

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

DISSERTATION

**Über die Auswirkung des Schädel-Hirn-Traumas und der Fraktur der
langen Röhrenknochen auf den posttraumatischen Hormonhaushalt
am Wildtyp- und leptin-defizienten Mausmodell**

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

*vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin*

von

*Anja GARBE
aus Bützow*

Datum der Promotion: 18.09.2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	iii
Tabellenverzeichnis	v
Abkürzungsverzeichnis	vii
Zusammenfassung	xi
Abstract	xiii
1 Einleitung	1
1.1 SHT und akzellerierte Frakturheilung	1
1.2 Hormone und Interaktionen	2
1.2.1 Leptin	2
1.2.2 Insulin	6
1.2.3 Osteocalcin	9
1.2.4 Hormon- und Energiehomöostase	14
2 Material und Methoden	17
2.1 Studiendesign und -ablauf	17
2.2 Tiermodell und Tierstämme	18
2.2.1 Auswahl des Tiermodells	18
2.2.2 Wildtyp-Tiere	19
2.2.3 Leptin-Defizienz-Tiere	20
2.3 Haltung und Ernährung	20
2.4 Operationen und Anästhesie	21
2.4.1 Allgemeines Prozedere	21
2.4.2 Femurosteotomie	22
2.4.3 Controlled Cortical Impact Injury	24
2.4.4 Kombinationstrauma	25
2.5 Blutentnahmen und Euthanasie	26
2.5.1 Allgemeine Erläuterungen	26
2.5.2 Venenpunktion	26
2.5.3 Herzpunktion	27

2.6	Hormonspiegelbestimmung	27
2.6.1	Insulin	27
2.6.2	Osteocalcin	29
2.7	Statistische Auswertung	30
3	Ergebnisse	31
3.1	Wildtyptiere	31
3.1.1	Insulin	31
3.1.2	Osteocalcin	35
3.2	Leptin-Defizienz-Tiere	40
3.2.1	Insulin	40
3.2.2	Osteocalcin	45
3.3	Wildtyp-Tiere vs. Leptin-Defizienz-Tiere	49
4	Diskussion	57
4.1	Trauma und Hormonreaktionen	57
4.1.1	Störung der Homöostase	57
4.1.2	Selfish-Brain-Theory	58
4.1.3	Hormone im posttraumatischen Kontext	60
4.1.4	Osteocalcin und Knochenheilung	62
4.1.5	Leptin und Knochenheilung	64
5	Limitationen, Einordnung und Ausblick	71
5.1	Limitationen	71
5.2	Skelettendokrinologie, Neuroendokrinologie und Neuroskeletal Science	72
5.3	Ausblick	73
	Literatur	XV
	Lebenslauf	XXV
	Veröffentlichungen	XXVII
	Eidesstattliche Erklärung	XXIX
	Danksagung	XXXI

Abbildungsverzeichnis

1.1	Peripherer und zentraler Leptineffekt	4
1.2	SNS-Signaling im Ostoblasten in Anlehnung an <i>Takeda und Karsenty 2008</i>	6
1.3	Der Insulin-OCN-Loop in Anlehnung an <i>Ferron et al. 2010</i>	8
1.4	Die Leptin-induzierte Regulation des Insulinsignalings durch OST-PTP in Anlehnung an <i>Ferron et al. 2010</i> und <i>Fulzele et al. 2010</i>	9
1.5	Die Wirkung von biologisch aktivem OCN an Fettgewebe, Skelettmuskel, Leber, Gefäßen und β -Zellen in Anlehnung an <i>Ferron und Lacombe 2014</i>	11
1.6	Die leptininduzierte und OST-PTP-vermittelte Downregulation der Gla-OCN-Produktion und -Freisetzung in Anlehnung an <i>Lee et al. 2007</i> und <i>Ferron et al. 2008</i>	13
1.7	Regulationen im Rahmen der insulin- und leptinkontrollierten Energiehomöostase	14
2.1	Gruppeneinteilung und Studiendesign	17
2.2	Zeitlicher Ablauf mit den Zeitpunkten der BEs und der finalen Herzpunktion . .	18
2.3	Intraoperative Inhalationsnarkose und stereotaktische Fixierung der Versuchstiere	22
2.4	Durchführung der Femurosteotomie	23
2.5	Durchführung des Controlled Cortical Impact Injury	25
2.6	Schematische Darstellung des Verlaufs der V. facialis	27
3.1	Von Ausreißern und Extremwerten bereinigte Plasma-/Seruminsulinkonzentrationen der 4 Traumagruppen innerhalb der WT-Tiere in pg/ml	35
3.2	Von Ausreißern und Extremwerten bereinigte Plasma-/Serum-OCN-Konzentrationen der 4 Traumagruppen der WT-Tiere in pg/ml	40
3.3	Von Ausreißern und Extremwerten bereinigte Plasma-/Seruminsulinkonzentrationen innerhalb der Leptin-Defizienz-Tiere in pg/ml	45
3.4	Von Ausreißern und Extremwerten bereinigte Plasma-/Serum-OCN-Konzentrationen innerhalb der Leptin-Defizienz-Tiere in pg/ml	49
3.5	Tierstammvergleich der mittleren Plasma-/Serum-OCN-Konzentrationen in pg/ml	52
4.1	Vereinfachtes Fischgrätenmodell der zentralen Blutzuckerspiegelregulation in Anlehnung an <i>Peters et al. 2004</i> Selfish-Brain-Theorie	59
4.2	Fünf Phänomene nach Kombinationsrauma	62
4.3	Mögliche Ursachen akzellerierter Fx-Heilung nach Kombitrauma	63

4.4	Abschließende Erklärung zur zentralen Leptinverteilung nach Fx und SHT in Anlehnung an Ducy et al. 2000 und Turner et al. 2013	69
-----	---	----

Tabellenverzeichnis

1.1	Metabolische und skeletale Phänotypen je nach Insulinrezeptor-KO in Anlehnung an Pramojane et al. 2014 [85]	7
2.1	Anzahl der insgesamt in den Versuch eingeschlossenen, vorzeitig verstorbenen und zur Hormonanalyse verbleibenden WT-Tiere	20
2.2	Anzahl der insgesamt in den Versuch eingeschlossenen, vorzeitig verstorbenen und zur Hormonanalyse verbleibenden Leptin-Defizienz-Tiere	20
3.1	Von Ausreißern und Extremwerten bereinigte deskriptive Statistik der Plasma-/Seruminsulinwerte für WT-Tiere in pg/ml	32
3.2	ANOVA der Plasma-/Seruminsulinkonzentrationen für WT-Tiere	34
3.3	Von Ausreißern und Extremwerten bereinigte deskriptive Statistik der Plasma-/Serum-OCN für WT-Tiere in pg/ml	36
3.4	ANOVA der Plasma-/Serum-OCN-Konzentrationen für WT-Tiere	39
3.5	Von Ausreißern und Extremwerten bereinigte deskriptive Statistik der Plasma-/Seruminsulinwerte für Leptin-Defizienz-Tiere in pg/ml	41
3.6	ANOVA der Plasma-/Seruminsulinkonzentrationen für Leptin-Defizienz-Tiere	44
3.7	Von Ausreißern und Extremwerten bereinigte deskriptive Statistik der Plasma-/Serum-OCN-Werte für Leptin-Defizienz-Tiere in pg/ml	46
3.8	ANOVA der Plasma-/Serum-OCN-Konzentrationen für Leptin-Defizienz-Tiere	48
3.9	ANOVA der Plasma-/Serum-OCN-Konzentrationen der Fx-Tiere mit und ohne Leptin	53
3.10	ANOVA der Plasma-/Serum-OCN-Konzentrationen der SHT-Tiere mit und ohne Leptin	53
3.11	ANOVA der Plasma-/Serum-OCN-Konzentrationen der Kombi-Tiere mit und ohne Leptin	54
3.12	ANOVA der Plasma-/Serum-OCN-Konzentrationen der K-Tiere mit und ohne Leptin	55

Abkürzungsverzeichnis

a. e.	am ehesten
Akt	AKT8 virus oncogene cellular homolog
AP-1	Alkalische Phosphatase 1
ARC	Nucleus arcuatus
ATF4	Activating Transcription Factor 4
BAD	Bcl-2-Associated Death promoter
BBB	Blood-Brain-Barrier/Blut-Hirn-Schranke
BE	Blutentnahme
BFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BFR	Bone Formation Rate
BM	Bone Mass
BMI	Body Mass Index
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMSC	Bone marrow Mesenchymal Stem Cell
BZ	Blutzuckerwert
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cbfa1	core-binding factor alpha 1
CCII	Controlled Cortical Impact Injury
Cdk4	Cyklin-abhängige Kinase 4
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptide
cm	Zentimeter
c-myc	avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homolog
CREB	cAMP Response Element-Binding protein
db/db	Leptin-Rezeptor-KO
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
ESP	Embryonic Stem Cell Phosphatase
evtl.	eventuell
Foxo-1	Forkhead box protein O-1
Fx	Fraktur
g	Gramm
ggf.	gegebenenfalls

GK-3	Guanylat Kinase 3
GLUT4	Glucose Transporter Typ
GPRC6a	G-Protein-gekoppelter Rezeptor 6a
h	Stunde/n
IGF-1	Insulin Like Growth Factor-1
INS-R	Insulin-Rezeptor
icv	intracerebroventriculär
K	Kontrolle
KO	Knock-Out
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
Kombi	Kombinationstrauma
L	Liter
M.	Musculus
MAP	Mitogen-Activated Protein
max.	maximal
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
mg	Milligramm
min	Minute
min.	mindestens/minimal
ml	Milliliter
mm	Millimeter
m/s	Meter je Sekunde
μ l	Mikroliter
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
N ₂ O	Lachgas
O ₂	Sauerstoff
ob/ob	Leptin-KO
o. g.	oben genannten
OPG	Osteoprotegrin
OST-PTP	Osteoblast Testicular Tyrosinphosphatase
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
Pgc1 α	peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 α
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
p. o.	per os
PTP1B	Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RANKL	RANK-Ligand

rpm	Runden pro Minuten
RUNX2	Runt-related transcription factor 2
s. c.	subcutan
SD	Standard Deviation
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
Smurf1	Smad ubiquitination regulatory factor 1
Ss.	Suturae
s. u.	siehe unten
TG	Triglyceride
TGF- β	Transforming Growth Faktor- β
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UCP1	Uncoupling Protein 1
V.	Vena
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VMH	Ventro-Mediale Hypothalamuskern
vol. %	Volumenprozent
z. B.	zum Beispiel

Zusammenfassung

Anja GARBE

Über die Auswirkung des Schädel-Hirn-Traumas und der Fraktur der langen Röhrenknochen auf den posttraumatischen Hormonhaushalt am Wildtyp- und leptin-defizienten Mausmodell

Einleitung: Die bei Schwerverletzten bekannte, ausgeprägte Kallusbildung bei gleichzeitig vorliegendem Schädel-Hirn-Trauma (SHT) wurde bereits von verschiedenen Studien analysiert und auf mögliche Ursachen hin untersucht. Trotzdem blieb eine Erklärung dabei bislang aus. Gleichzeitig stieg mit Entdeckung der Hormone Leptin und Osteocalcin (OCN) das Interesse an der endokrinen Regulation des Knochenumbaus und dessen Einfluss auf den Hormon- und Energiehaushalt. Die vorliegende Forschungsarbeit versucht, neuste Kenntnisse über den Knochenstoffwechsel in der Hormon- und Energiehomöostase auf die spezifische Situation des kombinierten zentralen und Extremitätentraumas zu übertragen und so Erkenntnisse auf dem Gebiet der Frakturheilung (Fx-Heilung) herauszuarbeiten.

Material und Methoden: 132 weibliche C57BL/6NCrl Wildtyp(WT)-Mäuse (Charles Rivers Labors) und 134 weibliche B6.V-Lep-ob/JRj Leptin-Defizienz-Mäuse (Janvier) wurden in die Gruppen: isolierte Fraktur, isoliertes SHT, Kombitrauma und Kontrolle, aufgeteilt und entsprechend einer Femurosteotomie und/oder einem Controlled-Cortical-Impact-Injury (CCII) unterzogen. Postoperativ erfolgten wöchentliche Blutentnahmen. Die so gewonnenen Proben mit Maus-Elisa-Systemen auf ihren Gehalt an Insulin (Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA®), Alpco Diagnostics) und OCN (Mouse Osteocalcin ELISA®, Immunotopics International) untersucht. Die statistische Auswertung erfolgte durch SPSS 22 (SPSS 22®, IBM).

Ergebnisse: Postoperativ zeigte sich bei WT-Tieren der Fx-Gruppe sowie der Kombinationstraumagruppe ein zweiwöchiger signifikanter Plasmaspiegelanstieg von Insulin bei gleichzeitigem Abfall der OCN-Plasmaspiegel. Hierbei zeigten Tiere mit Femurosteotomie und insbesondere Kombitraumatiere deutlich stärkere OCN-Abfälle als Tiere mit isoliertem SHT. Innerhalb der Leptin-Defizienz-Tiere zeigte sich bei Tieren dieser Gruppen innerhalb der ersten zwei Wochen ebenfalls ein traumaspezifischer Anstieg der Seruminsulinspiegel. Hier kam es entsprechend auch zu einem parallelen Abfall des Plasma-OCN-Spiegels, wobei sich bei Leptin-Defizienz kein

traumaspezifischer OCN-Verlauf nachweisen ließ. Vier Wochen postoperativ näherten sich bei beiden Tierstämmen Insulin- und OCN-Spiegel den Ausgangswerten an.

Diskussion: Im posttraumatischen Hormonspiegel von WT- und Leptin-Defizienz-Mäusen zeigt sich eine initiale, stressbedingte Hyperinsulinämie im Sinne einer zentral induzierten Insulinresistenz, die über das ausbleibende Insulin-Signaling im Osteoblasten zu einer geringeren Synthese und Freisetzung von OCN führt. Diese Prozesse sind in WT-Tieren traumaspezifisch und führen über eine Unterschreitung eines OCN-Grenzwerts in der Gruppe der Kombitraumatiere zu einer enthemmten Fx-Heilung mit akzellerierter Kallusbildung. Bei Leptin-Defizienz kommt es trotz deutlicherem OCN-Abfall über alle Traumagruppen zu einer gestörten Fx-Heilung, was die übergeordnete Funktion des Sättigungshormons verdeutlicht.

Schlussfolgerungen: Die vorliegende Studie zeigt die Interdependenz der Hormone Insulin, OCN und Leptin bei der Regulation des Energiehaushalts. Dabei übernimmt das Skelettsystem keine statisch-speichernde, sondern eine dynamisch regulierende Funktion. Im Traumafall kommt es zu einer akuten Energiedysbalance mit zentralen, hormonellen und zellulären Anpassungsreaktionen, die bei Kombinationstrauma zu einer akzellierten Fx-Heilung führen.

Abstract

Anja GARBE

On the effect of traumatic brain injury and long bone fracture on posttraumatic hormone balance in a wildtype and leptin-deficient mouse model

Introduction: In severely injured patients accelerated fracture healing after traumatic brain injury (TBI) is well-known. Studies which investigated its causes have been without any success. Parallel, the discovery of leptin and osteocalcin (OCN) has evoked interest in the endocrine regulation of bone turnover and its influence on hormone and energy homeostasis. This study attempts to transfer these insights onto the situation of a combined trauma to further investigate fracture healing.

Material and methods: 132 female C57BL/6NCrl wild type (WT) mice (Charles Rivers) and 134 female B6.V-Lep-ob/JRj leptin-deficient mice (Janvier) were divided into the groups: isolated fracture, isolated TBI, combination trauma and control. They underwent femur osteotomy and / or controlled cortical impact injury (CCII). Postoperatively, blood was drawn weekly and analyzed for insulin and OCN via mouse ELISA systems (Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA®, Alpco and Diagnostics and Mouse Osteocalcin ELISA®, Immunotopics International). Statistics were done using SPSS 22 (SPSS 22®, IBM).

Results: Within two weeks, WT-mice with isolated fracture and combined trauma showed a significant increase in insulin and a drop in OCN. Animals with isolated femur osteotomy and moreover with combined trauma showed a more distinct OCN variation than animals with isolated TBI. In leptin-deficiency, despite a preknown hyperinsulinemia, there was also a specific rise in insulin levels during the first two weeks postoperatively in mice with extremity or combined trauma. As in WT-mice, without leptin there was a drop in OCN levels, too, but without any trauma specificity. After four weeks insulin and OCN content recovered to initial levels in both mouse strains.

Discussion: Trauma specific hormone levels of WT- and leptin-deficient mice show an initial hyperinsulinemic stress reaction in terms of a centrally induced insulin resistance. In consequence, missing insulin signalling in osteoblasts leads to a drop in OCN synthesis and release below a

threshold that causes the disinhibition of fracture healing and accelerated callus formation after combined trauma. In leptin deficiency, despite a more distinct drop in OCN, fracture healing is impaired, which shows the superordinate role of leptin on the interaction of insulin and OCN after trauma.

Conclusion: This study shows the interdependence of insulin, OCN and leptin in the establishment and maintenance of an energy balance. Herein, the skeleton is not in a static storing, but in a dynamic regulating function. In trauma induced acute energy imbalance there are central, endocrine and cellular adaptive responses, which lead to an accelerated fracture healing in combined trauma.

Kapitel 1

Einleitung

1.1 SHT und akzellerierte Frakturheilung

In der Versorgung Schwerverletzter gilt es als bekanntes Phänomen, dass Patienten mit Extremitätenverletzungen und zusätzlichem Kopf- oder Wirbelsäulentrauma eine akzellerierte Knochenheilung häufig auch mit Tendenz zu einer überschießenden heterotopen Ossifikation aufweisen. Etwa die Hälfte diverser Tier- und Humanstudien konnten dies in der Zwischenzeit auch unter standardisierten Bedingungen bestätigen und herausarbeiten, dass spezifische Faktoren in Serum und Liquor der betroffenen mehrfachverletzten Patienten Auslöser dieses Phänomens sein könnten. Die übrigen der zu diesem Thema veröffentlichten Studien blieben inkonklusiv [40, 41, 51].

Als Auslöser dieses osteogenen Effekts wurden dabei in den letzten Jahrzehnten verschiedenste Faktoren genannt und untersucht, darunter Cytokine (wie z. B. IGF-1, Interleukine, TNF- α oder TGF- β), Wachstumsfaktoren (wie z. B. BMPs, VEGF/PDGF/BFGF, M-CSF), regulatorische Proteine wie OPG, RANK und RANKL, mesenchymale Stammzellen, Hormone (wie z.B. Leptin, Glucocorticoide, Calcitonin und CGRP, Prolactin, Wachstumshormone, Androgene und Parathormon), Proteine (wie z.B. Alkalische Phosphatase, Kollagene und C-Reaktives Protein) sowie Elektrolyte wie Calcium und Phosphat [51]. Eine abschließende Erklärung der klinisch nachweislich veränderten Fx-Heilung nach zentralem Trauma konnte dennoch bislang nicht abgegeben werden.

In einem Review-Artikel zu diesem Thema unterscheiden *Hofman et al. 2015* in der aktuellen Literatur zwei mehrheitlich anerkannte Ansätze. In vier von den von ihnen identifizierten sieben Studien, die eine Erklärung des Frakturheilungsphänomens versuchen, liegt der Untersuchungsfokus auf der posttraumatischen Stimulation von mesenchymalen Stammzellen [3, 11, 41, 51, 110]. Die übrigen drei Studien legen ihr Hauptaugenmerk auf die Hormone Leptin und CGRP als mögliche Auslöser einer beschleunigten Knochenheilung [51, 95, 108, 113].

Parallel dazu kam es insbesondere durch Arbeiten aus und um die Arbeitsgruppe um *Gerard Karsenty* ab dem Jahr 2000 zu einer zunehmend detaillierten Beschreibung des Einflusses des Hormons Leptin auf die Knochenstruktur und den Knochenumbau [2, 56]. Die hierbei untersuchten Leptinsignalwege und –Knock-Out (KO)-Modelle erweiterten das allgemeine Verständnis der regulatorischen Funktionen des Sättigungshormons im Sinne einer (neuro-)endokrinen Kontrolle über Auf- und Umbau des Skelettsystems [26, 102].

Schließlich kam es nach der Entdeckung des knochenspezifischen Gewebshormons Osteocalcin (OCN) 1975 in den letzten drei Jahrzehnten erst verzögert zu einer intensiveren Auseinandersetzung mit dessen Freisetzung und Funktionen innerhalb und außerhalb des Skelettsystems [46]. Hierbei geriet zunehmend seine antidiabetische Wirkung durch seinen positiven Einfluss auf die Insulinfreisetzung im Pankreas ins Forschungsinteresse und zeigte erstmals deutlich die systemische endokrine Funktion des Skelettsystems auf [17, 23, 48, 65, 67].

Die erstmalige inhaltliche Verbindung dieser drei neueren Entwicklungen auf den Gebieten der Fx-Heilung und muskuloskeletalen Grundlagenforschung bildet den Grundstein der vorliegenden tierexperimentellen Forschungsarbeit, die es zum Ziel hat, das Phänomen der beschleunigten Fx-Heilung unter Voraussetzung eines parallel eingetretenen SHT auf Grundlage des posttraumatisch je nach Verletzungsmuster spezifisch veränderten Hormonhaushalts zu erklären. Hierbei sollen die beteiligten Hormone Leptin, Insulin und OCN in ihrer Funktion und posttraumatischen Schwankung näher betrachtet und analysiert werden um deren Zusammenspiel im Zusammenhang der akzellerierten Fx-Heilung nach SHT besser zu verstehen.

1.2 Hormone und Interaktionen

1.2.1 Leptin

Leptin - das bereits 1994 durch *Friedman et al.* beschriebene Produkt des ob-Gens, welches entsprechend Anzahl und Energieniveau von Adipozyten des weißen Fettgewebes produziert und sezerniert wird - galt lange Zeit als reines Sättigungshormon und damit als eines der zentralen Regulationshormone des Energiehaushalts [6, 14, 116]. Nach und nach traten jedoch zunehmend weitere Funktionen dieses Hormons wie z. B. sein Einfluss auf den BMI, die Lipo- und Thermogenese, den Insulinhaushalt und die Gonadenfunktion [6, 16, 30, 48] in den Fokus weiterer wissenschaftlicher Betrachtungen.

Mit Rückbezug auf klinische Beobachtungen, nach denen es insbesondere bei Patienten mit postmenopausaler Osteoporose oder Anorexie auf der einen und pathologischem Übergewicht auf der anderen Seite zu deutlichen Veränderungen der Knochenmasse kommt, geriet Leptin schnell als möglicher Mediator auch dieser Phänomene ins Zentrum des osteologischen Forschungsinteresses [2, 26, 100]. Mit Hilfe gezielter genetischer Depletion von Leptin oder

dessen Rezeptor in ob/ob- und db/db-Mausmodellen konnte durch *Ducy et al. 2000* gezeigt werden, dass entsprechende Mausstämme, trotz des sie definierenden Hypogonadismus und Hypercortisolismus, einen Phänotyp mit hoher Knochenmasse (Bone Mass = BM) und um ca. 60-70% erhöhter Knochenbildungsrate (Bone Formation Rate = BFR) aufwiesen [2, 26, 100]. Zudem konnte hier gezeigt werden, dass die hohe BM dieser KO-Mäuse nicht von deren Übergewicht bzw. Hyperinsulinämie, sondern lediglich vom Fehlen des Botenstoffs Leptin abhängt, da entsprechende Tiere bereits vor Erreichen jeden Übergewichts oder damit verbundener erhöhter Plasmainsulinspiegel eine erhöhte Knochenmasse hatten und des Weiteren auch heterozygote Tiere mit normalen Körpergewicht im Vergleich zu WT-Tieren erhöhte Knochenmassewerte zeigten [2, 26]. Weiterhin konnte in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen aus dem Tiermodell auch bei Patienten mit lipodystrophiebedingter Hypoleptinämie eine Neigung zu erhöhter Knochenmasse und beschleunigtem Knochenwachstum bis hin zur Osteosklerose festgestellt werden [2, 24, 29]. Zusätzlich konnten auch Takeda und *Karsenty 2001* einen Zusammenhang zwischen BM und Leptin feststellen, nachdem sie sowohl bei Leptin-KO- als auch bei WT-Mäusen unter kontinuierlicher intracerebroventriculärer (icv) Leptininfusion einen Rückgang der BM feststellten, während auch *Elefteriou et al. 2004* an Serum-Amyloid-P-Component (SAP) - Leptin transgenen Mäusen mit 4fach erhöhter Leptinproduktion und ApoE-Leptin-transgenen Tieren mit 200-300fach erhöhten Serumleptinspiegeln eine Abnahme nicht nur des Körperfettanteils sondern auch der BM zeigen konnten, die durch Injektion eines löslichen Leptinrezeptors normalisiert werden konnte [29, 100]. Eine Korrelation zwischen Serumleptingehalt und BM konnte dabei jedoch nicht festgestellt werden [29].

Durch Rezeptoranalyse und icv Leptininjektion in ob/ob-Tieren konnten *Ducy et al. 2000* weiter herausarbeiten, dass es sich bei o. g. beschriebenen Leptineffekt auf die BM um einen zentralen Wirkmechanismus des Hormons handeln müsse, da von ihnen kein entsprechender peripherer Leptinrezeptor auf Osteoblasten nachgewiesen werden konnte. Die zentrale Zufuhr des Hormons in Leptin-KO-Mäusen führte jedoch zu einer Normalisierung der BM und BFR [2, 26]. Im Widerspruch dazu gelang anderen Forschungsgruppen dennoch der Nachweis von Leptinrezeptoren auf Osteoblasten; und unter Verwendung supraphysiologischer Leptinkonzentrationen konnte mittlerweile auch bei rein systemischer Leptinzufuhr ein peripherer Effekt mit gegenteiliger, ergo BM-stimulierender, Hormonwirkung festgestellt werden [14, 20, 97, 99]. Hierbei konnte eine BM-fördernde Wirkung von Leptin insbesondere durch eine verstärkte Differenzierung von Knochenmarksstammzellen (Bone Marrow Mesenchymal Stem Cell = BMSC) zu Osteoblasten festgestellt werden, während eine BMSC-Differenzierung zu Knochenmarksa-dipozyten in gleichem Maße zurückging [14, 92]. Als weitere mögliche, direkte Leptin-Effekte werden in der Forschungsliteratur zudem die Erhöhung der Osteoblastenproliferation, der Kollagen- und Osteoprotegrinsynthese, der Matrixmineralisierung, des Osteoclastensignalings und der Proosteozytenreifung sowie die Abnahme der Osteoblastenapoptoserate aufgeführt [14, 104]. Die initial von *Ducy et al. 2000* genannten Veränderungen bei Leptin-KO konnten dabei zwar in ähnlicher Weise auf eine Erhöhung der Osteoblastenfunktion, jedoch nicht auf

eine Erhöhung der Osteoblastenzahl oder Unterfunktion der Osteoclasten bzw. geminderte Knochenresorption bei Wegfall des sich negativ auf die BM auswirkenden zentralen Leptineinflusses zurückgeführt werden [26].

Der für seinen Einfluss auf den Knochenumbau zentrale Wirkort des Leptins schien dabei zunächst analog zu dessen Wirkung als Sättigungshormon im Hypothalamus zu liegen. Durch gezielte Läsion von Neuronen des Nucleus arcuatus (ARC) durch Monosodiumglutamat in Versuchsmäusen konnte hier durch *Takeda et al. 2002* ein gesteigerter Appetit mit Entwicklung einer hochgradigen Adipositas und durch exklusive Läsion der ventromedialen Hypothalamuskern (VMH) mittels Goldthioglucose eine Erhöhung von BM und BFR entsprechend derer bei *ob/ob* oder *db/db* Mäusen erzeugt werden [26, 57, 102]. Erstaunlicherweise konnte durch ein gezieltes Leptin-Rezeptor-KO in diesem Bereich jedoch kein gleichartiger Effekt auf die BM oder BFR erzeugt werden, womit ein direkter Effekt des Leptins auf Neurone des VMH ausgeschlossen werden konnte [76, 109]. Bei weiteren Untersuchungen insbesondere durch *Yadav et al. 2009* konnte zur Klärung dieses Widerspruchs gezeigt werden, dass Leptin seine zentralen Effekte an den VMH nicht direkt, sondern mit Hilfe eines Umwegs über die Regulation des zentralen Serotoninsignalings im VMH ausübt. Hierzu bindet Leptin an Rezeptoren auf Neuronen im Bereich der dorsalen und medialen Raphekerne des Hirnstamms, um hier die Umwandlung von Tryptophan zum Neurotransmitter Serotonin durch das Enzym Tryptophanhydroxylase 2 zu blockieren [109]. Damit wird die Serotoninausschüttung der in die VMH projizierenden Raphekerne gedrosselt und deren Hemmung der VMH-Neurone aufgehoben, sodass die VMH bei Leptinerhöhung im Hirnstamm durch eine Hemmung der Hemmung schließlich selbst enthemmt wird (siehe dazu **Abbildung 1.1**) [59, 74, 76, 109].

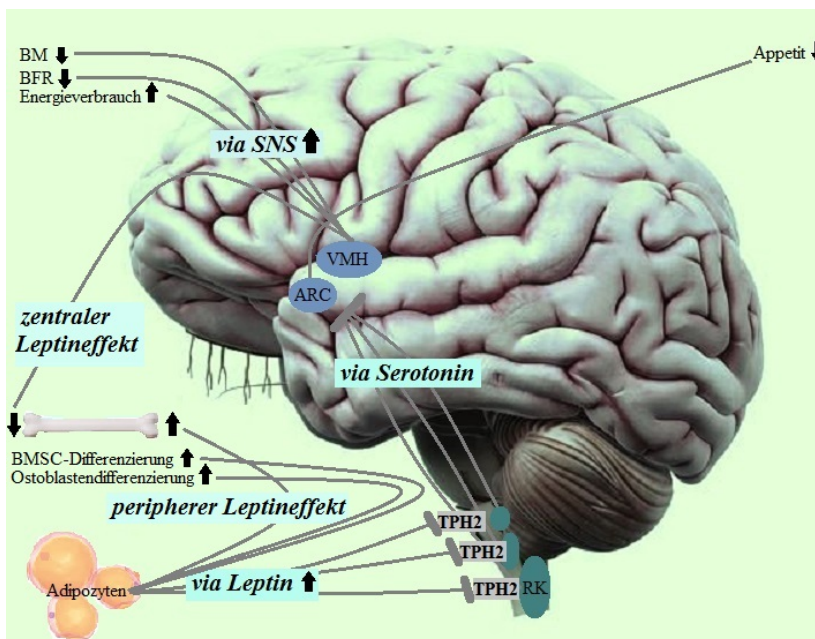


ABBILDUNG 1.1: Peripherer und zentraler Leptineffekt: Der periphere Leptineffekt führt über eine Erhöhung der Osteoblastendifferenzierung sowie einem Shift der BMSC-Differenzierung zugunsten der Osteogenese zu einer Erhöhung der BM und BFR. Zentral bewirkt Leptin über eine Hemmung der serotonergen Raphekerne eine Enthemmung des ARC und des VMH mit folgender Reduktion des Appetits sowie eine erhöhte Aktivität des SNS, welche wiederum über ihre Wirkung auf Osteoblasten und -clasten zu einer verminderten BM und BFR führt.

