

Aus dem

CharitéCentrum 09  
Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie

Klinik für Orthopädie und Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie

Ärztlicher Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Carsten Perka  
Kommis. Geschäftsführender Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ulrich Stöckle

## **Habilitationsschrift**

### **Die Interaktion zwischen Schädel-Hirn-Trauma und Frakturheilung**

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach Orthopädie und Unfallchirurgie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Dr. med. Serafeim Tsitsilonis, MSc, PhD**

**geboren in Athen**

Eingereicht:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Axel Radlach Pries

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Klaus-Peter Günther, Dresden

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Frosch, Hamburg

## Inhaltsverzeichnis

<b>Verzeichnis relevanter Abkürzungen</b>	<b>3</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>4</b>
<b>2 Ziel der Habilitationsschrift</b>	<b>10</b>
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>12</b>
3.1 Der Effekt vom Schädel-Hirn-Trauma auf die Knochenheilung: eine experimentelle Studie an einem neuen <i>in-vivo-Tiermodell</i>	12
3.2 Schädel-Hirn-Trauma und Knochenheilung: radiologische und biomechanische Analyse der Knochenformation und der Knochenstabilität an einem kombinierten Trauma-Maus-Modell	19
3.3 Gestörte Frakturheilung mit hoher Pseudarthroserate bleibt irreversibel trotz Schädel-Hirn-Traumas in leptin-defizienten Mäusen	28
3.4 Leptin-Defizienz beseitigt den positiven Effekt eines Schädel-Hirn-Traumas auf die Knochenheilung: histologische Analyse in einem kombinierten Trauma-Maus-Modell	38
3.5 Zeitliches Profil der inflammatorischen Reaktion nach einer Fraktur und einem hämorrhagischen Schock: ein neues Langzeitsüberlebens- Trauma-Maus-Modell	50
<b>4 Diskussion</b>	<b>58</b>
4.1 Interaktion zwischen SHT und Frakturheilung: klinische und experimentelle Beobachtungen	58
4.2 Etablierung experimenteller Tiermodelle	62
4.3 Radiologische, biomechanische und histologische Analyse in Wildtyp- und leptin-defizienten Mäusen	64
4.4 Ausblick	67
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>68</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>70</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>83</b>
7.1 Danksagung	83
7.2 Eidesstattliche Erklärung	85

## Verzeichnis relevanter Abkürzungen

$\alpha$ CGRP	Calcitonin gene-related peptide alpha
AF	Atemfrequenz
AP	alkalische Phosphatase
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CGRP	Calcitonin gene-related protein
CT	Computertomographie
ECM	Extrazelluläre Matrix
Fx	Fraktur
GLA-OCN	Carboxyliertes Osteokalzin
GLU13-OCN	Uncarboxyliertes Osteokalzin
HF	Herzfrequenz
IGF-1	Insulin-like growth hormone - 1
IL-6	Interleukin-6
InsR	Insulinrezeptor
MSCs	Mesenchymale Stammzellen
OCN	Osteokalzin
OPG	Osteoprotegerin
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SIRS	Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SNS	Sympatisches Nervensystem
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 1 Einleitung

Eine verzögerte bzw. beeinträchtigte Knochenheilung stellt ein relevantes klinisches Problem sowie eine therapeutische Herausforderung im klinischen Alltag im Bereich der Orthopädie und Unfallchirurgie dar [1, 2], was zu erheblichen Einschränkungen der Lebensqualität und des sozialen Lebens der Patienten sowie zu hohen Behandlungskosten für die Gesundheitssysteme führt [3]. Wenn die knöcherne Heilung einer Fraktur über einen Zeitraum von 4 bis 6 Monaten ausbleibt, dann spricht man von einer verzögerten Frakturheilung (‘‘delayed union’’). Falls nach 6 Monaten immer noch keine Tendenz einer Frakturkonsolidierung zu sehen ist, dann liegt eine Pseudarthrose vor (‘‘non-union’’) [1, 4, 5].

Die Pseudarthrosen werden in aseptische (hypertrophe und atrophe) und septische (Infekt-) Pseudarthrosen unterschieden. Die frühzeitige Erkennung der Art der Pseudarthrose ist von enormer Bedeutung für die weitere Planung der Therapie [3, 6]. Die hypertrophen Pseudarthrosen werden in der Regel durch eine Instabilität im Bereich des Frakturspaltens bei biomechanisch insuffizienter Osteosynthese verursacht und weisen in den meisten Fällen keine Durchblutungsprobleme auf. Im Gegenteil liegt bei den atropen Pseudarthrosen eine Störung der Durchblutung im Bereich der Fraktur vor, die entweder unfallbedingt ist (zum Beispiel durch schweres Weichteiltrauma oder Deperiostierung der Fragmente) oder durch eine biologische Beeinträchtigung des Patienten (zum Beispiel periphere arterielle Verschlusskrankung oder Diabetes mellitus) entsteht. Des Weiteren spielen iatrogene Faktoren auch eine Rolle, wie zum Beispiel eine sehr rigide Osteosynthese, eine Fixation der Fragmente auf Distanz, oder eine ungenügende intrafragmentäre Kompression. Die schwerwiegendste Art einer Pseudarthrose ist die Infekt-Pseudarthrose. Die ausbleibende Frakturheilung wird durch eine Infektion verursacht, vor allem bei offenen und komplexeren Frakturen mit schweren Weichteilschäden, sowie bei postoperativen Infektionen. Größere Knochendefekte, sowie persistierende Infektionen können die operative Behandlung der Infekt-Pseudarthrosen deutlich komplizieren [3, 6, 7].

Laut einer aktuellen schottischen Studie haben die Fortschritte im Bereich der operativen Frakturbehandlung über die letzten Jahre zu einer Senkung der Rate von Pseudarthrosen geführt (1,9 % im Vergleich zu 5–10 % in der Vergangenheit) [4]. Trotzdem zeigt sich bei bestimmten Lokalisationen und Frakturtypen, wie zum Beispiel

bei offenen Tibiaschaftfrakturen, immer noch eine Inzidenz von bis 12 % [5]. Vor allem sind männliche, junge, aktive Patienten in der Altersgruppe von 30–44 Jahren davon betroffen, was zu erheblichen gesundheits- und sozioökonomischen Kosten führt [4]. Das Auftreten einer Pseudarthrose kann im Vergleich zu einer unauffälligen Heilung zu einer Verdopplung der Behandlungskosten führen. In den USA kostet durchschnittlich die Behandlung von Pseudarthrosen 25.556 US\$/Fall, während die unkomplizierte Behandlung einer Fraktur 11.686 US\$ kostet. In Kanada verursacht eine Pseudarthrose durchschnittlich zusätzliche Kosten von 11.800 Can\$/Fall, im Vereinigten Königreich hingegen £29.204/Fall [1, 6]. Selbst bei erfolgreich therapierten Pseudarthrosen dauert die Behandlung durchschnittlich 3–4 Jahre und das Outcome geht in dem meisten Fällen mit einer dauerhaften Minderung der Lebensqualität der Patienten einher [2]. Trotz der intensiven Forschung im Bereich der Frakturheilung sowie der Etablierung von therapeutischen Algorithmen und Behandlungskonzepten über die letzten Jahrzehnte zeigen sich große Schwierigkeiten bezüglich der Wahl der optimalen Behandlung bei vielen dieser Patienten.

Der Behandlungserfolg bleibt in vielen Fällen unsicher und der Verlauf der Behandlung der Patienten ist aufgrund mehrerer individueller Risikofaktoren nicht immer optimal. Nebenerkrankungen wie Osteoporose, die periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, Neuropathien, Nikotin- und Alkoholabusus, medikamentöse Therapie mit Steroiden oder Zytostatika, sowie Adipositas und höheres Alters können negativ den Therapieverlauf beeinflussen [2, 3, 6].

Die zur Verfügung stehenden Interventionsmöglichkeiten richten sich hauptsächlich nach der Ursache der beeinträchtigten Knochenheilung (biomechanische, biologische und mikrobiologische Faktoren) [7].

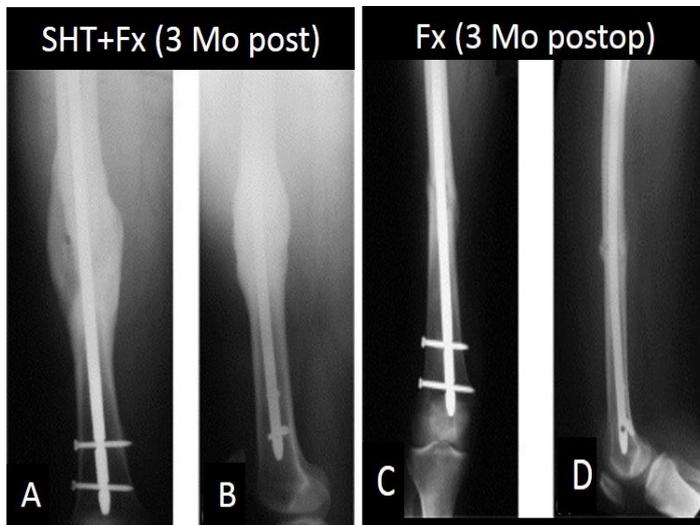
Bei den hypertrophen Pseudarthrosen richtet sich die operative Therapie grundsätzlich nach der biomechanischen Optimierung durch eine stabilere Osteosynthese zusätzlich zu der Anfrischung der Pseudarthrose. Zur Verfügung stehen unterschiedliche Osteosyntheseverfahren, wie die Platten- und Schraubenosteosynthese, die intramedulläre Marknagelung, oder der Fixateur externe, mit oder ohne Spongiosaplastik. Bei der intramedullären Marknagelung besteht zusätzlich die Möglichkeit der Dynamisierung, der intramedullären Aufbohrung zur Stimulation der endostalen Heilung, sowie des auf einen dickeren, stabileren Marknagels Implantatwechsels [3, 6, 7].

In dem Fall einer atrophen Pseudarthrose steht neben der biomechanischen Optimierung die Stimulation der biologischen Faktoren im Vordergrund. Das chirurgische Debridement mit Entfernung sämtlicher avitalen Fragmente, Anfrischung der Pseudarthrose und Auffüllen der Defekte mit autologer Spongiosa dienen der Stimulation der Kaskade der Knochenheilung. Bei größeren ossären Defekten können auch komplexe Techniken Anwendung finden, wie zum Beispiel die Kallusdistraction mittels Ilizarov-Fixateurs, in Kombination mit Verwendung von biologischen Faktoren (BMPs – Bone Morphogenetic Proteins). Zusätzlich besteht die Möglichkeit die operative Revision mittels konservativer Maßnahmen zu unterstützen, wie zum Beispiel die extrakorporale Stoßwellentherapie und die gepulste Ultraschalltherapie. Die erfolgreiche Therapie der Infektpseudarthrosen setzt zunächst die Infektsanierung voraus. Die komplette Entfernung des Osteosynthesematerials, das sorgfältige und ausgedehnte Débridement und die gezielte antibiotische Therapie sind die ersten Schritte. Nach der erfolgten Infektsanierung können die o.g. Techniken, wie bei den atrophen Pseudarthrosen, in Anwendung kommen [3, 6, 7].

Obwohl die meisten Pseudarthrosen durch eine stabilere Fixation mit zusätzlicher Spongiosaplastik erfolgreich behandelt werden können, ist eine solche Behandlung sehr zeit- und ressourcenaufwendig [2]. Das Problem wird relevanter für ältere bzw. multimorbide Patienten, die ein noch schlechteres Heilungspotenzial aufgrund einer eingeschränkten biologischen Reaktion im Bereich der Fraktur zeigen. Die Förderung der biologischen Faktoren im Frakturbereich kann durch isolierte operative Interventionen, selbst bei komplexeren Therapieregimen, nicht gewährleistet werden, sodass zusätzliche biologische Faktoren notwendig werden. Daher ist die Identifikation von Faktoren, die zu einer Stimulation und Beschleunigung der Knochenregeneration führen könnten, von großer Bedeutung, um die möglichst beste Behandlung der betroffenen Patienten zu gewährleisten [7].

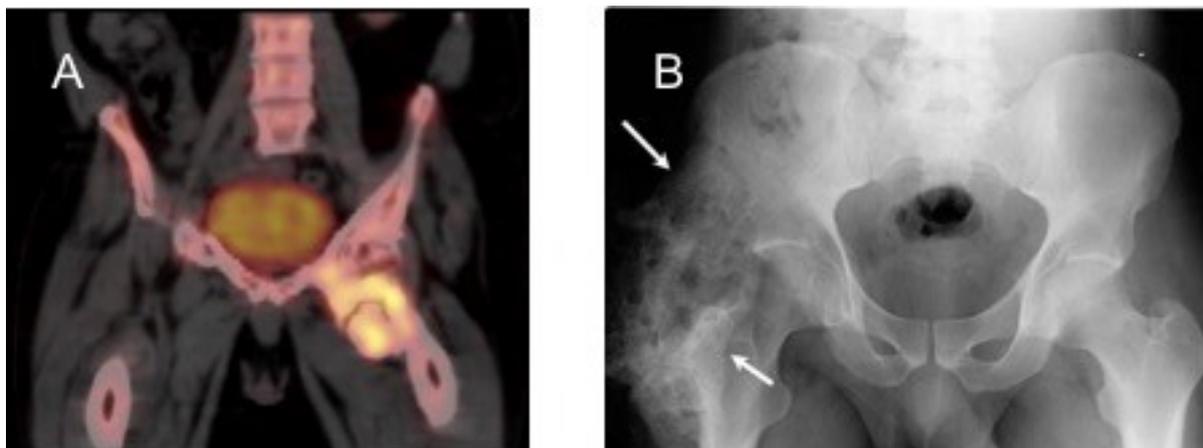
Trotz intensiver Forschungsbemühungen zur Charakterisierung der unterschiedlichen Prozesse, die die Frakturheilung regulieren, konnten bis dato nur wenige biologische therapeutische Möglichkeiten mit relativ eingeschränktem klinischen Anwendungsspektrum und hohen Kosten entwickelt werden [8]. Die im Rahmen von Studien gemachte paradoxe klinische Beobachtung, dass ein Schädel-Hirn-Trauma (SHT) die Frakturheilung positiv beeinflussen kann, ist sowohl klinisch als auch wissenschaftlich hoch interessant [9–17]. Während ein schweres SHT das gesamte posttraumatische Ergebnis des verletzten Patienten grundsätzlich beeinträchtigt, kann

es überraschenderweise zu einer paradoxen Erhöhung der Kallusformation bei begleitenden Frakturen kommen [13] (Abb. 1).



