

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité–Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Auswirkung von Schädel-Hirn-Trauma auf die
Frakturheilung langer Röhrenknochen: Eine
computertomographisch- und biomechanisch-experimentelle
Studie an Leptin-defizienten Mäusen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité–Universitätsmedizin Berlin

von

Frank Arthur Graef
aus Wangen im Allgäu

Datum der Promotion: 08. Dezember 2017

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| Zusammenfassung/Abstract | 4 |
| 1 Einleitung | 7 |
| 1.1 Der Einfluss des Schädel-Hirn-Traumas auf die Frakturheilung | 7 |
| 1.2 Leptin und das Modell der Leptin-defizienten Maus | 13 |
| 1.3 Ziel der Studie | 15 |
| 2 Methoden | 16 |
| 2.1 Tiere | 16 |
| 2.2 Gruppeneinteilung | 16 |
| 2.3 Operationen | 17 |
| 2.4 In vivo Mikro-Computertomographie | 24 |
| 2.5 Biomechanische Auswertung | 26 |
| 2.6 Statistik | 30 |
| 3 Ergebnisse | 31 |
| 3.1 Mikro-CT | 31 |
| 3.2 Biomechanik | 36 |
| 4 Diskussion | 40 |
| 4.1 Diskussion der Ergebnisse | 40 |
| 4.2 Diskussion der Methodik | 45 |
| Literatur | 50 |
| Abbildungsverzeichnis | 59 |
| Tabellenverzeichnis | 60 |
| Abkürzungsverzeichnis | 61 |
| Eidesstattliche Versicherung | 62 |
| Publikationen | 68 |
| Danksagung | 69 |

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Graef F, Seemann R, Garbe A, Schmidt-Bleek K, Schaser KD, Keller J, Duda G, Tsitsilonis S. *Impaired fracture healing with high non-union rates remains irreversible after traumatic brain injury in leptin-deficient mice.* J Musculoskelet Neuronal Interact. 2017 Jun 1;17(2):78-85.

Zusammenfassung/Abstract

Zusammenfassung

Fragestellung: Die klinische Erfahrung zeigt, dass das Verletzungsmuster aus kombiniertem Schädel-Hirn-Trauma (SHT) und der Fraktur eines langen Röhrenknochens zu einer vermehrten Kallusbildung führen kann. Dieser Effekt konnte von unserer Arbeitsgruppe in einem eigenen Tiermodell an Wildtyp-Mäusen bereits bestätigt werden. Die genauen pathophysiologischen Mechanismen dieses Phänomens sind jedoch weiterhin unklar. Es ist bekannt, dass das Hormon Leptin nach SHT vermehrt exprimiert wird. Zudem ist bekannt, dass Leptin proliferationsfördernd auf den Knochenstoffwechsel wirken kann. Ziel dieser Studie war es deshalb, die Frakturheilung von Leptin-defizienten Mäusen morphologisch mittels Mikro-CT (μ CT) und funktionell mittels Biomechanik-Testung zu analysieren und den Einfluss eines zusätzlichen SHT zu erfassen.

Methodik: 138 weibliche 12 Wochen alte B6.V-Lep-ob/JRj-Mäuse (ob/ob) (Firma Janvier, Saint Berthevin, Frankreich) wurden in 4 Gruppen aufgeteilt: Kontrolle (n = 28), Fraktur (n = 37), SHT (n = 35), Kombination (SHT+Fraktur) (n = 38). Die Frakturen wurden am linken Femur standardisiert durch eine 0,7 mm Osteotomie erzeugt und mit einem steifen Fixateur-Externe (RISystem, Davos, Schweiz) stabilisiert. Das Schädel-Hirn-Trauma erfolgte mit dem Modell der Controlled-Cortical-Impact-Injury (CCI) am linken Kortex. Postoperativ wurden einmal pro Woche in-vivo μ CT-Scans der Frakturen (Kallusvolumen- und dichte) durchgeführt. Mittels sagittaler und frontaler Rekonstruktionen wurden die Frakturen außerdem hinsichtlich ihrer Überbrückung durch ein Scoring-System bewertet. Drei bzw. vier Wochen postoperativ erfolgte die biomechanische Torsionstestung (max. Drehmoment, max. Steifigkeit) nach Tötung der Tiere.

Ergebnisse: Die μ CT-Untersuchung zeigte in der Fraktur- und Kombinationsgruppe einen signifikanten Anstieg des Kallusvolumens und der Kallusdichte. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen im Kallusvolumen und in der Kallusdichte bestanden jedoch zu keinem Messzeitpunkt. Die Bewertung der Fraktur-Überbrückung durch einen radiologischen Score zeigte nach drei Wochen eine Pseudarthrosenrate von 93,4% innerhalb der Frakturgruppe und von 96,7% in der Kombinationsgruppe. Nach vier Wochen wiesen beide Gruppen eine Pseudarthrosenrate von 83,4% auf. Bei der Torsionstestung zeigten sowohl die Fraktur- als auch die Kombinationsgruppe relativ niedrige Werte im Drehmoment und in der Steifigkeit. Signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen bestanden auch hier nicht.

Schlussfolgerung: Der Vergleich mit dem identischen Studiendesign unserer Arbeitsgruppe an Wildtyp-Mäusen zeigt, dass ob/ob-Mäuse mit isolierter Fraktur eine reduzierte

Frakturheilung aufweisen. Diese ließ sich auch nicht durch ein zusätzliches Schädel-Hirn-Trauma verbessern. Wir schlussfolgerten deshalb, dass die vermehrte Kallusbildung nach SHT auf das Leptin-Signaling angewiesen sein könnte.

Abstract

Introduction: It is well known that patients suffering from traumatic brain injury (TBI) can show increased callus formation in long-bone fractures. In an experimental study we were able to reproduce this effect in wild-type mice. The underlying mechanisms of this phenomenon, however, are poorly understood. We do, however, know that expression of the hormone leptin is significantly increased following TBI. Additionally, leptin seems to be able to increase bone growth. In this study the fracture healing of leptin-deficient mice with TBI and without TBI was analyzed morphologically using micro CT (μ CT) and biomechanically with a torque test in order to further clarify the role of leptin in the course of exuberant callus formation after TBI.

Method: 138 female 12 weeks old B6.V-Lep-ob/JRj mice (ob/ob) (Company Janvier, Saint Berthevin, France) were divided into 4 groups: Control (n = 28), Fracture (n = 37), TBI (n = 35), Combined Trauma (TBI + Fracture) (n = 38). The osteotomy gap was sawed at 0,7mm at the left femur and stabilization was achieved using an external fixator (RISystem, Davos, Switzerland). The TBI was induced at the left cortex with a Controlled Cortical Impact Injury (CCI). Postoperative in-vivo μ CT scans (callus volume, callus density) were performed weekly. Using frontal and sagittal reconstructions, the bridging of the osteotomy gap was also evaluated with a scoring system. After three and four weeks the animals were sacrificed and biomechanical testing (max. torque, max. stiffness) was performed.

Results: μ CT showed a significant increase of callus volume and callus density in the Fracture and Fracture + TBI group. However, differences between both groups at any time points were not significant. The μ CT scoring system revealed non-union rates of 93,4% and 96,7% at 3 weeks in the Fracture and Combined Trauma group, respectively. After 4 weeks, both groups showed non-union rates of 83,4%. Also, the biomechanical analysis could not show significant differences in max. torque and max. stiffness between the fracture and combined trauma group.

Conclusion: In this study we could show, along with the results from our wild type study, that fracture healing is impaired in leptin-deficient mice. Furthermore, TBI does not improve fracture healing in ob/ob mice. Given these results we can conclude that the exuberant callus formation often seen after TBI is dependant on leptin signaling.

1 Einleitung

1.1 Der Einfluss des Schädel-Hirn-Traumas auf die Frakturheilung

Aus der klinischen Praxis ist bekannt, dass Patienten mit einem Schädel-Hirn-Trauma (SHT) und einer Fraktur eine überschießende Kallusbildung zeigen können [1]. In der Literatur sind bereits zahlreiche klinische und tierexperimentelle Studien beschrieben, die sich mit der Frage der erhöhten Kallusbildung nach Schädel-Hirn-Trauma auseinandergesetzt haben. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht von Arbeiten, die radiologisch die Frakturheilung bei Frakturen mit und ohne SHT untersuchten. Dabei kam ausschließlich die Arbeit von Garland et al. [2] zu dem Schluss, dass ein SHT nicht zu einer erhöhten Kallusbildung bei Frakturen führt. Die Aussagekraft dieser Studie ist jedoch limitiert. So wurden retrospektiv von 600 SHT-Patienten aus einem Zeitraum von 10 Jahren alle Patienten herausgesucht, die gleichzeitig eine Femurfraktur aufgewiesen hatten. Dabei konnten 68 Patienten mit SHT und gleichzeitig vorliegender offener oder geschlossener Femurfraktur identifiziert werden. Von diesen 68 Patienten wurde die Frakturheilung klinisch und radiologisch ausgewertet. Eine Gruppe mit Femurfraktur ohne SHT gab es nicht. Die Frakturheilung der eingeschlossenen Patienten wurde mit Erfahrungswerten der Frakturheilung der allgemeinen Bevölkerung verglichen. Eine statistische Analyse von Daten wurde nicht durchgeführt. Die Frakturheilung der 68 eingeschlossenen Patienten mit Femurfraktur und SHT erfolgte klinisch und radiologisch. Radiologisch wurden die Frakturen auf eine exzessive Kallusbildung, eine Verkürzung der Knochenlänge und Achsfehlstellungen untersucht. Eine radiologische Analyse des Zeitraums bis zur vollständigen Frakturheilung wurde nur bei den konservativ behandelten Frakturen durchgeführt.

Eine der ersten klinischen Studien, die dieses Phänomen systematisch untersuchten, stammt von Perkins et al. [3]. Hier wurden zwei Gruppen von Patienten mit Femurschaft-Fraktur radiologisch untersucht und miteinander verglichen. Gruppe 1 bestand aus 22 Patienten mit dem kombinierten Trauma aus Femurschaft-Fraktur und einem begleitenden SHT, in Gruppe 2 waren ebenfalls 22 Patienten mit isolierter Femurschaft-Fraktur. Zwischen offenen und geschlossenen Frakturen wurde nicht unterschieden. In beide Gruppen wurden ausschließlich diaphysäre Frakturen mit vollständiger Dislokation der Frakturenden eingeschlossen. Die Osteosynthese wurde mit einer aufgebohrter Marknagelosteosynthese durchgeführt. Die Auswertung des Kallusvolumens erfolgte mittels konventionell-radiologischer Aufnahmen. Mit Hilfe der Röntgenbilder wurde der Radius des Knochens (r_1), der Radius des Kallus (r_2) und die Länge des Kallus (l) ausgemessen. Die Berechnung der Kallusgröße erfolgte mit der Formel $V = 2\pi r_1(r_2 - r_1)l$. Dabei wurde angenommen, dass der Knochen ein perfekter Zylinder sei, was eine grobe Näherung der Anatomie entspricht. Bei den Ergebnissen zeigte sich, dass das Kallusvolumen in der Gruppe der Patienten mit begleitendem SHT signifikant höher ausfiel als bei den Patienten mit isolier-

ter Fraktur ($p < 0,00005$). Perkins et al. konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen Kallusvolumen und der Dauer des Komas der SHT-Patienten finden.

In einer aktuellen klinischen Studie untersuchten Yang et al. [4] ebenfalls die Frakturheilung bei Vorliegen eines SHT. Dabei wurden Patienten im Alter zwischen 16 und 40 Jahren eingeschlossen, die eine geschlossene einfache isolierte Femurfraktur (32-A oder -B nach AO) mit oder ohne begleitendem SHT aufwiesen. Alle Femurfrakturen wurden mittels antegrader aufgebohrter Marknagelosteosynthese versorgt. Patienten mit weiteren Frakturen, chronischen Erkrankungen wie Diabetes, Niereninsuffizienz oder Patienten mit einer Drogen- oder Alkoholerkrankung wurden ausgeschlossen. Die Patienten wurden ebenfalls in eine Gruppe mit kombiniertem Trauma ($n = 20$) und in eine Gruppe mit isolierter Femurfraktur ($n = 49$) eingeteilt. Die Auswertung der Kallusdicke erfolgte mittels konventionell-radiologischer Bilder und einer modifizierten Formel von Spencer et al. [5]: $D = [(A_{AP} + A_{Lat}) - (2 \cdot B_M)] \cdot [B_R / (4 \cdot B_M)]$, wobei A_{AP} und A_{Lat} den maximalen Kallusdurchmesser auf den anteroposterioren und seitlichen Röntgenbildern anzeigen, B_M ist der Durchmesser des Nagels an der Frakturstelle und B_R ist der wahre Durchmesser des Nagels laut Angabe des Herstellers. Dabei zeigten die Patienten mit kombiniertem Trauma eine signifikant schnellere Frakturheilung (Zeit bis zur Überbrückung) ($p < 0,001$) und eine signifikant höhere Kallusdicke ($p < 0,001$) als die Patienten ohne SHT. Yang et al. untersuchten den Zusammenhang zwischen dem Schweregrad des SHT und der Kallusbildung. Dabei wurde deutlich, dass Patienten mit einem schweren SHT (Glasgow Coma Scale (GCS) ≤ 8) eine Tendenz zur schnelleren Frakturheilung und zur Bildung eines dickeren Kallus als Patienten mit einem moderaten SHT (GCS > 8) aufwiesen, jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant.

Neben weiteren klinischen Studien, die dieses Phänomen bestätigten, konnte auch im Tiermodell gezeigt werden, dass ein SHT zu einer erhöhten Kallusbildung führt (siehe Tabelle 1). Song et al. [6] untersuchten bei männlichen Ratten die Frakturheilung bei Vorliegen eines SHT. Dafür teilten sie die Tiere in 4 Gruppen auf: eine Kontrollgruppe, eine Frakturgruppe, eine SHT-Gruppe und eine Gruppe mit kombiniertem Trauma aus Fraktur und SHT. Die Fraktur wurde dabei mit einer Guillotine durchgeführt, die Osteosynthese erfolgte mittels Kirschner-Draht (K-Draht), das SHT wurde durch das Weight-Drop-Modell induziert [7]. Die postoperativ durchgeführten μ CT-Untersuchungen zeigten nach vier Wochen signifikant erhöhte Werte im Kallusvolumen und in der Kallusdichte der Tiere mit Kombinationstrauma gegenüber den Ratten mit isolierter Femurfraktur.

Auch unsere Arbeitsgruppe konnte den Effekt der erhöhten Kallusbildung nach SHT in einem standardisierten Mausmodell mit Wildtyp-Mäusen (wt) reproduzieren [8,9]. Dabei konnten wir mittels in-vivo μ CT-Untersuchungen zeigen, dass wt-Mäuse mit Fraktur und

SHT nach drei und vier Wochen signifikant mehr Kallusvolumen und nach vier Wochen eine signifikant höhere biomechanische Belastbarkeit im Torsionstest hatten als die Tiere mit isolierter Femurfraktur.

Die pathophysiologischen Mechanismen der beschleunigten Frakturheilung nach SHT sind bisher jedoch noch nicht bekannt. Die Motivation zur Entschlüsselung der molekularen Mechanismen dieses Phänomens ist, neue Therapieansätze bei verzögerter Frakturheilung, Osteoporose und großen Knochendefekten zu entwickeln. Denn trotz moderner Osteosyntheseverfahren können bei 10-20% aller Frakturen Heilungsstörungen beobachtet werden [10, 11]. Dies führt zu einem erhöhten Leidensdruck der Patienten und zu einer erheblichen finanziellen Mehrbelastung des Gesundheitssystems [12].

| Quelle | Jahr | Zusammenhang | Spezies | Gruppe 1 | Gruppe 2 | Gruppe 3 | Gruppe 4 | Frakturlokalisierung | Fallzahl | p-Wert |
|-----------------|------|--------------|---------|-------------|----------------|----------|-----------|-----------------------------------|----------|--------|
| Herold [13] | 1970 | ja | Schwein | SHT+Fraktur | Fraktur | - | - | Radius | n = 64 | <0,050 |
| Spencer [5] | 1987 | ja | Mensch | SHT+Fraktur | Fraktur | - | - | unspezifisch | n = 83 | <0,050 |
| Perkins [3] | 1987 | ja | Mensch | SHT+Fraktur | Fraktur | - | - | Femurschaft | n = 44 | <0,010 |
| Garland [2] | 1982 | nein | Mensch | SHT+Fraktur | - | - | - | Femur | n = 68 | - |
| Andermahr [14] | 2006 | ja | Mensch | Polytrauma | Polytrauma+SHT | - | - | Polytrauma | n = 77 | 0,098 |
| Boes [15] | 2006 | ja | Ratte | SHT+Fraktur | Fraktur | - | - | Femurschaft | n = 34 | 0,020 |
| Giannoudis [16] | 2006 | ja | Mensch | SHT+Fraktur | Fraktur | - | - | Femurschaft | n = 67 | <0,001 |
| Cadosch [17] | 2009 | ja | Mensch | SHT+Fraktur | Fraktur | - | - | Femur-, Tibia- oder Humerusschaft | n = 41 | 0,010 |
| Gautschi [18] | 2009 | ja | Mensch | SHT+Fraktur | Fraktur | SHT | Kontrolle | lange Röhrenknochen | n = 61 | <0,001 |
| Wang [19] | 2011 | ja | Ratte | SHT+Fraktur | Fraktur | SHT | Kontrolle | Femurschaft | n = 64 | <0,010 |
| Huang [20] | 2012 | ja | Mensch | SHT+Fraktur | Fraktur | - | - | Mandibula | n = 45 | 0,022 |
| Song [6] | 2012 | ja | Ratte | SHT+Fraktur | Fraktur | SHT | Kontrolle | Femurschaft | n = 62 | <0,010 |
| Yang [4] | 2012 | ja | Mensch | SHT+Fraktur | Fraktur | - | - | Femurschaft | n = 69 | <0,001 |
| Tsitsilonis [9] | 2015 | ja | Maus | SHT+Fraktur | Fraktur | - | - | Femurschaft | n = 36 | 0,006 |
| Locher [8] | 2015 | ja | Maus | SHT+Fraktur | Fraktur | SHT | Kontrolle | Femurschaft | n = 138 | 0,006 |

Tabelle 1: Auswahl von Studien über den Zusammenhang der verbesserten Frakturheilung nach SHT auf Grundlage radiologischer Auswertungen. Zusammenhang ja/nein bezieht sich auf den Zusammenhang zwischen SHT und verbesserter Frakturheilung.

In der Literatur finden sich bereits einige Studien, die den Mechanismus der beschleunigten Frakturheilung nach SHT untersucht haben. Die Studien legen nahe, dass die osteoinduktiven Effekte nach SHT vermutlich durch humorale Faktoren im Serum und Liquor der Patienten vermittelt werden. So untersuchten Boes et al. [15] im Tiermodell, ob das Serum von Ratten mit SHT ein osteoinduktives Potenzial hat und konnten dabei demonstrieren, dass das Serum von Ratten mit Fraktur und SHT in einer Zellkultur mit mesenchymalen Stammzellen zu einer signifikant höheren Proliferationsrate führte als das Serum von Ratten mit isolierter Fraktur. In Zellkulturen mit Osteoblasten und Fibroblasten konnte dieser Effekt nicht reproduziert werden.

In einer klinischen Studie untersuchten Cadosch et al. [24] die osteoinduktiven Effekte des Serums und Liquors von Patienten mit und ohne SHT. Auch hier zeigte sich, dass sowohl das Serum als auch der Liquor von Patienten mit dem kombinierten Trauma aus Femurschaftfraktur und SHT signifikant höhere Proliferationsraten in Zellkulturen humaner Osteoblasten induzierte als das Serum und der Liquor von Patienten mit isolierter Femurschaftfraktur.

