Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Neurochirurgie

Ärztlicher Leiter: Prof. Dr. med. Manfred Westphal

Mikro-Computertomographieuntersuchungen von kranialen Schädelnähten unter Verwendung von Röntgen- und Synchrotronstrahlung

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Tobias Schmidt aus Hamburg

Hamburg 2014

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am:

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

PD Dr. med. Jan Regelsberger

Prüfungsausschuss, 2 Gutachter/in:

Prof. Dr. Prof. Dr. Jens Fiehler

Prüfungsausschuss, 3 Gutachter/in:

PD Dr. Jochen Herrmann

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	
1.1 Vorbemerkung und Arbeitshypothese	3
1.2 Anatomie und Entwicklung der normalen Schädelnähte	5
1.3 Kraniofaziale Anomalien	
1.3.1 Kraniosynostose	15
1.3.2 Lagebedingte Plagiozephalie	19
1.4 Unterschiede primärer Kraniosynostosen und lagebedingter Plagiozephalien	25
1.5 Diagnostik der kraniofazialen Deformitäten heute	27
2. Material und Methoden	
2.1 Patienten und Proben	29
2.2 Methodenbeschreibung der histologischen Untersuchung	32
2.3 Methodenbeschreibung der Mikro-Computertomographie	33
3 Ergebnisse	
3.1 Histologischen Befunde der gesunden und pathologischen Schädelnähte	
sowie der lagebedingten Plagiozephalie	36
3.2 Beurteilung der Morphologie aller Schädelnähte anhand der	
Mikro-CT (Skyscan) und der SRµCT	39
3.3 Knochendichtemessung mittels SRµCT	45
4 Diskussion	46
4.1 Morphologische Diagnostik mittels histologischer Schnittführung	47
4.2. Schädelnahtmorphologie anhand der Mikro-Computertomographie	49
4.3. Die Bedeutung der Knochendichtemessung mittels SRµCT	50
4.4 Auswirkungen auf das Therapieregime und Ansätze für zukünftige Arbeiten	51
4.5 Kritikpunkte an der Arbeit	53
5 Zusammenfassung	54
6 Literaturverzeichnis	55
7 Danksagung	59
8 Publikation des Autors zum Thema	60
9 Lebenslauf	61
10 Eidesstattliche Erklärung	62

1 Einleitung

1.1 Vorbemerkung und Arbeitshypothese

Kraniofaziale Deformitäten sind auf pathologische Veränderungen der Schädelnähte zurückzuführen und seit weit mehr als 100 Jahren bekannt (Persing et al., 1989). Die chirurgischen Therapieansätze zur Korrektur der Deformitäten haben sich zwar vielfältig geändert, jedoch ging diese Entwicklung interessanterweise nicht mit einer zunehmenden wissenschaftlichen Erkenntnis einher. Pathologien der Schädelnähte werden auch heute noch nicht oder nur unzureichend verstanden.

Das heutige Wissen über den Aufbau von gesunden und pathologischen Schädelnähten geht ganz überwiegend auf Untersuchungen an Mäusen und Ratten zurück (Ogle et al., 2004, Stadler et al., 2006, Persson et al., 1978). Histologische Untersuchungen sind durch experimentelle Studien ergänzt worden, die im Falle eines vorzeitigen Schädelnahtverschlusses einen komplexen Ablauf von Mechanismen annehmen lassen und auf unterschiedlichsten Einflüssen wie z.B. dem wachsenden Gehirn beruhen (Burke et al., 1995). Hierbei werden Wachstums- und Transkriptionsfaktoren gefunden, die auf unterschiedliche Mutationen zurückgeführt werden können, deren Steuerung aber völlig ungeklärt ist (Alden et al., 1999, Kabbani and Raghuveer, 2004, Ogle et al., 2004, Opperman, 2000, Rice and Rice, 2008, Warren et al., 2003a, Warren et al., 2003b, Coussens et al., 2007).

In diesem Kontext stützt sich die vorliegende Arbeit auf die Hypothese, dass auch bei einer Schädelnahtverknöcherung Veränderungen in einer Synostose selbst als auch im umliegenden Knochen gefunden werden, die weitere Erklärungsansätze für primäre oder sekundäre Schädelnahtpathologien bieten könnten. Normale und pathologische Schädelnähte sowie eine lagebedingte Plagiozephalie mit den angrenzenden Knochenarealen, entnommen im Rahmen operativer Osteotomien oder Sektionsuntersuchungen, wurden mittels spezieller Computertomographien mit einer minimalen Auflösung von bis zu 7,3 µm auf ihre Morphologie und Knochenaufbau hin untersucht. Es sollte hierbei geklärt werden, ob eine Korrelation zwischen der Verknöcherung der Schädelnähte und der Knochendichte gegeben ist. Bezogen auf die Plagiozephalien stellt sich zusätzlich die Frage, ob diese Schädeldeformität einen normalen Aufbau oder pathologische Veränderungen der Schädelnaht sowie der Knochendichte zeigen. Knochendichtemessungen sind bei Schädelnähten noch nicht durchgeführt worden. Dementsprechend existieren auch keine Normwerte und Normbereiche. Anhand der durch die Gesamtzahl dieser Untersuchungen entstehenden Ergebnisse soll ein besseres wissenschaftliches Verständnis erlangt werden, welches die chirurgischen Therapieansätze bestätigt oder eventuell ein Überdenken der chirurgischen Herangehensweisen veranlasst.

1.2 Anatomie und Entwicklung der normalen Schädelnähte

Aufbau des Schädels:

Den Schädel unterteilt man anatomisch in:

a) das Neurocranium (Hirnschädel) und

b) das Splanchno- oder Viscerocranium (Gesichtsschädel).

Das Neurocranium kann nochmals in die Calvaria (Schädelkalotte) und die Basis cranii (Schädelbasis) unterteilt werden. Diese Unterteilung ist im Hinblick auf die Entstehung und Entwicklung während des Wachstums sinnvoll.

Das Neurocranium wird durch folgende Knochen gebildet:

- Os frontale (Stirnbein), paarig,
- Os parietale (Scheitelbein), paarig,
- Os occipitale (Hinterhauptsbein), unpaar,
- Os sphenoidale (Keilbein), unpaar,
- Os temporale (Schläfenbein), paarig und
- Os ethmoidale (Siebbein), unpaar.



Abbildung 1 Ansicht des knöchernen Schädels von lateral (Pernkopf, 1963)

Am Schädeldach finden sich zwischen den beiden Os frontale die Sutura frontalis oder auch Sutura metopica (Frontalnaht) genannt. Zwischen beiden Os parietale liegt die Sutura sagittalis (Pfeilnaht). Beidseitig jeweils zwischen dem Os frontale und dem Os parietale die rechte und linke Sutura coronalis (Kranznaht) und ebenfalls beidseitig und zwischen dem Os occipitale und dem Os parietale die rechte und linke Sutura lambdoidea (Lambdanaht).

Funktion des Schädels: Die Schädelknochen bilden einen Schutz für das Gehirn. Die einzelnen Schädelknochen sind durch bindegewebige Schädelnähte (Suturae) und Fontanellen voneinander getrennt. Die Schädelnähte fungieren als Gelenke, insbesondere unter der Geburt fangen sie mechanische Krafteinwirkungen ab. Zusätzlich dienen sie als Ausgangspunkt für das Knochenwachstum in der Entwicklung ohne selbst zu verknöchern (Opperman, 2000, Rice, 2008).

Größere bindegewebige Lücken, genannt Fontanellen, finden sich an den Berührungsstellen von mehreren Knochenplatten. Die große Fontanelle (Fonticulus anterior) und die kleine Fontanelle (Fonticulus posterior), die am vorderen und hinteren Ende der Sutura sagittalis liegen, sind unter der Geburt wichtige Orientierungspunkte, um die Lage vom Kopf des Kindes beurteilen zu können. Die Verknöcherung findet etwa im dritten Lebensmonat (kleine Fontanelle) bzw. im 36. Lebensmonat (große



Abbildung 2 Skizzierung der wichtigsten Schädelnähte des menschlichen Schädels A Ansicht von lateral, B Ansicht von oben (Regelsberger, 2007)

Fontanelle) statt.

Die Sutura frontalis/Sutura metopica verknöchert bei 90% aller Menschen regelhaft zwischen dem 3. bis 9. Monat, spätestens bis zum Ende des zweiten Lebensjahres. Bei 10% aller Menschen bleibt sie lebenslang offen. Die Sutura sagittalis, parietalis und lambdoidea verknöchern zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr. Die Suturae des Viscerocraniums dagegen verschließen erst um das 70. Lebensjahr (Cohen, 1993, Opperman, 2000, Vu et al., 2001). Eine frühzeitige Verknöcherung einer Schädelnaht nennt man Kraniosynostose. Diese wurde erstmalig 1851 von Rudolf Virchow beschrieben (Cohen, 1993, Delashaw et al., 1989, Persing et al., 1989).

Entwicklung der Schädelknochen: In der Embryogenese entwickelt sich in der Zeitpunkt Implantation zweiten Woche zum der durch verschiedene Differenzierungsvorgänge aus der Blastozyste (mit enthaltenem Embryoblast) die Embryonalanlage. Hierbei entscheidend ist die Ausbildung der zweiblättrigen Keimscheibe (Hypoblast- und Epiblastschicht) entstehend aus dem Embryoblast. Aus der Epiblastschicht bildet sich durch Auswanderung von Epiblastzellen, die dann Amnioblasten genannt werden, die Amnionhöhle aus. Am Rand der Hypoblastschicht wandern ebenfalls Zellen aus, die als dünne Zellschicht (=Heuser-Membran) den primären Dottersack bilden (Ulfig, 2005) (Abbildung 3).

Die Epiblastschicht differenziert sich weiter zu einer Ektodermschicht. Vom Primitivknoten wandern Epiblastzellen aus und bilden das Entoderm, welches im



Abbildung 3 Die Entstehung der dreiblättrigen Keimscheibe a) Dorsalansicht der Keimscheibe nach Entfernung des Amnions (Anfang 3. Woche); Bildung des Primitivstreifens; b) Querschnitt durch die Keimscheibe (Ulfig, 2005)

Bereich der Hypoblastschicht diese verdrängt. Zusätzlich bildet sich aus dem gleichen Ursprung die Chorda dorsalis, welche später benachbarte Strukturen induziert. In der Invaginationsphase kommt durch epithelio-mesenchymale Umwandlung der Epiblasten und folgender Einwanderung über den Primitivstreifen zu einer neuen Zelllage zwischen die beiden bestehenden Keimschichten zum sogenannten Mesoderm. Es besteht nun eine dreiblättrige Keimscheibe bestehend aus Ektoderm, Mesoderm und Entoderm (Ulfig, 2005) (Abbildung 4).



Abbildung 4

links: Auswanderung der Epiblastzellen (Invagination, 16. Tag) a) Dorsalansicht, b) Querschnitt durch die Keimscheibe

rechts: Differenzierung des Mesoderms a) 21. Tag, b) 26. Tag, c) 28. Tag, d) 30. Tag

Durch Proliferation und Differenzierung gliedert sich das Mesoderm weiter auf (Ulfig,

2005) (Abbildung 4):

- 1. paraaxiales Mesoderm (Somiten)
- 2. intermediäres Mesoderm
- 3. Seitenplattenmesoderm mit
 - a. parietalem Mesoderm
 - b. vis(Alden et al., 1999)zeralem Mesoderm

Aus dem paraaxialem Mesoderm bilden sich Somiten, welche sich zu einem beidseitigen Dermaton, Myotom und Sklerotom entwickeln und für die Bildung der Haut, Muskeln und Knochen zuständig ist. Das intermediäre Mesoderm ist für die Entstehung der Harnorgane notwendig. Das Seitenplattenmesoderm für die Ausbildung von Bindegewebe der inneren Organe und der Gefäße.

Das Ektoderm differenziert sich durch weitere Induktion zum Neuroektoderm und dem Neuralrohr. Hieraus zentrale Nervensystem. Während entsteht das der Neuralrohrbildung verlieren die Ektodermzellen, die am Rande des Neuralrohres liegen ihren Kontakt zu Nachbarzellen und ordnen sich zu einer sogenannten Neuralleiste an. Die aus der Neuralleiste entstehenden Mesenchymzellen bilden die Grundlage für Knochen und Muskeln des Schädels. Diese Induktion zeichnet sich durch einen komplexen Inhibitionsvorgang aus: Erhalten die Ektodermzellen keine Signalmoleküle, werden alle Zellen zu Neuralleistenzellen. Durch intraektodermale Signale, sogenannte (BMPs), 'bone morphogenetic proteins' werden wiederum alle Differenzierungsvorgänge unterdrückt. Diese Unterdrückung wird später durch verschiedene Polypeptide aus der Chorda dorsalis, beispielsweise Noggin, antagonisiert. Dadurch differenzieren sich die über der Chorda dorsalis liegenden Ektodermzellen zu Neuralleistenzellen und die Neuralleiste entsteht.

Aus der Neuralleiste und dem Mesoderm gemeinsam entstehen die meisten Schädelknochen, deren Zuordnung zu ihrem Ursprungsgewebe trotz diverser Untersuchungen von Entwicklungs- und Wachstumsfaktoren nicht eindeutig geklärt ist (Jiang et al., 2002, Morriss-Kay, 2001, Noden and Trainor, 2005, Opperman, 2000, Rice, 2008). Demgegenüber entsteht die Dura mater zweifelsohne aus der Neuralleiste, die sich durch eine anfängliche Mesenchymverdichtung (Meninx primitiva) später in die drei Hirnhäute (Dura mater, Pia mater und Arachnoidea) aufteilt (Mack et al., 2009). Die Biologie der Schädelnähte ist bei den Säugetieren sehr unterschiedlich, lediglich die Nahtbiologie der Maus, der Ratte und des Kaninchens kann mit der des Menschen verglichen werden, so dass die derzeitigen Theorien über die Funktionen und das Wachstumsverhalten der Schädelnähte überwiegend auf tierexperimentellen Beobachtungen basieren (Ogle et al., 2004, Persson et al., 1978, Stadler et al., 2006).

Verknöcherung der Schädelknochen: Allgemein gibt es zwei Möglichkeiten einer Ossifikation: die desmale oder die chondrale Verknöcherung.

Der erste Schritt in der Entstehung eines Knochengerüstes besteht in der Kondensation von Mesenchymzellen, die unabhängig von ihrem Ursprung (Mesoderm oder Neuralleiste) sind. Zum Start einer Kondensation erhalten die Mesenchymzellen unabhängig von ihrer Lokalisation Stimuli bestimmter Signale (z.B. BMP). Die nun folgende Proliferation und Aggregation von verteilt liegenden Zellen wird als "Kondensationsformation" bezeichnet. Aus dieser Formation entstehen die Grundstufen der zwei Ossifikationsformen. Einerseits kommt es durch die knochenproduzierenden Osteoblasten zu einer Produktion von Osteoid (Knochengrundsubstanz). Hierbei entstehen kleinere Knochentrabekel, welche sich zu größeren Knochenarealen fusionieren. Das weitere Wachstum des Knochens vollzieht sich appositionell mit Anlagerung von Osteoblasten produzierter Knochensubstanz (desmale Ossifikation). Andererseits entsteht aus den Mesenchymzellen ein knorpelhaltiges Grundgerüst, welches durch Chondroklasten abgebaut und mit Hilfe von Osteoblasten durch Knochen ersetzt wird (chondrale Ossifikation) (Rice and Rice, 2008).

Beim Viscerocranium und dem Schädeldach entstehen Knocheninseln im Sinne einer desmalen Ossifikation, die durch Knochenanlagerung die Schädelknochen bilden. Die chondrale Ossifikation der Schädelbasis verläuft mit Einwachsen von Blutgefäßen in das vorbestehende knorpelige Grundgerüst, in deren Begleitung sich Mesenchymzellen befinden. Diese differenzieren sich zu Chondroklasten (Knorpelabbau) und Osteoblasten (für den Knochenaufbau) (Rice, 2008, Rice and Rice, 2008).

Aufbau und Entwicklung der Schädelnähte: Nach Annäherung der Knochen verbleiben bindegewebige Schädelnähte, die als intramembranöse Knochenwachstumszentren agieren (Opperman, 2000, Pritchard et al., 1956). Sie erlauben einen weiteren Knochenaufbau an den gegenüberliegenden Knochenrändern, während sie selbst jedoch nicht verknöchern. Dieses gilt sowohl für die Schädelbasis als auch die Schädelkalotte (Opperman, 2000).

Histologisch konnte sehr frühzeitig erkannt werden, dass die Schädelnähte aus einer bindegewebigen Struktur bestehen. Pritchard fand schon 1956 heraus, dass sich zwischen den beiden Knochenkanten fünf Schichten befinden. Hinzu kommen zwei weitere Schichten, die die Naht von ektokranial und endokranial einschließen. Die fünf Schichten enthalten je zwei Schichten des Periosts: die innere cambiale, osteogenetische, knochenentwickelnde Schicht und die kapsuläre, periostverlängernde Schicht. Die fünfte Schicht wird durch eine innere lockere Bindegewebsschicht gebildet (Abbildung 5).



Abbildung 5

Schematische Darstellung der Schädelnaht mit den unterschiedlichen Schichten Jeweils lateral der mittleren lockeren Bindegewebsschicht ist eine kapsuläre und eine cambiale, zellbildende Schicht zu erkennen; ekto- und endokranial liegt jeweils eine umschließende Bindewebsschicht

Bei der Entwicklung der Naht verschmälert sich die cambiale Schicht schrittweise zu einer flachen Schicht aus Osteoblasten, während sich die kapsuläre Schicht verdickt. Die mittlere Schicht vaskularisiert stark und die äußeren umschließenden Schichten formieren sich zu einer festhaftenden Struktur. Die so formierte Naht ist eine feste bindegewebige Einheit, die leichte, gelenkartige Bewegungen noch zulässt (Pritchard et al., 1956). Am ausgereiften Knochen sieht man weiche Knochenränder und eine eingeschlossene Knochenmarksansammlung mit Gefäßinfiltration. An den Rändern des Periostes sind Osteoblastenansammlungen mit kleinen Knochenfoci zu sehen. Der Nahtzwischenraum ist mit gut vaskularisiertem, dicht liegendem fibrösen Gewebe gefüllt (Furuya et al., 1984a, Furuya et al., 1984b).

Burke fand 1995 in seinen histochemischen Untersuchungen, dass die Osteoblasten auf der knöchernen Oberfläche zu finden waren und die Osteoklasten jedoch nur im Bereich der Diploe (Spongiosa der platten Knochen). In der Naht selbst konnten keine Osteoklasten nachgewiesen werden, weshalb dort keine Möglichkeit zur Knochenelimination besteht. Zusätzlich konnten faserartige Stränge im Bereich der Naht gefunden werden. Hier wird vermutet, dass diese Strukturen für den normalen Verknöcherungsprozess als Leitstruktur dienen (Burke et al., 1995).



Abbildung 6 Histologisches Bild einer normalen Schädelnaht Deutlich sichtbarer Knochenfocus im Bereich des Periost. Die Nahtspalte (S) enthält dichtes vaskuläres Bindegewebe. (Furuya et al., 1984b)

Nach der Fusion der Schädelnähte tritt am Schädeldach ein koordiniertes Gleichgewicht ein zwischen einer osteoblastenbedingten Apposition, hauptsächlich an der äußerlichen Kalottenseite, und einer osteoklastenbedingten Resorption, hauptsächlich an der Innenfläche. Dieses führt in einem langsam ablaufenden Prozess zu einer weiteren Größenzunahme des Schädels (Rice, 2008, Rice and Rice, 2008). Zu welchem Zeitpunkt und durch welchen Mechanismus aber die Schädelnähte ihre Funktionen einstellen und damit verknöchern, bleibt unklar. Bemerkenswert bleib, dass eine Verknöcherung der Schädelnähte nicht zwangsläufig auf das Ende der Schädelnahtentwicklung und den Abschluss des Schädelnahtwachstums folgt.

Als ein wesentlicher Grund für den Verschluss von Schädelnähten wird der fehlende Stimulus des wachsenden Gehirns angenommen. Nach neuen Erkenntnissen wird der Verschluss von Schädelnähten durch Veränderungen in der Genexpression von Wachstumsfaktoren beeinflusst, die für die Osteoblastenaktivität zuständig sind.

Einfluss der Wachstumsfaktoren und der Dura mater auf die Schädelnähte/knochen: Die beiden wichtigsten Vertreter sind der 'fibroblast growth factor' (FGF-2, FGF-4) und das 'bone morphogenetic protein' (BMP-4, BMP-7) (Cohen, 1993). An dem gesamten Prozess von der Entwicklung bis zur Verknöcherung der Schädelnaht sind darüber hinaus diverse Entwicklungs- und Transkriptionsfaktoren ('fibroblast growth factor', 'bone morphogenetic protein', Noggin, MSX, TWIST,...) beteiligt, bei denen eine Veränderung der Expression nachgewiesen werden konnte. Diese Modelle sind noch unzureichend verstanden, um sie in der Behandlung der Kraniosynostosen therapeutisch nutzen zu können (Alden et al., 1999, Ogle et al., 2004, Opperman, 2000, Warren et al., 2003b).

Die Dura mater, als äußere der drei Hirnhäute, ist ein weiterer wichtiger Faktor bezogen auf die Funktion und Verknöcherung der Schädelnähte. Am Schädeldach liegt sie an der Knocheninnenseite während sie im Bereich der Gesichtsknochen keinen Kontakt zum Knochen aufweist. Hier nehmen andere Gewebe, z.B. das nasale Knorpelgewebe, Einfluss auf die Schädelnaht (Opperman, 2000, Rice and Rice, 2008). Der Verknöcherungsprozess der Dura wird durch interzelluläre und mechanische Signale sowie Zellen, die in die Naht einwandern können, beeinflusst (Ogle et al., 2004). Diese verändern die Genexpression in unterschiedlichen Regionen in komplexer Weise (Warren et al., 2003b).

Verknöcherung der Schädelnaht: Die normale Verknöcherung beginnt an der Dura mater zugewandten Seite und folgt *nicht* dem Alles-oder-Nichts Prinzip. Teile der Naht verknöchern und Teile der Naht bleiben offen (Anderson et al., 2006, Levine et al., 1998, Slater et al., 2009, Stadler et al., 2006, Slater et al., 2008). Anhand von Ultraschalluntersuchungen normaler Schädelnähte konnte bestätigt werden, dass mit zunehmendem Alter die Knochendicke zunimmt sowie eine Annäherung der Knochenplatten mit einer Abnahme der Nahtweite einhergeht, die eine Verzahnung der knöchernen Oberflächenstruktur zeigt (Regelsberger et al., 2006b). In histologischen Aufnahmen ist in einem Alter von 3 Monaten bei glatten Knochenrändern noch eine gelenkähnlicher Aufbau der angrenzenden Knochenplatten gesehen werden, während im Alter von 12 Monaten eine beginnende Verknöcherung sichtbar wird. Klinischen Erfahrungen zeigen im Alter von 3 Monaten weitestgehend bewegliche Kalottenteile, welche mit 12 Monaten größtenteils fixiert und durch manuellen Druck nicht mehr verschieblich sind (Regelsberger et al., 2006a, Regelsberger et al., 2006b).

Kongruierend hierzu ist das Größenwachstum des Gehirns zu Beginn des Lebens stärker ausgeprägt als nach einem Jahr, wenn die Wachstumskurve abflacht. Bei Geburt wiegt das Gehirn ca. 400g und dieses Gewicht verdoppelt sich bis zum 6. Lebensmonat. Eine Verdreifachung des Gewichtes hat ungefähr nach 2,5 Jahren stattgefunden, wo es annähernd das Endgewicht des erwachsenen Gehirns erreicht hat. Dieses beträgt 1400-1600g und wird meist zwischen dem 3. und 5. Lebensjahr erreicht.



Abbildung 7 Größenzunahme des Kopfes 1= Geburt, 2= 1 Jahr, 3= 7Jahre, 4= Erwachsener (Siemens, 2010)

1.3 Kraniofaziale Anomalien

1.3.1 Kraniosynostose

Eine Kraniosynostose ist eine zu frühe Verknöcherung einer oder mehrerer Schädelnähte. Sie setzt teilweise schon vor der Geburt ein und führt zu vielgestaltigen Schädeldeformitäten, die von der betroffenen Naht abhängig sind. Sie kommt bei etwa 0,02-0,15% (Alderman et al., 1997, Cohen, 1993) aller Neugeborenen vor und wird in eine primäre und sekundäre Form unterteilt. Entscheidend ist zum einen die Anzahl der betroffenen Nähte (eine vs. mehrere) und zum anderen, ob die Verknöcherung in Verbindung mit weiteren körperlichen Auffälligkeiten/Störungen auftritt (syndromal) oder unklarer/multifaktorieller Ätiologie ist.