**Abbildung 1: Klinischer Fall von ausgeprägten Kallusbildung nach SHT:** (A/B): anteroposteriore und seitliche Röntgen-Aufnahmen eines Patienten mit SHT und Femurfraktur 3 Monate postoperativ nach intramedullärer Marknagelung. (C/D): anteroposteriore und seitliche Röntgen-Aufnahmen eines Patienten mit isolierter Femurfraktur 3 Monate postoperativ nach intramedullärer Marknagelung. Der Unterschied bezüglich der Kallusbildung bei dem Patienten mit der kombinierten Verletzung ist eindeutig (modifiziert nach [15]).

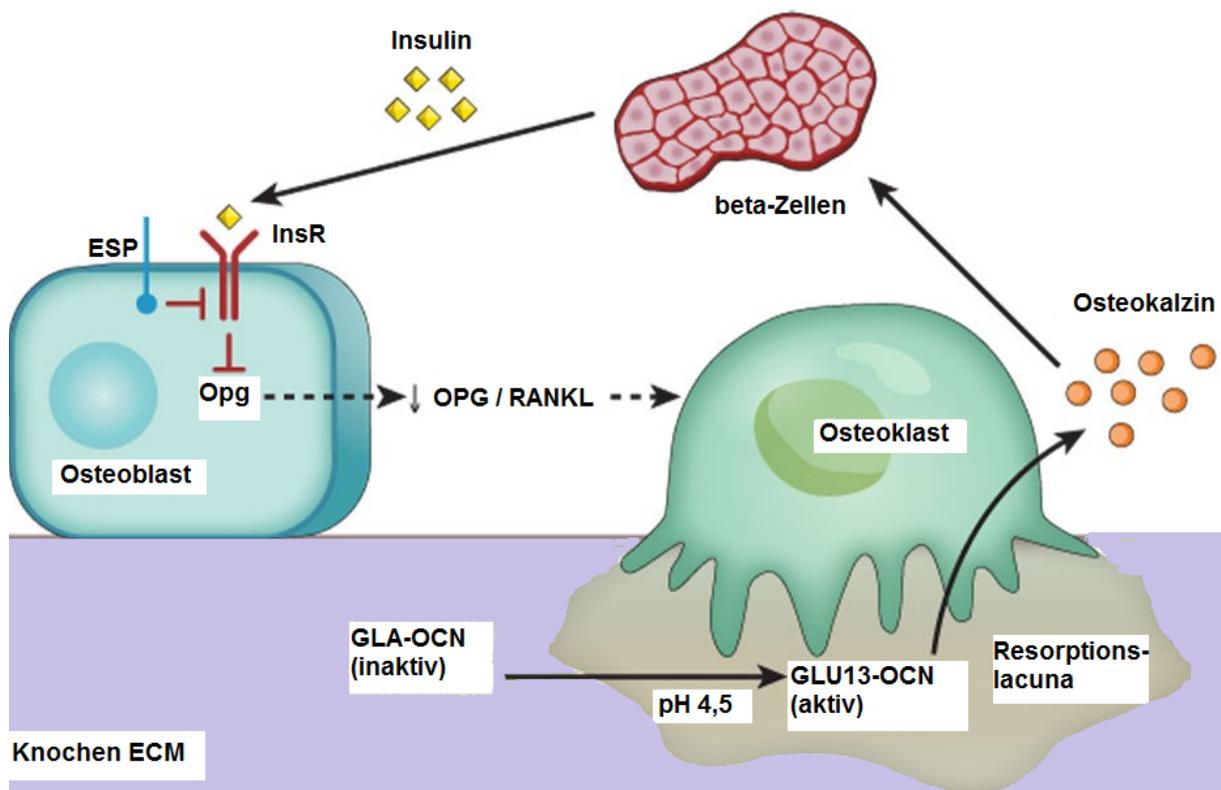
Des Weiteren leiden Patienten mit schwerem SHT oft an heterotopen Ossifikationen, die auf eine übermäßige Induktion der Knochenneubildung hinweisen [18–20] (Abb. 2).



**Abbildung 2: Klinischer Fall von aktiven heterotopen Ossifikationen:** A: 46-jähriger Patient mit ausgeprägten heterotopen Ossifikationen im Bereich der linken Hüfte nach einem schweren SHT 6 Monaten nach Trauma. B: Heterotopie Ossifikationen 8 Monate posttraumatisch nach SHT (modifiziert nach [21]).

Bei etwa 60 % aller polytraumatisierten Patienten liegt ein nennenswertes SHT vor [22]. Klinisch kann die Frakturheilung der langen Röhrenknochen beschleunigt sein. Nach der ersten Beschreibung des Phänomens von Calandriello in den 60er Jahren

[23, 24] konnten weitere klinische Studien dies bestätigen, während andere Studien zu widersprüchlichen Ergebnissen gekommen sind [9, 10, 12, 15, 16, 25–27]. Die Ursachen dieses einzigartigen Phänomens sind bisher unbekannt und werden demzufolge auch nicht therapeutisch genutzt. In Abkehr von der Vorstellung des Knochens als isoliertes Stützgewebe kam es in den letzten zwei Jahrzehnten zu einem wissenschaftlichen Paradigmenwechsel [28, 29]. Zunehmend rückte nun die endokrine Bedeutung des Knochens in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses, wobei die ossäre Regulation des Glukosestoffwechsels eine zentrale Rolle einnahm [28, 30–32] (Abb. 3).



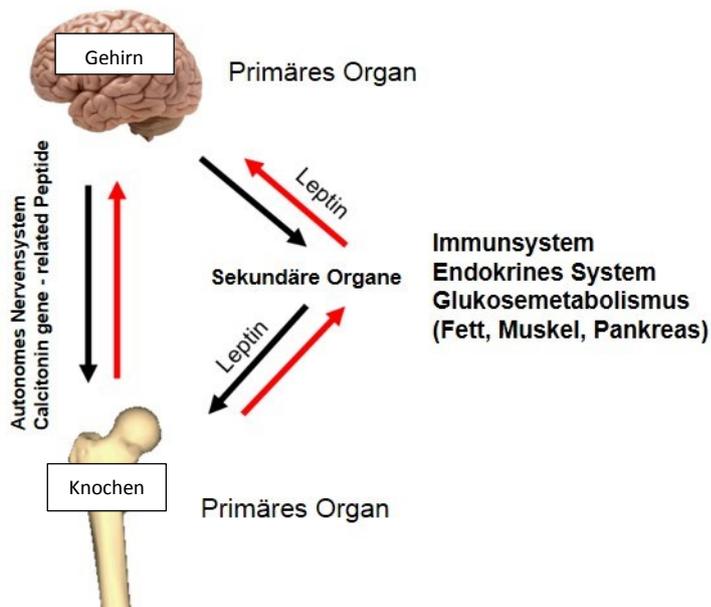
**Abbildung 3: Ossäre Regulation des Glukosemetabolismus:** Interaktion von Osteoblasten, Osteoklasten und beta-Zellen im Pankreas, die hauptsächlich durch die Hormonen Insulin, Osteokalzin und die OPG / RANKL erfolgt. OPG: Osteoprotegerin; GLA-OCN: carboxyliertes Osteokalzin; GLU13-OCN: uncarboxyliertes Osteokalzin; ECM: extrazelluläre Matrix; RANKL: Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; InsR: Insulinrezeptor (modifiziert nach [33]).

Trotz der bereits vorliegenden Literatur fehlt aktuell die pathophysiologische Erklärung der zugrunde liegenden Mechanismen dieses interessanten Phänomens der beschleunigten Frakturheilung nach SHT [17].

Dies liegt hauptsächlich daran, dass Traumata des zentralen Nervensystems (ZNS) und des Skeletts zu komplexen biologischen Änderungen im Organismus führen können [34–36]. Innerhalb der ersten Tage nach einem SHT können lokale und systemische Änderungen in einer Vielzahl von Neuropeptiden und Hormonen wie zum Beispiel erhöhter Leptin-, Calcitonin gene-related peptide alpha ( $\alpha$ CGRP)- oder Prolaktin-Spiegel, beobachtet werden [8, 37–43]. Im Gegensatz dazu wurden niedrigere Konzentrationen von Wachstumshormonen im Blut, wie zum Beispiel insulin-like growth hormones - 1 (IGF-1), antidiuretische Hormone, Kortikosteroiden und Steroiden beobachtet [39, 44, 45]. Zusätzlich führt der erhöhte Sympathikotonus zu einem hypermetabolischen Zustand, was wiederum zu einer peripheren Insulinresistenz bei gleichzeitiger Hyperinsulinämie führt [46, 47]. Je nach Schweregrad der Verletzung gehen diese Änderungen mit einer inflammatorischen Kaskade aufgrund einer immunologischen Dysfunktion durch lokale und systemische Änderungen der Konzentration von Zytokinen und Chemokinen einher [48, 49].

Während das SHT seine pleiotropen Effekte auf den Körper ausübt, wird die Frakturheilung wiederum von multiplen Faktoren gesteuert, was lokale und systemische Kontrollmechanismen beinhaltet [50]. Dazu gehört unter anderem die Invasion von Stammzellen und Immunzellen in das Frakturhämatom, gefolgt von einer Angiogenese sowie Induktion der Osteogenese mit darauffolgendem Kallus-Remodelling in späteren Phasen der Heilung [51-53]. Solche Änderungen werden nicht nur von der lokalen Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren gesteuert, sondern auch von systemisch zirkulierenden Peptiden [35, 48, 54–58].

Neuronale Signalkaskaden, zum Beispiel über das sympathische Nervensystem (SNS), scheinen zusätzlich die Frakturheilung zu kontrollieren [59]. Das Knochengewebe bzw. eine Fraktur ist auch in der Lage, die Funktion anderer fernliegender Organe durch endokrine Feedback-Loops zu regulieren. Ein Beispiel hierfür sind die Leptin- und Osteokalzin-Sekretion, welche den Glukose- und Testosteron-Stoffwechsel beeinflussen können [55] (Abb. 4).



**Abbildung 4: Bidirektionale Kommunikation zwischen Skelett und Nervensystem.** Das sympathische und parasympatische Nervensystem können den Knochenmetabolismus direkt regulieren. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für das Molekül  $\alpha$ CGRP beobachtet. Das Hormon Leptin scheint sowohl direkt, als auch indirekt den ossären Umbau zu kontrollieren. Sekundäre Organe (Immunsystem, endokrines System der Glukoseregulation) scheinen ein Teil der Effekte des zentralen Nervensystems auf den Knochenmetabolismus zu beeinflussen. Die genaue Rolle von diesen Faktoren, sowie eventuell weitere Mediatoren bezüglich der ausgeprägten Kallusbildung nach SHT, sind weiterhin unbekannt.

## 2 Ziel der Habilitationsschrift

Diese vielfältige Interaktion zwischen verschiedenen Systemen und Organen ist der Hauptgrund, warum bis dato die Interaktion zwischen SHT und Frakturheilung noch nicht grundsätzlich untersucht wurde. Dafür sind nicht nur Beobachtungsstudien, sondern auch mechanistische tierexperimentelle Studien, die das Phänomen auf biochemischer, molekularer, biomechanischer und histologischer Ebene von großer Bedeutung.

Zusätzlich fehlt bisher ein valides Tiermodell, welches in Analogie zur klinischen Situation Verletzungen des Skeletts (Frakturen) mit einem SHT in der Maus standardisiert reproduziert und das Phänomen der ausgeprägten Kallusbildung bestätigt [36, 60–63]. Des Weiteren war es bisher unbekannt, wie das biomechanische Verhältnis und die histomorphologischen Eigenschaften des ausgeprägten Frakturkallus sind. Ferner wurde bisher die mögliche Rolle des Hormons Leptin im Rahmen dieses Phänomens – als wesentlicher Regulator der Homöostase – noch nicht untersucht. Außerdem wurde die Frage, ob ähnliche Phänotypen nach noch komplexeren Traumakombinationen (zum Beispiel in Kombination mit einem

hämorrhagischen Schock) beobachtet werden könnten, bisher nicht adäquat beantwortet. Die pathophysiologische Erklärung der Interaktion von SHT und Knochenheilung kann von großer Bedeutung für die Entwicklung neuer Therapieprinzipien sein.

Aus den o. g. Gründen wurden im Rahmen dieser Habilitationsschrift folgende Fragen gestellt:

1. Ist es möglich, das Phänomen der ausgeprägten Kallusbildung nach SHT durch die Etablierung eines standardisierten Tiermodells an Wildtyp(WT)-Mäusen zu reproduzieren?
2. Wie verhält sich der neu gebildete Kallus biomechanisch und radiologisch im zeitlichen Verlauf im Tiermodell?
3. Gibt es Unterschiede hinsichtlich des radiologischen und biomechanischen Verlaufs der Frakturheilung nach Kombinationstrauma (SHT und Fraktur) in Leptin-Knock-out-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen?
4. Wie sind die histomorphometrischen Eigenschaften des Kallus in WT- und Leptin-Knock-out-Mäusen?
5. Wie zeigt sich die Frakturheilung bei komplexeren Verletzungsmustern mit zusätzlichem Hirnschaden in einem experimentellen Polytrauma-Tiermodell?