Es wurde jedoch nicht nur nachgewiesen, dass das Serum und der Liquor nach einem SHT osteoinduktiv wirkt. Einige Studien konnten bereits auch osteoinduktive Faktoren im Serum nach einem SHT identifizieren (siehe Tabelle 2). So berichten Gautschi et al. [18], dass im Serum von Patienten mit SHT und Fraktur signifikant höhere Konzentrationen der Alkalischen Phosphatase, Runx2 und der Serin-Protease 7 vorhanden waren als im Serum von Patienten mit isolierter Fraktur. Die Alkalische Phosphatase gilt als ein Marker für die Osteoblastenaktivität und bei Runx2 und der Serin-Protease 7 handelt es sich um Transkriptionsfaktoren für die Differenzierung von Osteoblasten [18, 25]. Auch Liu et al. [21] konnten zeigen, dass Mäuse mit dem kombinierten Trauma aus SHT und Fraktur im Kallus eine signifikant höhere mRNA-Expression von SDF-1 (Stromal cell-derived factor 1) und CXCR-4 (CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4) aufwiesen als Mäuse mit isolierter Fraktur. Sowohl SDF-1 als auch CXCR-4 wirken chemotaktisch auf die Migration von Stammzellen [21].

Bisher konnte jedoch bei keinem dieser Faktoren gezeigt werden, dass sie primär ursächlich für die erhöhte Kallusbildung nach SHT und keine sekundären Effekte waren, die auf übergeordnete Prozesse zurückzuführen sind. Auch, da die genannten Faktoren bisher ausschließlich im Serum und nicht auch im Liquor identifiziert wurden.

Eine Ausnahme davon bildet das Hormon Leptin, welches im Kaninchen-Modell bei den Tieren mit SHT sowohl im Serum als auch im Liquor signifikant gegenüber den Tieren mit Sham-Operation erhöht war [23].

| Studie | Spezies | Gruppe 1 | Gruppe 2 | Ergebnisse |
|---------------------|-----------|----------------|------------|--|
| Andermahr 2006 [14] | Mensch | Polytrauma+SHT | Polytrauma | Konzentration an Crosslinks (Knochenresorptionsmarker 1CTP) im Serum von SHT-Patienten verringert |
| Gautschi 2009 [18] | Mensch | SHT + Fraktur | Fraktur | Signifikant erhöhte Konzentrationen von ALP (Osteoblastenaktivität), Runx2 und Serin-Protease 7 (beide Transkriptionsfaktoren für Differenzierung von Osteoblasten) im Serum von Patienten mit SHT und Fraktur gegenüber Patienten mit isolierter Fraktur |
| Liu 2013 [21] | Maus | SHT + Fraktur | Fraktur | Signifikant erhöhte mRNA-Expression von SDF-1 und CXCR-4 (wirken beide chemotaktisch auf Stammzellmigration) im Kallus von Mäusen mit SHT und Fraktur gegenüber Mäusen mit isolierter Fraktur |
| Song 2011 [6] | Ratte | SHT + Fraktur | Fraktur | Signifikant erhöhte Konzentration von CGRP (osteoinduktiv) im Serum bei den Tieren mit SHT + Fraktur gegenüber den Ratten mit isolierter Fraktur |
| Wang 2011 [19] | Ratte | SHT + Fraktur | Fraktur | Signifikant erhöhte Konzentration von Leptin im Serum bei den Tieren mit SHT + Fraktur gegenüber den Tieren mit isolierter Fraktur |
| Wei 2008 [22] | Ratte | SHT + Fraktur | Fraktur | Signifikant erhöhte Konzentration von Leptin im Serum bei den Tieren mit SHT + Fraktur gegenüber den Tieren mit isolierter Fraktur |
| Yan 2013 [23] | Kaninchen | SHT | Sham-SHT | Signifikant erhöhte Konzentration von Leptin im Serum und Liquor bei den Tieren mit SHT gegenüber den Tieren mit Sham-SHT |

Tabelle 2: Auswahl von Studien, die osteoinduktive Faktoren im Serum und Liquor nach SHT identifizierten. ALP = Alkalische Phosphatase, SDF-1 = Stromal cell-derived factor 1, CXCR-4 = CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4, CGRP = Calcitonin Gene-Related Peptide.

1.2 Leptin und das Modell der Leptin-defizienten Maus

Leptin ist ein Hormon, das vom „obese“-Gen in Adipozyten kodiert wird [26] und über „ob“-Rezeptoren im Hypothalamus dem Zentralen Nervensystem (ZNS) Rückmeldung über den Körperfettanteil gibt. Je mehr Körperfett vorhanden ist, desto mehr Leptin wird exprimiert. Bei ausreichenden Fettreserven unterdrückt das erhöhte Leptin das Hungergefühl, wodurch die Nahrungsaufnahme und der Energiemetabolismus gesteuert werden [27, 28]. Neben dem Fettgewebe [26] wird Leptin auch in der Plazenta [29], dem Magen [28], dem Hirn und der Hypophyse [30] und dem gelben Knochenmark [31] exprimiert.

Die Leptin-defiziente Maus (ob/ob-Maus) wurde erstmalig 1950 bei der Firma Jackson Laboratory als Spontanmutation gesehen [32]. 1994 konnte das für die Fettleibigkeit der Mäuse verantwortliche Gen identifiziert werden und wurde *Leptin* genannt [26]. Leptin-defiziente Mäuse sind homozygote Träger der rezessiven Mutation des obese-Gens auf Chromosom 6, wodurch bei diesen Mäusen kein Leptin mehr exprimiert wird. Dadurch fällt der Hunger-unterdrückende Effekt von Leptin bei diesen Mäusen weg, die Tiere werden fettleibig und haben ein bis zu vierfach erhöhtes Körpergewicht gegenüber wt-Mäusen [33]. ob/ob-Mäuse zeigen im Alter von vier Wochen erste Anzeichen für Fettleibigkeit und eine verzögertes Körperwachstum, das im Alter von 12 Monaten immer noch nicht abgeschlossen ist [33]. Darüber hinaus scheinen Leptin-defiziente Mäuse anfällig für Wundheilungsstörungen zu sein [34].

Der Phänotyp der ob/ob-Mäuse ist davon abhängig, von welchem Stamm die Mäuse mit der Mutation abstammen. So zeigen ob/ob-Mäuse, die von C57BL/6J-Mäusen (Wildtyp-Mäusen) abstammen, eine moderate Hyperglykämie (≤ 200 mg/dl) mit kompensatorisch erhöhten Insulin-Konzentrationen (Hyperplasie und Hypertrophie der pankreatischen β -Zellen) und einen pathologischen Glukose-Toleranz-Test im Sinne eines moderaten Typ II Diabetes bzw. eines metabolischen Syndroms. Die Glukose-Werte nehmen nach 5-9 Monaten wieder normale Werte an [35]. ob/ob-Mäuse, die von C57BL/KsJ-Mäusen abstammen, entwickeln dagegen einen manifesten Diabetes, der durch eine ausgeprägte Hyperglykämie (400 mg/dl) und nur gelegentlich erhöhte Insulin-Konzentrationen charakterisiert ist. Bei ob/ob-Mäusen mit C57BL/KsJ-Background kommt es letztendlich zu einem Versagen der pankreatischen β -Zellen. Sie erreichen ihr maximales Körpergewicht in einem Alter von 3-4 Monaten und sterben oftmals mit 6 Monaten [36]. Gegenüber obese-Mäusen mit C57BL/6J-Background zeigen ob/ob-Mäuse mit BALB/cJ-Background hingegen einen um 60% verringerten Körperfettanteil mit jedoch erhöhten Insulin- und Triglyzerid-Werten [33, 37]

Neben den Mechanismen, die den Energiemetabolismus steuern, ist auch bekannt, dass

Leptin einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel hat. So konnten Ducy et al. demonstrieren, dass ob/ob-Mäuse eine höhere Knochenmasse als wt-Mäuse aufweisen und dass die intrazerebrale Applikation von Leptin zu einer Normalisierung der Knochenmasse führte, die vergleichbar mit wt-Mäusen war. Sie gingen deshalb davon aus, dass Leptin den Knochenstoffwechsel über das zentrale Nervensystem (ZNS) hemmt. Zudem konnten sie nachweisen, dass Osteoblasten den Leptin-Rezeptor in ihrem Versuch nicht exprimierten und dass Leptin in einer Zellkultur mit Osteoblasten keinen Effekt auf die Kollagensynthese und Mineralisierung hatte. Ducy et al. schlussfolgerten deshalb, dass der hemmende Einfluss von Leptin auf den Knochenstoffwechsel ausschließlich über das ZNS abläuft [38].

Andere Studien konnten jedoch zeigen, dass ob/ob-Mäuse nicht ubiquitär mehr Knochenmasse haben als wt-Mäuse, sondern dass beide Mausstämme ein unterschiedliches Verteilungsmuster der Knochenmasse aufweisen. Iwaniec et al. untersuchten mittels Mikro-CT (μ CT) Femur- und Lendenwirbelkörper- (LWK) Knochen beider Mausstämme. Dabei hatten die ob/ob-Mäuse im gesamten Femur weniger Knochenvolumen bei gleichzeitig kürzeren Knochen als die wt-Mäuse. In den LWK-Knochen wiesen die ob/ob-Mäuse mehr Knochenvolumen als die wt-Mäuse auf. Auch in der distalen Femurmetaphyse hatten die ob/ob-Mäuse ein höheres Knochenvolumen und eine höhere Trabekeldicke und -anzahl. Die Dicke der Kortikalis im Bereich des Femurschaftes war zwischen beiden Mausstämmen nicht unterschiedlich [39].

In einer anderen Studie zeigten Ealey et al. mittels DXA-Messung (Dual Energy X-ray Absorptiometry), dass ob/ob-Mäuse im gesamten Femur signifikant weniger Knochenmineralgehalt (Bone Mineral Content = BMC) und Knochenmineraldichte (Bone Mineral Density = BMD) aufwiesen als wt-Mäuse. In den LWK-Knochen ließen sich keine signifikanten Unterschiede im BMC und in der BMD zwischen ob/ob- und wt-Mäusen erkennen.

Darüber hinaus konnten eine Reihe von Studien nachweisen, dass, entgegengesetzt den Ergebnissen von Ducy et al., der Leptin-Rezeptor auf Osteoblasten und mesenchymalen Stammzellen exprimiert wird [40–42]. Auch in Zellkulturen mit Osteoblasten konnte der direkte Effekt von Leptin auf den Knochenstoffwechsel reproduziert werden. Hier zeigte sich, dass Leptin zu einer gesteigerten Kollagensynthese und einer gesteigerten Mineralisierung führte. Leptin wirkte hier zudem protektiv gegen die Apoptose von Osteoblasten und induzierte die Differenzierung von Osteoblasten zu Osteozyten [41]. Des Weiteren soll Leptin die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten fördern [43]. In-vivo-Studien an ob/ob-Mäusen zeigten zudem, dass die periphere Injektion von Leptin in ob/ob-Mäuse, sowohl subkutan als auch intraperitoneal, zu einem signifikanten Anstieg der Osteoblastenaktivität führte [44, 45].

Aus diesem Grund wurde auch eine duale Wirkweise von Leptin vorgeschlagen. Demnach sollte Leptin über das ZNS den Knochenmetabolismus hemmen und peripher über

direkte Mechanismen fördernd auf das Knochenwachstum wirken [46].

In neueren Studien wurde das Leptin-Gen über virale Vektoren in das ZNS von ob/ob-Mäusen geschleust, um die isolierte Wirkung physiologischer Mengen Leptin im ZNS auf den Knochenstoffwechsel zu untersuchen. Das dadurch im ZNS exprimierte Leptin war in der Peripherie nicht nachweisbar. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Geneinschleusung von Leptin in das ZNS von ob/ob-Mäusen zu einer Zunahme der Knochenneubildung führte [39, 45]. Die Annahme, dass Leptin über das ZNS den Knochenstoffwechsel hemmt, konnte hier nicht bestätigt werden. Auf Grundlage dieser Ergebnisse entwickelte sich eine neue Ansicht zur Wirkung von Leptin, wonach Leptin über zentrale und periphere Signalwege das Knochenwachstum fördert, wobei die peripheren Mechanismen eine größere Wirkung haben [45].

1.3 Ziel der Studie

Leptin stellt einen interessanten Faktor dar, der bei der beschleunigten Frakturheilung nach SHT eine Rolle spielen könnte. Zum einen wird Leptin eine auf das Knochenwachstum fördernde Wirkweise zugeschrieben, die unter anderem im ZNS stattfindet, wo auch die Pathomechanismen eines SHT ihren Ausgangspunkt haben. Zum anderen konnte bereits gezeigt werden, dass im Rattenmodell ein SHT sowohl zu einer gesteigerten Kallusbildung, als auch zu einem signifikanten Anstieg des Hormons Leptin im Serum führte [19, 22]. Auch im klinischen Setting konnte bereits nachgewiesen werden, dass Kinder (Alter < 15 Jahre) mit isoliertem SHT und einem GCS ≤ 8 gegenüber gesunden Kontrollen signifikant erhöhte Leptin-Konzentrationen im Plasma aufwiesen [47]. Des Weiteren wurde im Kaninchenmodell gezeigt, dass ein SHT zu einem signifikanten Anstieg der Leptin-Konzentration nicht nur im Serum, sondern auch im Liquor gegenüber der Gruppe mit Sham-Operation führte [23].

Ziel der Studie war es, die Auswirkungen eines SHT auf die Frakturheilung in Abwesenheit des Hormons Leptin biomechanisch und μ CT-morphologisch zu untersuchen. Anhand dieser Ergebnisse sollten erste Rückschlüsse auf die Rolle von Leptin bei der Frakturheilung nach SHT gezogen werden.

2 Methoden

Das Design der vorliegenden Arbeit wurde unverändert von der vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe an wt-Mäusen übernommen, um eine Vergleichbarkeit zwischen wt- und ob/ob-Mäusen zu gewährleisten [8,9].

2.1 Tiere

Für die Untersuchungen (Tierversuchsantragsnummer G0009/12, Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin) wurden insgesamt 138 weibliche ob/ob-Mäuse von der Firma Janvier Labs (Saint Berthevin, Frankreich) bestellt. Bei dem Mausstamm handelte es sich um *obese*-Mäuse, die von C57BL/6J-Mäusen abstammen. Die genaue Bezeichnung der Mäuse ist *B6.V-Lep^{ob}/JRj*.

2.1.1 Unterbringung und Ernährung der Tiere

Die Mäuse waren in der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité Campus Virchow-Klinikum (Tierhaltung ISO 9000/2008 zertifiziert) untergebracht. Bei der Ankunft waren die Mäuse 10 Wochen alt. Nach 7 Tagen Quarantäne wurden sie bei einem mittleren Gewicht von 50,67 g ($\pm 3,04$ g) für die Experimente freigegeben, sodass alle Mäuse zu allen Zeitpunkten gleich alt waren.

Die Unterbringung erfolgte in einem Standard-Käfig des Typs III („Euronorm“) mit einer Bodenfläche von 820 cm². Als Untergrund wurden Holzspäne und Zellulose-Tücher verwendet, der Käfig enthielt zudem ein rotes lichtdurchlässiges Kunststoffgehäuse als Unterschlupf. Den Mäusen wurde pelletiertes Kraftfutter (Alleinfuttermittel für Ratten & Mäuse-Haltung, Firma ssniff, Soest, Deutschland) und Leitungswasser über ein abgesenktes Gitter im Käfigdeckel ad libitum zur Verfügung gestellt.

Über eine Zeitschaltuhr wurde die Helligkeit geregelt, wobei die Tageszeit (hell) von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr geschaltet war und die Nacht (dunkel) entsprechend von 18.00 Uhr bis 6.00 Uhr. Die Raumtemperatur betrug 20°C (± 2 °C) bei einer Luftfeuchtigkeit von 55% Prozent.

2.2 Gruppeneinteilung

Für die Versuchsreihen wurden die Mäuse randomisiert in die folgenden vier Gruppen aufgeteilt (siehe Abbildung 1):

1. Kontrolle

2. Fraktur
3. Schädel-Hirn-Trauma (SHT)
4. Fraktur und SHT (Kombinationstrauma)

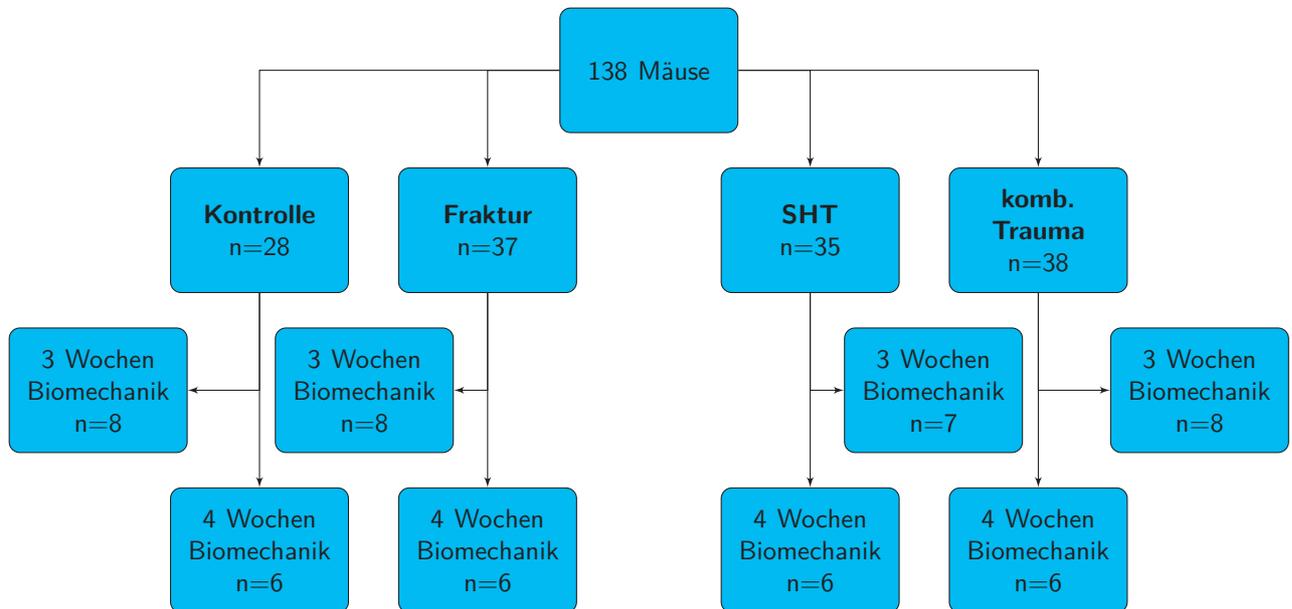


Abbildung 1: Übersicht Aufteilung der Mäuse in die entsprechenden Versuchsgruppen.

Die initial ungleiche Aufteilung der Mäuse in die Gruppen wurde vorgenommen, da aufgrund der Erfahrung aus Vorversuchen von unterschiedlichen Mortalitätsraten in den jeweiligen Gruppen auszugehen war. Die tatsächlichen Mortalitätsraten der Versuche sind in Kapitel 2.3.5 aufgeführt.

Bei den Mäusen der Fraktur- und Kombinations-Gruppe wurde einmal pro Woche postoperativ eine in-vivo μ CT-Untersuchung des Frakturspalts durchgeführt. Nach der dritten bzw. vierten postoperativen Woche wurden die Mäuse getötet und die Organe für weitere Untersuchungen entnommen. Für die biomechanische Torsionstestung verwendeten wir acht Femora der Drei-Wochen-Mäuse und sechs Femora der Vier-Wochen Mäuse. Die restlichen Femora wurden für histologische Untersuchungen entnommen, die nicht Gegenstand dieser Arbeit sind.

2.3 Operationen

Das in dieser Studie und der vorangegangenen Studie an wt-Mäusen verwendete Traumamodell entspricht dem kombinierten Traumamodell aus SHT und Femurosteotomie an Mäusen von Tsitsilonis et al. [9]. Die Operationen wurden für jeweils eine Liefer-Charge

von je 30 Tieren innerhalb einer Woche durchgeführt, um große Altersunterschiede bei den Mäusen auszuschließen. Die Eingriffe fanden dabei immer vormittags statt.

Im Rahmen von operativen Techniken kann es zu einem *Learning-Bias* kommen, der die Verbesserung des prä-, peri- und postoperativen Handlings und der chirurgischen Technik über die Zeit beschreibt. Um Auswirkungen dieses Effekts auf die Op-Gruppen zu vermeiden, wurden die zu operierenden Gruppen randomisiert auf die Op-Tage aufgeteilt, d.h. an einem Tag wurden zum Beispiel nicht nur Mäuse der Fraktur-Gruppe operiert.