Die Unterteilung erfolgt in folgender Weise:

1. primäre Kraniosynostose:

- a) nur eine Naht betroffen (meist nicht-syndromal)
- b) mehrere Nähte betroffen:
 - I nicht-syndromal
 - II syndromal: Crouzon-, Apert-, Pfeiffer-, Saethre-Syndrom
- 2. sekundäre Kraniosynostose

Die sekundäre Form der Kraniosynostose hat sehr unterschiedliche Ursachen. Sie kann metabolisch bedingt sein, z.B. durch eine Hyperthyreose, bei fetaler Belastung, durch Valproinsäure oder Phenytoin, bei Mukopolysaccharidosen oder auch bei einem Mikrozephalus. Bei einem shuntpflichtigen Hydrozephalus wird angenommen, dass der Wachstumsstimulus durch fortlaufende Drainage des Hirnwasserns vermindert wird und damit für die Entstehung einer frühzeitigen Schädelnahtverknöcherung verantwortlich ist (Alden et al., 1999, Hukki et al., 2008, Kabbani and Raghuveer, 2004, Kaufman et al., 1973).

Über 150 genetische Formen der Schädelnahtsynostose sind bekannt. Eine genaue Beschreibung des Mechanismus ist jedoch wegen der Vielzahl an Wachstumsfaktoren nicht möglich. 'Fibroblast growth factor' (FGF) und 'fibroblast growth factor receptor' (FGFR) gehören zu den entscheidenden Wachstumsfaktoren, regulieren das fetale Knochenwachstum und werden an fetalen Schädelnähten exprimiert. Diese Faktoren beeinflussen wahrscheinlich die fetale Nahtdurchgängigkeit. Mutationen in den für FGFR1 kodierenden Genen führen zu dem Pfeiffer-Syndrom und Mutationen im FGFR2 führen zu einem Apert- oder Crouzon-Syndrom (Kabbani and Raghuveer, 2004).



Abbildung 8

Schematische Darstellung von bekannten und vermuteten, genetischen Faktoren, die eine Synostose verursachen können Die primär erhöhte Konzentration von FGF-2, FGF-4 und TGF-B2 führen ebenso wie eine Erniedrigung von TGF-B3 direkt und indirekt über Beeinflussung anderer Faktoren zu einer vorzeitigen Schädelnahtsynostose (Opperman, 2000)

Die nicht-syndromalen Kraniosynostosen kommen mit 80-90% weitaus häufiger vor als die syndromalen Formen (10-20%). Am häufigsten betroffen ist die Sagittalnaht (40-60%). Die Koronarnaht ist in 20-30% der Fälle betroffen und die Metopicanaht nur in weniger als 10%. Die Lambdanaht ist nur in 3:100.000 Fällen involviert. Eine geschlechtsspezifische Präferenz tritt bei der Sagittalnahtsynostose mit 4:1 (männlich : weiblich) und bei einseitiger Koronarnahtsynostose 2:3 (männlich : weiblich) auf. Bei den anderen Nähten gibt es keine Geschlechtspräferenz (Persing, 2008). Helle Hautfarbe, höheres Alter. Rauchen, Leben in größerer Höhe und eine Fertilisationsbehandlung scheinen eine Kraniosynostose begünstigen. zu Wahrscheinlich bleibt aber eine Kraniosynostose multifaktoriell bedingt (Kabbani and Raghuveer, 2004).

Durch die Verknöcherung jeder einzelnen Naht entstehen spezifische Kopfformen. Schon sehr früh konnte festgestellt werden, dass das Wachstum rechtwinklig zur verschlossenen Naht eingeschränkt ist und ein verstärktes Wachstum in Richtung der Naht auftritt (Alden et al., 1999, Persing et al., 1989). Weitere Gesetzmäßigkeiten der Verknöcherung der Schädelnähte und deren Folgen lassen sich aus heutiger Sicht formulieren:

 Zwei oder mehrere Schädelknochen, die verknöchert sind, verhalten sich wie eine einzelne Knochenplatte mit einem deutlich geringeren Wachstumspotenzial.
 Der weitere Knochenaufbau findet nicht an der betroffenen Naht statt. Ein kompensatorischer Knochenaufbau ist vorwiegend an den nicht verknöcherten Nähten zu sehen, welche die bei jedem Nahtverschluss spezifische asymmetrische Kopfform entstehen lassen.

3. Nahe der verknöcherten Naht gelegene Nähte kompensieren das Wachstum stärker als weiter entfernt liegende Nähte.

(Cohen, 1993, Delashaw et al., 1991)

Verknöchert die Metopicanaht kommt es zur Entstehung eines Trigonocephalus durch ein Knochenwachstum an den Koronarnähten nach dorsal und der Verbreiterung der Parietalknochen nach lateral sowie eines Hypotelorismus. Bei der Sagittalnahtsynostose kommt es zu einer Verdickung der Sagittalnaht und bitemporaler Annäherung mit kompensatorischem Wachstum nach ventral und dorsal und der Entstehung eines sogenannten Scaphocephalus (Kahnschädel) oder Dolichocephalus (Langschädel). Der Verschluss der bilateralen Koronarnaht führt zu einer Betonung der Front und Abflachung des occipitalen Schädels, genannt Brachycephalus (Kurzschädel). Eine bilaterale Lambdanahtsynostose ist als nicht-syndromale Form sehr selten und zeigt ein abgeflachtes Occiput. Eine einseitige Koronar- oder Lambdanahtsynostose führt zu einer Verformung des Schädels und im Falle der Kranznaht zu einer fazialen Deformität (Abbildung 9). Darüber hinaus sind Kombinationen von Schädelnahtverschlüssen beschrieben, woraus sich diverse Schädeldeformitäten ableiten (Kabbani and Raghuveer, 2004, Persing, 2008). Die Verknöcherung der Schädelnähte mit begleitender Deformierung des Gesichts- und Hirnschädels führen einerseits zu einem kosmetischen Problem, andererseits können intrakranielle Druckerhöhungen resultieren. In Abhängigkeit der verknöcherten Naht wurden Druckerhöhungen zwischen 4% (Metopicnaht) und 26% (bilaterale Koronarnaht) beobachtet. Je mehr Nähte synostiert sind, desto höher ist auch die Wahrscheinlichkeit der intrakraniellen Druckerhöhung. Da eine intrakranielle Druckerhöhung die Gehirnfunktion beeinflussen kann, besteht die Möglichkeit einer geistigen Retardierung oder Entwicklungsverzögerung, was bei 50% der Kinder mit Kraniosynostosen nachgewiesen werden konnte (Hukki et al., 2008).



Abbildung 9

Schematische Darstellung von Schädeldeformitäten nach Verknöcherung einer bestimmten Schädelnaht

1) Sagittalnahtsynostose: Verknöcherung der Sagittalnaht mit Entstehung eines sogenannten Scaphocephalus (Kahnschädel) oder Dolichocephalus (Langschädel)

2) Metopicanahtsynostoe: Verknöcherung der Metopicanaht und Entstehung eines Trigonocephalus

3) bilaterale Kranznahtsynostose: Verknöcherung beider Koronarnähte mit Entstehung eines

Brachycephalus (Kuzschädel)

4) Verknöcherung der jeweils linken Koronar- und Lambdanaht

Kinder, bei denen eine Kraniosynostose schon länger als ein Jahr besteht, haben einen signifikant geringeren Intelligenzquotienten im Vergleich mit Kindern, bei denen eine Korrektur der Schädelnahtsynostose vor dem Ende des ersten Lebensjahres vorgenommen wurde. Die Frage, ob der erhöhte intrakranielle Druck dafür ursächlich verantwortlich ist, kann wegen fehlender aussagekräftiger Studien zum heutigen Stand nicht geklärt werden (Hukki et al., 2008, Panchal et al., 2001, Persing, 2008).

Die Indikation zur operativen Korrektur einer Kraniosynostose ist zum einen von den klinischen Gesichtspunkten wie Hinweisen eines gesteigerten Hirndruckes (Papillenprominenz, vorgewölbte Fontanelle, Müdigkeit und Adynamie) als auch von kosmetischen Gesichtspunkten abhängig. Verhaltensauffälligkeiten sind im Säuglingsoder Kleinkindalter nur schwer zu objektivieren und daher sicher von untergeordneter Bedeutung. Bei den isolierten Synostosen wird ein sehr früher Operationszeitpunkt zwischen dem dritten und sechsten Monat befürwortet, um remodellierende Verfahren oder sog. Umstellungsosteotomien mit erheblichem Aufwand und Risiko zu vermeiden. Hierbei wird das betroffene Nahtsegment entweder vollständig oder zumindest im größten Anteil entfernt. Von den früher recht einheitlich durchgeführten, linearen Kraniektomien bei der Sagittalnahtsynostose ist man heute zu deutlich individuelleren Ansätzen gelangt, die auch ein okzipitales oder auch frontales bossing zu berücksichtigen Im Falle einer einseitigen versuchen. Lambdaoder Kranznahtsynostose müssen aufgrund der meist erheblichen Asymmetrie des Kopfes Umstellungen und Erweiterungen erfolgen. Eine frühe Operation bei diesen Formen macht sich zu Nutze, dass der Schädelknochen noch bis zum 12. Lebensmonat nachwachsen kann und damit die knöchernen Lücken wieder verschließen. Komplexere Synostosen, wie auch ein Verschluss der Frontal- bzw. Metopicanaht, verlangen aufwändigere Verfahren, damit längere Operationszeiten und folglich stabilere Herz-Kreislaufverhältnisse der Kinder. Daher werden solche Operationen erst später, zwischen dem 6.-9. Lebensmonat, empfohlen.

1.3.2 Lagebedingte Plagiozephalie

Plötzlicher Kindstod (SIDS; sudden infant death syndrom) ist das unerwartete und nicht erklärliche Versterben eines Säuglings oder Kleinkindes, das während des Schlafes eines Kindes vorkommt. Er tritt am häufigsten im ersten Lebensjahr auf. In den Industrienationen gilt er als häufigste Todesursache von Kleinkindern. Es existieren unterschiedliche Risikofaktoren unter anderem auch das Schlafen in Bauchlage. Aufmerksam wurde man durch Untersuchungen von Davis 1985 in Hong Kong über die chinesische Angewohnheit Kinder in Rückenlage schlafen zu lassen, bei denen die Rate des SIDS deutlich geringer war als die in den Vereinigten Staaten oder in Europa, wo die Kinder in Bauch oder Rückenlage schlafen. In den Niederlanden wurde 1987 daraufhin die erste Kampagne begonnen, Kinder ausschließlich in Rückenlage schlafen zu lassen. In den Vereinigten Staaten wurde sie vom 'National Institute of Child Health and Human Development' als "Back to Sleep" Kampagne bekannt (NICHD, 2011). Mit dieser Maßnahme konnte die Inzidenz des plötzlichen Kindstods über 50% gesenkt werden. Jedoch konnten in der Zeit von 1992-1994 sechsmal so viel lagebedingte, okzipitale Plagiozephalien registriert werden wie in den vorangegangenen 13 Jahren. Das Wort Plagiozephalie stammt aus dem Griechischen und bedeutet "schiefer Kopf". Man unterscheidet die einseitige Koronarnaht- oder Lambdanahtsynostose, die auch als (anteriore und posteriore) primäre Plagiozephalie bezeichnet wird, von der lagebedingten, sekundären Plagiozephalie. Hierbei handelt es sich um eine Schädeldeformität ohne pathologische Verknöcherung einer Schädelnaht (NSP = nicht synostierte Plagiozephalie). Eine NSP ist klinisch eindeutig von einer einseitigen Koronarnaht- oder Lambdanahtsynostose zu unterscheiden (NICHD, 2011, Kennedy et al., 2009, Schaaf et al., 2010, Skadberg et al., 1998). Die Prävalenz dieser Schädelveränderung liegt bei gesunden Neugeborenen zwischen 5-48%. Für die Entstehung der Plagiozephalie gibt es verschiedene Ursachen. Zu diesen gehören neben der SIDS-Prophylaxe mit der auf dem Rücken liegenden Schlafposition, auch der Torticollis mit Fehlhaltung des Kopfes, die zu einer komplexen muskulären und skelettalen Asymmetrie führen können. Die lagebedingte Plagiozephalie besteht häufig schon bei Geburt und kommt bei Jungen häufiger vor. Die uterine Lage (z.B. bei Mehrlingsschwangerschaften oder Fehllagen) kann zu einer Deformierung führen, die nach der Geburt durch eine Drehung des Kopfes auf die betroffene Seite noch verstärkt werden kann. Ob es daran liegt, dass der männliche Fetus nicht so flexibel ist wie der weibliche und deshalb häufiger Deformitäten aufweist, konnte bisher nicht nachgewiesen werden (Bridges et al., 2002, Hukki et al., 2008, Joganic et al., 2009, Saeed et al., 2008).

Entscheidend für das therapeutische Vorgehen ist die Differenzierung der primären Plagiozephalie (z.B. einseitigen Lambdanahtsynostose) von der sekundären, lagebedingten Plagiozephalie. Die klinische Beurteilung wird mit dem Blick von oben auf den Kopf des Kindes vorgenommen. Dabei zeigt die Kraniosynostose eine dreieckige Schädelform, während die lagebedingte Plagiozephalie ein Parallelogramm darstellt. Dieses entsteht aus der einseitigen Abflachung des Hinterkopfes mit gleichseitiger Vorverschiebung der Stirnregion. Zusätzlich sieht man eine Vorverlagerung des Ohres der betroffenen Seite (Abbildung 10).

Eine faziale Asymmetrie ist bei 50% der Kleinkinder zu sehen und vom Ausmaß und Lokalisation der Plagiozephalie abhängig (Losee et al., 2005).



Abbildung 10

Unterschiede der lagebedingten (sekundären) Plagiozephalie (links) und einer einseitigen, rechtsseitigen (primären) Lambdanahtsynostose (rechts)

Die Kraniosynostose zeigt eine dreieckige Schädelform, die Plagiozephalie ein Parallelogramm. Dieses entsteht aus der einseitigen Abflachung des Hinterkopfes mit gleichseitiger Vorverschiebung der Stirnregion. Eine Vorverlagerung des Ohres der betroffenen Seite ist ebenfalls dargestellt. (Kabbani and Raghuveer, 2004)

Einer klinischen Klassifizierung nach Argenta entsprechend lässt sich das Ausmaß der Plagiozephalie in fünf Typen der einseitigen occipitalen Plagiozephalie unterscheiden. Typ I entspricht einer isolierten, einseitigen Abflachung des Hinterkopfes. Typ II ist zusätzlich von einer ipsilateralen Vorverlagerung des Ohres und Typ III von einer Protrusion der Stirn der betroffenen Seite gekennzeichnet. Die Typen IV und V lassen Asymmetrien des Mittelgesichtes sowie kompensatorische Deformitäten hoch-okzipital oder temporal erkennen. Diese Einteilung hat sich in der täglichen Praxis durch ihre einfache Handhabung bewährt und ermöglicht eine zuverlässige Einordnung der Kopfdeformität bei der lagebedingten Plagiozephalie (Argenta et al., 2004).



Abbildung 11

Klinische Klassifikation der einseitigen, okzipitalen, lagebedingten Plagiozephalie

Typ I nur Abflachung des Hinterkopfes, Typ II mit ipsilateraler Vorverlagerung des Ohres, Typ III mit Bossing der Stirnregion, Typ IV mit Gesichtsasymmetrie und Typ V mit Protuberanz der kontralateralen Okzipitalregion. (Argenta et al., 2004)

Bei der lagebedingten Plagiozephalie konnte ebenfalls, wie auch bei der primären Kraniosynostose, eine verlangsamte kognitive und psychomotorische Entwicklung festgestellt werden. Sekundäre Fehlentwicklungen sind eine Veränderung des Muskeltonus an Hals und Kopf und folglich auch Fehlhaltungen des gesamten Körpers. Klinische Zeichen wie Nackensteifigkeit, Skoliosen und Beckenschiefstellungen können dann in Erscheinung treten. Es erscheint wichtig, sehr frühzeitig präventive Maßnahmen zu ergreifen, die der Asymmetrie effektiv entgegenwirken. Vorrangig hierbei ist die Dauer der Bauchlage eines Kindes ("tummy time"), um die Muskulatur im Nacken-, Schulter-, Rücken- und oberen Armbereich zu stärken. Eine Verbesserung der motorischen Fähigkeiten konnte nicht nur bei Kindern mit einer Plagiozephalie, sondern auch bei Kindern ohne Schädeldeformität nachgewiesen werden.

In der Literatur werden drei Therapieformen bei Kindern mit lagebedingter Plagiozephalie diskutiert; die Physiotherapie, die Helmtherapie und die Operation.

Die physiotherapeutischen Maßnahmen mit aktiven Übungen zur Stabilisierung der Nacken- und Halsmuskulatur, sowie Lagerungstechniken des Kopfes helfen die eigenständige Normalisierung der Kopfdeformität, die in 80% bis 90% der Kinder bis zum Alter von 1,5 bis zwei Jahren durch das eigene Kopfwachstum auftreten, zu unterstützen (Hukki et al., 2008, Hutchison et al., 2003, Lipira et al., 2010, McGarry et al., 2008, Pollack et al., 1997). Je früher diese Maßnahmen ergriffen werden, desto größer erscheinen die Erfolgsaussichten (Jones, 2004, Kennedy et al., 2009, Miller and Clarren, 2000, Panchal et al., 2001, Stucker, 2009).

Als weitere Option besteht die Therapie mit einem Helm als passive Unterstützung zur Normalisierung der Kopfform auf natürliche Weise. Hierbei ist der Beginn der Therapie (vor dem 6. Lebensmonat) von entscheidender Bedeutung, um den natürliche Remodellingsprozess mit Größenwachstums des Gehirns während der ersten 12 Lebensmonate auszunutzen, da das Größenwachstum des Gehirns und des Schädels sich nach Beendigung des ersten Lebensjahres deutlich verlangsamt. Ab dem 12. Lebensmonat ist kein Nutzen der Helmtherapie mehr zu erkennen. Die Festigkeit der Schädelkalotte nimmt zu und auch die Beweglichkeit des Kindesschädels für eine passive Formgebung ist eingeschränkt. Nachteile der Helmtherapie sind die lange Tragedauer von ca. 22 Stunden am Tag und die Dauer der Therapie von zwei bis sechs Monaten (Saeed et al., 2008), obgleich der Helm in der Regel gut von den Kindern toleriert wird. Die hohen Kosten für den Helm (zwischen 1000 und 2500 €) und die wiederholten Kontrolluntersuchungen sind weitere Kritikpunkte dieser Methode. Nebenwirkungen wie Hautallergien und Druckstellen treten selten auf.

Im Gegensatz zur Helmtherapie steht die Operation. Gegen eine Operation spricht die Annahme, dass es sich sehr wahrscheinlich nicht um eine Naht- oder Schädelpathologie im eigentlichen Sinne handelt und die möglichen Risiken und Komplikationen einer Operation vermieden werden sollten (Pollack et al., 1997, David and Menard, 2000). Eine Operation wird daher nur bei sehr ausgeprägten Formen befürwortet, da meist kosmetische Aspekte zu Grunde liegen.

Die Frage des richtigen Therapiekonzeptes ist noch nicht abschließend geklärt. Es existieren länderspezifische Unterschiede bei der Therapiegestaltung. In den skandinavischen Ländern und in England wird ein konservatives Therapiekonzept mit physiotherapeutischen und lagerungstechnischen Maßnahmen bevorzugt, während in den USA die Helmtherapie den Vorzug bekommt (Hukki et al., 2008, Saeed et al., 2008). Lipira und Xia konnten eine höhere Reduktion der Schädeldeformität mit der Helmtherapie als mit alleinigen physiotherapeutischen Maßnahmen zeigen. Hierfür sind weitere größere Untersuchungszahlen und exaktere Definitionen einer Asymmetrie bzw. des Behandlungserfolges sind erforderlich, um dies zu bestätigen (Lipira et al., 2010, Xia et al., 2008).

23

Für die bestmögliche Therapie ist eine exakte Diagnostik einer Schädeldeformität und ihrer Ursache wichtig. Obligat ist der Ausschluss einer einseitigen Kraniosynostose vor Beginn einer Therapie, um die hierbei eindeutige Operationsindikation nicht zu übersehen. Das jeweilige Therapiekonzept sollte individuell aus einem der drei Elemente oder einer Kombination zusammengestellt werden.

1.4 Unterschiede primärer Kraniosynostosen und lagebedingter Plagiozephalien

Die Mehrzahl der Informationen über den Schädelnahtaufbau stammt aus histologischen Untersuchungen an Tiermodellen, vor allem von Mäusen und Ratten (Ogle et al., 2004, Persson et al., 1978, Stadler et al., 2006). Untersuchungen von menschlichen Schädelnähten sind dagegen selten. Aktuellere Untersuchungen verwenden die Computertomographie und Ultraschalldiagnostik, um den Aufbau der gesamten Schädelnaht und nicht nur Ausschnitte der menschlichen Schädelnähte zu untersuchen (Furuya et al., 1984a, Furuya et al., 1984b, Losee et al., 2005, Regelsberger et al., 2006a, Regelsberger et al., 2006b). Mikro-Computertomographieuntersuchungen sind hauptsächlich an Schädelnähten von Mäusen durchgeführt (Anderson et al., 2006, Recinos et al., 2004, Stadler et al., 2006).

Gesamthaft kann festgehalten werden, dass gesunde Schädelnähte aus zwei Knochen(kanten) und einem dazwischenliegenden bindegewebigen Anteil bestehen. Die Untersuchungen der gesamten Naht zeigen Verzahnungen der Knochenkanten (Anderson et al., 2006, Rice, 2008), die histologisch als Osteoblastenansammlungen vor allem im Übergangsbereich der knöchernen und bindegewebigen Anteile identifiziert werden konnten (Cohen, 1993). Computertomographieuntersuchungen von Kraniosynostosen mit Darstellung der gesamten Schädelnaht zeigen teilweise verknöcherte und verschlossene Schädelnähte. Komplette Verknöcherungen konnten nicht gesehen werden. Ausgehend ist die Verknöcherung häufig von der endokraniellen, dura mater zugewandten Seite. Der Einfluss der Dura mater auf die normale Schädelnahtverknöcherung ist in diversen Tiermodellen gezeigt (Anderson et al., 2006, Gagan et al., 2007, Levine et al., 1998, Ogle et al., 2004, Opperman, 2000, Rice, 2008, Rice and Rice, 2008, Slater et al., 2008, Slater et al., 2009, Warren et al., 2003b). Diese Hinweise deuten darauf hin, dass eine Verknöcherung an einem Punkt beginnt und sich über die Naht ausbreitet (Cohen, 1993, Recinos et al., 2004, Stadler et al., 2006). Abhängig von der Lokalisation der Kraniosynostose konnten in präoperativ durchgeführten CT-Untersuchungen Unterschiede der Schädelnaht gesehen werden. Bei Sagittalnahtsynostosen werden Verdickungen und Aufwallungen der Knochenkante beobachtet, während bei der Metopicanahtsynostose lokale Verdichtungen mit zusätzlichen Erosionen gesehen werden. Bei der Lambdanahtsynostose fallen neben der Naht gelegene Sklerosierungen auf und an der verknöcherten Kranznaht sind keine derartigen Auffälligkeiten beschrieben (Furuya et al., 1984a). Diese Auffälligkeiten sind

25

lediglich in Untersuchungen mit geringer Stückzahl durchgeführt worden. Große Studien fehlen hier, um solche Unterschiede auch sicher und signifikant den unterschiedlichen Schädelnähten zuzuordnen.

CT-Untersuchungen von NSP zeigen Überlappungen der Knochenkanten, während Knochenannäherung, Sklerosierung, endokranielle Verdickung und lokale Verknöcherung nur in wenigen Proben zu sehen waren (Losee et al., 2005). Typischerweise präsentieren sich die Schädelnähte der lagebedingten Plagiozephalien in Röntgen, Computertomographie oder Ultraschalluntersuchungen als offene Nähte, ähnlich der gesunden Schädelnähte (David and Menard, 2000, Pollack et al., 1997).

1.5 Diagnostik der kraniofazialen Deformitäten heute

Die Diagnostik der kraniofazialen Deformitäten stützt sich auf die klinische Untersuchung und Anamnese, die Röntgen-Nativ Aufnahmen, die Sonographie, die kraniale CT (CCT), die MRT und die 3-dimensionale Stereo Photogrammmetrie. Die Diagnostik soll zuverlässige Aussagen über die Beschaffenheit der Schädelnähte, Veränderungen der Schädelknochen, Anomalien oder Aplasien des Gehirns oder syndromale Veränderungen möglich machen.

Bei weniger stark ausgeprägten Deformitäten und nicht eindeutiger Kopfform waren bislang Röntgen-Nativ Aufnahmen als erste diagnostische Untersuchung selbstverständlich. Die Aufnahmen sind meist ausreichend zum Nachweis einer Nahtsynostose, jedoch mit einer deutlich geringeren Sensitivität im Vergleich zum CCT (David and Menard, 2000, Furuya et al., 1984a, Pollack et al., 1997).