Die Erklärung des Phänomens der beschleunigten Kallusformation bei SHT-Patienten könnte zu der Entwicklung von Therapieprinzipien zur Behandlung von heterotopen Ossifikationen, Osteoporose oder beeinträchtigter Knochenheilung führen, wie zum Beispiel nach schwerem Weichteilschaden, großen Knochendefekten und bei Pseudarthrosen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Der Effekt vom Schädel-Hirn-Trauma auf die Knochenheilung: eine experimentelle Studie an einem neuen *in-vivo*-Tiermodell

The effect of traumatic brain injury on bone healing: an experimental study in a novel *in vivo* animal model.

**Tsitsilonis S**, Seemann R, Misch M, Wichlas F, Haas NP, Schmidt-Bleek K, Kleber C, Schaser KD.

Injury. 2015 Apr;46(4):661-5.

doi: <https://doi.org/10.1016/j.injury.2015.01.044>. Epub 2015 Jan 31.

Die Pathophysiologie der Interaktion zwischen SHT und der beschleunigten Kallusbildung bei komplexen Frakturen in Polytrauma-Patienten ist bisher nur teilweise untersucht [10, 14, 16, 64, 65]. Ursachen sind die Vielfalt der Verletzungsmuster und die limitierte Anzahl von klinischen Studien sowie der Mangel entsprechender, zuverlässiger und reproduzierbarer, klinisch-relevanter Tiermodelle. Die Maus bietet mehrere Vorteile bezüglich der Entwicklung von experimentellen Traumamodellen: niedrigere Kosten im Vergleich zu Großtiermodellen, hohe Fertilität und Vermehrungsrate, unterschiedliche pharmakologische und genetische Manipulationsmöglichkeiten und vor allem die Verfügbarkeit von mehreren Knock-out-Stämmen. Unter diesem Aspekt war das Hauptziel der Studie die Etablierung eines Trauma-Mausmodelles mit einer Kombination von SHT und Fraktur der langen Röhrenknochen. Zwei standardisierte Methoden für die Induktion eines experimentellen Traumas wurden kombiniert (Controlled Cortical Impact Injury (CCII) für die SHT-Simulation [66, 67] und eine Femurosteotomie mit Stabilisierung durch Fixateur externe [68, 69], um zu untersuchen, ob das klinisch beobachtete Phänomen der beschleunigten Kallusbildung nach SHT auch an den Mäusen reproduzierbar ist (Proof-of-Principle). Die Etablierung eines solchen Tiermodelles würde die systematische detaillierte Untersuchung der pathophysiologischen Mechanismen und der Knocheneigenschaften hinsichtlich der Interaktion zwischen Gehirn und Knochen ermöglichen, um dadurch neue Therapien zu entwickeln bzw. zu testen. Im Rahmen dieser Studie wurden 36 weibliche, 12 Wochen alte C57/BL6-Mäuse in zwei Gruppen randomisiert (Fx-Gruppe/Kombinationsgruppe). In der Frakturgruppe wurde eine

Femurfraktur durch eine 0,7 mm Femurosteotomie induziert und anschließend mit einem Fixateur externe stabilisiert. In der Kombinationsgruppe wurde zunächst die SHT-Induktion (CCII) und anschließend die Femurosteotomie durchgeführt. Die Implementierung von einem Fixateur externe ist von Vorteil: Man kombiniert eine stabile Versorgung der Femurosteotomie, die den Frakturspalt intakt lässt, mit der Möglichkeit, eine artefakt-freie Mikro-CT-Untersuchung durchzuführen. Es zeigte sich eine Mortalität von 21 % in der Kombinationsgruppe und von 11,7 % in der Frakturgruppe. Die Tiere, die das Trauma überleben konnten, zeigten eine gute postoperative Reaktion ohne relevante sensomotorische Defizite über einen Zeitraum von drei Wochen (Zeitpunkt der Euthanasie). Die Frakturheilung wurde mittels wöchentlicher *in-vivo*-Mikro-CT-Messungen untersucht, die tatsächlich in der Kombinationsgruppe eine signifikant erhöhte Kallusbildung ab der 2. postoperativen Woche bis zum Zeitpunkt der Euthanasie zeigten. Diese Ergebnisse beweisen, dass das induzierte SHT stark genug war, um die erhöhte Kallusbildung zu stimulieren und das klinisch bekannte Phänomen in einem Tiermodell zu reproduzieren. Die Studie dient als experimentelles Proof-of-Principle und stellt die Basis für die weitere Abklärung der involvierten Faktoren dar, die zu dem erhöhten Kallusvolumen nach einem SHT führen.











### **3.2 Schädel-Hirn-Trauma und Knochenheilung: radiologische und biomechanische Analyse der Knochenformation und der Knochenstabilität an einem kombinierten Trauma-Maus-Modell**

Traumatic brain injury and bone healing: radiographic and biomechanical analyses of bone formation and stability in a combined murine trauma model.

Locher RJ, Lünemann T, Garbe A, Schaser K, Schmidt-Bleek K, Duda G, **Tsitsilonis S.**

J Musculoskelet Neuronal Interact. 2015 Dec;15(4):309-15.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26636276>

Die biomechanischen Eigenschaften der überschießenden Kallusbildung nach einem Kombinationstrauma (SHT und Fraktur der langen Röhrenknochen) waren bisher unklar. Die Beantwortung der Frage, ob es sich radiologisch und biomechanisch um eine Art von heterotopen Ossifikationen oder von normaler Kallusbildung handelt, war das Hauptziel der vorliegenden Studie. Im Rahmen dieser experimentellen Studie wurden 138 weibliche C57/Black6N-Mäuse in vier Gruppen randomisiert (Fraktur (Fx)/SHT/kombiniertes Trauma (Fx/SHT)/Kontrollgruppe). Die Femurosteotomien wurden mit einem Fixateur externe stabilisiert und das SHT wurde mittels der CCII-Methode induziert. Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 3 bzw. 4 Wochen radiologisch *in vivo* und biomechanisch *ex vivo* hinsichtlich der Kallusbildung und der biomechanischen Eigenschaften der Knochenheilung untersucht. Die radiologische Untersuchung erfolgte mittels *in-vivo*-Mikro-CT-Untersuchungen und die biomechanische Analyse mittels *ex-vivo*-Torsionsmessungen vom Femur.

In den Fraktur- und Kombinationsgruppen kam es bis zur dritten Woche zu einem Anstieg des Kallusvolumens, gefolgt von einem Abfall in der vierten Woche. In Woche 2, 3 und 4 war das Kallusvolumen in der Kombinationsgruppe signifikant höher (Woche 2:  $p=0,020$ , Woche 3:  $p=0,039$ , Woche 4:  $p<0,001$ ) als in der Frakturgruppe. In der 4. Woche war die Mineralisationsdichte der Kombinationsgruppe tendenziell höher ( $p=0,053$ ) im Vergleich zur Frakturgruppe. In der Kombinationsgruppe zeigten sich in der 3. und 4. Woche deutlich mehr überbrückte Femora im Vergleich zu den Mäusen mit isolierter Fraktur. Nach 3 Wochen war bei 79 % der Tiere in der Kombinationsgruppe und bei 60 % der Tiere in der Frakturgruppe die Osteotomie vollständig mit Kallus überbrückt. In der 4. Woche waren es 89 % in der

Kombinationsgruppe und 60 % in der Frakturgruppe. Dieser Unterschied erreichte allerdings keine statistische Signifikanz ( $p > 0,05$ ).

Vier Wochen nach der Operation waren die Femora der Kombinationsgruppe signifikant fester als die der Frakturgruppe ( $p = 0,029$ ). Vergleicht man die SHT-Gruppe mit der Kontrollgruppe, so waren die Torsionsfestigkeiten in der SHT-Gruppe 3 Wochen postoperativ signifikant niedriger ( $p = 0,021$ ). Nach 4 Wochen gab es keinen signifikanten Unterschied mehr zwischen den beiden Gruppen. Die Kombinationsgruppe war 3 und 4 Wochen postoperativ tendenziell steifer als die Frakturgruppe (Woche 3:  $p = 0,083$ , Woche 4:  $p = 0,057$ ). Die linken Femora der Kontrollgruppe waren 3 Wochen nach Operation signifikant steifer als die der SHT-Gruppe ( $p = 0,040$ ). In der 4. postoperativen Woche gab es zwischen der Kontroll- und der SHT-Gruppe keinen signifikanten Unterschied.

Die Ergebnisse der experimentellen Studie bestätigen die klinische Beobachtung der erhöhten Kallusbildung nach einem Kombinationstrauma (SHT und Fraktur) anhand von *in vivo* radiologischen aufeinander folgenden Mikro-CT-Messungen, sowie *ex vivo* biomechanischen Untersuchungen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese erhöhte Kallusbildung zu einer erhöhten Stabilität der Frakturzone mit erhöhter Mineraleichte führt, was gegen einen minderqualitativen Knochen spricht.















### **3.3 Gestörte Frakturheilung mit hoher Pseudarthroserate bleibt irreversibel trotz Schädel-Hirn-Traumas in leptin-defizienten Mäusen**

Impaired fracture healing with high non-union rates remains irreversible after traumatic brain injury in leptin-deficient mice.

Graef F, Seemann R, Garbe A, Schmidt-Bleek K, Schaser KD, Keller J, Duda G, **Tsitsilonis S.**

J Musculoskelet Neuronal Interact. 2017 Jun 1;17(2):78-85.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28574414>

Bereits durchgeführte Studien für die Identifizierung von Faktoren, die in die Interaktion von SHT und Frakturheilung involviert sind, fokussierten sich auf unterschiedliche Moleküle [10, 36, 37, 41, 44, 58, 70–76]; jedoch konnte bisher kein klarer kausaler Zusammenhang zwischen den beobachteten Änderungen und der beschleunigten Frakturheilung gezeigt werden. Das Hormon Leptin ist ein pleiotropes Hormon, was initial als Appetit-Regulator identifiziert wurde. In den letzten Jahren wurde die Beteiligung von Leptin auch am Knochenmetabolismus belegt [77–86]. Die Rolle von Leptin in der Knochenregulation ist komplex. Es scheint je nach Lokalisation (ZNS oder peripherer Knochen) sowohl osteoanabole, als auch osteokatabole Mechanismen zu stimulieren [81, 83–89]. Interessanterweise erhöht sich die Leptin-Konzentration im Serum und in der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) nach einem SHT [90, 91]. Dies führt zur Frage, ob Leptin in der Pathophysiologie der ausgeprägten und beschleunigten Kallusbildung nach einem SHT involviert sein könnte. Um diese Frage zu beantworten, wurden Leptin-Knock-out-Mäuse (ob/ob) radiologisch und biomechanisch in Bezug auf die Kallusbildung nach einem SHT und einer Fraktur anhand eines kombinierten Traumamodells untersucht, ähnlich wie die WT-Mäuse in der vorgegangenen Studie [92, 93].

Die Kombinationsgruppe zeigte gegenüber der Frakturgruppe in Woche 1–3 ein erhöhtes Kallusvolumen. In Woche 4 war das Kallusvolumen der Kombinationsgruppe niedriger als in der Frakturgruppe. Trotzdem waren diese Unterschiede zu keinem Zeitpunkt signifikant.

Die Kallusdichte war in der Kombinationsgruppe an allen 4 Messzeitpunkten höher als in der Frakturgruppe. Diese Unterschiede waren bei der Kallusdichte in Woche 3 signifikant.

In beiden Frakturgruppen (Fx- und Kombinationsgruppe) zeigte sich eine sehr hohe Pseudarthroserate (Woche 3: Fx-Gruppe: 100 %; Kombinationsgruppe: 87,5 %) (Woche 4: 66 % in beiden Gruppen). Die biomechanische Testung zwischen den beiden Frakturgruppen konnte zu keinem Zeitpunkt statistisch signifikante Unterschiede zeigen. Es konnte lediglich ein signifikanter Anstieg des maximalen Drehmomentes und der Steifigkeit in der Fx-Gruppe von Woche 3 zu Woche 4 gezeigt werden ( $p < 0,032$ ).

Die biomechanische Untersuchung der Femora in der SHT- und Kontrollgruppe zeigten in Woche 3 ein signifikant höheres maximales Drehmoment und höhere Steifigkeit in der Kontrollgruppe ( $p = 0,011$ ).

Im Rahmen der vorliegenden Studie an Leptin-Knock-out-Mäusen konnte der positive Effekt des SHT auf die Frakturheilung nicht reproduziert werden. Im Gegenteil zeigte sich eine deutlich schlechtere Frakturheilung mit hoher Pseudarthroserate in allen Gruppen. Diese Ergebnisse deuten auf die Mitwirkung des Hormons Leptin an der pathophysiologischen Kaskade, die zu einer erhöhten Kallusbildung führt, hin.

