2.3.1 Präoperatives Management, Anästhesie

Die Narkoseeinleitung wurde in einem halboffenen Topf durchgeführt, über den das Inhalationsgas mit 2% Isofluran (FORENE, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) in Kombination mit 0,3% O₂ und 0,5% N₂O kontinuierlich gegeben wurde.

Nach der Einleitung wurden die Mäuse antibiotisch mit 0,02 ml Clindamycin subcutan (s.c.) und analgetisch mit 0,1 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin s.c. (TEMGESIC, Reckitt Benckiser, Mannheim, Deutschland) abgedeckt. Damit die Augen während der Operation nicht austrockneten, wurde auf beide Augäpfel Augensalbe (BEPANTHEN Augen- und Nasensalbe, Bayer, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen. Die Fixierung des Kopfes erfolgte in einem Stereotaxie-System (Stoelting, Wood Dale, Illinois, USA) mit zwei lateralen Metallbolzen, die im *Meatus acusticus externus* platziert wurden. Die Durchführung der Narkose erfolgte in einem halboffenen Inhalationssystem, bei dem die Nase von einem Plastiktrichter umschlossen war, über den das Narkosegemisch gegeben wurde. Die Erhaltung der Narkose wurde mit 1,5-2% Isofluran (FORENE, Abbott, Wiesbaden, Deutschland), 0,3% O₂ und 0,5% N₂O durchgeführt. Sämtliche Operationen wurden auf einem mit Strom beheizbaren Heizkissen (Beurer, Ulm, Deutschland) durchgeführt.

2.3.2 Fraktur

Die Operation der Frakturen erfolgte nach einem standardisierten Modell für Mäuse am linken Femur mit Fixateur Externe [48].

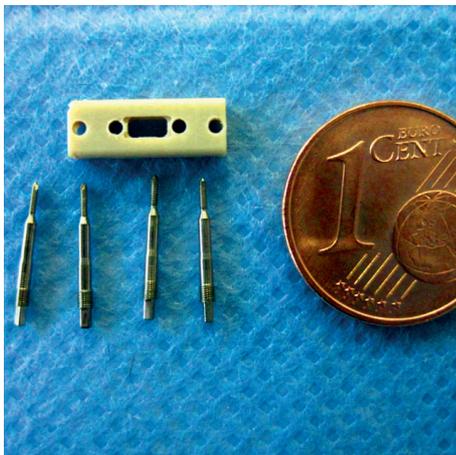
Op-Technik: Bauchlage, der Kopf der Maus ist stereotaktisch über den linken und rechten *Meatus acusticus externus* fixiert. Haare werden mit einer Präparierschere im anterolateralen Bereich des Oberschenkels gestutzt. Sterile Hautdesinfektion mit 10% Braunol (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Der Zugang erfolgt über einen an-



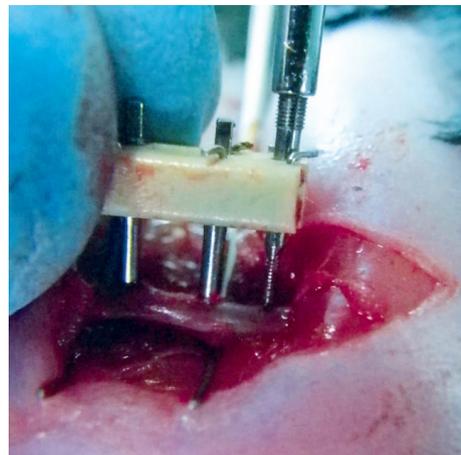
(a) Zugang zum Femur in Bauchlage



(b) Zirkuläres Lösen von Weichteilen im Bereich der Diaphyse



(c) Fixateur Externe



(d) Eindrehen der Schanz'schen Schrauben



(e) Osteotomie-Spalt von 0,7 mm (mit freundlicher Genehmigung von Dr. rer. nat. Katharina Schmidt-Bleek)



(f) Wundverschluss durch Naht

Abbildung 2: Durchführung der Femur-Fraktur: (a) Der Zugang zum Femur erfolgte in Bauchlage. (b) Schnittführung parallel zum Femur vom Hüftgelenk zum Kniegelenk und Freipräparieren der Femur-Diaphyse. (c) Der Fixateur Externe wird mit vier Pins fixiert. (d) Vorbohren der Löcher und eindrehen der Pins. (e) Nach der vollständigen Implantation des Fixateurs wird die Fraktur mit einer 0,7 mm Gigli-Wire-Säge gesetzt. (f) Der Wundverschluss erfolgt mit Ethibond Suture 6-0.

terolateralen Hautschnitt entlang des Femurs vom Hüftgelenk zum Kniegelenk (Abb. 2a). Scharfe Durchtrennung der *Fascia lata*. Darstellung des *M. vastus lateralis* und *M. biceps femoris* und stumpfe Durchtrennung der beiden Muskelbäuche. Anschließend Einbringung einer feinen Pinzette, um den *N. ischiadicus* zu schonen. Jetzt stumpfes Lösen von Weichteilen im Bereich der Diaphyse, wo die Osteotomie gesetzt werden soll (Abb. 2b).

Der Fixateur Externe (MouseExFix, Research Implant System, RIS, Davos, Schweiz) [49] besteht aus einem steifen Polymerblock (Länge 10,40 mm) mit je zwei Löchern für die proximale und distale Fixierung, die über insgesamt vier Pins (Durchmesser 0,45 mm) erfolgt (Abb. 2c). Das erste Bohrloch für den Fixateur wird knapp oberhalb der Kondylen gesetzt, dafür Anbohrung mit einem Anbohrer (Durchmesser 1,00 mm.) Anschließend komplette Durchbohrung des Femurs mit dem Feinbohrer (Durchmesser 0,45 mm). In dieses Loch wird der erste Pin mit dem Fixateur Externe gesetzt und festgeschraubt. Dadurch ist die Position des Fixateurs und somit der restlichen Löcher vorgegeben. Die Besetzung der restlichen Löcher erfolgt analog, wobei die zweite Schraube distal der am proximalsten gelegenen Position gesetzt wird und letztere am Schluss besetzt wird (Abb. 2d).

Nachdem der Fixateur Externe angebracht worden ist, kann die Osteotomie durchgeführt werden. Sie erfolgt mit einer 0,7 mm Gigli-Wire-Säge (Abb. 2e). Dieser relativ große Osteotomie-Spalt wurde gewählt, um die Knochenheilung über einen längeren Zeitraum beobachten zu können. Der Wundverschluss erfolgt in Donati-Rückstichnaht mit Ethibond Suture 6-0 (Ethicon/Johnson & Johnson, Norderstedt, Germany) (Abb. 2f).

Die durchschnittliche Op-Zeit betrug 44 min (\pm 13 min).

2.3.3 Schädel-Hirn-Trauma

Das SHT wurde mit der standardisierten Technik des Controlled-Cortical-Impact (CCI) ausgeführt [50–52].

Op-Technik: Bauchlage, der Kopf der Maus ist stereotaktisch über den linken und rechten *Meatus acusticus externus* fixiert. Haare werden mit einer Präparierschere im parieto-temporalen Bereich des Kopfes links gestutzt. Sterile Hautdesinfektion mit 10% Braunol (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Zusätzlich zur systemischen Analgesie erfolgt die subkutane Infiltration von 1 ml/kg KG Bupivacain 0,5% (Bupivacain-RPR-Actavis, Actavis GmbH & Co. KG, München, Deutschland) in den zu operierenden Bereich. Zugang zum Schädel über einen 1,5 cm langen Hautschnitt entlang der *Sutura sagittalis*, ein weiterer Hautschnitt erfolgt orthogonal dazu entlang der *Sutura lambdoidea* bis distal zum *M. temporalis*. Jetzt Hautmobilisation mit Ethibond Suture 6-0 (Ethicon/Johnson & Johnson, Norderstedt, Germany), um eine gute Übersicht auf das Op-Gebiet zu erlangen. Unter Mikroskop-Sicht (OPMI-6 SFC Operations-Mikroskop, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Germany) wird nun mit einer feinen Bipolar-Pinzette (Erbotom

Bipolar, Erbe Elektromedizin, Rangendingen, Deutschland) der *M. temporalis* partiell vom Schädelknochen gelöst. Jetzt Kraniotomie mit Hilfe einer elektrischen Kugelfräse (Durchmesser 1,2 mm) (Minimot 40, Proxxon, Föhren, Deutschland), bei der ein 7×7 mm großes Knochenfenster ausgefräst wird (Abb. 3b). Das Knochenfenster wird mit einem speziell angepassten stumpfen Haken aufgeklappt (Abb. 3c). Dabei Erhalt der *Dura mater* (Abb. 3d) zur Simulation eines geschlossenen SHT.

Nun folgt die Umsetzung der Maus in das elektrisch gesteuerte *Pneumatic Cortical Impact Device* (AmScien Instruments, Richmond, Virginia, USA), bei dem die Narkose analog zu Punkt 2.3.1 durchgeführt und aufrechterhalten wird (Abb. 3a). Der Schlagbolzen (Durchmesser 5,0 mm) wird so positioniert, dass er ausschließlich auf die *Dura mater* trifft und keinen Kontakt mit dem umliegenden knöchernen Schädel hat (Abb. 3e). Das SHT wird jetzt mit folgenden Parametern ausgeführt:

- Anprallwinkel: 45°
- Eindringtiefe: 0,25 mm
- Anprallgeschwindigkeit: 3,5 m/s
- Kontaktzeit: 150 ms

Nach Beendigung des Vorgangs erfolgt die sofortige Überprüfung des kardiopulmonalen Status. Bei fehlenden Herzschlägen oder Atemexkursionen wird eine kardiopulmonale Reanimation durchgeführt. Bei intakten Kreislaufverhältnissen bzw. einer erfolgreichen Reanimation wird die Maus wieder auf den Op-Tisch zurückgesetzt, um die Narkose aufrechtzuerhalten. Jetzt Verschluss des Schädels mit dem vorher ausgefrästen Knochenfenster, das auf dem Schädel mit Zahn-Zement (Harvard Cement, Harvard Dental International GmbH, Berlin, Deutschland) befestigt wird (Abb. 3f), um einen Dekompressionseffekt zu vermeiden. Der Wundverschluss erfolgt in Einzelknopfnah mit Ethibond Suture 6-0 (Ethicon/Johnson & Johnson, Norderstedt, Germany).

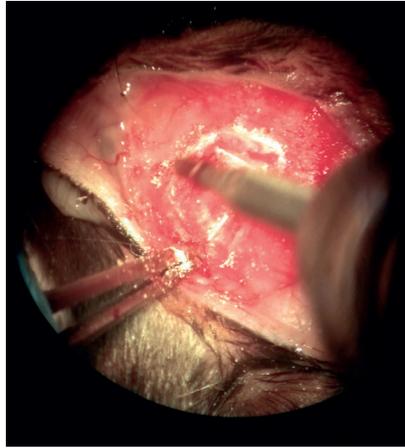
Die durchschnittliche Op-Zeit betrug 48 min (\pm 13 min).

2.3.4 Kombiniertes Trauma: Fraktur und Schädel-Hirn-Trauma

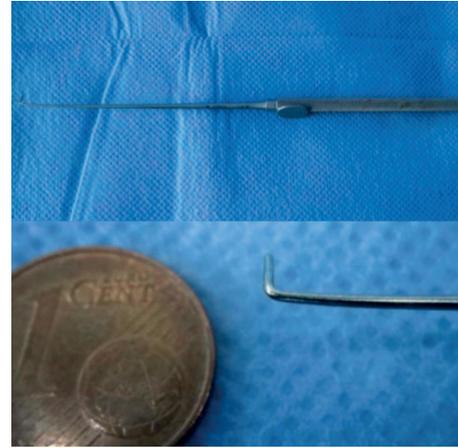
Die Mäuse der Kombinationsgruppe, bei denen eine Fraktur in Kombination mit einem SHT durchgeführt wurde, wurden analog zu den Punkten 2.3.2 und 2.3.3 operiert. Die Reihenfolge der Traumata wurde so festgelegt, dass das SHT zuerst gesetzt wurde und anschließend die Fraktur. Diese Reihenfolge wurde so gewählt, da das SHT ein größeres



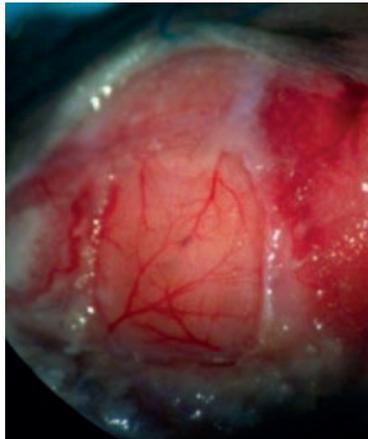
(a) Controlled Cortical Impact Device



(b) Fräsen des Knochenfensters unter Mikroskop-Sicht



(c) Haken zum Aufklappen des Knochenfensters



(d) Blick auf die intakte Dura



(e) Platzierung des Schlagbolzens auf der Dura



(f) Verschluss des Knochenfensters

Abbildung 3: Durchführung des SHT: (a) Das SHT wurde mit einem elektrisch gesteuerten Controlled Cortical Impact Device durchgeführt. (b) Dafür wurde ein 7×7 mm großes Knochenfenster mit einer Kugelfräse ausgefräst. (c) Das Knochenfenster wurde anschließend mit einem speziellen Stumpf-Haken entfernt. (d) Blick auf die intakte Dura. (e) Nun erfolgte die Platzierung des Schlagbolzens (Durchmesser 5 mm) auf der Dura. Anschließend wurde das SHT mit den in Kapitel 2.3.3 beschriebenen Parametern durchgeführt. (e) Das Knochenfenster wurde mit Zahnzement refixiert, der Wundverschluss erfolgte mit Ethibond 6-0.

Trauma darstellte und in einer kombinierten Operation den limitierenden Faktor darstellt. Im Anschluss an ein überlebtes SHT erfolgte dann die Operation der Fraktur einzeitig.

Die durchschnittliche Op-Zeit betrug 82 min (\pm 12 min)

2.3.5 Mortalität

Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Mortalität abhängig vom jeweiligen Eingriff. Von insgesamt 138 eingeschlossenen Mäusen starben durch die in der Tabelle aufgeführten Eingriffe 18 Mäuse (13,0 %). Die höchste Mortalität hatte das kombinierte Trauma aus Fraktur und SHT. Dabei starben 18,4 % der Mäuse durch die direkte Einwirkung der Operation. Der Punkt Blutentnahme ist nicht Gegenstand dieser Arbeit und nur zur Vollständigkeit aufgeführt.

| Bezeichnung Eingriff | Eingriffe insgesamt | dabei verstorben | Mortalität prozentual |
|-----------------------------|---------------------|------------------|-----------------------|
| Fraktur | 37 | 3 | 8,1% |
| SHT | 35 | 4 | 11,4% |
| Kombinationstrauma | 38 | 7 | 18,4% |
| μ CT | 202 | 1 | 0,5% |
| Blutentnahme | 546 | 3 | 0,5% |
| Mortalität insgesamt | 138 | 18 | 13,0% |

Tabelle 3: Übersicht Mortalität. Die Mortalitätsraten der einzelnen Punkte beziehen sich auf die Gesamtzahl der jeweils durchgeführten Eingriffe. Die Mortalität insgesamt bezieht sich auf alle 138 Tiere.

2.3.6 Postoperatives Management und Organentnahme

Postoperativ wurden alle Mäuse in einen Käfig umgesetzt und mit einer Rotlichtlampe für 2 Stunden gewärmt. Das rote Plastikgehäuse wurde aus dem Käfig entfernt, um zu verhindern, dass sich die Mäuse mit dem Fixateur daran verletzen können. Zusätzlich bekamen die Mäuse eine orale Schmerztherapie mit 25 mg/l Tramadol (Tramal, Grünenthal, Aachen, Deutschland) für 7 Tage postoperativ. Am Op-Tag selbst wurde der neurologische Status jeder Maus morgens, mittags und abends erhoben, um eine mögliche Parese/Plegie der operierten Extremität zu protokollieren. Darüber hinaus wurden alle operierten Mäuse jeden Tag visitiert. Dabei fand eine körperliche Untersuchung auf äußere Verletzungen (Bisse durch andere Mäuse, Wundheilungsstörungen) und neurologische Defizite statt. Beim Vorhandensein äußerer Verletzungen/Wundheilungsstörungen, wurden diese mit Tetracyclinspray (Oxytetracyclinhydrochlorid, Norbrook Laboratories Ltd, Northamptonshire, England) versorgt.

Aufgrund der körperlichen Konstitution der Mäuse und der Schwere der Traumata wurden Möglichkeiten für die Mäuse geschaffen, ohne große Anstrengungen an Futter und Wasser zu kommen. Einerseits wurden die Futter-Pellets auch auf den Boden gelegt, andererseits wurde Kochagar als Flüssigkeitssubstitution zur Verfügung gestellt.

Die Organentnahme fand nach drei oder vier Wochen statt (siehe Abbildung 1). Vor Tötung der Mäuse wurde den Tieren eine intraperitoneale Injektion von 0,3 mg/kg Körpergewicht (KG) Medetomidin (DORMITOR, Orion Pharma, Bad Homburg, Deutschland) und 60 mg/kg KG Ketamin (Ketamin, Actavis, München, Deutschland) verabreicht. Nach negativem Test des Zehenzwischenreflexes wurde die finale Entblutung mit anschließender zervikaler Dislokation durchgeführt.

Anschließend folgte die Entnahme des linken Femurs bei den Mäusen der Kontroll- und SHT-Gruppe. Bei den Mäusen der Fraktur- und Kombinationsgruppe wurde der linke und rechte Femur entnommen, um die operierte Seite mit der gesunden Seite vergleichen zu können [53].

2.4 In vivo Mikro-Computertomographie

Die operierten Femora der Fraktur- und Kombinations-Mäuse wurden einmal pro Woche postoperativ mittels in-vivo μ CT untersucht. Die Messungen wurden mit einem μ CT-Gerät (Scanco vivaCT 40, Scanco Medical, Brüttisellen, Schweiz) der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité am Campus Virchow-Klinikum durchgeführt.

Vor der Untersuchung wurden die Mäuse mit einer intraperitonealen Injektion von 0,3 mg/kg KG Medetomidin (Dormitor, Orion Pharma, Bad Homburg, Deutschland) und 60 mg/kg KG Ketamin (Ketamin, Actavis, München, Deutschland) sediert, wobei die Spontanatmung erhalten blieb. Dadurch konnten Bewegungsartefakte bei der Prozedur ausgeschlossen werden. Nach erfolgter Messung wurde die Wirkung des Medetomidin durch Gabe von 0,4 mg/kg KG Atipamezolhydrochlorid (Antisedan, Orion Pharma, Bad Homburg, Deutschland) intraperitoneal antagonisiert. Während der Aufwachphase lagen die Mäuse unter einer Wärmelampe, um die Thermoregulation zu unterstützen und die Mortalitätsrate zu senken.