Eine Enthemmung der VMH führt im Folgenden ihrerseits zu einem Anstieg des Sympathikotonus und einem Abfall der Parasympathikusaktivität, sodass es insgesamt zu einer systemischen Aktivierung von α - und β -Rezeptoren mit Abnahme der Insulinsekretion, einem Anstieg des Energieverbrauchs und zur Hochregulation der Körpertemperatur kommt [6, 70]. *Takeda und Karsenty 2002* konnten hierzu unmyelinisierte Axone sympathischer Nervenfasern im Knochenmark sowie β 2-Rezeptoren auf der Zelloberfläche von Osteoblasten nachweisen [100]. In Parabioseexperimenten konnten sie zudem zeigen, dass nur die icv leptininjizierte, jedoch nicht die kontralaterale Maus mit einer Reduktion der BM und BFR reagierte, was die Theorie der neuronalen Transmission des zentralen Leptineffekts weiter erhärtete [100]. In Tierexperimenten mit Gabe des β -Agonisten Isoprenolol konnte zur weiteren Klärung der Rolle des sympathischen Nervensystems im Mausmodell, unabhängig von BMI und Blutinsulinspiegel, eine Abnahme der Expression des Osteoblasten-Transkriptionsfaktors Cbfa1 sowie des α 1(I)-Kollagen nachgewiesen werden, während die Gabe des β -Blockers Propranolol zu einer Erhöhung der BM führte [102].

Intrazellulär kommt es in Osteoblasten nach Aktivierung des entsprechenden β 2-Rezeptors zu einer Aktivierung von ATF4 und darüber zu einer erhöhten Expression von RANKL, einem essentiellen Stimulationsfaktor der Osteoclastogenese. Desweiteren führt das β 2-Signaling hier CREB-induziert zu einer Aktivierung von Clock Genes, die ihrerseits die Aktivierung von c-myc und damit die Expression proliferationsfördernder Zellzyklusgene wie z.B. Cyclin D hemmen [28, 36, 101]. Zusätzlich wird dabei durch o. g. CREB-Aktivierung die Aktivität der alkalischen Phosphatase 1 (AP-1) und damit von c-myc erhöht, während die aktivierten Clock Genes parallel dazu AP-1-hemmend wirken (siehe dazu **Abbildung 1.2**) [28, 36, 101]. *Pierroz et al. 2004* postulierten überdies einen regulierenden Effekt des β 1-Rezeptors auf Osteoblasten, da es nach kombiniertem KO beider Sympathikusrezeptoren, im Gegensatz zur reinen β 2-Depletion, zu einer Abnahme der BM kam [84]. Bei zusätzlichem KO von β 3 konnten *Dhillon et al. 2004* wiederum eine erhöhte BM verzeichnen [22].

Schließlich kommt es, wie in **Abbildung 1.2** gezeigt, durch Aktivierung der β 2-Rezeptoren an Osteoblasten zur verstärkten Expression des Embryonic-Stem-Cell-Phosphatase-Gens (ESP-Gens) und dadurch zur Erhöhung der Osteoblast-Testicular-Tyrosinphosphatase-Aktivität (OST-PTP-Aktivität) im Mausmodell [32, 33, 39, 48, 58, 59, 67].

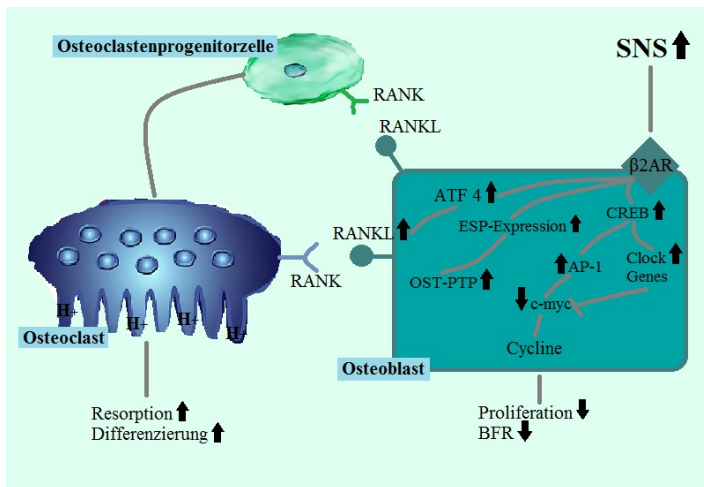


ABBILDUNG 1.2: SNS-Signaling im Osteoblasten in Anlehnung an *Takeda und Karsenty 2008* [101]: Über die Aktivierung des β 2A-Rezeptors bewirkt das SNS im Osteoblasten über die Hochregulation von CREB und ein Zusammenspiel von Clock-Genes und Cyclinen eine Senkung der Proliferationsrate und BFR. Zusätzlich kommt es über die β 2A-Aktivierung zu einer vermehrten ESP-Expression mit folgender OST-PTP-Hochregulation sowie einer erhöhten ATF4-Aktivierung mit folgender RANK/RANKL-induzierter Differenzierung von Osteoclasten und einer resultierenden Knochenresorption.

1.2.2 Insulin

Nach seiner bedarfsabhängigen Produktion und Sekretion durch die β -Zellen des Pankreas wirkt das Wachstumshormon Insulin am Knochen hauptsächlich über die Bindung an seinen spezifischen Rezeptor auf Osteoblasten. Hier führt es über den Einbau von GLUT4-Transportern zu einer verstärkten Glukoseaufnahme sowie, über eine Aktivierung des Akt/ERK-Signalwegs, zu einer Steigerung der Osteoblastenproliferation und Kollagensynthese. Ferner kommt es hierdurch zu einer Down-Regulation des RANK-Liganden und damit zu einer insgesamt anabolen Stoffwechselsituation [8, 37, 39, 53, 75, 94, 115]. Des Weiteren stimuliert Insulin die Synthese der alkalischen Phosphatase in Osteoclasten sowie die Proliferation von Chondrozyten, was das Bone Remodeling zusätzlich unterhält [33, 85]. Seine mitogene Wirkung übt Insulin dabei laut *Pramojane et al. 2014* über eine Aktivierung des MAP-Kinase-Wegs aus, während es seine metabolische Komponente über diverse Signalwege, wie z.B. die Aktivierung von RUNX2 und Osterix via PI3K/Akt ausübt [38, 39, 85, 94]. Eine insulinabhängige Hochregulation von Foxo-1, BAD, GK-3 und der Caspaseaktivität führt zudem zu verbesserter Zellreifung und vermehrtem Zellüberleben [68, 85]. Dementsprechend zeigten verschiedene Insulinrezeptor-KO-Modelle dabei folgende, ebenfalls von *Pramojane et al. 2014* entsprechend der **Tabelle 1.1** zusammengetragene Effekte auf die Knochensubstanz.

TABELLE 1.1: Metabolische und skeletale Phänotypen je nach Insulinrezeptor-KO in Anlehnung an Pramojanee et al. 2014 [85]

Inaktivierte Insulin-Rezeptor-Komponente	Metabolischer Phänotyp	Skeletaler Phänotyp
Insulin-Rezeptor (Ob-ΔIR) Mäuse	Insulinresistenz erhöhter BZ Adipositas	Osteopenie normale Osteogenese
Insulin-Rezeptor (InsRosb - / -) Mäuse	erhöhter BZ erniedrigter Insulinspiegel	Osteopenie
Insulin-Rezeptor (IRKO-L1) Mäuse	Euglycämie	normale BMD normale Osteogenese reduzierte Knochenmarksverfettung
IRS 1 (- / -) Mäuse	Hyperinsulinämie Insulinresistenz	low turnover Osteopenie eingeschränkte/verzögerte Osteogenese reduzierte Kallusbildung
IRS 2	N / A	Osteopenie reduzierter Knochenaufbau gesteigerte Knochenresorption normale Osteogenese

Fulzele et al. 2010 berichten zudem bei fehlender Insulinwirkung durch osteoblastären Insulinrezeptor-KO im Mausmodell von einem geschädigten postnatalen trabekulären Knochenaufbau mit einem Defizit von mehr als 47%. Diesem liege, laut *Fulzele et al. 2010*, eine verminderte Osteoblastenanzahl zu Grunde, die mit einem Verlust der BFR von etwa 30% einhergehe. Die Anzahl der Osteoclasten sei dabei zwar nicht verändert, ihre Aktivität jedoch eingeschränkt, was in einem Abfall der bei Knochenabbau entstehenden Crosslinks deutlich würde [39]. Zusätzlich beschreiben sie bei Insulinrezeptor-KO in Osteoblasten eine Zunahme der Körperfettmasse von 40%, die mit einer peripheren Insulinresistenz, einer Verminderung der β -Zell-Fläche und Insulin-Expression sowie einer Zunahme der Gluconeogenese einhergehe [39].

Diese systemischen Phänomene zeigen nicht nur welche enorme Bedeutung Insulin für das muskuloskeletale System hat, sondern im Umkehrschluss auch, welche zentrale Bedeutung gerade das muskuloskeletale System für die Glucosehomöostase zu haben scheint. Sowohl *Wei et al. 2014* als auch *Abdallah et al. 2015* bezeichnen in ihren systemisch angelegten Physiologien den Knochen daher nicht umsonst als zentralen Ort der Entstehung des unphysiologischen Zustands der Insulinresistenz [1, 106]. Wichtig ist dabei bei der ossären Regulation des Glucose- und Insulinhaushalts insbesondere ein insulininduzierter Feed-Forward-Loop, der bereits von *Lee et al. 2008* und *Ferron et al. 2010* detailliert beschrieben wurde. Hierbei kommt es durch das Insulin-Signaling an Osteoblasten zu einer Down-Regulation von Osteoprotegerin, einem Protein welches normalerweise die Interaktion von RANK und seinem Liganden durch kompetitive Bindung verhindert und damit die davon abhängige Osteoclastenreifung begrenzt [33, 66]. Eine erhöhte Interaktion von RANK und RANK-Ligand unter Insulineinfluss führt dementsprechend über eine Erhöhung der Osteoclastenanzahl zu einer vermehrten Knochenresorption und darüber zur verstärkten Freisetzung von bioaktivem OCN. Dieses knochenspezifische Gewebshormon führt, wie im nächsten Abschnitt genauer erläutert werden soll, seinerseits durch Bindung an Rezeptoren im Pankreas zu einer verstärkten Insulin-Freisetzung und darüber, wie

in **Abbildung 1.3** zusammengefasst, in Feed-Forward-Manier zu einer insgesamt verbesserten Glucosetoleranz [1, 4, 33, 39, 66, 67, 106].

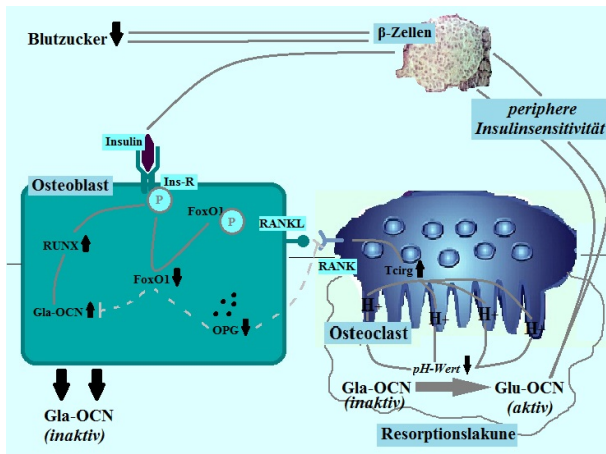


ABBILDUNG 1.3: Der Insulin-OCN-Loop in Anlehnung an Ferron *et al.* 2010 [33]: Über Insulinrezeptoraktivierung kommt es im Osteoblasten zu dessen Phosphorylierung, die zu einer Phosphorylierung von FoxO-1 und dessen Inaktivierung führt. Gleichzeitig kommt es zur Aktivierung von RUNX. Beides gemeinsam bewirkt eine verstärkte Gla-OCN-Expression und reduzierte OPG-Produktion, welche über eine Erhöhung des Gla-OCN-Anteils in der Knochenmatrix sowie eine erhöhte Osteoclastendifferenzierung und -aktivierung zu einer verstärkten Gla-OCN-Freisetzung aus Resorptionslakunen und damit zu einer vergrößerten peripheren Insulinsensitivität sowie Aktivierung der β -Zellen und damit zur BZ-Senkung führt.

Unterstützt werden kann diese Theorie einer insulininduzierten ossären Glucoseregulation zusätzlich durch Experimente von Lacombe, Karsenty und Ferron 2013 sowie Wei *et al.* 2014, die in osteoprotegerin-defizienten Mäusen bzw. Tieren mit Osteoclasteninhibition zum einen eine Vergrößerung der Osteoclastenoberfläche, der bioaktiven OCN-Konzentration und der Glucosetoleranz bzw. im zweiten Fall umgekehrt eine drastische Abnahme dieser Parameter zeigen konnten [64, 106]. In einem Mausmodell mit 1,5-fach erhöhtem Insulinrezeptorbesatz in Osteoblasten konnten Wei *et al.* 2014 zudem eine deutliche Reduktion negativer Auswirkungen einer hochkalorischen Ernährung auf die Entwicklung einer Glucoseintoleranz zeigen [106].

Auf Rezeptorebene wird dieser Insulin-Effekt über die Phosphorylierung des ESP-Gen-Produkts OST-PTP reguliert, welches zusätzlich, wie bereits oben beschrieben, via den Sympathikotonus durch das Hormon Leptin in seiner Expression moduliert werden kann [4, 8, 23, 33, 66, 66] (siehe dazu **Abbildung 1.4**). Darüber hinaus reguliert Insulin auf Expressionsebene über die Stimulation der OCN-Promotorregion sowie die Hochregulation von RUNX2 zusätzlich direkt die OCN-Produktion [8, 23, 39].

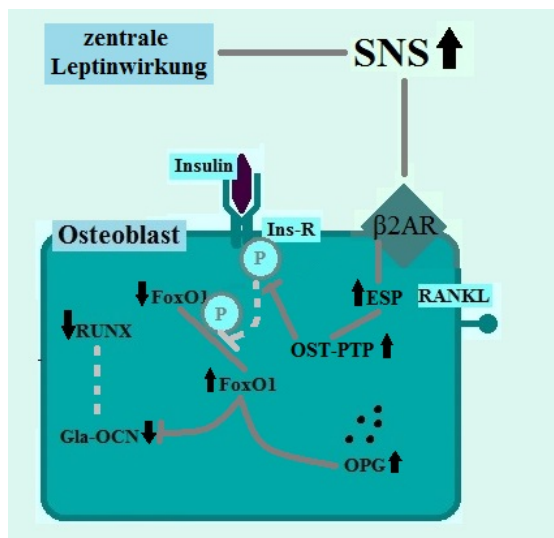


ABBILDUNG 1.4: Die Leptin-induzierte Regulation des Insulinsignalings durch OST-PTP in Anlehnung an Ferron *et al.* 2010 und Fulzele *et al.* 2010 [33, 39]: Durch die zentrale Up-Regulation des SNS-Signalings kommt es über eine Aktivierung des β 2A-Rezeptors in Osteoblasten zu einer Vermehrten Expression des ESP-Genes und Produktion von OST-PTP. Diese vermindert ihrerseits die Phosphorylierung des Insulinrezeptors und dessen downstream Phosphorylierung von FoxO-1, sodass dieses weiter aktiv sein und die Produktion von OPG steigern kann. Zusätzlich kommt es über eine fehlende Stimulation von RUNX durch eine fehlende Insulinrezeptor-Phosphorylierung zu einer verminderten Gla-OCN-Produktion, die zusätzlich durch das nun aktive FoxO-1 gehemmt wird.

Entsprechend konnten Ferron *et al.* 2010/2014 an osteoblastären Insulinrezeptor-KO-Mäusen einen geminderten Knochenumbau mit reduzierten Serumspiegeln bioaktiven OCN nachweisen, der mit einer gestörten Glukosetoleranz, reduzierter Insulinsekretion und peripherer Insulinresistenz einherging [32, 33]. Die Forschungsgruppe um Gerard Karsenty konnte weiterhin an transgenen Mäusen mit erhöhtem osteoblastären Insulinrezeptorbesatz, INS-R transgen, und an heterogenen insulinrezeptor-defizienten Tieren, INS-R +/-, zeigen, dass diese entsprechend ihrer Insulinsensibilität an Osteoblasten bei hochkalorischer Ernährung im Vergleich zu WT-Tieren eine verminderte (INS-R transgen) bzw. verstärkte (INS-R +/-) periphere Insulinresistenz aufwiesen [4, 106]. Durch den KO von OST-PTP konnte zusätzlich in weiteren Mausmodellen eine 50% Steigerung der Osteoclastenfunktion im Sinne einer 50% Vergrößerung ihrer Resorptionslakunen festgestellt werden, die auf einen gleichzeitigen Abfall des Osteoprotegrins zurückgeführt werden kann [33, 39]. Wie erneut Wei *et al.* 2014 zeigen konnten, führt eine Reduktion der Osteoclastenfunktion/OCN-Freisetzung, im Gegensatz dazu, zu einer verminderten peripheren Insulinsensitivität mit Erhöhung der Serumkonzentration freier gesättigter Fettsäuren. Diese führen ihrerseits durch die Aktivierung von Smurf1 zur einer gesteigerten Ubiquitierung und Degradation von Insulinrezeptoren in Osteoblasten und stören hierdurch nachhaltig den oben beschriebenen Insulin-Fast-Forward-Loop und darüber den gesamten systemischen Glucosehaushalt [106].

1.2.3 Osteocalcin

Das von ausgereiften Osteoblasten und Osteozyten produzierte OCN ist das verbreitetste nicht-kollagenöse Protein des Knochenkompartiments^{9,60}. Als knochenspezifisches Gewebshormon wurde es zuerst von Hauschka *et al.* 1975 und Price *et al.* 1976 beschrieben und zunächst als Knochenmatrixprotein angesehen, welches der Regulation von Größe und Form des Knochenminerals Hydroxylapatit diene und damit als Marker des Knochenaufbaus benutzt

werden könne [5, 25, 46, 86]. *Ducy et al. 1996* stellten im murinen OCN-KO-Modell jedoch einen großenteils unveränderten bzw. sogar verbesserten ossären Phänotyp mit erhöhter BFR und Knochenmasse, vermehrter Kristallbildung und erhöhtem Mineral/Matrix-Quotienten, erhöhter Kortikalisdicke und -dichte, vergrößertem Trabekelvolumen und daraus resultierender größerer biomechanischer Belastbarkeit fest [25]. Die sich aus dem Fehlen von OCN ergebenden negativen Änderungen in der Mineralkomposition des kortikalen Knochens fielen dabei nach *Ducy et al. 1996* eher gering aus. Hierbei erschien bei Fehlen von OCN, welches auch Knochen-Gla-Protein genannt wird, im Unterschied zum WT-Knochen lediglich das Kristallgitter des Hydroxylapatits unausgereift und seine Ausrichtung in Bezug auf das umgebende Kollagen gemindert zu sein [25, 72]. Auffällig war bei OCN-KO hier zudem ein erhöhter Anteil Osteoclasten bei gleichbleibender Anzahl von Osteoblasten im Vergleich zu WT-Tieren [25].

In seiner γ -carboxylierten Form, dem Gla-OCN, zeigt das Knochenhormon OCN eine hohe Calcium-Bindungskraft, wobei die Calcium-Bindung ihrerseits über eine Konfirmationsänderung seiner Proteinstruktur eine stabile Interaktion von OCN mit Hydroxylapatit ermöglicht und so dessen Nukleation, Form und Kollagen-I-Bindung zu beeinflussen und darüber einen matrixstabilisierenden Effekt hervorzurufen scheint [5, 13, 118]. Ein KO von OCN führte dementsprechend in jüngeren elektronenmikroskopischen Untersuchungen zur Ausbildung nur unreifer Hydroxylapatitkristalle mit erhöhter Brüchigkeit sowie deren Verlust an Carboxyl- und Phosphatgruppen [8, 72].

Über seine an den Positionen 17, 21 und 24 carboxylierte Form hinaus liegt OCN im Serum jedoch teilweise auch in einer unter- oder sogar einer uncarboxylierten Form, als Glu-OCN vor, welches seine Calcium-Bindungskraft eingebüßt hat⁷⁶. Die physiologische Aufgabe beider Formen blieb dabei lange ungeklärt, bis schließlich vor ca. 10 Jahren ihr essentieller Einfluss auf den Glucosestoffwechsel entdeckt wurde⁵. In Experimenten von *Lee et al. 2007* und *Ferron et al. 2008* konnte dabei festgestellt werden, dass gerade das unter- und uncarboxylierte Glu-OCN als dessen systemisch bioaktive Form fungiert und über den G-Protein-gekoppelten Rezeptor 6a (GPRC6a) auf den β -Zellen des Pankreas zu einer durch CREB-Phosphorylierung vermittelten Steigerung der Insulinproduktion und -sekretion bei vergrößerter β -Zell-Proliferation sowie über dessen Bindung an Leber, Muskel und Knochen zu einer gesteigerten peripheren Insulinsensitivität, Adiponectinexpression und Glucoseaufnahme sowie Energieverbrauch führt [1, 5, 23, 35, 33, 48, 48, 67, 82, 83, 91]. Hierbei scheint insbesondere die Vermittlung des OCN-Effekts via Clock Genes wie CdK4 und Cyclin D1 und D2 von besonderer Bedeutung zu sein [23, 35, 48, 67, 94]. Ein gezielter KO von GPRC6a konnte dabei ebenso eine Störung des Hormon- und Glucosehaushalts hervorrufen, wie ein entsprechender KO von OCN selbst [32, 76, 76, 81, 83, 106, 118]. Die genauen Funktionen des Glu-OCN-Proteins wurden dabei von *Ferron und Lacombe 2014* wie in **Abbildung 1.5** dargestellt zusammengefasst.

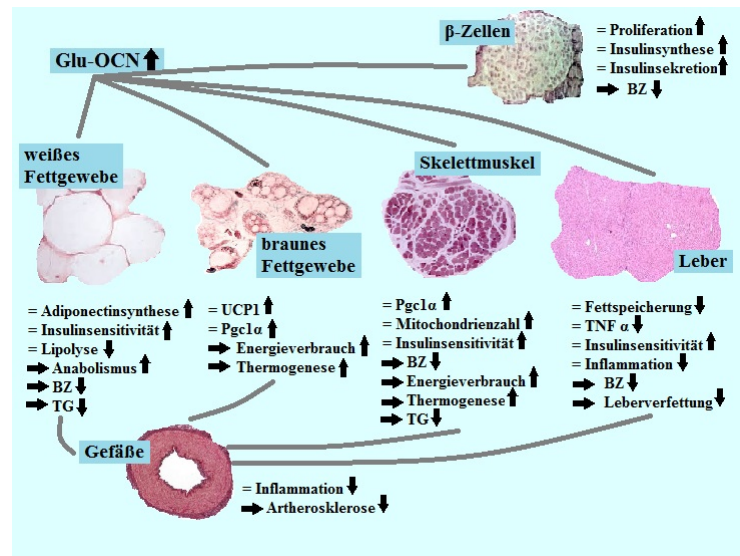


ABBILDUNG 1.5: Die Wirkung von biologisch aktivem OCN an Fettgewebe, Skelettmuskel, Leber, Gefäßen und β -Zellen in Anlehnung an Ferron und Lacombe 2014 [32]: In weißem Fettgewebe und Skelettmuskel führt Glu-OCN zu einer Stimulation der Adiponectinsynthese, einer Erhöhung der Insulinsensitivität sowie einer Hemmung der Lipolyse und Stimulation der Mitochondriensynthese und zur Senkung des BZ sowie der Triglyceride (TG). In braunem Fettgewebe und Skelettmuskel bewirkt es zusätzlich über die Aktivierung von UCP1 und $Pgc1\alpha$ eine Steigerung des Energieverbrauchs sowie der Thermogenese. In Leber und Pankreas führt Glu-OCN über eine Stimulation der β -Zell-Proliferation und Insulinsynthese sowie Steigerung der Insulinsensitivität und Hemmung der Fettspeicherung erneut zu einer BZ-Reduktion sowie zu einer Hemmung der Steatose und Inflammation. Zusammen bewirken die Glu-OCN-induzierten Veränderungen an den genannten Geweben eine Abnahme des systemischen BZ- und TG-Spiegel sowie der Inflammation und wirken damit gefäßschützend im Sinne einer dadurch reduzierten Artherosklerose.

Das Fehlen von OCN durch KO führt dementsprechend zu einer erhöhten Körperfettmasse, einer vergrößerten Anzahl von Adipozyten und erneut zu einem Anstieg der Serumtriglyceride und spiegelt damit erstaunlicherweise den ebenfalls von Lee et al. 2007 und Ferron et al. 2008 untersuchten metabolischen Phänotyp von ESP-KO-Mäusen wider [35, 32, 67].

Der Anteil des unter-/uncarboxylierten OCN korreliert dabei mit dem Gesamtserumosteocalcinwert, der durchschnittlich zwischen 100-1000ng/ml liegt [5, 32]. Dabei wird der Prozentsatz des γ -carboxylierten Hormons im Mausknöchel mit 67-93% und im Mausserum mit bis zu 50% angegeben, womit uncarboxyliertes OCN im murinen Tiermodell signifikante Konzentrationen erreicht [5, 72]. Im Gegensatz dazu ist der Anteil unter-/uncarboxylierten OCN im humanen Serum vermutlich deutlich geringer, was hier ebenfalls seinen potentiellen Effekt auf den Insulin- und Glucosehaushalt schmälern könnte [5, 4].

Der genaue Freisetzungsmechanismus des unter-/uncarboxylierten, bioaktiven OCN aus der Knochenmatrix geschieht dabei wie von *Lee et al. 2007*, *Ferron et al. 2008* und später *Ducy 2011* beschrieben im Zuge des osteoclastenabhängigen Knochenumbaus [23, 35, 67]. Während die Vitamin-K-abhängige γ -Carboxylierung durch relativ hohe pH-Werte unterstützt wird und bereits bei Calciumkonzentrationen von 1mM zur vollständigen Faltung der Glu-Form des OCN führt, liegt bei einem saurem pH von ca. 4,5 vermehrt die unter-/uncarboxylierte Gla-Form des Hormons vor, die erst bei Calciumkonzentrationen von 5mM zur vollständigen Proteinfaltung gelangt [23, 32]. Die hierfür notwendige saure Umgebung wird im Knochenkompartiment unter physiologischen Bedingungen dabei allein in den osteoclastären Resorptionslakunen erreicht, die damit essentiell zur systemischen OCN-Freisetzung und weiter zur Aufrechterhaltung der gesamten Glucosehomöostase beitragen.

Experimentell konnten hier erneut *Lee et al. 2007* und *Ferron et al. 2008* weiter feststellen, dass im OCN- und ESP-KO-Mausmodell entgegengesetzte Effekte erzielt werden können [35, 67]. Während es bei Verlust der OCN-Funktion zu einem Anstieg der Serumglucose sowie des Körperfettanteils, einem Abfall des Seruminsulins, der β -Zell-Oberfläche und -Anzahl sowie der peripheren Insulinsensitivität und des Energieverbrauchs kommt, kann bei ESP-KO-Tieren ein sogenannter „gain of function“ Effekt mit erhöhten OCN-Serumspiegeln, erhöhter Insulinsekretion und –sensitivität, erhöhter β -Zell-Fläche/-Anzahl, gesteigerter Glucosetoleranz und erhöhtem Energieverbrauch verzeichnet werden [23, 35, 67]. Ähnliche Effekte konnten bei WT-Mäusen zudem durch tägliche OCN-Injektion von 3 bzw. 30ng/gKG/Tag erzeugt werden [34].

Das ESP-Gen verschlüsselt hierbei, wie in **Abbildung 1.6** unten dargestellt, im Mausmodell die OST-PTP, welche durch Foxo-1- und ATF4-Bindung an dessen Promotorregion moduliert exprimiert wird und durch Dephosphorylierung die Aktivität des Insulinrezeptors senken kann [28, 32, 33, 47, 72, 73, 75, 87]. Durch die Senkung des Insulinrezeptorsignalings kommt es über eine Erhöhung der Ostoprotegrin-Konzentration und einer daraus resultierenden RANK-Ligand-Bindung zu einer Unterdrückung der Osteoclastenreifung und einer folgenden Absenkung des Knochenumbaus. Diese resultiert schließlich ihrerseits in einer verminderten Freisetzung bioaktiven OCN und dem Ausbleiben des ebenfalls in Abschnitt 1.2.2 beschriebenen Insulin-Feed-Forward-Loops [23, 35, 33, 64, 67, 72, 88, 106]. Im Menschen codiert das Esp-Gen anders als in der Maus nicht für die OST-PTP, sondern für die Protein-Tyrosin-Phosphatase 1B (PTP1B), die, wie experimentell durch *Ferron et al. 2010* gezeigt, ebenfalls eine Dephosphorylierung des osteoclastären Insulinrezeptors und die damit verbundene o. g. osteoprotegrinvermittelte Osteoclastenhemmung erzeugen kann [33].

