biochem Biophys Res Commun* 116:726-34; 1983.
57. Bolander, M. E.: Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc Soc Exp Biol Med* 200:165-70.; 1992.
58. Bostrom, M. P., Lane, J. M., Berberian, W. S., Missri, A. A., Tomin, E., Weiland, A., Doty, S. B., Glaser, D., Rosen, V. M.: Immunolocalization and expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4 in fracture healing. *J Orthop Res* 13:357-367; 1995.

59. Bostrom, M. P., Camacho, N. P.: Potential role of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Clin Orthop* (355 Suppl):S274-82; 1998.
60. Bostrom, M. P., Saleh, K. J., Einhorn, T. A.: Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models. *Orthop Clin North Am* 30:647-658; 1999.
61. Braunstein, E. M., Goldstein, S. A., Ku, J., Smith, P., Matthews, L. S.: Computed tomography and plain radiography in experimental fracture healing. *Skeletal Radiol* 15:27-31.; 1986.
62. Brixen, K., Nielsen, H. K., Mosekilde, L., Flyvbjerg, A.: A short course of recombinant human growth hormone treatment stimulates osteoblasts and activates bone remodeling in normal human volunteers. *J Bone Miner Res* 5:609-618; 1990.
63. Brixen, K., Kassem, M., Nielsen, H. K., Loft, A. G., Flyvbjerg, A., Mosekilde, L.: Short-term treatment with growth hormone stimulates osteoblastic and osteoclastic activity in osteopenic postmenopausal women: a dose response study. *J Bone Miner Res* 10:1865-1874; 1995.
64. Brunner, U., Kessler, S., Cordey, J., Rahn, B., Schweiberer, L., Perren, S. M.: [Treatment of defects of the long bones using distraction osteogenesis (Ilizarov) and intramedullary nailing. Theoretic principles, animal experiments, clinical relevance] Defektbehandlung langer Rohrenknochen durch Distractionsosteogenese (Ilizarov) und Marknagelung. Theoretische Grundlagen, tierexperimentelle Ergebnisse, klinische Relevanz. *Unfallchirurg* 93:244-250; 1990.
65. Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Guillemin, R.: Primary structure of somatostatin, a hypothalamic peptide that inhibits the secretion of pituitary growth hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 70:684-8; 1973.
66. Burny, F.: [Study of consolidation of fractures by deformation gauges in clinical medicine]. *Acta Orthop Belg* 34:917-27; 1968.
67. Burny, F.: [Methods of evaluation of fracture consolidation]. *Acta Chir Belg* 69:658-81; 1970.
68. Burny, F., Bourgois, R., Donkerwolcke, M., Moulart, F.: [Clinical use of strain gauges. Current situation and future prospects]. *Acta Orthop Belg* 44:895-920; 1978.
69. Canalis, E., Lian, J. B.: Effects of bone associated growth factors on DNA, collagen and osteocalcin synthesis in cultured fetal rat calvariae. *Bone* 9:243-6.; 1988.
70. Canalis, E., Pash, J., Gabbitas, B., Rydzziel, S., Varghese, S.: Growth factors regulate the synthesis of insulin-like growth factor-I in bone cell cultures. *Endocrinology* 133:33-38; 1993.
71. Canalis, E.: Skeletal growth factors and aging. *J Clin Endocrinol Metab* 78:1009-10; 1994.
72. Caplan, A. I., Elyaderani, M., Mochizuki, Y., Wakitani, S., Goldberg, V. M.: Principles of cartilage repair and regeneration. *Clin Orthop* :254-269; 1997.
73. Cardoso, A. I., Llera, A. S., Iacono, R. F., Domene, H. M., Martinez, A. S., Heinrich, J. J., Pena, C., Poskus, E.: Heterologous humoral immune response in patients treated with human growth hormone from different sources. *Acta Endocrinol Copenh* 129:20-25; 1993.
74. Carpenter, J. E., Hipp, J. A., Gerhart, T. N., Rudman, C. G., Hayes, W. C., Trippel, S. B.: Failure of growth hormone to alter the biomechanics of fracture-healing in a rabbit model. *J Bone Joint Surg [Am]* 74:359-367; 1992.
75. Celeste, A. J., Iannazzi, J. A., Taylor, R. C., Hewick, R. M., Rosen, V., Wang, E. A., Wozney, J. M.: Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:9843-7; 1990.

76. Chakkalakal, D. A., Lippiello, L., Wilson, R. F., Shindell, R., Connolly, J. F.: Mineral and matrix contributions to rigidity in fracture healing. *J Biomech* 23:425-34.; 1990.
77. Chakkalakal, D. A., Strates, B. S., Mashoof, A. A., Garvin, K. L., Novak, J. R., Fritz, E. D., Mollner, T. J., McGuire, M. H.: Repair of segmental bone defects in the rat: an experimental model of human fracture healing. *Bone* 25:321-332; 1999.
78. Chan, J. M., Giovannucci, E., Andersson, S. O., Yuen, J., Adami, H. O., Wolk, A.: Dairy products, calcium, phosphorous, vitamin D, and risk of prostate cancer (Sweden) [see comments]. *Cancer Causes Control* 9:559-66; 1998.
79. Chao, E. Y. S. Biomechanics of external fixation. In: J. L. Lane (ed.), *Fracture Healing*, pp. 105. Bristol: Churchill-Livingstone; 1987.
80. Chihara, K., Sugimoto, T.: The action of GH/IGF-I/IGFBP in osteoblasts and osteoclasts. *Horm Res* 48:45-9; 1997.
81. Christiansen, J. S. Personal communication. Aarhus, Denmark: Medical Department M - Endocrinology and Diabetes, Aarhus University; 2000.
82. Churches, A. E., Tanner, K. E., Evans, M., Gwillim, J.: Fracture healing assessment with external fixation. *Eng Med* 14:13-20; 1985.
83. Chwals, W. J., Bistran, B. R.: Role of exogenous growth hormone and insulin-like growth factor I in malnutrition and acute metabolic stress: a hypothesis. *Crit Care Med* 19:1317-22; 1991.
84. Claes, L., Burri, C., Gerngross, H.: [Comparative investigations on the stability of fracture fixations with different fixateurs externes (author's transl)]. *Unfallchirurgie* 7:194-7.; 1981.
85. Claes, L.: [Measuring bone healing in osteosynthesis with external fixator using the Fraktometer FM 100]. *Chirurg* 62:354-5; 1991.
86. Claes, L., Heitemeyer, U., Krischak, G., Braun, H., Hierholzer, G.: Fixation technique influences osteogenesis of comminuted fractures. *Clin Orthop*:221-9.; 1999.
87. Claes, L., Wolf, S., Augat, P.: [Mechanical modification of callus healing]. *Chirurg* 71:989-94; 2000.
88. Claes, L., Eckert-Hubner, K., Augat, P.: The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *JOR* 20:1099-105; 2002.
89. 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* 387:146-52; 2002.
90. Claes, L. E., Wilke, H. J., Augat, P., Rubenacker, S., Margevicius, K. J.: Effect of dynamization on gap healing of diaphyseal fractures under external fixation. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 10:227-234; 1995.
91. Codivilla, A.: On the means of lengthening, in the lower limbs, the muscles and tissues which are shortened through deformity. *Am J Orthop Surg* 2:353; 1905.
92. Connolly, J. F., Hahn, H., Davy, D.: Fracture healing in weight-bearing and nonweight-bearing bones. *J Trauma* 18:766-70.; 1978.
93. Conover, C. A.: Potentiation of insulin-like growth factor (IGF) action by IGF-binding protein-3: studies of underlying mechanism. *Endocrinology* 130:3191-3199; 1992.
94. Cook, S. D., Baffes, G. C., Wolfe, M. W., Sampath, T. K., Rueger, D. C., Whitecloud, T. S.-r.: The effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of large segmental bone defects. *J Bone Joint Surg [Am]* 76:827-838; 1994.
95. Correll, J. Die sonographische Verlaufskontrolle bei der Extremitätenverlängerung nach Ilizarov. In: F. R. Eyb (ed.), *Die Sonographie in der Orthopädie*, pp. 97-101: Springer Verlag; 1988.