Vor jeder Messung erfolgte eine Kalibration für den Schwarzabgleich von 5 Minuten. Für die eigentliche Messung wurde ein *scout view* erzeugt, mit dem die korrekte Achsstellung des Femurs überprüft und ein Messbereich festgelegt werden konnten (Abb. 4a). Beim Scannen erzeugte der Computertomograph dann 212 Schnittbilder mit einer isotropen Voxel-Größe von 15 μ m und einer Auflösung von 1024 \times 1024 Pixeln. Die Röntgenspannung

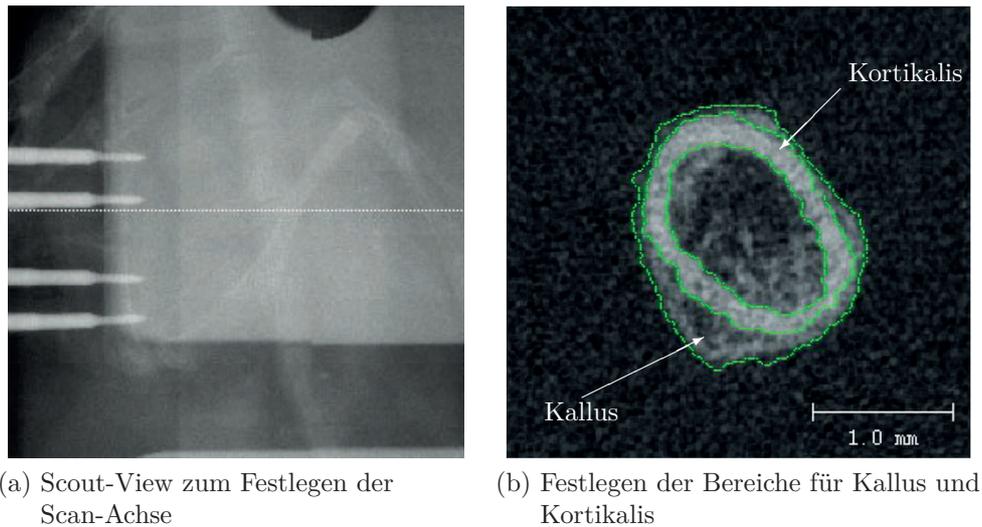


Abbildung 4: Durchführung des µCT-Scans (a), mit Hilfe eines Scout-Views wird die Scan-Achse festgelegt, innerhalb derer 200 Bilder generiert werden. Bei der anschließenden Auswertung (b) wird in der Transversalebene bei jedem Schnittbild der Bereich für den Kallus und die Kortikalis festgelegt.

betrug 55 kV, die Stromstärke 145 µA, die Integrationszeit 381 ms. Die reine Scan-Zeit einer einzelnen CT-Untersuchung dauerte 15 Minuten und 54 Sekunden.

2.4.1 Auswertung Kallusvolumen und Kallusdichte

Die Auswertung der µCT-Bilder erfolgte mit der Scanco Software IPL (Version 5.15, Scanco Medical, Brüttisellen, Schweiz). Im ersten Schritt wurde ein *Volume of Interest* (VOI) von 70 CT-Schnitten festgelegt, welches sich exakt in der Mitte des Frakturspalts befand. Ziel war es dann, das Kallusgewebe und den kortikalen Knochen zu segmentieren, um das Kallusgewebe separat analysieren zu können. Die Segmentierung erfolgte semi-automatisch mit einem Zeichen-Tool, das die unterschiedlichen Graustufenwerte von Kallus und Kortikalis erkennen konnte (Abb. 4b).

Der Threshold zur Berechnung des Kallusvolumens (mm^3) und der Kallusdichte ($\text{mg-Hydroxylapatit}/\text{mm}^3$) war 244, was $576.3 \text{ mg Hydroxylapatit}/\text{cm}^3$ entspricht. Die Bestimmung erfolgte anhand von 20 µCT-Serien, mit denen ein Histogramm erzeugt wurde. Anhand des Histogramms konnte dann der Bereich der Graustufenwerte definiert werden, der Kallusgewebe entspricht.

Das Kallusvolumen entspricht dem Volumen aller Pixel innerhalb der gezeichneten Fläche, die oberhalb des definierten Thresholds liegen. Bei der Kallusdichte entspricht der Graustufenwert eines Voxels (insgesamt 4096 Graustufenwerte) einer definierten Masse an Hydroxylapatit, die ins Verhältnis zum gesamten Kallusvolumen gesetzt wird.

2.4.2 Auswertung Überbrückung der Frakturen

Um mittels μ CT auch eine Aussage darüber zu treffen, ob das gebildete Kallus-Gewebe in der Lage ist, den Frakturspalt zu überbrücken, wurde ein radiologischer Score von Mehta et al. verwendet [54]. Dafür wurde jede CT-Serie in der Frontal-, Sagittal- und Transversalebene hinsichtlich der Überbrückung des Frakturspalts anhand von vier Kategorien analysiert (siehe Abbildung 5). Kategorie A beschreibt die komplette Überbrückung beider Frakturen, zu Kategorie B zählen Frakturen mit inkompletter Überbrückung. Kategorie C beschreibt eine verzögerte Frakturheilung, bei der zwar Kallusgewebe vorhanden ist, dieses den Frakturspalt jedoch nicht überbrückt. Eine Pseudarthrose mit abgerundeten Kortikalisenden beschreibt Kategorie D.

2.5 Biomechanische Auswertung

Das zweite Ziel dieser Arbeit war der Vergleich der biomechanischen Eigenschaften der vier Versuchsgruppen. Die Auswertung folgte im Anschluss an die Organentnahme nach drei oder vier Wochen (siehe Abbildung 1) und wurde mit einem Materialprüfsystem (Bose ElectroForce System TestBench, Friedrichsdorf, Deutschland) des Julius-Wolff-Instituts der Charité Campus Virchow-Klinikum durchgeführt. Es besteht aus einem Linearantrieb, in den die Knochen über Aluminiumblöcke eingespannt wurden (siehe Abb. 6c). Die Bose TestBench wird digital über die Software WinTest (ElectroForce System Group, Minnesota, USA) gesteuert.

Für den Torsionstest wurden der Femurkopf und die Kondylen von Weichteilen freipräpariert, damit eine möglichst stabile Fixierung in den Aluminiumblöcken gewährleistet werden konnte. Um den Kallus nicht zu beschädigen, wurden die Weichteile um den Frakturspalt dagegen nur partiell entfernt.

Die Fixierung des Femurs erfolgte an den Kondylen und am Hüftkopf. Zuerst wurde der Femurkopf mit einer Klammer gehalten, damit das distale Ende eingebettet werden konnte (Abb. 6a). Die Fixierung erfolgte mit einem 2-Komponenten-Kunststoff auf MMA-Basis (Methacrylat), bestehend aus einer Pulver- und einer Flüssigkeitskomponente (Technovit 3040, Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland). Nach einer Aushärtungsphase von 10 Minuten folgte die Einbettung des Femurkopfs, indem ein zweiter Aluminiumblock über einen Metallsteg an den ersten Aluminiumblock befestigt wurde und mit dem Kunststoff aufgefüllt wurde (Abb. 6b). Der Abstand beider Aluminium-Blöcke betrug 6 mm, wobei sich der Frakturspalt bzw. die Diaphyse zwischen den beiden Blöcken befand. Durch den Metallsteg wurde sichergestellt, dass vor der Messung keinerlei Kräfte auf den Knochen wirken konnten.



(a) Kategorie A: Komplette Überbrückung aller vier Cortices



(b) Kategorie B: Inkomplette Überbrückung, zwei von vier Cortices überbrücken



(c) Kategorie C: Keine Überbrückung, Vorhandensein von Kallus ohne Kortikalis-Überbrückung



(d) Kategorie D: Pseudarthrose, abgerundete Kortikalis, kaum Kallusformation

Abbildung 5: Radiologischer Score zur Beurteilung der Überbrückung eines Frakturspalts, nach Mehta et al. [54].

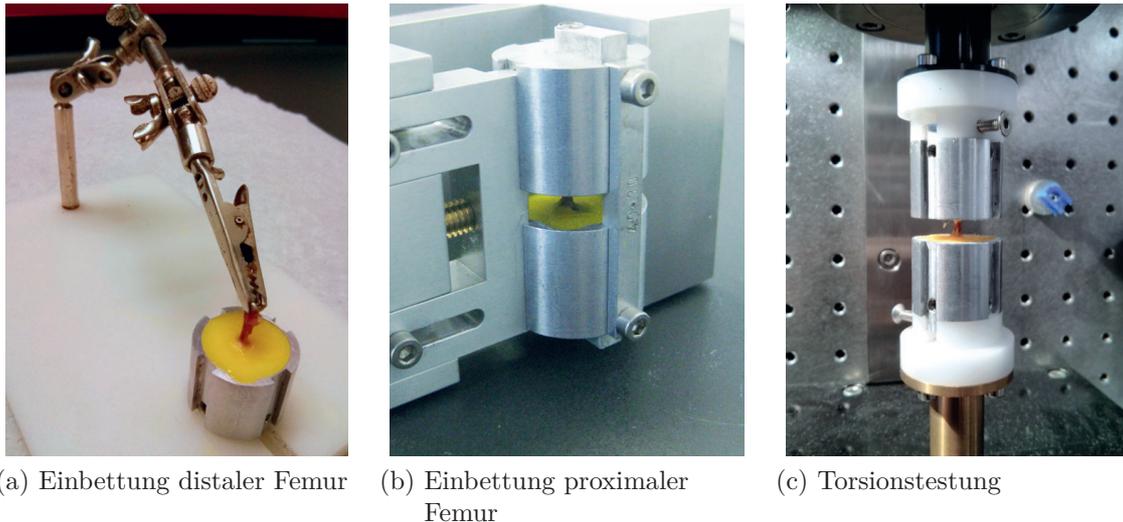


Abbildung 6: Durchführung des Torsionstests: Der distale Femur wird in einem Aluminium-Block mit einem schnell-härtenden 2-Komponenten-Kunststoff fixiert (a). Anschließend Fixierung des Femurkopfs (b). Zuletzt Einspannung in das Messgerät, das ein Drehmoment auf den Knochen ausübt, bis dieser versagt (c).

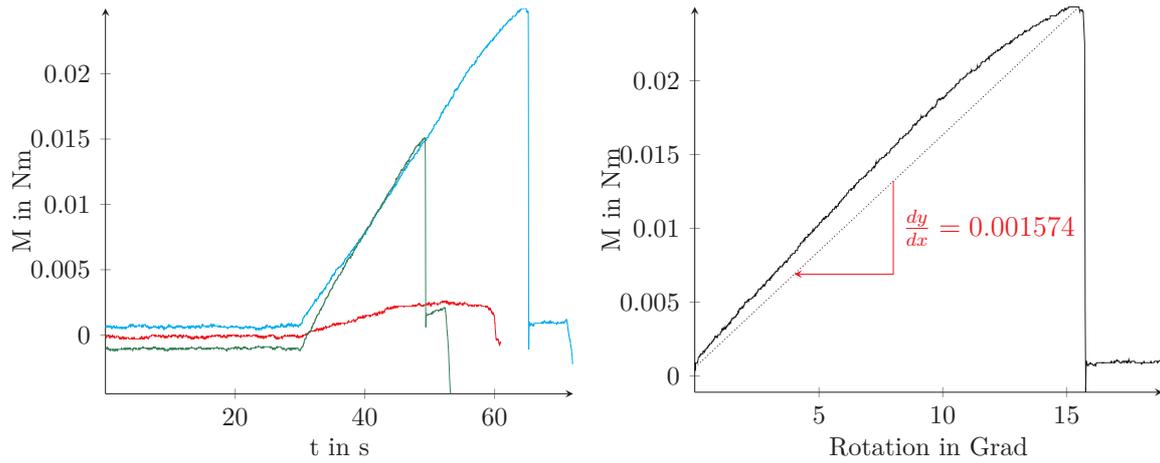
Nach insgesamt 20 Minuten Aushärtungszeit fand die Torsionsmessung statt (Abb. 6c). Dafür wurden beide Aluminiumblöcke, verbunden durch den Metallsteg, in das Testgerät eingespannt. Anschließend wurden die Messparameter (Kraft in N, Rotation in Grad und das Drehmoment in Nm) genullt. Dadurch wurde sichergestellt, dass keine Kräfte auf den Knochen wirkten, sobald der Metallsteg entfernt wurde.

Das Testgerät übte bei gleichbleibender axialer Vorlast ein Drehmoment bei einer mittleren Rotationsgeschwindigkeit von $0,6^\circ/\text{s}$ auf den Knochen auf, wobei die WinTest-Software das Drehmoment und die Rotation gegen die Zeit in einem Diagramm aufzeichnete (siehe Abbildung 7a). Sobald das maximale Drehmoment (M_{\max}) erreicht war, wurde die Messung beendet.

2.5.1 Auswertung der Testergebnisse

Die Ergebnisse des Torsionstests wurden als Excel-Datei (Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten) ausgegeben, aus der das maximale Drehmoment abgelesen werden konnte.

Neben dem maximalen Drehmoment ist die Steifigkeit ein weiterer wichtiger Parameter zur Beurteilung der biomechanischen Qualität eines Knochens [55]. Die Steifigkeit wird durch den Quotienten aus Drehmoment und Rotation beschrieben und gibt somit an, um wieviel Grad die beiden Knochenenden bei einem gegebenen Drehmoment rotiert wurden. Je geringer die Rotation, desto steifer der Knochen. Um die Steifigkeit zu berechnen, wurden die Werte für das Drehmoment gegen die entsprechenden Werte der Rotation in



- (a) Messungen des maximalen Drehmoments von drei verschiedenen Femora aufgetragen gegen die Zeit. Die grüne und blaue Messung stellen konsolidierte Frakturen dar. Die rote Messung ist eine Pseudarthrose.
- (b) Drehmoment einer Messung aufgetragen gegen die Rotation zu jedem Messzeitpunkt. Die Steifigkeit ist die Steigung einer Hilfsgeraden vom Minimum zum Maximum.

Abbildung 7: Diagramme der Biomechanik-Messungen.

einem Diagramm aufgetragen (Abb. 7b). Die Steigung der Kurve entspricht der Steifigkeit. Da die Kurven nicht linear verlaufen, wird eine Gerade vom Nullpunkt zum maximalen Drehmoment gelegt und anhand dessen die Steigung näherungsweise bestimmt [56].

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA). Die Überprüfung der Daten auf Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Die Signifikanzen kategorialer Variablen (μ CT-Scoring) wurden mit dem Exakten Fisher-Test berechnet. Vergleiche innerhalb einer Gruppe wurden mit dem Wilcoxon-Signed-Rank-Test für abhängige Messdaten durchgeführt. Vergleiche zwischen zwei Gruppen erfolgten mit dem Mann-Whitney-U-Test für unabhängige nicht-parametrische Daten.

Ein p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen.

3 Ergebnisse

Zur besseren Vergleichbarkeit enthält der Ergebnis-Teil Daten der bereits von unserer Arbeitsgruppe publizierten Studie mit wt-Mäusen [8]. Die entsprechenden Daten sind, anders als die Daten der vorliegenden Arbeit, in Diagrammen grau dargestellt und im Text gesondert erwähnt.

Die Gewichtsentwicklung der Mäuse stellte sich wie in Abbildung 8 dar. Präoperativ bestanden zwischen den Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede im Körpergewicht. Nach 4 Wochen zeigten ausschließlich die Mäuse der Kombinationsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe ein signifikant reduziertes Körpergewicht ($p < 0,001$).

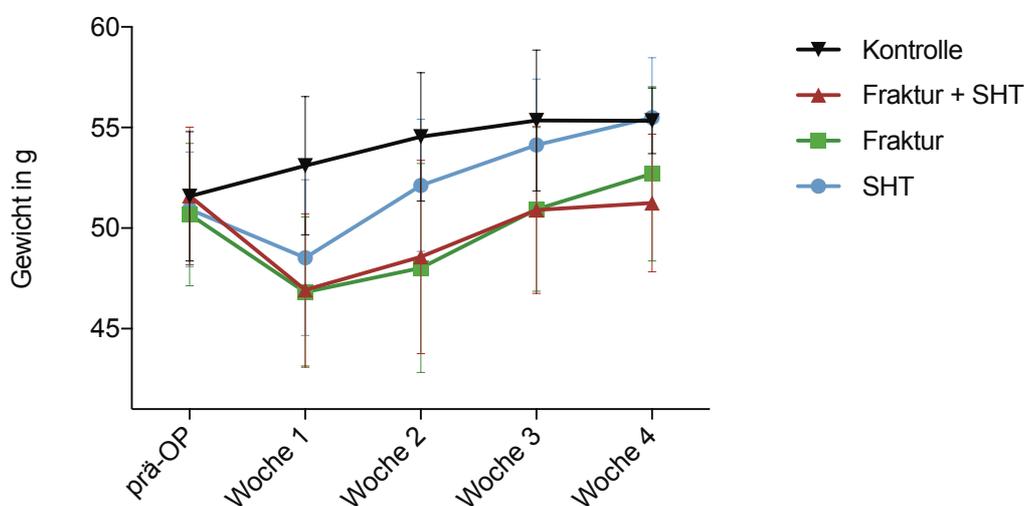


Abbildung 8: Gewichtsentwicklung der Gruppen. Dargestellt sind die Mittelwerte mit einer Standardabweichung.

3.1 Mikro-CT

Bei der μ CT-Auswertung wurden einmal pro Woche postoperativ das Kallusvolumen und die Kallusdichte bei den Mäusen der Fraktur- und Kombinationsgruppe untersucht. Es zeigte sich, dass sowohl in der Fraktur- als auch in der Kombinationsgruppe die Werte im Kallusvolumen und der Kallusdichte über den Messzeitraum stetig anstiegen (siehe Abbildung 9). In der Frakturgruppe waren sowohl das Kallusvolumen ($p < 0,0001$) als auch die Kallusdichte ($p < 0,0001$) bereits in Woche zwei signifikant gegenüber Woche eins erhöht. Auch in Woche drei und vier zeigten sich in der Frakturgruppe im Kallusvolumen und in der Kallusdichte signifikant erhöhte Werte gegenüber der Woche zuvor (Kallusvolumen: Woche 2 vs Woche 3 $p = 0,0008$, Woche 3 vs Woche 4 $p = 0,01$; Kallusdichte: Woche 2 vs Woche 3 $p < 0,0001$, Woche 3 vs Woche 4 $p = 0,002$).

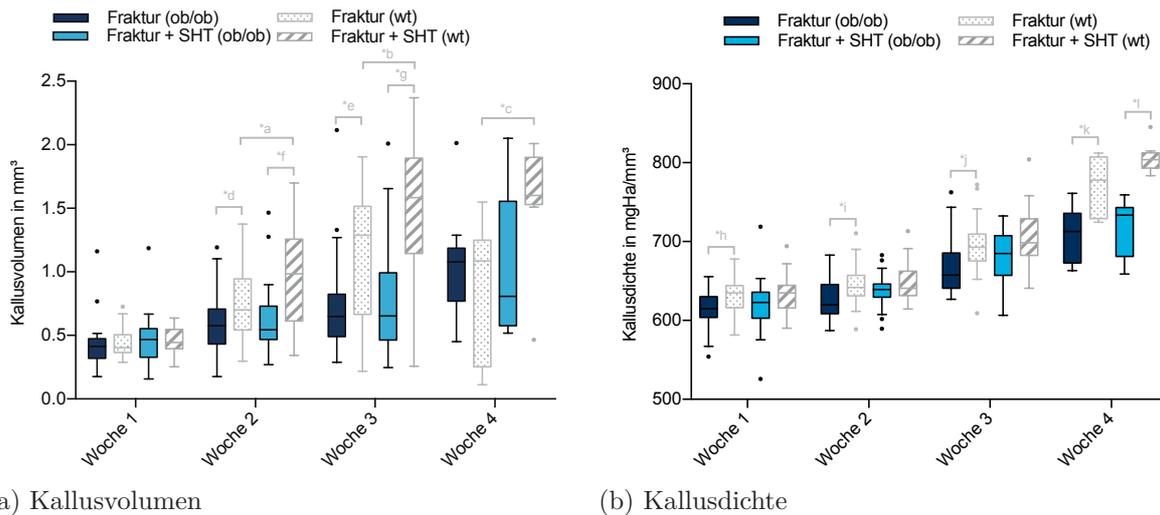


Abbildung 9: Ergebnisse im Kallusvolumen (a) und der Kallusdichte (b). Dargestellt sind Box-plots mit Median und 25. und 75. Perzentile. Zu keinem Messzeitpunkt bestanden statistische Unterschiede zwischen Fraktur- und Kombinationsgruppe der ob/ob-Mäuse im Kallusvolumen und in der Kallusdichte. Bei den wt-Mäusen (in grau) hatten die Mäuse mit kombiniertem Trauma ab Woche 2 signifikant mehr Kallusvolumen als die Mäuse mit isolierter Fraktur [8] (*a $p = 0,02$, *b $p = 0,04$, *c $p < 0,01$, *d $p = 0,03$, *e, *f, *g, *h, *i, *j, *k, *l $p < 0,01$).

Signifikanzniveau $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test für unabhängige, nichtparametrische Stichproben.