Beim Verdacht einer Kraniosynostose oder einer syndromalen Kraniosynostose ist ein CCT als diagnostisches Mittel und zwecks chirurgischer Interventionsplanung unerlässlich. Sie gilt als sensitivste Methode zur Beurteilung der kraniofazialen Anomalien (Vu et al., 2001). Allerdings muss hierbei die hohe Strahlenbelastung beachtet werden. Zur Beschreibung des Schädelnahtaufbaus ist diese Methode jedoch nicht aussagekräftig genug, obgleich sie deutlich sensitiver als Röntgenaufnahmen ist und die Beurteilung der gesamten Naht möglich macht (Furuya et al., 1984a, Losee et al., 2005, Ozaki and Buchman, 1998).

Das MRT und die Ultraschallsonographie stehen als diagnostische Methoden ohne Strahlenbelastung zur Verfügung. Das MRT ist im Vergleich zum CCT in der Diagnostik knöcherner Deformitäten unterlegen und hat seinen besonderen Stellenwert jedoch in der Diagnostik von zerebralen Malformationen und bei syndromalen Formen der Kraniosynostose. Die andere nicht strahlenbelastende Variante, die sich als geeignetes diagnostisches Verfahren erwiesen hat, ist die Nahfeld-Sonographie. Knochen und Weichteilgewebe können mit diesem Verfahren sehr genau differenziert werden, eine Verknöcherung sicher erkannt und auch die Länge des fusionierten Knochenteils exakt bestimmt werden. Weitere Gründe für den Einsatz von Ultraschall in der Diagnostik von kraniofazialen Anomalien ist die günstige und leicht zu handhabende Anwendbarkeit dieses Verfahrens. Mittlerweile sollte sie als Standard in der Diagnostik der kraniofazialen Deformitäten verstanden werden, da eine sichere Diagnosestellung einer Kraniosynostose möglich ist (Regelsberger et al., 2006a, Regelsberger et al., 2006b).

Ein neueres Verfahren ist die 3-dimensionale Photogrammmetrie. Sie kommt ebenfalls ohne Strahlenbelastung aus und formiert aus einzelnen Fotographien ein 3-dimensionales Bild.

Dieses Verfahren ist besonders für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgen in Hinblick auf die komplexe Operationsplanung interessant. In der Diagnostik der kranialen Deformitäten kann dieses Verfahren genutzt werden, um Abbildungen des gesamten Kopfes und der Kopfform zu erstellen. Für eine genauere Untersuchung des Schädelnahtaufbaus sind die entstehenden Bilder jedoch nicht aussagekräftig genug, da die zu untersuchende Schädelnaht nicht exakt genug abgebildet werden kann (Heike et al., 2010, Lipira et al., 2010, Schaaf et al., 2010).

2. Material und Methoden

2.1 Patienten und Methoden

Zwischen 2004 und 2007 wurden im Rahmen von Operationen in der Neurochirurgie oder aus der Rechtsmedizin des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Schädelnähte von insgesamt 8 Patienten im Alter von 3 bis 12 Monaten entnommen. Die therapeutische Entnahme der Schädelnahte erfolgte bei 5 Patienten im Rahmen einer Operation aufgrund einer Sagittalnahtsynostose und bei einem Patienten aufgrund einer schweren Kopfdeformität. Bei diesen Patienten wurden zusätzlich zu den erkrankten Schädelnähten, intraoperativ aus den benachbarten, gesunden Nähten kleine Knochen-/Schädelnahtelemente entnommen. Bei 2 Patienten, die aufgrund eines SIDS verstorben waren, wurden weitere Schädelnähte entnommen. Die Aufteilung der 11 Schädelnähte ist wie folgt:

- 3 Sagittalnahtsynostosen
- 7 gesunde Schädelnähte (Kranz-, Sagittal- und Lambdanaht)
- 1 lagebedingte Plagiozephalienaht

Alle Präparate wurden einerseits histologisch und andererseits mittels Computertomographie (entweder Mikro-Computertomographie (**mCT**) oder Mikro-Computertomographie unter Verwendung von Synchrotronstrahlung (**SR** μ **CT**)) im Hinblick auf den Aufbau und die Mikroarchitektur untersucht. Zusätzlich wurden bei den mittels SR μ CT untersuchten Proben, die Knochendichte anhand von Grauwerten bestimmt.

Proben von Schäo	lelnähten	Patienten mit	
pathologisch	3	Saggitalnahtsynostose	5
gesund	7	SIDS	2
Plagiozephalie	1	Plagiozephalie	1
insgesamt	11 Schädelnähte	insgesamt	8 Patienten

Tabelle 1Aufteilung der Schädelnähte

Alle 11 pathologischen Schädelnähte wurden histologisch untersucht und ebenfalls in 3 Gruppen eingeteilt:

- pathologische Schädelnähte
- gesunde Schädelnähte
- lagebedingte Plagiozephalienaht (NSP)

9 von 11 Proben wurden mittels einer Mikro-Computertomographiemethode (mCT oder SRµCT) untersucht. Ein spezielles mit Synchrotronstrahlung ausgestattetes Mikro-CT (SRµCT) wurde bei 6 Proben und ein "herkömmliches" Mikro-CT (Skyscan, Schweiz, mCT) für weitere 3 Proben verwendet. Die Untersuchungen beider Mikro-CT-Verfahren stellen die komplette Naht dar. Zur Auswertung wurden insgesamt 58 computergefertigte Schnittbilder erstellt. 50 % der Schnittbilder entstammen von der Plagiozephalienaht (29/58), weitere fast 25 % (14/59) von gesunden Schädelnähten und 15 Bilder (25 %) von pathologisch, verknöcherten Nähten. Anhand dieser Bilder wurde die Morphologie und der Knochenaufbau beurteilt. Für die Untersuchung der Knochendichte konnten lediglich die mit dem SRµCT gemessenen Schädelnähte verwendet werden. 25 computergefertigte Schnitte wurden hierfür gefertigt insgesamt 191 Grauwertmessungen durchgeführt. Entsprechende und Grauwertmessungen und eine indirekte Bestimmung der Knochendichte wurden bei Schädelnähten bisher nicht beschrieben. Demzufolge existiert kein definierter Normbereich für Schädelnähte.

	Anzahl	CT Diagnostik	SRµCT	mC T	Histologie	CT Bilder	Grauwert- messungen
Pathol. SN	3	3	2	1	3	15	72
gesunde SN	7	5	3	2	7	14	80
NSP	1	1	1	0	1	29	39
	11	9	6	3	11	58	191

 Tabelle 2

 Anzahl der untersuchten Schädelnähte mit den verschiedenen Methoden

 SN=Schädelnaht

Für die Grauwertmessung wurden Rechtecke vordefinierter Größe in einem Abstand von jeweils 0,2mm, 0,4mm, 0,6mm und 0,8mm entfernt von der Naht durch den Knochen gelegt. Computergesteuert wurden lediglich die Grauwerte in den knöchernen Elementen bestimmt. Allen Grauwerten werden Werte von 0 bis 255 zugeordnet und mit der Einheit U versehen. Bei unseren Proben lagen die Grauwerte der knöchernen Anteile zwischen 132 und 211 U. Zum Vergleich der Schädelnähte wurden 3 Gruppen gebildet:

- a) gesunde Nähte
- b) pathologische Schädelnähte
- c) lagebedingte Plagiozephalie



Abbildung 12

Schematische Darstellung einer Schädelnaht und Anfertigung der computergefertigten Schnitte

Die Patientenaufklärungen sowohl operativ als auch aus der Rechtsmedizin liegen ordnungsgemäß vor.

2.2 Methodenbeschreibung der histologischen Untersuchung

11 Proben wurden zunächst mittels 4-prozentiger Formaldehydlösung fixiert, anschließend mit flüssigem Paraffin entwässert und imprägniert, danach das Gewebe in Paraffin oder Kunststoff eingebettet und abschließend Paraffinblöcke hergestellt. Mittels eines Mikrotoms wurden zwei Teile erstellt, einerseits für die histologische Untersuchung und der andere angrenzende Teil für die Untersuchung im Mikro-CT. Um eine Unterscheidung zwischen gut und weniger gut mineralisiertem (Osteoid) Knochen treffen zu können und die Knochenstruktur in Kontrast setzen zu können, wurden die Schnitte nach Toluidin oder Giemsa gefärbt.

2.3. Methodenbeschreibung der Mikro-Computertomographie

Am "Hamburger Synchrotronlabor" (HASYLAB) des "Deutschen Elektronen Synchrotron", Hamburg, das in Kooperation mit dem "GKSS-Forschungszentrum Geesthacht" arbeitet, erfolgte die Untersuchung von 6 Proben mit der SRµCT. 3 weitere Proben haben wir am Universitätsspital Basel am Lehrstuhl von Prof. Dr. Bert Müller in der Schweiz mit der Mikro-Computertomographie mit einer konventionellen Röntgenröhre (mCT) untersucht.





Abbildung 13 Mikro-Computertomographie unter Verwendung von Synchrotronstrahlung (SRμCT) Oben schematische Aufbau des SRμCT, unten: links: gesamtes SRμCT an der DESY, rechts: Einsicht in das SRμCT bei Reparaturarbeiten (Beckmann et al., 2006)

Grundsätzlich ist das Prinzip der Computertomographie seit der Erfindung 1971 von Hounsfield gleichgeblieben. Sie nimmt eine Auswertung einer Vielzahl von Röntgenbildern vor, die mittels Röntgenstrahlung erstellt werden. Röntgenstrahlung entsteht durch zwei verschiedene Vorgänge: zum einen durch eine Geschwindigkeitsänderung von geladenen Teilchen Strahlung (meistens Beschleunigung von Elektronen) und zum anderen durch hochenergetische Übergänge in den Elektronenhüllen von Atomen oder Molekülen. Beim Schießen von Elektronen auf eine Metallplatte entsteht durch das Abbremsen der Elektronen eine kinetische Energie, die zur Erzeugung von Röntgenstrahlung verwendet wird. Dieser Effekt wird der Bremsstrahlung genannt. Bei Teilchenbeschleunigern (vor allem beim Synchrotron) und bei Speicherringen wird bei der Ablenkung von geladenen Teilchen durch ein Magnetfeld Bremsstrahlung frei, die in diesen Zusammenhängen Synchrotronstrahlung genannt wird.

Die Mikro-Computertomographie ist ein dreidimensionales Röntgenverfahren, das in ähnlicher Weise wie die Computertomographiegeräte in der Klinik arbeitet, jedoch in einer kleineren Maßeinheit mit einer sehr viel höheren Auflösung. Es repräsentiert damit die 3-D-Mikroskopie mit der sehr kleine, feine Strukturen von Objekten zerstörungsfrei dargestellt werden können. Eine Präparation, Färben oder Zuschneiden der Präparate ist meistens nicht notwendig, sodass die gesamte Probe mit einem einzigen Scan in einer 3-D-Abbildung dargestellt wird. Zusätzlich ist die Probe nach der Messung unversehrt und kann für weitere Diagnostik genutzt werden.

Eine Mikro-Röntgenstrahlenquelle durchleuchtet das Objekt von allen Seiten und ein planarer Röntgendetektor sammelt die vergrößerten Projektionen. Während eines Scans findet eine Serie von Röntgenabsorptionsmessungen statt, die benutzt werden, um danach ein 3-D-Bild eines Untersuchungsobjektes zu rekonstruieren. Im Gegensatz zur medizinischen Computertomographie wird die Probe und nicht die Röntgenröhre und der Detektor gedreht, um hunderte von Winkeln vermessen zu können. Nach Rekonstruktion der Datensätze kann durch das Objekt gescrollt und die inneren Strukturen können angesehen werden.

Bei der mCT gibt es unterschiedliche Geräte, die ihre Stärken in verschiedenen Bereichen wie der hohen Auflösung, dem hohen Energieeinsatz oder dem Einsatz bei lebenden Präparaten haben. Um den Aufbau der Schädelnähte und damit feine Strukturen zu untersuchen, wurde ein SkyScan 1172 benutzt, das sich durch seine hohe Auflösung auszeichnet. Die Vorteile der 3-D-CT-Messung sind die Erzeugung eines Volumenmodells, kurze Messzeiten, kostengünstige Messungen, Benutzerfreundlichkeit und eine gute Zugänglichkeit. Nachteile dieser Methode sind, dass das Objekt von allen Seiten durchstrahlt werden muss, was technisch aufwändig ist. Zwei weitere nicht zu vernachlässigende Nachteile der Röntgenröhren sind der geringere Fluss (Anzahl der erzeugten Röntgenphotonen) und das breite Spektrum der Röntgenstrahlung. Die im Objekt gemessene Schwächung ist stark energieabhängig und führt durch das breite Spektrum der

34

Röntgenstrahlung dazu, dass es zu Überlagerungen vieler Effekte kommt und dadurch die Abbildungen verfälscht werden können.

Diese Limitationen können mit einer SRµCT umgangen werden. Die SRµCT wird schon seit den 1980er Jahren genutzt und heutzutage existieren ca. 40 Synchrotronstrahlung-Laboratorien weltweit. Bei diesem Verfahren wird eine monochromatische Strahlung benutzt, bei der die unerwünschten Photonenenergien absorbiert oder abgelenkt werden, wobei trotzdem etwa 1000fach bis 10.000fach mehr Intensität für die Untersuchung übrig bleibt. Die Strahlenaufhärtung, wie sie bei der konventionellen Röntgenröhre (mit Verwendung von polychromatischer Strahlung) auftritt, wird durch die Verwendung monochromatischer Röntgenstrahlung vollständig verhindert. Bei der polychromatischen Strahlung werden auf dem Weg durch das Objekt die niedrigen Energien stärker absorbiert als die höheren. Das Objekt wirkt somit selbst als Filter. Dieses Abfiltern führt bei der Computertomographie insbesondere bei tieferer Gewebeeindringung vermehrt zu Artefakten, die sich vom Rand zum Inneren einer Probe als scheinbare Dichteabnahmen bemerkbar machen. Zusätzlich wird mit dem SRµCT eine Kollimation, Parallelrichtung der Strahlen, erreicht, was eine Vereinfachung in der Rekonstruktion und Implementierung der Daten sowie schnelleren und exakteren Messungen mit sich bringt. Bei unseren Aufnahmen wurde mit einer Photonenenergie von 18-21keV gearbeitet und es wurde eine minimale räumliche Auflösung von 7,3 μm erreicht. Nach der Rekonstruktion wurden 2- und 3-dimensionale Abbildungen in Hinblick auf die knöchernen Strukturen und morphologischen Charakteristika analysiert. Untersucht wurden dabei die knöchernen Kanten der Naht sowie die weiter entfernt liegenden knöchernen Abschnitte in Bezug auf ihre Knochendichte. Die Knochendichte wird dabei anhand von Graustufen bewertet und mit der Einheit U versehen.
3 Ergebnisse

3.1 Histologische Befunde der offenen und pathologischen Schädelnähte

Der histologische Aufbau der *gesunden Nähte* besteht aus einem Knochengerüst mit ausgereifter lamellärer Schichtung und vollständig ausgebildeten Osteonen. Im Knochengerüst sind Areale mit Faserknochenneubildung zu erkennen. Superfiziell beidseitig kommt ein weniger ausgereifter, faserig strukturierter Knochen zur Darstellung. An der Grenzzone zum Fibrosegewebe der Sutura sieht man einen Faserknochen mit breiteren zur Oberfläche hin senkrecht verlaufenden Kollagenfasern, die an sog. Sharpey-Fasern, die normalerweise im Bereich der Zahnwurzel eine federnde Befestigung mit dem Knochen bilden, erinnern. Es lässt sich eine gewisse Überbrückung der Nahtspalte zwischen den benachbarten Knochen durch die Kollagenfasern erahnen.



Abbildung 14

Histologischer Querschnitt einer gesunden Sagittalnaht

Das Knochengerüst mit ausgereifter lamellärer Schichtung und vollständig ausgebildeten Osteonen ist zu sehen. Zwischen den Knochnerändern sieht man den bindegewebigen Anteil der Schädelnaht. 10 fache Vergrößerung, Giemsa Färbung

Bei den *pathologischen Nähten* ist übereinstimmend in den tiefen Schichten ein ausgereifter, lamellär strukturierter Faserknochen mit parallel verlaufenden und untereinander vernetzten Knochentrabekeln und oberflächlich eine Faserknochenneubildung bei fehlendem Nachweis eines Besatzes durch aktivierte Osteoblasten zu erkennen. Teilweise ist eine Nahtspalte zu erkennen und teilweise ein durchgehendes knöchernes Gewebe (Kraniosynostose). Am Knochen-/Fibroseübergang lassen sich keine Osteoblasten nachweisen, was auf eine desmale Ossifikation hindeutet.



Abbildung 15

Histologischer Querschnitt einer pathologisch verschlossenen Sagittalnahtsynostose

Sichtbar ist der knöcherne Übergang an der intrakraniellen Seit der Schädelnaht und einem zur extrakraniellen Seite hin noch nicht endgültig verschlossenen Schädelnahtanteil 10 fache Vergrößerung, Toluidin Färbung

a contraction of the second seco

Abbildung 16

Histologischer Querschnitt einer Sagittalnahtsynostose mit offenen Schädelnahtanteil

a) und b) zeigen den offenen Anteil einer Schädelnaht, jedoch mit typischen Veränderungen der pathologischen Schädelnaht. In beiden Abbildungen ist ein lamellär strukurierter Faserknochen mit parallel verlaufenden und untereinander vernetzten Knochentrabekeln, sowie eine Verdickung der Knochenenden im Bereich der Schädelnaht zu sehen.

a) 10 fache Vergrößerung, Giemsa Färbung, b) 10 fache Vergrößerung, Toluidin Färbung

In der Übersichtsaufnahme der *Plagiozephalienaht* (Abb. 17) erkennt man eine querverlaufende fibröse Schicht in der Kalotte mit einem kompakten ossären Rand. Das Fibrosegewebe der Naht weist keinen Kontakt zur Spongiosa auf. Bei weiterer Vergrößerung erkennt man breite, in die Sutura hinein strahlende Fibrosefasern.

Der Knochen besteht bei gesunden wie auch pathologischen Nähten aus einem lamellären Aufbau. Im Knochen sieht man regelmäßig verteilte Osteozyten. Faserknochen kann im Bereich der Sutura gesehen werden. An der Knochenoberfläche können Osteoblasten gesehen werden. In der fibrösen Nahtschicht sind sowohl Arteriolen als auch Venen zu erkennen.



Abbildung 17

Histologischer Querschnitt einer lagebedingte Plagiozephalienaht

Sichtbar ist die querverlaufende fibröse Schicht in der Kalotte mit einem kompakten ossären Rand. Die Schädelnaht ist nicht verschlossen und zeigt eine Diploeverdickung. 10 fache Vergrößerung, Giemsa Färbung

38

3.2 Beurteilung der Morphologie aller Schädelnähte anhand der Mikro-CT (Skyscan) und der SRµCT

Bei der Untersuchung der Morphologie mittels Computertomographie wurde keine Trennung der beiden CT-Verfahren vorgenommen, da die Aussagekraft über den Nahtaufbau bei beiden Verfahren vergleichbar ist. Die insgesamt 58 Computertomographiebilder entstammen von drei pathologischen, fünf gesunden und einer Plagiozephalienaht. Dabei wurden die pathologischen Nähte (Sagittalnahtsynostosen), die lagebedingte Plagiozephalie mit Affektion der Lambdanaht und die gesunden Nähte (Kranznaht links und rechts, zwei Sagittalnähte und eine Lambdanaht links) mit einbezogen. Die Einteilung erfolgte in drei Gruppen:

- a) gesunde Schädelnähte
- b) pathologische Schädelnähte
- c) lagebedingte Plagiozephalienaht

Die *gesunden Schädelnähte* präsentieren sich als gelenkartige Knochenplatten. Sie zeigen keine Interdigitationen oder Verknöcherungen und haben keine kalzifizierenden Faserstränge. Die Knochenenden liegen entfernt voneinander, zeigen jedoch ausgeprägte Überlappungen und ausgeprägte Verzahnungen. Verdickungen der Schädelknochen im Bereich der Schädelnaht können gesehen werden.



Abbildung 18

Mikro-CT Bild (Skyscan) einer gesunden Sagittalnaht

Die Schädelnaht zeigt keine Verknöcherung oder Verzahnung der Schädelnaht. Die Knochenenden sind schmal ohne Diploeverdickung.



Abbildung 19

SRµCT einer gesunden rechten Kranznaht

Die Schädelnaht zeigt keine Verknöcherung. Die Verzahnung und Überlappung der Schädelnahtknochen ist zu erkennen.



Abbildung 20 Mikro-CT Bild (Skyscan) einer gesunden linken Lambdanaht Die Schädelnaht zeigt keine Verknöcherung, jedoch eine ausgeprägte Verzahnung. Die *pathologischen Nähte* zeigen Anteile einer komplett verknöcherten Schädelnaht, sowie offene Anteile einer Schädelnaht. Die Schädelnaht ist im Bereich der Verknöcherung verdickt. Die Verknöcherung geht in der anterioren-posterioren Achse von einem Punkt aus und zeigt in den offenen Anteilen keine pathologischen Morphologien. In den Bereichen der offenen Anteile können keine Schädelnahtverdickungen gesehen werden. Der Ursprung der Verknöcherung von innen (dura-seitig) oder außen kann nicht eindeutig definiert werden. Komplette Verknöcherungen oder Knochenbrücken mit beginnender Verknöcherung sind dura-seitig oder auch ektokraniell zu beobachten. Überlappungen der Knochenränder sind zu sehen, jedoch ausgeprägte Verzahnungen eher seltener.



Abbildung 21 SRµCT einer Sagittalnahtsynostose

Die Schädelnaht zeigt in diesem Abschnitt keine durchgehende Verknöcherung. Die Knochenbrücken zeigen jedoch eine beginnende Verknöcherung an. Eine deutliche Verzahnung der beiden Knochenende liegt nicht vor.



Abbildung 22

SRµCT Bild (oben) und mCT Bild (unten) einer Sagittalnahtsynostose

Ein durchgehender knöcherner Übergang ist in beiden Bildern zu erkennen. Der Beginn der Verknöcherung kann von der intrakraniellen Seite (oben), sowie der extrakraniellen Seite (unten) ausgehen. Eine Diploeverdickung im Nahtbereich ist bei beiden Synostosen zu erkennen.

Die *lagebedingte Plagiozephalie* einer Lambdanaht präsentierte sich mit einem offenen Nahtbereich und einer ausgeprägten Verzahnung der Knochenränder. Interdigitationen oder Knochenbrücken konnten nicht gesehen werden. Eine Verdickung des Knochens ist im Nahtbereich sichtbar. Hinweise auf eine pathologische Nahtmorphologie sind nicht zu erkennen.



Abbildung 23

SRµCT einer lagebedingten Plagiozephalie (betroffene Seite der Lambdanaht)

Die ausgiebige Verzahnung ist deutlich zu erkennen. Knochenbrücken sind in der Übersichtsaufnahme (oben), wie auch in der vergrößerten Ansicht (unten) nicht zu sehen. Im oberen Bild ist die Diploeverdickung angedeutet.



Abbildung 24 SRµCT einer lagebedingten Plagiozephalie (betroffene Seite der Lambdanaht) Die Diploeverdickung im Bereich der Schädelnaht ist zu sehen. Unterschiede des in der Naht enthaltenen Bindegewebes kann weder mit dem SR μ CT noch mit dem mCT beurteilt werden.

	gesunde SN	pathologische SN	NSP
Offene SN	+	-	+
Verzahnung	+/-	-	+
Überlappung der Ränder	+	+/-	+
Knochenbrücken	-	+	-
Verknöcherung	-	+	-
Diploeverdickung	-	+	+

Tabelle 3

Auflistung der Eigenschaften der gesunden und pathologischen Schädelnaht, sowie der lagebedingten Plagiozephalie (NSP), SN = Schädelnaht

3.3 Knochendichtemessung mittels SRµCT

Neben der morphologischen Untersuchung wurden mit dem SRµCT Grauwerte des Knochens bestimmt, die eine Korrelation mit der Knochendichte und deren knöcherner Aktivität erlaubt. Untersucht wurden zwei pathologischen Sagittalschädelnähte, drei gesunde Nähte und die lagebedingte Plagiozephalie (Lambdanaht).

In der Abbildung 25 a) sind die gesunden Schädelnähte dargestellt. An der Schädelnaht-/Knochengrenze (Bereich 1) sind die niedrigsten Knochendichtewerte zu erkennen. Die höchste Knochendichte findet man in den mittleren Bereichen von 0,4mm bis 0,6mm lateral von der Naht (Bereiche 2 und 3). Die durchschnittlichen Knochendichtewerte in allen Bereichen erstrecken sich bei den gesunden Schädelnähten von 158 bis 176 U.

In derselben Abbildung sind unter b) die pathologisch verschlossenen Schädelnähte ausgewertet. Im Bereich der Schädelnaht von 0,2mm bis 0,6mm lateral der Naht (Bereiche 1-3) sind die höchsten Knochendichtewerte zu verzeichnen. Ausgehend von der Schädelnaht fallen die Knochendichtewerte nach lateral hin ab. Insgesamt sind die Durchschnittswerte der Knochendichte im Bereiche 1-3 überdurchschnittlich hoch, wenn man die Werte der gesunden Schädelnähte als Norm annimmt.