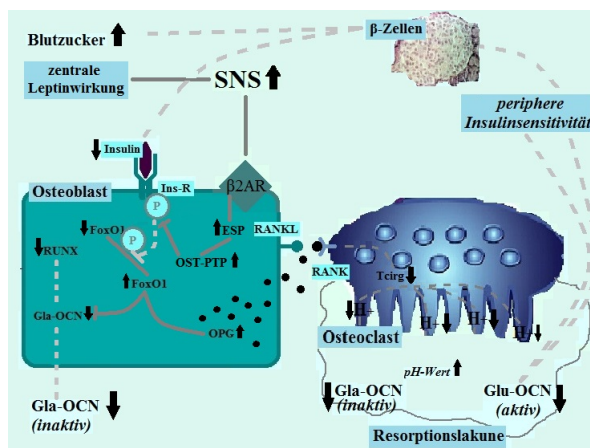


ABBILDUNG 1.6: Die leptininduzierte und OST-PTP-vermittelte Downregulation der Gla-OCN-Produktion und -Freisetzung in Anlehnung an Lee *et al.* 2007 und Ferron *et al.* 2008 [35, 67]: Durch leptininduzierte Up-Regulation der OPG-Synthese und -Freisetzung kommt es zu einer Besetzung der RANK-Bindungsstellen und einer verminderten RANK-RANKL-Interaktion mit erniedrigter Osteoclastendifferenzierung und -aktivierung sowie Wasserstoffionenfreisetzung in die Resorptionslakunen. Damit kommt es zu einer geringeren Erzeugung und Freisetzung von Glu-OCN und damit zu einer Abnahme der peripheren Insulinsensitivität und β -Zell-Aktivität sowie darüber zu einem BZ-Anstieg.

Trotz eines bei erhöhter OCN-Konzentration ebenfalls erhöhten Serumadiponectingehalts konnte in o. g. Experimenten keine direkte Beziehung beider Hormone festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass OCN seine die Insulinsekretion stimulierende und peripher sensibilisierende Wirkung zumindest teilweise unabhängig von Adiponectin ausübt [1, 66, 67]. Weiterhin konnte in neueren Untersuchungen am Menschen ein Erniedrigung des Serum-OCN-Gehalts mit dem Auftreten des metabolischen Syndroms, einem erhöhten BMI und Taillenumfang sowie Bluthochdruck und erhöhten Nüchternblutzuckerwerten in Verbindung gebracht werden, wobei die Bedeutung des notwendigen Carboxylierungsstatus des Matrix-Gla-Proteins hier bisher nur widersprüchlich diskutiert werden konnte [91, 4, 112, 118]. Auch seine Bedeutung für die Entstehung eines Diabetes mellitus oder in Bezug auf ein evtl. vorliegendes erhöhtes Fx-Risiko konnte bislang nicht abschließend geklärt werden [4]. Seine stark glucocorticoidsensitive Expression könnte dabei, laut entsprechender Studien, dessen bekannt negativen Effekt auf den Zucker- und Knochenstoffwechsel jedoch zusätzlich verstärken [9, 19].

Neueste breiter angelegte Untersuchungen der systemischen OCN-Funktion deuten zudem auf dessen positiven Einfluss auf die Reaktion von β -Zellen nach oxydativem Stress hin. So führe OCN bspw. über eine Erhöhung der Anzahl und Fläche von Mitochondrien in den β -Zellen des Pankreas sowie eine geringere Expression und Phosphorylierung von ER-Stress-Proteinen zum Schutz der insulinproduzierenden Zellen unter den Bedingungen einer hyperglykämie-induzierter Azidose [47, 63, 117, 118]. In den ansonsten nur mit wenigen Schutz- und Reparaturmechanismen ausgestatteten Pankreaszellen konnte unter diesen Bedingungen folglich nach OCN-Injektion eine Senkung des H_2O_2 -Spiegels und der Caspase-3a-Aktivität festgestellt werden, die zusätzlich einen wichtigen Beitrag zur OCN-abhängigen Verbesserung der Glucosehomöostase leisten könnte [63].

1.2.4 Hormon- und Energiehomöostase

In Zusammenschau lässt sich aus den oben erläuterten gegenseitigen komplexen Regulationsmechanismen zwischen dem Sättigungshormon Leptin, dem metabolisch wirksamen Insulin und dem peripheren Modulator OCN versuchsweise ein Regelkreis wie in **Abbildung 1.7** aufstellen, dessen Zweck es zu sein scheint, holistisch Energiespeicher, -angebot und -verwertung in Einklang zu bringen und damit einen Beitrag zur Energiehomöostase bei wechselndem Glucoseangebot zu leisten. Dabei steht die blutzuckergesteuerte Insulinausschüttung und der von ihr induzierte Feed-Forward-Loop durch OCN unter der modulierenden Kontrolle des übergeordneten, mit dem Energiespeicher- und ZNS-rückgekoppelten Hormons Leptin. Ein Zusammenspiel aller dieser Hormone erlaubt dabei so neben der kurzfristigen metabolischen Reaktion auf Nahrungsaufnahme oder -karenz eine langfristige Energieregulation bei hoch flexibler Energiezufuhr.

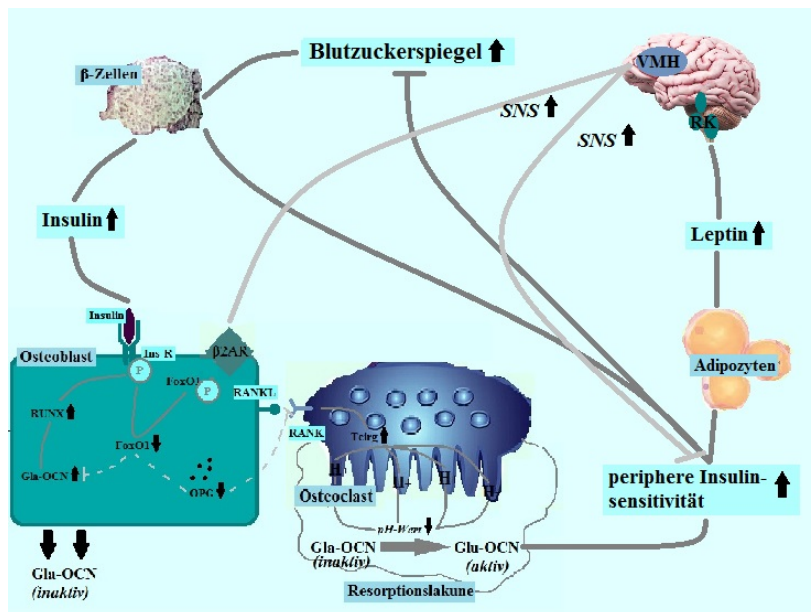


ABBILDUNG 1.7: Regulationen im Rahmen der insulin- und leptinkontrollierten Energiehomöostase: Bei erhöhtem BZ kommt es in den β -Zellen des Pankreas zur Insulinsynthese und -Freisetzung, mit anschließender Gla-OCN-Produktion in Osteoblasten und Glu-OCN-Freisetzung durch aktivierte Osteoclasten. Das bioaktive Glu-OCN führt zur weiteren Insulinfreisetzung, einer gesteigerten Insulinsensitivität und somit zu einem Absinken des BZ. Getriggert durch die erhöhte Insulinsensitivität steigern parallel Adipozyten des weißen Fettgewebes ihre Leptinsynthese und -Freisetzung. Leptin bewirkt über seinen zentralen Wirkmechanismus eine regulierende Aktivierung des SNS, welches einerseits die Gla-OCN-Produktion im Osteoblasten und die Aktivierung von Glu-OCN-freisetzenden Osteoclasten hemmt und damit die periphere Insulinsensitivität drosselt.

Das höhere evolutionsbiologische Ziel eines solch komplex angelegten kurz-, mittel- und langfristig angelegten Regulationsmechanismus stellt dabei ein möglichst konstantes mittleres Energieniveau dar, welches auf positive wie negative äußerliche Einflüsse rasch und flexibel zu reagieren in der Lage ist. Eine fälschlicherweise langfristig erhöhte positive wie negative Energiebilanz stellt dabei ein evolutionsbiologisches Hindernis dar, das sowohl das Fortbestehen des Einzelindividuums als auch der Art gefährdet und somit langfristig über Hormonregelkreise verhindert werden muss.

Dass hierbei das nicht nur als Stütz- und Bewegungsgerüst notwendige Skelettsystem einen entscheidenden Beitrag leisten muss, ist nicht verwunderlich. In ständiger Anpassung an Körpermaße und -aktivität dient es gleichermaßen als Sensor, Speicher und Effektor im Spiel zwischen Energieangebot und -verbrauch, weshalb es, wie bereits *Karsenty und Oury 2012* feststellten, nur logisch erscheint, dass das Sättigungshormon Leptin zuerst bei Vertebraten nachzuweisen ist und das oösäre Gewebshormon OCN seinen Anteil zu der insulinabhängigen Einstellung des Blutzuckers und der peripheren Glucoseaufnahme beiträgt [31, 59].

In diesem größeren Zusammenhang ist auch die hier vorliegende Forschungsfrage zu sehen, die die Hormonreaktion am Phänomen der Knochenheilung, mit und ohne zusätzliche Störung der neuronalen Steuerung und des Einflusses von Leptin im Sinne einer kurzfristigen posttraumatischen Störung der erwünschten Homöostase, zu beleuchten unternimmt.

Dabei sollen insbesondere die folgenden Fragen beantwortet werden:

1. *Inwieweit kommt es im Mausmodell posttraumatisch zu Veränderungen der Insulin- und OCN-Plasmaspiegel?*
2. *Wie genau sehen diese Veränderungen aus?*
3. *Welchen Einfluss hat die Art des jeweils vorangegangenen Traumas auf das Auftreten oder die Ausprägung dieser Veränderungen im Hormonhaushalt?*
4. *Ab wann kommt es zu einer Normalisierung der posttraumatischen Insulin- und OCN-Plasmaspiegel auf das Kontroll- bzw. Ausgangsniveau?*
5. *Wie ändert sich der posttraumatische Insulin- und OCN-Haushalt bei zusätzlicher Leptin-Defizienz?*
6. *Welchen Einfluss hat ein zusätzliches SHT auf die Veränderungen mit und ohne Leptin-Defizienz auf die posttraumatischen Plasmaspiegel von Insulin- und Osteocalcin?*
7. *Welche Erklärungsansätze für die am Mausmodell aufgezeigten posttraumatischen Hormonveränderungen bietet die aktuelle Forschungsliteratur?*

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Studiendesign und -ablauf

Die Genehmigung zur Durchführung der vorliegenden Tierversuchsstudie (Tierversuchsantragsnummer G0009/12) erfolgte durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin. Für die Untersuchung wurde prospektiv in einer Poweranalyse eine statistisch notwendige Studienpopulation von 120 Tieren pro Tierstamm festgelegt, welche entsprechend des ihnen zugefügten Verletzungsmusters in vier Untersuchungsgruppen zu je 30 Tieren aufgeteilt wurde. Hierdurch ergab sich für die Studie ein α -Fehler von 0,05 und ein β -Fehler von 0,2.

Die Gruppen gliederten sich dabei wie folgt:

Gruppe 1 = Fraktur (Fx)

Gruppe 2 = Schädel-Hirn-Trauma (SHT)

Gruppe 3 = Kombiniertes Trauma (Kombi) aus SHT und Fx

Gruppe 4 = Kontrolle (K)

Jede dieser vier Gruppen wurde zudem in einem zweiten Schritt randomisiert weiter in zwei Untergruppen mit zehn bzw. 20 Tieren unterteilt, die über einen Zeitraum von 21 oder 28 Tagen beobachtet wurden (siehe **Abbildung 2.1**).

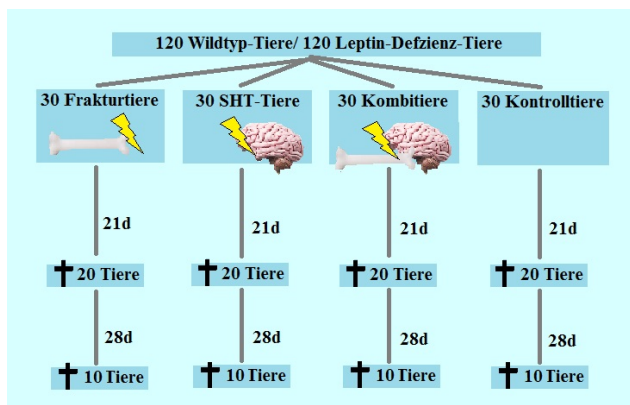


ABBILDUNG 2.1: Gruppeneinteilung und Studiendesign: Die 120 WT- bzw. Leptin-Defizienz-Tiere werden zu je 30 Tieren den Gruppen Fx, SHT, Kombi oder K zugeordnet und dem dazugehörigen Trauma unterzogen. 21 Tage postoperativ erfolgt die Euthanasie (†) von je 20 Tieren jeder Gruppe durch die finale Herzpunktion. Die Euthanasie der übrigen 10 Tiere je Gruppe erfolgt analog nach insgesamt 28 Tagen.

Der jeweilige Beobachtungszeitraum des individuellen Versuchstiers kann dabei grob in die drei Phasen: Trauma – Blutentnahmen (BE) – Euthanasie (†) unterteilt werden, wobei das Setzen des gruppenspezifischen Traumas Tag 1 und die Euthanasie der Tiere Tag 21 bzw. 28 der Beobachtungszeit markiert. Am ersten Untersuchungstag erfolgte zusätzlich die erste, bereits zwei Stunden nach Trauma durchgeführte, bukkale Blutentnahmen, die im weiteren Verlauf durch in siebentägigen Abstand durchgeführte Blutentnahmen ergänzt wurde. Je nach o. g. Untergruppe erfolgten damit 2 bzw. 3 weitere bukkale Blutentnahmen, bevor an Tag 21 bzw. 28 nach finaler Herzpunktion die Euthanasie der Versuchstiere mittels atlantookzipitaler Dislokation in Injektionsnarkose erfolgte.

Im Anschluss an dem tierexperimentellen Teil der Studie wurden zufällig ausgewählte Blutproben der vier Versuchsgruppen mittels spezieller Maus-ELISA-Systeme auf ihren Gehalt an Insulin und OCN hin untersucht und deren Ergebnisse statistisch ausgewertet (zum zeitlichen Ablauf siehe **Abbildung 2.2**).

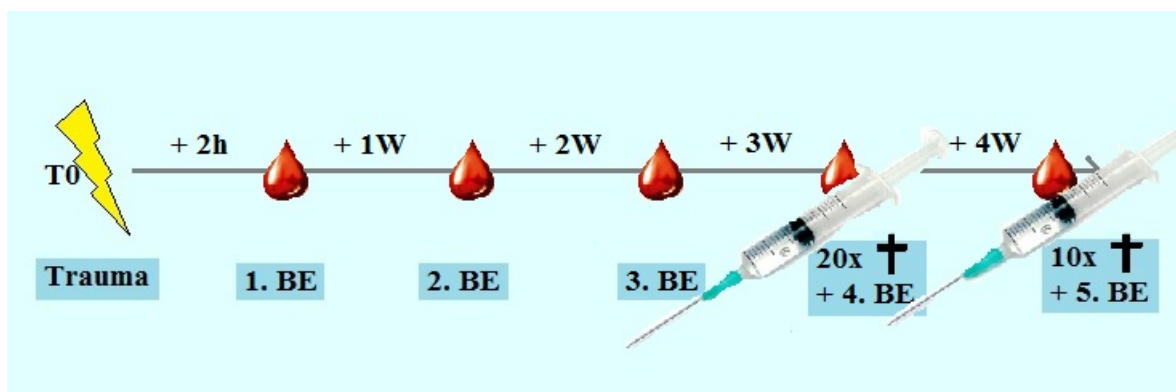


ABBILDUNG 2.2: Zeitlicher Ablauf mit den Zeitpunkten der BEs und der finalen Herzpunktion

2.2 Tiermodell und Tierstämme

2.2.1 Auswahl des Tiermodells

Zur Beantwortung der in der Einleitung ausgeführten Forschungsfrage sollte in vorliegender Studie, aus Gründen der Reliabilität und Reproduzierbarkeit, auf ein bereits andernorts gut etabliertes Raummodell zurückgegriffen werden. Hierbei zeigte sich speziell das Mausmodell als besonders geeignet, da dazu in der Literatur bereits standardisierte Fx- und SHT-Modelle sowie entsprechende KO-Tiere mit ihren skeletalen Phänotypen beschrieben wurden.

Zusätzlich sind die in dieser Studie in großer Stückzahl benötigten Versuchstiere gut erhältlich und in der beteiligten Tieranlage bereits umfangreiche Erfahrungen mit der Haltung derartiger Versuchstiere vorhanden. Bei allen in die Studie eingeschlossenen Tieren handelt es sich dementsprechend um adoleszente weibliche Mäuse im Alter zwischen 12-15 Wochen.

Die Auswahl ausschließlich weiblicher Mäuse ergab sich dabei aus der Überlegung, dass bei männlichen Vergleichstieren die Fx-Heilung in für die zu untersuchende Hypothese zu raschem Verlauf von statten geht und entsprechende hormonelle Schwankungen daher nicht mit Blutentnahmen in für die einzelnen Tiere gut verträglichen Zeitintervallen nachvollziehbar gemacht werden kann. Zudem zeigen männliche Tiere häufig ein aggressives Territorialverhalten, welches die gemeinsame Haltung der Tiere und damit die praktische Durchführbarkeit der Studie deutlich erschwert hätte.

Die durchgeführte Altersbeschränkung diene dazu, alle eingeschlossenen Tiere in einem möglichst vergleichbaren Hormonstatus zu untersuchen und so evtl. interferierende alterungsbedingte Veränderungen z. B. der Wachstums- oder Sexualhormone zu minimieren. Um die in der Einleitung postulierten Leptin-abhängigen Differenzen in den dem Fx-Heilungsprozess zugrundeliegenden Hormonverhältnissen erarbeiten zu können, wurden in vorliegender Studie in zwei Durchläufen sowohl WT- als auch Leptin-defiziente Mäuse den selben, bereits in Abschnitt 2.1 kurz vorgestellten, Versuchsbedingungen ausgesetzt. Die Auswahl der verwendeten Tierstämme sowie deren genauen Charakteristika sollen nun im Folgenden genauer erläutert werden.

2.2.2 Wildtyp-Tiere

Bei den im vorliegenden Versuch verwendeten WT-Mäusen handelte es sich um 12-15 Wochen alte und 20-25g schwere C57BL/6NCrI Tiere des Charles Rivers Labors (Sulzfeld, Deutschland). Mäuse dieses weit verbreiteten und in vielen Publikationen verwendeten Tierstamms zeichnen sich insbesondere durch ihre gute Verfügbarkeit und vielseitige Einsetzbarkeit aus und bieten zum Zweck vorliegender Studie zudem den Vorteil eines bereits vorhandenen genetisch ähnlichen Leptin-Defizienz-Partners (siehe hierzu Abschnitt 2.2.3).

Von den insgesamt 132 in die Studie eingeschlossenen C57BL/6NCrI-Mäusen konnten 112 Tiere in die anschließende Auswertung aufgenommen werden. Die übrigen 20 Studientiere verstarben vorzeitig aus den in **Tabelle 2.1** aufgeführten Gründen.

TABELLE 2.1: Anzahl der insgesamt in den Versuch eingeschlossenen, vorzeitig verstorbenen und zur Hormonanalyse verbleibenden WT-Tiere

	FX	SHT	SHT+FX	Kombi	insgesamt
Insgesamt eingeschlossen	33	36	39	24	132
Perioperativ verstorben	2	3	5		10
Bei Blutentnahme verstorben		2			2
Leidensbedingt vorzeitig euthanasiert entsprechend Tierversuchsantrag	1	1	5	1	8
Zur Auswertung verbleibend	30	30	29	23	112

2.2.3 Leptin-Defizienz-Tiere

Bei den Leptin-Defizienz-Mäusen handelte es sich entsprechend ebenfalls um 11-15 Wochen alte und 44-60g schwere B6.V-Lepob/JRj-Tiere der Janvier Labs (Saint Berthevin, Frankreich). Dieser Tierstamm wurde durch Janvier Labs aus dem in dieser Studie ebenfalls verwendeten WT eines C57BL/6-Tiers gezüchtet und eignet sich damit durch deren enge genetische Verwandtschaft besonders gut zum Hormonvergleich bei isolierter Leptin-Defizienz.

Von den insgesamt 134 in die Studie eingeschlossenen B6.V-Lepob/JRj-Mäusen konnten in diesem Fall 117 Tiere in die anschließende Auswertung aufgenommen werden. Die übrigen 17 Studientiere verstarben vorzeitig aus den in **Tabelle 2.2** aufgeführten Gründen:

TABELLE 2.2: Anzahl der insgesamt in den Versuch eingeschlossenen, vorzeitig verstorbenen und zur Hormonanalyse verbleibenden Leptin-Defizienz-Tiere

	FX	SHT	SHT+FX	Kombi	insgesamt
Insgesamt eingeschlossen	33	35	38	28	134
Perioperativ verstorben	1	2	2		5
Bei Blutentnahme verstorben	1		1	1	3
Leidensbedingt vorzeitig euthanasiert entsprechend Tierversuchsantrag	1	3	5		9
Zur Auswertung verbleibend	30	30	30	27	117

2.3 Haltung und Ernährung

Alle in der vorliegenden Studie eingeschlossenen Tiere wurden gleichermaßen nach Ankunft in der Tierhaltungsanlage (ISO 9000/2008 zertifiziert) zur Eingewöhnung für eine Woche im einlassbeschränkten Quarantänebereich der Anlage akklimatisiert, bevor sie in die frei zugängliche Tierhaltung überführt wurden. Zu allen Zeiten bestanden dabei kontrollierte Haltungsbedingungen mit konstanten Temperaturen von $20 \pm 2^\circ\text{C}$ und einem Tag-Nacht-Rhythmus von je 12h.

Die Mäuse wurden zu je max.10 Tieren in transparenten und frischluftdurchlässigen Standardkäfigen des Typs III („Euronorm“) mit einer Bodenfläche von 820 cm² gehalten, die mit einer Einstreu aus Sägespänen und Zellulosetüchern sowie Versteck- und Beschäftigungsmöglichkeiten ausgestattet wurden. Die Trockenfutter- und Wasser-Zufuhr erfolgte *ad libitum*. Zudem erfolgte eine tägliche Kontrolle und Reinigung der Käfige durch tierpflegerisches Fachpersonal.

2.4 Operationen und Anästhesie

2.4.1 Allgemeines Prozedere

Bei den für die Traumasimulation gewählten Operationsmethoden handelt es sich um zwei bereits andernorts etablierte und bewährte Traumamodelle. Diese beinhalten zum einen das 1988 von *Lighthall* entwickelte Controlled Cortical Impact Injury zur Generierung eines standardisierten, geschlossenen SHT und zum anderen die 2003 von *Cheung et al.* beschriebene Fixateur-Externe-stabilisierte Femurosteotomie zur Simulation einer Oberschenkel-Fx [15, 69]. Isoliert oder in Kombination wurden sie an je einem Teil der Studienpopulation durchgeführt um die Gruppen SHT, Fx und Kombi zu erzeugen, während bei den zum Vergleich herangezogenen Kombi-Tieren keine Intervention durchgeführt wurde.

Alle operativen Eingriffe wurden mikrochirurgisch in Inhalationsnarkose mittels 1,5 vol.% Isofluran (Forene[®], Abbot, Wiesbaden, Deutschland) in 0,5 L/min N₂O und 0,3 L/min O₂ und nachfolgender intraperitonealer Narkose mit einem Ketamin-(KETAMIN[®], Actavis GmbH & Co. KG, München, Deutschland) 60 mg/kg KG und Medetomidine- (DORMITOR[®], Orion Pharma, Bad Homburg, Deutschland) 0,3 mg/kg KG Gemisch durchgeführt. Eine perioperative Analgesie erfolgte durch eine zusätzliche Applikation von je 0,1mg/kg KG Bupremorphin s. c. (TEMGESIC[®], RB Pharmaceuticals Limited, Heidelberg, Deutschland) und eine perioperative Antibiose mittels einer subkutanen Injektion von 0,02 ml Clindamycin (CLINDAMYCIN-RATIOPHARM[®] 600 mg/4 ml, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland). Anschließend erfolgte zusätzlich eine orale Schmerztherapie mit Tramadol. Dazu wurde je nach Gruppe bis zu 7 Tage postoperativ 25 mg/L Tramadol (TRAMAL[®], Grünthal Group, Aachen, Deutschland) über das Trinkwasser verabreicht. Die Schmerzmitteldosierungen richteten sich nach Empfehlungen der GV-SOLAS Stand 2010.

Zur Durchführung aller Prozeduren wurden die jeweiligen Versuchstiere entsprechend **Abbildung 2.3** auf einer 37°C warmen Heizmatte in Bauchlage gelagert und die stereotaktische Fixierung mittels zwei gegenüberliegenden temporalen Schädelpins durchgeführt (mouse stereotaxic base, Stoelting, Wood Dale, IL).



ABBILDUNG 2.3: Intraoperative Inhalationsnarkose und stereotaktische Fixierung der Versuchstiere: Während aller operativen Eingriffe wurden die Versuchstiere mittels Inhalation von 1,5 vol.% Isofluran in 0,5 L/min N₂O und 0,3 L/min O₂ narkotisiert und mit Hilfe einer speziell für das Mausmodell entwickelten Apparatur beidseits temporal stereotaktisch fixiert.

Postoperativ schloss sich eine zweistündige Überwachungsphase an, während der Atmung, Kreislauf und Verhalten der Tiere beobachtet und einem postoperativen Abfall ihrer Körpertemperatur durch den Einsatz einer über dem Käfig angebrachten Rotlichtlampe entgegengewirkt wurde. Den Abschluss dieser Phase bildete die bereits oben erwähnte erste Blutentnahme zwei Stunden postoperativ.

Zur längerfristigen, posttraumatischen Analgesie erhielten alle Interventionstiere über die erste Woche postoperativ oral 25 mg/L Tramadolhydrochlorid (TRAMAL[®], Grünthal, Aachen, Deutschland) über das Trinkwasser ad libitum. Die weiterführende engmaschige, überwachende Kontrolle von Gesundheitszustand und Verhalten der Versuchsmäuse erfolgte mit entsprechender Dokumentation an den Tagen eins bis drei des Versuchszeitraums.

2.4.2 Femurosteotomie

Insgesamt wurden 36 WT- und 37 Leptin-Defizienz-Tiere einer isolierten linksseitigen Femurosteotomie mit anschließender Fixierung mittels eines starren Fixateur externe unterzogen. Hierbei liegt der Vorteil der externen gegenüber einer internen Fixation in der vollständigen Erhaltung des Markraumes sowie der Stabilisierung des Fx-Spalts unter Vermeidung seiner Komprimierung, wie sie gelegentlich unter Einsatz einer intramedullären Nagelung auftritt [49]. Zudem konnte mittels externer Stabilisierung die Artefaktbildung im Micro-CT minimiert und damit eine ebenfalls im Rahmen der vorliegenden Studie erfolgte CT-gestützte bildmorphologische Analyse der Fx-Heilung innerhalb der o. g. Traumagruppen durchgeführt werden [71].

Das jeweilige Versuchstier wurde dazu wie oben beschrieben gelagert und fixiert, die Haare im OP-Gebiet entfernt und die darunter liegende Haut mittels 10% Braunol[®] (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Anschließend wurde für einen mittigen diaphysealen Zugang zum linken Femur eine laterale ca. 2 cm lange longitudinale Hautinzision

entlang einer gedachten Linie zwischen Hüft- und Kniegelenk durchgeführt. Die Darstellung des Femurschafts erfolgte unter Erhalt des N. ischiadicus durch stumpfe Dissektion der Fascia lata sowie Teile des M. vastus lateralis und des M. biceps femoris.

Vor der eigentlichen Femurosteotomie erfolgte dann die Anlage eines speziell für das Mausmodell entwickelten Fixateur externe (MouseExFix[®], RIsystem, Davos, Schweiz) parallel zum Verlauf des Oberschenkelchafts mittels vier senkrecht eingebrachter und im Durchmesser 0,45 mm messender Schanz-Schrauben.

Nach so erreichter Stabilisierung konnte die Osteotomie entsprechend **Abbildung 2.4** mit Hilfe eines 0,7 mm breiten Gigli-Sägedrahts (Gigli Wire Saw, RIsystem, Davos, Schweiz) zwischen den mittleren Pins, senkrecht zum Femurschaft durchgeführt werden, wobei erneut besonderes Augenmerk auf Schonung des N. ischiadicus gelegt wurde. Der abschließende Wundverschluss erfolgte mit nicht-resorbierbarem Ethilon-Nahtmaterial der Stärke 6.0 (Ethicon[®], Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland).

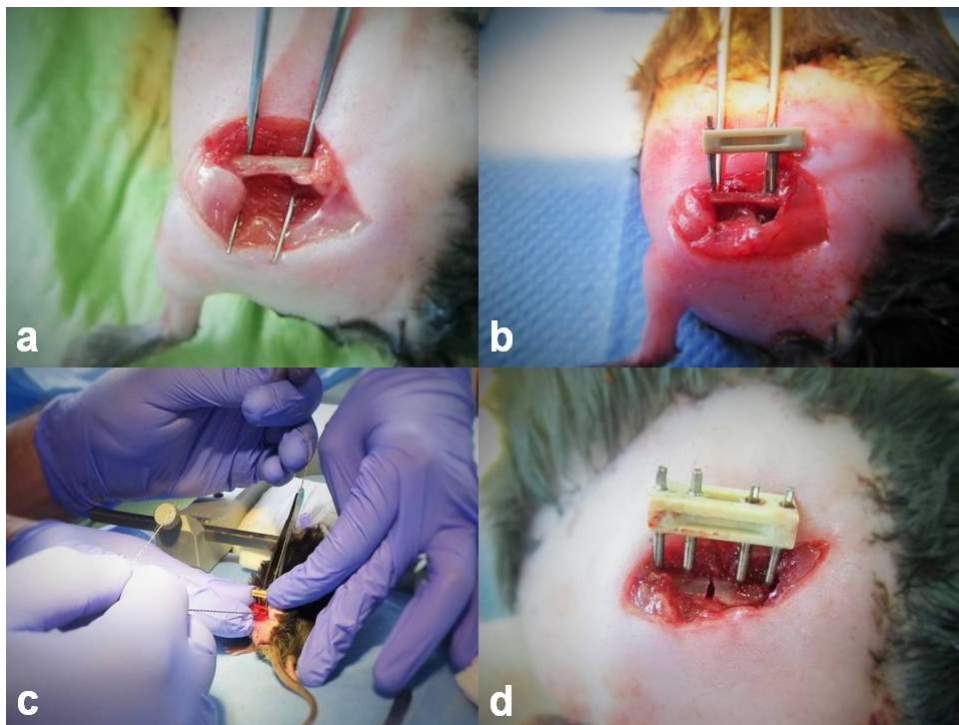


ABBILDUNG 2.4: Durchführung der Femurosteotomie: *a* Präparation des linken Mausfemur, *b* Einbringen des Fixateur externe, *c* Femurosteotomie mittels 0,7mm Gigli-Säge, *d* abgeschlossene extern stabilisierte Femurosteotomie

Die perioperative Mortalität lag hierbei für die WT-Tiere bei 2 und die Leptin-Defizienz-Tiere bei 1 und damit bei 5,6 bzw. 2,7%.