96. Cunningham, J. L., Evans, M., Harris, J. D., Kenwright, J.: The measurement of stiffness of fractures treated with external fixation. *Eng Med* 16:229-32; 1987.
97. Cunningham, J. L., Evans, M., Kenwright, J.: Measurement of fracture movement in patients treated with unilateral external skeletal fixation. *J Biomed Eng* 11:118-22; 1989.
98. Cunningham, J. L., Kenwright, J., Kershaw, C. J.: Biomechanical measurement of fracture healing. *J Med Eng Technol* 14:92-101; 1990.
99. Daughaday, W.: Growth hormone axis overview--somatomedin hypothesis. *Pediatr Nephrol* 14:537-40; 2000.
100. De Bastiani, G., Aldegheri, R., Trivella, G.: Lengthening of the lower limbs in achondroplastics. *Basic Live Sci* 48:353-55; 1988.
101. Delloye, C., Delefortrie, G., Coutelier, L., Vincent, A.: Bone regenerate formation in cortical bone during distraction lengthening. An experimental study. *Clin Orthop* :34-42; 1990.
102. Den Boer, H., Blok, G. J., Van der Veen, E. A.: Clinical aspects of growth hormone deficiency in adults. *Endocr Rev* 16:63-86; 1995.
103. Denis, I., Pointillart, A., Lieberherr, M.: Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on the proliferation and differentiation of cultured pig bone cells and rat calvaria cells. *Growth Regul* 4:123-30; 1994.
104. Derbyshire, N. D., Simpson, A. H.: A role for ultrasound in limb lengthening. *Br J Radiol* 65:576-580; 1992.
105. Döcke, F. Hormonale Regulation des Wachstums. In: F. Döcke (ed.), *Veterinärmedizinische Endokrinologie*; 1994.
106. Dwyer, J. S., Owen, P. J., Evans, G. A., Kuiper, J. H., Richardson, J. B.: Stiffness measurements to assess healing during leg lengthening. A preliminary report. *J Bone Joint Surg [Br]* 78:286-9; 1996.
107. Einhorn, T. A., Simon, G., Devlin, V. J., Warman, J., Sidhu, S. P., Vigorita, V. J.: The osteogenic response to distant skeletal injury. *J Bone Joint Surg [Am]* 72:1374-1378; 1990.
108. Einhorn, T. A., Majeska, R. J., Rush, E. B., Levine, P. M., Horowitz, M. C.: The expression of cytokine activity by fracture callus. *J Bone Miner Res* 10:1272-1281; 1995.
109. Emami, A., Larsson, A., Petren-Mallmin, M., Larsson, S.: Serum bone markers after intramedullary fixed tibial fractures. *Clin Orthop* 386:220-9; 1999.
110. Eriksen, E., Kassem, M., Langdahl, B.: Growth hormone, insuline like growth factors and bone remodelling. *Europ J Clin Invest* 26:525-534; 1996.
111. Eriksen, E. F., Kassem, M., Langdahl, B.: Growth hormone, insulin-like growth factors and bone remodelling. *Eur J Clin Invest* 26:525-534; 1996.
112. Ernst, M., Froesch, E. R.: Growth hormone dependent stimulation of osteoblast-like cells in serum-free cultures via local synthesis of insulin-like growth factor I. *Biochem Biophys Res Commun* 151:142-7; 1988.
113. Ernst, M., Rodan, G. A.: Increased activity of insulin-like growth factor (IGF) in osteoblastic cells in the presence of growth hormone (GH): positive correlation with the presence of the GH-induced IGF- binding protein BP-3. *Endocrinology* 127:807-814; 1990.
114. E Staugh-Waring, S. J., Hardy, J. R., Cunningham, J. L.: Fracture stiffness measurement using the orthometer: reproducibility and sources of error. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 15:140-2; 2000.
115. Evans, M., Kenwright, J., Cunningham, J. L.: Design and performance of a fracture monitoring transducer. *J Biomed Eng* 10:64-9; 1988.

116. Eyres, K., Bell, M., Kanis, J.: New bone formation during leg lengthening. Evaluated by dual energy X-ray absorptiometry. *J Bone Joint Surg [Br]* 75:96-106; 1993.
117. Eyres, K. S., Bell, M. J., Kanis, J. A.: Methods of assessing new bone formation during limb lengthening. Ultrasonography, dual energy X-ray absorptiometry and radiography compared. *J Bone Joint Surg [Br]* 75:358-364; 1993.
118. Eyres, K. S., Bell, M. J.: Ultrasound and leg lengthening [letter; comment]. *J Bone Joint Surg [Br]* 76:337-338; 1994.
119. 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*:261-72; 1996.
120. Fink, B.: Biomechanical properties of tendons during lower leg-lengthening in dogs using the Ilizarov method. *J Biomech* 32:763-68; 1999.
121. Fink, B.: Das Verhalten der Weichteilstrukturen bei der operativen Beinverlängerung. *Orthopädie* 28:1007-14; 1999.
122. Fink, B., Pollnau, C., Vogel, M., Skripitz, R., Enderle, A.: Histomorphometry of distraction osteogenesis during experimental tibial lengthening. *J Orthop Trauma* 17:113-8; 2003.
123. Fitch, R. D., Thompson, J. G., Rizk, W. S., Seaber, A. V., Garrett, W. E., Jr.: The effects of the Ilizarov distraction technique on bone and muscle in a canine model: a preliminary report. *Iowa Orthop J* 16:10-9; 1996.
124. Floyd, C. E., Jr., Chotas, H. G., Dobbins, J. T. d., Ravin, C. E.: Quantitative radiographic imaging using a photostimulable phosphor system. *Med Phys* 17:454-9; 1990.
125. Floyd, C. E., Jr., Lo, J. Y., Chotas, H. G., Ravin, C. E.: Quantitative scatter measurement in digital radiography using a photostimulable phosphor imaging system. *Med Phys* 18:408-13; 1991.
126. Frenkel, S. R., Saadeh, P. B., Mehrara, B. J., Chin, G. S., Steinbrech, D. S., Brent, B., Gittes, G. K., Longaker, M. T.: Transforming growth factor beta superfamily members: role in cartilage modeling. *Plast Reconstr Surg* 105:980-90; 2000.
127. Frierson, M., Ibrahim, K., Boles, M., Bote, H., Ganey, T.: Distraction osteogenesis. A comparison of corticotomy techniques. *Clin Orthop* 301:19-24; 1994.
128. Froesch, E. R.: [NSILA, insulin-like growth factors and somatomedins (author's transl)]. *Schweiz Rundsch Med Prax* 68:412-6; 1979.
129. Frystyk, J., Gronbaek, H., Skjaerbaek, C., Flyvbjerg, A., Orskov, H., Baxter, R. C.: 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* 139:4286-4292; 1998.
130. Fujita, H., Ueda, K., Morishita, J., Fujikawa, T., Ohtsuka, A., Sai, T.: Basic imaging properties of a computed radiographic system with photostimulable phosphors. *Med Phys* 16:52-9; 1989.
131. Ganey, T. M., Klotch, D. W., Sasse, J., Ogden, J. A., Garcia, T.: Basement membrane of blood vessels during distraction osteogenesis. *Clin Orthop* 301:132-138; 1994.
132. Gelato, M. C., Merriam, G. R.: Growth hormone releasing hormone. *Annu Rev Physiol* 48:569-91; 1986.
133. Gerhart, T. N., Kirker Head, C. A., Kriz, M. J., Holtrop, M. E., Hennig, G. E., Hipp, J., Schelling, S. H., Wang, E.: Healing segmental femoral defects in sheep using recombinant human bone morphogenetic protein. *Clin Orthop* 293:317-326; 1993.
134. Giovannucci, E.: Insulin-like growth factor-I and binding protein-3 and risk of cancer. *Horm Res* 51:34-41; 1999.
135. Gitelman, S. E., Kobrin, M. S., Ye, J. Q., Lopez, A. R., Lee, A., Derynck, R.: Recombinant Vgr-1/BMP-6-expressing tumors induce fibrosis and endochondral bone

- formation in vivo. *J Cell Biol* 126:1595-609; 1994.
136. Goodship, A. E., Watkins, P. E., Rigby, H. S., Kenwright, J.: The role of fixator frame stiffness in the control of fracture healing. An experimental study. *J Biomech* 26:1027-1035; 1993.
  137. Gopinath, R., Etherton, T. D.: Effects of porcine growth hormone on glucose metabolism of pigs: I. Acute and chronic effects on plasma glucose and insulin status. *J Anim Sci* 67:682-8; 1989.
  138. Gopinath, R., Etherton, T. D.: Effects of porcine growth hormone on glucose metabolism of pigs: II. Glucose tolerance, peripheral tissue insulin sensitivity and glucose kinetics. *J Anim Sci* 67:689-97; 1989.
  139. Gore, D. C., Honeycutt, D., Jahoor, F., Rutan, T., Wolfe, R. R., Herndon, D. N.: Effect of exogenous growth hormone on glucose utilization in burn patients. *J Surg Res* 51:518-23; 1991.
  140. Govender, S., Csimma, C., Genant, H. K., Valentin-Opran, A., Amit, Y., Arbel, R., Aro, H., Atar, D., Bishay, M., Borner, M. G., Chiron, P., Choong, P., Cinats, J., Courtenay, B., Feibel, R., Geulette, B., Gravel, C., Haas, N., Raschke, M., Hammacher, E., van der Velde, D., Hardy, P., Holt, M., Josten, C., Ketterl, R. L., Lindeque, B., Lob, G., Mathevon, H., McCoy, G., Marsh, D., Miller, R., Munting, E., Oevre, S., Nordsletten, L., Patel, A., Pohl, A., Rennie, W., Reynders, P., Rommens, P. M., Rondia, J., Rossouw, W. C., Daneel, P. J., Ruff, S., Ruter, A., Santavirta, S., Schildhauer, T. A., Gekle, C., Schnettler, R., Segal, D., Seiler, H., Snowdowne, R. B., Stapert, J., Taglang, G., Verdonk, R., Vogels, L., Weckbach, A., Wentzensen, A., Wisniewski, T.: Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg [Am]* 84:2123-34.; 2002.
  141. Green, H., Morikawa, M., Nixon, T.: A dual effector theory of growth-hormone action. *Differentiation* 29:195-198; 1985.
  142. Grimberg, A., Cohen, P.: Role of insulin-like growth factors and their binding proteins in growth control and carcinogenesis. *J Cell Physiol* 183:1-9; 2000.
  143. Gruber, G., Fischer, J., Konermann, W., Krieger, M.: [Possible applications of ultrasound in corticotomy-callus distraction] Einsatzmöglichkeiten der Sonographie in der Kortikotomie- Kallusdistraction. *Aktuelle Radiol* 5:268-273; 1995.
  144. Guillemain, R., Brazeau, P., Bohlen, P., Esch, F., Ling, N., Wehrenberg, W. B., Bloch, B., Mougin, C., Zeytin, F., Baird, A.: Somatocrinin, the growth hormone releasing factor. *Recent Prog Horm Res* 40:233-99; 1984.
  145. Guillemain, R., Zeytin, F., Ling, N., Bohlen, P., Esch, F., Brazeau, P., Bloch, B., Wehrenberg, W. B.: Growth hormone-releasing factor: chemistry and physiology. *Proc Soc Exp Biol Med* 175:407-13; 1984.
  146. Guler, H. P., Zapf, J., Schmid, C., Froesch, E. R.: Insulin- like growth factors I and II in healthy man. Estimations of half- lives and production rates. *Acta Endocrinol* 121:753-8; 1989.
  147. Hall, K., Sara, V. R.: Somatomedin levels in childhood, adolescence and in adult life. *Clin Endocrinol* 13:91-112; 1984.
  148. Hamdy, R. C., Walsh, W., Olmedo, M., Wallach, M., Ehrlich, M. G.: Correlation between ultrasound imaging and mechanical and physical properties of lengthened bone: an experimental study in a canine model. *J Pediatr Orthop* 15:206-211; 1995.
  149. Hammer, R., Edholm, P., Lindholm, P.: Stability of union after tibial shaft fracture. Analysis by a non-invasive technique. *J Bone Joint Surg [Br]* 66:529-34; 1984.
  150. Hankinson, S. E., Willett, W. C., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Michaud, D. S., Deroo, B., Rosner, B., Speizer, F. E., Pollak, M.: Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer [see comments]. *Lancet* 351:1393-6; 1998.