Unter dem Punkt c) ist die lagebedingten Plagiozephalie dargestellt. Die Grauwerte befinden sich größtenteils im Bereich zwischen 158 und 176 U. Die Verteilung der Knochendichtewerte sowie auch die Höhe der Werte ähneln denen der gesunden Schädelnähte.



Abbildung 25

Auswertung der Knochendichtemessung aufgrund der Grauwertbestimmung. Der "Normwert' der Grauwerte (158-176 U) ist blau hinterlegt. Die Bereiche 1-4 sind jeweils in einem Abstand von 0,2 mm gemessen.

a) gesunde Schädelnähte; b) pathologische Schädelnähte; c) lagebedingte Plagiozephalie

4 Diskussion

Die Beobachtungen von Davis 1985 zeigten eine deutlich niedrigere Rate an SIDS Fällen in China als in Europa oder Amerika. Dies führte er auf die chinesische Angewohnheit, Kinder in Rückenlage schlafen zu lassen, zurück und löste damit die in den Vereinigten Staaten vom 'National Institute of Child Health and Human Development' bekannt gewordene "Back to Sleep" Kampagne zur Vermeidung des plötzlichen Kindstods aus (NICHD, 2011). Hierdurch konnte die Inzidenz des plötzlichen Kindstodes um 50% gesenkt werden. Allerdings zeigte sich in dessen Folge eine deutliche Zunahme von lagebedingten, okzipitalen Plagiozephalien. Viele Mutmaßungen über sekundäre Veränderungen der betroffenen Naht sind seither geäußert worden. Meinungen bis hin zu Nahtverschlüssen durch 'Verklebung' werden bis heute noch vertreten, sodass operative Korrekturen für notwendig empfunden werden (Losee et al., 2005).

Untersuchungen an Schädelnähten werden schon seit über 100 Jahren durchgeführt (Persing et al., 1989). Die heutigen Erkenntnisse stützen sich auf histologische Untersuchungen, insbesondere von Tieren, sowie Röntgennativuntersuchungen, die Computertomographie und Magnetresonanztomographie des gesamten Kopfes. Ergänzend wurden auch Genanalysen zur Klärung der Pathologien durchgeführt (Anderson et al., 2006, Furuya et al., 1984a, Ozaki and Buchman, 1998, Persson et al., 1978, Pritchard et al., 1956). Die Untersuchungen verglichen meistens nur die Schädelnahtsynostosen mit den gesunden Nähten. Konzentrieren sich die meisten Untersuchungen der lagebedingten Plagiozephalie auf die klinische Diagnostik, Ätiologie und Therapie (Bridges et al., 2002, Hukki et al., 2008, Hutchison et al., 2003, Lipira et al., 2010, McGarry et al., 2008, Saeed et al., 2008, Xia et al., 2008), so sind Informationen über den Aufbau der lagebedingten Plagiozephalienaht bislang nicht bekannt. Einzig diagnostische und technische Untersuchungen legen nahe, dass die Naht einer Plagiozephalie offen ist und es sich hierbei nicht um eine Synostose zu handeln scheint (David and Menard, 2000, Losee et al., 2005, Pollack et al., 1997, Regelsberger et al., 2006b).

4.1 Morphologische Diagnostik mittels histologischer Schnittführung

Die histologischen Untersuchungen bestätigen den Aufbau der Schädelnaht mit zwei Knochenkanten und interstitiellem Bindegewebe. Bei den gesunden Schädelnähten ist ein Knochengerüst mit Arealen von Faserknochenneubildung zu erkennen und bei den pathologisch veränderten Schädelnähten ausgereifte Faserknochenanteile mit untereinander vernetzten Knochentrabekeln zu sehen. Teilweise ist noch eine Nahtspalte zu sehen, teilweise auch schon ein durchgehendes knöchernes Gewebe, also ein verschlossener Teil der Schädelnaht. Hier sind am Knochen-Fibrose-Übergang keine Osteoblasten nachweisbar, was eine desmale Ossifikation vermuten lässt. Diese ist auch zu erwarten gewesen, wenn man die These von Cohen, einer zu frühen Verknöcherung in einem normal ablaufendem Verknöcherungsprozess, befürwortet (Cohen, 1993, Pritchard et al., 1956).

Vergleicht man nun auch noch die Plagiozephalienaht mit den gesunden und pathologischen Nähten, so sieht man deutlich, dass kein knöcherner Übergang besteht. Die fibröse Bindgewebsschicht ist sehr vital durch die sichtbaren Arteriolen und Venen, was einer beginnenden Verknöcherung widersprechen würde. Ebenfalls kann man bei der Plagiozephalie Osteoblasten im Bereich der Naht sehen, welche bei den pathologischen Nähten nicht zu sehen sind. Histologisch betrachtet ähnelt die Plagiozephalienaht deutlich mehr der normalen gesunden Naht als den pathologisch veränderten Schädelnähten, was die Schädeldeformitäten einer Plagiozephalie nicht erklären kann.

Allerdings ist die Beurteilung der Schädelnaht in der Histologie im Vergleich mit der Computertomographie zur Beurteilung der Knochenstruktur und dem Aufbau der Schädelnaht im Ganzen unterlegen, da nur einzelne Schnittbilder und nicht eine komplette dreidimensionale Ansicht vorliegen. Für eine genauere Untersuchung der Naht, wie z.B. Elementanalysen oder Faseranordnung, vor allem im bindegewebigen Anteil der Naht, sind weitere Untersuchungsverfahren anzuwenden. Eine weitere Untersuchungsmethode, die Anderson zur Untersuchung von (gesunden und pathologisch veränderten) Schädelnähten verwendet hat, ist die Elektronenmikroskopie. Hiermit kann die Mikroarchitektur und die Faseranordnung begutachtet werden. Bei einem hohen Energieaufwand übertrifft die Vergrößerung deutlich die der Histologie. Bei Untersuchungen mit niedrigem oder hohem Energieaufwand sieht man bei gesunden Schädelnähten geordnet liegende, kollagene Fasern, die parallel in einer Ebene zueinander und dem Periost liegen. Unter Verwendung von hohen Energien fangen die Fasern an zu kalzifizieren. Bei verknöcherten Nähten, z.B. im Sinne einer Kraniosynostose, ist eine geordnete Anordnung nicht mehr gegeben und die Fasern liegen wirr durcheinander. Bei den verknöchernden Nähten bilden sich feine Stränge zwischen den Knochen, die sich während des Verknöcherungsprozesses verdichten, kalzifizieren und als kleine Knochenkügelchen sichtbar werden (Anderson et al., 2006, Ozaki and Buchman, 1998, Ozaki et al., 1998).

Elementanalysen hatten Unterschiede in der Verteilung des Carbons und des Calciums bei offenen Nähten gezeigt. Einen hohen Anteil an Carbon findet man im Zentrum der Naht. An den Knochenrändern ist hingegen der Calciumanteil hoch. Entfernt man sich von der Naht, steigt der Calciumanteil an und der Carbonanteil sinkt (Anderson et al., 2006).

4.2. Schädelnahtmorphologie anhand der Mikro-Computertomographie

Zur detailgenauen Beurteilung und einer weiteren Differenzierung in pathologischen und normalen Schädelnähten und deren Veränderungen reichen die klinisch diagnostischen Methoden mit Ultraschall-, Röntgennativ-, CCT- und MRT- Untersuchung des Kopfes nicht aus. Die Auflösungen dieser Verfahren bis in den Millimeter Bereich sind nicht ausreichend, um eine exakte Aussage über den materiellen und strukturellen Aufbau von Schädelnähten zu treffen.

Die Mikro-Computertomographie ermöglicht chirurgische Resektate durch eine sehr viel höhere Ortsauflösung als die in der Klinik übliche CCT mit einer Genauigkeit im Mikrometerbereich (hier mit einer minimalen Ortsauflösung von 7,3 µm) zu analysieren. Hierdurch lässt sich der Aufbau der Schädelnähte und die damit verbundene Knochenstruktur beurteilen. Bei den durchgeführten Untersuchungen zeigten sich, wie in anderen Arbeiten bereits beschrieben, das pathologische Nähte teilweise komplett, teilweise aber auch nur inkomplett und segmental verschlossen sind. Der Schädelnahtverschluss stellt damit kein "Alles-oder-Nichts" Resultat dar, sondern verschließt die Naht nur anteilig und variiert in seiner Ausdehnung (Stadler et al., 2006). Ob die Verknöcherung an einem Punkt beginnt und sich dann kontinuierlich entlang der Naht ausbreitet oder nur Teile verknöchern und andere Teile offen bleiben, ist ungeklärt. Nach den bisherigen Untersuchungen liegt aber die Vermutung nahe, dass es sich um einen zeitlich zu früh einsetzenden, dynamischen Prozess handelt, der mit dem normalen Verknöcherungsprozess durchaus vergleichbar ist.

Auffällig ist die Verdickung der Knochenkanten bei den pathologischen Nähten, welche auf eine erhöhte Aktivität im Sinne eines lokal gesteigerten Verknöcherungsprozesses hindeutet. Diese Verdickungen sind bei gesunden Nähten nicht zu sehen, erstaunlicherweise jedoch bei der Plagiozephalie. Diese Veränderung deutet darauf hin, dass eine erhöhte Aktivität in diesem Bereich besteht, obwohl sonst keine morphologischen Anzeichen für einen verfrühten Verschluss oder eine pathologische Anomalie erkennbar sind.

Die nachfolgenden Knochendichtemessungen sollten klären, inwieweit sich der Schädelnahtaufbau bei gesunden und pathologischen Schädelnähten sowie der lagebedingten Plagiozephalienaht quantitativ voneinander unterscheidet.

4.3. Die Bedeutung der Knochendichtemessung mittels SRµCT

Die SRµCT ist ein Verfahren, welches eine (Knochen-)Dichte misst und diese anhand von Grauwerten darstellt. Dieses Verfahren wird in vielen Bereichen eingesetzt, um Knochendichte bei der Osteoporose zu messen, komplette Amphibien zu untersuchen oder auch Materialstabilität im technischen Bereich (z.B. im Flugzeugbau) zu testen.

Bislang ist das Verfahren jedoch nicht zur Untersuchung von Schädelnähten eingesetzt worden, weswegen die hier durchgeführten Untersuchungen ein Novum bedeuten.

Mit der SRµCT Untersuchung wird ein Vielfaches der Energie, wie bei der herkömmlichen Mikro-CT Untersuchung verwendet. Hierdurch kann die Beschaffenheit des Gewebes genauer analysiert werden und über die gemessenen Graustufen der Grad der Verknöcherung abgeschätzt werden. An der Oberfläche der Gewebe ist eine Grauwertbestimmung mit der herkömmlichen Mikro-Computertomographie möglich, jedoch sind in den Schnittebenen durch den Knochen die Grauwerte nur mittels SRµCT aussagekräftig.

Die in dieser Untersuchung gemessenen Grauwerte der gesunden Nähten liegen in einem Bereich von 158 bis 176 U, was folglich als Normbereich der Knochdendichte bei gesunden Schädelnähten verstanden werden kann. Interessanterweise sind die Grauwerte der lagebedingten Plagiozephalie in einem vergleichbaren Bereich mit denen von gesunden Nähten. Die pathologisch veränderten Nähte hingegen überschreiten den "normalen" Grauwertbereich deutlich, was eine erhöhte Knochenaktivität vermuten lässt. Korrelierend hierzu ist die im mCT oder SRµCT gesehene Verdickung der Knochenkanten. Bei der CT-morphologischen Untersuchung der NSP sind ebenfalls Verdickungen der Knochenkanten zu erkennen, welche eine erhöhte Knochenaktivität vermuten lassen, welche jedoch mittels SRµCT Untersuchung bei normwertigen Grauwerten nicht bestätigt werden kann. Dies passt auch zu der Annahme, dass die NSP keine primäre Verknöcherungsstörung darstellt.

Die Verteilung der Knochendichtewerte zeigt bei den gesunden Nähten im Bereich der Schädelnaht-/Knochengrenze die niedrigsten Werte, wohingegen bei den pathologischen Nähten überdurchschnittlich hohe Knochendichtewerte in den Schädelnaht-nahen Bereichen (0,2 - 0,6mm entfernt der Naht) zu finden sind, was ein vermehrtes Knochenwachstum und stabileres Knochengerüst vermuten lässt. Unterstellt man einer Synostose eine normale, lediglich zu früh einsetzende Verknöcherung, würde man bei physiologisch verschlossenen Schädelnähten eine ähnliche Verteilung dieser Knochendichtewerte erwarten. Weiterführende Untersuchungen mit der SRµCT von gesunden, physiologisch verschlossenen Schädelnähten könnten einen weiteren Aufschluss erbringen.

4.4 Auswirkungen auf das Therapieregime und Ansätze für zukünftige Arbeiten

Aus den Untersuchungen kann bei einer NSP von einer normalen Schädelnaht ausgegangen werden, die konservativ versorgt werden sollten. Es gibt keinen Anhalt, dass eine primäre Verknöcherungsstörung vorliegt, die eine operative Versorgung rechtfertigt. Dem gegenüber stellen die Kraniosynostosen eine Verknöcherungsstörung dar, unabhängig davon, ob eine komplette oder nur teilweise Verknöcherung vorliegt, die eine operative Versorgung indizieren, um mögliche Spätfolgen zu minimieren oder sogar zu verhindern. Die chirurgische Herangehensweise sollte jedoch bei den teilweise verschlossenen Schädelnähten nochmals hinterfragt werden, da sich die offenen Anteile der Naht ebenfalls wie normale Schädelnähte präsentieren. Hierbei kann das Ausmaß des Verschlusses sehr leicht mit der Sonographie bestimmt werden und die operativen Techniken möglicherweise auf weniger invasive Eingriffe, wie endoskopische Verfahren mit Eröffnung lediglich des fusionierten Nahtabschnittes, beschränkt werden, um dadurch auch die periprozedurale Morbidität zu senken. Dieses Vorgehen müsste allerdings durch prospektive Studien untersucht werden, um ein Umdenken der zurzeit gängigen Kraniotomietechniken zu bewirken.

In dieser Arbeit sind erstmals Grauwerte, die Ausdruck des Mineralisationsgrades und der Aktivität des Knochenumbaus sind, bei Schädelnähten bestimmt worden. Gesunde Nähte zeigten Knochendichtewerte in einem Bereich von 158 bis 176U. Dieser Bereich sollte in weiterführenden Arbeiten als Normbereich dazu dienen, die Schädelnähte zwischen gesunden und pathologischen Nähten klassifizieren zu können. Angesichts der geringen Anzahl der Messungen sollte eine größere Anzahl von Untersuchungen folgen, um diesen Normbereich zu bestätigen und eventuell zu präzisieren. Hierfür wäre die Erstellung eines Schädelnahtregisters sinnvoll, um in spezialisierten Zentren Daten zu den Schädelnahtveränderungen, ihrer Therapieerfolge und ihrer morphologischen Eigenschaften aufzuarbeiten. Die ca. 40 weltweit existierenden SRµCT könnten somit optimal zur Untersuchung von Schädelnähten genutzt werden. Zusätzliche SRµCT-Untersuchungen oder Elementanalysen mit speziellen Elektronenmikroskopen, wie z.B. Rasterelektronen- oder Polarisationsmikroskopen, sind sinnvoll, um ein weiteres Verständnis der Schädelnähte zu entwickeln. Vor allem sollten die Elementanalysen speziell der Schädelnaht und nicht allein der knöchernen Anteile erfolgen. Hierbei ist die Verteilung von Knochenelementen, wie Calcium, Phosphat, Carbon, Sauerstoff und Sulfat, und Bindegewebsbestandteilen von besonderem Interesse.

Diverse Untersuchungen zeigten, dass eine Kraniosynostose mit Veränderungen von unterschiedlichen Transkriptions- und Wachstumsfaktoren assoziiert sind. Es besteht jedoch weiterhin Unklarheit, ob es sich bei den Kraniosynostosen um eine normale Verknöcherung handelt, die einfach nur zu früh stattfindet oder eine echte Störung im Verknöcherungsprozess vorliegt. Histologisch konnte ein normaler Verknöcherungsprozess bei den Kraniosynostosen gesehen werden, was ebenfalls die These eines dynamischen Fusionsprozesses des Knochens nur zu einem verfrühten Zeitpunkt unterstreicht. Burke's Theorie der normalen Verknöcherung zu einem verfrühtem Zeitpunkt, begründet sich darauf, dass bei normalen mechanischen Einflüssen wie z.B. durch das Wachstum des Gehirns, sich in der Naht bildende Fasern zerstört werden und es nicht zu einer Verknöcherung kommt. Bei Ausbleiben der Faserzerstörung kommt es zu einer Kraniosynostose. Diese ist dann einem normalen Verknöcherungsprozess gleichzusetzen und stützt die These, dass bei der Synostose eine normale Verknöcherung nur zu einem verfrühten Zeitpunkt abläuft (Burke et al., 1995, Cohen, 1993). SRµCT-Untersuchungen sollten bei physiologisch verschlossenen Schädelnähten erfolgen, um den Vergleich mit dem Aufbau einer Kraniosynostose herstellen zu können und den Verknöcherungsprozess einordnen zu können.

4.5 Kritikpunkte an der Arbeit

Die geringe Anzahl der Untersuchungsproben erklärt sich vor allem bei der lagebedingten Plagiozephalie aufgrund der Tatsache, dass sie nur selten operativ versorgt wird. Es kommt hinzu, dass die Untersuchungen am "Hamburger Synchrotronlabor" (HASYLAB) des "Deutschen Elektronen Synchrotron", Hamburg, sehr aufwändig in Bezug auf Personal und Zeit und damit auch kostenintensiv sind. Es ist hier nicht von der Hand zu weisen, dass die Ergebnisse wegen der geringen Anzahl an Proben nur Hinweise geben können und kein ausreichendes Signifikanzniveau für statistische Berechnungen bieten. Trotz allem ist nicht zu vernachlässigen, dass sich deutliche Ergebnisse bei speziellen Aspekten im Aufbau der Knochenstruktur und der Grauwertbestimmung zeigen, die ein Grundstein für weiterführende Arbeiten sein werden. Für die tägliche Routineuntersuchung ist dieses Verfahren allerdings nicht geeignet.

5 Zusammenfassung

'Normale' Mikro-Computertomographie-, Mikro-Computertomographie- mit Synchrotronstrahlung und histologische Untersuchungen wurden an gesunden und synostierten Schädelnähten sowie einer NSP durchgeführt, um ein besseres Verständnis des Schädelnahtaufbaus zu bekommen. Morphologische Eigenschaften der Schädelnähte wurden beurteilt und die durchgeführten Knochendichtemessungen zur weiteren Beurteilung der Knochenaktivität und des Verknöcherungsprozesses herangezogen.

Anhand der durchgeführten Untersuchungen können folgende Aussagen getroffen werden:

1) gesunde und pathologische Schädelnähte zeigen unterschiedliche Nahtmorphologien und differieren in der Höhe und Verteilung der Knochendichtewerten

2) bei den pathologischen Schädelnähten ist keine Alles-oder-Nichts Entscheidung vorhanden, denn nur Teile der Naht verknöchern, während gleichzeitig andere Teile offen bleiben

3) lagebedingte Plagiozephalien zeigen die gleichen Knochendichtewerte wie gesunde Schädelnähte und präsentieren sich auch in den Mikro-Computertomographieuntersuchungen wie die gesunden Nähte, weshalb eine Verknöcherungsstörung bei den NSP als unwahrscheinlich erscheint

4) Verdickungen im Nahtbereich gehen nicht mit erhöhten Knochendichtewerten einher

5) der Normbereich der Knochendichte von gesunden Schädelnähten liegt zwischen 158 und 176U

Eine Untersuchung von Schädelnähten des Menschen ist mittels SRµCT bisher nicht durchgeführt worden. Röntgen-, CT-, MRT- und Ultraschalluntersuchungen können keine Aussagen über die Aktivität in den Knochenkanten treffen. Die gemessenen Knochendichtewerte ermöglichen ein besseres Verständnis der Schädelnähte. Die Definition eines Normbereiches oder die Festlegung von Graustufen/Knochendichtewerten bei gesunden wie auch pathologischen Schädelnähten würde die Untersuchung von Schädelnähten revolutionieren und könnte wegbereitend für weitere Untersuchungen und das Verständnis der Schädelnahtentwicklung sein. Weitere Untersuchungen sind hier notwendig, um die oben genannten Aussagen zu bestätigen und um Einfluss auf Therapieempfehlungen zu nehmen. Bislang wird die Therapie der lagebedingten Plagiozephalie noch kontrovers diskutiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen bei der NSP bis auf eine Verdickung der Naht keine pathologischen Schädelnahtveränderungen. Eine Verknöcherungsstörung ist nicht nachweisbar und damit eine operative Versorgung ist nach diesen Ergebnissen nicht indiziert.

6 Literaturverzeichnis

- ALDEN, T. D., LIN, K. Y. & JANE, J. A. 1999. Mechanisms of premature closure of cranial sutures. *Childs Nerv Syst*, 15, 670-5.
- ALDERMAN, B. W., FERNBACH, S. K., GREENE, C., MANGIONE, E. J. & FERGUSON, S. W. 1997. Diagnostic practice and the estimated prevalence of craniosynostosis in Colorado. *Arch Pediatr Adolesc Med*, 151, 159-64.
- ANDERSON, P. J., NETHERWAY, D. J., DAVID, D. J. & SELF, P. 2006. Scanning electron microscope and micro-CT evaluation of cranial sutures in health and disease. *J Craniofac Surg*, 17, 909-19.
- ARGENTA, L., DAVID, L. & THOMPSON, J. 2004. Clinical classification of positional plagiocephaly. *J Craniofac Surg*, 15, 368-72.
- BECKMANN, F., DONATH, T., FISCHER, J., DOSE, T., LIPPMANN, T., LOTTERMOSER, L., MARTINS, R. V. & SCHREYER, A. New developments for synchrotron-radiation-based microtomography at DESY. 2006. 631810-631810-11.
- BRIDGES, S. J., CHAMBERS, T. L. & POPLE, I. K. 2002. Plagiocephaly and head binding. *Arch Dis Child*, 86, 144-5.
- BURKE, M. J., WINSTON, K. R. & WILLIAMS, S. 1995. Normal sutural fusion and the etiology of single sutural craniosynostosis: the microspicule hypothesis. *Pediatr Neurosurg*, 22, 241-6; discussion 247.
- COHEN, M. M., JR. 1993. Sutural biology and the correlates of craniosynostosis. *Am J Med Genet*, 47, 581-616.
- COUSSENS, A. K., WILKINSON, C. R., HUGHES, I. P., MORRIS, C. P., VAN DAAL, A., ANDERSON, P. J. & POWELL, B. C. 2007. Unravelling the molecular control of calvarial suture fusion in children with craniosynostosis. *BMC Genomics*, 8, 458.
- DAVID, D. J. & MENARD, R. M. 2000. Occipital plagiocephaly. Br J Plast Surg, 53, 367-77.
- DELASHAW, J. B., PERSING, J. A., BROADDUS, W. C. & JANE, J. A. 1989. Cranial vault growth in craniosynostosis. *J Neurosurg*, 70, 159-65.
- DELASHAW, J. B., PERSING, J. A. & JANE, J. A. 1991. Cranial deformation in craniosynostosis. A new explanation. *Neurosurg Clin N Am*, 2, 611-20.
- FURUYA, Y., EDWARDS, M. S., ALPERS, C. E., TRESS, B. M., NORMAN, D. & OUSTERHOUT, D. K. 1984a. Computerized tomography of cranial sutures. Part 2: Abnormalities of sutures and skull deformity in craniosynostosis. J Neurosurg, 61, 59-70.
- FURUYA, Y., EDWARDS, M. S., ALPERS, C. E., TRESS, B. M., OUSTERHOUT, D. K. & NORMAN, D. 1984b. Computerized tomography of cranial sutures. Part 1: Comparison of suture anatomy in children and adults. *J Neurosurg*, 61, 53-8.
- GAGAN, J. R., THOLPADY, S. S. & OGLE, R. C. 2007. Cellular dynamics and tissue interactions of the dura mater during head development. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 81, 297-304.
- HEIKE, C. L., UPSON, K., STUHAUG, E. & WEINBERG, S. M. 2010. 3D digital stereophotogrammetry: a practical guide to facial image acquisition. *Head Face Med*, 6, 18.
- HUKKI, J., SAARINEN, P. & KANGASNIEMI, M. 2008. Single suture craniosynostosis: diagnosis and imaging. *Front Oral Biol*, 12, 79-90.
- HUTCHISON, B. L., THOMPSON, J. M. & MITCHELL, E. A. 2003. Determinants of nonsynostotic plagiocephaly: a case-control study. *Pediatrics*, 112, e316.