2.4.3 Controlled Cortical Impact Injury

Insgesamt wurden 37 WT- und 35 Leptin-Defizienz-Tiere einem isolierten geschlossenen SHT mittels CCII ausgesetzt. Dieses von *Lighthall 1988* entwickelte Verfahren stellt eine Methode dar, ein standardisiertes und reproduzierbares sowie nicht-letales Trauma über der linkshemisphärischen Dura mater und der darunterliegenden Großhirnrinde zu erreichen [69].

Hierfür wurden die Tiere erneut wie o. g. gelagert und fixiert sowie das Operationsfeld von Haaren befreit und desinfiziert. Anschließend erfolgten ein sagittaler medianer Hautschnitt am Kopf des Versuchstieres und die eine linksseitige Mobilisation von Kopfhaut und Unterhautgewebe. Zur Vorbereitung der anschließenden Kraniotomie wurde der linke M. temporalis präpariert und mit einem Elektrokauter großflächig vom Schädeldach abgesetzt. Die folgende ca. 7 x 7mm große parietotemporale Kraniotomie erfolgte mittels einer elektrischen Kugelfräse (Durchmesser 1,2 mm, Minimot 40, Proxxon, Föhren, Deutschland) entsprechend der natürlichen Begrenzung des Kraniotomiefensters durch die S. sagittalis, coronaria und lambdoidea ohne Penetration der Dura mater. Das auf diese Art präformierte Knochenfragment wurde mit Hilfe eines Zahnarztthäkchens geborgen und bis zur Wiedereinsetzung im Anschluss an das eigentliche SHT in einer mit NaCl-Lösung befeuchteten sterilen Kompresse gelagert.

Parallel wurde unter fortgesetzter Inhalationsanästhesie mittels eines sauerstoffbetriebenen, computerassistierten Pneumatic Cortical Impact Device (Model: AMS 201, AmScien Instruments, Richmond, Virginia, USA) das gewünschte geschlossene SHT gesetzt. Hierzu wurde das jeweilige Versuchstier mit der Kraniotomiezone zentral unter dem o. g. Impaktor positioniert und hier erneut stereotaktisch fixiert, bevor nach entsprechender Kalibrierung ein pneumatisch gesteuerter, im Durchmesser 3 mm großer Metallbolzen mit einer Geschwindigkeit von 3,5 m/s und einer Eindringtiefe von 0,25 mm in einem 45°-Winkel senkrecht zur Oberfläche der linken Hirnkonvexität auf das Zentrum des Knochenfensters abgefeuert wurde (siehe **Abbildung 2.5**).

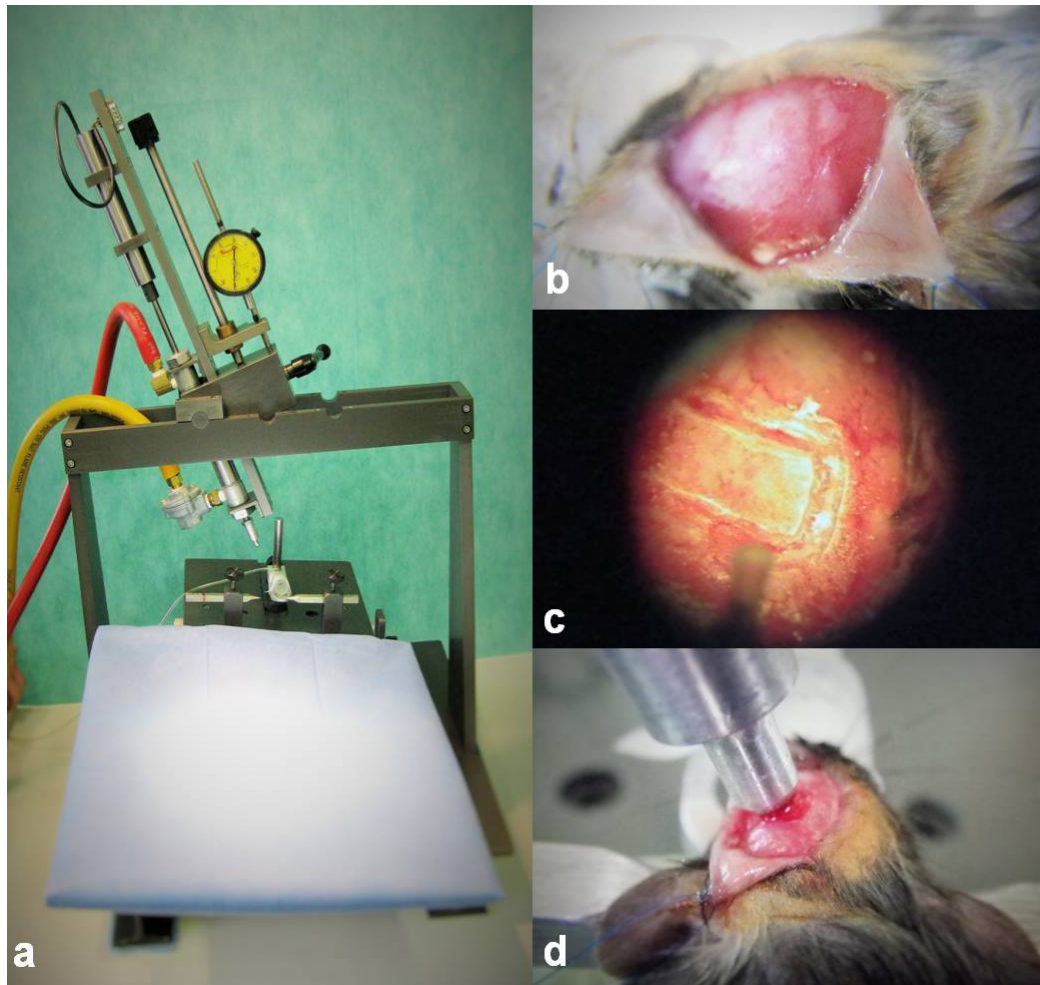


ABBILDUNG 2.5: Durchführung des Controlled Cortical Impact Injury: *a* Impactor Device, *b* Präparation der Schädelkalotte links, *c* Präparation des Knochendeckels mittels Mikroböhrer unter dem OP-Mikroskop, *d* Automatisiertes Setzen des CCII

Im Anschluss erfolgte die Reposition und Fixierung des aufbewahrten Schädelfragments mit Hilfe von Dentalzement (Harvard Cement, Harvard Dental International GmbH, Berlin, Deutschland) und der abschließende Wundverschluss mit nicht-resorbierbarem Ethilon-Nahtmaterial der Stärke 6.0 (Ethicon[®], Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland).

Die perioperative Mortalität lag hierbei für die WT bei 4 und die Leptin-Defizienz-Typen bei 2 und damit bei 10,8 bzw. 5,7%.

2.4.4 Kombinationstrauma

Schließlich wurden in vorliegender Studie weitere 44 WT- und 38 Leptin-Defizienz-Tiere einer Kombination der beiden oben beschriebenen Traumata ausgesetzt, um so ein neuartiges in vivo Kombitrauma-Mausmodell zu etablieren, an dem die in der Einleitung aufgestellte Hypothese

eines zentralnervösen Einflusses auf die Fx-Heilung untersucht werden konnte (siehe dazu auch *Tsitsilonis et al. 2015*)[103].

Hierzu wurden die jeweiligen Versuchstiere zunächst einem wie oben erläuterten CCII ausgesetzt, um danach bei stabilen Vitalwerten noch in gleicher Sitzung der ebenfalls oben beschriebenen linksseitigen Femurosteotomie mit externer Fixierung unterzogen zu werden.

Die perioperative Mortalität lag hierbei für die WT bei 7 und die Leptin-Defizienz-Typen bei 2 und damit bei 15,9 bzw. 5,2%.

2.5 Blutentnahmen und Euthanasie

2.5.1 Allgemeine Erläuterungen

Zur Bestimmung der Hormonspiegel von Insulin und OCN wurden über einen Zeitraum von drei bzw. vier Wochen wöchentlich Blutentnahmen an den Studientieren aller Versuchsgruppen durchgeführt. Hierzu erfolgten zunächst bukkale Punktionen aus der V. facialis und zum Ende des Beobachtungszeitraums eine finale Herzpunktion nach drei bzw. vier Wochen. Die Lagerung aller so gewonnen Plasma- und Serumproben erfolgte anschließend bei -80°C ohne Unterbrechung der Kühlung bis zur abschließenden Hormonbestimmung mittels Maus-ELISA-Kits.

2.5.2 Venenpunktion

Zur Gewinnung der Citrat-verdünnten Plasmaproben erfolgte entsprechend **Abbildung 2.6** die standardisierte bukkale Punktion der V. facialis mit einer Metalllanzette. Die so gewonnen zwei Blutstropfen wurden in einem zuvor mit Citrat benetzten Eppendorfgesäß aufgefangen. Mit Hilfe einer ebenfalls citratbenetzten Eppendorfpipette wurde das Blut entnommen und in ein zweites mit Citrat gefülltes Eppendorfgesäß überführt, so dass sich darin ein Mischungsverhältnis von 1:2 ergab.

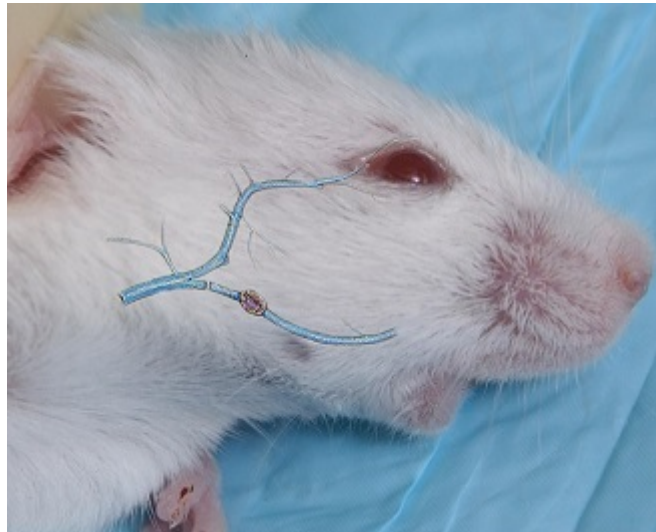


ABBILDUNG 2.6: Schematische Darstellung des Verlaufs der V. facialis: Hier zur besseren Visualisierung bei einer Albinomausart schematisch dargestellter Verlauf der V. facialis mit vorgesehener Lokalisation zur Punktion und venösen Blutentnahme (http://www.medipoint.com/html/for_use_on_mice.html).

Das auf diese Weise erhaltene Citrat-Blut-Gemisch wurde anschließend bei 1000 rpm für 10 min zentrifugiert, der so gewonnene zellfreie Citrat-Plasma-Überstand abpipettiert und zur abschließenden Aufbewahrung in ein drittes unbehandeltes Eppendorfgefäß überführt.

2.5.3 Herzpunktion

Die finale Herzpunktion der Versuchsmäuse wurde unter intraperitonealer Injektionsnarkose mittels 0,3 ml/kg Medetomidin (DORMITOR[®], Orion Pharma, Bad Homburg, Deutschland) und 0,6 ml/kg Ketamin 10% (KETAMIN[®], Actavis GmbH & Co. KG, München, Deutschland) durchgeführt.

Hierzu wurde der Herzspitzenstoß des Studientieres palpirt, das Herz anschließend punktiert und eine möglichst große Menge des gesamten Blutvolumens mit Hilfe einer 10 ml Spritze abgezogen. Das so gewonnene Vollblut wurde anschließend in ein unbehandeltes Eppendorfgefäß überführt und ebenfalls für 10 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der dabei entstandene Serumüberstand wurde abschließend zur weiteren Lagerung in ein zweites Eppendorfgefäß überführt.

2.6 Hormonspiegelbestimmung

2.6.1 Insulin

Die Bestimmung des Plasma- bzw. Seruminsulingehalts erfolgte mit Hilfe eines mausspezifischen Insulin-ELISA-Systems (Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA[®], Version: Oktober 10, 2012,

Alpco Diagnostics, Salem, NH) mit einem Intra-Assay-Variationskoeffizient von $< 9,3\%$ und einem entsprechenden Inter-Assay-Variationskoeffizienten von $< 11,5\%$. Die Probenaufbereitung und Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend der unten beschriebenen Abfolge. Hierbei wurden, in Anbetracht der geringen Hormonspiegeln der WT-Tiere, je $25\mu\text{l}$ der bereits 1:2 vorverdünnten Citrat-Plasma- sowie die unverdünnten Serumproben als Einzelmessungen analysiert. Bei durch die Leptin-Defizienz stark erhöhten Insulin-Werten der Leptin-Defizienz-Tiere, erfolgte hier hingegen eine weitere Probenverdünnung auf 1:6 und eine Reduktion des verwendeten Probenvolumens auf $5\mu\text{l}$, um den Ergebnisrahmen des verwendeten ELISA-Systems nicht zu überschreiten. Eine Doppelmessung war auf Grund des geringen Probenumfangs und der geplanten Durchführung eines parallelen OCN-ELISAs am selben Probenmaterial nicht durchführbar.

Standard Operating Procedure des verwendeten Mouse Ultrasensitive Insulin ELISA

- Für **WT-Tiere**: Pipettiere je **$25\mu\text{l}$** Volumen des **Zero-Standards**, der **Standards A-E** (0,025, 0,09, 0,188, 0,5 und 1,25ng/ml), der **Kontrolle 1** sowie der **Plasma- und Serumproben** in jedes Well einer Mikropipettierplatte
- Für **Leptin-Defizienz-Tiere** : Pipettiere **$5\mu\text{l}$** Volumen des **Zero-Standards**, der **Standardreihe C-G** (0,188, 0,5, 1,25, 3,75 und 6,9ng/ml), der **Kontrolle 2** sowie der zusätzlich nochmals **1 : 6** mit Zero-Standard **verdünnten Plasma- und Serumproben** in jedes Well einer Mikropipettierplatte
- Pipettiere dazu **$75\mu\text{l}$** der mitgelieferten **Konjugatflüssigkeit**
- Decke die Mikropipettierplatte mit einer mitgelieferten selbstklebenden Folie ab und **inkubiere** sie für **2h** bei **Raumtemperatur** bei **700-900rpm** auf einem Platten-Shaker
- **Dekantiere** die Flüssigkeit aus der Mikropipettierplatte und **wasche** die Platte **6x** mit je **$350\mu\text{l}$** des mitgelieferten **Waschpuffers**, **klopfe** die Mikropipettierplatte nach jedem Waschgang auf inem Papiertuch **trocken**
- Pipettiere je **$100\mu\text{l}$** **Tetramethylbenzidin-Substrat** in jedes Well
- Decke die Mikropipettierplatte mit einer mitgelieferten selbstklebenden Folie ab und **inkubiere** sie für **30min** bei **Raumtemperatur** bei **700-900rpm** auf einem Platten-Shaker
- Pipettiere je **$100\mu\text{l}$** **Stopp-Lösung** in jedes Well und schwenke die Platte leicht zum Durchmischen der Flüssigkeit
- Positioniere so schnell wie möglich (aber zumindest in weniger als 30min) die Mikropipettierplatte in einen kompatiblen **Mikropipettierplatten-Reader** und miss die **Absorption** bei **450nm**
- Multipliziere die gemessenen Ergebnisse der Plasmaproben mit dem zuvor verwendeten Citrat-Verdünnungskoeffizienten und bei Leptindefizienz mit 6 nach vorheriger 1 : 6 Verdünnung s.o.

2.6.2 Osteocalcin

Die Bestimmung des Plasma- bzw. Serum-OCN-Gehalts erfolgte ebenfalls mit Hilfe eines maus-spezifischen OCN-ELISA-Systems (Mouse Osteocalcin ELISA[®], Immunotopics International, San Clemente, CA) mit einem Intra-Assay-Variationskoeffizient von < 3,7% und einem entsprechenden Inter-Assay-Variationskoeffizienten von < 6,1%. Die Probenaufbereitung und Versuchsdurchführung erfolgte wie unten beschrieben. Hierzu wurden die entsprechenden bereits 1 : 2 vorverdünnten Citrat-Plasma- sowie die unverdünnten Serumproben sowohl der WT- als auch der Leptin-Defizienz-Tiere mit Hilfe eines im ELISA-Kit enthaltenen Zero Standards auf ein abschließendes Verhältnis von 1 : 6 verdünnt. Alle folgenden Schritte des Versuchsaufbaus wurden anschließend mit 25 µl der verdünnten Proben abgearbeitet. Insgesamt wurden hier, aus dem o. g. Gründen, nur 50% aller im Tierexperiment gewonnenen Blutproben in Einzelmessungen analysiert.

Standard Operating Procedure des verwendeten Mouse Osteocalcin ELISA

- **Verdünne Kontrollen** sowie **Plasma-** und **Serumproben** mit Zero-Standard 1:6 (Standard müssen nicht verdünnt werden)
- Pipettiere 25 µl Volumen des **Zero-Standards**, der **Standards 2-5**, der **Kontrollen 1 + 2** und der **verdünnten Plasma-** und **Serumproben** in jedes Well der Mikropipettierplatte
- Pipettiere dazu je 50 µl **Maus-Osteocalcin-Antikörper**
- Decke die Mikropipettierplatte mit einer mitgelieferten selbstklebenden Folie ab und **inkubiere** die für **1h** bei **Raumtemperatur** bei **180-220rpm** auf einem Mikropipettierplatten-Shaker
- **Dekantiere** die Flüssigkeit und **wasche** die Platte 5x mit je 350 µl **Waschpuffer**, **klopfe** die Mikropipettierplatte nach jedem Waschgang auf einem Papiertuch **trocken**
- Pipettiere je 100 µl **Maus-Osteocalcin-Meerrettichperoxidase-konjugierten-Antikörper** in jedes Well
- Decke die Mikropipettierplatte mit einer mitgelieferten selbstklebenden Folie sowie Aluminiumfolie ab und **inkubiere** sie für **1h** bei **Raumtemperatur** bei **180-220rpm** auf einem Mikropipettierplatten-Shaker
- **Dekantiere** die Flüssigkeit und **wasche** die Platte 5x mit je 350 µl **Waschpuffer**, **klopfe** die Mikropipettierplatte nach jedem Waschgang auf einem Papiertuch **trocken**
- Pipettiere je 100 µl **ELISA-Meerrettichperoxidase-Substrat** in jede Well
- Decke die Mikropipettierplatte mit einer mitgelieferten selbstklebenden Folie sowie aluminiumfolie ab und **inkubiere** sie für **30min** bei **Raumtemperatur** bei **180-220rpm** auf einem Mikropipettierplatten-Shaker
- Pipettiere je 50 µl **Stopp-Lösung** in jedes Well und vermische die Lösungen für **1min** bei **Raumtemperatur** bei **180-220rpm** auf einem Mikropipettierplatten-Shaker
- Positioniere so schnell wie möglich (aber zumindest in weniger als 10 min) die Mikropipettierplatte in einen kompatiblen **Mikropipettierplatten-Reader** und miss die **Absorption** bei **450nm**
- Multipliziere die gemessenen Ergebnisse mit dem zuvor verwendeten Citrat-Verdünnungs-koeffizienten und mit 6 nach vorheriger 1 : 6 Verdünnung s. o.

2.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung und grafische Darstellung der gruppenspezifischen Hormonverhältnisse erfolgte mit Hilfe eines gängigen Statistikprogramms (SPSS 22[®], IBM, Armonk, NY, USA). Alle Variablen werden als Mittelwert \pm Standardabweichung oder Median mit der 25. und 75. Perzentile sowie Konfidenzintervall angegeben. Zur Überprüfung auf Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov- sowie bei kleinem Stichprobenumfang der Saphiro-Wilks-Test angewendet. Die Testung auf gruppenspezifische Unterschiede erfolgte durch univariate Varianzanalyse mit anschließender Bonferroni-Korrektur. Unterschiede zwischen den jeweiligen Vergleichsgruppen wurden entsprechend der gängigen Verwendung dieses Begriffs als signifikant angesehen, falls die Null-Hypothese mit einem $p < 0,05$ mit mehr als 95%-Wahrscheinlichkeit abgelehnt werden konnte. Als hoch signifikant galten demnach Differenzen mit $p < 0,01$ und einer 99%-Wahrscheinlichkeit, dass die Null-Hypothese abzulehnen sei.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Wildtyptiere

3.1.1 Insulin

Nach Testung mittels Kolmogorow-Smirnow- und Saphiro-Wilk-Test ergaben sich bei den WT-Tieren für Insulin zum Teil nicht-normalverteilte Stichproben. In einem zweiten Schritt erfolgte, um mögliche Fehler in der Durchführung der Hormontestung auszugleichen und zudem eine größtmögliche Homogenität der einzelnen Traumagruppen für die später durchzuführende Teststatistik zu erreichen, der Ausschluss von Ausreißern und Extremwerten aus dem Datenmaterial. Als Ausreißer galten dabei bei SPSS 22 Werte, die das 1,5-fache bis 3-fache unter bzw. über dem 25%- bzw. 75% Perzentil lagen. Bei Extremwerten betrug der o. g. Abstand dementsprechend mehr als das 3fache. Hieraus ergaben sich abschließend die in **Tabelle 3.1** dargestellten Mittel- und Medianwerte sowie die sich daraus ergebenden Standardabweichungen und Standardfehler des Mittelwerts und deren Konfidenzintervalle.

Hierbei zeigten sich bei den K-Tieren im Rahmen der ersten Blutentnahme mittlere Insulinspiegel von 150,6 pg/ml (Median 142,5 pg/ml, SD \pm 83,534pg/ml), während die Insulinspiegel bei Tieren mit Trauma auf deutlich höhere Werte anstiegen, wobei Kombinationstiere den höchsten Insulinstieg direkt postoperativ aufwiesen. Anschließend kam es bei allen Traumagruppen gleichermaßen zu einem Anstieg der Plasmainsulinspiegel bis zur zweiten postoperativen Woche mit deutlich erhöhten Werten insbesondere für Tiere mit begleitender Fx, wobei auch hier die Tiere mit Kombitrauma erneut die höchsten Werte boten. Kontrolltiere lagen mit einem mittleren 2-Wochen-Insulinwert von nur 86,14 pg/ml (Median 85,5, SD \pm 56,4pg/ml) deutlich unter den Insulinwerten der drei Traumagruppen. In den Wochen drei und vier kam es anschließend zu einer generellen Absenkung des Plasma- und Seruminsulins, wobei erneut Tiere mit Fx und hier insbesondere Kombitraumatiere im Vergleich zu SHT- und K-Tieren eine verlängerte Erhöhung der Hormonspiegel zeigten.

TABELLE 3.1: Von Ausreißern und Extremwerten bereinigte deskriptive Statistik der Plasma-/Seruminsulinwerte für WT-Tiere in pg/ml

OP-Gruppe			Statistik	Standardfehler
Insulin 2 Stunden	Fx	Mittelwert	194,63	13,67
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 166,35 Obergrenze 222,9	
		Median	177	
		Standardabweichung	66,967	
	SHT	Mittelwert	160,88	22,371
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 107,98 Obergrenze 213,77	
		Median	162	
		Standardabweichung	63,274	
	Kombi	Mittelwert	256,24	18,975
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 217,37 Obergrenze 295,11	
		Median	237	
		Standardabweichung		
K	Mittelwert	150,6	18,679	
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 111,5 Obergrenze 189,7		
	Median	142,5		
	Standardabweichung	83,534		
Insulin 1 Woche	Fx	Mittelwert	220,08	23,783
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 170,99 Obergrenze 269,17	
		Median	189	
		Standardabweichung	118,913	
	SHT	Mittelwert	166,5	30,203
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 98,17 Obergrenze 234,83	
		Median	148,5	
		Standardabweichung	95,512	
	Kombi	Mittelwert	204,82	14,092
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 175,51 Obergrenze 234,12	
		Median	225	
		Standardabweichung	66,099	
K	Mittelwert	185,75	40,118	
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 97,45 Obergrenze 274,05		
	Median	138		
	Standardabweichung	138,972		
Insulin 2 Wochen	Fx	Mittelwert	248,23	26,183
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 194,31 Obergrenze 302,16	
		Median	211,5	
		Standardabweichung	133,508	
	SHT	Mittelwert	312,47	50,398
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 206,59 Obergrenze 418,36	
		Median	234	
		Standardabweichung	219,68	

OP-Gruppe		Statistik	Standardfehler	
Insulin 2 Wochen	Kombi	Mittelwert	329,64	45,126
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 236,51 Obergrenze 422,77	
		Median	252	
		Standardabweichung	225,628	
	K	Mittelwert	86,14	15,074
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 53,58 Obergrenze 118,71	
		Median	85,5	
		Standardabweichung	56,401	
Insulin 3 Wochen	Fx	Mittelwert	145,41	17,173
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 110,11 Obergrenze 180,71	
		Median	113	
		Standardabweichung	89,234	
	SHT	Mittelwert	160,83	22,727
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 113,82 Obergrenze 207,85	
		Median	127,5	
		Standardabweichung	111,34	
Kombi	Mittelwert	242,19	32,478	
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 175,3 Obergrenze 309,08		
	Median	229,5		
	Standardabweichung	165,605		
K	Mittelwert	125,33	14,382	
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 94,99 Obergrenze 155,68		
	Median	117,5		
	Standardabweichung	61,018		
Insulin 4 Wochen	Fx	Mittelwert	137,75	34,144
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 57,01 Obergrenze 218,49	
		Median	102	
		Standardabweichung	96,574	
	SHT	Mittelwert	195,22	30,187
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 125,61 Obergrenze 264,83	
		Median	229	
		Standardabweichung	90,562	
Kombi	Mittelwert	135,83	7,499	
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 116,56 Obergrenze 155,11		
	Median	138		
	Standardabweichung	18,368		
K	Mittelwert	163,56	11,431	
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 137,2 Obergrenze 189,92		
	Median	167		
	Standardabweichung	34,293		

Die Ergebnisse der verschiedenen Traumagruppen wurden in einem dritten Schritt statistisch auf signifikante traumaspezifische Unterschiede im Plasma-/Seruminsulingehalt hin untersucht. Allgemein kam es dabei, wie bereits oben am Anstieg der Mittelwerte gezeigt, sowohl nach Fx, als auch nach SHT und Kombinationstrauma zu einem postoperativen Insulinstieg, der etwa in Woche zwei seinen Höhepunkt erreichte, um dann in der vierten Woche wieder auf das Niveau der Kontrolltiere abzufallen. Mäuse mit Fx und insbesondere Kombinationstrauma zeigten dabei deutlichere Plasmakonzentrationserhöhungen als Mäuse mit isoliertem SHT.

Eine zur weiteren Differenzierung möglicher traumaspezifischer Hormonprofile durchgeführte ANOVA ergab entsprechend für die Zeitpunkte zwei Stunden, zwei Wochen sowie drei Wochen postoperativ signifikante bzw. hoch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Traumagruppen ($p = 0,000$, $0,001$ und $0,005$, bei $F = 7,061$, $6,211$ und $4,629$, siehe **Tabelle 3.2**).

TABELLE 3.2: ANOVA der Plasma-/Seruminsulinkonzentrationen für WT-Tiere

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Insulin 2 Stunden	Zwischen Gruppen	152977,612	3	50992,537	7,061	,000
	Innerhalb der Gruppen	556098,61	77	7222,06		
	Gesamtsumme	709076,222	80			
Insulin 1 Woche	Zwischen Gruppen	24099,355	3	8033,118	0,72	,554
	Innerhalb der Gruppen	725665,863	65	11164,09		
	Gesamtsumme	749765,217	68			
Insulin 2 Wochen	Zwischen Gruppen	600329,126	3	200109,709	6,211	,001
	Innerhalb der Gruppen	2577420,827	80	32217,760		
	Gesamtsumme	3177749,952	83			
Insulin 3 Wochen	Zwischen Gruppen	189387,099	3	63129,033	4,629	,005
	Innerhalb der Gruppen	1241073,890	91	13638,175		
	Gesamtsumme	1430460,989	94			
Insulin 4 Wochen	Zwischen Gruppen	18722,764	3	6240,921	1,231	,317
	Innerhalb der Gruppen	141992,111	28	5071,147		
	Gesamtsumme	160714,875	31			

Im Anschluss wurde eine post-hoc-Analyse mittels Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche angeschlossen. In dieser konnte für den Zeitpunkt zwei Stunden postoperativ mit $p = 0,038$ und $0,000$ eine signifikante Erhöhung des Plasmainsulinwerts der Kombinationstraumagruppe gegenüber der SHT- und der Kontrollgruppe festgestellt werden. Des Weiteren zeigte sich hier mit $p = 0,062$ auch gegenüber der Fx-Gruppe eine Tendenz zur signifikanten Plasmainsulinerhöhung nach Kombitrauma. Zum Zeitpunkt zwei Wochen postoperativ hingegen zeigten sich bezüglich der unterschiedlichen Traumagruppen keine signifikanten Unterschiede. Mit $p = 0,047$, $0,004$ und $0,001$ zeigten sich die Insulinwerte aller Traumagruppen lediglich gegenüber denen der Kontrollgruppe signifikant erhöht, wobei die Werte der Fx-Gruppe der Kontrollgruppe

bezüglich der Plasmainsulinspiegel am nächsten und die der Kombinationstraumagruppe am entferntesten lagen. In Woche drei zeigte schließlich erneut das Kombinationstrauma signifikant erhöhte Insulinwerte gegenüber Tieren der Fx- und Kontrollgruppe mit $p = 0,02$ und $p = 0,009$, bevor sich alle Versuchsgruppen in der vierten Versuchsgruppe auf statistisch gleichem Niveau befanden. Siehe dazu **Abbildung 3.1**.