151. Hansen, T. K., Gravholt, C. H., Orskov, H., Rasmussen, M. H., Christiansen, J. S., Jorgensen, J. O.: Dose dependency of the pharmacokinetics and acute lipolytic actions of growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 87:4691-8; 2002.
152. Harp, J. H., Aronson, J., Hollis, M.: Noninvasive determination of bone stiffness for distraction osteogenesis by quantitative computed tomography scans. *Clin Orthop* 301:42-48; 1994.
153. Harris, J. M., 3d, Bean, D. A., Banks, H. H.: Effect of phosphate supplementation, thyrocalcitonin, and growth hormone on strength of fracture healing. *Surg Forum* 26:519-521; 1975.
154. Hayden, J. M., Mohan, S., Baylink, D. J.: The insulin-like growth factor system and the coupling of formation to resorption. *Bone* 17:93S-98S; 1995.
155. Hayes, W. C., Piazza, S. J., Zysset, P. K.: Biomechanics of fracture risk prediction of the hip and spine by quantitative computed tomography. *Radiol Clin North Am* 29:1-18; 1991.
156. Hayes, W. C. Basic orthopaedic biomechanics. Philadelphia, New York: Lippincott-Raven; 1997.
157. Henry, A. N., Freeman, M. A., Swanson, S. A.: Studies on the mechanical properties of healing experimental fractures. *Proc R Soc Med* 61:902-6; 1968.
158. Hente, R., Cordey, J., Rahn, B. A., Maghsudi, M., von Gumpfenberg, S., Perren, S. M.: Fracture healing of the sheep tibia treated using a unilateral external fixator. Comparison of static and dynamic fixation. *Injury* 30:A44-51; 1999.
159. Herndon, D. N., Barrow, R. E., Kunkel, K. R., Broemeling, L., Rutan, R. L.: Effects of recombinant human growth hormone on donor-site healing in severely burned children. *Ann Surg* 212:424-429; 1990.
160. Herold, G. H. Z., Hurvitz, A., Tadmor, A.: The effect of growth hormone on the healing of experimental bone defects. *Acta Orthop Scand* 42:377-384; 1971.
161. Hessmann, M., Rommens, P. M., Hainson, K.: [Callus distraction of femur and tibia. Experiences with the mono-fixateur--indications for procedural changes]. *Unfallchirurg* 101:370-6; 1998.
162. Hill, D. J.: Stimulation of cartilage zones of the calf costochondral growth plate in vitro by growth hormone dependent rat plasma somatomedin activity. *J Endocrinol* 83:219-27; 1979.
163. Hill, P. A., Reynolds, J. J., Meikle, M. C.: Osteoblasts mediate insulin-like growth factor-I and -II stimulation of osteoclast formation and function. *Endocrinology* 136:124-131; 1995.
164. Hintz, R. L.: Untoward events in patients treated with growth hormone in the USA. *Horm Res* 38:44-9; 1992.
165. Hock, J., Centrella, M., Canalis, E.: Insulin like growth factor I has independent effects on bone matrix formation and cell replication. *Endocrinology* 122:254-260; 1988.
166. Holbein, O., Neidlinger Wilke, C., Suger, G., Kinzl, L., Claes, L.: Ilizarov callus distraction produces systemic bone cell mitogens. *J Orthop Res* 13:629-638; 1995.
167. Honig, J. F., Merten, H. A.: Das Göttinger Miniaturschwein (GMS) als Versuchstier in der human-medizinischen osteologischen Grundlagenforschung. *Z Zahnärztl Implantol* 9:244-254; 1993.
168. Hughes, T. H., Maffulli, N., Fixsen, J. A.: Ultrasonographic appearance of regenerate bone in limb lengthening. *J R Soc Med* 86:18-20; 1993.
169. Hughes, T. H., Maffulli, N., Green, V., Fixsen, J. A.: Imaging in bone lengthening. A review. *Clin Orthop* 308:50-53; 1994.

170. Humbel, R. E., Rinderknecht, E., Haselbacher, G., Froesch, E. R., Walter, H., Zapf, J.: Insulin-like growth factors I and II. In: Symposium on proinsulin, insulin, and C-peptide, Tokushima, Japan:413-8; 1978.
171. Huppertz, R., Pfeil, J., Kaps, H. P.: [Ultrasound follow-up of bone lengthening osteotomy] Sonographische Verlaufskontrollen von Verlängerungsosteotomien. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 128:90-95; 1990.
172. Ilizarov, G. Transosseous osteosynthesis. Theoretical and clinical aspects of the regeneration and growth of tissue. Berlin - Heidelberg - New York: Springer; 1992.
173. Ilizarov, G. A., Barabash, A. P., Imerlishvili, I. A., Larionov, A. A., 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* 1:16-20; 1984.
174. Ilizarov, G. A.: The principles of the Ilizarov method. *Bull Hosp Jt Dis Orthop Inst* 48:1-11; 1988.
175. Ilizarov, G. A.: The tension-stress effect on the genesis and growth of tissues: Part II. The influence of the rate and frequency of distraction. *Clin Orthop* 239:263-285; 1989.
176. Ilizarov, G. A.: 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* 238:249-281; 1989.
177. Inzucchi, S. E.: Growth hormone in adults: indications and implications. *Hosp Pract (Off Ed)* 32:79-86, 90-1, 95-6; 1997.
178. Isaksson, O. G., Jansson, J. O., Gause, I. A.: Growth hormone stimulates longitudinal bone growth directly. *Science* 216:1237-1239; 1982.
179. Isaksson, O. G., Ohlsson, C., Bengtsson, B. A., Johannsson, G.: GH and bone--experimental and clinical studies. *Endocr J* 47:S9-16; 2000.
180. Isefuku, S., Joyner, C. J., Simpson, A. H.: A murine model of distraction osteogenesis. *Bone* 27:661-5; 2000.
181. Jamsa, T., Koivukangas, A., Kippo, K., Hannuniemi, R., Jalovaara, P., Tuukkanen, J.: Comparison of radiographic and pQCT analyses of healing rat tibial fractures. *Calcif Tissue Int* 66:288-91; 2000.
182. Jazrawi, L. M., Majeska, R. J., Klein, M. L., Kagel, E., Stromberg, L., Einhorn, T. A.: Bone and cartilage formation in an experimental model of distraction osteogenesis. *J Orthop Trauma* 12:111-6; 1998.
183. Jernberger, A.: Measurement of stability of tibial fractures. A mechanical method. *Acta Orthop Scand Suppl* 135:1-88; 1970.
184. Joerring, S., Jensen, L. T., Andersen, G. R., Johansen, J. S.: Types I and III procollagen extension peptides in serum respond to fracture in humans. *Arch Orthop Trauma Surg* 111:265-7; 1992.
185. Joerring, S., Krogsgaard, M., Wilbek, H., Jensen, L. T.: Collagen turnover after tibial fractures. *Arch Orthop Trauma Surg* 113:334-6; 1994.
186. Jones, J. I., Clemmons, D. R.: Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16:3-34; 1995.
187. Jones, K. L., Villela, J. F., Lewis, U. J.: The growth of cultured rabbit articular chondrocytes is stimulated by pituitary growth factors but not by purified human growth hormone or ovine prolactin. *Endocrinology* 118:2588-93; 1986.
188. Jorgensen, T. E.: Measurements of stability of crural fractures treated with Hoffmann osteotaxis. 2. Measurements on crural fractures. *Acta Orthop Scand* 43:207-18; 1972.