### **3.4 Leptin-Defizienz beseitigt den positiven Effekt eines Schädel-Hirn-Traumas auf die Knochenheilung: histologische Analyse in einem kombinierten Trauma-Maus-Modell**

Leptin-deficiency Eradicates the Positive Effect of Traumatic Brain Injury on Bone Healing: Histological Analyses in a Combined Trauma Mouse Model

Seemann R, Graef F, Garbe A, Keller J, Huang F, Duda G, Schmidt-Bleek K, **Tsitsilonis S**

J Musculoskelet Neuronal Interact. 2018 März ;18(1):32-41

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29504576>

Ziel der Studie war die histologische Untersuchung der histomorphologischen und strukturellen Eigenschaften des Kallus nach Femurosteotomie in WT- und leptin-defizienten Mäusen, mit und ohne zusätzliches SHT. Weibliche C57/Black6N- und leptin-defiziente Ob/ob-Mäuse (jeweils 36 Tiere) wurden zwei Gruppen zugeordnet (Fx-Gruppe und Kombinationsgruppe). Die Tiere wurden nach 3 (n=12 für jede Gruppe) und nach 4 Wochen (n=6 für jede Gruppe) euthanasiert. Die histologische Untersuchung wurde nach dem Movat's Pentachrome Protokoll durchgeführt. Die Proben wurden histomorphometrisch analysiert, die Knochendichte und das prozentuale mineralisierte Knochenareal wurde bestimmt. Zusätzlich wurde eine semi-qualitative Evaluation der Frakturspaltüberbrückung nach dem Protokoll von Mehta et al. durchgeführt (A=komplette Überbrückung, B=inkomplette Überbrückung, C=keine Überbrückung, D=Pseudarthrose) [94]. Die radiologischen Ergebnisse der Vorstudien an Wildtyptieren wurden durch die Histologie gestützt. Qualitativ konnte in der Kombinationsgruppe der WT-Mäuse eine höhere Überbrückungsrate im Vergleich zur Frakturgruppe festgestellt werden. Quantitativ zeigte sich beim Kombinationstrauma ab der 3. Woche eine höhere 2D-Knochendichte bei vergleichbarem mineralisiertem Knochenareal als bei der isolierten Fraktur. Leptin-defiziente Mäuse zeigten (sowohl in der Kombinations-SHT- als auch in der Frakturgruppe) eine höhere Pseudarthroserate und weniger Knochenbildung im Frakturspalt mit statistisch signifikant geringerer Knochendichte und mineralisiertem Knochenareal als die WT-Mäuse 3 und 4 Wochen postoperativ. Das zusätzliche SHT bei den leptin-defizienten Mäusen führte zu keiner Stimulation der Kallusbildung; zusätzlich zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Knochendichte und des

mineralisierten Knochenareals zwischen der Fraktur- und der Kombinationsgruppe in den leptin-defizienten Mäusen. Außerdem zeigten sich Knochen- und Knorpelbildung an osteotomie-unabhängigen Stellen, was bei WT-Tieren kaum vorkam. Unsere Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass Leptin eine wichtige Rolle bei der Stimulation der Knochenheilung bei einem Kombinationstrauma spielt und dass eine SHT-induzierte vermehrte Kallusbildung bei gleichzeitig vorliegender Fraktur ohne den Einfluss von Leptin nicht stattfindet.





















### **3.5 Zeitliches Profil der inflammatorischen Reaktion nach einer Fraktur und einem hämorrhagischen Schock: ein neues Langzeitsüberlebens-Trauma-Maus-Modell**

Temporal profile of inflammatory response to fracture and hemorrhagic shock: Proposal of a novel long-term survival murine multiple trauma model.

Kleber C, Becker CA, Malysch T, Reinhold JM, **Tsitsilonis S**, Duda GN, Schmidt-Bleek K, Schaser KD

J Orthop Res. 2015 Jul;33(7):965-70. doi: <https://doi.org/10.1002/jor.22857>

Das Interesse an den komplexen Interaktionen zwischen Frakturheilung, hämorrhagischem Schock und immunologischen Kaskaden bei polytraumatisierten Patienten haben über die letzten Jahre an Bedeutung gewonnen. Nach einem hämorrhagischen Schock zeigt sich eine ausgeprägte prä-inflammatorische Reaktion mit zum Beispiel erhöhter Interleukin 6 (IL-6)-Konzentration, die zu systemischer inflammatorischer Reaktion (SIRS), Sepsis oder sogar Multiorganversagen führen kann. Während der ersten Phasen der Frakturheilung ist IL-6 notwendig; es konnte gezeigt werden, dass erhöhte IL-6-Werte die Kallusbildung und die Knochenheilung stimulieren und beschleunigen können. Bisher fehlten aber Polytrauma-Tiermodelle, die die Untersuchung der Frakturheilung über eine längere Zeit ermöglichen würden. Die Entwicklung eines solchen klinisch relevanten Polytrauma-Tiermodelles ist absolut notwendig, um die pathophysiologischen Mechanismen verstehen zu können. Im Rahmen der Studie wurden 60 erwachsene, weibliche C57Bl6n-Mäuse in vier Gruppen randomisiert: Gruppe I: Kontrolle (n=6), Gruppe II: hämorrhagischer Schock (n=6), Gruppe III: Femur- und Tibiafraktur (n=24); Gruppe IV: multiples Trauma mit hämorrhagischem Schock und Fraktur (n=24). Die Tiere wurden unter Isofluran-Anästhesie und unter Real-time-Monitoring (Herzfrequenz (HF) und Atemfrequenz (AF)) operiert. Der hämorrhagische Schock wurde nach dem Protokoll von Wichmann und Vollmar induziert [95, 96]. Dabei wird die A. carotis communis rechts mit einem Katheter punktiert und sukzessiv Blut bis zum manifesten Eintreten eines hämorrhagischen Schocks entzogen, was durch das Monitoring validiert und überwacht wird. Anschließend erfolgt die Reanimation der Tiere, der Katheter wird entfernt und die A. carotis communis wird ligiert. Dies führt wiederum zu einer Durchblutungsstörung des Gehirns. Die Femur- und die Tibiafraktur wurden sukzessiv

gesetzt. Die Frakturheilung wurde radiologisch nach 21 Tagen untersucht. Blutentnahmen zu den IL-6-Analysen erfolgten nach 6, 24, 48 h und 21 Tagen nach dem Trauma. Die Serum-Analysen zeigten eine signifikant erhöhte Steigerung der inflammatorischen Reaktion durch IL-6 in Gruppe IV (multiples Trauma) im Vergleich zu den anderen Gruppen. Die radiologische Untersuchung der Frakturen nach 21 Tagen zeigte eine gute knöchernen Überbrückung der Frakturen mit ausgeprägter Kallusbildung, vor allem in der Gruppe IV (multiples Trauma). Diese Ergebnisse reproduzieren die klinisch beobachteten Phänomene der paradoxen Stimulation der Kallusbildung bei Polytrauma-Patienten mit einem SHT. Es wird postuliert, dass die Minderung der zerebralen Durchblutung durch die Ligatur der A. carotis communis zu einer ähnlichen, wie nach einem SHT, pathophysiologischen Kaskade mit einer ausgeprägten inflammatorischen Reaktion führt. Die Serumanalysen, das engmaschige Monitoring, die radiologische Untersuchung der Frakturheilung und die relativ lange Überlebenszeit dieses komplexen, experimentellen Polytrauma-Modells ermöglicht eine Vielfalt von Untersuchungen für die mechanistische Erläuterung der komplexen Interaktion zwischen Frakturheilung und Homöostase.













## 4 Diskussion

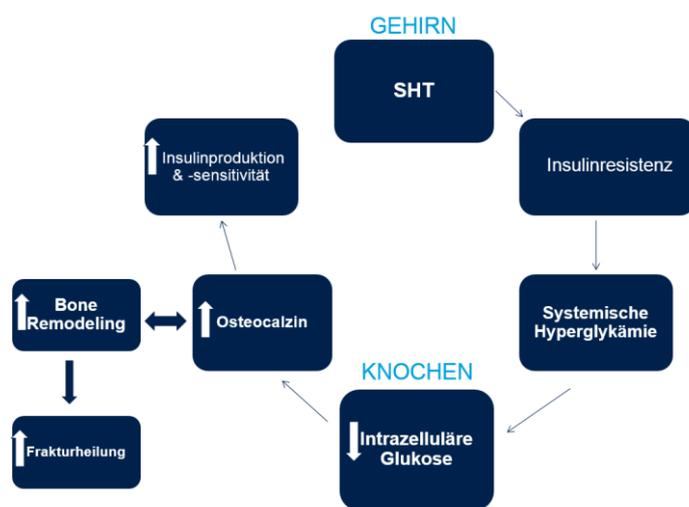
### 4.1 Interaktion zwischen SHT und Frakturheilung: klinische und experimentelle Beobachtungen

Studien der vergangenen Jahre konnten zeigen, dass das Gehirn (ZNS) den Knochenmetabolismus kontrolliert und dass der Hypothalamus, als Hauptregulator der Homöostase, dabei eine zentrale Rolle spielt [28, 29, 72, 78, 97]. Diese Kontrolle erfolgt vor allem durch die Aktivierung des SNS [59, 84, 98].

Unter diesen Aspekten wurde die seit längerer Zeit bekannte klinische Beobachtung der ausgeprägten Kallusbildung nach einem SHT noch interessanter. Das Phänomen der Interaktion zwischen SHT und Frakturheilung wurde zum ersten Mal 1964 von Calandriello [23, 24] beschrieben und wurde von mehreren klinischen Studien reproduziert. Trotzdem konnte diese Hypothese über längere Zeit nicht begründet werden [13, 17]. Neu gewonnene Kenntnisse der letzten 15 Jahre haben aber zu einem Consensus bezüglich der positiven Auswirkung eines SHT auf die Frakturheilung geführt [15, 57, 99]. In den bereits durchgeführten Studien wurden unterschiedliche Faktoren untersucht, wie zum Beispiel Wachstumsfaktoren und Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). Trotz der beobachteten Änderungen konnte aber eine kausale Erklärung bisher nicht gegeben werden [9–11, 14, 26, 27, 39, 42, 45, 54, 56, 70, 73, 76, 100–103].

Es ist seit längerer Zeit bekannt, dass ein Kombinationstrauma von SHT und Fraktur der langen Röhrenknochen bestimmte Mechanismen im Körper aktivieren kann [35, 36, 43, 71, 74]. Die Aktivierung vom SNS nach einem SHT führt zu einer reaktiven Hyperglykämie, hauptsächlich aufgrund einer durch das Gehirn induzierten Insulinresistenz, um dem Gehirn möglichst viel Glukose bereitzustellen (selfish-brain-theory) [46, 47, 104–111]. Die SNS-Aktivierung wird zusätzlich vom Hormon Leptin stimuliert, ein pleiotropes Hormon, was hauptsächlich von den weißen Fettzellen produziert und typischerweise nach einem Trauma erhöht wird [29, 40, 84, 87, 89, 90, 112–116]. Diese Phänomene führen konsekutiv zu einer Reduktion der intrazellulären Resorption der Glukose auf Knochenebene. Mittlerweile ist bekannt, dass der Knochen den Glukosemetabolismus durch eine Erhöhung der Insulinproduktion und -sensitivität beeinflussen kann [29]. Das Hormon Osteokalzin, welches von Osteoblasten produziert wird, scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen [28, 55, 117–120].

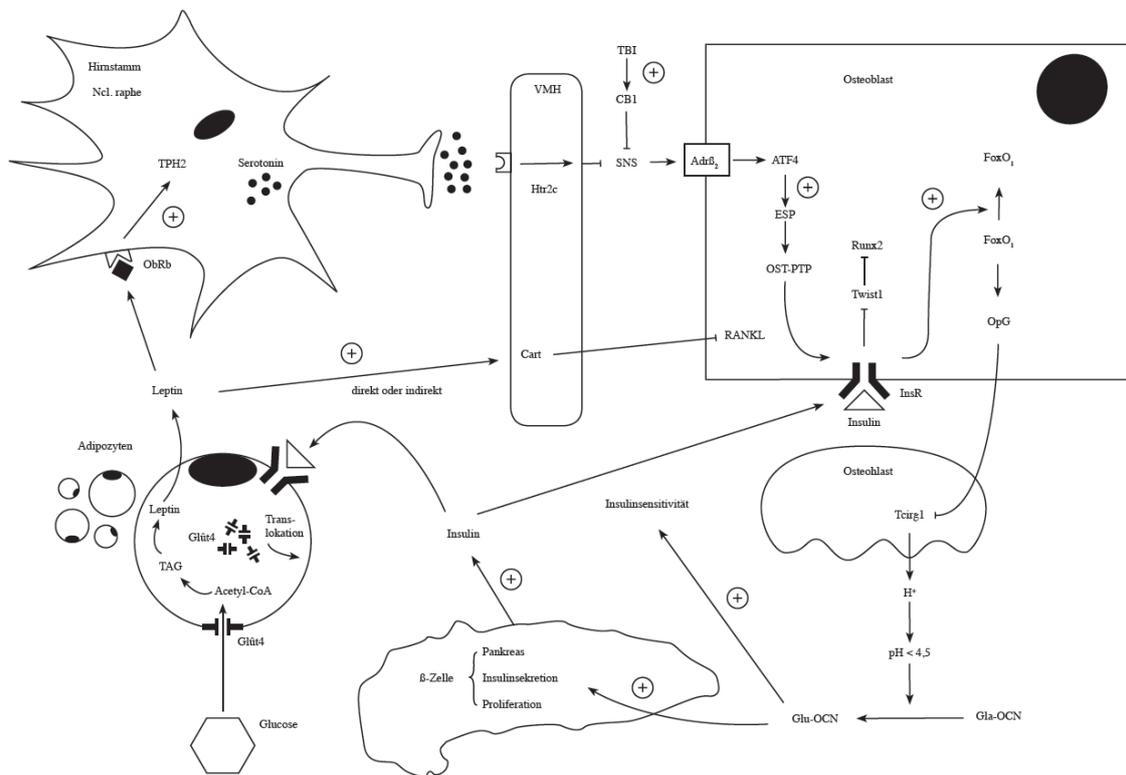
Allerdings ist das von Osteoblasten produzierte Osteokalzin inaktiv. Für dessen Aktivierung ist ein niedriger pH-Wert notwendig, was in der osteoklastischen Mikroumgebung vorhanden ist [120, 121]. Demzufolge ist die ossäre Ankoppelung der Osteoblasten und Osteoklasten für die Osteokalzin-Aktivierung notwendig. Die resultierende höhere Bone-Remodelling-Rate führt zu einer erhöhten Konzentration von aktiviertem Osteokalzin [122]. Nach dieser Aktivierung wird Osteokalzin in den systemischen Kreislauf ausgeschieden, bindet sich an Rezeptoren von Beta-Zellen des Pankreas und erhöht somit die Insulin-Produktion. Zusätzlich kann sich das aktivierte Osteokalzin an Rezeptoren von Fettzellen binden und die Ausschüttung von Adiponektin stimulieren, was die Sensitivität der peripheren Organe gegen Insulin erhöhen kann [123, 124]. Diese Fakten deuten darauf hin, dass die beobachtete ausgeprägte Kallusbildung nach einem SHT als ein Nebeneffekt der Konkurrenz für Energie zwischen Gehirn und den peripheren Organen betrachtet werden könnte (fight-for-energy): Der Knochen reagiert gegen die Insulinresistenz nach einem SHT, die zu einer Minderung der intrazellulären Absorption von Glukose führt. Um dieser entgegenzuwirken, produziert der Knochen mehr aktiviertes Osteokalzin, wofür eine höhere Bone-Remodelling-Rate notwendig ist, was radiologisch als ausgeprägte Kallusbildung sichtbar wird (Abb. 5).