- JIANG, X., ISEKI, S., MAXSON, R. E., SUCOV, H. M. & MORRISS-KAY, G. M. 2002. Tissue origins and interactions in the mammalian skull vault. *Dev Biol*, 241, 106-16.
- JOGANIC, J. L., LYNCH, J. M., LITTLEFIELD, T. R. & VERRELLI, B. C. 2009. Risk factors associated with deformational plagiocephaly. *Pediatrics*, 124, e1126-33.
- JONES, M. W. 2004. Supine and prone infant positioning: a winning combination. *J Perinat Educ*, 13, 10-20.
- KABBANI, H. & RAGHUVEER, T. S. 2004. Craniosynostosis. *Am Fam Physician*, 69, 2863-70.
- KAUFMAN, B., WEISS, M. H., YOUNG, H. F. & NULSEN, F. E. 1973. Effects of prolonged cerebrospinal fluid shunting on the skull and brain. *J Neurosurg*, 38, 288-97.
- KENNEDY, E., MAJNEMER, A., FARMER, J. P., BARR, R. G. & PLATT, R. W. 2009. Motor development of infants with positional plagiocephaly. *Phys Occup Ther Pediatr*, 29, 222-35.
- LEVINE, J. P., BRADLEY, J. P., ROTH, D. A., MCCARTHY, J. G. & LONGAKER, M. T. 1998. Studies in cranial suture biology: regional dura mater determines overlying suture biology. *Plast Reconstr Surg*, 101, 1441-7.
- LIPIRA, A. B., GORDON, S., DARVANN, T. A., HERMANN, N. V., VAN PELT, A. E., NAIDOO, S. D., GOVIER, D. & KANE, A. A. 2010. Helmet versus active repositioning for plagiocephaly: a three-dimensional analysis. *Pediatrics*, 126, e936-45.
- LOSEE, J. E., FELDMAN, E., KETKAR, M., SINGH, D., KIRSCHNER, R. E., WESTESSON, P. L., COOPER, G., MOONEY, M. P. & BARTLETT, S. P. 2005. Nonsynostotic occipital plagiocephaly: radiographic diagnosis of the "sticky suture". *Plast Reconstr Surg*, 116, 1860-9.
- MACK, J., SQUIER, W. & EASTMAN, J. T. 2009. Anatomy and development of the meninges: implications for subdural collections and CSF circulation. *Pediatr Radiol*, 39, 200-10.
- MCGARRY, A., DIXON, M. T., GREIG, R. J., HAMILTON, D. R., SEXTON, S. & SMART, H. 2008. Head shape measurement standards and cranial orthoses in the treatment of infants with deformational plagiocephaly. *Dev Med Child Neurol*, 50, 568-76.
- MILLER, R. I. & CLARREN, S. K. 2000. Long-term developmental outcomes in patients with deformational plagiocephaly. *Pediatrics*, 105, E26.
- MORRISS-KAY, G. M. 2001. Derivation of the mammalian skull vault. J Anat, 199, 143-51.
- NICHD. 2011. Back to sleep public education campaign [Online]. Maryland, U. S.: NICHD. Available: http://www.nichd.nih.gov/sids/.
- NODEN, D. M. & TRAINOR, P. A. 2005. Relations and interactions between cranial mesoderm and neural crest populations. *J Anat*, 207, 575-601.
- OGLE, R. C., THOLPADY, S. S., MCGLYNN, K. A. & OGLE, R. A. 2004.
- Regulation of cranial suture morphogenesis. Cells Tissues Organs, 176, 54-66.
- OPPERMAN, L. A. 2000. Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. *Dev Dyn*, 219, 472-85.
- OZAKI, W. & BUCHMAN, S. R. 1998. Use of scanning electron microscopy in the evaluation of craniosynostosis. *J Craniofac Surg*, 9, 30-8; discussion 39.
- OZAKI, W., BUCHMAN, S. R., MURASZKO, K. M. & COLEMAN, D. 1998. Investigation of the influences of biomechanical force on the ultrastructure of human sagittal craniosynostosis. *Plast Reconstr Surg*, 102, 1385-94.

- PANCHAL, J., AMIRSHEYBANI, H., GURWITCH, R., COOK, V., FRANCEL, P., NEAS, B. & LEVINE, N. 2001. Neurodevelopment in children with singlesuture craniosynostosis and plagiocephaly without synostosis. *Plast Reconstr Surg*, 108, 1492-8; discussion 1499-500.
- PERNKOPF, E. 1963. Atlas der topographischen und angewandten Anatomie. Urban und Schwarzenberg, München, Berlin.
- PERSING, J. A. 2008. MOC-PS(SM) CME article: management considerations in the treatment of craniosynostosis. *Plast Reconstr Surg*, 121, 1-11.
- PERSING, J. A., JANE, J. A. & SHAFFREY, M. 1989. Virchow and the pathogenesis of craniosynostosis: a translation of his original work. *Plast Reconstr Surg*, 83, 738-42.
- PERSSON, M., MAGNUSSON, B. C. & THILANDER, B. 1978. Sutural closure in rabbit and man: a morphological and histochemical study. *J Anat*, 125, 313-21.
- POLLACK, I. F., LOSKEN, H. W. & FASICK, P. 1997. Diagnosis and management of posterior plagiocephaly. *Pediatrics*, 99, 180-5.
- PRITCHARD, J. J., SCOTT, J. H. & GIRGIS, F. G. 1956. The structure and development of cranial and facial sutures. *J Anat*, 90, 73-86.
- RECINOS, R. F., HANGER, C. C., SCHAEFER, R. B., DAWSON, C. A. & GOSAIN, A. K. 2004. Microfocal CT: a method for evaluating murine cranial sutures in situ. J Surg Res, 116, 322-9.
- REGELSBERGER, J. 2007. *Kraniosynostose* [Online]. Hamburg: Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf. Available:

http://www.uke.de/kliniken/neurochirurgie/index_15719.php

- REGELSBERGER, J., DELLING, G., HELMKE, K., TSOKOS, M., KAMMLER, G., KRANZLEIN, H. & WESTPHAL, M. 2006a. Ultrasound in the diagnosis of craniosynostosis. *J Craniofac Surg*, 17, 623-5; discussion 626-8.
- REGELSBERGER, J., DELLING, G., TSOKOS, M., HELMKE, K., KAMMLER, G., KRANZLEIN, H. & WESTPHAL, M. 2006b. High-frequency ultrasound confirmation of positional plagiocephaly. *J Neurosurg*, 105, 413-7.
- RICE, D. P. 2008. Developmental anatomy of craniofacial sutures. *Front Oral Biol*, 12, 1-21.
- RICE, D. P. & RICE, R. 2008. Locate, condense, differentiate, grow and confront: developmental mechanisms controlling intramembranous bone and suture formation and function. *Front Oral Biol*, 12, 22-40.
- SAEED, N. R., WALL, S. A. & DHARIWAL, D. K. 2008. Management of positional plagiocephaly. *Arch Dis Child*, 93, 82-4.
- SCHAAF, H., PONS-KUEHNEMANN, J., MALIK, C. Y., STRECKBEIN, P., PREUSS, M., HOWALDT, H. P. & WILBRAND, J. F. 2010. Accuracy of three-dimensional photogrammetric images in non-synostotic cranial deformities. *Neuropediatrics*, 41, 24-9.
- SIEMENS, N. 2010. Entwicklung der Schädelknochen. *In:* MEDIZIN, C. F. O. (ed.). Oppenweiler.
- SKADBERG, B. T., MORILD, I. & MARKESTAD, T. 1998. Abandoning prone sleeping: Effect on the risk of sudden infant death syndrome. *J Pediatr*, 132, 340-3.
- SLATER, B. J., KWAN, M. D., GUPTA, D. M., AMASHA, R. R., WAN, D. C. & LONGAKER, M. T. 2008. Dissecting the influence of regional dura mater on cranial suture biology. *Plast Reconstr Surg*, 122, 77-84.
- SLATER, B. J., KWAN, M. D., GUPTA, D. M., LEE, J. K. & LONGAKER, M. T. 2009. The role of regional posterior frontal dura mater in the overlying suture morphology. *Plast Reconstr Surg*, 123, 463-9.

- STADLER, J. A., 3RD, CORTES, W., ZHANG, L. L., HANGER, C. C. & GOSAIN, A. K. 2006. A reinvestigation of murine cranial suture biology: microcomputed tomography versus histologic technique. *Plast Reconstr Surg*, 118, 626-34.
- STUCKER, R. 2009. [Plagiocephaly associated with infant asymmetry]. Z Orthop Unfall, 147, 503-10; quiz 511-2.
- ULFIG, N. 2005. Kurzlehrbuch Embryologie, Georg Thieme Verlag KG.
- VU, H. L., PANCHAL, J., PARKER, E. E., LEVINE, N. S. & FRANCEL, P. 2001. The timing of physiologic closure of the metopic suture: a review of 159 patients using reconstructed 3D CT scans of the craniofacial region. *J Craniofac Surg*, 12, 527-32.
- WARREN, S. M., BRUNET, L. J., HARLAND, R. M., ECONOMIDES, A. N. & LONGAKER, M. T. 2003a. The BMP antagonist noggin regulates cranial suture fusion. *Nature*, 422, 625-9.
- WARREN, S. M., GREENWALD, J. A., NACAMULI, R. P., FONG, K. D., SONG, H. J., FANG, T. D., MATHY, J. A. & LONGAKER, M. T. 2003b. Regional dura mater differentially regulates osteoblast gene expression. *J Craniofac Surg*, 14, 363-70.
- XIA, J. J., KENNEDY, K. A., TEICHGRAEBER, J. F., WU, K. Q., BAUMGARTNER, J. B. & GATENO, J. 2008. Nonsurgical treatment of deformational plagiocephaly: a systematic review. Arch Pediatr Adolesc Med, 162, 719-27.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Jan Regelsberger, stellvertretender ärztlicher Leiter der Klinik für Neurochirurgie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf (Direktor Prof. Dr. med. Manfred Westphal) für die gute Zusammenarbeit bei dieser Arbeit. Für die Einführung in eine spannende wissenschaftliche Thematik und den anhaltenden Enthusiasmus bedanke ich mich sehr. Hervorzuheben ist neben der fachlichen Unterstützung auch die freundliche und ruhige Persönlichkeit, die mich beeindruckt hat.

Bei Herrn Dr. Felix Beckmann, Wissenschaftler in der Strukturforschung für Neue Werkstoffe des Helmholtz-Zentrums Geesthacht, Zentrum für Material- und Küstenforschung, bedanke ich mich für die Einführung in den Spezialbereich der Mikro-Computertomographie mittels Synchrotronstrahlung, sowie die Durchführung der computertomographischen Untersuchung.

Frau Dr. Julia Herzen, Wissenschaftlerin in der Strukturforschung für Neue Werkstoffe des Helmholtz-Zentrums Geesthacht, Zentrum für Material- und Küstenforschung, danke ich für die kompetente Unterstützung bei der Messung und Auswertung der computertomographisch erhobene Daten. Für die Durchführung aller computertomographischen Untersuchungen, besonders denen in der Schweiz bedanke ich mich sehr.

Aus dem Institut für Osteologie und Biomechanik des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Direktor Prof. Dr. med. Michael Amling) danke ich Herrn Dr. rer. medic. Björn Busse und Dr. Ing. Michael Hahn für die Aufarbeitung der Präparate und den regen Gedankenaustausch.

Herrn PD Dr. J. Zustin aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Direktor Prof. Dr. med. Guido Sauter) danke ich für die histologische Begutachtung der Präparate.

Herrn PD Dr. M. Tsokos, Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (Direktor Prof. Dr. med. K. Püschel), danke ich für die Bereitstellung der Präparate.

8 Publikationen des Autors zum Thema

Synchrotron-microcomputed tomography studies of normal and pathological cranial sutures: further insight.

Regelsberger J1, Schmidt T, Busse B, Herzen J, Tsokos M, Amling M, Beckmann F.

J Neurosurg Pediatr. 2010 Mar;5(3):238-42. doi: 10.3171/2009.10.PEDS09138.

Changes to the cell, tissue and architecture levels in cranial suture synostosis reveal a problem of timing in bone development.

Regelsberger J1, Milovanovic P, Schmidt T, Hahn M, Zimmermann EA, Tsokos M, Zustin J, Ritchie RO, Amling M, Busse B. Eur Cell Mater. 2012 Nov 28:24:441-58.

9 Lebenslauf

10 Eidesstattliche Versicherung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:

Synchrotron–microcomputed tomography studies of normal and pathological cranial sutures: further insight

Laboratory investigation

JAN REGELSBERGER, M.D.,¹ TOBIAS SCHMIDT, CAND. MED.,¹ BJÖRN BUSSE, PH.D.,² JULIA HERZEN,⁴ MICHAEL TSOKOS, M.D.,³ MICHAEL AMLING, M.D.,² AND FELIX BECKMANN, PH.D.⁴

¹Department of Neurological Surgery, ²Center for Biomechanics and Skeletal Biology, and ³Department of Forensic Medicine, University Hospital Hamburg-Eppendorf, Hamburg; and ⁴Institute of Materials Research, GKSS Research Centre, Geesthacht, Germany

Object. Both CT and high-frequency ultrasound have been shown to be reliable diagnostic tools used to differentiate normal cranial sutures from suture synostosis. In nonsynostotic plagiocephaly, overlapping of the bony plates and the so-called "sticky suture" is still controversial and is believed to represent a pathological fusion process. Synchrotron-microcomputed tomography (SRmCT) studies were undertaken to determine whether positional head deformities can be assumed to be true suture pathologies.

Methods. Morphological features and growth development of 6 normal cranial sutures between the ages of 3 and 12 months were analyzed histologically. Additionally 6 pathological sutures, including sagittal synostosis and nonsynostotic plagiocephaly (NSP), were compared with the group of normal sutures by histological and SRmCT studies. Synchrotron-microcomputed tomography is a special synchrotron radiation source with a high photon flux providing a monochromatic x-ray beam with a very high spatial resolution. Morphological characteristics of the different suture types were evaluated and bone density alongside the sutures was measured to compare the osseous structure of the adjacent bony plates of normal and pathological sutures.

Results. Histologically jointlike osseous edges of the normal sutures were seen in the 1st month of life and interlocking at the age of approximately 12 months. During this 1st year, bone thickness increases and suture width decreases. The SRmCT studies showed that: 1) sutures and adjacent bones in NSP are comparable to normal sutures in terms of their morphological aspects; 2) bone densities in the adjacent bony plates of NSP and normal sutures are not different; 3) thickening of the diploe with ridging of the bone in sagittal synostosis is associated with significantly higher bone density; 4) synostotic sutures are only partially fused but vary in their extent; and 5) nonfused sections in sagittal synostosis behave like normal sutures without any signs of pathological bone formation.

Conclusions. Sutures in patients with NSP were found without any morphological irregularities or different osseous structures alongside those compared with normal sutures. Thus, a true suture pathology or osseous change of the adjacent bony plates is highly unlikely in NSP. Even though the number of specimens is limited in this series, cranial suture fusion seems to start at one undetermined point and spread along the suture, whereas other parts of the same suture are not involved according to morphological aspects and bone density measurements of the adjacent bones. This theory may represent a dynamic fusion process completed over time but just starting too early. (DOI: 10.3171/2009.10.PEDS09138)

KEY WORDS • cranial suture • microcomputed tomography • bone density

Positional head deformities, so-called NSP, have been increasingly observed during the last 15 years due to the campaign of laying infants on their backs to prevent sudden infant death syndrome.^{2,14,15} Both CT and sonographic imaging have shown that overlapping of the adjacent bony plates with narrowing of lambdoid sutures is a characteristic finding in patients with occipital head deformities.^{1,8,12,13} Therefore, the hypothesis of a secondary suture pathology has been discussed and surgical reshaping procedures advocated to prevent early suture fusion in these patients.^{2,8,12,15}

In previous studies involving the use of high-frequency ultrasonography in 100 patients with NSP between the ages of 2 and 13 months, we did not verify any morphological differences between NSP sutures and normal cranial sutures.^{14,15} Suture width decreased over time from 6.5 to 2 mm, and bone thickness in the affected area increased

Abbreviations used in this paper: NSP = nonsynostotic plagiocephaly; SRmCT = synchrotron-microcomputed tomography.

Normal and pathological cranial sutures

from 0.6 to 1.2 mm until the age of 13 months.^{14,15} Based on these findings, additional histological and SRmCT analyses were the logical next step to study the osseous structure at the suture sites and to outline the suture characteristics of normal sutures, nonsynostotic, and synostotic head deformities in exemplary specimens.

Methods

Overall 6 pathological sutures were investigated histologically and by SRmCT. In a series of 100 patients with NSP, 2 underwent surgery to treat severe occipital plagiocephaly in which true lambdoid synostosis was suspected. Clinical and sonographic aspects in both infants were not convincing for a nonsynostotic origin. There were 2 patients with occipital NSP and 4 infants with true suture synostosis of the sagittal suture who underwent surgery. In the patients with scaphocephaly, a modified biparietal linear craniectomy was performed. The entire fused suture and the adjacent proximal part of the coronal and lambdoid sutures was resected. In the group of patients with NSP, surgical reshaping and resection of the affected lambdoid suture were conducted.

Normal cranial sutures (6 overall) in patients between 1 and 12 months of age underwent forensic investigation to clarify a diagnosis of sudden infant death syndrome or other causes not related to CNS diseases or cranial vault pathological entities. Informed parental consent was obtained prior to forensic, histological, and SRmCT investigation.

Near-field radiography was first undertaken to exclude true synostosis in NSP and normal cranial sutures. All specimens were studied histologically and imaged by SRmCT utilizing a monochromatic x-ray beam at the Hamburger Synchrotronstrahlungslabor HASYLAB at Deutsche Elektronen Synchrotron DESY (Hamburg, Germany, and GKSS Research Centre, Geesthacht, Germany). High photon energy of 18-21 keV was used to achieve a spatial resolution of 7.3 µm. The images were reconstructed using the standard black-and-white projection algorithm. The morphological features of the sutures and their collateral bony structures were evaluated on 2D and 3D images. The bone density of the adjacent bony plates in coronal sections was measured in all specimens by absorption per length modus. We analyzed the edges of the bony plates nearest to the patent sutures (NSP and normal sutures), the fused and nonfused segments in sagittal synostosis, and the flanking parts laterally (in total, 4 sections bilaterally 0.2-0.8 mm apart from the suture). Bone density measurements of the 3 different suture types were recorded and their characteristics compared.

Results

Histological investigations of 6 normal cranial sutures showed jointlike edges of the adjacent bony plates in the 1st months of life. At the age of 1 year, narrowing of the suture was accompanied by an interfering osseous bridging and thickening, unrelated to the suture sites. At approximately 1 year of life, the adjacent bony plates seemed to "interlock," and in this, osseous movement was further restricted in the specimens (Fig. 1).



Fig. 1. Histological sections of a normal sagittal suture at the ages of 3 (A), 6 (B), and 12 (C) months. Jointlike edges of the bony plates with a plain surface is the characteristic finding in the 1st months of life. Thickening of the bony plates increases over time and is accompanied by a higher density of the osseous structure, whereas narrowing of the bony edges and a decrease of suture width are followed by restricted movement of the suture. Interlocking with osseous bridging was not seen in the 1st year of life in 6 normal cranial sutures. Masson-Goldner stain (A) and Masson-Goldner-Trichrome stain (B and C).

J. Regelsberger et al.



Fig. 2. Upper: Coronal image of a normal lambdoid suture with interosseous gaps that remain intact. No interference of the bony plates is seen. Lower: Axial view in a 3D projection of a lambdoid suture obtained in a patient with NSP in which patency of the suture can be confirmed. Based on these morphological analyses, a true suture pathology in positional head deformities is most unlikely.

Histological and SRmCT investigations of 2 lambdoid sutures resected in patients with NSP showed overlapping of the bones but no osseous bridging or other signs of suture pathologies along the entire specimen. There were no morphological differences when compared with the group of normal sutures (Fig. 2).

Sagittal synostosis was analyzed in 4 patients. All resected specimens showed only partial fusions with osseous bridging and thickening of the diploe in the fused segments (Fig. 3). In all 4 specimens partial fusion was found to start in the anterior or middle third of the sagittal suture. Morphological analyses of the nonfused sections, just next to the fused part anteriorly and posteriorly, showed morphological features no different from normal sutures.

In total 194 osseous measurements of the adjacent bony plates along the patent and fused sutures were made in coronal sections (Fig. 4). In the group of normal cranial sutures (Fig. 4A), the highest bone density was found in the area 0.4–0.6 mm lateral to the patent suture (measurement Points 2, 3, 7, and 8). The lowest activity was found nearest to the suture itself. Bone density in all sections ranged between 158 and 176 U. In patients with NSP (Fig. 4B) bone density measurements remained in the normal range of 158–176 U, and no differences were found regarding their osseous absorption compared with the normal-suture



Fig. 3. A: Coronal view of a partially fused sagittal suture. Thickening of the diploe with osseous bridging at the inner layer is seen. B: Axial view of the same specimen showing the start of the fusion process in the *left* section, whereas no pathological changes can be seen in the *right* section. C: A 3D view inside the fused segment with osseous fixing of the adjacent bones and restriction of any movements.

specimens. In sagittal synostosis (Fig. 4C) high levels of bone density were found in Sections 2-4 and 6-8 (0.2–0.6 mm) confirming the marked thickening of the diploe at the fused segments. Almost normal levels were found at the far-lateral measurements, 0.8 mm lateral to the suture, and also at the site of nonfused sections (Fig. 4D). In patients with sagittal synostosis, thickening of the diploe with ridging of the bone at the fused segment was associated with a significantly higher bone density, whereas in the nonfused sections morphological and bone densities show no differences compared with normal sutures.



Normal and pathological cranial sutures

Fig. 4. Graphs comparing the bone densities of the adjacent bones of normal sutures (A), sutures in patients with NSP (B), and synostotic sutures (fused [C] and nonfused [D] sections). Measurement Point 5 is the suture/fused suture itself, which was not measured. Points 1–4 and 6–9 are the lateral measurement points at 0.2, 0.4, 0.6, and 0.8 mm taken in the coronal projection. In normal cranial sutures (A), the lowest bone density was found nearest to the suture itself. Bone density in all sections ranged between 158 and 176 U. In patients with NSP (B), bone density measurements remained in the normal range of 158–176 U, not different from those of normal-suture specimens. In sagittal synostosis (C), high levels of bone density were found in Sections 2–4, 6, and 7, confirming the osseous activity in this area with thickening of the diploe and ridging of the bone at the fused segment. In the nonfused sections of sagittal synostosis (D), bone densities were not found to be different from those of the normal sutures.

Discussion

Sutures in patients with nonsynostotic plagiocephaly are termed "sticky sutures" radiographically,^{4,11} and overlapping of the bony plates may be misunderstood as an early pathological sign of suture fusion induced by external forces. Numerous reports have precluded a true suture pathology in patients with NSP,^{2,5,6,9,15,16} but histopathological and SRmCT analyses have not been performed.

Conventional microcomputed tomography is an established tool used to analyze the x-ray absorption coefficient in a 3D mode of a probe. In contrast, synchrotron radiation sources (SRmCT) allow quantitative measurements that are not influenced by beam hardening, which therefore facilitates reliable measurements of the bone even in the depth of a probe. Synchrotron-microcomputed tomography (18-21 keV) was used to reduce the artifacts caused by polychromatic illumination and to facilitate acquisition of quantitative data of the osseous structure in the bony plates around the sutures.

Suture specimens, especially those obtained in patients both with and without NSP, are limited for natural and ethical reasons, particularly if they are not treated surgically. Therefore, general conclusions could not be drawn in this small series, but some particular aspects in normal and pathological suture growth were nonetheless determined.

The morphological findings in 2 lambdoid sutures resulting from positional plagiocephaly did not provoke suspicion: there was no interosseous bridging and there were no suture calcifications that could be interpreted as an early interlocking of sutures. Even overlapping of the bony plates was confirmed in the probes (this is known to be a frequent phenomenon in lambdoid sutures and found in 79% of healthy infants sonographically¹⁵). Bone density of the adjacent bones in patients with NSP did not differ from that in patients with normal sutures, excluding an increased osseous growth at the suture sites. Based on our findings, narrowing and overlapping of bony plates in occipital plagiocephaly do not lead to a fusion process.

The SRmCT data confirmed our previous sonographic results in 100 patients with NSP in whom a secondary synostosis could be excluded. The sutures remain intact and movement of the adjacent occipital bones in patients with NSP is less likely to be restricted. This may explain why head deformities may normalize in a greater proportion of infants with NSP in response to physiotherapy, orthotic devices, or just different recumbent positions. Nevertheless, therapeutic goals have to be achieved during the 1st year of life because bone thickness and osseous interlocking will most likely inhibit normalization of the head deformity beyond the age of 12 months.