189. Jorgensen, T. E.: Measurements of stability of crural fractures treated with Hoffmann osteotaxis. 1. Method and measurements of deflection on autopsy crura. *Acta Orthop Scand* 43:188-206; 1972.
190. Jorgensen, T. E.: Measurements of stability of crural fractures treated with Hoffmann osteotaxis. 4. The complicated, terminal phase of healing of crural fractures. *Acta Orthop Scand* 43:280-91; 1972.
191. Jorgensen, T. E.: Measurements of stability of crural fractures treated with Hoffmann osteotaxis. 3. The uncomplicated, terminal phase of healing of crural fractures. *Acta Orthop Scand* 43:264-79; 1972.
192. Joyce, M. E., Jingushi, S., Scully, S. P., Bolander, M. E.: Role of growth factors in fracture healing. *Prog Clin Biol Res* 365:391-416; 1991.
193. Juul, A., Main, K., Blum, W. F., Lindholm, J., Ranke, M. B., Skakkebaek, N. E.: The ratio between serum levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and the IGF binding proteins (IGFBP-1, 2 and 3) decreases with age in healthy adults and is increased in acromegalic patients. *Clin Endocrinol Oxf* 41:85-93; 1994.
194. Juul, A., Pedersen, S. A., Sorensen, S., Winkler, K., Jorgensen, J. O., Christiansen, J. S., Skakkebaek, N. E.: Growth hormone (GH) treatment increases serum insulin-like growth factor binding protein-3, bone isoenzyme alkaline phosphatase and forearm bone mineral content in young adults with GH deficiency of childhood onset. *Eur J Endocrinol* 131:41-9; 1994.
195. Juul, A., Dalgaard, P., Blum, W. F., Bang, P., Hall, K., Michaelsen, K. F., Muller, J., Skakkebaek, N. E.: 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* 80:2534-2542; 1995.
196. Kanbe, K.: Analysis of Muscle Bioenergetic Metabolism in Rabbit Leg Lengthening. *Clin Orthop* 351:214-21; 1998.
197. Kandziora, F., Bail, H., Schmidmaier, G., Schollmeier, G., Scholz, M., Knispel, C., Hiller, T., Pflugmacher, R., Mittlmeier, T., Raschke, M., Haas, N. P.: Bone morphogenetic protein-2 application by a poly(D,L-lactide)-coated interbody cage: in vivo results of a new carrier for growth factors. *J Neurosurg* 97:40-8; 2002.
198. Kann, P., Piepkorn, B., Schehler, B., Piepenburg, R., Lotz, J., Bockisch, A., Prellwitz, W., Beyer, J.: Replacement Therapy with Recombinant Human Growth Hormone (GH) in GH-Deficient Adults: Effects on Bone Metabolism and Bone Mineral Density in a 2-year Prospective Study. *Endocrinology and Metabolism* 2:103-110; 1995.
199. Kaplan, F. S., Shore, E. M.: Bone morphogenetic proteins and C-FOS: early signals in endochondral bone formation. *Bone* 19:13S-21S; 1996.
200. Kaplan, S. J., Hayes, W. C., Mudan, P., Lelli, J. L., White, A. A.: Monitoring the healing of a tibial osteotomy in the rabbit treated with external fixation. *J Orthop Res* 3:325-30; 1985.
201. Karaharju, E. O., Aalto, K., Kahri, A., Lindberg, L. A., Kallio, T., Karaharju-Suvanto, T., Vauhkonen, M., Peltonen, J.: Distraction bone healing. *Clin Orthop* 297:38-43; 1993.
202. 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* 21:320-5; 2003.
203. Kassem, M., Blum, W., Ristelli, J., Mosekilde, L., Eriksen, E. F.: Growth hormone stimulates proliferation and differentiation of normal human osteoblast-like cells in vitro. *Calcif Tissue Int* 52:222-6; 1993.
204. Kassem, M., Brixen, K., Blum, W. F., Mosekilde, L., Eriksen, E. F.: Normal osteoclastic and osteoblastic responses to exogenous growth hormone in patients with

- postmenopausal spinal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 9:1365-1370; 1994.
205. Kawaguchi, H., Kurokawa, T., Hanada, K., Hiyama, Y., Tamura, M., Ogata, E., Matsumoto, T.: Stimulation of fracture repair by recombinant human basic fibroblast growth factor in normal and streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 135:774-781; 1994.
  206. Kawamura, B., Hosono, S., Takahashi, T., Yano, T., Kobayashi, Y., Shibata, N., Shinoda, Y.: Limb lengthening by means of subcutaneous osteotomy. Experimental and clinical studies. *J Bone Joint Surg Am* 50:851-78; 1968.
  207. Kenwright, J., White, S. H.: A historical review of limb lengthening and bone transport. *Injury* 24:9-19; 1993.
  208. Khandwala, H. M., McCutcheon, I. E., Flyvbjerg, A., Friend, K. E.: The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev* 21:215-44; 2000.
  209. Klapp, R., Block, W. *Die Knochenbruchbehandlung mit Drahtzügen*. Stuttgart: Ferd. Enke; 1930.
  210. Klein, P., Bail, H. J., Schell, H., Michel, R., Amthauer, H., Duda, G. N.: Capability of bone turnover markers to predict the course of bone consolidation during bone healing. *Langenbecks Arch Chir* 387:5-6; 2003.
  211. 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 Br* 70:543-549; 1988.
  212. Kolbeck, S., Bail, H., Schmidmaier, G., Alquiza, M., Raun, K., Kappelgard, A., Flyvbjerg, A., Haas, N., Raschke, M.: Homologous growth hormone accelerates bone healing--a biomechanical and histological study. *Bone* 33:628-37; 2003.
  213. Koskinen, E.: The repair of experimental fractures under the action of growth hormone, thyrotropin and cortisone. A tissue analytic, roentgenologic and autoradiographic study. *Ann Chir Gynaecol Fenn [Suppl]* 90:1-48; 1959.
  214. Koskinen, E. V., Lindholm, R. V., Nieminen, R. A., Puranen, J., Atila, U.: [Human growth hormone in fractures of long bones with delayed fracture healing. Fractures of tibial diaphysis and other bone injuries] *Humanes Wachstums-hormon bei Frakturen der langen Röhrenknochen mit verzögerter Knochen-bruchheilung. Tibiaschaftfrakturen und andere Knochenverletzungen*. *Med Welt* 26:1905-1910; 1975.
  215. Koskinen, E. V. S.: The Effect of Growth Hormone and Thyrotropin on Human Fracture Healing. *Acta Orthop Scand Suppl* 62:S6-S68; 1963.
  216. Kovacs, G. T., Worgall, S., Schwalbach, P., Steichele, T., Mehls, O., Rosivall, L.: Hypoglycemic effects of insulin-like growth factor-1 in experimental uremia: can concomitant growth hormone administration prevent this effect? *Horm Res* 51:193-200; 1999.
  217. Kurdy, N. M., Bowles, S., Marsh, D. R., Davies, A., France, M.: Serology of collagen types I and III in normal healing of tibial shaft fractures. *J Orthop Trauma* 12:122-6; 1998.
  218. Kurdy, N. M.: Serology of abnormal fracture healing: the role of PIIINP, PICP, and BsALP. *J Orthop Trauma* 14:48-53; 2000.
  219. Lai, K. A., Lin, C. J., Chen, J. H.: Application of locked intramedullary nails in the treatment of complications after distraction osteogenesis. *J Bone Joint Surg [Br]* 82:659-65; 2002.
  220. Lammens, J., Liu, Z., Aerssens, J., Dequeker, J., Fabry, G.: Distraction bone healing versus osteotomy healing: a comparative biochemical analysis. *J Bone Miner Res* 13:279-286; 1998.

221. Landin-Wilhelmsen, K., Nilsson, A., Bosaeus, I., Bengtsson, B. A.: Growth hormone increases bone mineral content in postmenopausal osteoporosis: a randomized placebo-controlled trial. *J Bone Miner Res* 18:393-405; 2003.
222. Langdahl, B. L., Kassem, M., Moller, M. K., Eriksen, E. F.: The effects of IGF-I and IGF-II on proliferation and differentiation of human osteoblasts and interactions with growth hormone. *Eur J Clin Invest* 28:176-83; 1998.
223. Lee, D. Y., Choi, I. H., Chung, C. Y., Chung, P. H., Chi, J. G., Suh, Y. L.: Effect of tibial lengthening on the gastrocnemius muscle. A histopathologic and morphometric study in rabbits. *Acta Orthop Scand* 64:688-92.; 1993.
224. Leung, K. S., Fung, K. P., Sher, A. H., Li, C. K., Lee, K. M.: Plasma Bone-Specific Alkaline Phosphatase as an Indicator of Osteoblastic Activity. *J Bone Joint Surg Br* 75:288-292; 1993.
225. Li, C. H., Dixon, J. S., Liu, W. K.: Human pituitary growth hormone. XIX. The primary structure of the hormone. *Arch Biochem Biophys* 133:70-91; 1969.
226. Li, C. H., Dixon, J. S.: Human pituitary growth hormone. 32. The primary structure of the hormone: revision. *Arch Biochem Biophys* 146:233-6; 1971.
227. Liaudet-Coopman, E. D., Wellstein, A.: Regulation of gene expression of a binding protein for fibroblast growth factors by retinoic acid. *J Biol Chem* 271:21303-8; 1996.
228. Lieberman, J. R., Daluiski, A., Stevenson, S., Wu, L., McAllister, P., Lee, Y. P., Kabo, J. M., Finerman, G. A., Berk, A. J., Witte, O. N.: The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2-producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats. *J Bone Joint Surg Am* 81:905-917; 1999.
229. Lind, M.: Growth factor stimulation of bone healing. Effects on osteoblasts, osteomies, and implants fixation. *Acta Orthop Scand Suppl* 283:2-37; 1998.
230. Lindahl, A., Isgaard, J., Carlsson, L., Isaksson, O. G.: Differential effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on colony formation of epiphyseal chondrocytes in suspension culture in rats of different ages. *Endocrinology* 121:1061-9; 1987.
231. Lindahl, A., Isgaard, J., Isaksson, O. G.: Growth hormone in vivo potentiates the stimulatory effect of insulin-like growth factor-1 in vitro on colony formation of epiphyseal chondrocytes isolated from hypophysectomized rats. *Endocrinology* 121:1070-5; 1987.
232. Lindahl, A., Nilsson, A., Isaksson, O. G.: Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I on colony formation of rabbit epiphyseal chondrocytes at different stages of maturation. *J Endocrinol* 115:263-71; 1987.
233. Linkhart, T. A., Mohan, S., Baylink, D. J.: Growth factors for bone growth and repair: IGF, TGF beta and BMP. *Bone* 19:1S-12S; 1996.
234. Ma, J., Pollak, M. N., Giovannucci, E., Chan, J. M., Tao, Y., Hennekens, C. H., Stampfer, M. J.: Prospective study of colorectal cancer risk in men and plasma levels of insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-3 [see comments]. *J Natl Cancer Inst* 91:620-5; 1999.
235. Madon, R. J., Panton, D. M., Flint, D. J.: Long-term effect of a sheep antiserum to rat growth hormone in vivo in rats is explained by the rat anti-sheep immunoglobulin response. *J Endocrinol* 128:229-237; 1991.
236. Madsen, K., Friberg, U., Roos, P., Eden, S., Isaksson, O.: Growth hormone stimulates the proliferation of cultured chondrocytes from rabbit ear and rat rib growth cartilage. *Nature* 304:545-547; 1983.
237. Maffulli, N., Hughes, T., Fixsen, J. A.: Ultrasonographic monitoring of limb lengthening [see comments]. *J Bone Joint Surg [Br]* 74:130-132; 1992.