**Abbildung 5: Interaktion von Gehirn und peripherem Knochen nach einem SHT:** Das SHT führt zu einer systemischen Änderung vom Glukosemetabolismus (Insulinresistenz und Hyperglykämie), um die dem Gehirn verfügbare Glukose zu erhöhen. Die Minderung der intrazellulären Glukose im Knochen führt zu Aktivierung von kompensatorischen Mechanismen (Aktivierung von Osteokalzin) durch eine erhöhte Knochenumbaurate, um die Insulinproduktion und –sensitivität zu erhöhen. Dies führt zu einer erhöhten Kallusproduktion nach einer Fraktur, die radiologisch als ausgeprägte Frakturheilung dargestellt wird.

Die Pathophysiologie dieses Phänomens ist komplex und bisher nicht ganz eindeutig geklärt. Die mesenchymalen Stammzellen (MSCs) mit ihren Signalkaskaden sowie Hormonen, wie Leptin oder CGRP (calcitonin gene-related peptide), die durch

humorale Faktoren (Zytokine, Wachstumsfaktoren, Enzyme usw.) beeinflusst werden, scheinen jedoch die Hauptregulatoren zu sein [37, 38] (Abb. 6).



**Abbildung 6: Pathophysiologische Interaktionswege nach SHT auf der Ebene des gesamten Organismus:** Das SHT führt zu einer Änderung der Energiehomöostase, was zu einer Aktivierung von Kompensationsmechanismen zwischen mehreren Organsystemen im Körper führt (Gehirn und Nervensystem, Knochen, Fett, Pankreas) mittels hormoneller und zellulärer Mechanismen.

Leptin, das sogenannte „Sättigungshormon“, was vom Ob-Gen codiert wird, wurde zuerst in den neunziger Jahren durch Friedman et al. beschrieben und hat in den letzten Jahren im Bereich der Erforschung des Knochenmetabolismus an Bedeutung gewonnen [40, 125-128]. In einigen Studien konnte eine Steigerung des Leptin-Spiegels nach einem Trauma festgestellt werden [78, 85, 86, 90, 129].

Leptin kann eine bi-modale Auswirkung auf den Knochen durch zwei verschiedene Signalwege (pathways) ausüben: Der periphere Signalweg ist pro-osteogen und stimuliert die Differenzierung der Osteoblasten auf Osteozyten und Knochenmineralisierung, während der zentrale Signalweg durch die Stimulierung der Hypothalamus-SNS-Achse anti-osteogen wirkt [86, 130-132]. *In vivo* sind aber diese zwei Signalwege nicht so klar zu differenzieren, denn die Realität entspricht eher komplexeren homöostatischen Mechanismen [17].

Dies wird zusätzlich durch die verschiedenen Knochenphänotypen der experimentellen Tiermodelle bestätigt. Ein häufig angewandtes Tiermodell ist die leptin-defiziente Maus (ob/ob). Diese Mäuse zeigen durchschnittlich ein dreifaches Körpergewicht im Vergleich zu den WT-Mäusen mit einem manifesten metabolischen Syndrom. Obwohl frühere Studien auf eine erhöhte Knochenmasse mit erhöhter Frakturheilung hingedeutet hatten [102], zeigt sich in den letzten Studien knochenphänotypisch eine reduzierte Knochenmasse mit reduzierter Knochenformation und biomechanisch reduzierter Knochenqualität sowie mit reduziertem longitudinalem Wachstum [79, 88, 130, 133–135].

Unsere Studien konnten zeigen, dass die Knochenformation und die knöcherne Überbrückung im Frakturbereich bei leptin-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen sowohl radiologisch als auch biomechanisch deutlich beeinträchtigt wurden. Zusätzlich konnte das Phänomen der beschleunigten Frakturheilung und der ausgeprägten Kallusbildung bei zusätzlichem SHT nicht reproduziert werden [136].

Diese Ergebnisse deuten – zumindest teilweise – auf die wichtige Rolle des Leptins als Mediator der Interaktion zwischen einem SHT und der Frakturheilung hin; trotzdem war bisher eine mechanistische Erklärung der genauen Pathophysiologie oder die Identifizierung von anderen Signalkaskaden nicht möglich.

## 4.2 Etablierung experimenteller Tiermodelle

Um die pathophysiologischen Mechanismen des interessanten Phänomens zu erklären, wurden unterschiedliche Tiermodelle etabliert. An einem Ratten-Modell haben Boes et al. herausgefunden, dass 3 Wochen nach einem Kombinationstrauma (Fraktur und SHT) das Kallusvolumen einer geschlossenen, mit einem intramedullären Kirschner-Draht stabilisierten Femurfraktur deutlich erhöht war [14, 116]. In den Studien von Wei und Wang wurde der Kallus-Durchmesser an Ratten in herkömmlichen Röntgenbildern mit der Verwendung der Perkins-Volumenformel ausgewertet [90, 116]. Die Autoren berichteten über ein erhöhtes Kallusvolumen in der kombinierten Trauma-Gruppe bis zum Zeitpunkt von 8 Wochen. Schließlich verwendeten Maegele et al. ein neues Rattenmodell und führten eine histomorphometrische Auswertung des neu gebildeten Kallus in nicht fixierten Tibiafrakturen *ex vivo* durch [137]. Die Autoren zeigten eine deutlich erhöhte Kallusmasse in der kombinierten Trauma-Gruppe 2 Wochen nach dem Trauma. Die früheren Studien fokussierten sich hauptsächlich auf die beobachteten Assoziationen, während mechanistische Studien bisher fehlten.

Unser neu etabliertes Trauma-Modell mit der Kombination von Femurosteotomie und SHT (CCII) weist eine Reihe von Vorteilen auf:

- Eine standardisierte Kombination der Verletzungen reproduziert die klinischen Charakteristika der Polytrauma-Patienten nach einem Hochenergie-Trauma mit SHT und Fraktur der langen Röhrenknochen.
- Der unberührte Osteotomiespalt ermöglicht eine sehr präzise und nahezu artefakt-freie *In-vivo*-Mikro-CT-Auswertung der Knochenheilung im Laufe der Zeit. Die wöchentliche Wiederholung der *In-vivo*-Mikro-CT-Untersuchung hat uns ermöglicht, den Fortschritt und die Dynamik des zeitlichen Verlaufs der Knochenheilung zu beurteilen.
- Die Nutzung von Mäusen mit den unterschiedlichen Knock-out-Stämmen, die zu Verfügung stehen, ermöglicht die Untersuchung der kausalen und temporalen Interaktionen von neuronalen, endokrinen und metabolischen Aspekten der Auswirkung eines SHT auf die Frakturheilung und die Kallusbildung.

Im Gegenteil gibt es gewisse methodische Limitierungen bei dem Maus-Modell, die die direkte Übertragung der Ergebnisse auf andere Tiermodelle und auf die Menschen

nicht unbedingt ermöglichen. Aufgrund des hohen metabolischen Index der Mäuse mit deutlich höherem ossären Heilungspotenzial, des fehlenden Haversscher-Systems und –knochenumbaus, sowie der Unterschiede der Mikro- und Makroarchitektur des Knochens wäre die Bestätigung der Ergebnisse an Großtier-Modellen von Vorteil. Zusätzlich setzt das im Rahmen dieser Habilitationsschrift Maus-Modell eine gewisse Infrastruktur voraus, um die komplexen mikrochirurgischen Eingriffe und die extrem sensiblen biomechanischen Untersuchungen durchführen zu können. Des Weiteren erschwert die limitierte Blutmenge bei der Maus die konsekutiven *in-vivo* Blutanalysen im selben Tier.

Die vorliegende Studie ist unseres Wissens nach die erste, welche präzise radiologische und biomechanische Daten von seriellen *In-vivo*-Mikro-CT-Messungen und biomechanischen Tests in den gleichen Mäusen zur Bewertung der stimulierenden Wirkung eines SHT auf die Knochenheilung im zeitlichen Verlauf zeigt. Unsere Ergebnisse liefern daher sehr starke Hinweise, welche die Hypothese ergänzen, dass ein SHT einen positiven Effekt auf die Knochenheilung hat. Ob die beobachteten Unterschiede nach Abschluss der Knochenumbauphase verbleiben, muss durch künftige Untersuchungen geklärt werden. Die Bestätigung der stimulierenden Wirkung eines SHT auf die Kallusbildung bei Mäusen wirft neue Fragen auf die biochemischen Substrate dieses Phänomens. Das Verständnis und die therapeutische Nutzung dieses Phänomens auf dem Gebiet der translationalen Forschung kann von großer Relevanz für die Behandlung von komplexen Fällen sein. Aus klinischer Sicht ist die Aufklärung der zugrunde liegenden ursächlichen biochemischen und hormonellen Kaskaden, die zu unterschiedlichen Stimulationen der Knochenbildung führen, von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung zukünftiger Therapiestrategien in komplexen Situationen wie zum Beispiel verzögerte Frakturheilung oder Pseudarthrosebildung.

#### 4.3 Radiologische, biomechanische und histologische Analyse in Wildtyp- und leptin-defizienten Mäusen

Die Ergebnisse der durchgeführten Studien zeigen, dass die WT-Versuchstiere mit Femurosteotomie und SHT ab der 2. postoperativen Woche deutlich mehr Kallus produzierten [92, 93]. Die Hypothese einer durch das SHT vermehrten Kallusbildung konnte hiermit bestätigt werden. Auch hinsichtlich der Kallusdichte wurden in der 4. Woche tendenziell höhere Werte bei den Tieren mit kombiniertem Trauma festgestellt [92]. Die höheren Werte bezüglich der Steifigkeit und Festigkeit sprechen auch für eine Beeinflussung der biomechanischen Eigenschaften des Kallus. Die Hypothese einer schnelleren Knochenheilung konnte trotzdem nicht eindeutig belegt werden. Obwohl die Osteotomien in der Kombinationsgruppe tendenziell effizienter und schneller durchbaut waren, zeigten die Veränderungen von Kallusvolumen und Dichte in der Fraktur- und der Kombinationsgruppe den gleichen zeitlichen Verlauf. Die biomechanischen Ergebnisse der SHT- und Kontrollgruppe deuten darauf hin, dass nur die Kombination von SHT und Verletzung eines langen Röhrenknochens zu dem Phänomen einer verbesserten Knochenheilung führt. Ohne eine assoziierte Knochenverletzung scheint das SHT eine Schwächung der biomechanischen Eigenschaften des Knochens zu bewirken. Dies könnte für eine Art Aktion-Reaktion zwischen Gehirn und Knochen sprechen. Diese Ergebnisse konnten bei den leptin-defizienten Mäusen nicht reproduziert werden [136], obwohl frühere Studien genau das Gegenteil hinsichtlich der Knochenheilung zeigen konnten [77, 78, 80, 130, 134]. Die Ursachen für diese Diskrepanz bleiben bisher unklar; ein neues Experiment mit leptin-defizienten Mäusen, welche Leptin verabreicht bekommen würden (als Proof-of-Principle), wäre an dieser Stelle von Bedeutung. Die histologische Auswertung der Proben untermauert die Hypothese hinsichtlich der Wichtigkeit von Leptin sowie der Bedeutung des metabolischen Weges und der Rolle des Knochens bei der Homöostase des Gesamtorganismus. Unter diesen Aspekten könnte man die Hypothese formulieren, dass die beobachtete erhöhte Kallusbildung bei einer Kombinationsverletzung ein Nebeneffekt ist, wobei das eigentliche Ziel die optimale Energieverteilung in Stresssituationen darstellt. Unsere Studie unterstützt die Hypothese, dass die Kombination von SHT und Fraktur zu einer ausgeprägten Kallusbildung führt. Im Vergleich zur Fx-Gruppe bei den Wildtyptieren wurde ein signifikant erhöhtes Kallusvolumen und eine erhöhte biomechanische Stabilität in

Bezug auf die Drehfestigkeit mit erhöhter Minereraldichte und höhere Raten von Knochenspaltüberbrückung in der Kombinationsgruppe beobachtet. Das erhöhte Kallusvolumen wurde bereits 2 Wochen nach dem Trauma beobachtet und blieb während der gesamten Studiendauer erhöht.