Synchrotron-microcomputed tomography of sagittal synostosis has shown that the affected sutures are fused only partially and that the nonfused sections, anteriorly and posteriorly to the fused section, are comparable to normal sutures in terms of suture width, bony thickness, osseous structure, and bone density of the adjacent bones. Marked thickening of the diploe with ridging of the bone in the fused segments has a significant, higher bone density and may be the result of a virulent ossification. At the same time, normal ossifications can be seen alongside the nonfused sections of a synostotic suture. This observation may support the idea that ossification starts at a single point of the suture and spreads out along the suture,⁷ representing a dynamic fusion process completed over time.

Suture pathologies are known to be associated with mutations of several transcription factors, growth factors, and their receptors, leading to an accelerated bone growth inside the intermembranous gaps. Downregulation and upregulation of bone growth, site of suture, quantity of involved sutures, and the impact by external forces such as those in positional plagiocephaly are still unknown, even though data have been garnered from experimental research studies.

Surgical strategies have changed due to the increased understanding of cranial suture pathology. Our findings support the hypothesis that some normal growth in synostotic sutures can take place even though the fusion process has already started.⁷ This supports previous studies and the daily clinical observations that timing of surgery may be the decisive key in determining the cosmetic result. It is well known that modified biparietal linear craniectomies in sagittal synostosis performed in the very 1st weeks of life are most efficient in correcting the abnormal head shape.^{3,10} In contrast, surgery in older infants requires more complex strategies and is less successful due to subsequent bone growth, skull thickening, and an ongoing process of suture closure. However, craniosynostosis remains etiologically and pathogenetically heterogeneous, and minimally invasive techniques are limited to the isolated forms of craniosynostosis and may even fail in some instances. Multiple and syndromic forms of synostosis still require a multidisciplinary approach including complex reshaping procedures by which the associated malformations are also managed.

Conclusions

Synchrotron-microcomputed tomography studies, including bone density measurements of the adjacent bony plates on lambdoid sutures in patients with NSP, did not show any morphological irregularities or different bony structure compared with normal sutures. Therefore, a secondary suture fusion due to external forces seems to be most unlikely, and in such cases surgical intervention in patients with NSP is not inevitably needed. Even though the number of specimens is limited in this series, we determined that suture fusion starts at one point and spreads along the entire suture while other sections of the same suture are not involved and thus behave as normal cranial sutures. This may represent a dynamic fusion process completed over time but just starting too early.

Disclosure

The authors report no conflict of interest concerning the materials or methods used in this study or the findings specified in this paper.

References

- American Academy of Pediatrics Task Force on Sudden Infant Death Syndrome: the changing concept of sudden infant death syndrome: diagnostic coding shifts, controversies regarding the sleeping environment, and new variables to consider in reducing risk. Pediatrics 116:1245–1255, 2005
- Argenta LC, David LR, Wilson JA, Bell WO: An increase in infant cranial deformity with supine sleeping position. J Craniofac Surg 7:5-11, 1996
- Baumgartner JE, Seymour-Dempsey K, Teichgraeber JF, Xia JJ, Waller AL, Gateno J: Nonsynostotic scaphocephaly: the socalled sticky sagittal suture. J Neurosurg 101 (1 Suppl):16– 20, 2004
- Bradley JP, Shahinian H, Levine JP, Rowe N, Longaker MT: Growth restriction of cranial sutures in the fetal lamb causes deformational changes, not craniosynostosis. Plast Reconstr Surg 105:2416-2423, 2000
- Bruneteau RJ, Mulliken JB: Frontal plagiocephaly: synostotic, compensational, or deformational. Plast Reconstr Surg 89: 21-33, 1992
- Cohen MM Jr. Sutural biology and the correlates of craniosynostosis. Am J Med Genet 47:581-616, 1993
- Goodrich JT, Argamaso R: Lambdoid stenosis (posterior plagiocephaly) and craniofacial asymmetry: long-term outcomes. Childs Nerv Syst 12:720-726, 1996
- Huang MH, Mouradian WE, Cohen SR, Gruss JS: The differential diagnosis of abnormal head shapes: separating craniosynostosis from positional deformities and normal variants. Cleft Palate Craniofac J 35:204-211, 1998
- Losee JE, Feldman E, Ketkar M, Singh D, Kirschner RE, Westesson PL, et al: Nonsynostotic occipital plagiocephaly: radiographic diagnosis of the "sticky suture." Plast Reconstr Surg 116:1860-1869, 2005
- Martínez-Lage JF, Ruíz-Espejo AM, Gilabert A, Pérez-Espejo MA, Guillén-Navarro E: Positional skull deformities in children: skull deformation without synostosis. Childs Nerv Syst 22:368-374, 2006
- Moss SD: Nonsurgical, nonorthotic treatment of occipital plagiocephaly: what is the natural history of the misshapen neonatal head? J Neurosurg 87:667-670, 1997
- Mulliken JB, Vander Woude DL, Hansen M, LaBrie RA, Scott RM: Analysis of posterior plagiocephaly: deformational versus synostotic. Plast Reconstr Surg 103:371-380, 1999
- Persing J, James H, Swanson J, Kattwinkel J: Prevention and management of positional skull deformities in infants. American Academy of Pediatrics Committee on Practice and Ambulatory Medicine, Section on Plastic Surgery and Section on Neurological Surgery. Pediatrics 112:199-202, 2003
- Regelsberger J, Delling G, Helmke K, Tsokos M, Kammler G, Kränzlein H, et al: Ultrasound in the diagnosis of craniosynostosis. J Craniofac Surg 17:623-628, 2006
- Regelsberger J, Delling G, Tsokos M, Helmke K, Kammler G, Kränzlein H, et al: High-frequency ultrasound confirmation of positional plagiocephaly. J Neurosurg 105 (5 Suppl):413-417, 2006
- Rekate HL: Occipital plagiocephaly: a critical review of the literature. J Neurosurg 89:24–30, 1998

Address correspondence to: Jan Regelsberger, M.D., Neurochirurgische Klinik, Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany. email: j.regelsberger@uke.de.

Manuscript submitted March 24, 2009.

Accepted October 12, 2009

CHANGES TO THE CELL, TISSUE AND ARCHITECTURE LEVELS IN CRANIAL SUTURE SYNOSTOSIS REVEAL A PROBLEM OF TIMING IN BONE DEVELOPMENT

J. Regelsberger¹, P. Milovanovic^{2,3}, T. Schmidt¹, M. Hahn³, E. A. Zimmermann⁴, M. Tsokos⁵, J. Zustin⁶, R. O. Ritchie⁴, M. Amling³ and B. Busse^{3,4,*}

¹Department of Neurological Surgery, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany ²Laboratory for Anthropology, Institute of Anatomy, School of Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia ³Department of Osteology and Biomechanics, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany ⁴Materials Sciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, University of California – Berkeley, Berkeley, CA, USA

⁵Institute of Legal Medicine and Forensic Sciences, Charité - University Medicine Berlin, Berlin, Germany ⁶Institute of Pathology, University Medical Centre Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Abstract

Premature fusion of cranial sutures is a common problem with an incidence of 3-5 per 10,000 live births. Despite progress in understanding molecular/genetic factors affecting suture function, the complex process of premature fusion is still poorly understood. In the present study, corresponding excised segments of nine patent and nine prematurely fused sagittal sutures from infants (age range 3-7 months) with a special emphasis on their hierarchical structural configuration were compared. Cell, tissue and architecture characteristics were analysed by transmitted and polarised light microscopy, 2D-histomorphometry, backscattered electron microscopy and energy-dispersivex-ray analyses. Apart from wider sutural gaps, patent sutures showed histologically increased new bone formation compared to reduced new bone formation and osseous edges with a more mature structure in the fused portions of the sutures. This pattern was accompanied by a lower osteocyte lacunar density and a higher number of evenly mineralised osteons, reflecting pronounced lamellar bone characteristics along the prematurely fused sutures. In contrast, increases in osteocyte lacunar number and size accompanied by mineralisation heterogeneity and randomly oriented collagen fibres predominantly signified woven bone characteristics in patent, still growing suture segments. The already established woven-to-lamellar bone transition provides evidence of advanced bone development in synostotic sutures. Since structural and compositional features of prematurely fused sutures did not show signs of pathological/defective ossification processes, this supports the theory of a normal ossification process in suture synostosis - just locally commencing too early. These histomorphological findings may provide the basis for a better understanding of the pathomechanism of craniosynostosis, and for future strategies to predict suture fusion and to determine surgical intervention.

Keywords: Human craniosynostosis; sagittal suture; bone structure; bone histomorphometry; biomineralisation.

*Address for correspondence: Björn Busse Department of Osteology and Biomechanics (IOBM) University Medical Center Hamburg-Eppendorf Lottestr. 59, 22529 Hamburg, Germany Telephone Number: ++49-40-7410-56687 E-mail: b.busse@uke.uni-hamburg.de

List of abbreviations*

BMP-4	bone morphogenetic protein 4
CBFA1	core binding factor alpha 1
EDXA	energy dispersive X-ray analysis
FGFR	fibroblast growth factor receptor
FGF-2	basic fibroblast growth factor 2
IGF-1	insulin-like growth factor 1
(P)MMA	(poly)methylmethacrylate
qBEI	quantitative backscattered electron imaging
ROI	region of interest
SPP-1	secreted phosphoprotein 1, osteopontin
TGF-beta	transforming growth factor beta
TRAP	tartrate-resistant acid phosphatase
Wt%	weight percent
Δ width CaWt%	width of the calcium content distribution

* Histomorphometric indices are listed in Fig. 2.

Introduction

Craniosynostosis is a common malformation with an estimated incidence of 3-5 per 10,000 live births (Boyadjiev, 2007). The incidence of craniosynostosis has even increased, as recent findings have shown a rise from 2.6 per 10,000 live births in 1997 to 6.4 in 2007 (Kweldam et al., 2010). Moreover, a high incidence of medical problems among children with non-syndromic craniosynostosis (Boyadjiev, 2007) - particularly an increased intracranial pressure (Thompson et al., 1995a; Thompson et al., 1995b; Shimoji and Tomiyama, 2004), ophthalmological problems (Gupta et al., 2003), mental retardation, learning disabilities as well as emotional and behavioural problems (Hunter and Rudd, 1976; Fehlow, 1993; Kapp-Simon et al., 1993; Kapp-Simon, 1998; Magge et al., 2002; Shipster et al., 2003; Lekovic et al., 2004; Van der Vlugt et al., 2009) - has been reported. In particular, major malformations occurred in 22 % of patients with sagittal synostosis (Hunter and Rudd, 1976).



Cranial suture synostosis

In contrast to endochondral growth with ossification of a pre-existing cartilaginous matrix, cranial sutures act as intramembranous bone growth sites (Opperman, 2000). New bone is produced at the sutural edges by proliferation of mesenchymal cells and subsequent differentiation into bone-forming osteoblasts (Mathijssen *et al.*, 1999; Moenning *et al.*, 2009). The suture itself remains in a non-ossified stage in which maintenance of growth at the osteogenic fronts requires a balance between proliferation and differentiation of bone forming cells (Opperman, 2000). Disruption of any of these processes can result in premature fusion of calvarial sutures, known as craniosynostosis (Alden *et al.*, 1999).

Premature fusion of cranial sutures is a complex pathomechanism in which alterations in transcription factors, growth factors and their receptors may be the regulating items (Opperman, 2000; Jacob et al., 2007). In suture fusion, type 1 collagen, TGF-beta, FGFR and SPP-1 have been identified to be upregulated in the suture matrix, whereas CBFA1, FGF-2 and IGF-1 become expressed in the adjacent bone borders (Hunenko et al., 2001; Chong et al., 2003; Ignelzi et al., 2003; Eswarakumar et al., 2004; Tholpady et al., 2004; Mooney et al., 2007; Coussens et al., 2008; Moenning et al., 2009; Shen et al., 2009). These processes are most likely occurring in response to external stimuli like the expanding brain (Kokich, 1986; Davis et al., 2009; Oppenheimer et al., 2009). The internal periosteum under the dura mater and the external periosteum may influence bone formation and suture fusion, but the amount and nature of their influences as well as the exact signalling pathway in normal and pathological suture fusion are still unknown (Mooney et al., 2001; Shen et al., 2009; Slater et al., 2009; Wilczak and Ousley, 2009).

Based on studies in animals and clinical observations in humans, suture fusion in isolated synostosis seems to start at one undetermined point and spread along the suture (Cohen, 1993; Opperman, 2000; Regelsberger et al., 2009). This may explain why excellent cosmetic results are achieved by surgical resection in isolated craniosynostosis, if carried out early and before suture fusion is completed. In these cases, surgical resection of the fused suture interrupts the pathological process effectively, assuming that premature fusion is a focal process involving the affected suture and its adjacent bony plates (Cohen, 1993). Although progress has been made to elucidate the events surrounding the cranial suture's fate, predominantly on the molecular and genetic basis, the cause of premature fusion is unknown and much of the suture biology remains poorly understood (David et al., 1982; Kokich, 1986; Slater et al., 2009). In this context, data on bone structure and composition alongside the bony edges of sutures is extremely scarce or contradictory (Enlow, 1982; David et al., 1982; Kokich, 1986; De Pollack et al., 1996; Sherick et al., 2000; Vastardis et al., 2004; Regelsberger et al., 2009). Moreover, it is unknown whether the ossification process in craniosynostosis is pathological itself, or whether it just commences too early. Therefore, in this study we carried out a detailed comparison between patent and synostotic sagittal sutures of infants with special emphasis on the various hierarchical levels. In particular, we analysed the characteristics of the cell, tissue and architecture levels in control and craniosynostosis cases to provide new insights into the composition and morphology of both normal and synostotic sutures.

Materials and Methods

The study group was comprised of nine infants (age range: 3-7 months, mean: 4.4 months) with isolated i.e., nonsyndromic synostosis of the sagittal suture (Fig. 1a). The diagnostic procedure was based on clinical examination (characteristic skull deformity) and confirmed by near-field high-frequency ultrasound as previously suggested by Regelsberger et al. (2006). In the cases with prematurely fused sagittal sutures, the complete sagittal suture with the adjacent osseous tissue was resected during surgery (Fig. 1b,c). For the control group, corresponding patent sagittal suture samples were taken from nine infants of an equivalent age (age range: 3-7 months, mean: 4.7 months). The patent segments of the sagittal sutures were excised in the control cases during autopsy. The circumstances leading to their deaths were sudden infant death syndrome or other causes not related to central nervous system diseases or cranial vault pathological entities. Contact radiography of the excised suture segments demonstrated the presence or absence of synostosis (Fig. 1c,d). Micro-CT (µCT 40, Scanco Medical, Brüttisellen, Switzerland) scans of the specimens were taken perpendicular to the suture to illustrate the orientation that was used for the subsequent structural and compositional analyses (Fig. 1e,f). Informed written parental consent was obtained prior to our investigations. Furthermore, this study was in accordance with the local ethics regulations (Hamburgisches Gesetz- und Verordnungsblatt, Gesetz zur Regelung von klinischen, rechtsmedizinischen und anatomischen Sektionen (Sektionsgesetz 9-2-2000 §2)).

Undecalcified preparation of the specimens

A part of each resected sagittal suture (approximately 2 cm x 6 cm, red rectangle, Fig. 1a,b) was prepared in order to perform histological and compositional analyses. Specifically, two cores (approximate dimensions: 2 x 0.5 cm) per suture were excised perpendicular to the suture (in positions indicated by the dashed lines in Fig. 1c,d) to assess the structural and cellular indices of the sutures' bony edges in both the synostotic and the control samples. All samples were embedded in polymethylmethacrylate (PMMA) as described previously to allow artefact-free undecalcified preparation of bone tissue while preserving the bone matrix and cellular features (Hahn et al., 1991). In particular, prior to embedding, the samples were first fixed in 4 % phosphate-buffered formaldehyde and then dehydrated in an ascending ethanol series (70 %, 90 %, 100 % ethanol). Afterwards, the bone specimens were embedded without decalcification in MMA (Merck, Darmstadt, Germany). The destabilised MMA (Merck #8.00590) was augmented with LPG (nonylphenol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, #74430) as softener and benzoyl peroxide (Merck #801641) and N,N dimethyl-ptoluidine (DMPT) (Merck #822040) as initiator/catalyst. The polymerisation process was performed at a temperature





Fig. 1. (a) Computed tomography (CT) reconstructions of the skull of two infants with sagittal suture synostosis (side view: age 13 weeks, and top view: age 11 weeks) showing a premature closure of the sagittal suture, while the coronal suture (white arrows) and lambdoid suture (black arrows) show patency. In the course of surgery, the whole sagittal suture was resected with the adjacent osseous tissue (dotted red lines); (b) A part of the resected fused suture of approximately 6 x 2 cm (red rectangle) was obtained for this study. (c) Contact specimen x-ray (cranio-caudal projection) of the excised fused suture segment (age 13 weeks) showing dense mineralised bone parallel to the barely existing suture gap; (d) Contact specimen x-ray (cranio-caudal projection of the excised patent suture from a control case aged 12 weeks). The sutural gap can be observed as the radiolucent area between the mineralised bones of the cranium. The dashed lines in (c) and (d) mark the two adjacent regions used for the subsequent preparation of undecalcified histological blocks perpendicular to the suture; (e) Micro-CT scans of the sections perpendicular to a clinically fused suture showing a narrow gap, while in (f) a widely open suture gap is visible in a control case.





	ROI	2D Histomorphometry	Description	Units
al	Α	Gap Width	mean width of the sagittal suture	mm
	В	Fb.T.Pm/B.Pm	sutural bone perimeter covered by fibrous	%
			tissue per sutural bone perimeter	
tur	C, D	B.Ar/T.Ar	bone area per tissue area	%
ruc	C, D	O.Ar/B.Ar	osteoid area per bone area	%
St	C, D	O.Pm/B.Pm	osteoid perimeter per bone perimeter	%
	C, D	O.Th	osteoid thickness	μm
	C, D	N.On/B.Ar	number of osteon profiles per bone area	#/mm ²
Cellular indices	C, D	N.Ot.Lc/B.Ar	number of osteocyte lacunae per bone area	#/mm ²
	C, D	Ot.Lc.Ar	mean osteocyte lacunar area	μm ²
	C, D	N.Oc/T.Ar	number of osteoclasts per tissue area	#/mm ²
	C, D	Ob.Pm/B.Pm	bone perimeter covered by osteoblasts per	%
			bone perimeter	

Fig. 2. Schematic illustrating the histomorphometric measurements used to assess the cell and tissue characteristics of the sutures (Patent or unfused sagittal suture, von Kossa/van Gieson stain: mineralised bone tissue = black, soft tissue and osteoid = reddish tones). The gap width was measured in region of interest (ROI A) by means of a manually positioned grid (green gridlines) where the shortest distances (yellow arrows) from the gridlines to the opposed mineralised edge were randomly collected and averaged as the mean gap width. Note that 7 gridlines are shown here for illustration, while the true number of gridlines used for analysis depended on the size of suture margins and were positioned from inner periosteum (near the dura mater) to the outer periosteum edge of the suture. The sutural bone perimeter covered by fibrous tissue per bone perimeter (Fb.T.Pm/B.Pm; ROI B) represents a percentage of the sutural bone perimeter (shown by white dashed line) that is covered by dense irregular connective tissue. Further structural and cellular indices were assessed within the edges of the bony plates on each side of the suture (ROIs C and D) up to 3 mm lateral from the mineralised suture front, within the area indicated by the blue outline (for simplicity shown only on the right side). 2D histomorphometry was carried out in measuring fields that were moved (white rectangle with arrows) within the outlined area. Of note, the blue outline is drawn a little bit separated from the white dashed line for the sake of visibility, but the white dashed line actually represents the sutural bone perimeter.


of 4 °C. After the completion of polymerisation, the embedded suture samples had a cylindrical block shape, which is appropriate for microtome cutting. Eight cross-sections per PMMA-block (sixteen cross-sections per individual) with a thickness of approximately 4 μ m each were cut with a rotation microtome (Cut 4060 E, microTec, Walldorf, Germany) and stained with von Kossa/ van Gieson, toluidine blue, Goldner's modified Masson-trichrome, and tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). Four microscope slides per block were used for spreading 8 microtome cross sections.

Von Kossa with van Gieson counterstain (acidic fuchsin) was used to differentiate osteoid/collagen (red) from mineralised bone (black), while the toluidine blue and Goldner's modified Masson-trichrome stains were applied to examine the bone cell morphology, resorption cavities, mineralisation fronts and bone remodelling units (Vedi and Compston, 2003). In order to visualise osteoclast numbers, we applied Tartrate resistant acid phosphatase staining to the undecalcified bone sections (Vedi and Compston, 2003).

Static 2D-histomorphometry and qualitative analysis

Histologic sections stained by means of the von Kossa/van Gieson, Goldner's modified Masson-trichrome and toluidine blue protocols enabled static bone histomorphometry (Osteo, BioQuant Image Analysis Corp., Nashville, TN, USA; and Osteomeasure, OsteoMetrics, Decatur, GA, USA) in accordance with ASBMR (American Society of Bone and Mineral Research; www.asbmr.org) guidelines (Parfitt et al., 1987). Fig. 2 shows an example specimen of a von Kossa/van Gieson stained sagittal suture and illustrates the locations in the sutures where structural and cellular indices were assessed. The mean width of the sagittal suture (gap width, mm) was assessed by means of a manually positioned grid where the shortest distances from the gridlines to the opposed mineralised edge were determined by an interactive automatic procedure and averaged (for further explanation, see Fig. 2). The sutural bone perimeter covered by fibrous tissue per bone perimeter (Fb.T.Pm/B.Pm, %) was determined as the ratio between the perimeter of the sutural bony edges that is covered by the fibrous tissue (dense irregular connective tissue) and total perimeter of the sutural bone edges (see Fig. 2). Furthermore, structural indices were assessed at both the left and right osseous edges of the sagittal suture in the 3 mm-wide zones lateral to the mineralised suture front. The total area of the tissue profile used for quantitative evaluation was 7-9 mm² per suture edge, i.e., 14-18 mm² per section. Measuring fields covered this complete area of interest, while size and number of fields depended on the microscopic magnification (which depends on the evaluated parameter). The following structural indices were measured in these regions: bone area per tissue area (B.Ar/T.Ar, %), osteoid area per bone area (O.Ar/B. Ar, %), osteoid perimeter per bone perimeter (O.Pm/B. Pm, %), osteoid thickness (O.Th, µm) and number of osteon profiles per bone area (N.On/B.Ar, #/mm²). The Osteomeasure system was used to automatically calculate osteoid thickness, which requires manual marking of the inner and outer boundary of osteoid. According to the

underlying 2D histomorphometry approach, only osteon profiles that had been cut transversally or obliquely were counted. Considering the guidelines from Parfitt et al. (1987), "bone area" refers to both mineralised and osteoid areas. The following cellular indices were evaluated: number of osteocyte lacunae per bone area (N.Ot.Lc/B. Ar, #/mm²), mean osteocyte lacunar area (Ot.Lc.Ar, μm²), number of osteoclasts per tissue area (N.Oc/T.Ar, #/mm²) and bone perimeter covered with osteoblasts per bone perimeter (Ob.Pm/B.Pm, %). These parameters provided individual classification of the bone status in the adjacent bony plates of patent and fused sutures (Fig. 2). The term "osteoblasts" as used in this study refers to surface osteoblasts, unless specified otherwise. Image analysis segmentation included the selection of a threshold corresponding to the mineralised bone plus osteoid for the Bioquant software (for B.Ar/T.Ar), while other parameters were thresholded manually to obtain the corresponding ratios via the Osteomeasure system. For quantification of osteoblasts and osteoclasts, toludine blue- and TRAPstained sections were used, while Goldner staining was used to determine Fb.T.Pm/B.Pm.

In addition to the quantitative analysis, further qualitative analyses were carried out to investigate whether the ossification bears any signs of pathological conditions (i.e., peculiar characteristics of: (a) cellular presence, appearance and number; (b) architecture/arrangement of the bone tissue; (c) presence/absence of resorption cavities; (d) relative thickness of bone compartments; (e) presence/ absence of mosaic organisation, mineralisation degree and mineralisation patterns).

Polarised light microscopy

In histological sections, the orientation of the collagen fibrils in the bone tissue can be illustrated under linearly polarised light. Collagen fibrils or bundles of fibrils, which are cut longitudinally and run parallel to the polariser or analyser plane, appear bright on the dark background, while cross-sectioned fibrils or fibres appear dark. The application of linearly polarised light on histological sections ensured a qualitative assessment of the osseous maturation, i.e., distinction between woven and lamellar bone, within the segments of the infants' sutures.

Energy dispersive x-ray microanalysis

The plastic-embedded block specimens were polished at the surface and carbon coated for scanning electron microscopy and non-destructive microanalysis with EDXA (energy dispersive x-ray analysis; EDAX, DX-4, Mahwah, NJ, USA) allowing spatial investigation of the elemental concentrations (Busse et al., 2010a; Busse et al., 2010b). It is necessary to note that depending on the electron beam settings, damage to the surface of the polished block may occur during the EDXA (Bloebaum et al., 2005). To analyse the elemental composition of the sutural soft tissue, EDXA was performed in three regions of interest (ROI): the connective tissue in the centre of the suture gap, and in the soft tissue adjacent to each of the sutural margins where initial ossification is expected. These ROIs were 0.01 mm² in size, each. Elemental peaks reflecting pronounced calcium (Ca), phosphorus (P), oxygen (O)



and sulphur (S) contents in the suture were evaluated in weight percent (Wt-%) by means of EDX-ZAF software provided by the manufacturer (EDAX, DX-4). Hence, EDXA quantifies the relative contribution of each of the detected elements (within the ROI) to 100 %.