238. Maffulli, N., Cheng, J. C., Sher, A., Lam, T. P.: Dual-energy X-ray absorptiometry predicts bone formation in lower limb callotasis lengthening. *Ann R Coll Surg Engl* 79:250-6; 1997.
239. Maffulli, N.: Ultrasound for detection of fracture healing [letter; comment]. *J Orthop Trauma* 13:395-6; 1999.
240. Makarov, M. R., Kochutina, L. N., Samchukov, M. L., Birch, J. G., Welch, R. D.: Effect of rhythm and level of distraction on muscle structure: an animal study. *Clin Orthop* 384:250-64; 2001.
241. Mann, D. R., Rudmann, C. G., M.A., A., K.G., G.: Preservation of bone mass in hypogonadal female monkeys with recombinant human growth hormone administration. *J Clin Endocrinol Metab* 74:1263-9; 1992.
242. Marcus, R., Holloway, L., Butterfield, G.: Clinical uses of growth hormone in older people. *J Reprod Fertil Suppl* 46:115-8; 1993.
243. Markel, M. D.: The determination of bone fracture properties by dual-energy X- ray absorptiometry and single-photon absorptiometry: a comparative study. *Calcif Tissue Int* 48:392-99; 1991.
244. Markel, M. D., Wikenheiser, M. A., Chao, E. Y.: Formation of bone in tibial defects in a canine model. Histomorphometric and biomechanical studies. *J Bone Joint Surg Am* 73:914-923; 1991.
245. Markel, M. D., Chao, E. Y.: Noninvasive monitoring techniques for quantitative description of callus mineral content and mechanical properties. *Clin Orthop* 293:37-45; 1993.
246. Martin, R. B., Papamichos, T., Dannucci, G. A.: Linear calibration of radiographic mineral density using video-digitizing methods. *Calcif Tissue Int* 47:82-91; 1990.
247. Matano, T., Tamai, K., Kurokawa, T.: Adaptation of skeletal muscle in limb lengthening: a light diffraction study on the sarcomere length in situ. *J Orthop Res* 12:193-6; 1994.
248. Matveenko, V. N., Popkov, A. V., Luneva, S. N., Matveenko, M. E.: [Clinical and biochemical indicators in patients undergoing limb lengthening using Ilizarov's method] *Kliniko-biokhimicheskie pokazateli u bol'nykh pri udlinenii konechnosti po Ilizarovu. Ortop Travmatol Protez* 4:35-38; 1989.
249. McCarthy, T., Centrella, M., Canalis, E.: Regulatory effects of insulin-like growth factors I and II on bone collagen synthesis in rat calvarial cultures. *Endocrinology* 124:301-309; 1989.
250. McKibbin, B.: The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg [Br]* 60-B:150-62; 1978.
251. Minuto, F., Barreca, A., Del Monte, P., Giordano, G.: Paracrine actions of IGF binding proteins. *Acta Endocrinol (Copenh)* 124:63-9; 1991.
252. Moens, P., Lammens, J., Molenaers, G., Fabry, G.: Femoral derotation for increased hip anteversion. A new surgical technique with a modified Ilizarov frame. *J Bone Joint Surg Br* 77:107-9; 1995.
253. Mohan, S., Linkhart, T., Farley, J., Baylink, D.: Bone-derived factors active on bone cells. *Calcif Tissue Int* 36 Suppl 1:S139-45; 1984.
254. Mohan, S., Baylink, D. J.: Bone growth factors. *Clin Orthop* 17:30-48; 1991.
255. Morel, G., Chavassieux, P., Barenton, B., Dubois, P. M., Meunier, P. J., Boivin, G.: Evidence for a direct effect of growth hormone on osteoblasts. *Cell Tissue Res* 273:279-286; 1993.
256. Morton, D. B., Griffiths, P. H.: Guidelines on the recognition of pain, distress and discomfort in experimental animals and an hypothesis for assessment. *Vet Rec* 116:431-6; 1985.

257. Mosekilde, L., Bak, B.: The effects of growth hormone on fracture healing in rats: a histological description. *Bone* 14:19-27; 1993.
258. Moses, A. C., Young, S. C., Morrow, L. A., O'Brien, M., Clemmons, D. R.: Recombinant human insulin-like growth factor I increases insulin sensitivity and improves glycemic control in type II diabetes. *Diabetes* 45:91-100; 1996.
259. Myers, G., Bache, C., Brandish, C.: Use of Distraction Osteogenesis Techniques in Skeletal Dysplasias. *J Pediatr Orthop* 23:41-5; 2003.
260. Nash, T. J., Howlett, C. R., Martin, C., Steele, J., Johnson, K. A., Hicklin, D. J.: Effect of platelet-derived growth factor on tibial osteotomies in rabbits. *Bone* 15:203-208; 1994.
261. Neely, E. K., Rosenfeld, R. G.: Use and abuse of human growth hormone. *Annu Rev Med* 45:407-20; 1994.
262. Niall, H. D.: Revised primary structure for human growth hormone. *Nat New Biol* 230:90-1; 1971.
263. Nicholls, P. J., Berg, E., Bliven, F. E., Jr., Kling, J. M.: X-ray diagnosis of healing fractures in rabbits. *Clin Orthop* 142:234-6; 1979.
264. Nielsen, H. M., Bak, B., Jorgensen, P. H., Andreassen, T. T.: Growth hormone promotes healing of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand* 62:244-247; 1991.
265. Nielsen, H. M., Andreassen, T. T., Ledet, T., Oxlund, H.: Local injection of TGF-beta increases the strength of tibial fractures in the rat. *Acta Orthop Scand* 65:37-41; 1994.
266. Nishiyama, K., Sugimoto, T., Kaji, H., Kanatani, M., Kobayashi, T., Chihara, K.: Stimulatory effect of growth hormone on bone resorption and osteoclast differentiation. *Endocrinology* 137:35-41; 1996.
267. Northmore-Ball, M. D., Wood, M. R., Meggitt, B. F.: A biomechanical study of the effects of growth hormone in experimental fracture healing. *J Bone Joint Surg [Br]* 62:391-6; 1980.
268. Ohlsson, C., Nilsson, A., Isaksson, O. G., Lindahl, A.: Effect of growth hormone and insulin-like growth factor-I on DNA synthesis and matrix production in rat epiphyseal chondrocytes in monolayer culture. *J Endocrinol* 133:291-300; 1992.
269. Ohlsson, C., Jansson, J. O., Isaksson, O.: Effects of growth hormone and insulinlike growth factor-I on body growth and adult bone metabolism. *Curr Opin Rheumatol* 12:346-8; 2000.
270. Orbay, J. L., Frankel, V. H., Finkle, J. E., Kummer, F. J.: Canine leg lengthening by the Ilizarov technique. A biomechanical, radiologic, and morphologic study. *Clin Orthop* :265-273; 1992.
271. Orskov, H. Personal Communication. Aarhus, Dänemark: Medical Research Laboratories and Medical Department M, Aarhus University Hospital; 1995.
272. Paley, D.: Current techniques in limb lengthening. *J Pediatr Orthop* 8:73-92; 1988.
273. Paley, D.: Problems, obstacles, and complications of limb lengthening by the Ilizarov technique. *Clin Orthop* 52:81-104; 1990.
274. Paley, D., Rumley, T., Kovelmann, H.: The Ilizarov technique: A method to regenerate bone and soft tissue. *Adv in Plastic and Recons Surg* 7:1-43; 1991.
275. Panjabi, M. M., Walter, S. D., Karuda, M., White, A. A., Lawson, J. P.: Correlations of radiographic analysis of healing fractures with strength: a statistical analysis of experimental osteotomies. *J Orthop Res* 3:212-218; 1985.
276. Peltonen, J. I., Kahri, A. I., Lindberg, L. A., Heikkila, P. S., Karaharju, E. O., Aalto, K. A.: Bone formation after distraction osteotomy of the radius in sheep. *Acta Orthop Scand* 63:599-603; 1992.
277. Peretti, G., Memeo, A., Paronzini, A., Marinoni, E. C.: Methods for the study of bone regeneration in lengthening of the limbs. *Ital J Orthop Traumatol* 15:217-21; 1989.