Die Tatsache, dass die Minereraldichte des Kallus in der Gruppe des kombinierten Traumas (Fraktur/SHT) gleich derjenigen der Fx-Gruppe war (mit Tendenz zu erhöhten Werten in der 4. Woche), zeigt, dass der neu gebildete Knochen mindestens von ausreichender Qualität war. Die Gruppe des kombinierten Traumas zeigte eine Tendenz zur höheren Steifigkeit im Vergleich zur Frakturgruppe nach 4 Wochen. In Bezug auf die Steifigkeit stimmen diese Ergebnisse teilweise mit denen von Boes et al. überein, die deutlich höhere Steifigkeitswerte im Femurknochen von Ratten mit kombiniertem Trauma gefunden haben, jedoch zum Zeitpunkt von 3 Wochen [14]. In Bezug auf ihre Ergebnisse kommen die Autoren zu dem Schluss, dass die Frakturheilung in Kombination mit einem SHT bezüglich Lastübertragungsfähigkeit (zum Beispiel Steifigkeit), aber nicht in Bezug auf Belastbarkeit (Festigkeit) beschleunigt wird, da sie keinen Unterschied in der Drehfestigkeit zwischen den beiden Gruppen nach 3 Wochen finden konnten. Ähnlich zu den Ergebnissen von Boes et al. wurde in der vorliegenden Studie eine Differenz der Torsionsfestigkeit nach 3 Wochen nicht gefunden. Jedoch zeigte die kombinierte Trauma-Gruppe nach 4 Wochen signifikant höhere Steifigkeitswerte als die Fx-Gruppe. In der Tat erreichten die Festigkeit und die Steifigkeit des Femurs der kombinierten Trauma-Gruppe das Niveau der Werte der intakten Knochen der Kontrollgruppe schneller, während die Fraktur-Gruppe mehr Zeit benötigte, um diese Normalwerte zu erreichen. Die intakten Femora der SHT-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten verringerte Torsionssteifigkeiten 3 Wochen nach dem Trauma. Dieser Befund widerspricht der Studie von Boes et al., welche eine erhöhte Steifigkeit in der SHT-Gruppe, aber keine Unterschiede in der Torsionsfestigkeit bei Ratten gefunden hat [14]. Ob diese Feststellung tatsächlich auf einer Interaktion zwischen Gehirn und Knochen basieren könnte oder letztendlich auf der temporären trauma-induzierten verringerten Mobilität der Tiere mit SHT resultiert (was zu einem Rückgang der Minereraldichte führen kann), muss durch künftige Studien untersucht werden. In den leptin-defizienten Mäusen konnten die o. g. Ergebnisse nicht reproduziert werden. Im Gegenteil zu früheren Studien wurde eine deutlich schlechtere Knochenheilung in diesem Tierstamm gezeigt. Die Ursachen für den beobachteten Unterschied bleiben bisher unklar. Auf

jeden Fall scheint das Hormon Leptin eine wichtige Rolle bei der Stimulation von Knochenheilung bei vorliegendem Kombinationstrauma mit SHT und Fraktur zu spielen. Die genaue Rolle und die Kinetik von den o. g. Hormonen im Rahmen der Stimulation der Knochenheilung werden in zukünftigen Studien näher beleuchtet. In den meisten früheren Untersuchungen wurden Ratten für die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen SHT und Knochenverletzungen verwendet [132, 138]. Ein Mausmodell bietet durch die genetische Ähnlichkeit zwischen Mäusen und Menschen sowie die Möglichkeit zum Erstellen und Verwenden von Knock-out-Arten relevante Vorteile gegenüber der Anwendung von Rattenmodellen.

Um das vielfältige Phänomen zu erklären und die unterschiedlichen Aspekte untersuchen zu können, sind weitere Modelle notwendig. Unter diesem Aspekt wurde ein zusätzliches Polytraumamodell in Mäusen entwickelt mit dem primären Ziel, die inflammatorische Reaktion nach hämorrhagischem Schock zu untersuchen [19, 27, 139]. Trotz der fehlenden zerebralen Verletzung zeigte sich weiterhin eine Stimulation der Frakturheilung in dem Modell nach der Durchblutungsstörung des Gehirns bei Ligatur der A. carotis communis in unserem Modell. Diese Beobachtung untermauert die Hypothese der Interaktion zwischen Gehirn und Knochenmetabolismus. Die klinisch beobachtete Entwicklung von heterotopen Ossifikationen bei Patienten mit Hirntumoren oder Schlaganfall unterzeichnet die homöostatische Natur dieser Interaktionen, die sich sekundär als ein Nebeneffekt im Bereich des ossären Metabolismus zeigen [19, 27].

#### 4.4 Ausblick

Durch die vorliegenden Studien konnte die Interaktion zwischen SHT und Knochenheilung tierexperimentell bestätigt werden. Dies ermöglicht die weitere Durchführung von gezielten Experimenten, um die pathophysiologische Kaskade der ausgeprägten Kallusbildung zu verstehen und erklären. Die Identifizierung sowie die Isolierung der Schlüsselfaktoren durch biochemische und gentechnische Analysen wird uns die Entwicklung und Implementierung von neuen Therapiestrategien ermöglichen. Momentan führen wir ein weites genetisches sowie molekulares Screening von mehr als 300 Faktoren durch, um die Moleküle zu identifizieren, die eine wichtige Rolle dabei spielen. Der Paradigmenwechsel im Forschungsbereich des Knochenmetabolismus über die letzten Jahre hat die endokrine Rolle des Knochens eindeutig gemacht; die komplexen Interaktionen zwischen verschiedenen Organen auf zellulärer, endokriner, biochemischer und inflammatorischer Ebene werden aktuell von unserer Arbeitsgruppe durch eine Vielfalt von Experimenten (tierexperimentelle mechanistische Studien mit WT- und Knock-out-Mausstämmen, *In-vitro*-Zellkulturen, genetische Analysen, histologische und biomechanische Untersuchungen) untersucht. Des Weiteren führen wir momentan eine prospektive klinische Studie an Patienten mit einem SHT und Frakturen durch, um das Phänomen der ausgeprägten Knochenheilung mithilfe der bereits gewonnenen Kenntnisse durch die tierexperimentellen Studien translational im menschlichen Körper zu erklären. Die Betrachtung des Knochenmetabolismus und dessen phänotypischer Aspekte (Kallusbildung und heterotope Ossifikationen) als Teil der Homöostase des Organismus wird unser therapeutisches Verständnis in der Zukunft ändern. Langfristiges Ziel unserer Arbeitsgruppe ist es, die Therapiemöglichkeiten und -strategien vor allem von komplexen Knochenpathologien und schweren Verletzungen, wie die Stimulation der Frakturheilung unter kompromittierten Zuständen (Pseudarthrosen), die Regeneration von Knochendefekten nach schwerem Trauma, die pharmakologische Behandlung der heterotopen Ossifikationen, sowie von metabolischen Knochenerkrankungen weitgehend zu entwickeln und in eine neue Ära zu bringen. Die Kombination der molekularen Mechanismen mit den biomechanisch verbesserten osteosynthetischen Möglichkeiten werden die Therapieprinzipien im Bereich der Orthopädie und Unfallchirurgie ändern, sodass man hoffentlich in der

Zukunft von einer klinisch-orientierten molekularen Orthopädie und Unfallchirurgie sprechen kann.

## 5 Zusammenfassung

Die gestörte Frakturheilung stellt nach wie vor aufgrund der limitierten Behandlungsoptionen eine große klinische Herausforderung dar. Vor diesem Hintergrund ist das klinische Phänomen bedeutsam, dass ein Schädelhirntrauma die Frakturheilung positiv beeinflusst. Mithilfe eines standardisierten und reproduzierbaren experimentellen Ansatzes konnten wir bislang zeigen, dass die Frakturheilung in operierten Mäusen mit kombiniertem Schädel-Hirn-Trauma (Controlled Cortical Impact Injury) und Femurfraktur mit Fixateur externe ebenfalls erhöht ist. Nach der Etablierung des Tiermodells konnten wir eine Reihe von *in-vivo*- und *ex-vivo*-radiologischen (Mikro-CT) und biomechanischen Experimenten durchführen, um den Effekt des SHT auf die Frakturheilung von WT-Mäusen zu untersuchen. Die radiologische Untersuchung zeigte eine erhöhte Kallusformation in den Tieren mit dem kombinierten Verletzungsmuster bereits 2 Wochen posttraumatisch sowie eine erhöhte Tendenz zur beschleunigten Frakturüberbrückung. Diese Ergebnisse waren entscheidend für die nächsten Schritte, denn die initiale Hypothese wurde bestätigt und beweist das Vorliegen des Phänomens auch in Tieren. Die konsekutive biomechanische Testung der Femora zeigte zusätzlich eine biomechanische Überlegenheit der Frakturen in der Gruppe der kombinierten Verletzung im Vergleich zu der Gruppe mit der isolierten Fraktur. Dieser Befund impliziert eine normale Kallusformation, die schlussendlich zu den beobachteten biomechanischen Eigenschaften führt. Nachfolgend wurde das Experiment mit leptin-defizienten Mäusen wiederholt, um den Effekt vom Leptin, als zentrales Hormon der Homöostase, auf das Phänomen zu untersuchen. Interessanterweise konnten die vorherigen Ergebnisse der erhöhten Kallusbildung nicht reproduziert werden. Die hohe Pseudarthroserate weist auf die wichtige Rolle von Leptin im Rahmen der Frakturheilung und der ossären Homöostase hin. Des Weiteren konnten diese Ergebnisse histologisch bestätigt werden. Die weitere Etablierung eines Polytrauma-Modells mit hämorrhagischem Schock und die beobachtete Stimulation der Frakturheilung bestätigen die Komplexität des Phänomens und die vielfältigen steuernden Mechanismen.

Nachdem die zugrundeliegenden Mechanismen weiterhin unklar sind, sollen in

zukünftigen Studien die zellulären und molekularen Grundlagen des beobachtenden Phänomens aufgedeckt werden. Wir werden umfassende Analysen der Genexpression, histologische und FACS-Untersuchungen neben Serum- und Urinmessungen durchführen, um die entscheidenden Zielorgane, Zellen und Signaltransduktionswege zu identifizieren, die an der gesteigerten Frakturheilung nach einem SHT beteiligt sind. Abhängig von diesen Ergebnissen werden vielversprechende Kandidaten und Signaltransduktionswege anhand von Zellkulturexperimenten mit Primärzellen oder Zelllinien näher charakterisiert. Abschließend erfolgt die Verifizierung der Funktion etablierter Kandidaten durch pharmakologische und/oder genetische *Proof-of-Principle*-Experimente. Die zelluläre und molekulare Charakterisierung der gesteigerten Frakturheilung vervollständigt die Erforschung der gestörten Knochenheilung und ist die Grundlage zum grundlegenden Verständnis der Knochenregeneration und zur Entwicklung jeglicher neuartiger Therapieformen für betroffene Patienten.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Hak DJ, Fitzpatrick D, Bishop JA, Marsh JL, Tilp S, Schnettler R, Simpson H, Alt V. *Delayed union and nonunions: epidemiology, clinical issues, and financial aspects*. Injury. 2014;45 Suppl 2: S3-7
2. 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;39: 521-5
3. Märdian S, Giesecke M, Haschke F, Tsitsilonis S, Wildemann B, Schwabe P. *Treatment of Tibial Non-Unions - State of the Art and Future Implications*. Acta Chir Orthop Traumatol Cech. 2016;83: 367-374
4. Mills LA, Aitken SA, Simpson AHRW. *The risk of non-union per fracture: current myths and revised figures from a population of over 4 million adults*. Acta Orthop. 2017;88(4): 434-9
5. Antonova E, Le TK, Burge R, Mershon J. *Tibia shaft fractures: Costly burden of nonunions*. BMC Musculoskeletal Disorders. 2013;14: 42
6. Raschke MJ, Rosslénbroich S, Everding J. *Pseudarthrosen: Immer 6 Monate warten oder muss früher etwas passieren?* Trauma Berufskrankh. 2017;19: 255-9
7. Schlundt C, Bucher CH, Tsitsilonis S, Schell H, Duda GN, Schmidt-Bleek K. *Clinical and Research Approaches to Treat Non-union Fracture*. Curr Osteoporos Rep. 2018;16(2): 155-68
8. Hankenson KD, Gagne K, Shaughnessy M. *Extracellular signaling molecules to promote fracture healing and bone regeneration*. Adv Drug Deliv Rev. 2015;94: 3-12
9. Spencer RF. *The effect of head injury on fracture healing. A quantitative assessment*. J Bone Joint Surg Br. 1987;69: 525-8
10. Bidner SM, Rubins IM, Desjardins JV, Zukor DJ, Goltzman D. *Evidence for a humoral mechanism for enhanced osteogenesis after head injury*. J Bone Joint Surg Am. 1990;72: 1144-9
11. Khare GN, Gautam VK, Gupta LN, Gupta AK. *A new hypothesis for faster healing of fractures in head injured patients*. Indian J Med Sci. 1995;49: 281-4
12. Kushwaha VP, Garland DG. *Extremity fractures in the patient with a traumatic brain injury*. J Am Acad Orthop Surg. 1998;6: 298-307

13. Morley J, Marsh S, Drakoulakis E, Pape HC, Giannoudis PV. *Does traumatic brain injury result in accelerated fracture healing?* Injury. 2005;36: 363-8
14. Boes M, Kain M, Kakar S, Nicholls F, Cullinane D, Gerstenfeld L, Einhorn, TA, Tornetta P 3rd. *Osteogenic effects of traumatic brain injury on experimental fracture-healing.* J Bone Joint Surg Am. 2006;88: 738-43
15. Giannoudis PV, Mushtaq S, Harwood P, Kambhampati S, Dimoutsos M, Stavrou Z, Pape HC. *Accelerated bone healing and excessive callus formation in patients with femoral fracture and head injury.* Injury. 2006;37 Suppl 3: S18-24
16. Cadosch D, Gautschi OP, Thyer M, Song S, Skirving AP, Filgueira L, Zellweger R. *Humoral factors enhance fracture-healing and callus formation in patients with traumatic brain injury.* J Bone Joint Surg Am. 2009;91: 282-8
17. Hofman M, Koopmans G, Kobbe P, Poeze M, Andruszkow H, Brink PR, Pape HC. *Improved fracture healing in patients with concomitant traumatic brain injury: proven or not?* Mediators Inflamm. 2015;2015: 204842
18. Simonsen LL, Sonne-Holm S, Krashenninikoff M, Engberg AW. *Symptomatic heterotopic ossification after very severe traumatic brain injury in 114 patients: incidence and risk factors.* Injury. 2007;38: 1146-50
19. Moore TJ. *Functional outcome following surgical excision of heterotopic ossification in patients with traumatic brain injury.* J Orthop Trauma. 1993;7: 11-4
20. Banovac K, Gonzalez F. *Evaluation and management of heterotopic ossification in patients with spinal cord injury.* Spinal Cord. 1997;35: 158-62
21. Chalidis, B, Stengel D, Giannoudis PV. *Early excision and late excision of heterotopic ossification after traumatic brain injury are equivalent: a systematic review of the literature.* J Neurotrauma. 2007;24: 1675-86
22. Antoni A, Heinz T, Leitgeb J. *[Polytrauma and concomitant traumatic brain injury : The role of the trauma surgeon].* Unfallchirurg. 2017;120: 722-72
23. Calandriello B. *CALLUS FORMATION IN SEVERE BRAIN INJURIES.* Bull Hosp Joint Dis. 1964;25: 170-5
24. Calandriello B. *[Bone regeneration in fractures in patients with severe cranial injuries].* Z Orthop Ihre Grenzgeb. 1965;100: 21-5