Bone mineral density distribution analysis

The backscattered electron (BSE) mode of scanning electron microscopy was used to assess the degree of mineralisation in the bony plates lateral to the sagittal suture over an area similar to that used for the histomorphometric assessment. The application is based on previous work that established quantitative backscattered electron imaging (qBEI) (Roschger et al., 1995; Roschger et al., 1998). The scanning electron microscope (LEO 435 VP, LEO Electron Microscopy Ltd., Cambridge, England) was operated at 15 kV and 665 pA at a constant working distance (BSE Detector, Type 202, K.E. Developments Ltd., Cambridge, England) in line with our previous studies (Busse et al., 2009; Busse et al., 2010a, 2010b). The pixel size was 3 µm according to the recommendations of Roschger et al. (Roschger et al., 2008). Synthetic hydroxyapatite samples were used to create a calibration curve. These hydroxyapatite samples (DOT Medical Solutions, Rostock, Germany) contained different Ca/P ratios, which were determined using energy dispersive x-ray analysis (DX-4, EDAX) and qBEI. A highly linear relationship (r = 0.98) between the grey values of the backscattered signal intensities and the calcium content (CaWt%) in each sample has also been reported by other authors (Skedros *et al.*, 1993; Roschger *et al.*, 1995; Roschger *et al.*, 1998), which enables calibration of the method. The generated mineralisation profiles (grey value histograms) for each specimen represent the mean calcium weight percent (mean CaWt%) and indicate the average calcium content in the mineralised bone tissue area, while the width calcium value (Δ width CaWt%) reflects the homogeneity of mineralisation, i.e., the width of the calcium content distribution in the given bone area.

Statistical Analysis

The data were subjected to the Shapiro-Wilk test to define the distribution. In the case of normally distributed data, a *t*-test was used for comparisons. Non-parametric data were analysed by the paired Wilcoxon rank sum test. *P*-values of $p \le 0.05$ were considered to be significant.

Results

Static 2-D histomorphometry

In line with qualitative contact x-ray analyses, the patent segments demonstrated a wide-open sutural gap (Fig. 3a; Table 1) in contrast to the very narrow gaps in prematurely

Table 1: Histomorphometric assessment of structural indice	ic assessment of structural indices.	Table 1: Histomorphometric
---	--------------------------------------	----------------------------

	2D Histomorphometry	Localisation	Patent Suture	Fused Suture	р
Structural indices	Gap Width [mm]	sutural gap	1.23 ± 0.32	0.48 ± 0.14	\leq 0.0005
	Fb.T.Pm/B.Pm [%]	sutural gap	86.71 ± 9.1	13.29 ± 16.69	\leq 0.0005
	B.Ar/T.Ar [%]	sutural edges	61.88 ± 9.72	57.92 ± 7.81	N.S.
	O.Ar/B.Ar [%]	sutural edges	4.62 ± 0.59	3.58 ± 0.76	\leq 0.05
	O.Pm/B.Pm [%]	sutural edges	35.91 ± 4.45	34.79 ± 4.48	N.S.
	Ο.Th [μm]	sutural edges	8.23 ± 0.66	7.33 ± 0.58	\leq 0.05
	N.On/B.Ar [#/mm²]	sutural edges	2.87 ± 1.9	8.10 ± 1.27	≤ 0.005

N.S.= not significant

For abbreviations, see Fig. 2

Table 2: Histomorphometri	c assessment	of	cellular	indices
---------------------------	--------------	----	----------	---------

	2D Histomorphometry	Localisation	Patent Suture	Fused Suture	р
Cellular indices	Ob.Pm/B.Pm [%]	sutural edges	40.29 ± 15.29	24.53 ± 2.68	≤0.05
	N.Ot.Lc/B.Ar [#/mm ²]	sutural edges	445.85 ± 46.16	251.28 ± 79.84	\leq 0.0005
	Ot.Lc.Ar [µm ²]	sutural edges	138.41 ± 14.77	121.60 ± 9.03	≤ 0.005
	N.Oc/T.Ar [#/mm ²]	sutural edges	8.5 ± 1.66	16.4 ± 2.24	≤ 0.005

For abbreviations, see Fig. 2





Fig. 3. Undecalcified histological sections of patent segments from sagittal sutures (**a**) showed wide-open fibrous tissue gaps in comparison to (**b**) the narrow suture gaps in clinically fused segments (mineralised bone tissue = black, soft tissue = red; von Kossa/van Giesson); (**c**) Patent sutures indicated an increased amount of collagen fibres (stained in red, black arrows); the fibres frequently were oriented at a roughly 45° angle to the mineralised fronts of the sutural bony edges (stained in green, Goldner's trichrome stain), but some fibres did show other oblique angles; (**d**) The specimens from the cases with clinically fused sutures showed significantly narrower suture gaps with minor amounts of frayed dense irregular connective tissue between smooth outlines of the adjacent mineralised bone (black arrows; Goldner's trichrome stain).



Fig. 4. Pattern of trabecular orientation in patent sutures: (a) bright field low-power image (von Kossa/van Gieson); (b) polarised light high-power image. Mineralised bone trabeculae (white arrows) seem to follow the orientation of pre-existing mesenchymal tissue and collagen fibres (black arrows).





Fig. 5. (a) A Von Kossa/Van Gieson stained specimen from one of two patients with complete fusion of the sagittal suture (both 4.5 months old), showing bridged sutural margins with two small islands of remnant sutural connective tissue (arrow) in the centre of the former suture gap; (b) A high power Goldner's trichrome staining showing the former suture gap, which is bridged by mineralised bone (see (a)).

fused sutures (Fig. 3b; Table 1). The ratio of bone area per tissue area was unchanged in patent segments compared to fused segments (Table 1). In contrast, the sutural edges of patent segments demonstrated an increased amount of frayed dense irregular connective tissue (Fig. 3c; Table 1), compared to already fused sutures (Fig. 3d; Table 1). The pronounced colour differentiation between the green-stained mesenchymal tissue and the red-stained fibres was a specific feature of patent sutures in Goldner's modified Masson-trichrome staining (Fig. 3c). The pattern of collagen fibre orientation and trabecular alignment is shown in Fig. 4. In two infants with craniosynostosis, the bony fusion process was almost complete indicating true synostosis (Fig. 5).

Osseous suture margins of patent segments showed an increased presence of prominent osteoblastic cells with a regular cuboidal shape (Fig. 6a; bone perimeter covered with osteoblasts per bone perimeter: Table 2), whereas the fused segments demonstrated a smaller osteoblast population (Fig. 6b, Table 2). These osteoblasts in fused

cases were rather flat-shaped, which is indicative of a quiescent phase and lower bone-forming ability (Fig. 6b). Accordingly, the fused sutures showed a reduced osteoid area per bone area, as well as a decreased osteoid thickness (Fig. 6c,d; Table 1). An increased number of osteon profiles per bone area (N.On/B.Ar, #/mm²) was measured in fused segments (Fig. 6d; Table 1), in contrast to lower numbers of osteons in patent sutures (Fig. 6c; Table 1). In contrast to the patent sutures, pronounced internal osteoclastic resorption in the bone plates of prematurely fused sutures was suggested by the appearance of numerous osteoclasts (Fig. 6b; Table 2; also evidenced by their TRAP positivity – Fig. 6e,f) in Howship's lacunae.

In patent segments, higher numbers of osteocyte lacunae (N.Ot.Lc/B.Ar, #/mm²) with no specific alignment were observed (Fig. 6g; Table 2), whereas in fused segments, the osteocyte lacunar density was significantly lower (Fig. 6h; Table 2). The average osteocyte lacunar size (Ot.Lc.Ar, μ m²) decreased significantly in fused sutures in comparison to the patent ones (Fig. 6g,h; Table 2).

Fig. 6 (on next page). (a) In patent sutures, there were seams of osteoid-secreting regular cube-shaped osteoblasts (OBL) that were forming osteons infrequently within predominantly woven bone area (osteoid = light blue, mineralised bone = blue; toluidine blue); (b) In contrast, bone of the fused sutures showed lower osteoblast numbers (OBL) in contrast to numerous osteoclasts (OCL) in Howship's lacunae on the endosteal side of the bone bordering the remaining sutural gap, indicating a more advanced stage of bone restructuring (toluidine blue); (c) The amount of osteoid area (black arrows) per bone area showed increased values accompanied by low numbers of osteon profiles per bone area in patent sutures (osteoid = red, mineralised bone = green; Goldner's trichrome stain); (d) In contrast, fused sutures revealed decreased areas of osteoid (black arrows) per bone area accompanied by elevated numbers of osteon profiles that interrupt remnant cellular woven bone areas (WB) (Goldner's trichrome stain). (e). In patent sutures, a lower number of osteoclasts (OCL) per bone area in comparison to fused sutures (f) was further confirmed by the red TRAP-staining; (g) Bony edges of patent sutures display more numerous irregularly sized osteocyte lacunae indicating the woven bone, along with inserting collagen fibers from the suture (mineralised bone tissue = black, soft tissue and osteoid = reddish tones; von Kossa/van Gieson); (h) In contrast, osteocyte lacunae in fused segments were smaller and less densely arranged (von Kossa/van Gieson).



Fused Suture Patent Suture b OB OBL OBL OCL C WB 65 µm 65 µm f e OCL 10 OCL OCI 25 µm 25 µm TIM









Fused Suture









Fig. 7 (on previous page). Energy dispersive x-ray analysis of the suture centre and soft tissue near the suture margins in the patent sutures (a) and fused sutures (b). In both the patent and fused sutures, significantly increased proportions of calcium (Ca) and sulphur (S) were found near the edges of the suture gap in comparison to the suture centres, probably indicating an increased amount of calcium available for mineralisation and sulphated glycosaminoglycans triggering this process; (c) Under polarised light, patent sutures showed evidence of woven bone formation, while in fused sutures (d) lamellar organisation (white arrows) of the collagen fibrils was evident where focal existence of these matured osteonal entities interrupts the remaining woven bone characteristics (toluidine blue, polarised light); (e) Bone mineral density distribution analyses revealed predominantly inhomogeneous, mineralised woven bone and a fraved, low-mineralised sutural surface (arrows) in patent sutures, while bony plates alongside the fused segments (f) revealed frequently evenly mineralised secondary osteons (asterisks) and smooth mineralised periosteal outlines (arrows) (bluish pixels = low mineral content, greenish pixels = higher mineral content, pseudocoloured quantitative backscattered image); (g) Details from backscattered electron images of the patent (left image) and fused suture (right image): a fraved sutural outline and woven bone characteristics in the patent sutural edge vs. frequent osteonal features (asterisks) with thin cement lines (white arrows) in the clinically fused sutural margins; (h) The overall mean calcium weight percent (mean Ca, Wt%) as a measure of the average calcium content in the detected bone area showed no significant differences between the patent and fused sutures. However, the width calcium value (width Ca, Wt%), a measure of the statistical distribution of various calcium concentrations within the detected bone area, was significantly higher in the suture margins of patent sutures (a: $p \le 0.05$), demonstrating a more heterogeneous calcium distribution in these samples. In contrast, fused cases demonstrated more homogenous mineralisation in the bony plates of fused sutures due to a predominance of evenly mineralised osteons occupying the observed bone area.

Energy dispersive x-ray microanalysis

Elemental spectra obtained from microanalysis (Fig. 7a,b) at both the centres of sutural gaps and the tissue adjacent to sutural margins showed distinctive elemental peaks of carbon (C), oxygen (O), sodium (Na), magnesium (Mg), phosphorus (P), chloride (Cl), potassium (K), sulphur (S) and calcium (Ca). In particular, the proportion of calcium (Ca) and sulphur (S) was significantly greater near the suture margins in comparison to the suture centres. This difference was evident in both the patent segments (Ca: 0.2 ±0.04 Wt% vs. 0.10 ±0.01 Wt%; $p \le 0.005$ and S: 0.24 ±0.08 Wt% vs. 0.13 ±0.02 Wt%; $p \le 0.05$) and fused segments (Ca: 0.17 ±0.02 Wt% vs. 0.10 ±0.03 Wt%; $p \le 0.005$ and S: 0.16 ±0.01 Wt% vs. 0.09 ±0.03 Wt%; $p \le 0.05$). Elemental composition did not differ between the analysed regions of patent vs. fused sutures.

Polarised light microscopy

Patent suture segments revealed a predominance of bright collagen fibres in the bone plates, which were perpendicular to each other without any specific lamellar organisation (Fig. 7c). This fibre pattern, together with the assessed cellular and structural histomorphometric indices, confirmed the presence of woven bone in patent segments. In contrast, polarised light microscopy demonstrated that fused segments had an increased number of osteons revealing a lamellar organisation of collagen fibrils (Fig. 7d).

Analysis of the bone mineral density distribution

Bone mineral density distribution measurements by quantitative backscattered electron imaging (qBEI) in synostotic cases revealed a significant difference in terms of the mineral distribution compared to patent sutures (Fig. 7e,f,g,h). The mean calcium content in the mineralised bone tissue area did not differ significantly between the patent and prematurely fused sutures (mean Ca: 18.09 ± 1.5 Wt% vs. 17.34 ± 1.88 ; $p \ge 0.05$) (Fig. 7h). However, patent

segments revealed a significant increase in mineralisation heterogeneity as reflected in the higher calcium width (Δ width Ca: 8.59 ±0.32 Wt% vs. 7.30 ±0.75 Wt%; $p \le 0.05$) (Fig. 7h). While patent sutural margins showed dominant woven bone features and frayed mineralisation fronts (Fig. 7e,g – left upper image), the bony plates in prematurely fused sutures (Fig. 7f,g – right image) revealed the predominance of osteonal features (asterisks) – with thin cement lines (white arrows in right lower image), accompanied by smooth mineralised sutural outlines (Fig. 7f, g – right upper image), as observed in the backscattered electron images. However, the osteocyte lacunae present in the patent sutures were disorganised (Fig. 7g – left image) and did not seem to be systematically connected to each other through canaliculi as in the fused cases.

Discussion

Bone growth at sutures encompasses a series of cellular activities: recruitment of mesenchymal cells to osteogenic cell lineage, stimulation of osteoblast proliferation and differentiation, as well as matrix mineralisation at the osteogenic front (Mao and Nah, 2004). However, progression of osteogenesis requires strict control at the advancing osteogenic fronts to preserve sutural disposition (Opperman, 2000; Mao and Nah, 2004). Skull growth and suture patency are based on simultaneous balanced increases in the synthesis of extracellular matrices of both fibrogenic and osteogenic cells; in this case, expansion of the fibrogenic component denies suture closure, while the expansion of the osteogenic cells and matrix increases the bone's size (Mao and Nah, 2004). In a competition between fibrogenic and osteogenic cells and/or factors (Mao and Nah, 2004), timely osteoblastic predominance is necessary to replace the fibrogenic component and to achieve timely suture closure essential for normal skull growth and development (De Pollack et al., 1996). Therefore,



although in our assessment minor amounts of dense irregular connective tissue still appeared within clinically fused sutures, its diminished quantity in comparison to the control group of a corresponding age indicated that early osteoblastic predominance and/or fibroblast retreat led to premature clinically detectable suture fusion in infants.

In the fused suture segments, a quiescence phase of bone forming activity was observed from the less numerous and rather flat-shaped osteoblasts along with reduced osteoid seams (Miller et al., 1980; Nishino et al., 2001; Rosen, 2004; Amizuka et al., 2005). The observed differences in osteoblast number and shape between patent and fused sutural segments suggest that these two features are associated with different maturation stages in the course of suture development. Thus, nearly complete bone forming cycles were evident in prematurely fused sutures. In addition, the observed lower values of osteoid area per bone area in prematurely closed sutures are compatible with the findings on adult parietal bones with completed growth (Torres-Lagares et al., 2010). The observed shift to more osteoclastic activity in fused segments indicates an advanced stage of bone development where remodelling occurs to resorb woven bone in favour of the formation of secondary bone.

An increased osteocyte lacunar density assessed in the bony edges of patent sutures is in agreement with rare data on osteocyte number and morphology in woven bone (Hernandez et al., 2004). Woven bone osteocytes in an early phase of osteogenesis show shorter dendritic processes and do not express any particular alignment within the bone matrix. The osteocytes in woven bone are immature antecedents of lamellar bone osteocytes (Kusuzaki et al., 2000), which supports the observation that normal and prematurely closed sutures in agematched infants reflect two different stages of normal bone development. Nevertheless, owing to sutural bone maturation, fused sutures demonstrated a significantly lower number of osteocyte lacunae. However, the measured osteocyte lacunar number in prematurely fused sutures is still higher than in adult human parietal bone (Torres-Lagares et al., 2010). Thus, the decreasing osteocyte lacunar number with bone maturation may reflect a "timeline" of cranial bone maturation: (1) immature phase in patent sutures, (2) advanced maturation level in prematurely fused sutures, and (3) completely developed adult cranial bone. In addition, our study revealed larger osteocyte lacunae in the woven bone of patent suture margins. In this context, previous studies have shown that increased osteocyte lacunar size can be associated with a calcium deficiency of various aetiologies (Salomon, 1971; Bonucci and Gherardi, 1977; Sissons et al., 1984; Lane et al., 2006; Lane and Yao, 2010). Therefore, large lacunae might reflect a relative calcium deficiency due to a high demand for calcium during rapid formation of woven bone (Ardizzoni, 2001; Li et al., 2006; Mulder et al., 2008), in contrast to smaller lacunae found in the more mature bone of fused suture segments.

Previous studies reported locally enhanced boneforming activity in craniosynostosis. Increased parameters of osteoblastic cell differentiation indicated that elevated osteoblast maturation at the suture leads to premature ossification in non-syndromic craniosynostosis (De Pollack et al., 1996; Shevde et al., 2001). Cultured rabbit bone cells involved in craniosynostosis showed a pronounced response to recombinant human BMP-4 stimulation (Cooper et al., 2010), while human cells from patent sutures showed a weaker response to osteogenic stimuli (Coussens et al., 2009). In our study, EDXA in both patent and fused segments revealed slightly increased concentrations of calcium and phosphorus in the connective tissue near the suture margins (i.e., facing the mineralisation fronts) when compared to the centre of the suture gap. The simultaneous appearance of sulphur at these sites denotes the presence of matrix glycosaminoglycans, but also might suggest the presence of a moiety for attaining high local concentrations of calcium and phosphorus essential for the controlled local formation of calcium phosphate, as suggested by Arsenault and Ottensmever (1984). Backscattered electron analyses of the bone edges showed different mineralisation patterns in patent vs. fused sutures. A large part of the bone mineral is initially deposited quickly during the first days (Frost, 1963; Parfitt, 1987; Jee, 2001), and only a minor portion of the bone mineral is added slowly over months or years during the secondary mineralisation phase (Frost, 1963; Parfitt, 1987; Jee, 2001). This fact may explain our observation of similar calcium contents between the immature sutural bone and the more advanced bone in fused cases. Although woven bone areas have been reported to be more mineralised than the lamellar bone (Currey, 1998), our analyses at sutural edges may not have shown a significant result because of the existence of irregular low mineralised fronts in patent sutures and various mineralisation spots. However, we found that patent segments showed more mineralisation heterogeneity, which can be attributed to rapid bone formation and mineral deposition in woven bone (Rosen, 2004; Li et al., 2006; Mulder et al., 2008). In contrast, the fused segments demonstrated advanced modelling of the bony edges, which is reflected in the decreased calcium width. This homogeneous mineralisation profile in fused segments, together with the obtained histomorphometric data, demonstrates that with fusing, the woven bone is replaced by successive formation of secondary bone.

Despite the general expectation for similarities between suture growth and distraction osteogenesis/defect healing, our findings add new evidence that distraction osteogenesis might not be a reliable model for sutural growth and premature suture closure. Whereas in distraction gaps the tissue between the ends of the mineralised bone is first subject to bleeding, coagulation, granulation tissue and fibrosis (Kokich, 1976; Shapiro, 2008), bone directly develops at the suture edges in craniosynostosis. In addition, in contrast to the distraction gap (Yasui *et al.*, 1997; Jazrawi *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 1998; Ploder *et al.*, 2002; Lafuente *et al.*, 2009; Forriol *et al.*, 2010), our analyses of sutural sites showed no verification of enchondral and transchondroid types of osteogenesis.

Our analyses at various analytical levels provide new insights into the cellular, architectural and compositional characteristics of normal (patent) *vs.* "pathological" (prematurely ossified) sutures. Namely, we have observed that the prematurely fused bony edges show a matured



bone structure at all investigated levels. Hence, the developed pattern of lamellar bone points to an advanced stage in the sequence of normal bone development in contrast to the immature woven bone observed at the bony edges of the patent sutures. However, our findings raise additional questions that have not been addressed so far. For instance, considering the differences at all the investigated levels in craniosynostosis, it is not known whether the ossification process occurs early but with normal characteristics, or whether it might represent a pathological entity. As several metabolic and genetic bone diseases are known to be accompanied by pathological ossification processes (Elster et al., 1992; Koehler et al., 2003; Krimmel et al., 2004), some may be associated with secondary craniosynostosis (Koehler et al., 2003); however, there are no directly comparable studies on appropriate human skull bones. Based on the known characteristics of pathological ossification at other bone sites (e.g., osteoid characteristics, cellular characteristics, tissue organisation, mineralisation - Khurana, 2009), the structural and compositional features that we observed in prematurely fused sutures do not favour a true pathological or defective ossification process. Therefore, our data on non-syndromic prematurely fused sutures are in agreement with the theory of a normal ossification process that simply commences too early (Opperman, 2000). The timing of suture fusion and its underlying regulating signals seem to be the key points in craniosynostosis where premature fusion of cranial sutures may be understood as a normal fusion process that starts prematurely.

Several limitations of the study have to be taken into account. As this study has a cross-sectional design, an individuals' time course of osteogenesis and suture closure during growth is not directly assessable. Therefore, our study exclusively compares a control group and a craniosynostosis group of age-matched individuals. Although such study designs can be of particular interest in bone research when a longitudinal study cannot be done due to obvious ethical and practical constraints, the obtained data cannot compensate for demonstrating dynamic and temporal processes in craniosynostoses.

Conclusions

In conclusion, combined analyses at the cellular, material and structural levels of the sutures suggested that the bone segments in patent *vs*. fused sutures are associated with different stages in the course of normal osteogenesis process. Bony edges in fused suture segments showed various morphological features indicative of their more advanced stage in bone development/maturation, without any clues of a pathological or defective process of ossification. Therefore, our data support the theory of a normal ossification process in suture synostosis that simply commences too early. These findings may provide a basis for future strategies aiming to further understand craniosynostosis, predict suture fusion and determine the time point for surgical intervention.

Disclosures

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

The authors would like to thank the scientific editor, Prof. Dr. Hanns Plenk, for many detailed and very helpful comments. Moreover, we thank Marija Djuric and Brian Panganiban who provided helpful comments and research support on the manuscript. Petar Milovanovic thanks the Ministry of Science of Republic of Serbia, Pr.Nr: III45005. Björn Busse is a fellow of the DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft; BU 2562/1-1).

References

Alden TD, Lin KY, Jane JA (1999) Mechanisms of premature closure of cranial sutures. Childs Nerv Syst **15**: 670-675.

Amizuka N, Li M, Nasu M, Maeda T, Shimomura J (2005) Histological evaluation for "bone quality" on two mouse models with different bone remodeling. J Bone Miner Metab **23**: 43-47.

Ardizzoni A (2001) Osteocyte lacunar size-lamellar thickness relationships in human secondary osteons. Bone **28**: 215-219.

Arsenault AL, Ottensmeyer FP (1984) Visualization of early intramembranous ossification by electron microscopic and spectroscopic imaging. J Cell Biol **98**: 911-921.

Bloebaum RD, Holmes JL, Skedros JG (2005) Mineral content changes in bone associated with damage induced by the electron beam. Scanning **27**: 240-248.

Bonucci E, Gherardi G (1977) Osteocyte ultrastructure in renal osteodystrophy. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **373**: 213-231.

Boyadjiev SA (2007) Genetic analysis of nonsyndromic craniosynostosis. Orthod Craniofac Res **10**: 129-137.

Busse B, Hahn M, Soltau M, Zustin J, Püschel K, Duda GN, Amling M (2009) Increased calcium content and inhomogeneity of mineralization render bone toughness in osteoporosis: Mineralization, morphology and biomechanics of human single trabeculae. Bone **45**: 1034-1043.

Busse B, Djonic D, Milovanovic P, Hahn M, Püschel K, Ritchie RO, Djuric M, Amling M (2010a) Decrease in the osteocyte lacunar density accompanied by hypermineralized lacunar occlusion reveals failure and delay of remodeling in aged human bone. Aging Cell 9: 1065-1075.