278. Pfeil, J., Heijens, E., Brunnengraber, G.: [Lengthening osteotomies in leg length inequality]. *Orthopade* 29:775-86; 2000.
279. Pfluger, G., Rahn, B. A., Fischerleitner, F., Thoma, H., Wolner, C.: [Osseous bridging of the distraction gap in leg lengthening procedures (author's transl)]. *Arch Orthop Unfallchir* 86:45-60; 1976.
280. Pritchard, J., Ruzicka, A.: Comparison of fracture repair in the frog, lizard and rat. *J Anat* 84:236-261; 1950.
281. Raben, M. S., Westermeyer, V. M.: Recovery of Growth Hormone in Purification of Corticotropin. *Proc Soc exper Biol & Med* 78:550-551; 1951.
282. Raff, T., Germann, G.: [Growth hormone in surgery--an assessment of current knowledge] Wachstumshormon in der Chirurgie--Eine Standortbestimmung. *Chirurg* 68:995-1003; 1997.
283. Rajewski, F.: [Differentiation of new bone formation at the site of limb lengthening procedures in ultrasonographic examination]. *Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol* 58:205-16; 1993.
284. Rajewski, F.: [The value of computed tomography in evaluation of newly formed bone remodeling after lengthening] Wartosci komputerowej tomografii w ocenie przebudowy nowo powstalej kosci po wydłużeniu. *Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol* 59:73-9; 1994.
285. Raschke, M., Oedekoven, G., Ficke, J., Claudi, B. F.: The monorail method for segment bone transport. *Injury* 24 Suppl 2:S54-S61; 1993.
286. Raschke, M., Wildemann, B., Inden, P., Bail, H., Flyvbjerg, A., Hoffmann, J., Haas, N., Schmidmaier, G.: Bioactive implants accelerate fracture healing in pigs. *Trans Orthop Res Soc* 46; 2000.
287. Raschke, M., Kolbeck, S., Bail, H., Schmidmaier, G., Flyvbjerg, A., Lindner, T., Dahne, M., Roenne, I., Haas, N.: Homologous growth hormone accelerates healing of segmental bone defects. *Bone* 29:368-73; 2001.
288. Raschke, M., Wildemann, B., Inden, P., Bail, H., Flyvbjerg, A., Hoffmann, J., Haas, N. P., 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* 30:144-51.; 2002.
289. Raschke, M. J., Bail, H., Windhagen, H. J., Kolbeck, S. F., Weiler, A., Raun, K., Kappelgard, A., Skiaerbaek, C., Haas, N. P.: Recombinant growth hormone accelerates bone regenerate consolidation in distraction osteogenesis. *Bone* 24:81-88; 1999.
290. Reddy, S. V., Roodman, G. D.: Control of osteoclast differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 8:1-17; 1998.
291. Reichel, H., Lebek, S., Alter, C., Hein, W.: Biomechanical and densitometric bone properties after callus distraction in sheep. *Clin Orthop* 357:237-46; 1998.
292. Richards, J.: Stiffness in healing fractures. *Crit Rev Biomed Eng* 15:145-85; 1987.
293. Richardson, J. B., Cunningham, J. L., Goodship, A. E., O'Connor, B. T., Kenwright, J.: Measuring stiffness can define healing of tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br* 76:389-394; 1994.
294. Rinderknecht, E., Humbel, R. E.: Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett* 89:283-6; 1978.
295. Rinderknecht, E., Humbel, R. E.: The amino acid sequence of human insulin-like growth factor I and its structural homology with proinsulin. *J Biol Chem* 253:2769-76; 1978.
296. Rosen, C. J., Pollak, M.: Circulating IGF-I: New Perspectives for a New Century. *Trends Endocrinol Metab* 10:136-141; 1999.

297. Rosen, V., Thies, R. S. The Cellular and Molecular Basis of Bone Formation and Repair: P.G. Landes Co; 1995.
298. Roupas, P., Herington, A. C.: Cellular mechanisms in the processing of growth hormone and its receptor. *Mol Cell Endocrinol* 61:1-12; 1989.
299. Saggese, G., Federico, G., Cinquanta, L.: In vitro effects of growth hormone and other hormones on chondrocytes and osteoblast-like cells. *Acta Paediatr Suppl* 82:54-9; 1993.
300. Salmas, M. G., Nikiforidis, G., Sakellaropoulos, G., Kosti, P., Lambiris, E.: Estimation of artifacts induced by the Ilizarov device in quantitative computed tomographic analysis of tibiae. *Injury* 29:711-6; 1998.
301. Salmon, W. D., Daughaday, W. H.: "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* 51:167-73; 1958.
302. Salmon, W. D., Burkhalter, V. J.: Stimulation of sulfate and thymidine incorporation into hypophysectomized rat cartilage by growth hormone and insulin-like growth factor-I in vitro: the somatomedin hypothesis revisited. *J Lab Clin Med* 129:430-8; 1997.
303. Salzar, G., Gonzalez, A.: Novel mechanism for regulation of epidermal growth factor receptor endocytosis revealed by protein kinase A inhibition. *Mol Cell Biol* 13:1677-93; 2002.
304. Sandberg, M., Aro, H., Vuorio, E.: Gene expression during bone repair. *Clin Orthop* 289:292-312; 1993.
305. Sartorio, A., Conti, A., Monzani, M., Morabito, F., Faglia, G.: Growth hormone treatment in adults with GH deficiency: effects on new biochemical markers of bone and collagen turnover. *J Endocrinol Invest* 16:893-898; 1993.
306. Schelling, S. H.: Secondary (classical) bone healing. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 6:16-20; 1991.
307. Scheven, B. A., Hamilton, N. J.: Longitudinal bone growth in vitro: effects of insulin-like growth factor I and growth hormone. *Acta Endocrinol (Copenh)* 124:602-7; 1991.
308. Schlechter, N. L., Russell, S. M., Greenberg, S., Spencer, E. M., Nicoll, C. S.: A direct growth effect of growth hormone in rat hindlimb shown by arterial infusion. *Am J Physiol* 250:E231-5; 1986.
309. Schlechter, N. L., Russell, S. M., Spencer, E. M., Nicoll, C. S.: Evidence suggesting that the direct growth-promoting effect of growth hormone on cartilage in vivo is mediated by local production of somatomedin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:7932-4; 1986.
310. Schleicher, A., Tillmann, B., Zilles, K.: Quantitative analysis of x-ray images with a television image analyser. *Microsc Acta* 83:189-96; 1980.
311. Schlemmer, A., Johansen, J. S., Pedersen, S. A., Jorgensen, J. O., Hassager, C., Christiansen, C.: The effect of growth hormone (GH) therapy on urinary pyridinoline cross-links in GH-deficient adults. *Clin Endocrinol Oxf* 35:471-476; 1991.
312. Schlitz, P. M., Mohan, S., Baylink, D. J.: Insulin-like Growth Factor Binding Protein-4 Inhibits Both Basal and IGF-Mediated Chick Pelvic Cartilage Growth In Vitro. *J Bone Miner Res* 8:391-6; 1993.
313. Schmid, C., Steiner, T., Froesch, E. R.: Insulin-like growth factor I supports differentiation of cultured osteoblast-like cells. *FEBS Lett* 173:48-52; 1984.
314. Schmid, C., Rutishauser, J., Schläpfer, I., Froesch, E. R., Zapf, J.: Intact but not truncated insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) blocks IGF I-induced stimulation of osteoblasts: control of IGF signalling to bone cells by IGFBP-3-specific proteolysis? *Biochem Biophys Res Commun* 179:579-85; 1991.

315. Schmid, C., Schlapfer, I., Futo, E., Waldvogel, M., Schwander, J., Zapf, J., Froesch, E. R.: Triiodothyronine (T3) stimulates insulin-like growth factor (IGF)-1 and IGF binding protein (IGFBP)-2 production by rat osteoblasts in vitro. *Acta Endocrinol (Copenh)* 126:467-73; 1992.
316. Schmid, C.: Insulin-like growth factors. *Cell Biol Int* 19:445-57; 1995.
317. Schmidmaier, G., Wildemann, B., Bail, H., Lucke, M., T, F., Stemberger, A., Flyvbjerg, A., Haas, N. P., Raschke, M.: Local application of growth factors (IGF-I and TGF- $\beta$ 1) from a biodegradable Poly(D,L-lactide) coating of osteosynthetic implants accelerates fracture healing in rats. *Bone* 28:341-50; 2001.
318. Schmidmaier, G., Wildemann, B., Cromme, F., Kandziora, F., Haas, N. P., 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* 30:816-22; 2002.
319. Schoenle, E., Zapf, J., Humbel, R., Froesch, E.: Insulin-like growth factor I stimulates growth in hypophysectomized rats. *Nature* 18:252-253; 1982.
320. Schoenle, E., Zapf, J., Hauri, C., Steiner, T., Froesch, E. R.: Comparison of in vivo effects of insulin-like growth factors I and II and of growth hormone in hypophysectomized rats. *Acta Endocrinol* 108:167-74; 1985.
321. Schröter, C., Korschewitz, I., Tegeler, G., Schulke, B.: [Isolation of growth hormone from swine hypophysis]. *Endokrinologie* 69:246-57; 1977.
322. Schumacher, B., Albrechtsen, J., Keller, J., Flyvbjerg, A., Hvid, I.: Periosteal insulin-like growth factor I and bone formation. Changes during tibial lengthening in rabbits. *Acta Orthop Scand* 67:237-241; 1996.
323. Schwartzman, V., Schwartzman, R.: Corticotomy. *Clin Orthop* :37-47; 1992.
324. Shah, K. M., Nicol, A. C., Hamblen, D. L.: Fracture stiffness measurement in tibial shaft fractures: a non-invasive method. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 10:395-400; 1995.
325. Shepanek, L.: The effect of endocrine substances (ACTH and growth hormone) on experimental fractures. *Surg Gynaecol Obstet* 96:200-204; 1953.
326. Silberberg, M., Silberberg, R.: Influence of acid extract of cattle pituitary gland on bone repair in young guinea pigs. *Proc Soc Exp Biol Med* 33:113-119; 1935.
327. Simpson, A. H., Kenwright, J.: Fracture after distraction osteogenesis. *J Bone Joint Surg [Br]* 82:659-65; 2000.
328. Slootweg, M. C., van Buul-Offers, S. C., Herrmann-Erlee, M. P., Duursma, S. A.: Direct stimulatory effect of growth hormone on DNA synthesis of fetal chicken osteoblasts in culture. *Acta Endocrinol (Copenh)* 118:294-300; 1988.
329. Slootweg, M. C., van Buul-Offers, S. C., Herrmann-Erlee, M. P., van der Meer, J. M., Duursma, S. A.: Growth hormone is mitogenic for fetal mouse osteoblasts but not for undifferentiated bone cells. *J Endocrinol* 116:R11-3.; 1988.
330. Slootweg, M. C., Salles, J. P., Ohlsson, C., de Vries, C. P., Engelbregt, M. J., Netelenbos, J. C.: Growth hormone binds to a single high affinity receptor site on mouse osteoblasts: modulation by retinoic acid and cell differentiation. *J Endocrinol* 150:465-72; 1996.
331. Smith, R.: Head injury, fracture healing and callus [editorial]. *J Bone Joint Surg Br* 69:518-520; 1987.
332. Solheim, E.: Growth factors in bone. *Int Orthop* 22:410-416; 1998.
333. Sommelet, J., Hummer, J., Ory, J. M.: [Objective method of evaluating bone implant deformations in vivo by telemetry]. *Acta Orthop Belg* 42:88-97; 1976.
334. Sonoda, M., Takano, M., Miyahara, J., Kato, H.: Computed radiography utilizing scanning laser stimulated luminescence. *Radiology* 148:833-8; 1983.