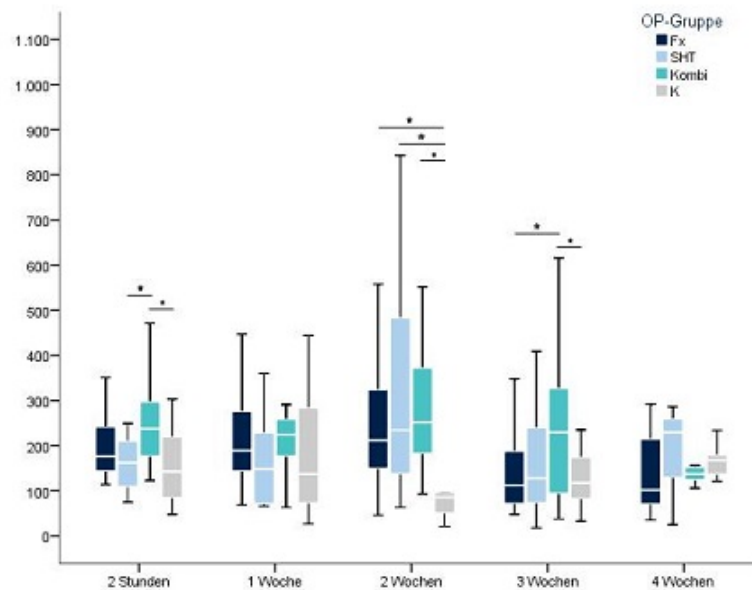


ABBILDUNG 3.1: Von Ausreißern und Extremwerten bereinigte Plasma-/Seruminsulinkonzentrationen der 4 Traumagruppen innerhalb der WT-Tiere in pg/ml

* signifikante Differenz der postoperativen Insulinkonzentration

3.1.2 Osteocalcin

Aus den für die Plasma- und Serum-OCN-Spiegel der WT-Tiere ergaben sich laut Kolmogorow-Smirnow- und Saphiro-Wilk-Test erneut zum Teil nicht-normalverteilte Stichproben. In einem zweiten Schritt erfolgte, erneut um mögliche Fehler in der Durchführung der Hormontestung auszugleichen und zudem eine größtmögliche Homogenität der einzelnen Traumagruppen für die später durchzuführende Teststatistik zu erreichen, entsprechend den Insulinwerten oben, der Ausschluss von Ausreißern und Extremwerten aus dem Datenmaterial nach entsprechender SPSS-Ausreißer-/Extremwertdefinition. Hieraus ergaben sich die in **Tabelle 3.3** dargestellten Mittel- und Medianwerte sowie die sich wiederum daraus ergebenden Standardabweichungen und Standardfehler des Mittelwerts und deren Konfidenzintervalle.

Hierbei zeigte sich zwei Stunden postoperativ ein erhöhter Abfall des mittleren Plasma-OCN-Werts nach Kombitrauma mit einem Mittelwert von nur 47920,29 pg/ml (Median 51891 pg/ml,

SD \pm 15132,320pg/ml) im Vergleich zu Fx- und K-Tieren. Der Mittelwert der SHT-Gruppe zeigte sich zu diesem Zeitpunkt mit einem Mittelwert von 50842,15 pg/ml (Median 49638 pg/ml, SD \pm 17098,637pg/ml) sogar leicht erhöht. Im Verlauf der ersten zwei postoperativen Wochen kam es für OCN in WT-Tieren anders als bei Insulin nicht zu einem Anstieg, sondern zu einem Abfall der Plasmaspiegel. Dabei zeigten sich die Hormonspiegel nach Fx und Kombitrauma gegenüber den K-Tieren nach einer Woche deutlich erniedrigt, während Tiere mit SHT nach einer und zwei Wochen mit den K-Tieren vergleichbare oder sogar diesen gegenüber erhöhte OCN-Werte zeigten. Ähnlich wie auch für Insulin kam es ab der dritten postoperativen Woche zu einer Erholung der Plasmaspiegel auf Ausgangs- und Kontrollniveau, wobei sich die Normalisierung nach SHT verzögert darstellte und die OCN-Serumspiegel nach Kombinationstrauma sich gegen Ende des Beobachtungszeitraums gegenüber den K und übrigen Traumagruppen erhöht zeigten.

TABELLE 3.3: Von Ausreißern und Extremwerten bereinigte deskriptive Statistik der Plasma-/Serum-OCN für WT-Tiere in pg/ml

OP-Gruppe		Statistik	Standardfehler		
OCN 2 Stunden	Fx	Mittelwert	48558,92	4120,71	
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		39580,67 57537,18
		Median	50064		
		Standardabweichung	14857,431		
	SHT	Mittelwert	50842,15	4742,309	
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		40509,55 61174,76
		Median	49638		
		Standardabweichung	17098,637		
	Kombi	Mittelwert	47920,29	4044,283	
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		39183,14 56657,43
Median		51891			
Standardabweichung		15132,320			
K	Mittelwert	48728	4223,538		
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		39432,06 58023,94	
	Median	46701			
	Standardabweichung	14630,766			
OCN 1 Woche	Fx	Mittelwert	34669,2	2618,385	
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		28746 40592,4
		Median	34263		
		Standardabweichung	8280,061		
	SHT	Mittelwert	42541,09	4464,778	
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		32592,95 52489,24
		Median	39078		
		Standardabweichung	14807,993		

OP-Gruppe		Statistik	Standardfehler		
OCN 1 Woche	Kombi	Mittelwert	26640	3095,584	
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		19952,4 33327,6
		Median	27711		
		Standardabweichung	11582,615		
K	Mittelwert	41021,5	3467,072		
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		33390,53 48652,47	
	Median	38490			
	Standardabweichung	12010,291			
OCN 2 Wochen	Fx	Mittelwert	44482,5	2184,113	
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		39317,89 49647,11
		Median	41892		
		Standardabweichung	6177,603		
SHT	Mittelwert	56147,08	6048,14		
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		42969,31 69324,84	
	Median	61596			
	Standardabweichung	21806,879			
Kombi	Mittelwert	28235,57	3778,29		
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		20073,07 36398,07	
	Median	29733			
	Standardabweichung	14137,065			
K	Mittelwert	41115	2863,604		
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		34812,25 47417,75	
	Median	43104			
	Standardabweichung	9919,814			
OCN 3 Wochen	Fx	Mittelwert	41503	2662,018	
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		35643,94 47362,06
		Median	42093		
		Standardabweichung	9221,499		
SHT	Mittelwert	66328,71	3578,521		
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		58597,79 74059,64	
	Median	68655			
	Standardabweichung	13389,599			
Kombi	Mittelwert	49762,4	4723,938		
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		39630,56 59894,24	
	Median	55104			
	Standardabweichung	18295,734			
K	Mittelwert	53314,5	4385,933		
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		43661,13 62967,87	
	Median	51717			
	Standardabweichung	15193,317			

		OP-Gruppe		Statistik	Standardfehler
OCN 4 Wochen	Fx	Mittelwert		54906	5792,031
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze	41210,02	
			Obergrenze	68601,98	
		Median		53106	
		Standardabweichung		16382,338	
	SHT	Mittelwert		50244	5137,588
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze	38095,54	
			Obergrenze	62392,46	
		Median		44862	
		Standardabweichung		14531,293	
	Kombi	Mittelwert		58322,57	6842,758
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze	41578,95	
			Obergrenze	75066,2	
		Median		64470	
		Standardabweichung		18104,235	
	K	Mittelwert		54557,25	4379,791
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze	44200,69	
			Obergrenze	64913,81	
		Median		55719	
		Standardabweichung		12387,919	

Wiederum wurden die verschiedenen OP-Gruppen weiter auf insbesondere traumaspezifische Unterschiede im Plasma-/Serum-SCN-Gehalt hin untersucht. Hierbei kam es, wie an den Mittelwerten oben bereits kurz erläutert, bei Fx- und Kombitraumatieren zu einem postoperativen OCN-Abfall in den ersten zwei Wochen, dessen Werte in den Wochen drei und vier dann wieder auf das Niveau der Kontrolltiere anstiegen. Mäuse mit isoliertem SHT zeigten im Gegensatz dazu in den Wochen zwei und drei sogar erhöhte Plasma-OCN-Konzentrationen im Vergleich zu den Kontroll- und übrigen Traumatieren.

In der hierzu durchgeführten ANOVA konnte dementsprechend mit $p = 0,006$, $p = 0,000$ und $p = 0,001$ eine hohe traumaspezifische Signifikanz nach einer, zwei und drei Wochen festgestellt werden, wobei die F-Werte hierfür bei 4,702, 7,888 und 6,588 lagen (siehe **Tabelle 3.4**).

TABELLE 3.4: ANOVA der Plasma-/Serum-OCN-Konzentrationen für WT-Tiere

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
OCN 2 Stunden	Zwischen Gruppen	63853274,604	3	21284424,868	,089	,966
	Innerhalb der Gruppen	11488764527,473	48	239349260,989		
	Gesamtsumme	11552617802,077	51			
OCN 1 Woche	Zwischen Gruppen	2014340103,427	3	671446701,142	4,702	,006
	Innerhalb der Gruppen	6140559893,509	43	142803718,454		
	Gesamtsumme	8154899996,936	46			
OCN 2 Wochen	Zwischen Gruppen	5312946967,138	3	1770982322,379	7,888	,000
	Innerhalb der Gruppen	9654184768,352	43	224515924,845		
	Gesamtsumme	14967131735,489	46			
OCN 3 Wochen	Zwischen Gruppen	4231475201,222	3	1410491733,741	6,588	,001
	Innerhalb der Gruppen	10491534115,457	49	214112941,132		
	Gesamtsumme	14723009316,679	52			
OCN 4 Wochen	Zwischen Gruppen	248123206,141	3	82707735,380	,349	,79
	Innerhalb der Gruppen	6397580109,214	27	236947411,452		
	Gesamtsumme	6645703315,355	30			

In der angeschlossenen post-hoc-Analyse mittels Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche konnte dabei in Woche eins eine signifikante Plasmakonzentrationserniedrigung nach Kombitraum gegenüber isoliertem SHT ($p = 0,012$) und den K-Tieren ($p = 0,023$) festgestellt werden. In Woche 2 blieb davon nur eine hochsignifikante Erniedrigung der OCN-Werte nach Kombitraum im Vergleich zu den stark angestiegenen OCN-Werten des isolierten SHT bestehen ($p = 0,000$), während in Woche 3 durch den weiteren Anstieg des Plasma-OCN in der SHT-Gruppe diese nun signifikant höhere Werte aufwies als bei Tieren nach Fx als auch nach Kombitraum ($p = 0,000$ und $p = 0,022$). Gleichzeitig näherten sich die OCN-Spiegel der Fx- und Kombinationstraumatiere denen der Kontrolltiere über die Zeit bis zum Ende des Beobachtungszeitraums erneut an, wobei die Hormonspiegel nach Kombitraum die der Kontrolltiere am Ende des Beobachtungszeitraums sogar überstiegen, was schließlich jedoch zu keiner neuen Signifikanz führte (siehe dazu **Abbildung 3.2**).

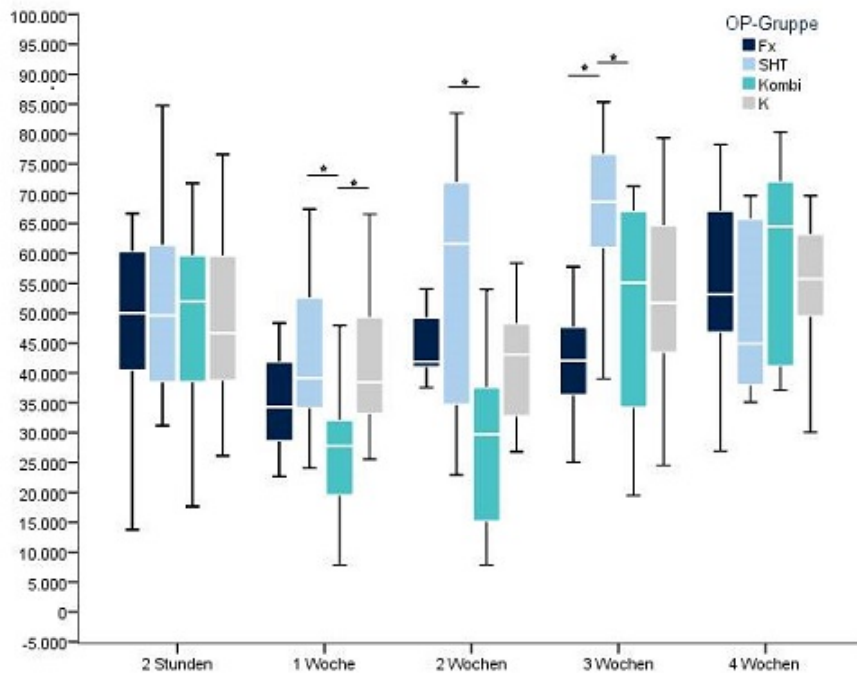


ABBILDUNG 3.2: Von Ausreißern und Extremwerten bereinigte Plasma-/Serum-OCN-Konzentrationen der 4 Traumagruppen der WT-Tiere in pg/ml

* signifikante Differenz der postoperativen OCN-Konzentration

3.2 Leptin-Defizienz-Tiere

3.2.1 Insulin

Auch bei den Leptin-Defizienz-Tieren ergaben sich laut Kolmogorow-Smirnow- und Saphiro-Wilk-Test erneut zum Teil nicht-normalverteilte Stichproben. In einem zweiten Schritt erfolgte, wiederum um mögliche Fehler in der Durchführung der Hormontestung auszugleichen und zudem eine größtmögliche Homogenität der einzelnen Traumagruppen für die später durchzuführende Teststatistik zu erreichen, entsprechend den WT-Tieren oben, der Ausschluss von Ausreißern und Extremwerten aus dem Datenmaterial nach entsprechender SPSS-Ausreißer-/Extremwertdefinition. Hieraus ergaben sich die in **Tabelle 3.5** dargestellten Mittel- und Medianwerte sowie die sich daraus ergebenden Standardabweichungen und Standardfehler des Mittelwerts und entsprechende Konfidenzintervalle.

Es zeigte sich die bei Leptin-Defizienz zu erwartende und bereits bei *Lindström 2007* beschriebene starke allgemeine Erhöhung der Insulinwerte über alle Gruppen hinweg [70]. Weiterhin konnte zudem, ähnlich wie bei den WT-Tieren, ein zusätzlicher postoperativer Insulinanstieg für Tiere nach Fx, SHT und Kombitrauma verzeichnet werden. Hierbei zeigten Leptin-Defizienz-Tiere mit isolierter Fx einen schnelleren Hormonanstieg als die übrigen Traumagruppen und

erreichten dabei bereits eine Woche postoperativ maximale Mittelwerte von 75582,67 pg/ml (Median 82188,00 pg/ml, SD \pm 58741,086 pg/ml). Vergleichbar hohe Insulinwerte wurden mit von Tieren mit isoliertem SHT oder Kombitrauma erst in der zweiten postoperativen Woche erreicht, während der Hormonspiegel der Fx-Tiere sich ab Woche zwei bereits wieder auf dem Weg der Normalisierung befand. In den Wochen drei und vier kam es daran anschließend auch bei Tieren mit SHT oder Kombitrauma zu einem Abfall der Plasma- und Seruminsulinwerte sogar unter Ausgangs- und Kontrollniveau.

TABELLE 3.5: Von Ausreißern und Extremwerten bereinigte deskriptive Statistik der Plasma-/Seruminsulinwerte für Leptin-Defizienz-Tiere in pg/ml

OP-Gruppe		Statistik	Standardfehler	
Insulin	Fx	Mittelwert	20753,71	2356,307
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 15663,22 Obergrenze 25844,21	
		Median	21320	
		Standardabweichung	8816,494	
	SHT	Mittelwert	38205,43	7228,823
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 22588,51 Obergrenze 53822,35	
		Median	33472	
		Standardabweichung	27047,78	
	Kombi	Mittelwert	21214,67	2624,73
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 15585,18 Obergrenze 26844,15	
		Median	19064	
		Standardabweichung	10165,535	
	K	Mittelwert	37596,57	10734,97
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 14405,08 Obergrenze 60788,06	
		Median	19026	
		Standardabweichung	40166,58	
Insulin 1 Woche	Fx	Mittelwert	75582,67	15166,883
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 43052,94 Obergrenze 108112,4	
		Median	82188	
		Standardabweichung	58741,086	
	SHT	Mittelwert	49921,29	8344,556
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 31893,97 Obergrenze 67948,6	
		Median	47934	
		Standardabweichung	31222,471	

OP-Gruppe			Statistik	Standardfehler
Insulin 1 Woche	Kombi	Mittelwert	49440,67	12913,485
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 21744 Obergrenze 77137,34	
		Median	25536	
		Standardabweichung	50013,714	
	K	Mittelwert	61332,86	9448,42
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 40920,79 Obergrenze 81744,93	
		Median	66022	
		Standardabweichung	35352,75	
Insulin 2 Wochen	Fx	Mittelwert	33749,29	5808,127
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 21201,59 Obergrenze 46296,98	
		Median	30419	
		Standardabweichung	21732,022	
	SHT	Mittelwert	75998,67	12351,383
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 49507,59 Obergrenze 102489,75	
		Median	84300	
		Standardabweichung	47836,7	
	Kombi	Mittelwert	72802	13821,238
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 43158,39 Obergrenze 102445,61	
		Median	62772	
		Standardabweichung	53529,424	
K	Mittelwert	40638,46	5098,901	
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 29528,91 Obergrenze 51748,01		
	Median	36444		
	Standardabweichung	18384,349		
Insulin 3 Wochen	Fx	Mittelwert	8112,86	2703,126
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 2273,11 Obergrenze 13952,61	
		Median	3058	
		Standardabweichung	10114,171	
	SHT	Mittelwert	47467,6	11681,093
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 22414,15 Obergrenze 72521,05	
		Median	28572	
		Standardabweichung	45240,677	
	Kombi	Mittelwert	6551	2237,089
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 1627,2 Obergrenze 11474,8	
		Median	3992	
		Standardabweichung	7749,505	
K	Mittelwert	15490,13	2030,98	
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 11134,11 Obergrenze 19846,15		
	Median	17760		
	Standardabweichung	7865,953		

OP-Gruppe		Statistik	Standardfehler	
Inulin 4 Wochen	Fx	Mittelwert	1417,67	225,119
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 898,54 Obergrenze 1936,79	
		Median	1204	
		Standardabweichung	675,357	
	SHT	Mittelwert	6768,11	783,591
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 4961,15 Obergrenze 8575,08	
		Median	6396	
		Standardabweichung	2350,773	
	Kombi	Mittelwert	1837,13	373,651
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 953,58 Obergrenze 2720,67	
		Median	2177,5	
		Standardabweichung	1056,845	
	K	Mittelwert	10877,5	2656,319
95 % Konfidenzintervall für Mittelwert		Untergrenze 4596,3 Obergrenze 17158,7		
Median		10825		
Standardabweichung		7513,204		

Auch innerhalb der Leptin-Defizienz-Tiere wurden die verschiedenen OP-Gruppen auf ihre dezidiert traumaspezifischen Unterschiede im Plasma-/Seruminsulingehalt hin untersucht. Hierbei kam es, wie durch die Entwicklung der Mittelwerte oben bereits skizziert, ähnlich wie schon bei den WT-Mäusen in allen Traumagruppen zu einem postoperativen Insulinanstieg, der etwa in Woche zwei seinen Höhepunkt erreichte, um dann in den Wochen drei und vier sogar unter das Niveau der Kontrolltiere abzufallen. Mäuse mit Fx zeigten dabei erneut einen größeren und schnelleren Insulinanstieg im Gegensatz zu Tieren mit isoliertem SHT, wobei Tiere der Kombinationstraumagruppe nun einen mittleren Platz einnahmen. Tiere mit isoliertem SHT hatten zudem einen verzögerten Insulinabfall erst vier Wochen postoperativ.

In der durchgeführten ANOVA konnte bei Leptin-Defizienz mit einem $p = 0,008$ bzw. je $0,000$ und einem F-Wert von $4,334$, $8,673$ bzw. $11,073$ eine traumaspezifische Signifikanz für die Wochen zwei, drei und vier festgestellt werden (siehe dazu **Tabelle 3.6**).

TABELLE 3.6: ANOVA der Plasma-/Seruminsulinkonzentrationen für Leptin-Defizienz-Tiere

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
Insulin 2 Stunden	Zwischen Gruppen	4077091621,514	3	1359030540,505	2,187	,100
	Innerhalb der Gruppen	32941406019,048	53	621535962,624		
	Gesamtsumme	37018497640,561	56			
Insulin 1 Woche	Zwischen Gruppen	6723547714,486	3	2241182571,495	1,078	,366
	Innerhalb der Gruppen	112246989141,238	54	2078647947,06		
	Gesamtsumme	118970536855,724	57			
Insulin 2 Wochen	Zwischen Gruppen	20203623114,052	3	6734541038,017	4,334	,008
	Innerhalb der Gruppen	82347949323,421	53	1553734892,895		
	Gesamtsumme	102551572437,474	56			
Insulin 3 Wochen	Zwischen Gruppen	15765988887,167	3	5255329629,056	8,673	,000
	Innerhalb der Gruppen	31510746359,048	52	605975891,52		
	Gesamtsumme	47276735246,214	55			
Insulin 4 Wochen	Zwischen Gruppen	499170080,736	3	166390026,912	11,073	,000
	Innerhalb der Gruppen	450814045,764	30	15027134,859		
	Gesamtsumme	949984126,5	33			

In der angeschlossenen post-hoc-Analyse mittels Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche wiesen, bei einem p-Wert von 0,034, Tiere mit Fx nach zwei Wochen signifikant niedrigere Werte auf als Tiere mit isoliertem SHT. Zudem zeigte sich hier ebenfalls eine Tendenz zur Signifikanz zwischen den niedrigen Werten der Fx-Tiere und den fast auf dem Niveau der SHT-Tiere liegenden Insulinspiegel der Kombinationstraumatiere ($p=0,061$). Nach drei Wochen zeigten sich die Plasmainsulinwerte der SHT-Gruppe dann hoch signifikant erhöht gegenüber allen anderen Gruppen, wobei der entsprechende p-Wert gegenüber der Fx- und der Kombi-Gruppe bei 0,000 und gegenüber den K-Tieren bei 0,005 lag. Nach vier Wochen zeigte sich der Insulinerumspiegel der Fx-Tiere mit $p = 0,039$ und $p = 0,000$ erneut gegenüber der SHT- und der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt. Ebenso ergab sich zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Differenz zwischen den niedrigen Werten der Kombinationstraumagruppe und den K-Tieren mit ebenfalls $p = 0,000$ (siehe **Abbildung 3.3**).

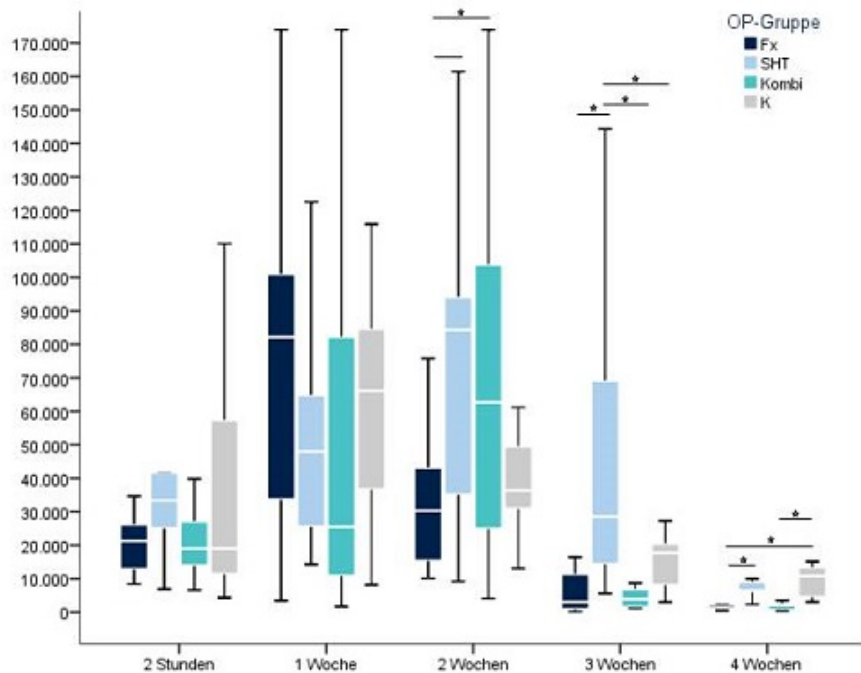


ABBILDUNG 3.3: Von Ausreißern und Extremwerten bereinigte Plasma-/Seruminsulinkonzentrationen innerhalb der Leptin-Defizienz-Tiere in pg/ml

* signifikante Differenz der postoperativen Insulinkonzentration

3.2.2 Osteocalcin

Aus den Plasma-OCN-Werten der Leptin-Defizienz-Tiere ergaben sich laut Kolmogorow-Smirnow und Saphiro-Wilk-Test erneut zum Teil nicht-normalverteilte Stichproben. In einem zweiten Schritt erfolgte wiederum entsprechend den WT-Tieren oben, der Ausschluss von Ausreißern und Extremwerten aus dem Datenmaterial nach entsprechender SPSS-Ausreißer-/Extremwertdefinition. Hieraus ergaben sich erneut die in **Tabelle 3.7** dargestellten Mittel- und Medianwerte sowie die sich daraus ergebenden Standardabweichungen und Standardfehler des Mittelwerts und entsprechende Konfidenzintervalle.

Anders als für das Hormon Insulin lagen die Plasma- und Serum-OCN-Werte bei Leptin-Defizienz auf vergleichbarem Niveau wie bei den oben beschriebenen WT-Tieren. Ebenso wie bereits für die WT-Tiere beschrieben, kam es hier zu einem vergleichbaren postoperativen Absinken der Plasmawerte, welches bereits in der ersten postoperativen Woche seinen Zenit erreichte, bevor es im folgenden Beobachtungszeitraum zu einer Erholung der OCN-Spiegel leicht über das Ausgangsniveau kam. Hierbei schienen insbesondere Tiere mit SHT und Kombitrauma initial einen leicht verstärkten Hormonabfall zu zeigen, wobei bei Leptin-Defizienz jedoch im Gegensatz zu WT-Tieren keine weitere Traumaspezifik des Hormonverlaufs sichtbar wurde.

TABELLE 3.7: Von Ausreißern und Extremwerten bereinigte deskriptive Statistik der Plasma-/Serum-OCN-Werte für Leptin-Defizienz-Tiere in pg/ml

OP-Gruppe			Statistik	Standardfehler
OCN 2 Stunden	Fx	Mittelwert	35025,86	3071,704
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 28389,84 Obergrenze 41661,87	
		Median	36669	
		Standardabweichung	11493,263	
	SHT	Mittelwert	35225	3003,618
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 28782,88 Obergrenze 41667,12	
		Median	39258	
		Standardabweichung	11632,964	
	Kombi	Mittelwert	39434,8	4174,423
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 30481,55 Obergrenze 48388,05	
		Median	40236	
		Standardabweichung	16167,471	
K	Mittelwert	34239,6	3512,496	
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 26706,05 Obergrenze 41773,15		
	Median	32046		
	Standardabweichung	13603,837		
OCN 1 Woche	Fx	Mittelwert	10170,77	1601,437
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 6681,54 Obergrenze 13660	
		Median	9030	
		Standardabweichung	5774,064	
	SHT	Mittelwert	7129,43	1131,424
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 4685,14 Obergrenze 9573,72	
		Median	6416	
		Standardabweichung	4233,4	
	Kombi	Mittelwert	7613,6	373,886
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 6767,81 Obergrenze 8459,39	
		Median	7761	
		Standardabweichung	1182,332	
K	Mittelwert	23561,14	2973,233	
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 17137,86 Obergrenze 29984,42		
	Median	25803		
	Standardabweichung	11124,82		
OCN 2 Wochen	Fx	Mittelwert	11126,33	1195,139
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 8495,85 Obergrenze 13756,82	
		Median	11255	
		Standardabweichung	4140,084	
	SHT	Mittelwert	11591	1684,824
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze 7951,16 Obergrenze 15230,84	
		Median	10334	
		Standardabweichung	6304,033	

OP-Gruppe		Statistik	Standardfehler			
OCN 2 Wochen	Kombi	Mittelwert	12568,13	1545,651		
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		9253,04 15883,23	
		Median	10376			
		Standardabweichung	5986,281			
	K	Mittelwert	25718,14		2798,504	
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze			19672,34 31763,94
		Median	26370			
		Standardabweichung	10471,043			
OCN 3 Wochen	Fx	Mittelwert	39361,71	5297,285		
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		27917,63 50805,8	
		Median	40365			
		Standardabweichung	19820,626			
	SHT	Mittelwert	30087,86	4386,668		
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		20611,04 39564,68	
		Median	28419			
		Standardabweichung	16413,408			
	Kombi	Mittelwert	41857,2	6178,095		
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		28606,5 55107,9	
		Median	43098			
		Standardabweichung	23927,66			
K	Mittelwert	40162,71	3274,187			
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		33089,26 47236,16		
	Median	41238				
	Standardabweichung	12250,884				
OCN 4 Wochen	Fx	Mittelwert	42997,2	3255,412		
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		35632,95 50361,45	
		Median	46320			
		Standardabweichung	10294,515			
	SHT	Mittelwert	46846	1089,983		
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		44044,11 49647,89	
		Median	47280			
		Standardabweichung	2669,903			
	Kombi	Mittelwert	42783,33	5141,879		
		95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		30926,14 54640,53	
		Median	47334			
		Standardabweichung	15425,637			
K	Mittelwert	68016,75	1905,88			
	95 % Konfidenzintervall für Mittelwert	Untergrenze Obergrenze		63510,06 72523,44		
	Median	68631				
	Standardabweichung	5390,644				

Zum Schluss wurden auch hier erneut die verschiedenen Traumagruppen gezielt auf traumaspezifische Unterschiede im Plasma-/Serum-OCN-Gehalt hin untersucht. Hierbei kam es, wie an den Mittelwerten oben bereits zu erkennen, wie schon bei den WT-Mäusen in allen Traumagruppen zu einem postoperativen OCN-Abfall, der zwischen Woche eins und zwei seinen Tiefpunkt erreichte, um dann ab Woche drei erneut auf und sogar über Ausgangsniveau anzusteigen.