25. Gautschi OP, Cadosch D, Frey SP, Skirving AP, Filgueira L, Zellweger R. *Serum-mediated osteogenic effect in traumatic brain-injured patients*. ANZ J Surg. 2009;79: 449-55
26. Herold HZ, Tadmor A, Hurvitz A. *Callus formation after acute brain damage*. Isr J Med Sci. 1970;6: 163-6
27. Garland DE. *Clinical observations on fractures and heterotopic ossification in the spinal cord and traumatic brain injured populations*. Clin Orthop Relat Res. 1988: 86-101
28. Karsenty G, Oury F. *Biology without walls: the novel endocrinology of bone*. Annu Rev Physiol. 2012;74: 87-105
29. Katsnelson A. *Physiology: The bones of contention*. Nature. 2010;466: 914-5
30. Amling M, Pogoda P, Beil FT, Schilling AF, Holzmann T, Priemel M, Blicharski D, Catala-Lehnen P, Rueger JM, Ducy P, Karsenty G. *Central control of bone mass: brainstorming of the skeleton*. Adv Exp Med Biol. 2001;496: 85-94
31. Amling M, Takeda S, Karsenty G. *A neuro (endo)crine regulation of bone remodeling*. Bioessays. 2000;22: 970-5
32. Confavreux CB, Levine RL, Karsenty G. *A paradigm of integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolisms*. Mol Cell Endocrinol. 2009;310: 21-9
33. Karsenty G, Ferron M. *The contribution of bone to whole-organism physiology*. Nature. 2012;481: 314-20
34. Neubauer T. *[Traumatic brain injury in polytrauma patients]*. Unfallchirurg. 2017;120: 720-721
35. Neugebauer E, Hensler T, Rose S, Maier B, Holanda M, Raum M, Rixen D, Marzi I. *[Severe craniocerebral trauma in multiple trauma. An assessment of the interaction of local and systemic mediator responses]*. Unfallchirurg. 2000;103: 122-31
36. Probst C, Mirzayan MJ, Mommsen P, Zeckey C, Tegeder T, Geerken L, Maegele M, Samii A, Van Griensven M. *Systemic inflammatory effects of traumatic brain injury, femur fracture, and shock: an experimental murine polytrauma model*. Mediators Inflamm. 2012;2012: 136020
37. Song Y, Bi L, Zhang Z, Huang Z, Hou W, Lu X, Sun P, Han Y. *Increased levels of calcitonin gene-related peptide in serum accelerate fracture healing following traumatic brain injury*. Mol Med Rep. 2012;5: 432-8

38. Song Y, Han GX, Chen L, Zhai YZ, Dong J, Chen W, Li TS, Zhu HY. *The role of the hippocampus and the function of calcitonin gene-related peptide in the mechanism of traumatic brain injury accelerating fracture-healing*. Eur Rev Med Pharmacol Sci. 2017;21: 1522-1531
39. Wildburger R, Zarkovic N, Tonkovic G, Skoric T, Frech S, Hartleb M, Loncaric I, Zarkovic K. *Post-traumatic hormonal disturbances: prolactin as a link between head injury and enhanced osteogenesis*. J Endocrinol Invest. 1998;21: 78-86
40. Otero M, Lago R, Lago F, Casanueva FF, Dieguez C, Gomez-Reino JJ, Gualillo O. *Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights*. FEBS Lett. 2005;579: 295-301
41. Gu XC, Zhang XB, Hu B, Zi Y, Li M. *Neuropeptide Y accelerates post-fracture bone healing by promoting osteogenesis of mesenchymal stem cells*. Neuropeptides. 2016;60: 61-66
42. Hannouche D, Petite H, Sedel L. *Current trends in the enhancement of fracture healing*. J Bone Joint Surg Br. 2001;83: 157-64
43. Zhuang YF, Li J. *Serum EGF and NGF levels of patients with brain injury and limb fracture*. Asian Pac J Trop Med. 2013;6: 383-6
44. Wildburger R, Zarkovic N, Leb G, Borovic S, Zarkovic K, Tatzber F. *Post-traumatic changes in insulin-like growth factor type 1 and growth hormone in patients with bone fractures and traumatic brain injury*. Wien Klin Wochenschr. 2001;113: 119-26
45. Wildburger R, Zarkovic N, Egger G, Petek W, Meinitzer A, Borovic S, Zarkovic K, Li L, Stipancic I, Trbojevic-Cepe M, et al. *Comparison of the values of basic fibroblast growth factor determined by an immunoassay in the sera of patients with traumatic brain injury and enhanced osteogenesis and the effects of the same sera on the fibroblast growth in vitro*. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1995;33: 693-8
46. Mowery NT, Dortch MJ, Dossett LA, Norris PR, Diaz JJ Jr., Morris JA Jr., May AK. *Insulin resistance despite tight glucose control is associated with mortality in critically ill surgical patients*. J Intensive Care Med. 2009;24: 242-51
47. Mowery NT, Gunter OL, Guillaumondegui O, Dossett LA, Dortch MJ, Morris JA Jr., May AK. *Stress insulin resistance is a marker for mortality in traumatic brain injury*. J Trauma. 2009;66: 145-51; discussion 151-3

48. Lustenberger T, Kern M, Relja B, Wutzler S, Stormann P, Marzi I. *The effect of brain injury on the inflammatory response following severe trauma.* Immunobiology. 2016;221: 427-31
49. Wilcockson DC, Campbell SJ, Anthony DC, Perry VH. *The systemic and local acute phase response following acute brain injury.* J Cereb Blood Flow Metab. 2002;22: 318-26
50. Claes L, Recknagel S, Ignatius A. *Fracture healing under healthy and inflammatory conditions.* Nat Rev Rheumatol. 2012;8: 133-43
51. Reinke S, Geissler S, Taylor WR, Schmidt-Bleek K, Juelke K, Schwachmeyer V, Dahne M, Hartwig T, Akyuz L, Meisel C, Unterwalder N, Singh NB, Reinke P, Haas NP, Volk HD, Duda GN. *Terminally differentiated CD8(+) T cells negatively affect bone regeneration in humans.* Sci Transl Med. 2013;5: 177ra36
52. Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, Gaber T, Toben D, Schmidmaier G, Perka C, Buttgerit F, Duda GN. *The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing.* Tissue Eng Part B Rev. 2010;16: 427-34
53. Konnecke I, Serra A, El Khassawna T, Schlundt C,, Schell H, Hauser A, Ellinghaus A, Volk HD, Radbruch A, Duda GN, Schmidt-Bleek K. *T and B cells participate in bone repair by infiltrating the fracture callus in a two-wave fashion.* Bone. 2014;64: 155-65
54. Zhao XG, Zhao GF, Ma YF, Jiang GY. *Research progress in mechanism of traumatic brain injury affecting speed of fracture healing.* Chin J Traumatol. 2007;10: 376-80
55. Wei J, Flaherty S, Karsenty G. *Searching for additional endocrine functions of the skeleton: genetic approaches and implications for therapeutics.* Expert Rev Endocrinol Metab. 2015;10: 413-424
56. Trentz OA, Handschin AE, Bestmann L, Hoerstrup SP, Trentz OL, Platz A. *Influence of brain injury on early posttraumatic bone metabolism.* Crit Care Med. 2005;33: 399-406
57. Toffoli AM, Gautschi OP, Frey SP, Filgueira L, Zellweger R. *From brain to bone: evidence for the release of osteogenic humoral factors after traumatic brain injury.* Brain Inj. 2008;22: 511-8

58. Sang X, Wang Z, Qin T, Li Y. *Elevated concentrations of hypoxia-inducible factor-1alpha in patients with fracture and concomitant traumatic brain injury.* Ann Clin Biochem. 2017;54: 584-592
59. Graham S, Hammond-Jones D, Gamie Z, Polyzois I, Tsiridis E. *The effect of beta-blockers on bone metabolism as potential drugs under investigation for osteoporosis and fracture healing.* Expert Opin Investig Drugs. 2008;17: 1281-99
60. Kennedy AJ, Ellacott KL, King VL, Hasty AH. *Mouse models of the metabolic syndrome.* Dis Model Mech. 2010;3: 156-66
61. Mirzayan MJ, Probst C, Samii M, Krettek C, Gharabaghi A, Pape HC, Van Griensven M, Samii A. *Histopathological features of the brain, liver, kidney and spleen following an innovative polytrauma model of the mouse.* Exp Toxicol Pathol. 2012;64: 133-9
62. Griebenow M, Casalis P, Woiciechowsky C, Majetschak M, Thomale UW. *Ubiquitin reduces contusion volume after controlled cortical impact injury in rats.* J Neurotrauma. 2007;24: 1529-35
63. Histing T, Garcia P, Holstein JH, Klein M, Matthys R, Nuetzi R, Steck R, Laschke MW, Wehner T, Bindl R et al. *Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting.* Bone. 2011;49: 591-9
64. Cadosch D, Thyer M, Gautschi OP, Lochnit G, Frey SP, Zellweger R, Filgueira L, Skirving AP. *Functional and proteomic analysis of serum and cerebrospinal fluid derived from patients with traumatic brain injury: a pilot study.* ANZ J Surg. 2010;80: 542-7
65. Cadosch D, Toffoli AM, Gautschi OP, Frey SP, Zellweger R, Skirving AP, Filgueira L. *Serum after traumatic brain injury increases proliferation and supports expression of osteoblast markers in muscle cells.* J Bone Joint Surg Am. 2010;92: 645-53
66. Smith DH, Soares HD, Pierce JS, Perlman KG, Saatman KE, Meaney DF, Dixon CE, McIntosh TK. *A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects.* J Neurotrauma. 1995;12: 169-78
67. Thomale UW, Kroppenstedt SN, Beyer TF, Schaser KD, Unterberg AW, Stover JF. *Temporal profile of cortical perfusion and microcirculation after controlled cortical impact injury in rats.* J Neurotrauma. 2002;19: 403-13

68. Claes L, Augat P, Suger G, Wilke HJ. *Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing*. J Orthop Res. 1997;15: 577-84
69. Histing T, Holstein JH, Garcia P, Matthys R, Kristen A, Claes L, Menger MD, Pohlemann T. *Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture*. J Orthop Res. 2009;27: 1152-6
70. Andermahr J, Elsner A, Brings AE, Hensler T, Gerbershagen H, Jubel A. *Reduced collagen degradation in polytraumas with traumatic brain injury causes enhanced osteogenesis*. J Neurotrauma. 2006;23: 708-20
71. Cadosch D, Al-Mushaiqri MS, Gautschi OP, Chan E, Jung FJ, Skirving AP, Filgueira L. *Immune response deviation and enhanced expression of chemokine receptor CCR4 in TBI patients due to unknown serum factors*. Injury. 2010;41: e4-9
72. Huang GY, Ma X, Xia XL, Jiang JY, Jin WF, Gao JJ, Huang HY. *Effect of rat brain tissue extracts on osteoblast proliferation and differentiation*. Int Orthop. 2012;36: 887-93
73. Kesemenli CC, Necmioglu S. *The role of melatonin as a link between head injury and enhanced osteogenesis*. Med Hypotheses. 2005;65: 605-6
74. Lahner D, Fritsch G. *[Pathophysiology of intracranial injuries]*. Unfallchirurg. 2017;120: 728-733
75. Liu X, Zhou C, Li Y, Ji Y, Xu G, Wang X, Yan J. *SDF-1 promotes endochondral bone repair during fracture healing at the traumatic brain injury condition*. PLoS One. 2013;8: e54077
76. Wildburger R, Zarkovic N, Egger G, Petek W, Zarkovic K, Hofer HP. *Basic fibroblast growth factor (BFGF) immunoreactivity as a possible link between head injury and impaired bone fracture healing*. Bone Miner. 1994;27: 183-92
77. Burguera B, Hofbauer LC, Thomas T, Gori F, Evans GL, Khosla S, Riggs BL, Turner RT. *Leptin reduces ovariectomy-induced bone loss in rats*. Endocrinology. 2001;142: 3546-53
78. Ducy P, Amling M, Takeda S, Priemel M, Schilling AF, Beil FT, Shen J, Vinson C, Rueger JM, Karsenty G. *Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass*. Cell. 2000;100: 197-207
79. Ealey KN, Fonseca D, Archer MC, Ward WE. *Bone abnormalities in adolescent leptin-deficient mice*. Regul Pept. 2006;136: 9-13

80. Gordeladze JO, Drevon CA, Syversen U, Reseland JE. *Leptin stimulates human osteoblastic cell proliferation, de novo collagen synthesis, and mineralization: Impact on differentiation markers, apoptosis, and osteoclastic signaling.* J Cell Biochem. 2002;85: 825-36
81. Iwaniec UT, Boghossian S, Lapke PD, Turner RT, Kalra SP. *Central leptin gene therapy corrects skeletal abnormalities in leptin-deficient ob/ob mice.* Peptides. 2007;28: 1012-9
82. Kishida Y, Hirao M, Tamai N, Nampei A, Fujimoto T, Nakase T, Shimizu N, Yoshikawa H, Myoui A. *Leptin regulates chondrocyte differentiation and matrix maturation during endochondral ossification.* Bone. 2005;37: 607-21
83. Reseland JE, Syversen U, Bakke I, Qvigstad G, Eide LG, Hjertner O, Gordeladze JO, Drevon CA. *Leptin is expressed in and secreted from primary cultures of human osteoblasts and promotes bone mineralization.* J Bone Miner Res. 2001;16: 1426-33
84. Takeda S, Eleftheriou F, Levasseur R, Liu X, Zhao L, Parker KL, Armstrong D, Ducy P, Karsenty G. *Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system.* Cell. 2002;111: 305-17
85. Thomas T, Gori F, Khosla S, Jensen MD, Burguera B, Riggs BL. *Leptin acts on human marrow stromal cells to enhance differentiation to osteoblasts and to inhibit differentiation to adipocytes.* Endocrinology. 1999;140: 1630-8
86. Turner RT, Kalra SP, Wong CP, Philbrick KA, Lindenmaier LB, Boghossian S, Iwaniec UT. *Peripheral leptin regulates bone formation.* J Bone Miner Res. 2013;28: 22-34
87. Wauters M, Considine RV, Van Gaal LF. *Human leptin: from an adipocyte hormone to an endocrine mediator.* Eur J Endocrinol. 2000;143: 293-311
88. Stepan CM, Crawford DT, Chidsey-Frink KL, Ke H, Swick AG. *Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice.* Regul Pept. 2000;92: 73-8
89. Morash B, Li A, Murphy PR, Wilkinson M, Ur E. *Leptin gene expression in the brain and pituitary gland.* Endocrinology. 1999;140: 5995-8
90. Wei Y, Wang L, Clark JC, Dass CR, Choong PF. *Elevated leptin expression in a rat model of fracture and traumatic brain injury.* J Pharm Pharmacol. 2008;60: 1667-72