335. Spencer, R. F.: The effect of head injury on fracture healing. A quantitative assessment. *J Bone Joint Surg Br* 69:525-528; 1987.
336. Sporn, M. B., Roberts, A. B.: Transforming growth factor-beta. Multiple actions and potential clinical applications. *Jama* 262:938-41; 1989.
337. Stahnke, N., Zeisel, H. J.: Growth hormone therapy and leukaemia. *Eur J Pediatr* 148:591-6; 1989.
338. Stanitski, D. F., Hahcheraghi, H.: Results of tibial lengthening with the Ilizarov technique. *J Pediatr Orthop* 16:168-172; 1996.
339. Svoboda, M. E., Van Wyk, J. J., Klapper, D. G., Fellows, R. E., Grissom, F. E., Schlueter, R. J.: Purification of somatomedin-C from human plasma: chemical and biological properties, partial sequence analysis, and relationship to other somatomedins. *Biochemistry* 19:790-7; 1980.
340. Tajana, G., Morandi, M., Zembo, M.: The structure and development of osteogenetic repair tissue according to Ilizarov technique in man. Characterization of extracellular matrix. *Orthopedics* 12:515-23; 1989.
341. Tannenbaum, G. S., Ling, N.: The interrelationship of growth hormone (GH)-releasing factor and somatostatin in generation of the ultradian rhythm of GH secretion. *Endocrinology* 115:1952-7; 1984.
342. Tegeler, G., Schulke, B.: [Secretion of growth hormone in pigs]. *Endokrinologie* 73:112-5; 1979.
343. 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* 31:429-33; 1993.
344. Thaller, S., 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* 31:421-428; 1993.
345. Thaller, S. R., 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* 31:421-428; 1993.
346. Tiedeman, J. J., Lippiello, L., Connolly, J. F., Strates, B. S.: Quantitative roentgenographic densitometry for assessing fracture healing. *Clin Orthop* 253:279-86; 1990.
347. Tjernstrom, B., Thoumas, K. A., Pech, P.: Bone remodelling after leg lengthening: evaluation with plain radiographs, and computed tomography and magnetic resonance imaging scans. *J Pediatr Orthop* 12:751-5; 1992.
348. Topel, D. G., Weiss, G. M., Siers, D. G., Magilton, J. H.: Comparison of blood source and diurnal variation on blood hydrocortisone, growth hormone, lactate, glucose and electrolytes in swine. *J Anim Sci* 36:531-4; 1973.
349. Trippel, S., Coutts, R., Einhorn, T., Mundy, R., Rosenfeld, R.: Growth factors as therapeutic agents. *J Bone Joint Surg [Am]* 78:1272-1286; 1996.
350. Tylkowski, C. M., Wezeman, H., Ray, R. D.: Hormonal effects on the morphology of bone defect healing. *Clin Orthop* 115:274-285; 1976.
351. Udupa, K. N., Gupta, L. P.: The effect of growth hormone and thyroxine in healing of fractures. *Indian J Med Res* 53:623-628; 1965.
352. Urist, M.: Bone: formation by autoinduction. *Science* 150:893-9; 1965.
353. Van Herpen, H., Rijnberk, A., Mol, J. A.: Production of antibodies to biosynthetic human growth hormone in the dog. *Vet Rec* 134:171-171; 1994.
354. Van Roermund, P. M., Ter Haar Romeny, B. M., Schoonderwoert, G. J., Brandt, C. J., Sijbrandij, S., Renooij, W.: The use of computed tomography to quantitate bone formation after distraction epiphysiolytic in the rabbit. *Skeletal Radiol* 16:52-6; 1987.

355. Van Roermund, P. M.: Bone growth and remodeling after distraction epiphysiolysis of the proximal tibia of the rabbit. *Clin Orthop* 266:304-12; 1991.
356. Vauhkonen, M., Peltonen, J., Karaharju, E., Aalto, K., Alitalo, I.: Collagen synthesis and mineralization in the early phase of distraction bone healing. *Bone Miner* 10:171-81; 1990.
357. Vetter, U., Helbing, G., Heit, W., Pirsig, W., Sterzig, K., Heinze, E.: Clonal proliferation and cell density of chondrocytes isolated from human fetal epiphyseal, human adult articular and nasal septal cartilage. Influence of hormones and growth factors. *Growth* 49:229-45; 1985.
358. Volpin, G., Rees, J. A., Ali, S. Y., Bentley, G.: Distribution of alkaline phosphatase activity in experimentally produced callus in rats. *J Bone Joint Surg [Br]* 68:629-634; 1986.
359. Wagner, H.: Operative Beinverlängerung. *Chirurg* 6:260-66; 1971.
360. Walker, C. W., Aronson, J., Kaplan, P. A.: Radiologic evaluation of limb-lengthening procedures. *AJR* 156:353-8; 1991.
361. 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* 15:1776-85; 2000.
362. Webb, J., Herling, G., Gardner, T., Kenwright, J., Simpson, A. H.: Manual assessment of fracture stiffness. *Injury* 27:319-20; 1996.
363. Wehrenberg, W. B., Ling, N., Bohlen, P., Esch, F., Brazeau, P., Guillemin, R.: Physiological roles of somatocrinin and somatostatin in the regulation of growth hormone secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 109:562-7; 1982.
364. Weiss, S., Baumgart, R., Jochum, M., Strasburger, M.: Systemic regulation of distraction osteogenesis: a cascade of biochemical factors. *J Bone Miner Res* 17:1280-9; 2002.
365. Welch, R. D., Birch, J. G., Makarov, M. R., Samchukov, M. L.: Histomorphometry of distraction osteogenesis in a caprine tibial lengthening model. *J Bone Miner Res* 13:1-9; 1998.
366. Wergedal, J. E., Mohan, S., Lundy, M., Baylink, D. J.: Skeletal growth factor and other growth factors known to be present in bone matrix stimulate proliferation and protein synthesis in human bone cells. *J Bone Miner Res* 5:179-86; 1990.
367. White, A. A., Panjabi, M. M., Southwick, W. O.: The four biomechanical stages of fracture repair. *J Bone Joint Surg [Am]* 59:188-92; 1977.
368. Wiedemann, M.: Morphologische Grundlagen der Kallusdistraction. *Zentralbl Chir* 119:587-93; 1994.
369. Wildburger, R., Zarkovic, N., Dobnig, H., Petek, W., Hofer, H. P.: Post-traumatic dynamic change of carboxyterminal propeptide of type I procollagen, alkaline phosphatase and its isoenzymes as predictors for enhanced osteogenesis in patients with severe head injury. *Res Exp Med Berl* 194:247-259; 1994.
370. Wilhelmi, A. E. Comparative Biochemistry of Growth hormone from Ox, Sheep, Pig, Horse and Fish Pituitaries. In: R. W. Smith and O. H. Gaebler (eds.), *The hypophyseal growth hormone, nature and actions*, pp. 59-69. New York: McGraw-Hill Book Comp.; 1955.
371. Wilhelmi, A. E.: Canine Growth Hormone. *Yale J biol Med* :199-207; 1968.
372. Wilhelmi, A. E. Chemistry of Growth Hormone. In: R. O. Greep and E. B. Astwood (eds.), *Handbook of Physiology*, Sect 7 4, pp. 59-78. Washington DC; 1974.
373. Williams, E. A., Rand, J. A., An, K. N., Chao, E. Y., Kelly, P. J.: The early healing of tibial osteotomies stabilized by one-plane or two-plane external fixation. *J Bone Joint Surg [Am]* 69:355-65; 1987.