In der auch hier durchgeführten ANOVA zeigten sich mit $p = 0,000$ und mit F-Werten von 16,858, 13,130 und 11,278 signifikante traumaabhängige OCN-Werte in den Wochen eins, zwei und vier (siehe **Tabelle 3.8**).

TABELLE 3.8: ANOVA der Plasma-/Serum-OCN-Konzentrationen für Leptin-Defizienz-Tiere

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
OCN 2 Stunden	Zwischen Gruppen	245747257,031	3	81915752,344	,457	,714
	Innerhalb der Gruppen	9862119409,714	55	179311261,995		
	Gesamtsumme	10107866666,746	58			
OCN 1 Woche	Zwischen Gruppen	2425979636,306	3	808659878,769	16,858	,000
	Innerhalb der Gruppen	2254541811,851	47	47968974,72		
	Gesamtsumme	4680521448,157	50			
OCN 2 Wochen	Zwischen Gruppen	2032952351,231	3	677650783,744	13,13	,000
	Innerhalb der Gruppen	2632227460,114	51	51612303,139		
	Gesamtsumme	4665179811,345	54			
OCN 3 Wochen	Zwischen Gruppen	1190816731,435	3	396938910,47	1,133	,344
	Innerhalb der Gruppen	18575898437,829	53	350488649,770		
	Gesamtsumme	19766715169,263	56			
OCN 4 Wochen	Zwischen Gruppen	3612735790,9	3	1204245263,633	11,278	,000
	Innerhalb der Gruppen	3096450793,1	29	106774165,279		
	Gesamtsumme	6709186584	32			

In der auch hier angeschlossenen post-hoc-Analyse mittels Bonferroni-Korrektur für Mehrfachvergleiche zeigten sich diese Signifikanzen mit p-Werten zwischen 0,000 und 0,04, wie in **Abbildung 3.4** dargestellt, jedoch einzig und allein im signifikanten Unterschied der Traumagruppen gegenüber den K-Tieren begründet. Statistisch signifikante und dezidiert von der Art des gesetzten Traumas abhängige Unterschiede konnten bei Leptin-Defizienz hier anders als bei den WT-Tieren nicht festgestellt werden.

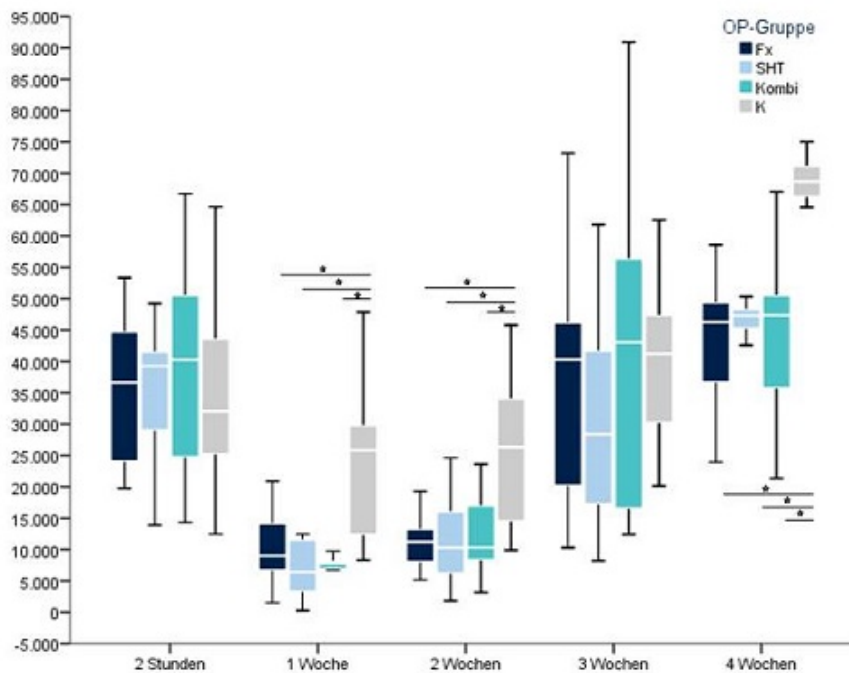


ABBILDUNG 3.4: Von Ausreißern und Extremwerten bereinigte Plasma-/Serum-OCN-Konzentrationen innerhalb der Leptin-Defizienz-Tiere in pg/ml

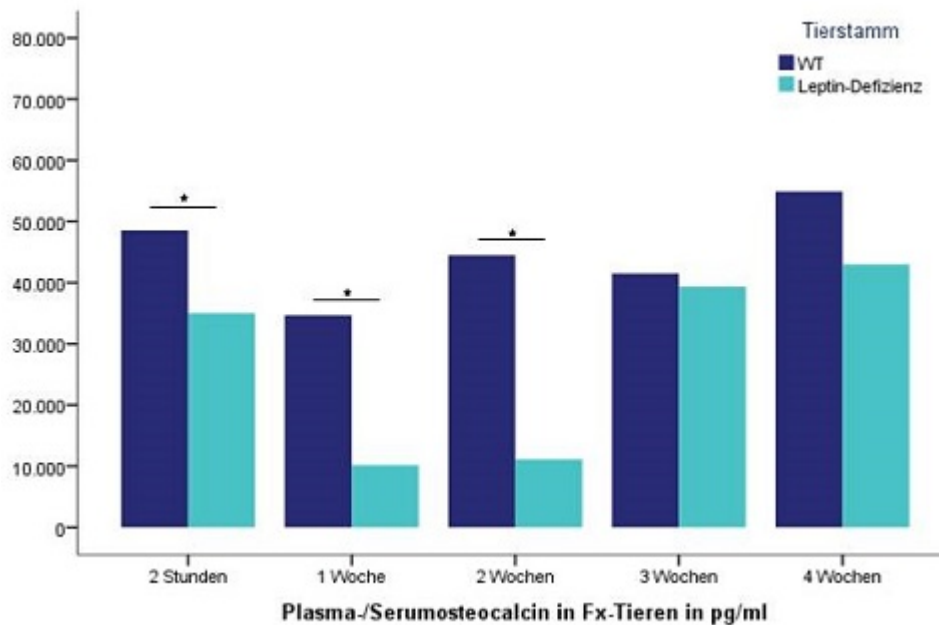
* signifikante Differenz der postoperativen OCN-Konzentration

3.3 Wildtyp-Tiere vs. Leptin-Defizienz-Tiere

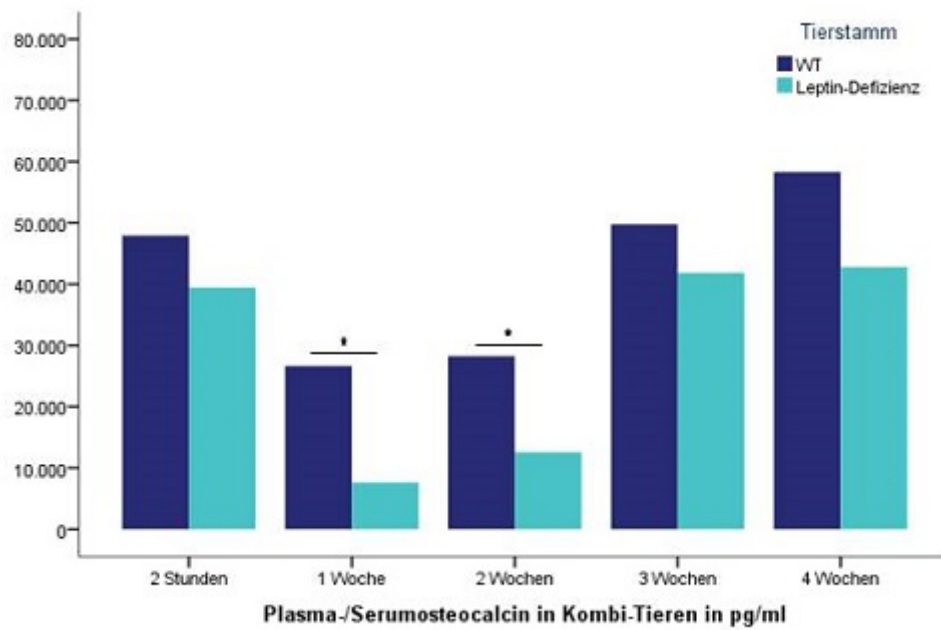
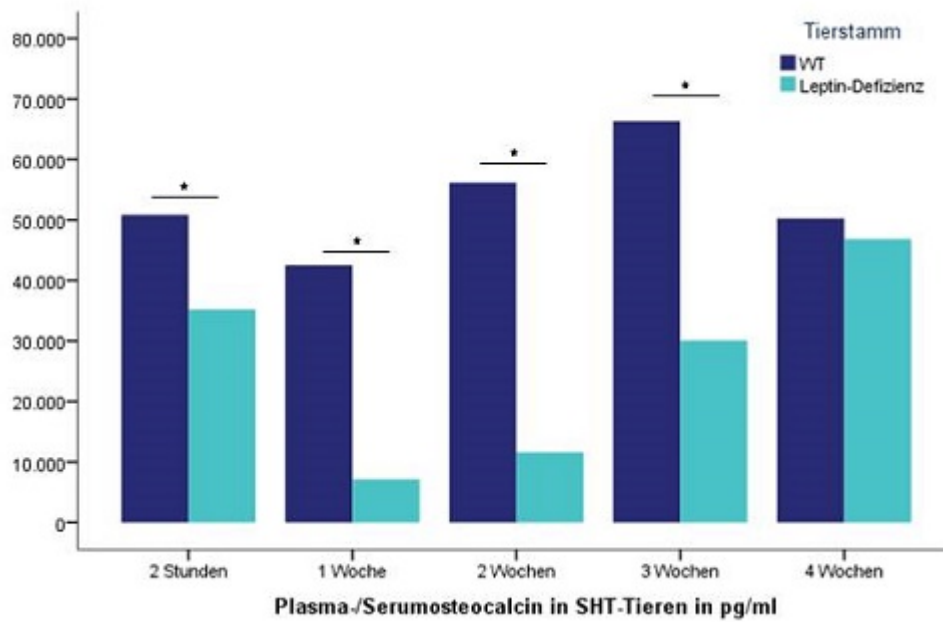
In einem weiteren Schritt erfolgte, nach der Analyse der gruppenspezifischen posttraumatischen Insulin- und OCN-Haushalte, getrennt in den beiden Tierstämmen, zur Ermittlung des vermuteten Leptineinflusses, ein direkter Vergleich der Hormonspiegel von WT- und Leptin-Defizienz-Tieren. Hierbei konnten nicht nur der für Leptin-defiziente Mäuse bereits vorbeschriebene Hyperinsulinismus mit ca. 250fach erhöhten Insulinwerten, sondern auch direkt oder indirekt leptinabhängige Veränderungen im postoperativen Hormonhaushalt der einzelnen Tierstämme festgestellt werden.

In Bezug auf Insulin zeigte sich dabei bei Leptin-Defizienz eine erhöhte posttraumatische Auslenkung der Plasma-/Serumkonzentration, die ca. dem achtfachen der postoperativen Schwankung innerhalb der WT-Tiere entsprach. Diese erhöhte Vulnerabilität des Insulinhaushalts nach Trauma zeigte sich insbesondere bei Fx- und Kombinationstrauma-Tieren, wobei der Zeitpunkt der höchsten Plasmainsulinkonzentration in WT- und Leptin-defizienten Mäusen gleichfalls in der zweiten Woche festzustellen war. Auf Grund der zugrundeliegenden hohen Konzentrationsunterschiede zwischen WT- und Leptindefizienz-Mäusen musste hier auf einen direkten, statistischen Vergleich verzichtet werden, da sich hieraus von vornherein eine unspezifische signifikante Differenz ergibt.

Beim Vergleich der Plasma- und Serum-OCN-Werte zwischen den beiden Tierstämmen zeigten sich, wie in **Abbildung 3.5** dargestellt, im Gegensatz zu Insulin vergleichbare Ausgangsspiegel. Die posttraumatische Auslenkung von OCN-Plasma-/-Serumkonzentration war im Folgenden jedoch bei Leptin-Defizienz erneut erhöht, sodass sie ca. dem doppelten der postoperativen Schwankung innerhalb der WT-Tiere entsprach. Diese erhöhte Vulnerabilität des OCN-Haushalts nach Trauma zeigte sich dabei für alle Traumagruppen gleichermaßen ausgeprägt, sodass die bei WT-Tieren beobachtete Traumaspezifität hier durch den Wegfall von Leptin zu verschwinden schien. Zudem erschien die Auslenkung des Plasma-OCN-Gehalts bei Leptin-Defizienz protrahiert zu sein, sodass hier die Hormonsenke bis zur dritten postoperativen Woche anhielt, während sie bei WT-Tieren bereits in Woche zwei regredient war. Lediglich bei Vorliegen eines Kombitraumas erholten sich die OCN-Plasmaspiegel auch hier erst in der dritten Woche postoperativ.



* signifikante Differenz der postoperativen OCN-Konzentration



* signifikante Differenz der postoperativen OCN-Konzentration

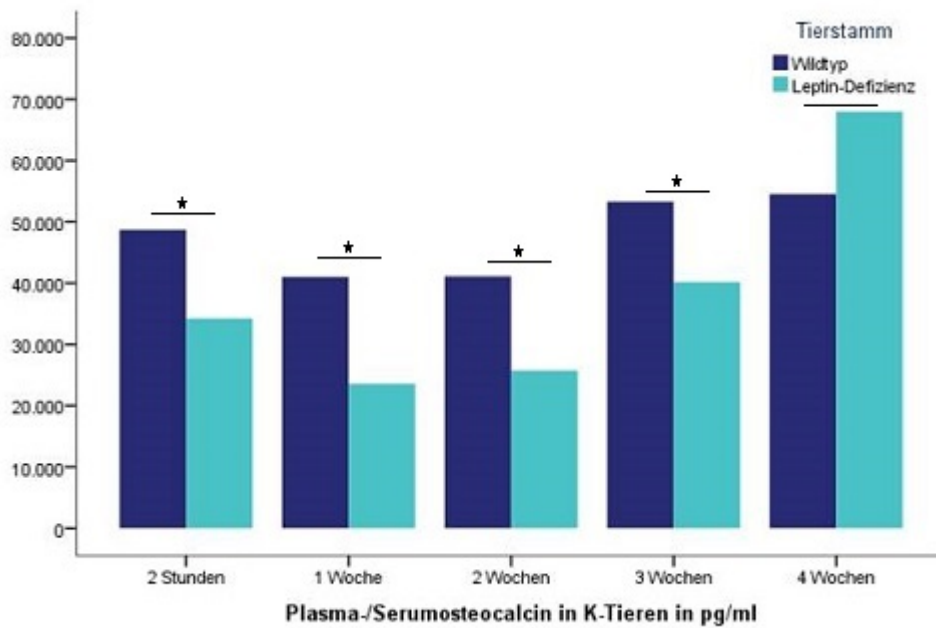


ABBILDUNG 3.5: Tierstammvergleich der mittleren Plasma-/Serum-OCN-Konzentrationen in pg/ml

* signifikante Differenz der postoperativen OCN-Konzentration

Hierbei zeigten sich mit einem $p = 0,013$ und je $p = 0,000$ sowie F-Werten von 7,069, 70,039 und 210,962 die OCN-Werte der Leptin-defizienten Fx-Tiere von 2 Stunden bis 2 Wochen nach Trauma hochsignifikant größer abfallend als die ihrer WT-Partner (siehe **Tabelle 3.9**).

TABELLE 3.9: ANOVA der Plasma-/Serum-OCN-Konzentrationen der Fx-Tiere mit und ohne Leptin

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
OCN 2 Stunden	Zwischen Gruppen	1234525370,029	1	1234525370,029	7,069	,013
	Innerhalb der Gruppen	4366155128,637	25	174646205,145		
	Gesamtsumme	5600680498,667	26			
OCN 1 Woche	Zwischen Gruppen	3392282796,527	1	3392282796,527	70,039	,000
	Innerhalb der Gruppen	1017112477,908	21	48433927,519		
	Gesamtsumme	48433927,519	22			
OCN 2 Wochen	Zwischen Gruppen	5340642502,533	1	5340642502,533	210,962	,000
	Innerhalb der Gruppen	455682756,667	18	25315708,704		
	Gesamtsumme	5796325259,2	19			
OCN 3 Wochen	Zwischen Gruppen	29626829,143	1	29626829,143	,118	,735
	Innerhalb der Gruppen	6042540258,857	24	251772510,786		
	Gesamtsumme	6072167088	25			
OCN 4 Wochen	Zwischen Gruppen	630308966,4	1	630308966,4	3,56	,077
	Innerhalb der Gruppen	2832460401,6	16	177028775,1		
	Gesamtsumme	3462769368	17			

Zudem zeigten sich mit einem $p = 0,008$ und je $p = 0,000$ sowie F-Werten von 8,174, 73,241, 53,759 und 40,981 die OCN-Werte der Leptin-defizienten SHT-Tiere ebenfalls von 2 Stunden bis 3 Wochen nach Trauma hochsignifikant größer abfallend als die ihrer WT-Partner (siehe **Tabelle 3.10**).

TABELLE 3.10: ANOVA der Plasma-/Serum-OCN-Konzentrationen der SHT-Tiere mit und ohne Leptin

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
OCN 2 Stunden	Zwischen Gruppen	1698557906,415	1	1698557906,415	8,174	,008
	Innerhalb der Gruppen	5402922681,692	26	207804718,527		
	Gesamtsumme	7101480588,107	27			
OCN 1 Woche	Zwischen Gruppen	7724552709,822	1	7724552709,822	73,241	,000
	Innerhalb der Gruppen	2425748374,338	23	105467320,623		
	Gesamtsumme	10150301084,16	24			
OCN 2 Wochen	Zwischen Gruppen	13382015048,929	1	13382015048,929	53,759	,000
	Innerhalb der Gruppen	6223110450,923	25	248924418,037		
	Gesamtsumme	19605125499,852	26			
OCN 3 Wochen	Zwischen Gruppen	9193798085,143	1	9193798085,143	40,981	,000
	Innerhalb der Gruppen	5832857432,571	26	224340670,484		
	Gesamtsumme	15026655517,714	27			
OCN 4 Wochen	Zwischen Gruppen	39587670,857	1	39587670,857	,314	,586
	Innerhalb der Gruppen	1513751160	12	126145930		
	Gesamtsumme	1553338830,857	13			

Für die Kombitraumatiere zeigten sich mit einem $p = 0,000$ und $p = 0,001$ bei F-Werten von 26,447 und 15,483 die OCN-Werte bei Leptin-Defizienz lediglich in Woche 1 und 2 nach Trauma hochsignifikant stärker abfallend als die ihrer WT-Partner (siehe **Tabelle 3.11**).

TABELLE 3.11: ANOVA der Plasma-/Serum-OCN-Konzentrationen der Kombi-Tiere mit und ohne Leptin

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
OCN 2 Stunden	Zwischen Gruppen	521404422,053	1	521404422,053	2,121	,157
	Innerhalb der Gruppen	521404422,053	27	245787126,121		
	Gesamtsumme	7157656827,31	28			
OCN 1 Woche	Zwischen Gruppen	2111689398,933	1	2111689398,933	26,447	,000
	Innerhalb der Gruppen	1756621918,4	22	79846450,836		
	Gesamtsumme	3868311317,333	23			
OCN 2 Wochen	Zwischen Gruppen	1777531360,631	1	1777531360,631	15,483	,001
	Innerhalb der Gruppen	3099833741,162	27	114808657,08		
	Gesamtsumme	4877365101,793	28			
OCN 3 Wochen	Zwischen Gruppen	468691402,8	1	468691402,8	1,0331	,318
	Innerhalb der Gruppen	12701735112	28	453633396,857		
	Gesamtsumme	13170426514,8	29			
OCN 4 Wochen	Zwischen Gruppen	950779937,286	1	950779937,286	3,439	,085
	Innerhalb der Gruppen	3870182229,714	14	276441587,837		
	Gesamtsumme	4820962167	15			

Erstaunlicherweise zeigten die Kontrolltiere mit und ohne Leptin mit $p = 0,013$, je $p = 0,001$ sowie $p = 0,022$ und $p = 0,014$ und bei F-Werten von 7,074, 14,794, 14,66, 5,974 und 7,94 zu allen Zeitpunkten signifikant bzw. hochsignifikant erniedrigte Werte gegenüber ihren WT-Partnern (siehe Tabelle 3.12).

TABELLE 3.12: ANOVA der Plasma-/Serum-OCN-Konzentrationen der K-Tiere mit und ohne Leptin

		Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Sig.
OCN 2 Stunden	Zwischen Gruppen	1399424897,067	1	1399424897,067	7,074	,013
	Innerhalb der Gruppen	4945553721,6	25	197822148,864		
	Gesamtsumme	6344978618,667	26			
OCN 1 Woche	Zwischen Gruppen	1969890923,901	1	1969890923,901	14,794	,001
	Innerhalb der Gruppen	3195618934,714	24	133150788,946		
	Gesamtsumme	5165509858,615	25			
OCN 2 Wochen	Zwischen Gruppen	1531793048,44	1	1531793048,44	14,66	,001
	Innerhalb der Gruppen	2507785279,714	24	104491053,321		
	Gesamtsumme	4039578328,154	25			
OCN 3 Wochen	Zwischen Gruppen	1117648866,758	1	1117648866,758	5,974	,022
	Innerhalb der Gruppen	4490299749,857	24	187095822,911		
	Gesamtsumme	5607948616,615	25			
OCN 4 Wochen	Zwischen Gruppen	724632561	1	724632561	7,94	,014
	Innerhalb der Gruppen	1277637111	14	91259793,643		
	Gesamtsumme	2002269672	15			

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Trauma und Hormonreaktionen

4.1.1 Störung der Homöostase

Der im Rahmen der vorliegenden Arbeit analysierte posttraumatische Hormonhaushalt ist, ebenso wie die bereits in der Einleitung beschriebene physiologische Interaktion von Insulin, Leptin und OCN, am ehesten innerhalb des größeren Zusammenhangs einer langfristigen Energiehomöostase zu betrachten, wobei hier das zentrale ebenso wie auch das knöchernen Trauma eine schwere, kurzfristige und unvorhersehbare Störung eines langfristig ausgeglichenen Energiehaushalts darstellt. Dabei ist zu bemerken, dass es sich sowohl beim zentralen Nervensystem als auch beim Skelettsystem um besonders energieaufwändige Organe handelt. Die konstante Deckung ihres hohen Energiebedarfs als auch ihr uneingeschränktes Funktionieren stellen des Weiteren zwei zentrale Faktoren für das Überleben des Individuums sowie das Fortbestehen seiner Art dar.

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine posttraumatische, akute Dysregulation in einer deutlichen Auslenkung der untersuchten Hormone nach zentraler oder knöcherner Verletzung. Dabei kommt es zu einer deutlichen Erhöhung des Insulin- und Abfall des OCN-Spiegels über alle Traumagruppen hinweg. Bemerkenswert dabei ist, dass innerhalb der WT-Tiere, die einer Femurosteotomie unterzogen wurden, also den Gruppen Fx oder Kombinationstrauma zugeordnet sind, eine stärkere bis signifikante Abweichung ihrer Hormonwerte von denen der Kontrolltiere zeigen. Nicht die Schwere der Verletzung (bei vergleichbarer physiologischer Beeinträchtigung nach isoliertem SHT und isolierter Femurosteotomie) sondern vielmehr die Beteiligung des knöchernen Systems zeigt sich hier entscheidend für die Ausprägung der folgenden hormonellen Reaktivität.

Zudem zeigt der Vergleich der vorliegenden Ergebnisse von WT- und Leptin-Defizienz-Tieren eine deutlich verstärkte posttraumatische Auslenkung von Insulin und OCN beim Fehlen von Leptin und bestätigt damit die in der Literatur z. B. von *Wei et al. 2008* und *Wang et al. 2011* untersuchte regulatorische Funktion des nach Kombinationstrauma in Serum und Kallus deutlich

erhöhten Hormons [105, 108]. Interessant ist in diesem Zusammenhang außerdem der bereits oben beschriebene Wegfall der bei WT-Tieren herausgearbeiteten verletzungsspezifischen Natur der posttraumatischen Hormonauslenkung in Leptin-Defizienz-Tieren.

Wie nun die hier beschriebene posttraumatische Hormondysregulation und der in der vorliegenden Studie auffällige Einfluss des zugrundeliegenden Traumas sowie des Hormons Leptin mit den bereits in der Einleitung beschriebenen Hormoninteraktionen und aktuellen Theorien zum Thema erklärt werden kann, soll in den folgenden Abschnitten beleuchtet werden. Insbesondere in der Auseinandersetzung mit der von *Peters et al. 2004* entwickelten Selfish-Brain-Theory soll dabei ein tieferes Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen und Regulationen sowie eine Einordnung der vorliegenden Ergebnisse in die aktuelle Studienlage erreicht werden [80].

4.1.2 Selfish-Brain-Theory

In der erstmals von *Peters et al. 2004* vorgestellten Theorie des „Selfish Brain“ kommt es zu einer Umwertung der Rolle des Gehirns im Hormon- und Energiehaushalt. Trotz seines bekannt hohen Energiebedarfs, seiner Substratspezifität, dem erschwerten Übertritt von Nährstoffen über die Blut-Hirn-Schranke sowie seiner Fähigkeit zur Plastizität und zur Regulation der meisten Körperfunktionen war das zentrale Nervensystem bis dahin zumeist als passiver Glucoserezipient verstanden worden, der seinen Energiebedarf über insulinunabhängige GLUT-1-Transporter allein abhängig vom Blutzuckergehalt zu decken bedurfte [79]. *Peters et al. 2004* stellten dem ein Konzept der aktiven zentralen Regulation des Glucose- und Insulinhaushalts entgegen, welches es dem Gehirn, insbesondere in Situationen des Ressourcenmangels, ermöglicht seinen eigenen Energiebedarf vor dem peripheren Organen zu sichern [80].

Grundlage hierfür sind, laut *Peters et al. 2004*, hochsensible ATP-abhängige Kalium-Kanäle in den Neuronen des Neocortex, die bei ATP-Mangel über die Produktion von Glutamat zu einer Stimulation der Expression von GLUT-1-Rezeptoren auf Astrozyten und darüber zur verstärkten Aufnahme von Glucose über die Blut-Hirn-Schranke führen [80]. Zudem postulieren *Peters et al. 2004* die weitere zentrale Regulation des Energiehaushalts zugunsten der Sicherung des eigenen Eigenbedarfs auf den Ebenen der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse und der Orexine [80]. Das komplexe Zusammenspiel dieser verschiedenen Regulationsebenen veranschaulichen sie dabei am sogenannten „Fischgrätenmodell“ der zentralen Steuerung des Glucosemetabolismus (siehe **Abbildung 4.1**).

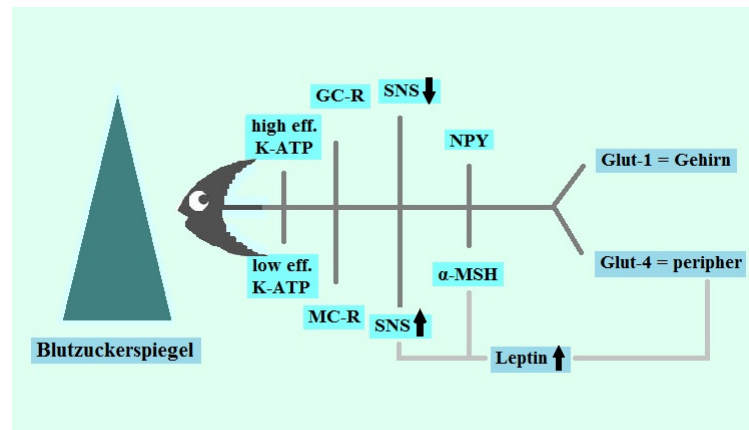


ABBILDUNG 4.1: Vereinfachtes Fischgrätenmodell der zentralen Blutzuckerspiegelregulation in Anlehnung an *Peters et al. 2004* Selfish-Brain-Theory [80]: In Abhängigkeit vom BZ kommt es zentral zur Aktivierung von high efficiency oder low efficiency ATP-abhängigen K-Kanälen bzw. Glucocorticoid- oder Mineralcorticoid-Rezeptoren. Hierüber kommt es bei niedrigem BZ oder Glucocorticoidspiegel zur verstärkten Expression von Glut-1-Rezeptoren bzw. vermehrter Bindung von Mineralocorticoiden und darüber zu einer verstärkten SNS-Aktivität mit folgender Glucocorticoidausschüttung. Schließlich kommt es zu einer BZ-abhängigen Ausschüttung von NPY oder α -MSH zur (An)Orexin-gesteuerten BZ-Regulation, wobei sowohl diese, als auch das SNS einer zusätzlichen Regulation durch Leptin unterworfen sind.

Neben der ATP-abhängigen Vergrößerung der Anzahl von GLUT-1-Rezeptoren reduziert das Gehirn dabei unter Stress, Energiemangel oder bei Störungen der neuronalen Funktion z. B. durch Erkrankung oder nach Traumata laut *Peters et al. 2004* den Glucoseverlust an periphere Organe durch eine gezielte Veränderung des systemischen Cortisolhaushalts. Hierzu binden bei Cortisolmangel oder zentraler Up-Regulation des Cortisolwerts Mineralocorticoide an entsprechende Rezeptoren von Neuronen im VMH und führen darüber zu einer verstärkten Aktivierung des SNS mit einer folgenden Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse mit abschließender, verstärkter Cortisolausschüttung. Diese führt schließlich ihrerseits zu einer Down-Regulation der β -Zell-Sekretion des Pankreas, zur Glycolyse in Leber und Skelettmuskel sowie zu einer peripheren Insulin-Resistenz und darüber zu einem verbesserten Glucoseangebot für das ZNS [31, 80].