Die in grau dargestellten Balken wurden bereits in der wt-Studie publiziert [8].

In der Kombinationsgruppe waren beim Kallusvolumen in Woche zwei ($p < 0,0001$) und vier ($p = 0,0068$) die Werte gegenüber der Vorwoche signifikant erhöht. Bei der Kallusdichte waren die Ergebnisse in Woche zwei ($p = 0,0006$), drei ($p < 0,0001$) und vier ($p = 0,03$) gegenüber der Vorwoche signifikant erhöht.

Beim Vergleich zwischen Fraktur- und Kombinationsgruppe zeigten sich jedoch zu keinem Messzeitpunkt signifikante Unterschiede im Kallusvolumen und in der Kallusdichte (siehe Tabelle 5 und Abbildung 9).

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse der wt-Studie, in der die Mäuse der Kombinationsgruppe in Woche zwei bis vier signifikant mehr Kallusvolumen hatten als die Mäuse der Frakturgruppe [8]. In Woche vier war dieser Unterschied am größten. Hier zeigten die wt-Mäuse der Frakturgruppe weniger Kallusvolumen als in Woche drei, was im Rahmen der physiologischen Frakturheilung auf den Umbau des Kallus nach drei Wochen zurückgeführt werden kann [57]. Dafür spricht auch, dass die Kallusdichte der wt-Mäuse in der Frakturgruppe nach drei Wochen weiter stetig anstieg [8]. Die Frakturgruppe der ob/ob-Mäuse hingegen zeigte in Woche vier keine Reduktion des Kallusvolumens, was als pathologisch-verzögerte Frakturheilung gewertet werden kann.

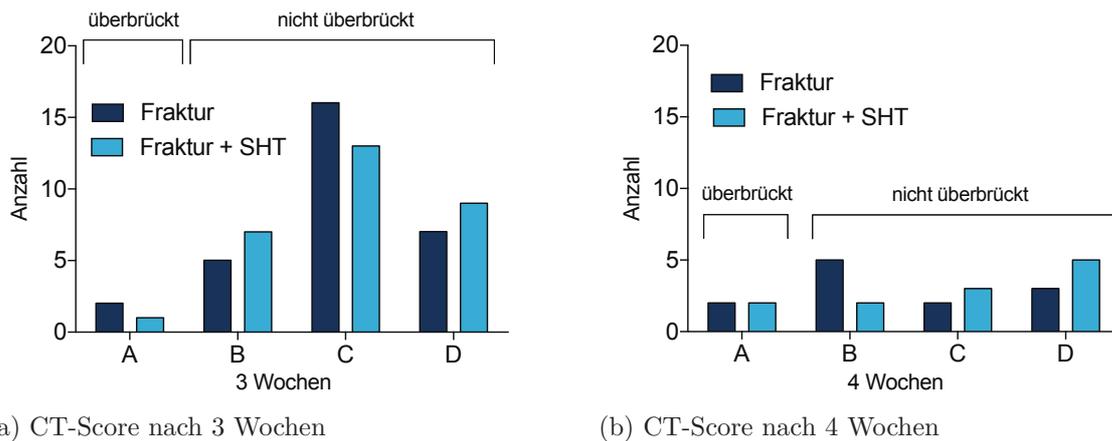


Abbildung 10: Ergebnisse der Auswertung der Fraktur-Überbrückung mittels CT-Score: Dargestellt sind die Anzahl der als Kategorie A, B, C oder D gewerteten Frakturen. Es bestanden keine statistischen Unterschiede nach drei und vier Wochen zwischen Fraktur- und Kombinationsgruppe hinsichtlich der Überbrückung. Signifikanzniveau $p < 0,05$, Exakter Fisher-Test. Kategorie A = komplette Überbrückung, Kategorie B = inkomplette Überbrückung, Kategorie C = keine Überbrückung aber Vorhandensein von Kallus, Kategorie D = Pseudarthrose. Nach Mehta et al. [58].

Zusätzlich zur quantitativen Bestimmung des Kallusvolumens und der Kallusdichte wurde auch die Überbrückung der Osteotomien mittels μ CT bewertet. Die Ergebnisse der μ CT-gestützten Bewertung der Frakturüberbrückung sind in Abbildung 10 und in Tabelle 4 dargestellt.

Zur Berechnung von Unterschieden der Frakturüberbrückung zwischen beiden Kohorten wurden die Kategorien dichotomisiert. Die Kategorien B-D wurden dafür als eine Kategorie für nicht-überbrückte Frakturen zusammengefasst und konnten dadurch gegen Kategorie A für überbrückte Frakturen gerechnet werden (siehe Abbildung 10). Dadurch konnte gezeigt werden, dass nach drei Wochen 93,4% der Frakturen innerhalb der Frakturgruppe und 96,7% der Frakturen innerhalb der Kombinationsgruppe keinen vollständig überbrückten Frakturspalt aufwiesen. Nach vier Wochen hatte sowohl die Fraktur- als auch die Kombinationsgruppe eine Rate von 83,4% nicht vollständig überbrückter Frakturen. Unterschiede zwischen Fraktur- und Kombinationsgruppe nach drei und vier Wochen hinsichtlich der Frakturüberbrückung waren nicht signifikant.

Bei den wt-Mäusen hingegen waren in der Frakturgruppe 59% der Frakturen nach drei und 60% nach vier Wochen überbrückt. In der Kombinationsgruppe waren nach drei Wochen 79% und nach vier Wochen 89% der Frakturen überbrückt [8].

| Gruppe | 3 Wochen | | | | 4 Wochen | | | |
|---------------|----------|-------|-------|-------|----------|-------|-------|-------|
| | A (%) | B (%) | C (%) | D (%) | A (%) | B (%) | C (%) | D (%) |
| Fraktur | 6,6 | 16,6 | 53,3 | 23,3 | 16,6 | 41,6 | 16,6 | 25 |
| Fraktur + SHT | 3,3 | 23,3 | 43,3 | 30 | 16,6 | 16,6 | 25 | 41,6 |

Tabelle 4: Tabellarische Darstellung der qualitativen Auswertung der μ CT-Scans. Angegeben sind die prozentualen Anteile der Kategorien an einer Kohorte. Es bestanden keine statistischen Unterschiede nach drei und vier Wochen zwischen Fraktur- und Kombinationsgruppe hinsichtlich der Überbrückung. Das Signifikanzniveau war $p < 0,05$, Exakter Fisher-Test. Kategorie A = komplette Überbrückung, Kategorie B = inkomplette Überbrückung, Kategorie C = keine Überbrückung aber Vorhandensein von Kallus, Kategorie D = Pseudarthrose. Nach Mehta et al. [58].

| | Zeitpunkt | | Fraktur | | Fraktur + SHT | | p-Wert | |
|--------------------------------------|-----------|--------|---------|-----------------|---------------|--------|-----------------|------|
| Kallusvolumen (mm ³) | 1 w | N = 30 | 0,41 | (0,31-0,47) | N = 30 | 0,46 | (0,32-0,55) | 0,10 |
| | 2 w | N = 29 | 0,57 | (0,43-0,70) | N = 31 | 0,54 | (0,46-0,73) | 0,80 |
| | 3 w | N = 30 | 0,64 | (0,48-0,82) | N = 30 | 0,65 | (0,46-0,99) | 0,80 |
| | 4 w | N = 10 | 1,07 | (0,76-1,18) | N = 12 | 0,80 | (0,57-1,55) | 0,64 |
| Kallusdichte (mgHa/mm ³) | 1 w | N = 30 | 614,85 | (603,88-630,02) | N = 30 | 622,96 | (602,86-635,90) | 0,35 |
| | 2 w | N = 29 | 619,85 | (608,63-645,48) | N = 31 | 639,29 | (629,43-646,15) | 0,08 |
| | 3 w | N = 30 | 657,38 | (640,95-685,47) | N = 30 | 684,79 | (657,22-707,46) | 0,05 |
| | 4 w | N = 10 | 712,66 | (672,73-735,84) | N = 12 | 733,43 | (681,02-743,24) | 0,35 |

Tabelle 5: Ergebnisse der μ -Untersuchungen. Angegeben ist der Median mit 25. und 75. Perzentile. 1 w = 1 Woche, 2 w = 2 Wochen, 3 w = 3 Wochen, 4 w = 4 Wochen. Das Signifikanzniveau ist $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test für unabhängige, nichtparametrische Stichproben.

3.2 Biomechanik

Die biomechanische Analyse der Femur-Knochen erfolgte nach Tötung der Tiere drei und vier Wochen postoperativ. Dabei wurden das maximale Drehmoment und die maximale Steifigkeit der linken Femur-Knochen aller vier Gruppen gemessen (siehe Tabelle 6).

Beim Vergleich von Fraktur- und Kombinationsgruppe konnten keine signifikanten Unterschiede im Drehmoment nach drei und vier Wochen zwischen beiden Gruppen nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11a und Tabelle 6). Auch bei der Steifigkeit nach drei und vier Wochen bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen.

Bei den wt-Mäusen hatte die Kombinationsgruppe nach vier Wochen ein signifikant erhöhtes Drehmoment gegenüber der Frakturgruppe (siehe Abbildung 11b und Tabelle 6) [8].

In der Fraktur- und Kombinationsgruppe wurde zusätzlich zum linken Femur auch beim rechten nicht-operierten Femur das maximale Drehmoment und die maximale Steifigkeit gemessen. Dadurch konnte das Ergebnis der linken Seite in Prozent der kontralateralen rechten Seite angegeben werden, um interindividuelle Unterschiede auszuschließen [53]. Auch hier zeigte sich, dass nach drei und vier Wochen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen im relativen Drehmoment und der relativen Steifigkeit bestanden (siehe Abbildung 13a und Tabelle 6).

Beim Vergleich von Kontroll- und SHT-Gruppe konnten ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede im Drehmoment zwischen beiden Gruppen nach drei und vier Wochen nachgewiesen werden. Bei der Steifigkeit hatte die Kontroll-Gruppe in Woche drei signifikant höhere Werte als die SHT-Gruppe.

Die wt-Mäuse der Kontroll-Gruppe wiesen nach drei Wochen sowohl eine signifikant erhöhte Steifigkeit als auch ein signifikant erhöhtes Drehmoment gegenüber der SHT-Gruppe auf (siehe Tabelle 6 und Abbildung 12) [8].

| | Zeitpunkt | | Fraktur | | Fraktur + SHT | | p-Wert | |
|--------------------------------|-----------|-------|-----------|-----------------|---------------|-------|-----------------|--------|
| Drehmoment $\times 10^{-3}$ | 3 w | N = 8 | 1,20 | (0,70 - 3,20) | N = 8 | 1,75 | (0,70 - 6,57) | 0,562 |
| Drehmoment $\times 10^{-3}$ | 4 w | N = 6 | 3,50 | (1,77 - 18,52) | N = 6 | 1,70 | (1,07 - 7,57) | 0,378 |
| Steifigkeit $\times 10^{-3}$ | 3 w | N = 8 | 0,07 | (0,01 - 0,18) | N = 8 | 0,07 | (0,04 - 0,93) | 0,487 |
| Steifigkeit $\times 10^{-3}$ | 4 w | N = 6 | 0,47 | (0,18 - 1,92) | N = 6 | 0,09 | (0,01 - 0,61) | 0,109 |
| Drehmoment in % d. Gegenseite | 3 w | N = 8 | 12,66 | | N = 8 | 14,74 | | 0,563 |
| Drehmoment in % d. Gegenseite | 4 w | N = 6 | 42,34 | | N = 6 | 19,9 | | 0,423 |
| Steifigkeit in % d. Gegenseite | 3 w | N = 8 | 6,33 | | N = 8 | 26,08 | | 0,728 |
| Steifigkeit in % d. Gegenseite | 4 w | N = 6 | 65,74 | | N = 6 | 19,63 | | 0,150 |
| | Zeitpunkt | SHT | Kontrolle | | | | | p-Wert |
| Drehmoment $\times 10^{-3}$ | 3 w | N = 7 | 20,90 | (17,90 - 23,00) | N = 8 | 23,40 | (21,02 - 26,35) | 0,105 |
| Drehmoment $\times 10^{-3}$ | 4 w | N = 6 | 19,75 | (17,82 - 22,85) | N = 6 | 21,10 | (16,45 - 23,62) | 0,873 |
| Stiffness $\times 10^{-3}$ | 3 w | N = 7 | 1,90 | (1,72 - 2,24) | N = 8 | 3,29 | (2,53 - 3,66) | 0,011 |
| Stiffness $\times 10^{-3}$ | 4 w | N = 6 | 1,95 | (1,38 - 2,15) | N = 6 | 2,29 | (2,06 - 2,72) | 0,078 |

Tabelle 6: Ergebnisse der Biomechanik. Dargestellt sind die Mediane des max. Drehmoment in Nm/° mit 25. und 75. Perzentile. 3 w = 3 Wochen, 4 w = 4 Wochen. Das Signifikanzniveau ist $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test für unabhängige, nichtparametrische Stichproben.

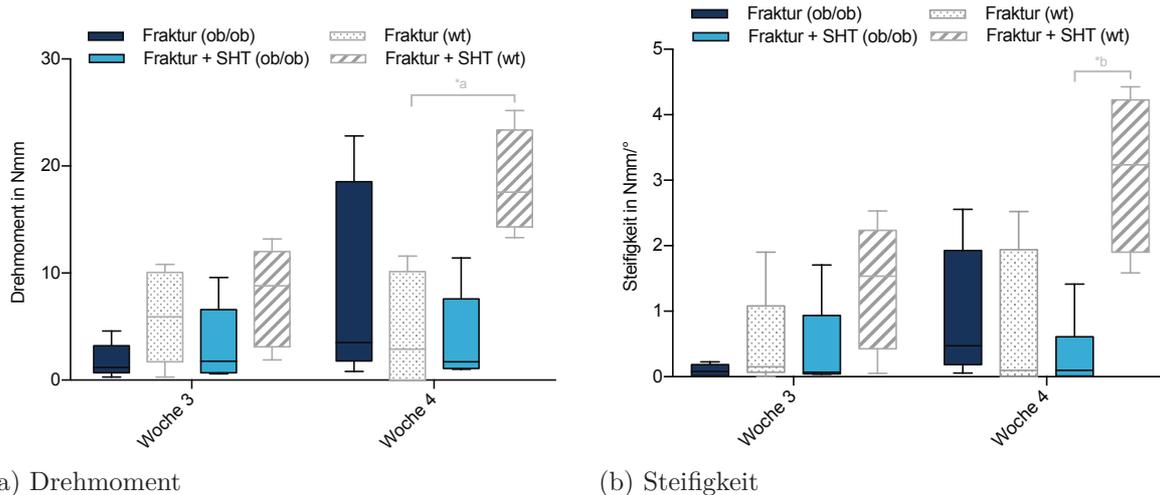


Abbildung 11: Ergebnisse der Biomechanik-Messungen. Verglichen wurden die Fraktur- und Kombinationsgruppe. Dargestellt sind Boxplots mit Median und 25. und 75. Perzentile. Bei den ob/ob-Mäusen bestanden keine statistischen Unterschiede nach drei und vier Wochen im Drehmoment und in der Steifigkeit. Bei den wt-Mäusen hatte die Kombinationsgruppe in Woche vier signifikant höhere Werte als die Frakturgruppe [8] (*a $p = 0,03$, *b $p < 0,01$). Signifikanzniveau $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test für unabhängige, nichtparametrische Stichproben. Die in grau dargestellten Balken wurden bereits in der wt-Studie publiziert [8].

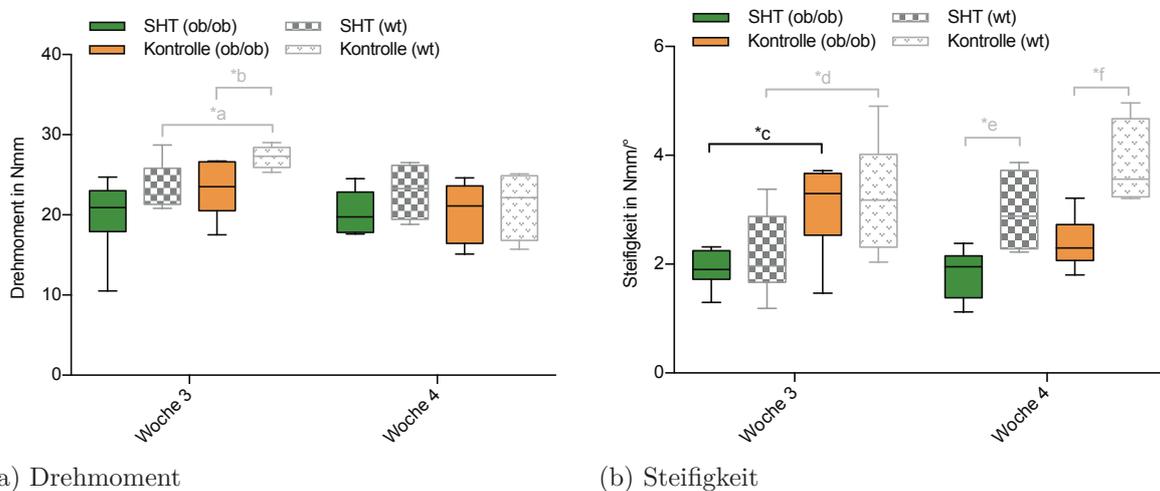
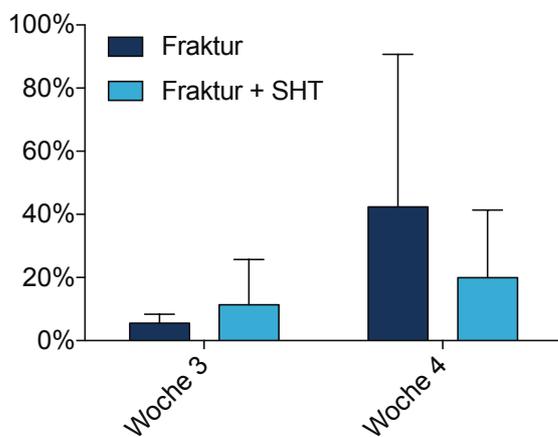
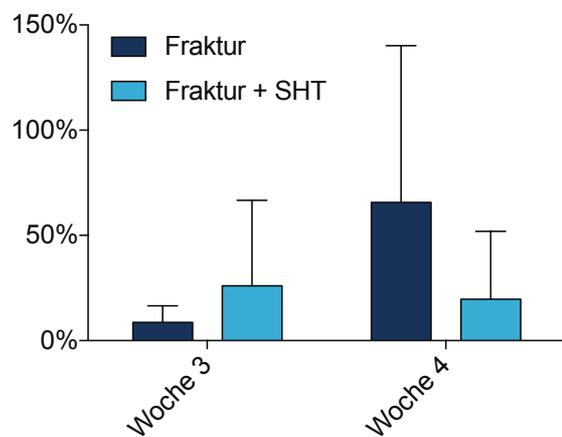


Abbildung 12: Ergebnisse der Biomechanik-Messungen. Verglichen wurden die SHT-Gruppe mit der Kontroll-Gruppe. Dargestellt sind Boxplots mit Median und 25. und 75. Perzentile. Bei den ob/ob-Mäusen hatte die Kontroll-Gruppe nach drei Wochen eine signifikant höhere Steifigkeit als die SHT-Gruppe. Bei den wt-Mäusen war nach drei Wochen in der Kontrollgruppe sowohl das Drehmoment als auch die Steifigkeit gegenüber der SHT-Gruppe signifikant höher [8]. *a $p = 0,02$, *b $p = 0,02$, *c $p < 0,01$, *d $p = 0,04$, *e $p = 0,02$, *f $p = 0,02$. Signifikanzniveau $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test für unabhängige, nichtparametrische Stichproben. Die in grau dargestellten Balken wurden bereits in der wt-Studie publiziert [8].



(a) Drehmoment in Prozent des nicht operierten rechten Femurs.



(b) Steifigkeit in Prozent des nicht operierten rechten Femurs.