374. Willoughby, J. O., Martin, J. B., Renaud, L. P., Brazeau, P.: Pulsatile growth hormone release in the rat: failure to demonstrate a correlation with sleep phases. *Endocrinology* 98:991-6; 1976.
375. Wolf, S., Augat, P., Eckert-Hubner, K., Laule, A., Krischak, G. D., Claes, L. E.: Effects of high-frequency, low-magnitude mechanical stimulus on bone healing. *Clin Orthop* 385:192-8; 2001.
376. Wong, G. L., Kotliar, D., Schlaeger, D., Brandes, S. J.: IGF-I Production by mouse osteoblasts. *J Bone Miner Res* 5:133-40; 1990.
377. Wozney, J. M. Bone Morphogenetic Proteins and their Gene Expression. In: M. Noda (ed.), *Cellular and Molecular Biology of Bone*, pp. 131-167. Tokyo: Academic Press Inc.; 1993.
378. Wozney, J. M., Rosen, V.: Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair. *Clin Orthop* 346:26-37; 1998.
379. Wray, B., Goldstein, J.: The Effect of the Pituitary Gland and Growth Hormone Upon the Strength of the Healing Fracture in the Rat. *J Bone Joint Surg [Am]* 48:815-816; 1966.
380. Wu, X., Yu, H., Amos, C. I., Hong, W. K., Spitz, M. R.: Joint effect of insulin-like growth factors and mutagen sensitivity in lung cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 92:737-43; 2000.
381. Yasui, N., Kojimoto, H., Sasaki, K., Kitada, A., Shimizu, H., Shimomura, Y.: Factors affecting callus distraction in limb lengthening. *Clin Orthop* :55-60; 1993.
382. 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 [Br]* 79:824-830; 1997.
383. Young, J. W., Kostrubiak, I. S., Resnik, C. S., Paley, D.: Sonographic evaluation of bone production at the distraction site in Ilizarov limb-lengthening procedures. *AJR Am J Roentgenol* 154:125-128; 1990.
384. Zadek, R., Robinson, R.: The effect of growth hormone on experimental long-bone defects. *J Bone Joint Surg [Am]* 43:1261-1261; 1961.
385. Zapf, J., Walter, H., Froesch, E. R.: 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* 68:1321-1330; 1981.
386. Zeisel, H. J., Lutz, A., von Petrykowski, W.: Immunogenicity of a mammalian cell-derived recombinant human growth hormone preparation during long-term treatment. *Horm Res* 37 Suppl 2:47-55; 1992.
387. Zheng, M. H., Nicholson, G. C., Warton, A., Papadimitriou, J. M.: What's new in osteoclast ontogeny? *Pathol Res Pract* 187:117-25; 1991.
388. Zheng, M. H., Wood, D. J., Papadimitriou, J. M.: What's new in the role of cytokines on osteoblast proliferation and differentiation? *Pathol Res Pract* 188:1104-1121; 1992.
389. Zwickl, C. M., Smith, H. W., Tamura, R. N., Bick, P. H.: Somatotropin antibody formation in cows treated with a recombinant bovine somatotropin over two lactations. *J Dairy Sci* 73:2888-95; 1990.
390. Zwickl, C. M., Cocke, K. S., Tamura, R. N., Holzhausen, L. M., Brophy, G. T., Bick, P. H., Wierda, D.: Comparison of the immunogenicity of recombinant and pituitary human growth hormone in rhesus monkeys. *Fundam Appl Toxicol* 16:275-287; 1991.

## Anhang

### VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

µg	Mikrogramm
b-ALP	Bone specific alkaline phosphatase
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BW	Bodyweight, Körpergewicht
CT	Computertomographie
DEXA	Double emission x-ray absorptiometry
DLR	Digitale Lumineszenzradiographie
EAT	equivalent aluminum thickness (äquivalente Dicke des Aluminium-Phantoms)
FGF	Fibroblast growth factor
FIZ	Fibrous interzone
GH	Growth Hormone
GHBP	Growth Hormone binding protein
HA-Äquivalent	Hydroxylapatit-Äquivalent
ICTP	Carboxy-terminal telopeptide collagen I
IGFBP	IGF-binding protein
IGF-I	Insulin-like growth factor – I
IGF-II	Insulin like growth factor – II
IVTS	<i>In-vivo</i> torsionale Steifigkeit
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
MHz	Megahertz
mrem	Millirem
PDGF	Platelet-derived growth factor
QCT	Quantitative Computertomographie
rh	Rekombinant human
r-pGH	Recombinant porcine Growth Hormone
STH	Somatotropes Hormon
TGF-β	Transforming growth factor-β

## **Danksagung**

Zunächst gilt mein ganz besonderer Dank meinem Chef, Herrn Professor Dr. Norbert P. Haas, für die mir gewährten Freiräume, ohne die die zeitraubenden experimentellen Untersuchungen nicht möglich gewesen wären. Zusätzlich danke ich ihm für seine vielfältige Unterstützung, sein Vertrauen und die Möglichkeit in seiner Klinik sowohl experimentell als auch klinisch tätig sein zu dürfen.

Mein ganz besonderer Dank gilt ebenso Herrn Professor Dr. Michael Raschke, Ordinarius an der Universität Münster ohne den die vorliegenden Studien nicht möglich gewesen wären. Er hat mich in seine Arbeitsgruppe aufgenommen, seine innovativen Ideen gaben den Anstoß für einen großen Teil der vorliegenden Studien. Des Weiteren bedanke ich mich bei ihm für die vielfältige freundschaftliche Unterstützung, die ich von ihm wissenschaftlich und klinisch erfahren durfte. Mein Dank gilt daher an dieser Stelle auch seiner geduldigen Assistenz bei meiner ersten Osteosynthese und vielen nachfolgenden Operationen.

Danken möchte ich ebenso Herrn Dr. Stefan Kolbeck für die unermüdliche Hilfe und freundschaftliche Unterstützung bei der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente.

Freundschaftlich verbunden danke ich Herrn Dr. Klaus-Dieter Schaser für die vielfältigen wissenschaftlichen Diskussionen und Ratschläge, sowie die Ermutigung, die ich aus seiner Unterstützung ziehen durfte.

Ferner gilt mein Dank Herrn PD Dr. Andreas Weiler, dessen Scharfsinn bei der Durchführung und Auswertung der tierexperimentellen Untersuchungen von besonderem Wert gewesen ist. Ebenso danke ich meinen Kollegen Dr. Gerhard Schmidmaier für konstruktive Diskussionen und die Hilfe bei der Durchführung der Experimente.

Zutiefst danke ich Herrn Professor Dr. Bernd Kladny, Chefarzt der Fachklinik Herzogenaurach, für die Starthilfe und Rückendeckung bei meinem Einstieg in das eigenständige wissenschaftliche Arbeiten. Ebenso bedanke ich mich für die Gelegenheit, einen Großteil der in der vorliegenden Arbeit angewandten Methoden in seiner Arbeitsgruppe erlernen zu dürfen.

Zur Dankbarkeit verpflichtet bin ich auch Herrn Professor Dr.-Ing. Georg Duda, der die Fortführung meiner wissenschaftlichen Betätigung jederzeit freundlich

unterstützt hat.

Bei PD Dr. Michael Schütz, PD Dr. Ulrich Stöckle und Dr. Ingo Melcher bedanke ich mich für ihre vielfältige klinische Unterstützung, ohne die die wissenschaftliche Arbeit in einem klinisch operativen Fach nicht möglich ist.

Ebenso bedanke ich mich auch bei Herrn PD Dr. Henning Windhagen, dessen Ideen und Umsetzung derselben die biomechanischen Untersuchungen der vorliegenden Arbeit geprägt haben.

Vielen herzlichen Dank an unsere ehemaligen und noch tätigen Doktoranden, Herrn Tobias Lindner (Unfallchirurgie, Charité, Berlin), Herrn Arno Schmeling (Unfallchirurgie, Charité, Berlin), Herrn Michael Dahne (Unfallchirurgie, Charité, Berlin), Herrn Thomas Strassmüller (Chirurgie, Starnberg), Herrn Christian Petz (Chirurgie, Straussberg), Frau Karolin Arndt (Unfallchirurgie, Göttingen), Frau Dr. Petra Seebeck (Tierärztin, Unfallchirurgische Forschung, Charité) und Frau Julia Funk (Orthopädie, Charité, Berlin) für die Unmengen an Zeit und die Leidenschaft, die sie in die Durchführung der experimentellen Untersuchungen investiert haben. Besonders ist an dieser Stelle Herr Dr. G. Krummrey (Chirurgie, Inselspital Bern) hervorzuheben, der sich mit großem Einsatz um die histologischen und histomorphometrischen Techniken und Auswertungen verdient gemacht hat.

Ebenso danke ich Frau Gabriele Hardung, die geduldig und kompetent die histologischen Techniken, welche in der vorliegenden Studie zum Einsatz kamen, angewandt und weiterentwickelt hat.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei Kirsten Raun, Anne-Marie Kappelgard, Ian Ahnfeldt-Roenne und Michael H. Rasmussen (Novo Nordisk A/S, Dänemark) für die vielfältige Unterstützung und jederzeit konstruktiven Diskussionen.

Ohne die finanzielle Unterstützung durch Novo Nordisk, Dänemark, die Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie, die AO/ASIF (Schweiz), die Forschungskommission der Charité und die Firma Mathys (Bettlach, Schweiz) wäre die Durchführung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen. Auch dafür möchte ich mich bedanken.

Dr. med. Hermann Josef Bail

## **Eidesstattliche Versicherung**

gemäss der Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- keine staatsanwaltlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Berlin, den 01.12.03

Dr. med. Hermann Josef Bail