Parallel dazu beschreiben *Peters et al. 2004*, dass in ähnlicher Weise cortisol- und mineralcorticoidabhängig die Exzitabilität glutamaterger Neurone des VMH und des LH moduliert wird, sodass es hier zum einen zu einem erhöhten Glucosetransport über die Blut-Hirn-Schranke sowie zu einer Steigerung des Appetits durch die Ausschüttung von Orexinen wie z. B. NPY, agRP oder Ghrelin kommt, welche wiederum über eine Stimulation der Nahrungsaufnahme die Energiezufuhr des Gehirns verbessert [31, 80].

Zusätzlich dazu sehen *Peters et al. 2004*, ähnlich wie auch *Takeda et al. 2002* und *Takeda und Karsenty 2008*, eine weitere Möglichkeit der zentralen Überwachung der systemischen Glucoseverteilung durch das im Fettgewebe gebildete Leptin, welches dem Gehirn den Füllungszustand der peripheren Energiespeicher und somit die bereitstehenden Energiereserven anzeigt, worauf dieses zur kurzfristigen Regulation mit einer Up- oder Downregulation des SNS reagiert [80, 102, 101].

In einem späteren Artikel zum Thema bezeichnen *Peters 2011* entsprechend *Hitze et al. 2010* diese Vorgänge zusammenfassend als Brain-Pull-Mechanismen und zerebrale Insulinsuppression, wobei sie betonen, dass das Gehirn dabei nicht erst auf einen bereits manifesten Energiemangel reagiert, sondern mit seinen hochsensiblen Mechanismen schon vorsorglich auf geringste Veränderungen im Glucose- und Hormonhaushalt eingeht noch bevor eine systemische Hypoglykämie nachweisbar wird [50, 79]. Passend dazu zeigte sich in der postakuten Versorgung polytraumatisierter Patienten eine permissive Hyperglykämie, die auf deren posttraumatisch verminderte Insulinproduktion oder transiente periphere Insulinresistenz zurückzuführen scheint. Aggressive Blutzucker (BZ)-Protokolle mit regelhafter BZ-Senkung auf physiologische Werte zeigten hierbei eine höhere Mortalität als permissive BZ-Protokolle, sodass nach aktuellen Versorgungsleitlinien für ein besseres Outcome nach Polytrauma eine leichte Hyperglykämie im Sinne eines vorsorglichen Brain-Pull-Mechanismus mit zentral induzierter Insulinresistenz toleriert werden sollte.

4.1.3 Hormone im posttraumatischen Kontext

Wendet man diese beiden Prinzipien sowie die erläuterten Hormonregelkreise konsequent auf den in der vorliegenden Studie analysierten posttraumatischen Hormonhaushalt im Mausmodell an, kann man die hierbei herausgearbeiteten fünf Phänomene wie folgt deuten:

1. Die posttraumatische Dysregulation der Insulinhomöostase ist Ausdruck einer akuten Brain-Pull-Reaktion auf das dem jeweiligen Versuchstier zugefügte Trauma. Dabei kommt es durch eine systemische Stressreaktion unabhängig von der Art des Traumas über die zentrale Aktivierung des SNS und der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse zu einer peripheren Insulinresistenz. Diese schlägt sich in vorliegender Studie sowohl im WT-Tier als auch bei Leptin-Defizienz in einer akuten posttraumatischen Hyperinsulinämie nieder, welche im ELISA unabhängig vom vorangegangenen Trauma und Vorhandensein oder Fehlen von Leptin nachweisbar war (siehe dazu **Abbildung 4.2**).

2. Gleichzeitig dazu kommt es durch die stressbedingte verstärkte Aktivierung des SNS innerhalb der Osteoblasten zu einer verstärkten Expression von OST-PTP mit einer folgenden Hochregulation von OPG sowie einer dadurch verminderten Osteoclastenaktivierung. Die daraus resultierende reduzierte Freisetzung von un- /untercarboxyliertem, systemisch aktivem

Glu-OCN aus der Knochenmatrix zeigt sich dabei in vorliegender Studie in einem deutlichen akuten Absinken der posttraumatischen Plasma-OCN-Spiegel sowohl der WT- als auch der Leptin-Defizienz-Tiere (siehe dazu auch **Abbildung 4.2**).

3. Zusätzlich zur Senkung des OCN-Spiegels durch die Wirkungsweise des SNS führt auch die von Peters et al. 2004 beschriebene stressbedingte Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde mit folgender Cortisolausschüttung zu einer weiteren Reduktion der OCN-Produktion, die wie auch Brennan-Speranza et al. 2012 und Cooper, Seibel and Zhou 2015 zeigen hoch sensibel auf einen Anstieg von Glucocorticoiden reagiert [9, 19] (siehe dazu auch **Abbildung 4.2**).

4. Neben dem akuten, traumatischen Stressereignis kann, im Sinne von Peters et al 2004, der erhöhte Energiebedarf des ZNS zur Regeneration nach SHT sowie dessen drohende Unterversorgung bei erhöhtem peripheren Energiebedarf während der Knochenheilung nach Femurosteotomie zu einer prolongierten Hyperinsulinämie bei peripherer Insulinresistenz und unterdrückter OCN-Freisetzung führen [80]. Diese erreichte in der vorliegenden Studie ihr Punktum maximum unabhängig von Tierstamm und zugefügter Verletzung zwischen der ersten und zweiten Woche postoperativ (siehe dazu **Abbildung 4.2**).

5. Schließlich kommt es durch den Abfall des posttraumatischen Stresspegels, das Absinken der für die weitere Gewebeheilung notwendigen Energiemengen und das Ausbleiben des Insulin-OCN-Forward-Loops bei Mangel an freiem un-/untercarboxyliertem OCN ab der zweiten postoperativen Woche zur zunehmenden Wiederherstellung der Hormon- und Energiehomöostase, die zwischen der dritten und vierten postoperativen Woche die Normwerte der Kontrollgruppe erreicht, was den Abschluss des jeweiligen Heilungsprozesses anzeigt (siehe dazu auch **Abbildung 4.2**).

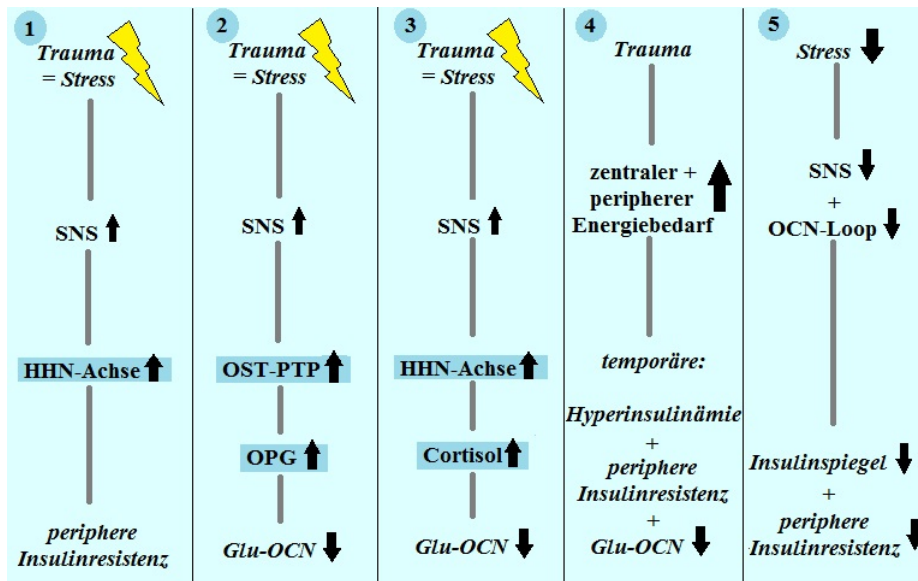


ABBILDUNG 4.2: Fünf Phänomene nach Kombinationstrauma

4.1.4 Osteocalcin und Knochenheilung

Bereits 1996 stellen *Ducy et al.* in einer Studie mit OCN-Defizienten-Mäusen einen diesen Tieren eigenen Skeletalen-Phänotyp fest, welcher sich durch eine höhere Knochenmasse und eine verbesserte Knochenqualität im Sinne einer besseren biomechanischen Belastbarkeit auszeichnet [25]. Histomorphometrisch konnten sie dabei bei OCN-Defizienz eine gesteigerte Knochenbildung bei unveränderter Knochenresorption nachweisen, die in den von *Ducy et al.* 1996 untersuchten Versuchstieren zu einer Erhöhung der Cortexdicke und -dichte, einer Vermehrung von spongiosen Knochen sowie einem Anstieg der Matrix-Mineralisierung führt [25].

Auch *Boskey et al.* 1998 und *Lombardi et al.* 2015 stellen in ihren mikroskopischen Knochenanalysen im Falle einer genetischen OCN-Defizienz eine erhöhte BFR fest [7, 72]. Zusätzlich zeigten *Lombardi et al.* 2015 in ihren histologischen Untersuchungen von Knochenschnitten jedoch auch, dass es beim Fehlen von OCN durch eine Fehlausrichtung der Kollagenfibrillen, eine gesteigerte Verunreinigung der Knochenmatrix, eine mangelnde Carbonatbindung und eine ausbleibende Kristallreifung zu Fehlstrukturierungen der Knochenmatrix mit folgender gesteigerter Knochensprödigkeit kommt [72]76. *Kavukcuoglu, Petterson-Buckendahl und Mann* 2009 berichten in ihrer Studie an OCN-defizienten Tieren hingegen von einer gesteigerten Knochenhärte bei unveränderter Elastizität [60].

OCN erscheint aus dieser Perspektive als Negativregulator des Knochenaufbaus bei unverändertem Knochenabbau zu fungieren, der eine zu schnelle und damit eventuell fehlerhafte Matrixmineralisation unterdrückt [25, 118]. Bei Untersuchungen an Tieren mit einer Überexpression von OCN konnten bisher entgegen dieser Annahme jedoch keine Veränderungen der

Knochenphysiologie festgestellt werden [118]. Warum dem so ist und wie genau OCN die Aktivität der Osteoblasten und -clasten reguliert, bleibt dabei weiter unbekannt.

Überträgt man diese Vermutungen jedoch auf die Ergebnisse der vorliegenden Forschungsarbeit und bezieht dazu die Theorie von *Peters et al. 2004* Brain-Pull-Mechanismen mit ein, ergibt sich ein weiterer möglicher Ansatz, die nachweisbar gesteigerte Fx-Heilung in der Gruppe der Kombinationstraumatierte zu erklären (siehe dazu weiterführende Ergebnisse unserer Forschungsgruppe zur Knochenheilung der von uns analysierten Versuchstiere in *Graef et al. 2017*)[80, 43].

Ausschlaggebend ist hierbei die durch die posttraumatische Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse und des SNS resultierende Insulinresistenz mit folgender Erniedrigung der posttraumatischen OCN-Spiegel. Diese zeigen sich nach Kombinations-trauma im Vergleich zum Vorliegen eines isolierten SHT oder einer isolierten Femurosteotomie nochmals deutlich minimiert. Damit könnten sie im Falle eines Kombitraumas einen physiologischen Grenzwert unterschreiten, ab dem es zu einer Delimitierung der Osteoblastenaktivität im Sinne der von *Ducy et al. 1996* beschriebenen gesteigerten Knochenmineralisierung bei unverändertem Knochenabbau und damit zu einer beschleunigten Fx-Heilung kommen könnte [25] (Siehe dazu **Abbildung 4.3**).

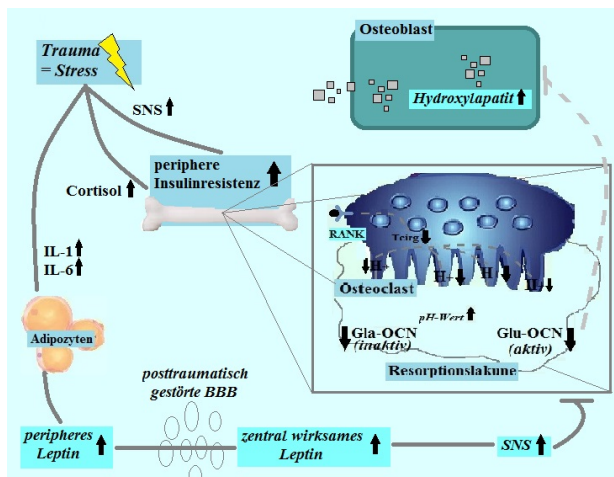


ABBILDUNG 4.3: Mögliche Ursachen akzellerierter Fx-Heilung nach Kombitrauma: Durch Trauma/Stress erfolgt die Erhöhung der systemischen IL-1-, -6- und Cortisolspiegel sowie der SNS-Aktivität. Hierüber kommt es zur peripheren Insulinresistenz mit verringerter Glu-OCN-Produktion und -Sekretion sowie zur Ausschüttung von Leptin. Diese führt nach Zusammenbruch der BBB bei parallelem SHT über seine zentrale Wirkung verstärkt zur SNS-Aktivierung und somit zum stärkeren Absinken der Glu-OCN-Spiegel nach Kombitrauma. Hierdurch kommt es zur Unterschreitung einer angenommenen Glu-OCN-Hemmschwelle am Osteoblasten, zu einer vermehrten Hydroxylapatitsynthese und -Sekretion sowie einer klinisch apparenten akzellerierten sowie akzentuierten Fx-Heilung.

Da Osteoblasten wie auch das Gehirn ihren intrazellulären Glucosebedarf über insulinunabhängige GLUT-1-Transporter bedienen [79, 107] sind sie, anders als Muskel und Fettgewebe, auch bei ausgeprägtem Hyperinsulinismus mit peripherer Insulinresistenz in der Lage, ihren Energiebedarf zu decken und können so im Falle eines Nahrungsüberangebots und erhöhter Körpermasse insulinunabhängig ein ausreichend stabiles Stützgewebe aufrecht erhalten.

Im Falle einer zentral induzierten, posttraumatischen Glucoseumverteilung bei normalem oder bei Auftreten eines deutlich erniedrigten Glucoseangebots führt im Gegensatz dazu der oben beschriebene unphysiologisch drastische OCN-Abfall zu einer erhöhten BFR, welche bei gegebenenfalls schlechterer Knochenqualität ein für das Überleben des betroffenen Individuums notwendiges, funktionierendes Skelettsystem bei Energiemangel aufrechtzuerhalten vermag.

Diese insulin- und OCN-abhängige Gegenregulation des Skelettsystems in Bereichen unterhalb des physiologischen Energieniveaus führt dabei eher nebenproduktlich zum klinisch sichtbaren Phänomen der akzentuierten verbesserten Fx-Heilung bei Vorliegen eines zusätzlichen ZNS-Trauma, die wir entsprechend auch in der hier vorliegenden Studie reproduzieren konnten [71, 103]. Dabei scheint sowohl der Brain-Pull-Mechanismus, als auch die OCN-Reaktion bei ossärer Beteiligung schneller zu erfolgen und drastischer zu sein als bei einem isolierten SHT.

Eine mögliche Erklärung dafür liefern *Wang et al. 2011*, *Kerimoğlu et al. 2013* und *Khan et al. 2013*, die in ihren Fx-Modellen an Mausfemora und Rattentibiae einen deutlichen, initialen posttraumatischen Anstieg des Serumleptins feststellten [61, 62, 105]. Als proinflammatorisches Zytokin scheint die periphere Sekretion von Leptin aus dem weißen Fettgewebe und insbesondere aus Knochenmarksadipozyten dabei durch Interleukin-1 und -6 in der akuten Phase spezifisch induziert zu werden [61, 62]. Der daraus resultierende Anstieg der Leptinspiegel sorgt im Folgenden über dessen oben beschriebene zentrale Wirkung zu einer zusätzlichen SNS-Aktivierung und einer auch in den vorliegenden Ergebnissen nachweisbaren verstärkten Hyperinsulinämie bzw. posttraumatischen OCN-Abfalls im Sinne eines verstärkten Brain-Pull-Mechanismus oder einer erhöhten zentral induzierten Insulinresistenz.

4.1.5 Leptin und Knochenheilung

Welche zentrale und komplexe Rolle Leptin für die Regulation des Knochenmetabolismus spielt, konnte bereits in der ausführliche Darstellung seiner diversen Regulationswege und deren Auswirkung auf die Osteoblasten- und Osteoclastenfunktion gezeigt werden. Demensprechend konnten bereits *Ducy et al. 2000* und später *Hamrick et al. 2004* in Ihren Untersuchungen an Leptin- und Leptinrezeptor-KO-Tieren deutliche Veränderungen im skeletalen Phänotyp von ob/ob- bzw. db/db-Mäusen zeigen [26, 44], wobei sich jedoch auch Unterschiede der jeweils beschriebenen Besonderheiten zeigten.

Ducy et al. 2000 proklamierten dabei in ihren Untersuchungen an Tieren mit Leptindefizienz einen generellen Anstieg der Knochenmasse bei gleichbleibender Kortikalisdicke, aber zweifach erhöhtem Trabekelvolumen. Diese Veränderung führten sie bei unveränderter Osteoblastenzahl und -oberfläche sowie intakter Osteoclastenfunktion auf eine verstärkte Osteoblastenaktivierung zurück [26]. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, konnte von *Ducy et al. 2000*

zudem gezeigt werden, dass der Leptin-Effekt auf den Knochenumbau über zentrale Regulationszentren und die Aktivierung des SNS erfolgt und der skeletale Phänotyp der untersuchten ob/ob-Mäuse durch icv-Injektionen mit Leptin an den Phänotyp von vergleichbaren WT-Tieren angepasst werden kann [26, 24].

Hamrick et al. 2004 und auch *Ealey et al. 2006* konnten demgegenüber feststellen, dass sich die Erhöhung der Knochenmasse bei Leptindefizienz nur im Bereich des Stammskeletts nachweisen lässt, während die Knochendichte der Femora Leptin-defizienter Tiere deutlich vermindert war [27, 44]. Des Weiteren zeigten sich in ihren Untersuchungen die Wirbelkörper von ob/ob-Mäusen länger und deren Femora kürzer als bei WT-Tieren, wobei das Trabekelvolumen bei Leptindefizienz ebenfalls lumbar vergrößert und femoral verringert war [27, 44].

Im Gegensatz zu *Ducy et al. 2000*, die eine periphere direkte Wirkung von Leptin mit dem Verweis auf das Fehlen eines Leptinrezeptors auf Osteoblasten negierten, konnten *Hamrick et al. 2005* und auch *Steppan et al. 2000* eine Wirkung von peripher appliziertem Leptin mit anschließender Normalisierung des skeletalen Phänotyps in ob/ob-Mäusen feststellen [45, 96]. Hierbei zeigte sich nach exogener Leptinzufuhr eine verstärkte Rekrutierung von BMSCs im Sinne einer verstärkten Osteoblastogenese und verringerten Differenzierung zu Knochenmarksadipozyten sowie eine verminderte Osteoblastenapoptose [96, 45, 96]. Außerdem führte die periphere Wirkung von Leptin zusätzlich zu einer Erhöhung der Kollagensynthese und Matrixmineralisierung sowie zu einer verstärkten Freisetzung von OPG, was auf eine direkte Aktivierung von Osteoblasten und Chondrozyten über einen schließlich von *Steppan et al. 2000* auch im Western-Blot nachgewiesenen Leptinrezeptor auf den oben genannten Zellen zurückzuführen ist [96, 96].

In Bezug auf die Fx-Heilung konnten ähnlich osteogene Effekte peripher wirkenden Leptins mittlerweile auch für Prozesse der Kallusbildung und -mineralisierung gezeigt werden. Erst kürzlich veröffentlichte Untersuchungen an Rattentibiae und Mausfemora konnten dabei nachweisen, dass peripher zugeführtes Leptin sowohl die allgemeine Fx-Heilung beschleunigen als auch die beeinträchtigte Fx-Heilung in ob/ob-Mäusen normalisieren kann [61, 62]. *Khan et al. 2013* zeigten dementsprechend eine ausbleibende enchondrale Ossifikation in ob/ob-Mäusen sowie eine hier nachweisbare Persistenz nicht umgebauten weichen Kallus aus hypertrophen Chondrozyten [62]. Nach exogener Leptinzufuhr zeigte sich in der gleichen Studie jedoch schnell eine Kallusreifung mit Osteoid- und Knochenbildung [62]. In entsprechenden Untersuchungen an db/db-Mäusen konnten *Röszer et al. 2014* eine hier vorherrschende Schwäche der postnatalen, regenerativen Osteogenese im Sinne einer mangelnden periostalen mesenchymalen Osteogenese feststellen [90]. Hierbei zeigte sich, neben einer Erhöhung des generellen Knochenumbaus und einer uneingeschränkten akuten Fx-Heilung mit weicher Kallusbildung durch Fibroblasten- und Chondrozytenaktivierung, ein folgender fehlerhafter Kallusumbau mit persistierendem primordealen Knochen, ausbleibender Vaskularisierung und

Osteoblastenaktivierung/-proliferation sowie fehlender desmaler und enchondraler Ossifikation [90]. *Röszer et al. 2014* interpretieren dies als Fehlschlagen der Knorpel-Knochen-Transmission, die, wie sie in selber Arbeit zeigen, durch eine lokale Leptinsubstitution aufgehoben werden kann. Außerdem führt, so die Ergebnisse von *Röszer et al. 2014*, eine periphere Leptingabe zur Aufhebung der überschießenden und fehlgeleiteten Knorpelbildung sowie anschließenden Chondrozytenapoptose in db/db-Tieren [90].

Anders als in der von *Ducy et al. 2000* formulierten und weithin anerkannten Theorie der zentral vermittelten negativen Leptinwirkung auf den Knochenumbau, zeigen damit neuere Studien den stark positiven peripheren Einfluss Leptins auf den skeletalen Phänotyp und die Fx-Heilung. Als Erklärung dafür postulieren *Turner et al. 2013* in ihrer umfangreichen Studie zu Knochenumbau und Energiehaushalt in WT-, ob/ob-, und db/db-Tieren eine grundsätzlich hauptsächlich periphere Hormonwirkung sowie eine bisher überschätzte negative hypothalamische Leptinwirkung [104]. Dazu konnten sie in ihren Experimenten bei Vorhandensein einer Leptin-Defizienz die bereits vorbeschriebene Störung von Knochenwachstum, Osteoblastendichte und BFR reproduzieren. Zudem konnten sie aber auch zeigen, dass trotz normaler Osteoclastendichte der Knochenumbau der db/db-Versuchstiere, bei reduzierten Turn-Over-Markern und Calcifizierung des enchondralen Knorpels im Sinne einer Osteopetrose, sich ebenfalls deutlich beeinträchtigt zeigte [52, 104]. Ein ähnlicher Phänotyp zeigte sich auch bei WT-Mäusen, denen, nach Bestrahlung des eigenen Knochenmarks, Knochenmark von db/db-Tieren transplantiert wurde [104]. In Versuchen in denen Leptin bei genetischer Defizienz subcutan substituiert wurde, konnten *Turner et al. 2013* entsprechend eine Normalisierung der o. g. Störungen im Knochenhaushalt oder sogar dessen Steigerung über das Niveau der zum Vergleich herangezogenen WT-Tiere feststellen. Darüber hinaus konnten sie in Experimenten mit hypothalamischer Leptin Gene Therapie an ob/ob-Mäusen zeigen, dass es im Widerspruch zur gängigen Theorie der negativen zentralen Leptinwirkung, auch hier nach Induktion zentralen Leptins zu einem positiven Effekt auf das Skelettsystem mit Normalisierung der oben genannten Parameter kam [104].

Zhang et al. 2013 konnten passend dazu in ihren in vitro Experimenten an murinen Osteoblasten zeigen, dass die Blockade von deren Leptin-Rezeptor mittels small interfering Ribonucleid Acid (siRNA) zu einer Veränderung der Genexpression mit nachfolgender Reduktion von Ossifikation, des Knochenumbaus und der Matrixmineralisierung bei gesteigerter Osteoblastendifferenzierung und Knochenresorption kam [114].

Die durch diese neueren Studien stattgehabte Aufwertung der positiven peripheren oder zentralen Leptinwirkung und dessen zentraler Rolle im Rahmen der Fx-Heilung kann auch durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt werden. Hier konnte in Übereinstimmung mit den oben genannten Autoren gezeigt werden, dass es bei Leptin-Defizienz-Tieren zu einer starken Beeinträchtigung der Knochenheilung mit ausbleibender Knorpel-Knochen-Transformation

und Fx-Überbrückung kommt (siehe dazu weiterführende Ergebnisse unserer Forschungsgruppe in Bezug auf die Fx-Heilung bei Leptindefizienz in *Graef et al. 2017* und *Seemann et al. 2018* [43, 93]).

Parallel dazu zeigt sich bei den in vorliegender Studie untersuchten Leptin-Defizienz-Mäusen, neben der für diesen Tierstamm bekannten Hyperinsulinämie bei vorbestehender peripherer Insulinresistenz, eine drastischere posttraumatische Störung der Hormonhomöostase im Sinne einer im Vergleich zu WT-Tieren achtfach erhöhten Steigerung der Insulin- und eines um ein Drittel verstärkten OCN-Abfalls.

Eine Erklärung für die auffällig gesteigerte Vulnerabilität des Hormonhaushalts von Leptin-Defizienz-Mäusen kann dabei in der fehlenden leptininduzierten Hemmung der Insulinproduktion und -sekretion in den β -Zellen des Pankreas vermutet werden. Der hierdurch hervorgerufene Insulinüberschuss zeigt sich bei Leptin-Defizienz-Tieren demnach nicht nur langfristig, sondern auch in einer posttraumatischen akuten Hyperinsulinämie, die bei fehlender Leptinhemmung die Werte der WT-Tiere bei weitem überschreitet und damit zu einem noch ausgeprägteren Abfall des posttraumatischen OCN nach oben beschriebenem Muster führt.

Auffällig ist dabei ferner eine weitere zentrale Beobachtung, die Leptin-Defizienz- und WT-Tiere weiter unterscheidet. Im Falle einer vorliegenden Leptin-Defizienz zeigt sich trotz zu den WT-Tieren analoger traumaspezifischer Unterschiede im Insulinverlauf, mit erneut höheren Insulinwerten für Fx- und Kombinationstraumatiere, anders als bei WT-Tieren bei Leptin-Defizienz kein vergleichbarer traumaspezifischer Verlauf des posttraumatischen OCN. Sowohl der OCN-Abfall, als auch die Störung der Fx-Heilung zeigen hierbei keinerlei Unterschiede mehr zwischen Versuchstieren mit isolierter Osteotomie, isoliertem SHT oder Osteotomie mit zusätzlichem Schädelhirntrauma.

Sowohl dieser Wegfall jeder Verletzungsspezifität im posttraumatischem OCN-Abfall, als auch die allgemeine Störung der Fx-Heilung bei Leptin-Defizienz, steht im Widerspruch zu oben erläuteter Rolle von OCN in der Fx-Heilung. Alle Leptin-Defizienz-Gruppen müssten mit ihrem allseits gleich starken OCN-Abfall demnach den oben genannten, gedachten Grenzwert unterschreiten, ab welchem die OCN-Hemmung auf den Knochenumbau entfällt und somit eine sogar suffizientere Fx-Heilung aufweisen.

Dies führt zu der Annahme, dass die traumaspezifische Dysregulation der Hormonhomöostase von Insulin und OCN nicht allein Erklärung der klinisch beobachtbaren verbesserten Knochenheilung in polytraumatisierten Patienten mit zentraler Beteiligung sein kann. Erst in Anwesenheit von Leptin können die hier auffälligen Phänomene im Tierexperiment reproduziert werden, was endlich die zentrale regulative Rolle dieses Hormons in Energiehomöostase, Knochenumbau und Fraktuheilung aufzeigt.

Den Schlüssel zum Verständnis der bedeutenden Regulationsfunktion von Leptin könnte dabei die abschirmende Funktion der Blut-Hirn-Schranke bieten, über welche das Hormon lediglich aktiv, mittels spezieller Ob-Ra-Transporter ins ZNS aufgenommen werden kann [12, 42]. Das Ausmaß des zentralen Leptineffekts ist damit durch die Sättigungsrate spezifischer Transportsysteme begrenzt. Bereits *Caro et al. 1996* und *Ghazali et al. 2003* konnten dies in ihren Untersuchungen zum zentralen Leptintransport und zur Entwicklung einer zentralen Leptinresistenz bestätigen und für die Sättigung der zentralen Leptintransportsysteme einen Serumhormonspiegel von ca. 24-26 ng/ml angeben [12, 42].

Diese imminente Limitierung des zentralen Leptineffekts führt im physiologischen Bereich zum Ausgleich der peripheren und zentralen Leptinwirkung und darüber hinaus zu einer Deckelung des zentralen Hormoneffekts in Situationen kurz- oder langfristiger unphysiologischer Leptinerhöhung wie z. B. nach skeletalem Trauma oder beim metabolischen Syndrom. In diesen Fällen scheint der von *Turner et al. 2013*, *Khan et al. 2013* und *Kerimoglu et al. 2013* beobachtete peripher osteogene Einfluss des Sättigungshormons zu überwiegen, der hier zu einer physiologischen oder gar gesteigerten Knochenheilung führt, die bei Leptin-Defizienz entsprechend deutlich gestört sein muss [61, 62, 104].

Zudem erklärt die Rezeptor-regulierte Aufnahme von Leptin ins ZNS die, gegenüber einer isolierten Osteotomie verbesserte Fx-Heilung bei Kombinationstrauma, da im Allgemeinen nach einem SHT eine Dysregulation zentraler Transportsysteme mit einer erhöhten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke zu beobachten ist [10]. Hierbei kann es damit auch zu einem vermehrten Übertritt von Leptin ins ZNS kommen, womit eine verstärkte Leptinwirkung induziert wird. Diese kann, folgt man der Argumentation der Arbeitsgruppen um *Ducy*, *Karsenty* oder *Takeda*, über ihren negativen, zentralen Effekt SNS-vermittelt zu einer verstärkten Hyperinsulinämie, einem verstärkten Abfall von OCN unter dessen Hemmschwelle und so indirekt zu einer besseren Knochenheilung führen oder, folgt man der Argumentation von *Turner et al. 2013*, durch einen zentral positiven Effekt direkt eine verbesserte Fx-Heilung induzieren, deren genaue Signalwege bislang jedoch noch unbekannt sind [104].