91. Lin C, Huang SJ, Wang N, Shen ZP. *Relationship between plasma leptin levels and clinical outcomes of pediatric traumatic brain injury*. Peptides. 2012;35: 166-71
92. Locher RJ, Lunnemann T, Garbe A, Schaser K, Schmidt-Bleek K, Duda G, Tsitsilonis S. *Traumatic brain injury and bone healing: radiographic and biomechanical analyses of bone formation and stability in a combined murine trauma model*. J Musculoskelet Neuronal Interact. 2015;15: 309-15
93. Tsitsilonis S, Seemann R, Misch M, Wichlas F, Haas NP, Schmidt-Bleek K, Kleber C, Schaser KD. *The effect of traumatic brain injury on bone healing: an experimental study in a novel in vivo animal model*. Injury. 2015;46: 661-5
94. Mehta M, Strube P, Peters A, Perka C, Hutmacher D, Fratzl P, Duda GN. *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. 2010;47: 219-28
95. Vollmar B, Lang G, Menger MD, Messmer K. *Hypertonic hydroxyethyl starch restores hepatic microvascular perfusion in hemorrhagic shock*. Am J Physiol. 1994;266: H1927-34
96. Wichmann MW, Ayala A, Chaudry IH. *Severe depression of host immune functions following closed-bone fracture, soft-tissue trauma, and hemorrhagic shock*. Crit Care Med. 1998;26: 1372-8
97. Ducey P, Schinke T, Karsenty G. *The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance*. Science. 2000;289: 1501-4
98. Tam J, Trembovler V, Di Marzo V, Petrosino S, Leo G, Alexandrovich A, Regev E, Casap, N, Shteyer, A, et al. *The cannabinoid CB1 receptor regulates bone formation by modulating adrenergic signaling*. Faseb j. 2008;22: 285-94
99. Yang TY, Wang TC, Tsai YH, Huang KC. *The effects of an injury to the brain on bone healing and callus formation in young adults with fractures of the femoral shaft*. J Bone Joint Surg Br. 2012;94: 227-30
100. Newman RJ, Stone MH, Mukherjee SK. *Accelerated fracture union in association with severe head injury*. Injury. 1987;18: 241-6
101. Perkins R, Skirving AP. *Callus formation and the rate of healing of femoral fractures in patients with head injuries*. J Bone Joint Surg Br. 1987;69: 521-4

102. Beil FT, Barvencik F, Gebauer M, Beil B, Pogoda P, Rueger JM, Ignatius A, Schinke T, Amling M. *Effects of increased bone formation on fracture healing in mice*. J Trauma. 2011;70: 857-62
103. Ducey P, Karsenty G. *The family of bone morphogenetic proteins*. Kidney Int. 2000;57: 2207-14
104. Trimmel H, Herzer G, Schochl H, Voelckel WG. [*Intensive care treatment of traumatic brain injury in multiple trauma patients : Decision making for complex pathophysiology*]. Unfallchirurg. 2017;120: 739-744
105. Mowery NT, Carnevale RJ, Gunter OL, Norris PR, Dossett LA, Dortch MJ, Morris JA Jr., May AK. *Insulin resistance heralds positive cultures after severe injury*. Surg Infect (Larchmt). 2009;10: 503-9
106. Dossett LA, Collier B, Donahue R, Mowery NT, Dortch MJ, Guillaumondegui O, Diaz JJ, May AK. *Intensive insulin therapy in practice: can we do it?* JPEN J Parenter Enteral Nutr. 2009;33: 14-20
107. Peters A, Schweiger U, Pellerin L, Hubold C, Oltmanns KM, Conrad M, Schultes B, Born J, Fehm HL. *The selfish brain: competition for energy resources*. Neurosci Biobehav Rev. 2004;28: 143-80
108. Fehm HL, Kern W, Peters A. *The selfish brain: competition for energy resources*. Prog Brain Res. 2006;153: 129-40
109. Wang P, Mariman EC. *Insulin resistance in an energy-centered perspective*. Physiol Behav. 2008;94: 198-205
110. Hitze B, Hubold C, Van Dyken R, Schlichting K, Lehnert H, Entringer S, Peters A. *How the selfish brain organizes its supply and demand*. Front Neuroenergetics. 2010;2: 7
111. Peters A. *The selfish brain: Competition for energy resources*. Am J Hum Biol. 2011;23: 29-34
112. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, Nishimura H, Yoshimasa Y, Tanaka I, Mori T, et al. *Nonadipose tissue production of leptin: leptin as a novel placenta-derived hormone in humans*. Nat Med. 1997;3: 1029-33
113. Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, et al. *The stomach is a source of leptin*. Nature. 1998;394: 790-3

114. Laharrague P, Larrouy D, Fontanilles AM, Truel N, Campfield A, Tenenbaum R, Galitzky J, Corberand JX, Penicaud L, Casteilla L. *High expression of leptin by human bone marrow adipocytes in primary culture*. *Faseb j*. 1998;12: 747-52
115. Burguera B, Couce ME. *Leptin access into the brain: a saturated transport mechanism in obesity*. *Physiol Behav*. 2001;74: 717-20
116. Wang L, Tang X, Zhang H, Yuan J, Ding H, Wei Y. *Elevated leptin expression in rat model of traumatic spinal cord injury and femoral fracture*. *J Spinal Cord Med*. 2011;34: 501-9
117. Wei J, Karsenty G. *An overview of the metabolic functions of osteocalcin*. *Rev Endocr Metab Disord*. 2015;16: 93-8
118. Fulzele K, Riddle RC, Digirolamo DJ, Cao X, Wan C, Chen D, Faugere MC, Aja S, Hussain MA, Bruning JC, et al. *Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition*. *Cell*. 2010;142: 309-19
119. Lee NK, Sowa H, Hinoi E, Ferron M, Ahn JD, Confavreux C, Dacquin R, Mee PJ, Mckee MD, et al. *Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton*. *Cell*. 2007;130: 456-69
120. Ferron M, Wei J, Yoshizawa T, Del Fattore A, Depinho RA, Teti A, Ducy P, Karsenty G. *Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism*. *Cell*. 2010;142: 296-308
121. Matsuo K, Irie N. *Osteoclast-osteoblast communication*. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473: 201-9
122. Sims NA, Gooi JH. *Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption*. *Semin Cell Dev Biol*. 2008;19: 444-51
123. Zoico E, Zamboni M, Di Francesco V, Mazzali G, Fantin F, De Pergola G, Zivelonghi A, Adami S, Bosello O. *Relation between adiponectin and bone mineral density in elderly post-menopausal women: role of body composition, leptin, insulin resistance, and dehydroepiandrosterone sulfate*. *J Endocrinol Invest*. 2008;31: 297-302
124. Agbaht K, Gurlek A, Karakaya J, Bayraktar M. *Circulating adiponectin represents a biomarker of the association between adiposity and bone mineral density*. *Endocrine*. 2009;35: 371-9

125. Lee NJ, Wong IP, Baldock PA, Herzog H. *Leptin as an endocrine signal in bone.* Curr Osteoporos Rep. 2008;6: 62-6
126. Gat-Yablonski G, Phillip M. *Leptin and regulation of linear growth.* Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 2008;11: 303-8
127. Hamrick MW, Ferrari SL. *Leptin and the sympathetic connection of fat to bone.* Osteoporos Int. 2008;19: 905-12
128. Friedman J. *The long road to leptin.* J Clin Invest. 2016;126: 4727-4734
129. W Wang L, Yuan JS, Zhang HX, Ding H, Tang XG, Wei YZ. *Effect of leptin on bone metabolism in rat model of traumatic brain injury and femoral fracture.* Chin J Traumatol. 2011;14: 7-13
130. Reimer RA, Lamothe JM, Zernicke RF. *Leptin Deficiency and Its Effects on Tibial and Vertebral Bone Mechanical Properties in Mature Genetically Lean and Obese JCR:LA-Corpulent Rats.* J Obes. 2012;2012: 650193
131. Khan SN, Duraine G, Virk SS, Fung J, Rowland DJ, Reddi AH, Lee MA. *The temporal role of leptin within fracture healing and the effect of local application of recombinant leptin on fracture healing.* J Orthop Trauma. 2013;27: 656-62
132. Liu P, Cai M. *Leptin Influences Healing in the Sprague Dawley Rat Fracture Model.* Med Sci Monit. 2017;23: 258-265
133. Campfield LA, Smith FJ, Guisez Y, Devos R, Burn P. *Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks.* Science. 1995;269: 546-9
134. Pogoda P, Egermann M, Schnell JC, Priemel M, Schilling AF, Alini M, Schinke T, Rueger JM, Schneider E, Clarke I, et al. *Leptin inhibits bone formation not only in rodents, but also in sheep.* J Bone Miner Res. 2006;21: 1591-9
135. Roszer T, Jozsa T, Kiss-Toth ED, De Clerck N, Balogh L. *Leptin receptor deficient diabetic (db/db) mice are compromised in postnatal bone regeneration.* Cell Tissue Res. 2014;356: 195-206
136. 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;17: 78-85
137. Maegele M, Riess P, Sauerland S, Bouillon B, Hess S, Mcintosh TK, Mautes A, Brockmann M, Koebeke J, Knifka J, et al. *Characterization of a new rat model of experimental combined neurotrauma.* Shock. 2005;23: 476-81

138. Garcia P, Histing T, Holstein JH, Klein M, Laschke MW, Matthys R, Ignatius A, Wildemann B, Lienau J, Peters A, et al. *Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review*. Eur Cell Mater. 2013;26: 1-12; discussion 12-4
139. Kleber C, Becker CA, Malysch T, Reinhold JM, Tsitsilonis S, Duda GN, Schmidt-Bleek K, Schaser KD. *Temporal profile of inflammatory response to fracture and hemorrhagic shock: Proposal of a novel long-term survival murine multiple trauma model*. J Orthop Res. 2015;33: 965-70

## **7 Anhang**

### **7.1 Danksagung**

Mein großer Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Carsten Perka, Ärztlicher Direktor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin. Ich danke ihm herzlich für seine vielfältige Unterstützung, das in mich gesetzte Vertrauen und das Gewähren von zeitlichen Freiräumen zur Durchführung meiner weiterführenden Forschungsvorhaben.

Zusätzlich möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dr. med. Michael Schütz, ehemaliger Geschäftsführender Direktor des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie der Charité – Universitätsmedizin Berlin für seine Unterstützung und seine Verbesserungsvorschläge während des Zusammenschreibens der vorliegenden Habilitationsschrift.

Mein Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. N.P. Haas für die von ihm geschaffenen klinischen und wissenschaftlichen Strukturen des CMSC. Ohne ein solches Umfeld wäre die vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen.

Außerdem möchte ich mich zutiefst bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. K. D. Schaser, Universitätsklinik Dresden, bedanken, dessen zielstrebige, geradlinige und offene Art meine Arbeit im klinischen und operativen Bereich maßgeblich gefördert und geprägt hat.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Freund und Mentor PD Dr. med. F. Wichlas, Universitätsklinik Salzburg, der mir das wissenschaftliche und klinische Denken beibrachte und mich ebenfalls uneingeschränkt unterstützte. Des Weiteren möchte ich mich bei den guten Kollegen und Freunden PD Dr. med. Christian Kleber, Universitätsklinik Dresden, und bei Dr. med. Sebastian Manegold, Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie, Charité – Universitätsmedizin Berlin für ihre klinische und wissenschaftliche Unterstützung.

Mein besonderer Dank geht auch an Herrn PD Dr. med. J. Keller, Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie, Charité - Universitätsmedizin Berlin für die exzellente Zusammenarbeit und die Weiterentwicklung unseres gemeinsamen Projektes.

Danken möchte ich außerdem allen Kolleginnen und Kollegen des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie und der AG Molekulare Unfallchirurgie für die geleistete Unterstützung und ihre exzellente Arbeit und außergewöhnliche Leistung. Besonders

möchte ich mich bei PD Dr. med. S. Märdian, Kommissarischer Geschäftsführender Direktor Campus Virchow Klinikum, Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie, Charité - Universitätsmedizin Berlin für seine Unterstützung bei der Arbeit. Mein Dank gilt auch Herrn Univ.-Prof. Dr. Georg N. Duda, Direktor des Julius-Wolff-Instituts für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration, für die Unterstützung und die uneingeschränkte Möglichkeit, meine Forschungsarbeit durchführen zu können. Mein allergrößter Dank gilt meiner Familie – meinen Eltern, meinem Bruder, und vor allem meiner Frau Angeliki und meiner Tochter Ellie für die nie endende Unterstützung und ihr Vertrauen; ohne sie wäre alles nicht möglich.

## 7.2 Eidesstattliche Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

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

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

.....

Datum

.....

Dr. med. Serafeim Tsitsilonis, MSc, PhD