Abbildung 13: Darstellung des Drehmoments (a) und der Steifigkeit (b) der operierten Femora in Prozent des nicht operierten rechten Femurs. Dargestellt sind Balken als Mittelwerte mit einer Standardabweichung. Das Signifikanzniveau ist $p < 0,05$, Mann-Whitney-U-Test für unabhängige, nichtparametrische Stichproben.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Ergebnisse

Warum ein SHT zu einer überschießenden Kallusbildung führen kann, ist noch nicht vollständig bekannt. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass 1.) ob/ob-Mäuse in dem beschriebenen Trauma-Modell eine schlechtere Frakturheilung aufwiesen als wt-Mäuse und 2.) dass ein SHT bei ob/ob-Mäusen nicht wie bei wt-Mäusen zu einer vermehrten Kallusbildung führte [8]. Nach unserem Kenntnisstand ist dies die erste Studie mit dieser Fragestellung.

Khan et al. untersuchten ebenfalls Unterschiede in der Frakturheilung zwischen wt- und ob/ob-Mäusen [59]. Dafür erzeugten sie bei allen Mäusen eine Fraktur des Femurs mit einer Zange, die Osteosynthese erfolgte mittels K-Draht. Bei einem Teil der ob/ob-Mäuse wurde im Anschluss an die Operation rekombinantes Leptin in den Frakturspalt appliziert. Die Auswertung erfolgte histologisch, mittels konventionellen Röntgenbildern und der μ CT (Auflösung 44 μ m).

Sie kamen dabei zu dem Ergebnis, dass Leptin-defiziente Mäuse eine signifikant schlechtere Frakturheilung aufwiesen als wt- und ob/ob-Mäuse mit Leptin-Therapie. Des Weiteren konnten sie zeigen, dass die lokale Applikation von Leptin in den Frakturspalt bei ob/ob-Mäusen zu einer Normalisierung der Frakturheilung führte.

Die Leptin-defizienten Mäuse in dieser Studie wiesen in der Histologie, Radiologie und μ CT ein signifikant erhöhtes Kallusvolumen gegenüber den wt- und ob/ob-Mäusen mit Leptin-Behandlung auf. Die Schlussfolgerung, dass die Leptin-defizienten Mäuse trotzdem eine schlechtere Frakturheilung aufwiesen, beruht auf der qualitativen histologischen Auswertung des Frakturkallus. Dort konnten Khan et al. zeigen, dass bei Leptin-defizienten Mäusen zwar das Kallusvolumen erhöht ist, der Kallus selbst aber überwiegend aus hypertrophen Knorpelzellen bestand. Dies wurde als verzögerte chondrale Frakturheilung gewertet. Bei den wt-Mäusen und den ob/ob-Mäusen mit Leptin-Behandlung zeigten sich zu diesem Zeitpunkt keine Knorpelzellen mehr, sondern differenziertes mineralisiertes Knochengewebe.

Auch Turner et al. gehen davon aus, dass Osteoklasten in ob/ob-Mäusen eine reduzierte Aktivität aufweisen [45]. Dadurch soll einerseits der Knochenumbau von Knorpel zu Knochen eingeschränkt sein. Auf der anderen Seite kann die reduzierte Osteoklastenaktivität eine Erklärung dafür sein, warum ob/ob-Mäuse mehr trabekuläres Knochenvolumen aufweisen als wt-Mäuse. Da spongiöser Knochen eine hohe Knochenbildungsrate hat, könnte die Reduktion der Osteoklastenaktivität in diesen Bereichen zu mehr Knochenvolumen führen [45].

Beil et al. untersuchten ebenfalls die Frakturheilung bei ob/ob-Mäusen (C57-BL/6J Lep^{ob}) und Leptin-Rezeptor-defizienten Mäusen (C57BL/6J Lepr^{db}) und verglichen sie mit einer Kontroll-Gruppe von wt-Mäusen [60]. Die Fraktur wurde dabei in allen Gruppen mit einer Guillotine durchgeführt, die Osteosynthese erfolgte ebenfalls mit einem K-Draht. Postoperativ wurde die Frakturheilung durch Histologie/Histomorphometrie, radiologisch mit konventionellen Röntgenbildern und biomechanisch durch eine 3-Punkt-Biegetestung evaluiert.

Beil et al. kamen in ihrer Arbeit zu dem Ergebnisse, dass ob/ob- und db/db-Mäuse eine signifikant bessere Frakturheilung aufwiesen als wt-Mäuse. So konnten bei der biomechanischen Testung signifikant erhöhte Werte in der maximalen Biegekraft, Deformation und Biegesteifigkeit bei den ob/ob- und db/db-Mäusen gegenüber den wt-Mäusen gesehen werden. Die Ergebnisse in der Histomorphometrie zeigten zwar, dass hinsichtlich des Kallusdurchmessers keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bestanden. Jedoch stellte sich heraus, dass die periostale Kallusfläche bei den ob/ob- und db/db-Mäusen gegenüber den wt-Mäusen signifikant erhöht war. Innerhalb dieser periostalen Kallusfläche war auch die Fläche von mineralisiertem Knochen bei den ob/ob- und db/db-Mäusen signifikant erhöht [60].

Die Vergleichbarkeit beider Studien mit der in dieser Arbeit durchgeführten Studie ist schwierig. Das kann einerseits damit begründet werden, dass sich die Methoden zur Auswertung der Frakturheilung unterscheiden. Auf der anderen Seite ist die Vergleichbarkeit der Studien durch die unterschiedlichen Frakturmodelle stark eingeschränkt.

So benutzten wir in dieser Arbeit ein Frakturmodell mit einem segmentalen Knochendefekt von 0,7 mm, die Osteosynthese wurde mit einem Fixateur externe durchgeführt. Die Größe des Osteotomie-Spalts von 0,7 mm könnte in unserer Arbeit dafür verantwortlich sein, dass die Leptin-defizienten Mäuse in beiden Untersuchungsgruppen Pseudarthrosenraten von über 80% nach drei und vier Wochen aufwiesen. Laut Consensus Meeting zu Frakturmodellen bei Kleintieren wird empfohlen, den Osteotomie-Spalt bei offenen Fraktur-Modellen nicht größer als 20% des Knochendurchmessers zu wählen [61]. Die Femur-Knochen der in dieser Studie verwendeten ob/ob-Mäuse hatten je nach Höhe und Mess-Strecke (anterior-posterior, medial-lateral) einen durchschnittlichen Knochendurchmesser im Bereich der Diaphyse von 1,4-2,0 mm. Bei einem Durchmesser von 2,0 mm würde dies bedeuten, dass eine maximale Osteotomie-Breite von 0,4 mm empfohlen wird. Dies legt den Verdacht nahe, dass die hohe Rate an Pseudarthrosen in der vorliegenden Studie auf den relativ großen Knochendefekt von 0,7 mm zurückzuführen sein könnte. Der Vergleich mit unserer Studie an wt-Mäusen aber zeigt, dass wt-Mäuse mit isolierter Fraktur bei gleichem Studiendesign mit einem Knochendefekt von 0,7 mm und der Stabilisierung mit Fixateur externe bereits nach drei Wochen zu 60% vollständig überbrückte Fraktu-

ren aufwiesen [8]. Der relativ große Osteotomie-Spalt von 0,7 mm wurde gewählt, da wir die Frakturheilung mittels in-vivo μ CT über einen längeren Zeitraum beobachten wollten.

In den Studien von Beil et al. und Khan et al. wurde hingegen ein Frakturmodell verwendet, bei dem kein segmentaler Knochendefekt entsteht. Die Fraktur wurde in beiden Studien ebenfalls an der Femur-Diaphyse durchgeführt, wobei nicht mit einer Säge ein Defekt gesetzt wurde, sondern mit einer Zange bzw. Guillotine eine Querfraktur erzeugt wurde. Die Osteosynthese erfolgte in beiden Studien mittels K-Draht. Durch dieses Osteosyntheseverfahren wird jedoch keine axiale Stabilität und auch keine Rotationsstabilität erreicht [61]. Leptin-defiziente Mäuse weisen ein bis zu vierfach höheres Körpergewicht als wt-Mäuse auf (siehe Abb. 8). Deshalb ist davon auszugehen, dass aufgrund der fehlenden Osteosynthesestabilität die mechanische Belastung und somit die interfragmentäre Bewegung (IFM = interfragmentary movement) im Frakturspalt höher war als bei den wt-Mäusen. Es ist bekannt, dass hohe IFMs zu einer erhöhten Kallusproduktion führen können [62–64]. Die dementsprechend erhöhten IFMs könnten in den beiden Arbeiten von Beil et al. und Khan et al. deshalb zu der erhöhten Kallusbildung der ob/ob-Mäuse geführt haben [65].

Unsere Ergebnisse decken sich mit vorangegangenen Studien zur Wirkung von Leptin auf den Knochenstoffwechsel, wie in Kapitel 1.2 erläutert. Denn auch auf zellulärer Ebene ist nachvollziehbar, warum ob/ob-Mäuse eine schlechtere Frakturheilung aufweisen können als wt-Mäuse. So führt die Bindung von Leptin an Rezeptoren auf Osteoblasten und mesenchymalen Stammzellen zu einer gesteigerten Kollagensynthese und Mineralisierung und fördert über eine direkte Wechselwirkung die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten [40–43]. Auch in-vivo Studien an ob/ob-Mäusen konnten zeigen, dass Leptin zu einem signifikanten Anstieg der Osteoblastenaktivität führte [45].

Des Weiteren konnten wir in dieser Arbeit zeigen, dass ob/ob-Mäuse nach SHT, im Gegensatz zu wt-Mäusen, nicht mit einer überschießenden Kallusbildung reagieren. Da die Leptin-Konzentrationen im Serum und Liquor nach SHT signifikant erhöht sind [19, 22, 23, 47] und in dem vorliegenden Leptin-defizienten Traumamodell die Kallusbildung nach SHT nicht signifikant anstieg, könnte Leptin ein wichtiger Faktor sein, der die Kallusbildung nach SHT stimuliert. Diese Schlussfolgerung hat jedoch ihre Limitationen. Zum einen könnte der fehlende Kallus-stimulierende Effekt eines SHT bei ob/ob-Mäusen auch deshalb resultieren, da die Kallusbildung von ob/ob-Mäusen bereits vorher deutlich eingeschränkt war. Da die ob/ob-Mäuse in dieser Studie jedoch bereits in Woche zwei eine signifikante Zunahme des Kallusvolumens aufwiesen und auch in Woche drei und vier ein signifikanter Zuwachs des Kallusvolumens gegenüber der Vorwoche gemessen werden konnte, gingen wir nicht davon aus, dass ein zu geringes Kallusvolumen dafür verantwort-

lich war, dass das SHT keinen Effekt zeigen konnte.

Zudem kommt es bei ob/ob-Mäusen durch das fehlende Leptin zu einer Vielzahl von metabolischen und endokrinologischen Veränderungen, wodurch ob/ob-Mäuse einen komplexen Phänotyp aufweisen, der sich deutlich von wt-Mäusen unterscheidet. Das macht es schwierig, Beobachtungen auf das alleinige Fehlen von Leptin zurückzuführen. So weisen ob/ob-Mäuse eine diabetische Stoffwechsellage auf, die ebenfalls zu einer verzögerten Frakturheilung führen kann [66,67]. Die in dieser Arbeit verwendeten ob/ob-Mäuse stammten von C57BL/6J-Mäusen ab. Dieser Stamm zeichnet sich im Gegensatz zu anderen Mäusestämmen mit Leptindefizienz durch ein moderates metabolisches Syndrom aus [33] (siehe Kapitel 1.2).

Des Weiteren konnte bei ob/ob-Mäusen gezeigt werden, dass diese einen Hypogonadismus und exzessiv erhöhte Kortison-Konzentrationen im Serum aufwiesen [60]. Es ist bekannt, dass ein Hypogonadismus und Hyperkortisolismus zu einer verringerten Knochenmasse führen können [68,69]. Eine verringerte Knochenmasse bzw. Knochenformation wiederum kann zu einer verringerten Knochenheilung führen [60].

Ob ob/ob-Mäuse eine schlechtere Knochenqualität als wt-Mäuse aufweisen, ist abschließend noch nicht geklärt. In dieser Arbeit hatten die Mäuse der Kontrollgruppe ein signifikant niedrigeres maximales Drehmoment in Woche drei und eine signifikant niedrigere Steifigkeit in Woche vier als wt-Mäuse [8]. Die Ergebnisse aus der Literatur dazu sind widersprüchlich. Einerseits konnten Ducey et al. und Reimer et al. zeigen, dass Femora von ob/ob-Mäusen im Biege- und Kompressionstest keine signifikanten Unterschiede gegenüber wt-Mäusen aufwiesen [38, 70]. Auf der anderen Seite hatten die ob/ob-Mäuse in der Studie von Ealey et al. signifikant geringere biomechanische Testparameter als wt-Mäuse [71].

Um die in dieser Arbeit gezeigten Beobachtungen zu bestätigen, könnte in künftigen Studien der komplexe Phänotyp von ob/ob-Mäusen vereinfacht werden, indem im Sinne eines „Gain-of-Function-Modells“ ob/ob-Mäusen Leptin systemisch injiziert wird. Die systemische Gabe von Leptin bei ob/ob-Mäusen kann zu einem vollständigen Wechsel des diabetischen Metabolismus hin zu einem normalen Energie- und Knochenstoffwechsel führen [44, 45, 72]. Dadurch würden die eigentlich Leptin-defizienten ob/ob-Mäuse zwar über das Hormon Leptin verfügen, jedoch wären die verabreichten Mengen bei ob/ob- und wt-Mäusen gleich hoch. Das SHT könnte bei den ob/ob-Mäusen also nicht zu einem Anstieg des Leptins führen. Dadurch wäre es möglich, zu zeigen, ob ein SHT bei ob/ob-Mäusen auch unter einem normalisierten Metabolismus nicht zu einer verstärkten Kallusbildung führt und somit das fehlende Leptin dafür verantwortlich sein könnte.

Auch die Betrachtung des Immunsystems könnte in zukünftigen Studien wichtig sein, da nach SHT inflammatorische Zytokine wie Interleukin 1 und 6 vermehrt exprimiert werden,

die wichtig für die Knochenheilung sind [73] und die Expression von Leptin induzieren können [47, 74–76].

4.2 Diskussion der Methodik

Das übergeordnete Ziel dieser Studie ist es, den biologischen Mechanismus der erhöhten Kallusbildung nach SHT zu verstehen. In der klinischen Praxis stellen Patienten mit einem solchen Verletzungsmuster eine inhomogene Gruppe mit großen Unterschieden im Verletzungsmuster und des Verletzungsgrades dar. Um den Mechanismus der beschleunigten Frakturheilung nach SHT beschreiben zu können, sind standardisierte Bedingungen notwendig. Deshalb war für dieses Versuchsvorhaben ein Tiermodell notwendig.

Die Wahl des Tiermodells hängt vom Versuchsvorhaben ab. Großtiere wie Hunde und Schafe haben den Vorteil, dass es große Ähnlichkeiten in der Knochenheilung zum Menschen gibt. Zudem können die vom Menschen bekannten Operationsmethoden leichter auf Großtiere übertragen werden. Der Nachteil ist jedoch die deutlich teurere Unterbringung und Anschaffung [61]. Der Vorteil von Mäusen besteht darin, dass die Unterbringung und Anschaffung aufgrund der geringen Größe deutlich kostengünstiger ist als bei Großtieren. Ein weiterer Nutzen ist die Verfügbarkeit an genetisch veränderten Mäusen. Dadurch ist es möglich, molekulare Mechanismen der Frakturheilung auf Gen-Ebene zu beobachten. Darüber hinaus können aufgrund des weitgehend bekannten Mäuse-Genoms einzelne Gene auch mittels Antikörpern gezielt und, aufgrund des geringen Gewichts, deutlich kostengünstiger als bei Großtieren gehemmt werden [61, 77].

Ein Nachteil bei der Verwendung von Mäusen ist jedoch, dass die geringe Größe der Nager eine Herausforderung an die Entwicklung von Implantaten und den Operateur stellt [61]. Zudem ist bei der Verwendung von Mäusen zu beachten, dass diese eine primitivere Knochenarchitektur als Menschen besitzen. So ist der Lamellenknochen bei Mäusen nicht in Haverssystemen angeordnet, sondern besteht ausschließlich aus primären Osteonen. Wobei das Remodelling über Resorptionslakunen stattfindet [78]. Laut einem Consensus Meeting von 2011 zu einheitlichen Standards von Kleintiermodellen der Frakturheilung stellt dies jedoch keinen Grund dar, Mäuse nicht für Frakturmodelle benutzen zu können. Als Grund wird angeführt, dass die Knochenarchitektur von Mäusen der Struktur von humanem Knochen sehr nahe kommt [61].

Die in dieser Studie verwendeten Leptin-defizienten Mäuse waren weiblich und bei Versuchsbeginn 10-12 Wochen alt. Beide Faktoren, das Geschlecht und das Alter, spielen bei der Frakturheilung von Mäusen eine wichtige Rolle. So konnte gezeigt werden, dass bereits bei Mäusen mittleren Alters (sechs Monate) die Knochenheilung gegenüber jungen Mäusen (vier Wochen) signifikant reduziert ist [61, 79]. Um die Frakturheilung von Mäusen auf den erwachsenen Menschen übertragen zu können und um unter standardisierten Bedingungen zu arbeiten, dürfen die Mäuse demgegenüber auch nicht zu jung sein. Bei

Mäusen ist das Längenwachstum der Knochen nach acht Wochen abgeschlossen [80]. Der Versuchsbeginn bei einem Alter von 10-12 Wochen stellt somit ein Zeitfenster dar, das weit genug von der reduzierten Frakturheilung im mittleren Alter entfernt ist und nah genug am Alter der abgeschlossenen Knochenentwicklung ist.

Wir verwendeten in dieser Studie weibliche Mäuse, da diese eine langsamere Knochenheilung aufweisen als männliche Mäuse [58]. Dies birgt den Vorteil, dass sich die Knochenheilung bei weiblichen Nagern über einen längeren Zeitraum erstreckt und die verschiedenen Phasen der Frakturheilung so differenzierter untersucht werden können. Zudem können weibliche Mäuse in Gruppen von sechs bis zwölf Tieren pro Käfig gehalten werden. Männliche Mäuse hingegen müssen aufgrund ihres aggressiven Verhaltens meist einzeln in Käfigen gehalten werden, was einen deutlich höheren Kostenfaktor darstellen würde [61].

Das Handling der Mäuse hinsichtlich Anästhesie, Schmerzmanagement und antibiotischer Versorgung erfolgte mit größter Sorgfalt und gemäß den Empfehlungen des Consensus Meeting zu Kleintiermodellen der Frakturheilung von 2011 [61], dem Tierschutzgesetz (TierSchG) und den Vorgaben zum Umgang mit Kleintieren der Forschungseinrichtung experimentelle Medizin (FEM) der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

Die Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose während der Operationen wurde mit dem inhalativen Anästhetikum Isofluran durchgeführt. Der große Vorteil inhalativer Anästhetika gegenüber Injektions-Narkosen ist die kurze Halbwertszeit der Gase im Blut. Dies ist wichtig, wenn Tiere großen Traumata, wie in dieser Studie, ausgesetzt sind: Durch die kurze Halbwertszeit wachen die Mäuse postoperativ schnell wieder auf, wodurch die Regenerationszeit verkürzt wird. Zudem kann die Narkosedauer und -tiefe sehr genau kontrolliert werden. Demgegenüber sind inhalative Anästhetika jedoch teuer und können nur durch spezielle Geräte mit einer entsprechenden Infrastruktur verabreicht werden. Da bei inhalativen Anästhetika meist mit halboffenen Systemen gearbeitet wird, kann eine Exposition der Gase gegenüber dem Operateur nicht immer vermieden werden [61].

Injektions-Narkosen andererseits, wie sie mit Ketamin und Medetomidin bei der μ CT-Untersuchung durchgeführt wurden, sind günstiger, leichter durchzuführen und können vom Untersucher nicht inhaliert werden. Grundsätzlich sollten Injektions-Narkosen nicht innerhalb kurzer Zeitabstände wiederholt werden, da sie langsam abfluten und dadurch die Regenerationszeit der Mäuse deutlich länger wird als bei inhalativen Narkotika [61]. Die μ CT-Untersuchungen dieser Studie mussten mit Injektions-Narkotika durchgeführt werden, da inhalative Narkosen im μ CT technisch nicht durchführbar sind.