Busse B, Jobke B, Hahn M, Priemel M, Niecke M, Seitz S, Zustin J, Semler J, Amling M (2010b) Effects of strontium ranelate administration on bisphosphonatealtered hydroxyapatite: Matrix incorporation of strontium is accompanied by changes in mineralization and microstructure. Acta Biomater 6: 4513-4521.



274: 962-971.

O, Opperman LA, Siegel MI, Mooney MP (2003) Rescue of coronal suture fusion using transforming growth factor-beta 3 (TGF-beta 3) in rabbits with delayed-onset

craniosynostosis. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol Cohen MM Jr (1993) Sutural biology and the correlates of craniosynostosis. Am J Med Genet 47: 581-616.

Cooper GM, Lensie EL, Cray JJJ, DeCesare GE, Smalley MA, Losee JE, Mooney MP (2010) BMP-4 response in wild-type and craniosynostotic rabbit bone cells. Plast Reconstr Surg 125: 1403-1411.

Coussens AK, Hughes IP, Wilkinson CR, Morris CP, Anderson PJ, Powell BC, van Daal A (2008) Identification of genes differentially expressed by prematurely fused human sutures using a novel in vivo - in vitro approach. Differentiation 76: 531-545.

Coussens AK, Hughes IP, Morris CP, Powell BC, Anderson PJ (2009) In vitro differentiation of human calvarial suture derived cells with and without dexamethasone does not induce in vivo-like expression. J Cell Phys 218: 183-191.

Currey J (1998) Mechanical properties of vertebrate hard tissues. Proc Inst Mech Eng H J Eng Med 212: 399-411.

David DJ, Poswillo DE, Simpson DA (1982) The Craniosynostoses. Causes, Natural History, and Management. Springer, Berlin.

Davis C, Windh P, Lauritzen CG (2009) Spring-assisted cranioplasty alters the growth vectors of adjacent cranial sutures. Plast Reconstr Surg 123: 470-474.

De Pollack C, Renier D, Hott M, Marie PJ (1996) Increased bone formation and osteoblastic cell phenotype in premature cranial suture ossification (craniosynostosis). J Bone Miner Res 11: 401-407.

Elster AD, Theros EG, Key LL, Chen MY (1992) Cranial imaging in autosomal recessive osteopetrosis. Part II. Skull base and brain. Radiology 183: 137-144.

Enlow DH (1982) Handbook of Facial Growth. WB Saunders, Philadelphia.

Eswarakumar VP, Horowitz MC, Locklin R, Morriss-Kay GM, Lonai P (2004) A gain-of-function mutation of Fgfr2c demonstrates the roles of this receptor variant in osteogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 101: 12555-12560.

Fehlow P (1993) Craniosynostosis as a risk factor. Childs Nerv Sys 9: 325-327.

Forriol F, Denaro L, Longo UG, Taira H, Maffulli N, Denaro V (2010) Bone lengthening osteogenesis, a combination of intramembranous and endochondral ossification: an experimental study in sheep. Strategies Trauma Limb Reconstr 5: 71-78.

Frost HM (1963) Bone Remodeling Dynamics. Thomas, Springfield, IL.

Gupta PC, Foster J, Crowe S, Papay FA, Luciano M, Traboulsi EI (2003) Ophthalmologic findings in patients with nonsyndromic plagiocephaly. J Craniofac Surg 14: 529-532.

Hahn M, Vogel M, Delling G (1991) Undecalcified preparation of bone tissue: report of technical experience and development of new methods. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 418: 1-7.

Hernandez CJ, Majeska RJ, Schaffler MB (2004) Osteocyte density in woven bone. Bone 35: 1095-1099.

Hunenko O, Karmacharya J, Ong G, Kirschner RE (2001) Toward an understanding of nonsyndromic craniosynostosis: altered patterns of TGF-beta receptor and FGF receptor expression induced by intrauterine head constraint. Ann Plast Surg 46: 546-554.

Hunter AGW, Rudd NL (1976) Craniosynostosis. I. Sagittal synostosis; Its genetics and associated clinical findings in 214 patients who lacked involvement of the coronal suture(s). Teratol 14: 185-193.

Ignelzi MA, Jr., Wang W, Young AT (2003) Fibroblast growth factors lead to increased Msx2 expression and fusion in calvarial sutures. J Bone Miner Res 18: 751-759.

Jacob S, Wu C, Freeman TA, Koyama E, Kirschner RE (2007) Expression of Indian Hedgehog, BMP-4 and Noggin in craniosynostosis induced by fetal constraint. Ann Plast Surg 58: 215-221.

Jazrawi LM, Majeska RJ, Klein ML, Kagel E, Stromberg L, Einhorn TA (1998) Bone and cartilage formation in an experimental model of distraction osteogenesis. J Orthop Trauma 12: 111-116.

Jee WSS (2001) Integrated bone tissue physiology: Anatomy and physiology. In: Bone Mechanics Handbook (Cowin SC, ed), CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1.1-1.68.

Kapp-Simon KA (1998) Mental development and learning disorders in children with single suture craniosynostosis. Cleft Palate Craniofac J 35: 197-203.

Kapp-Simon KA, Figueroa A, Jocher CA, Schafer M (1993) Longitudinal assessment of mental development in infants with nonsyndromic craniosynostosis with and without cranial release and reconstruction. Plast Reconstr Surg 92: 831-839.

Khurana J (2009) Bone pathology. Humana Press, Philadelphia.

Koehler A, Zimmer E-A, Freyschmidt J, Brossmann J. Wiens J. Sternberg A (2003) Koehler/Zimmer's Borderlands of Normal and Early Pathological Findings in Skeletal Radiography. Thieme, Stuttgart.

Kokich VG (1976) Age changes in the human frontozygomatic suture from 20 to 95 years. Am J Orthod **69**: 411-430.

Kokich VG (1986) Biology of sutures. In: Craniosynostosis: Diagnosis, Evaluation, and Management (Cohen MMJ, ed), Raven, New York, pp 81-103.

Krimmel M, Niemann G, Will B, Reinert S (2004) Surgical correction of craniosynostosis in malignant osteopetrosis. J Craniofac Surg 15: 218-220.

Kusuzaki K, Kageyama N, Shinjo H, Takeshita H, Murata H, Hashiguchi S, Ashihara T, Hirasawa Y (2000) Development of bone canaliculi during bone repair. Bone 27: 655-659.

Kweldam CF, van der Vlugt JJ, van der Meulen JJNM (2010) The incidence of craniosynostosis in the Netherlands, 1997-2007. J Plast Reconstr Aesthet Surg 64: 583-588.

Lafuente P, Franch J, Durall I, Manzanares C (2009) Experimental study of bone lengthening in dogs by means



of backscattered scanning electron microscopy. Vet Surg **38**: 388-397.

Lane NE, Yao W, Balooch M, Nalla RK, Balooch G, Habelitz S, Kinney JH, Bonewald LF (2006) Glucocorticoid-treated mice have localized changes in trabecular bone material properties and osteocyte lacunar size that are not observed in placebo-treated or estrogen-deficient mice. J Bone Miner Res **21**: 466-476.

Lane NE, Yao W (2010) Glucocorticoid-induced bone fragility. Ann NY Acad Sci **1192**: 81-83.

Lekovic GP, Bristol RE, Rekate HL (2004) Cognitive impact of craniosynostosis. Semin Pediatr Neurol **11**: 305-310.

Li CY, Jepsen KJ, Majeska RJ, Zhang J, Ni R, Gelb BD, Schaffler MB (2006) Mice lacking cathepsin K maintain bone remodeling but develop bone fragility despite high bone mass. J Bone Miner Res **21**: 865-875.

Magge SN, Westerveld M, Pruzinsky T, Persing JA (2002) Long-term neuropsychological effects of sagittal craniosynostosis on child development. J Craniofac Surg **13**: 99-104.

Mao JJ, Nah H-D (2004) Growth and development: hereditary and mechanical modulations. Am J Orthod Dentofac Orthop **125**: 676-689.

Mathijssen IM, van Splunder J, Vermeij-Keers C, Pieterman H, de Jong TH, Mooney MP, Vaandrager JM (1999) Tracing craniosynostosis to its developmental stage through bone center displacement. J Craniofac Genet Dev Biol **19**: 57-63.

Miller SC, Bowman BM, Smith JM, Jee WSS (1980) Characterization of endosteal bone-lining cells from fatty marrow bone sites in adult beagles. Anat Rec **198**: 163-173.

Moenning A, Jager R, Egert A, Kress W, Wardelmann E, Schorle H (2009) Sustained platelet-derived growth factor receptor alpha signaling in osteoblasts results in craniosynostosis by overactivating the phospholipase C-gamma pathway. Mol Cell Biol **29**: 881-891.

Mooney MP, Burrows AM, Smith TD, Losken HW, Opperman LA, Dechant J, Kreithen AM, Kapucu R, Cooper GM, Ogle RC, Siegel MI (2001) Correction of coronal suture synostosis using suture and dura mater allografts in rabbits with familial craniosynostosis. Cleft Palate Craniofac J **38**: 206-225.

Mooney MP, Losken HW, Moursi AM, Bradley J, Azari K, Acarturk TO, Cooper GM, Thompson B, Opperman LA, Siegel MI (2007) Anti-TGF-beta2 antibody therapy inhibits postoperative resynostosis in craniosy nostotic rabbits. Plast Reconstr Surg **119**: 1200-1215.

Mulder L, Koolstra JH, den Toonder JMJ, van Eijden TMGJ (2008) Relationship between tissue stiffness and degree of mineralization of developing trabecular bone. J Biomed Mater Res A **84A**: 508-515.

Nishino I, Amizuka N, Ozawa H (2001) Histochemical examination of osteoblastic activity in op/op mice with or without injection of recombinant M-CSF. J Bone Miner Metab **19**: 267-276.

Oppenheimer AJ, Rhee ST, Goldstein SA, Buchman SR (2009) Force-induced craniosynostosis in the murine sagittal suture. Plast Reconstr Surg **124**: 1840-1848.

Opperman LA (2000) Cranial sutures as intramembranous bone growth sites. Dev Dyn **219**: 472-485.

Parfitt AM (1987) Bone remodeling and bone loss: Understanding the pathophysiology of osteoporosis. Clin Obstet Gynecol **30**: 789-811.

Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR (1987) Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. J Bone Miner Res 2: 595-610.

Ploder O, Kanz F, Randl U, Mayr W, Voracek M, Plenk HJ (2002) Three-dimensional histomorphometric analysis of distraction osteogenesis using an implanted device for mandibular lengthening in sheep. Plast Reconstr Surg **110**: 130-137.

Regelsberger J, Delling G, Helmke K, Tsokos M, Kammler G, Kränzlein H, Westphal M (2006) Ultrasound in the diagnosis of craniosynostosis. J Craniofac Surg **17**: 623-625.

Regelsberger J, Schmidt T, Busse B, Herzen J, Tsokos M, Amling M, Beckmann F (2009) Synchrotronmicrocomputed tomography studies of normal and pathological cranial sutures: further insight. J Neurosurg Pediatr 5: 238-242.

Roschger P, Plenk H Jr, Klaushofer K, Eschberger J (1995) A new scanning electron microscopy approach to the quantification of bone mineral distribution: backscattered electron image grey-levels correlated to calcium K alpha-line intensities. Scanning Microsc **9**: 75-87.

Roschger P, Fratzl P, Eschberger J, Klaushofer K (1998) Validation of quantitative backscattered electron imaging for the measurement of mineral density distribution in human bone biopsies. Bone **23**: 319-326.

Roschger P, Paschalis EP, Fratzl P, Klaushofer K (2008) Bone mineralization density distribution in health and disease. Bone **42**: 456-466.

Rosen CJ (2004) Anatomy, physiology and disease. In: The Physical Measurement of Bone (Langton CM, Njeh CF, eds), Institute of Physics Publishing, Bristol, pp 3-34.

Salomon CD (1971) Osteoporosis following calcium deficiency in rats. Calcif Tissue Int **8**: 320-333.

Sato M, Yasui N, Nakase T, Kawahata H, Sugimoto M, Hirota S, Kitamura Y, Nomura S, Ochi T (1998) Expression of bone matrix proteins mRNA during distraction osteogenesis. J Bone Miner Res **13**: 1221-1231.

Shapiro F (2008) Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. Eur Cell Mater **15**: 53-76.

Shen K, Krakora SM, Cunningham M, Singh M, Wang X, Hu FZ, Post JC, Ehrlich GD (2009) Medical treatment of craniosynostosis: recombinant Noggin inhibits coronal suture closure in the rat craniosynostosis model. Orthod Craniofac Res **12**: 254-262.

Sherick DG, Buchman SR, Goulet RW, Goldstein SA (2000) A new technique for the quantitative analysis of cranial suture biology. Cleft Palate Craniofac J **37**: 5-11.

Shevde NK, Bendixen AC, Maruyama M, Ling Li B, Billmire DA (2001) Enhanced activity of osteoblast



www.ecmjournal.org

differentiation factor (PEBP2αA2/CBFa1) in affected sutural osteoblasts from patients with nonsyndromic craniosynostosis. Cleft Palate Craniofac J **38**: 606-614.

Shimoji T, Tomiyama N (2004) Mild trigonocephaly and intracranial pressure: report of 56 patients. Childs Nerv Syst **20**: 749-756.

Shipster C, Hearst D, Somerville A, Stackhouse J, Hayward R, Wade A (2003) Speech, language, and cognitive development in children with isolated sagittal synostosis. Dev Med Child Neurol **45**: 34-43.

Sissons H, Kelman G, Marotti G (1984) Mechanisms of bone resorption in calcium-deficient rats. Calcif Tissue Int **36**: 711-721.

Skedros JG, Bloebaum RD, Bachus KN, Boyce TM, Constantz B (1993) Influence of mineral content and composition on graylevels in backscattered electron images of bone. J Biomed Mater Res **27**: 57-64.

Slater BJ, Kwan MD, Gupta DM, Lee JK, Longaker MT (2009) The role of regional posterior frontal dura mater in the overlying suture morphology. Plast Reconstr Surg **123**: 463-469.

Tholpady SS, Abdelaal MM, Dufresne CR, Gampper TJ, Lin KY, Jane JA, Sr., Morgan RF, Ogle RC (2004) Aberrant bony vasculature associated with activating fibroblast growth factor receptor mutations accompanying Crouzon syndrome. J Craniofac Surg **15**: 431-438.

Thompson DNP, Harkness W, Jones B, Gonsalez S, Andar U, Hayward R (1995a) Subdural intracranial pressure monitoring in craniosynostosis: its role in surgical management. Childs Nerv Sys **11**: 269-275.

Thompson DNP, Malcolm GP, Jones BM, Harkness WJ, Hayward RD (1995b) Intracranial pressure in single-suture craniosynostosis. Pediatr Neurosurg **22**: 235-240.

Torres-Lagares D, Tulasne J-F, Pouget C, Llorens A, Saffar J-L, Lesclous P (2010) Structure and remodelling of the human parietal bone: An age and gender histomorphometric study. J Craniomaxillofac Surg **38**: 325-330.

Van der Vlugt JJB, van der Meulen J, Creemers HE, Willemse SP, Lequin ML, Okkerse JME (2009) The risk of psychopathology in children with craniosynostosis. Plast Reconstr Surg **124**: 2054-2060.

Vastardis H, Mulliken JB, Glowacki J (2004) Unilateral coronal synostosis: a histomorphometric study. Cleft Palate Craniofac J **41**: 439-446.

Vedi S, Compston J (2003) Bone histomorphometry. In: Bone Research Protocols (Helfrich MH, Ralston SH, eds), Humana Press, Totowa, NJ, pp 283-298.

Wilczak CA, Ousley SD (2009) Test of the relationship between sutural ossicles and cultural cranial deformation: results from Hawikuh, New Mexico. Am J Phys Anthropol **139**: 483-493.

Yasui N, Sato M, Ochi T, Kimura T, Kawahata H, Kitamura Y, Nomura S (1997) Three modes of ossification during distraction osteogenesis in the rat. J Bone Joint Surg Br **79-B**: 824-830.

Discussion with Reviewers

Reviewer I: The authors state that the relative size of osteocyte lacunae (lacuna area per bone area) is smaller in mature lamellar bone tissue than in newly forming woven bone. Is it known whether this is a result of increasing deposition of intercellular substance (fibres and matrix), of actual shrinkage of the lacunae or a combination of both processes?

Authors: Indeed, there are more osteocyte lacunae per bone area in woven bone and their size is also significantly greater. These observations are consistent with data obtained from other woven bone sites reported in the literature (Remaggi et al., 1998, additional reference; Hernandez et al., 2004, text reference). Hernandez et al. suggested that an increase in osteocyte cell size might be associated with the necessity for a rapid rate of matrix synthesis in woven bone (Hernandez et al., 2004, text reference). Evidently, former "surface" osteoblasts on lamellar bone become embedded between the layers of collagen fibrils with changing directions in the lamellae, and gradually reduce their extracellular matrix (ECM) production activity, as their content of organelles and cytoplasm is reduced. On the other hand, so-called "mesenchymal" osteoblasts (Shapiro, 2008, text reference) are much larger, may contain as many organelles as active surface osteoblasts, and are embedded in ECM with collagen fibrils/fibres with woven orientation. Therefore, wider peri-osteocyte spaces with signs of on-going ECM production (e.g., osteoid seams) can be observed in woven bone.

Reviewer I: Is it known whether the shape of osteoblastic cells, as described in this manuscript, is linked to proliferation activity and/or to stage of cell cycle of the osteoblasts?

Authors: The shape of the bone-forming cells that cover the bone surfaces varies from flat to cuboidal or low columnar. The cuboidal cell shape together with the characteristic appearance of the cell nuclei and organelles is consistent with metabolically active cells producing bone matrix. After completing their bone forming function, osteoblasts that do not undergo apoptosis or become entrapped in the bone matrix can transform to flat-shaped cells populating the bone surface of quiescent bone areas (bone-lining cells) (Khurana, 2009, text reference; Manolagas, 2000, additional reference).

Reviewer I: Is there any difference in the items analysed for this study between corticalis and diploe of the parietal bones?

Authors: We have found specific features in the pattern/ orientation of the bone trabeculae within the diploe. It seems that the mineralised bone trabeculae form according to the orientation of pre-existing mesenchymal tissue and collagen fibres, which is in line with the observations of Enlow (Enlow, 1982, text reference). However, it is difficult to comment on the definite differences between



the compartments, as there is a rather smooth transition from the cortical bone to the diploe. We have added a high magnification image representing the observed orientation pattern in Fig. 4. A further study focusing on ground sections through the whole tissue block containing the suture gap with adjacent bone borders consecutively from the external periosteal surface to the intracranial surface covered by the internal periosteum under the dura mater may enable an additional assessment of cortical and diploic compartments in both investigated groups.

Reviewer II: The process of subsequent intramembranous bone formation in the sutures might be at least partly driven by the mechanical stimuli arising by the expanding brain. Are there similarities to distraction osteogenesis and could imbalances in the distraction process lead to advanced bone development?

Authors: The exact mechanism driving the suture's expansion and closure is not yet fully understood, but there are indeed some hypotheses that mechanical stimuli from the expanding brain contribute to suture growth (e.g., Davis et al., 2009, text reference; Oppenheimer et al., 2009, text reference). The premature suture closure, which occurs in craniosynostosis, would actually signify that there is a defect in the cross-talk between the brain and the bone. Therefore, the normal process of distraction osteogenesis might not represent the most reliable model for explaining the craniosynostotic phenotype. Another concern regarding a comparison with distraction osteogenesis is related to additional observed types of bone formation at the distraction gap (enchondral and transchondroid) (Dinu et al., 2011, additional reference; Forriol et al., 2010, text reference; Lafuente et al., 2009, text reference; Jazrawi et al., 1998, text reference; Fink et al., 2003, additional reference; Yasui et al., 1997, text reference; Lawler et al., 2010, additional reference; Ploder et al., 2002, text reference) as well as different sequences of osteogenesis (Shapiro, 2008, text reference). In addition, in distraction osteogenesis a "premature" closure of the distraction gap can also occur, either by starting distraction too late, or if the bone formation capacity is underestimated in setting the distraction parameters (Aronson and Harp, 1994, additional reference; Pereira et al., 2007, additional reference). Therefore, we think that distraction osteogenesis and premature suture closure indeed share several morphological features, but caution is required in terms of a mechanistic comparison of those entities.

Reviewer III: Can you say that fused sutures in cranial synostosis are similar to normal fused sutures? There is no evidence of normal fused sutures presented. There is also no timeline of events in either the normal or fused cases. It is therefore difficult to draw the conclusion that the sequence of events and structure for fused sutures is normal, just happens early.

Authors: We agree. In general, there is more data needed in regard to the various levels involved in cranial bones and suture characteristics. Moreover, hitherto comprehensive studies dealing with cellular, tissue and matrix characteristics that specifically focus on prematurely

fused sutures are rare. As the here presented cell, tissue and matrix properties in prematurely fused cases do not bear clues of ossification processes that are pathological itself, we believe the present study indeed supports the theory that in cases with isolated craniosynostosis, ossification simply takes place early. However, the current study design certainly has limitations in terms of the progression of craniosynostosis because it does not follow the course of osteogenesis progressively but rather statically compares patent and fused segments at one specific time point.

Reviewer III: Recurrent deformity despite successful surgery is a common experience in the management of craniosynostosis, indicating a persisting abnormal osseous growth not amenable to treatment. Do the authors feel that this experience can be incorporated into their pathogenetic concept?

Authors: According to previous publications, we do confirm in our own series that the younger the patients are the more effective the surgical intervention is. This may underline the concept of an actually 'normal' suture fusion process that has started too early at one undetermined time point and spreads over the entire suture. However, this seems to be limited to the single suture synostosis most likely. Simple strip craniectomies have been shown to be successful in the very first weeks of sagittal and even coronal suture synostosis. Therefore, timing of the onset of suture fusion or timing of surgery is the crucial issue. Even early re-ossification can be seen in all cases, a tendency of recurrent deformities is not obvious in our series except in the more complex synostoses. In these, surgery is performed later at the age of 6-9 months. In summary, premature suture fusion is cured by timely surgery effectively as long as this process is limited to a single suture.

Reviewer III: Is it known whether biomechanical stimulation of these sutures in the evidence of craniosynostosis could have an effect on the balance between immigration of new mesenchymal stem cells and differentiation of those into new osteocytes? In other words, could wrong biomechanical stimuli lead to premature fusion besides growth factors and genetics?

Authors: We thank the referee for her/his important comment. Indeed, the relation between suture fusion and biomechanical stimuli has been subject of several studies (Review article: Kokich, 1986, text reference). In particular, experimentally tensile forces were frequently applied which led to increased deposition of bone which may be attributed to a differentiation of osteoblasts and osteocytes from mesenchymal stem cells at the sutural margins (Jackson et al., 1979; Guyman et al., 1980, additional references. In this connection, the expanding brain was commonly considered as a source of tension (Kokich, 1986, text reference; Oppenheimer et al., 2009, text reference), guiding sutural growth. In the case of craniosynostosis, the fact that the suture fuses prematurely might suggest either inappropriate biomechanical stimuli or rather a disordered cross-talk between the expanding brain and the suture.



Additional References

Aronson J, Harp J (1994) Mechanical forces as predictors of healing during tibial lengthening by distraction osteogenesis. Clin Orthop Relat Res **301**: 73-79.

Dinu C, Kretschmer W, Băciuț M, Rotaru H, Bolboacă SD, Gheban D, Muste A, Cătoi C, Peştean C, Băciuț G (2011) The effect of distraction rate on bone histological and histomorphometrical properties in an ovine mandible model. Rom J Morphol Embryol **52**: 819-825.

Fink B, Pollnau C, Vogel M, Skripitz R, Enderle A (2003) Histomorphometry of distraction osteogenesis during experimental tibial lengthening. J Orthop Trauma **17**: 113-118.

Guyman G, Kokich VG, Oswald R (1980) Ankylosed teeth as abutments for palatal expansion in the rhesus monkey. Am J Orthod 77: 486-499.

Jackson GW, Kokich VG, Shapiro PA (1979) Experimental and postexperimental response to anteriorly directed extraoral force in young *Macaca nemestrina*. Am J Orthod **76**: 318-333.

Lawler ME, Tayebaty FT, Williams WB, Troulis MJ, Kaban LB (2010) Histomorphometric analysis of the porcine mandibular distraction wound. J Oral Maxillofac Surg **68**: 1543-1554.

Manolagas SC (2000) Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. Endocr Rev. **21**: 115-137.

Pereira MA, Luiz de Freitas PH, Da Rosa TF, Xavier CB (2007) Understanding distraction osteogenesis on the maxillofacial complex: a literature review. J Oral Maxillofac Surg **65**: 2518-2523.

Remaggi F, Canè V, Palumbo C, Ferretti M (1998) Histomorphometric study on the osteocyte lacunocanalicular network in animals of different species. I. Woven-fibered and parallel-fibered bones. Ital J Anat Embryol **103**: 145-155.