In dieser Studie wurde ein kombiniertes Traumamodell für Mäuse angewendet, das von unserer Arbeitsgruppe entwickelt wurde [9]. Dabei wurden zwei bereits etablierte und standardisierte Verfahren zusammengeführt: 1. Die offen-chirurgische Femur-Osteotomie

der Maus und Osteosynthese mittels Fixateur externe [48, 61, 65] und 2. das CCI-Modell zur Induktion eines SHT [50–52]. Beide Modelle waren am Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité-Universitätsmedizin Berlin und der Tierexperimentellen Einrichtung am Campus Virchow-Klinikum bereits etabliert.

So benutzten wir als Frakturmodell die offene Femurosteotomie und Fixation mittels Fixateur externe. Der Hauptgrund für uns, dieses Verfahren anzuwenden, war, dass der Osteotomiespalt dabei nicht in Kontakt mit den Osteosynthese-Implantaten kam, wie es zum Beispiel bei der Frakturversorgung durch einen Nagel oder eine Plattenosteosynthese kommt. Daraus ergaben sich mehrere Vorteile. Denn die Kallus-Formation wurde durch die Implantate nicht beeinflusst und in-vivo μ CT-Untersuchungen konnten artefaktfrei durchgeführt werden. Zudem konnte das Osteosynthesematerial ohne Beschädigung des Kallus nach Tötung der Tiere entfernt werden, was bei Nagel- oder Plattenosteosynthesen nicht der Fall ist. Der in dieser Arbeit verwendete Fixateur externe hatte eine hohe Steifigkeit, wodurch im Frakturspalt eine axiale Stabilität und Rotationsstabilität erreicht wird [61]. Das war notwendig, da die ob/ob-Mäuse der verschiedenen Gruppen unterschiedliche Gewichte aufwiesen (siehe Abb. 8). Bei einem semi-rigiden Fixateur externe hätte das zu einer unterschiedlich hohen Belastung auf den Frakturspalt und dementsprechend zu unterschiedlich hohen IFMs geführt, was zu einer unterschiedlich stark ausgeprägten Formation von Kallus hätte führen können [62–64]. Durch die Verwendung eines steifen Fixateur externe wird eine rigide Osteosynthese geschaffen, die keine IFMs zulässt. Dadurch konnten wir standardisierte und vergleichbare Bedingungen für alle Mäuse trotz unterschiedlicher Körpergewichte schaffen. Nachteile des Fixateur externe sind bei bestimmten Modellen jedoch das hohe Gewicht, das zu einem unphysiologischen Gangbild führen kann, die hohen Anschaffungskosten, die Invasivität des Verfahrens und die hohen Anforderungen an den Operateur. [61]

Für die Erzeugung des SHT wendeten wir das standardisierte Modell des *Controlled Cortical Impact* an, das in unserem Institut bereits etabliert ist [51, 81]. Bei der Wahl des SHT-Modells ist zu berücksichtigen, dass SHT keine einheitliche Entität darstellen, sondern abhängig vom Verletzungsmuster durch das Auftreten unterschiedlicher Pathomechanismen charakterisiert sind. Zu wichtigen Teilaspekten des SHT zählen die fokale Kontusion, das Hirnödem, die intrakranielle Blutung, die Perfusionsstörung und der mechanische Nervenfaserschaden (diffuser Axonschaden), die je nach Verletzung kombiniert in unterschiedlichen Ausprägungen auftreten können [51]. Auch experimentelle SHT-Modelle können nur einen Teil dieser Pathologien simulieren.

Beim CCI wird das SHT nach Kraniotomie über einen pneumatisch betriebenen Schlagbolzen aus Metall induziert. Es entsteht eine kortikale Kontusion mit subduralen Blutun-

gen, Axonenschäden, Gehirnerschütterungen, Verletzungen der Blut-Hirn-Schranke und es kann zum Koma führen [50, 82, 83]. Diffuse Hirnschädigungen wurden nicht beobachtet [51]. Die Methode erlaubt es, Anprallwinkel, Eindringtiefe, Anprallgeschwindigkeit und Kontaktzeit elektronisch präzise zu steuern. Dadurch ist es möglich, eine weite Spanne unterschiedlicher Traumastärken einzustellen. Zudem liefert das CCI reproduzierbare und vergleichbare Ergebnisse, was bei anderen SHT-Modellen wie dem Weight-Drop-Modell, der kortikalen Kälteläsion oder dem Fluid-Percussion-Modell nicht immer gegeben ist [7].

Die Auswertung der Frakturheilung wurde in dieser Studie morphologisch mittels μ CT und funktionell mit einem Torsionstest durchgeführt. Gegenüber der Histomorphometrie hat die μ CT den Nachteil, dass eine Betrachtung zellulärer Vorgänge nicht möglich ist. Dies ist zum Beispiel notwendig, wenn bei der Frakturheilung zwischen intramembranöser und chondraler Ossifikation unterschieden werden soll. Auf CT-Ebene kann nur die Gewebedichte dargestellt werden. In dieser Studie wurde der Threshold dabei so gesetzt, dass zwischen kalzifiziertem Gewebe und nicht-kalzifiziertem Gewebe unterschieden werden konnte. Der Hauptvorteil der μ CT gegenüber der konventionellen Radiologie und der Histomorphometrie besteht jedoch darin, dass das Knochenvolumen dreidimensional betrachtet werden kann und somit Volumenanalysen möglich sind. Ein weiterer Vorteil gegenüber der Histomorphometrie ist, dass bei der radiologischen Analyse die Probe nicht verletzt wird und somit für spätere Untersuchungen noch zur Verfügung steht [84]. Durch in-vivo μ CT-Untersuchungen, wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurden, sind außerdem wiederholte Untersuchungen über einen längeren Zeitraum möglich und damit die longitudinale Betrachtung dynamischer Prozesse wie der Frakturheilung [84]. Der Nachteil von in-vivo μ CTs gegenüber in-vitro μ CTs zeigte sich bei uns jedoch in der für in-vivo-Analysen geringeren Auflösung. Diese war durch die relativ kurze Scan-Zeit unserer in-vivo μ CTs begründet. In dieser Arbeit wurden μ CT-Bilder mit einer Voxel-Seitenlänge von 15 μ m durchgeführt. Es wird empfohlen, dass die Voxel-Größe *höchstens* 50% der Größe des zu analysierenden Objekts betragen soll [84]. Die Trabekel-Dicke von Mäusen wird je nach Literatur zwischen 30-60 μ m und 20-50 μ m angegeben [85, 86]. In dieser Arbeit wurde jedoch ausschließlich Kallusgewebe analysiert, das keine trabekulären Strukturen enthält.

Ein Nachteil von in-vivo μ CT-Untersuchungen kann die Strahlenbelastung v.a. bei wiederholten Messungen sein. Das kann gerade bei mitosereichen Prozessen wie der Frakturheilung problematisch sein [84]. Brouwers et al. konnten jedoch an weiblichen 30 Wochen alten Ratten zeigen, dass wiederholte μ CT-Untersuchungen keinen signifikanten Einfluss auf die Knochenstruktur oder die Anzahl der Knochenmarkszellen hatten [87]. Die μ CT-Untersuchungen wurden dabei unverhältnismäßig lange über 7 Wochen hinweg einmal pro Woche durchgeführt, wobei die Scan-Einstellungen vergleichbar zu denen in unserer Studie waren (70 kV, 85 mA, 350 ms Integrationszeit, 212 Bilder). Klinick et al. konnten

zeigen, dass eine Bestrahlung einmal pro Woche über drei Wochen lang bei wt-Mäusen ebenfalls zu keiner signifikanten Reduktion der Knochenparameter führte (55 kV, 109 μ A, 200 ms Integrationszeit, 211 Bilder). Bei operierten oder transgenen Mäusen führte diese Bestrahlung jedoch zu einer Reduktion des spongiösen Knochenvolumens von 8-20% [88]. Da in dieser Studie mit genveränderten Mäusen gearbeitet wurde, ist eine hemmende Wirkung der μ CT-Untersuchungen auf die Frakturheilung nicht auszuschließen. Weil die μ CT-Einstellungen sowohl für die Fraktur- als auch die Kombinationsgruppe jedoch identisch waren, ist die Vergleichbarkeit zwischen beiden Gruppen innerhalb dieser Studie gegeben. Beim Vergleich mit anderen Studien muss die Strahlenbelastung jedoch berücksichtigt werden.

Die funktionelle Auswertung der Frakturheilung erfolgte in dieser Studie durch einen Torsionstest. Prinzipiell stehen zur biomechanischen Analyse von Knochen eine Vielzahl an Verfahren zur Verfügung wie dem Drei-Punkt-Biegetest, dem Vier-Punkt-Biegetest und dem Torsionstest [89]. Beim Drei-Punkt-Biegetest wird punktuell im Bereich der Diaphyse eine Biegekräft auf den Knochen ausgeübt, die applizierte Kraft ist damit an diesem Punkt am stärksten, wodurch nicht der gesamte Knochen getestet werden kann. Die Fraktur tritt dadurch nicht zwangsläufig am schwächsten Punkt des Knochens auf. Der Vier-Punkt-Biegetest und der Torsionstest gelten beide als Verfahren, um den gesamten Knochen zu testen [90].

Ein Vorteil von Torsionstests gegenüber Biegetests besteht darin, dass der Torsionstest unabhängig von der geometrischen Ausrichtung ausgeführt werden kann. Bei Biegetests ist die Orientierung des Knochens im Raum (anterior-posterior, medial-lateral, usw.) ausschlaggebend für das Testergebnis [91]. Ansonsten gelten der Vier-Punkt-Biege-Test und der Torsionstest als gleichwertig bei der Messung mechanischer Eigenschaften von Kleintier-Knochen [89]. In dieser Arbeit wurde ein Torsionstest verwendet, auch, da er in unserem Institut bereits etabliert war. Die Bose TestBench, die für den Test verwendet wurde, kann hochsensibel Änderungen des Drehmoments im Bereich 10^{-4} Nm anzeigen. Ein weiterer Vorteil der TestBench war, dass das Drehmoment bei gleichbleibender axialer Vorlast getestet werden konnte. Ähnlich wie beim Auswringen eines nassen Handtuchs verkürzt sich die Länge eines Körpers mit zunehmender Rotation des einen Endes gegen das andere Ende. Bei einem starren Testgerät würde dies zusätzliche Zugkräfte auf den Knochen ausüben, was in dieser Studie nicht der Fall war.

Literatur

- [1] A. M. Toffoli, O. P. Gautschi, S. P. Frey, L. Filgueira, and R. Zellweger, “From brain to bone: evidence for the release of osteogenic humoral factors after traumatic brain injury.,” *Brain injury : [BI]*, vol. 22, pp. 511–8, July 2008.
- [2] D. E. Garland, B. Rothi, and R. L. Waters, “Femoral fractures in head-injuries adults.,” *Clinical orthopaedics and related research*, no. 166, pp. 219–225, 1982.
- [3] R. Perkins and A. P. Skirving, “Callus formation and the rate of healing of femoral fractures in patients with head injuries.,” *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, vol. 69, pp. 521–4, Aug. 1987.
- [4] T.-Y. Yang, T.-C. Wang, Y.-H. Tsai, and K.-C. Huang, “The effects of an injury to the brain on bone healing and callus formation in young adults with fractures of the femoral shaft.,” *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, vol. 94, pp. 227–30, Feb. 2012.
- [5] R. F. Spencer, “The effect of head injury on fracture healing. A quantitative assessment.,” *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, vol. 69, pp. 525–8, Aug. 1987.
- [6] Y. Song, L. Bi, Z. Zhang, Z. Huang, W. Hou, X. Lu, P. Sun, and Y. Han, “Increased levels of calcitonin gene-related peptide in serum accelerate fracture healing following traumatic brain injury.,” *Molecular medicine reports*, vol. 5, pp. 432–8, Feb. 2012.
- [7] D. M. Morales, N. Marklund, D. Lebold, H. J. Thompson, A. Pitkanen, W. L. Maxwell, L. Longhi, H. Laurer, M. Maegele, E. Neugebauer, D. I. Graham, N. Stocchetti, and T. K. McIntosh, “Experimental models of traumatic brain injury: do we really need to build a better mousetrap?,” *Neuroscience*, vol. 136, pp. 971–89, jan 2005.
- [8] R. J. Locher, T. Lünemann, A. Garbe, K.-D. Schaser, K. Schmidt-Bleek, G. Duda, and S. Tsitsilonis, “Traumatic brain injury and bone healing: radiographic and biomechanical analyses of bone formation and stability in a combined murine trauma model.,” *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions*, vol. 15, pp. 309–15, dec 2015.
- [9] S. Tsitsilonis, R. Seemann, M. Misch, F. Wichlas, N. P. Haas, K. Schmidt-Bleek, C. Kleber, and K.-D. Schaser, “The effect of traumatic brain injury on bone healing: an experimental study in a novel in vivo animal model,” *Injury*, vol. 46, no. 4, pp. 661–665, 2015.
- [10] N. P. Haas, “[Callus modulation—fiction or reality?].,” *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin*, vol. 71, pp. 987–8, Sept. 2000.

- [11] P. Garcia, J. H. Holstein, T. Histing, M. Burkhardt, U. Culemann, A. Pizanis, R. J. Wirbel, T. Pohlemann, and M. D. Menger, “A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: Impact of stability on fracture healing,” *Journal of Biomechanics*, vol. 41, no. 8, pp. 1689–1696, 2008.
- [12] N. K. Kanakaris and P. V. Giannoudis, “The health economics of the treatment of long-bone non-unions.,” *Injury*, vol. 38 Suppl 2, pp. S77–84, May 2007.
- [13] H. Z. Herold, A. Tadmor, and A. Hurvitz, “Callus formation after acute brain damage.,” *Israel journal of medical sciences*, vol. 6, no. 1, pp. 163–6.
- [14] J. Andermahr, A. Elsner, A. E. Brings, T. Hensler, H. Gerbershagen, and A. Jubel, “Reduced collagen degradation in polytraumas with traumatic brain injury causes enhanced osteogenesis.,” *Journal of neurotrauma*, vol. 23, pp. 708–20, May 2006.
- [15] M. Boes, M. Kain, S. Kakar, F. Nicholls, D. Cullinane, L. Gerstenfeld, T. a. Einhorn, and P. Tornetta, “Osteogenic effects of traumatic brain injury on experimental fracture-healing.,” *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 88, pp. 738–43, Apr. 2006.
- [16] P. V. Giannoudis, S. Mushtaq, P. Harwood, S. Kambhampati, M. Dimoutsos, Z. Stavrou, and H. C. Pape, “Accelerated bone healing and excessive callus formation in patients with femoral fracture and head injury.,” *Injury*, vol. 37 Suppl 3, pp. S18–24, Sept. 2006.
- [17] D. Cadosch, O. P. Gautschi, M. Thyer, S. Song, A. P. Skirving, L. Filgueira, and R. Zellweger, “Humoral factors enhance fracture-healing and callus formation in patients with traumatic brain injury.,” *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 91, pp. 282–8, Feb. 2009.
- [18] O. P. Gautschi, D. Cadosch, S. P. Frey, A. P. Skirving, L. Filgueira, and R. Zellweger, “Serum-mediated osteogenic effect in traumatic brain-injured patients.,” *ANZ journal of surgery*, vol. 79, pp. 449–55, June 2009.
- [19] L. Wang, J.-s. Yuan, H.-x. Zhang, H. Ding, X.-g. Tang, and Y.-z. Wei, “Effect of leptin on bone metabolism in rat model of traumatic brain injury and femoral fracture.,” *Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi / Chinese Medical Association*, vol. 14, pp. 7–13, Feb. 2011.
- [20] W. Huang, Z. Li, Z. Li, and R. Yang, “Does traumatic brain injury result in accelerated mandibular fracture healing?,” *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, vol. 70, pp. 2135–42, Sept. 2012.

- [21] X. Liu, C. Zhou, Y. Li, Y. Ji, G. Xu, X. Wang, and J. Yan, “SDF-1 promotes endochondral bone repair during fracture healing at the traumatic brain injury condition.,” *PLoS one*, vol. 8, p. e54077, Jan. 2013.
- [22] Y. Wei, L. Wang, J. C. M. Clark, C. R. Dass, and P. F. M. Choong, “Elevated leptin expression in a rat model of fracture and traumatic brain injury.,” *The Journal of pharmacy and pharmacology*, vol. 60, no. 12, pp. 1667–1672, 2008.
- [23] H. Yan, H.-W. Zhang, P. Fu, B.-L. Liu, W.-Z. Jin, S.-B. Duan, J. Xue, K. Liu, Z.-M. Sun, and X.-W. Zeng, “Leptin’s effect on accelerated fracture healing after traumatic brain injury.,” *Neurological research*, vol. 35, pp. 537–44, June 2013.
- [24] D. Cadosch, M. Thyer, O. P. Gautschi, G. Lochnit, S. P. Frey, R. Zellweger, L. Filgueira, and A. P. Skirving, “Functional and proteomic analysis of serum and cerebrospinal fluid derived from patients with traumatic brain injury: a pilot study.,” *ANZ journal of surgery*, vol. 80, no. 7-8, pp. 542–7, 2010.
- [25] T. Komori, “Regulation of bone development and maintenance by Runx2.,” *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, vol. 13, pp. 898–903, 2008.
- [26] Y. Zhang, R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold, and J. M. Friedman, “Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue.,” *Nature*, vol. 372, no. 6505, pp. 425–432, 1994.
- [27] L. A. Campfield, F. J. Smith, Y. Guisez, R. Devos, and P. Burn, “Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks.,” *Science (New York, N.Y.)*, vol. 269, no. 5223, pp. 546–549, 1995.
- [28] A. Bado, S. Levasseur, S. Attoub, S. Kermorgant, J. P. Laigneau, M. N. Bortoluzzi, L. Moizo, T. Lehy, M. Guerre-Millo, Y. Le Marchand-Brustel, and M. J. Lewin, “The stomach is a source of leptin.,” *Nature*, vol. 394, no. 6695, pp. 790–793, 1998.
- [29] H. Masuzaki, Y. Ogawa, N. Sagawa, K. Hosoda, T. Matsumoto, H. Mise, H. Nishimura, Y. Yoshimasa, I. Tanaka, T. Mori, and K. Nakao, “Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans.,” *Nature medicine*, vol. 3, no. 9, pp. 1029–1033, 1997.
- [30] B. Morash, A. Li, P. R. Murphy, M. Wilkinson, and E. Ur, “Leptin gene expression in the brain and pituitary gland.,” *Endocrinology*, vol. 140, no. 12, pp. 5995–5998, 1999.
- [31] P. Laharrague, D. Larrouy, A. M. Fontanilles, N. Truel, A. Campfield, R. Tenenbaum, J. Galitzky, J. X. Corberand, L. Pénicaud, and L. Casteilla, “High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture.,” *The FASEB journal : official*

- publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 12, no. 9, pp. 747–752, 1998.
- [32] a. M. Ingalls, M. M. Dickie, and G. D. Snell, “Obese, a new mutation in the house mouse.,” *Obesity research*, vol. 4, no. 1, p. 101, 1950.
- [33] A. J. Kennedy, K. L. J. Ellacott, V. L. King, and A. H. Hasty, “Mouse models of the metabolic syndrome.,” *Disease models & mechanisms*, vol. 3, no. 3-4, pp. 156–66, 2010.
- [34] R. Tsuboi, C. M. Shi, D. B. Rifkin, and H. Ogawa, “A wound healing model using healing-impaired diabetic mice.,” *The Journal of dermatology*, vol. 19, no. 11, pp. 673–675, 1992.
- [35] S. M. Genuth, R. J. Przybylski, and D. M. Rosenberg, “Insulin resistance in genetically obese, hyperglycemic mice.,” *Endocrinology*, vol. 88, no. 5, pp. 1230–1238, 1971.
- [36] D. L. Coleman and K. Hummel, “The Influence of Genetic Background on the Expression of the Obese,” *Diabetologia*, vol. 9, pp. 287–293, 1973.
- [37] J. Qiu, S. Ogus, K. Mounzih, A. Ewart-Toland, and F. F. Chehab, “Leptin-deficient mice backcrossed to the BALB/cJ genetic background have reduced adiposity, enhanced fertility, normal body temperature, and severe diabetes,” *Endocrinology*, vol. 142, no. 8, pp. 3421–3425, 2001.
- [38] P. Ducy, M. Amling, S. Takeda, M. Priemel, a. F. Schilling, F. T. Beil, J. Shen, C. Vinson, J. M. Rueger, and G. Karsenty, “Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass.,” *Cell*, vol. 100, pp. 197–207, Jan. 2000.
- [39] U. T. Iwaniec, S. Boghossian, P. D. Lapke, R. T. Turner, and S. P. Kalra, “Central leptin gene therapy corrects skeletal abnormalities in leptin-deficient ob/ob mice.,” *Peptides*, vol. 28, pp. 1012–9, May 2007.
- [40] J. E. Reseland, U. Syversen, I. Bakke, G. Qvigstad, L. G. Eide, O. Hjertner, J. O. Gordeladze, and C. A. Drevon, “Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization.,” *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 16, no. 8, pp. 1426–1433, 2001.
- [41] J. O. Gordeladze, C. A. Drevon, U. Syversen, and J. E. Reseland, “Leptin Stimulates Human Osteoblastic Cell Proliferation , De Novo Collagen Synthesis , and Minerali-

- zation : Impact on Differentiation Markers , Apoptosis , and Osteoclastic Signaling,” vol. 836, pp. 825–836, 2002.
- [42] R. Hess, A. M. Pino, S. Ríos, M. Fernández, and J. P. Rodríguez, “High affinity leptin receptors are present in human mesenchymal stem cells (MSCs) derived from control and osteoporotic donors,” *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 94, no. 1, pp. 50–57, 2005.
- [43] T. Thomas, F. Gori, S. Khosla, M. D. Jensen, B. Burguera, and B. L. Riggs, “Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes,” *Endocrinology*, vol. 140, no. 4, pp. 1630–1638, 1999.
- [44] C. M. Steppan, D. T. Crawford, K. L. Chidsey-Frink, H. Ke, and a. G. Swick, “Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice.,” *Regulatory peptides*, vol. 92, pp. 73–8, Aug. 2000.
- [45] R. T. Turner, S. P. Kalra, C. P. Wong, K. A. Philbrick, L. B. Lindenmaier, S. Boghossian, and U. T. Iwaniec, “Peripheral leptin regulates bone formation.,” *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 28, pp. 22–34, jan 2013.
- [46] B. Burguera, L. C. Hofbauer, T. Thomas, F. Gori, G. L. Evans, S. Khosla, B. L. Riggs, and R. T. Turner, “Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats.,” *Endocrinology*, vol. 142, pp. 3546–53, aug 2001.
- [47] C. Lin, S.-J. Huang, N. Wang, and Z.-P. Shen, “Relationship between plasma leptin levels and clinical outcomes of pediatric traumatic brain injury,” *Peptides*, vol. 35, no. 2, pp. 166–171, 2012.
- [48] K. M. C. Cheung, K. Kaluarachi, G. Andrew, W. Lu, D. Chan, and K. S. E. Cheah, “An externally fixed femoral fracture model for mice.,” *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 21, pp. 685–90, July 2003.
- [49] T. Histing, J. H. Holstein, P. Garcia, R. Matthys, A. Kristen, L. Claes, M. D. Menger, and T. Pohlemann, “Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture.,” *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 27, pp. 1152–6, Sept. 2009.
- [50] D. H. Smith, H. D. Soares, J. S. Pierce, K. G. Perlman, K. E. Saatman, D. F. Meaney, C. E. Dixon, and T. K. McIntosh, “A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects.,” *Journal of neurotrauma*, vol. 12, pp. 169–78, Apr. 1995.

- [51] U. W. Thomale, M. Griebenow, A. Mautes, T. F. Beyer, N.-K. Dohse, R. Stroop, O. W. Sakowitz, A. W. Unterberg, and J. F. Stover, “Heterogeneous regional and temporal energetic impairment following controlled cortical impact injury in rats.,” *Neurological research*, vol. 29, no. 6, pp. 594–603, 2007.
- [52] U. W. Thomale, S. N. Kroppenstedt, T. F. Beyer, K. D. Schaser, A. W. Unterberg, and J. F. Stover, “Temporal profile of cortical perfusion and microcirculation after controlled cortical impact injury in rats.,” *Journal of neurotrauma*, vol. 19, pp. 403–13, Apr. 2002.
- [53] H. Schell, J. Lienau, D. R. Epari, P. Seebeck, C. Exner, S. Muchow, H. Bragulla, N. P. Haas, and G. N. Duda, “Osteoclastic activity begins early and increases over the course of bone healing.,” *Bone*, vol. 38, pp. 547–54, Apr. 2006.
- [54] M. Mehta, P. Strube, a. Peters, C. Perka, D. Hutmacher, P. Fratzl, and G. N. Duda, “Influences of age and mechanical stability on volume, microstructure, and mineralization of the fracture callus during bone healing: is osteoclast activity the key to age-related impaired healing?,” *Bone*, vol. 47, pp. 219–28, Aug. 2010.
- [55] S. S. Trostle and M. D. Markel, “Fracture biology, biomechanics, and internal fixation.,” *The Veterinary clinics of North America. Food animal practice*, vol. 12, pp. 19–46, Mar. 1996.
- [56] A. A. White, M. M. Panjabi, and W. O. Southwick, “The four biomechanical stages of fracture repair.,” *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, vol. 59, pp. 188–92, Mar. 1977.
- [57] M. B. Manigrasso and J. P. O’Connor, “Characterization of a closed femur fracture model in mice.,” *Journal of orthopaedic trauma*, vol. 18, no. 10, pp. 687–95, 2004.
- [58] M. Mehta, H. Schell, C. Schwarz, A. Peters, K. Schmidt-Bleek, A. Ellinghaus, H. J. Bail, G. N. Duda, and J. Lienau, “A 5-mm femoral defect in female but not in male rats leads to a reproducible atrophic non-union.,” *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, vol. 131, pp. 121–9, Jan. 2011.
- [59] S. N. Khan, G. DuRaine, S. S. Virk, J. Fung, D. J. Rowland, a. H. Reddi, and M. a. Lee, “The temporal role of leptin within fracture healing and the effect of local application of recombinant leptin on fracture healing.,” *Journal of orthopaedic trauma*, vol. 27, pp. 656–62, Nov. 2013.
- [60] F. T. Beil, F. Barvencik, M. Gebauer, B. Beil, P. Pogoda, J. M. Rueger, A. Ignatius, T. Schinke, and M. Amling, “Effects of increased bone formation on fracture healing in mice.,” *The Journal of trauma*, vol. 70, pp. 857–62, Apr. 2011.

- [61] T. Histing, P. Garcia, J. H. Holstein, M. Klein, R. Matthys, R. Nuetzi, R. Steck, M. W. Laschke, T. Wehner, R. Bindl, S. Recknagel, E. K. Stuermer, B. Vollmar, B. Wildemann, J. Lienau, B. Willie, A. Peters, A. Ignatius, T. Pohlemann, L. Claes, and M. D. Menger, “Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting.,” *Bone*, vol. 49, pp. 591–9, Oct. 2011.
- [62] L. Claes, P. Augat, G. Suger, and H. J. Wilke, “Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing.,” *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 15, pp. 577–84, July 1997.
- [63] A. E. Goodship and J. Kenwright, “The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures.,” *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, vol. 67, pp. 650–5, Aug. 1985.
- [64] J. Kenwright, J. B. Richardson, A. E. Goodship, M. Evans, D. J. Kelly, A. J. Spriggins, J. H. Newman, S. J. Burrough, J. D. Harris, and D. I. Rowley, “Effect of controlled axial micromovement on healing of tibial fractures.,” *Lancet*, vol. 2, pp. 1185–7, Nov. 1986.
- [65] V. Röntgen, R. Blakytyn, R. Matthys, M. Landauer, T. Wehner, M. Göckelmann, P. Jermendy, M. Amling, T. Schinke, L. Claes, and A. Ignatius, “Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator.,” *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*, vol. 28, no. 11, pp. 1456–1462, 2010.
- [66] S. B. Chaudhary, F. A. Liporace, A. Gandhi, B. G. Donley, M. S. Pinzur, and S. S. Lin, “Complications of ankle fracture in patients with diabetes.,” *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons*, vol. 16, no. 3, pp. 159–170, 2008.
- [67] M. L. Brown, K. Yukata, C. W. Farnsworth, D. G. Chen, H. Awad, M. J. Hilton, R. J. O’Keefe, L. Xing, R. A. Mooney, and M. J. Zuscik, “Delayed fracture healing and increased callus adiposity in a C57BL/6J Murine model of obesity-associated type 2 diabetes mellitus,” *PLoS ONE*, vol. 9, no. 6, 2014.
- [68] B. L. Riggs and L. J. r. Melton, “Involutional osteoporosis.,” *N Engl J Med*, vol. 314, no. 26, pp. 1676–1686, 1986.
- [69] Y. S. Chyun, B. E. Kream, and L. G. Raisz, “Cortisol decreases bone formation by inhibiting periosteal cell proliferation,” *Endocrinology*, vol. 114, no. 2, pp. 477–480, 1984.

- [70] R. a. Reimer, J. M. Lamothe, and R. F. Zernicke, “Leptin Deficiency and Its Effects on Tibial and Vertebral Bone Mechanical Properties in Mature Genetically Lean and Obese JCR:LA-Corpulent Rats.,” *Journal of obesity*, vol. 2012, p. 650193, jan 2012.
- [71] K. N. Ealey, D. Fonseca, M. C. Archer, and W. E. Ward, “Bone abnormalities in adolescent leptin-deficient mice.,” *Regulatory peptides*, vol. 136, pp. 9–13, sep 2006.
- [72] B. Stallmeyer, J. Pfeilschifter, and S. Frank, “Systemically and topically supplemented leptin fails to reconstitute a normal angiogenic response during skin repair in diabetic ob/ob mice.,” *Diabetologia*, vol. 44, pp. 471–9, apr 2001.
- [73] A. Schindeler, M. M. McDonald, P. Bokko, and D. G. Little, “Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture.,” *Seminars in cell & developmental biology*, vol. 19, pp. 459–66, Oct. 2008.
- [74] R. Faggioni, K. R. Feingold, and C. Grunfeld, “Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition.,” *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 15, no. 14, pp. 2565–2571, 2001.
- [75] G. Fantuzzi and R. Faggioni, “Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis.,” *Journal of leukocyte biology*, vol. 68, no. 4, pp. 437–446, 2000.
- [76] P. Sarraf, R. C. Frederich, E. M. Turner, G. Ma, N. T. Jaskowiak, D. J. Rivet, J. S. Flier, B. B. Lowell, D. L. Fraker, and H. R. Alexander, “Multiple cytokines and acute inflammation raise mouse leptin levels: potential role in inflammatory anorexia.,” *The Journal of experimental medicine*, vol. 185, no. 1, pp. 171–175, 1997.
- [77] O. Jacenko and B. R. Olsen, “Transgenic mouse models in studies of skeletal disorders,” in *Journal of Rheumatology*, vol. 22, pp. 39–41, 1995.
- [78] D. M. Nunamaker, “Experimental models of fracture repair.,” *Clinical orthopaedics and related research*, pp. S56–S65, 1998.
- [79] K.-T. Lu, Y.-W. Wang, J.-T. Yang, Y.-L. Yang, and H.-I. Chen, “Effect of interleukin-1 on traumatic brain injury-induced damage to hippocampal neurons.,” *Journal of neurotrauma*, vol. 22, no. 8, pp. 885–895, 2005.
- [80] a. Hiltunen, E. Vuorio, and H. T. Aro, “A standardized experimental fracture in the mouse tibia,” *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 11, no. 2, pp. 305–312, 1993.
- [81] U. W. Thomale, K. Schaser, S. N. Kroppenstedt, A. W. Unterberg, and J. F. Stover, “Cortical hypoperfusion precedes hyperperfusion following controlled cortical impact injury.,” *Acta neurochirurgica. Supplement*, vol. 81, pp. 229–31, Jan. 2002.

- [82] C. E. Dixon, G. L. Clifton, J. W. Lighthall, A. A. Yaghmai, and R. L. Hayes, “A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat.,” *Journal of neuroscience methods*, vol. 39, pp. 253–62, Oct. 1991.
- [83] J. W. Lighthall, “Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model.,” *Journal of neurotrauma*, vol. 5, pp. 1–15, Jan. 1988.
- [84] M. L. Bouxsein, S. K. Boyd, B. a. Christiansen, R. E. Guldberg, K. J. Jepsen, and R. Müller, “Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography.,” *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 25, pp. 1468–86, July 2010.
- [85] E. Martín-Badosa, D. Amblard, S. Nuzzo, A. Elmoutaouakkil, L. Vico, and F. Peyrin, “Excised bone structures in mice: imaging at three-dimensional synchrotron radiation micro CT.,” *Radiology*, vol. 229, no. 3, pp. 921–928, 2003.
- [86] R. Müller, B. Koller, T. Hildebrand, A. Laib, S. Gianolini, and P. Rügsegger, “Resolution dependency of microstructural properties of cancellous bone based on three-dimensional mu-tomography.,” *Technology and health care : official journal of the European Society for Engineering and Medicine*, vol. 4, no. 1, pp. 113–119, 1996.
- [87] J. E. M. Brouwers, B. Van Rietbergen, and R. Huiskes, “No effects of in vivo micro-CT radiation on structural parameters and bone marrow cells in proximal tibia of wistar rats detected after eight weekly scans,” *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 25, no. 10, pp. 1325–1332, 2007.
- [88] R. J. Klinck, G. M. Campbell, and S. K. Boyd, “Radiation effects on bone architecture in mice and rats resulting from in vivo micro-computed tomography scanning.,” *Medical engineering & physics*, vol. 30, no. 7, pp. 888–895, 2008.
- [89] M. D. Brodt, C. B. Ellis, and M. J. Silva, “Growing C57Bl/6 mice increase whole bone mechanical properties by increasing geometric and material properties.,” *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, vol. 14, no. 12, pp. 2159–2166, 1999.
- [90] C. H. Turner and D. B. Burr, “Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial.,” *Bone*, vol. 14, no. 4, pp. 595–608, 1993.
- [91] M. C. H. van der Meulen and N. A. Netravali, “Considerations for mechanical testing of mouse long bones,” *49th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society*, p. Poster # 0432, 2001.

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|----|---|----|
| 1 | Übersicht Aufteilung der Mäuse in die entsprechenden Versuchsgruppen. . . | 17 |
| 2 | Durchführung der Femur-Osteotomie | 19 |
| 3 | Durchführung des Schädel-Hirn-Traumas | 22 |
| 4 | Durchführung des μ CT-Scans | 25 |
| 5 | Qualitative Kategorien zur Bewertung der Frakturheilung | 27 |
| 6 | Durchführung der Biomechanik | 28 |
| 7 | Diagramme der Biomechanik-Messungen. | 29 |
| 8 | Ergebnisse Gewicht | 31 |
| 9 | Ergebnisse Kallusvolumen und Kallusdichte | 32 |
| 10 | Ergebnisse Auswertung Fraktur-Überbrückung mittels CT-Score | 33 |
| 11 | Ergebnisse Biomechanik Fraktur und kombiniertes Trauma | 38 |
| 12 | Ergebnisse Biomechanik Kontrolle vs. SHT | 38 |
| 13 | Ergebnisse Biomechanik prozentual Fraktur und kombiniertes Trauma . . . | 39 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|---|---|----|
| 1 | Auswahl von Studien über den Zusammenhang der verbesserten Frakturheilung nach SHT | 10 |
| 2 | Auswahl von Studien, die osteoinduktive Faktoren im Serum und Liquor nach SHT identifizierten | 12 |
| 3 | Übersicht Mortalität der Operationen und Prozeduren | 23 |
| 4 | Tabellarische Darstellung der qualitativen Auswertung der μ CT-Scans . . . | 34 |
| 5 | Ergebnisse der μ -Untersuchungen | 35 |
| 6 | Ergebnisse der Biomechanik | 37 |

Abkürzungsverzeichnis

ALP Alkalische Phosphatase

BMC Bone Mineral Content

BMD Bone Mineral Density

CCI Controlled Cortical Impact Injury

CGRP Calcitonin Gene-Related Peptide

CXCR-4 CXC-Motiv-Chemokinrezeptor 4

DXA Dual Energy X-ray Absorptiometry

FEM Forschungseinrichtung experimentelle Medizin der Charité-Universitätsmedizin Berlin

GCS Glasgow Coma Scale

IFM Interfragmentary Movement

K-Draht Kirschner-Draht

KG Körpergewicht

LWK Lendenwirbel-Körper

MMA Methacrylat

ob/ob Leptin-Defizienz, homozygoter Träger der rezessiven Mutation des obese-Gens

s.c. subcutan

SDF-1 Stromal cell-derived factor 1

SHT Schädel-Hirn-Trauma

TierSchG Tierschutzgesetz

VOI Volume of Interest

wt Wildtyp

ZNS Zentrales Nervensystem

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Frank Arthur Graef, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Auswirkung von Schädel-Hirn-Traumata auf die Frakturheilung langer Röhrenknochen: eine computertomographisch- und biomechanisch-experimentelle Studie an Leptin-defizienten Mäusen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen:

Graef F., Seemann R, Garbe A, Schmidt-Bleek K, Schaser KD, Keller J, Duda G, Tsitsilonis S. *Impaired fracture healing with high non-union rates remains irreversible after traumatic brain injury in leptin-deficient mice.* J Musculoskelet Neuronal Interact. 2017 Jun 1;17(2):78-85.

Frank Arthur Graef hatte folgenden Anteil an dieser Publikation:

1. Assistenz bei den Operationen, tägliche Käfigvisiten und Pflege der Tiere
2. Durchführung der Biomechanik- und Mikro-CT-Untersuchungen
3. Datenauswertung und -interpretation
4. Erstellung sämtlicher Grafiken
5. Erstellung des Manuskripts und der Revisionen

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

Unterschrift des Doktoranden

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

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

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

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

Publikationen

Wichlas F, Tsitsilonis S, Disch AC, Haas NP, Hartmann C, **Graef F**, Schwabe P. Long-term functional outcome and quality of life after successful surgical treatment of tibial nonunions. *Int Orthop*. 2015 Mar;39(3):521-5.

Graef F., Locher R., Garbe A., Schmidt-Bleek K., Schaser KD., Keller J., Duda G., Tsitsilonis S. Impaired fracture healing with high non-union rates remains irreversible after traumatic brain injury in leptin-deficient mice. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2017 Jun 1;17(2):78-85.

Danksagung

Die von mir verfasste Dissertation entstand als Teilprojekt der Arbeitsgruppe MOBIL (Metabolism, Osteocalcin, Bone, Insulin, Leptin) von Prof. Dr. med. Klaus-Dieter Schaser und Dr. med. Serafeim Tsitsilonis. Das Projekt wird von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt, Projekt TS 303/1-1.

Mein außerordentlicher Dank geht an meinen Doktorvater Prof. Dr. med. Klaus-Dieter Schaser für die Überlassung des Dissertations-Themas und für die regelmäßigen und konstruktiven Arbeitsgruppen-Treffen.

Ebenso bedanke ich mich bei meinem Betreuer Dr. med. Serafeim Tsitsilonis, der mich klinisch sowie wissenschaftlich stets motivierte und unterstützte und mir beim Verfassen der Dissertation eine große Hilfe war.

Ebenfalls herzlich bedanken möchte ich mich bei Dr. med. Ricarda Seemann, Anja Garbe und Tim Lünemann mit denen ich viele Stunden im Labor verbrachte.

Mein Dank geht auch an die Mitarbeiter des Julius-Wolff-Instituts und der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité-Universitätsmedizin Berlin Campus Virchow-Klinikum: Insbesondere sind hierbei zu erwähnen Dr. rer. nat. Katharina Schmidt-Bleek, die stets als Ansprechpartnerin für sämtliche Versuche und Operationen dieser Dissertation zur Verfügung stand. Außerdem Mario Thiele, der eine große Hilfe bei der Einrichtung und der Bedienung des μ CT war.