In Jeden Fall bietet erst die Zusammenschau der Wirkungsweisen und Interaktionen aller drei in der vorliegenden Studie beobachteten Hormone zusammen mit der zusätzlichen Kenntnis der Transporter-regulierten Leptinaufnahme ins ZNS eine suffiziente Erklärung, sowohl der tragenden Rolle von Leptin in Knochenumbau und Fx-Heilung, als auch dessen verstärkte Wirksamkeit bei vorliegen eines zeitgleichen SHT (siehe dazu abschließend **Abbildung 4.4**).

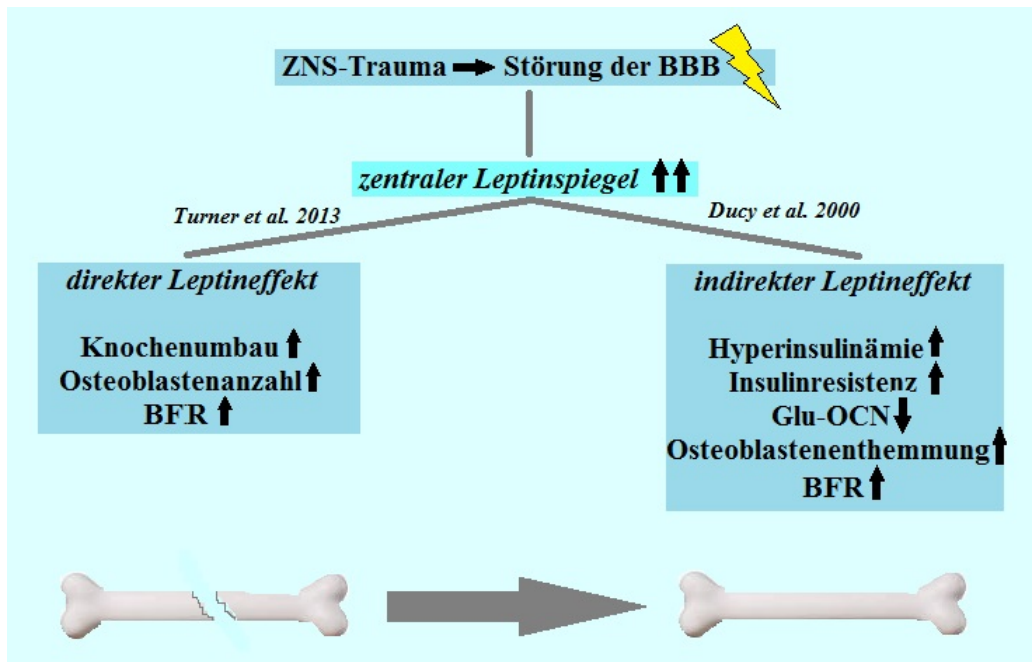


ABBILDUNG 4.4: Abschließende Erklärung zur zentralen Leptinverteilung nach Fx und SHT in Anlehnung an *Ducy et al. 2000* und *Turner et al. 2013* [26, 104]: Durch die Störung der BBB nach SHT kommt es zu einem drastischen Anstieg des zentral wirksamen Leptins. Dieses wirkt je nach konsultierter Literatur direkt oder indirekt über den Umweg über SNS-Aktivierung und Glu-OCN-Reduktion positiv auf die Fx-Heilung bei Kombitrauma, was das Phänomen der hier auffälligen beschleunigten Knochenheilung abschließend erklärt.

Kapitel 5

Limitationen, Einordnung und Ausblick

5.1 Limitationen

Trotz der Menge an Daten konnten bei nur sehr geringen Hormonunterschieden zwischen den verschiedenen Traumagruppen häufig nur Tendenzen, jedoch keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Hier wäre eventuell eine umfangreichere tierexperimentelle Studie von Nöten, um eindeutiger Ergebnisse und damit genauere Erkenntnisse über die verletzungsspezifischen Hormonverläufe zu erzielen.

In der vorliegenden Studie erfolgte die Messung und Auswertung der Hormone Insulin und OCN als zentrale Größen des Brain-Pull-Mechanismus und des Knochenumbaus bzw. der Fx-Heilung. Auf andere bedeutende Regelgrößen, wie z. B. die Messung von Glucose, Leptin und auch des speziell biologisch aktiven unter- und uncarboxyliertem OCN konnte im Rahmen dieser Studie auf Grund der geringen Probenvolumina und des zum Zeitpunkt der Probenanalyse nicht kommerziell erhältlichen spezifischen ELISA für unter- oder uncarboxyliertes OCN nicht eingegangen werden.

Alle Hormonanalysen erfolgten durch ELISA-Technik im Blutplasma oder -serum der Versuchstiere ohne weitere Analyse einer dieser zugrunde liegenden genetischen Up- oder Downregulation z. B. mittels PCR oder Western-Blot. Somit konnten hier gegebenenfalls Phänomene, wie z. B. ein scheinbarer Hormonabfall auf Grundlage einer vermehrten Hormonbindung bei gleicher oder eventuell sogar gesteigerter Hormonproduktion sowie eine Hormonspiegelerhöhung aufgrund fehlender Bindung bei gleicher oder eventuell sogar erniedrigter Produktion nicht detektiert und abschließend interpretiert werden. Auch die Frage nach dem genauen Ort der (posttraumatisch reduzierten) OCN-Produktion (Kallus/Fx-nah oder Extremität/Fx-fern) kann somit im Rahmen dieser Studie nicht geklärt werden.

Zusätzlich erfolgte in der vorliegenden Forschungsarbeit keine Untersuchung zum posttraumatischen Aktivitätsniveau des SNS bzw. zu dessen traumaspezifisch unterschiedlicher Aktivierung

im Sinne einer posttraumatischen katabolen Stressreaktion sowie von *Peters et al. 2004* Selfish-Brain-Theorie [80]. Damit bleibt in der Frage nach dem Zusammenhang von ZNS-Signaling und Fx-Heilung bei zusätzlich vorliegendem SHT ein zentraler Signalweg weiter unbeleuchtet. Ebenso erfolgte keine Untersuchung bezüglich der zentralen Leptinkonzentrationen der verschiedenen Traumagruppen, sodass auch die Frage nach einem zugrundeliegenden spezifisch gesteigerten zentralen Leptineffekt in der Auswertung der hier dargestellten Daten offen bleiben muss.

Schließlich konnte in der vorliegenden Studie eine deutliche Störung der Fx-Heilung bei Leptin-Defizienz festgestellt werden. Ein Proof-of-Principle im Sinne einer Normalisierung der Knochenheilung nach exogener Zufuhr von Leptin wurde hier jedoch nicht durchgeführt, sodass hier die Frage nach zentraler oder peripherer Wirkung ebenfalls nicht geklärt werden konnte.

Nichtsdestotrotz ergaben sich in der Auswertung der vorliegenden Daten richtungsweisende Unterschiede und reproduzierbare Hormonzusammenhänge, die in einer derartigen Breite am Polytrauma-Mausmodell bislang nicht vorlagen und die aktuelle Forschungsliteratur zum Thema unterstützen und somit das Verständnis des zentralen und hormonellen Einflusses auf die Fx-Heilung weiter vertiefen.

5.2 Skelettendokrinologie, Neuroendokrinologie und Neuroskeletal Science

In der Auseinandersetzung mit den in der vorliegenden Studie erhobenen Daten sowie der aktuellen Forschungsliteratur zum Thema Knochenumbau und Fx-Heilung zeigt sich eine deutliche allgemeine Entwicklung das muskuloskeletale System nicht länger isoliert oder als statisches Konstrukt zu betrachten. Vielmehr wird darin eine zunehmende Einbettung in größere physiologische Abläufe und Regelkreise deutlich, in denen der Knochenumbau als stetig aktiver Prozess an Bedeutung gewinnt.

Durch zunehmend komplexere Studiendesigns und Analysemethoden erfolgte in den letzten Jahren damit eine zunehmende Um- und Aufwertung des muskuloskeletalen Systems im Rahmen seiner regulierenden Funktion innerhalb einer grundlegenden Energiehomöostase und gewann dadurch ein enormes Forschungsinteresse auf dem Gebiet der Endokrinologie, Diabetologie und Osteoporoseforschung [78, 89, 98, 111]. Autoren wie *Karsenty 2006*, *Lee et al. 2007*, *Confavreux*, *Levine und Karsenty 2009* und *Ferron et al. 2010* betonten dabei die zentrale Rolle des Knochenbaus für den Energiehaushalt und lieferten die dazu notwendigen molekularbiologischen Zusammenhänge auf der Grundlage des Zusammenspiels von Insulin und OCN etwa in der Form des oben beschriebenen Fast-Forward-Loops [18, 33, 55, 67].

Parallel dazu verlief eine ähnliche Hinwendung zu einem verstärkt integrativen Ansatz auch auf dem Gebiet der Neurowissenschaften mit Folge der Entwicklung eines neuen Konzepts - der sogenannten Neuroendokrinologie. Diese betrachtet verstärkt die Interdependenzen zwischen zentralen Regulationsmechanismen, Hormonhaushalt und Energiehomöostase über die Grenzen der bekannten neuroendokrinen Achse hinaus und betont damit die Bedeutung der zentralen Steuerung über die Grenzen des rein neuronalen Systems hinaus. Insbesondere *Amling, Takeda und Karsenty 2000, Ducky, Schinke und Karsenty 2000, Ducky et al. 2000* und *Karsenty 2002* stellten dabei den Einfluss des ZNS auf den Knochenmetabolismus heraus und lieferten mit ihrer Theorie eines zentralen Leptineffekts sowie ihren Untersuchungen der Wirkung des SNS am Osteoblasten Erklärungsmodelle für die neuronale Steuerung des Knochenumbaus [2, 21, 26, 24, 54].

Schließlich führten diese integrativen Überlegungen zu der Forderung nach der Etablierung eines neuen Forschungsfelds, einer sogenannten Neuroskeletal Science, welche das in den oben genannten Studien deutlich zu Tage getretene enge Zusammenspiel von ZNS und Knochenmetabolismus und dessen Einfluss auf die Energiehomöostase untersuchen sollte [77].

Im Rahmen dieses neuen Forschungsfelds zwischen Naturwissenschaften und muskuloskeletaler Grundlagenforschung bewegt sich auch die vorliegende Arbeit mit ihrer Frage nach dem (gestörten) Zusammenspiel von ZNS und Knochenmetabolismus nach lokalem Trauma und deren physiologischer Grundlage im Sinne der Erhaltung eines langfristig ausgeglichenen Energiehaushalts. Sie zeigt die enge Interdependenz von neuronalen, hormonellen und lokal zellulären Abläufen sowie deren verletzungsabhängige Dysregulation im Mono- und Kombitrauma- Tiermodell.

Entsprechende weitere groß angelegte Tier- und Humanstudien müssen folgen, um die hier erstmals gezeigten Phänomene weiter in ihrer Natur zu untersuchen und schließlich einen Wissenstransfer der dabei erlangten Ergebnisse in die Therapie mehrfachverletzter Traumapatienten zu erreichen.

5.3 Ausblick

Zur weiteren Klärung der oben genannten Hormoninteraktionen und ggf. weiterer Faktoren, die das Phänomen der beschleunigten Fx-Heilung bei parallelem Extremitäten- und zentralvenösen Trauma verursachen, erfolgte im Rahmen der vorliegenden Studie nach Abschluss Akquise der hier vorgestellten Daten bereits eine weiterführende Genexpressionsanalyse, die auch auf Ebene der Hormonsynthese eine posttraumatische Down-Regulation von OCN speziell nach Femurosteotomie und insbesondere Kombitrauma bestätigt. Zusätzlich konnte hierbei jedoch auch eine veränderte Neuroinflammation nach SHT und zusätzlicher Femurosteotomie

festgestellt werden, sodass davon auszugehen ist, dass nicht nur das SHT die Fx-Heilung sondern auch diese wiederum die Entzündungs- und Heilungsvorgänge im ZNS beeinflusst (bisher noch unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe Molekulare Unfallchirurgie). Damit stellt sich auch hier die hochgradige Verflechtung zentraler, endokriner und ossärer Signalwege dar, die zu entwirren sowie auf Vorgänge im menschlichen Organismus zu übertragen und für die Versorgung Schwerverletzter oder Patienten mit gestörter Knochenheilung nutzbar zu machen Aufgabe der nächsten Jahre sein wird.

Literatur

- [1] B. M. Abdallah u. a. „DLK1 Regulates Whole-Body Glucose Metabolism: A Negative Feedback Regulation of the Osteocalcin-Insulin Loop“. In: *Diabetes* 64.9 (2015), S. 3069–80. DOI: 10.2337/db14-1642.
- [2] M. Amling, S. Takeda und G. Karsenty. „A neuro (endo)crine regulation of bone remodeling“. In: *Bioessays* 22.11 (2000), S. 970–5. DOI: 10.1002/1521-1878(200011)22:11<970::aid-bies3>3.0.co;2-l.
- [3] M. Boes u. a. „Osteogenic effects of traumatic brain injury on experimental fracture-healing“. In: *J Bone Joint Surg Am* 88.4 (2006), S. 738–43. DOI: 10.2106/JBJS.D.02648.
- [4] S. L. Booth, A. J. Centi und C. Gundberg. „Bone as an endocrine organ relevant to diabetes“. In: *Curr Diab Rep* 14.12 (2014), S. 556. DOI: 10.1007/s11892-014-0556-3.
- [5] S. L. Booth u. a. „The role of osteocalcin in human glucose metabolism: marker or mediator?“ In: *Nat Rev Endocrinol* 9.1 (2013), S. 43–55. DOI: 10.1038/nrendo.2012.201.
- [6] K. T. Borer. „Counterregulation of insulin by leptin as key component of autonomic regulation of body weight“. In: *World J Diabetes* 5.5 (2014), S. 606–29. DOI: 10.4239/wjd.v5.i5.606.
- [7] A. L. Boskey u. a. „Fourier transform infrared microspectroscopic analysis of bones of osteocalcin-deficient mice provides insight into the function of osteocalcin“. In: *Bone* 23.3 (1998), S. 187–96.
- [8] T. C. Brennan-Speranza und A. D. Conigrave. „Osteocalcin: an osteoblast-derived polypeptide hormone that modulates whole body energy metabolism“. In: *Calcif Tissue Int* 96.1 (2015), S. 1–10. DOI: 10.1007/s00223-014-9931-y.
- [9] T. C. Brennan-Speranza u. a. „Osteoblasts mediate the adverse effects of glucocorticoids on fuel metabolism“. In: *J Clin Invest* 122.11 (2012), S. 4172–89. DOI: 10.1172/jci63377.
- [10] R. Brown u. a. „Traumatic brain injury induces adipokine gene expression in rat brain“. In: *Neurosci Lett* 432.1 (2008), S. 73–8. DOI: 10.1016/j.neulet.2007.12.008.
- [11] D. Cadosch u. a. „Humoral factors enhance fracture-healing and callus formation in patients with traumatic brain injury“. In: *J Bone Joint Surg Am* 91.2 (2009), S. 282–8. DOI: 10.2106/JBJS.G.01613.
- [12] J. F. Caro u. a. „Decreased cerebrospinal-fluid/serum leptin ratio in obesity: a possible mechanism for leptin resistance“. In: *Lancet* 348.9021 (1996), S. 159–61.

- [13] L. Chen u. a. „Refinement of collagen-mineral interaction: a possible role for osteocalcin in apatite crystal nucleation, growth and development“. In: *Bone* 71 (2015), S. 7–16. DOI: 10.1016/j.bone.2014.09.021.
- [14] X. X. Chen und T. Yang. „Roles of leptin in bone metabolism and bone diseases“. In: *J Bone Miner Metab* (2015). DOI: 10.1007/s00774-014-0569-7.
- [15] K. M. Cheung u. a. „An externally fixed femoral fracture model for mice“. In: *J Orthop Res* 21.4 (2003), S. 685–90. DOI: 10.1016/S0736-0266(03)00026-3.
- [16] B. Cohen, D. Novick und M. Rubinstein. „Modulation of insulin activities by leptin“. In: *Science* 274.5290 (1996), S. 1185–8.
- [17] C. B. Confavreux. „Bone: from a reservoir of minerals to a regulator of energy metabolism“. In: *Kidney Int Suppl* 121 (2011), S14–9. DOI: 10.1038/ki.2011.25.
- [18] C. B. Confavreux, R. L. Levine und G. Karsenty. „A paradigm of integrative physiology, the crosstalk between bone and energy metabolisms“. In: *Mol Cell Endocrinol* 310.1-2 (2009), S. 21–9. DOI: 10.1016/j.mce.2009.04.004.
- [19] M. S. Cooper, M. J. Seibel und H. Zhou. „Glucocorticoids, bone and energy metabolism“. In: *Bone* (2015). DOI: 10.1016/j.bone.2015.05.038.
- [20] J. Cornish u. a. „Leptin directly regulates bone cell function in vitro and reduces bone fragility in vivo“. In: *J Endocrinol* 175.2 (2002), S. 405–15.
- [21] M. Dalamaga u. a. „Leptin at the intersection of neuroendocrinology and metabolism: current evidence and therapeutic perspectives“. In: *Cell Metab* 18.1 (2013), S. 29–42. DOI: 10.1016/j.cmet.2013.05.010.
- [22] H. Dhillon u. a. „ β -Adrenergic receptor KO mice have increased bone mass and strength but are not protected from ovariectomy-induced bone loss.“ In: *J Bone Miner Res* 19:S32 (2004).
- [23] P. Ducy. „The role of osteocalcin in the endocrine cross-talk between bone remodelling and energy metabolism“. In: *Diabetologia* 54.6 (2011), S. 1291–7. DOI: 10.1007/s00125-011-2155-z.
- [24] P. Ducy, T. Schinke und G. Karsenty. „The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance“. In: *Science* 289.5484 (2000), S. 1501–4.
- [25] P. Ducy u. a. „Increased bone formation in osteocalcin-deficient mice“. In: *Nature* 382.6590 (1996), S. 448–52. DOI: 10.1038/382448a0.
- [26] P. Ducy u. a. „Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass“. In: *Cell* 100.2 (2000), S. 197–207.
- [27] K. N. Ealey u. a. „Bone abnormalities in adolescent leptin-deficient mice“. In: *Regul Pept* 136.1-3 (2006), S. 9–13. DOI: 10.1016/j.regpep.2006.04.013.

- [28] F. Elefteriou u. a. „Leptin regulation of bone resorption by the sympathetic nervous system and CART“. In: *Nature* 434.7032 (2005), S. 514–20. DOI: 10.1038/nature03398.
- [29] F. Elefteriou u. a. „Serum leptin level is a regulator of bone mass“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101.9 (2004), S. 3258–63. DOI: 10.1073/pnas.0308744101.
- [30] Carol F. Elias und Darshana Purohit. „Leptin signaling and circuits in puberty and fertility“. In: *Cellular and Molecular Life Sciences* 70.5 (2013), S. 841–862. DOI: 10.1007/s00018-012-1095-1.
- [31] H. L. Fehm, W. Kern und A. Peters. „The selfish brain: competition for energy resources“. In: *Prog Brain Res* 153 (2006), S. 129–40. DOI: 10.1016/s0079-6123(06)53007-9.
- [32] M. Ferron und J. Lacombe. „Regulation of energy metabolism by the skeleton: osteocalcin and beyond“. In: *Arch Biochem Biophys* 561 (2014), S. 137–46. DOI: 10.1016/j.abb.2014.05.022.
- [33] M. Ferron u. a. „Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling and energy metabolism“. In: *Cell* 142.2 (2010), S. 296–308. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.003.
- [34] M. Ferron u. a. „Intermittent injections of osteocalcin improve glucose metabolism and prevent type 2 diabetes in mice“. In: *Bone* 50.2 (2012), S. 568–75. DOI: 10.1016/j.bone.2011.04.017.
- [35] M. Ferron u. a. „Osteocalcin differentially regulates beta cell and adipocyte gene expression and affects the development of metabolic diseases in wild-type mice“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 105.13 (2008), S. 5266–70. DOI: 10.1073/pnas.0711119105.
- [36] L. Fu u. a. „The molecular clock mediates leptin-regulated bone formation“. In: *Cell* 122.5 (2005), S. 803–15. DOI: 10.1016/j.cell.2005.06.028.
- [37] K. Fulzele und T. L. Clemens. „Novel functions for insulin in bone“. In: *Bone* 50.2 (2012), S. 452–6. DOI: 10.1016/j.bone.2011.06.018.
- [38] K. Fulzele u. a. „Disruption of the insulin-like growth factor type 1 receptor in osteoblasts enhances insulin signaling and action“. In: *J Biol Chem* 282.35 (2007), S. 25649–58. DOI: 10.1074/jbc.M700651200.
- [39] K. Fulzele u. a. „Insulin receptor signaling in osteoblasts regulates postnatal bone acquisition and body composition“. In: *Cell* 142.2 (2010), S. 309–19. DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.002.
- [40] O. P. Gautschi u. a. „Osteoinductive effect of cerebrospinal fluid from brain-injured patients“. In: *J Neurotrauma* 24.1 (2007), S. 154–62. DOI: 10.1089/neu.2006.0166.
- [41] O. P. Gautschi u. a. „Serum-mediated osteogenic effect in traumatic brain-injured patients“. In: *ANZ J Surg* 79.6 (2009), S. 449–55. DOI: 10.1111/j.1445-2197.2008.04803.x.
- [42] A. Ghazali u. a. „Bone mineral density directly correlates with elevated serum leptin in haemodialysis patients“. In: *Nephrol Dial Transplant* 18.9 (2003), S. 1882–90.

- [43] F. Graef u. a. „Impaired fracture healing with high non-union rates remains irreversible after traumatic brain injury in leptin-deficient mice“. In: *J Musculoskelet Neuronal Interact* 17.2 (2017), S. 78–85.
- [44] M. W. Hamrick u. a. „Leptin deficiency produces contrasting phenotypes in bones of the limb and spine“. In: *Bone* 34.3 (2004), S. 376–83. DOI: 10.1016/j.bone.2003.11.020.
- [45] M. W. Hamrick u. a. „Leptin treatment induces loss of bone marrow adipocytes and increases bone formation in leptin-deficient ob/ob mice“. In: *J Bone Miner Res* 20.6 (2005), S. 994–1001. DOI: 10.1359/jbmr.050103.
- [46] P. V. Hauschka, J. B. Lian und P. M. Gallop. „Direct identification of the calcium-binding amino acid, gamma-carboxyglutamate, in mineralized tissue“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 72.10 (1975), S. 3925–9.
- [47] H. S. Hill u. a. „Carboxylated and uncarboxylated forms of osteocalcin directly modulate the glucose transport system and inflammation in adipocytes“. In: *Horm Metab Res* 46.5 (2014), S. 341–7. DOI: 10.1055/s-0034-1368709.
- [48] E. Hinoi u. a. „The sympathetic tone mediates leptin’s inhibition of insulin secretion by modulating osteocalcin bioactivity“. In: *J Cell Biol* 183.7 (2008), S. 1235–42. DOI: 10.1083/jcb.200809113.
- [49] T. Histing u. a. „Small animal bone healing models: Standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting“. In: *Bone* 49.4 (2011), S. 591–599. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2011.07.007>.
- [50] B. Hitze u. a. „How the selfish brain organizes its supply and demand“. In: *Front Neuroenergetics* 2 (2010), S. 7. DOI: 10.3389/fnene.2010.00007.
- [51] M. Hofman u. a. „Improved fracture healing in patients with concomitant traumatic brain injury: proven or not?“ In: *Mediators Inflamm* 2015 (2015), S. 204842. DOI: 10.1155/2015/204842.
- [52] A. Idelevich, K. Sato und R. Baron. „What are the effects of leptin on bone and where are they exerted?“ In: *J Bone Miner Res* 28.1 (2013), S. 18–21. DOI: 10.1002/jbmr.1812.
- [53] K. K. Ivaska u. a. „The effects of acute hyperinsulinemia on bone metabolism“. In: *Endocr Connect* 4.3 (2015), S. 155–62. DOI: 10.1530/ec-15-0022.
- [54] G. Karsenty. „Central control of bone formation“. In: *Adv Nephrol Necker Hosp* 31 (2001), S. 119–33.
- [55] G. Karsenty. „Convergence between bone and energy homeostases: leptin regulation of bone mass“. In: *Cell Metab* 4.5 (2006), S. 341–8. DOI: 10.1016/j.cmet.2006.10.008.
- [56] G. Karsenty. „The central regulation of bone remodeling“. In: *Trends Endocrinol Metab* 11.10 (2000), S. 437–9.

- [57] G. Karsenty und P. Ducy. „The hypothalamic control of bone mass, implication for the treatment of osteoporosis“. In: *Ann Endocrinol (Paris)* 67.2 (2006), S. 123.
- [58] G. Karsenty und M. Ferron. „The contribution of bone to whole-organism physiology“. In: *Nature* 481.7381 (2012), S. 314–20. DOI: 10.1038/nature10763.
- [59] G. Karsenty und F. Oury. „Biology without walls: the novel endocrinology of bone“. In: *Annu Rev Physiol* 74 (2012), S. 87–105. DOI: 10.1146/annurev-physiol-020911-153233.
- [60] N. B. Kavukcuoglu, P. Patterson-Buckendahl und A. B. Mann. „Effect of osteocalcin deficiency on the nanomechanics and chemistry of mouse bones“. In: *J Mech Behav Biomed Mater* 2.4 (2009), S. 348–54. DOI: 10.1016/j.jmbbm.2008.10.010.
- [61] G. Kerimoglu u. a. „Effects of leptin on fracture healing in rat tibia“. In: *Eklem Hastalik Cerrahisi* 24.2 (2013), S. 102–7. DOI: 10.5606/ehc.2013.23.
- [62] S. N. Khan u. a. „The temporal role of leptin within fracture healing and the effect of local application of recombinant leptin on fracture healing“. In: *J Orthop Trauma* 27.11 (2013), S. 656–62. DOI: 10.1097/BOT.0b013e3182847968.
- [63] K. Kover u. a. „Osteocalcin protects pancreatic beta cell function and survival under high glucose conditions“. In: *Biochem Biophys Res Commun* 462.1 (2015), S. 21–6. DOI: 10.1016/j.bbrc.2015.04.095.
- [64] J. Lacombe, G. Karsenty und M. Ferron. „In vivo analysis of the contribution of bone resorption to the control of glucose metabolism in mice“. In: *Mol Metab* 2.4 (2013), S. 498–504. DOI: 10.1016/j.molmet.2013.08.004.
- [65] N. K. Lee. „An evolving integrative physiology: skeleton and energy metabolism“. In: *BMB Rep* 43.9 (2010), S. 579–83. DOI: 10.5483/BMBRep.2010.43.9.579.
- [66] N. K. Lee und G. Karsenty. „Reciprocal regulation of bone and energy metabolism“. In: *J Musculoskelet Neuronal Interact* 8.4 (2008), S. 351.
- [67] N. K. Lee u. a. „Endocrine regulation of energy metabolism by the skeleton“. In: *Cell* 130.3 (2007), S. 456–69. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.047.
- [68] Y. H. Lee und M. F. White. „Insulin receptor substrate proteins and diabetes“. In: *Arch Pharm Res* 27.4 (2004), S. 361–70.
- [69] J.W. Lighthall. „Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model.“ In: *J Neurotrauma* 5.1 (1988), S. 1–15.
- [70] Per Lindström. „The Physiology of Obese-Hyperglycemic Mice [ob/ob Mice]“. In: *TheScientificWorldJOURNAL* 7 (2007). DOI: 10.1100/tsw.2007.117.
- [71] R. J. Locher u. a. „Traumatic brain injury and bone healing: radiographic and biomechanical analyses of bone formation and stability in a combined murine trauma model“. In: *J Musculoskelet Neuronal Interact* 15.4 (2015), S. 309–15.

- [72] G. Lombardi u. a. „A four-season molecule: osteocalcin. Updates in its physiological roles“. In: *Endocrine* 48.2 (2015), S. 394–404. DOI: 10.1007/s12020-014-0401-0.
- [73] K. J. Motyl, L. R. McCabe und A. V. Schwartz. „Bone and glucose metabolism: a two-way street“. In: *Arch Biochem Biophys* 503.1 (2010), S. 2–10. DOI: 10.1016/j.abb.2010.07.030.
- [74] K. J. Motyl und C. J. Rosen. „Understanding leptin-dependent regulation of skeletal homeostasis“. In: *Biochimie* 94.10 (2012), S. 2089–96. DOI: 10.1016/j.biochi.2012.04.015.
- [75] K. J. Oldknow, V. E. MacRae und C. Farquharson. „Endocrine role of bone: recent and emerging perspectives beyond osteocalcin“. In: *J Endocrinol* 225.1 (2015), R1–19. DOI: 10.1530/joe-14-0584.
- [76] F. Oury und G. Karsenty. „Towards a serotonin-dependent leptin roadmap in the brain“. In: *Trends Endocrinol Metab* 22.9 (2011), S. 382–7. DOI: 10.1016/j.tem.2011.04.006.
- [77] M. S. Patel und F. Elefteriou. „The new field of neuroskeletal biology“. In: *Calcif Tissue Int* 80.5 (2007), S. 337–47. DOI: 10.1007/s00223-007-9015-3.
- [78] F. J. de Paula, M. C. Horowitz und C. J. Rosen. „Novel insights into the relationship between diabetes and osteoporosis“. In: *Diabetes Metab Res Rev* 26.8 (2010), S. 622–30. DOI: 10.1002/dmrr.1135.
- [79] A. Peters. „The selfish brain: Competition for energy resources“. In: *Am J Hum Biol* 23.1 (2011), S. 29–34. DOI: 10.1002/ajhb.21106.
- [80] A. Peters u. a. „The selfish brain: competition for energy resources“. In: *Neurosci Biobehav Rev* 28.2 (2004), S. 143–80. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2004.03.002.
- [81] M. Pi, Y. Wu und L. D. Quarles. „GPRC6A mediates responses to osteocalcin in beta-cells in vitro and pancreas in vivo“. In: *J Bone Miner Res* 26.7 (2011), S. 1680–3. DOI: 10.1002/jbmr.390.
- [82] M. Pi u. a. „GPRC6A null mice exhibit osteopenia, feminization and metabolic syndrome“. In: *PLoS One* 3.12 (2008), e3858. DOI: 10.1371/journal.pone.0003858.
- [83] M. Pi u. a. „Impaired osteoblast function in GPRC6A null mice“. In: *J Bone Miner Res* 25.5 (2010), S. 1092–102. DOI: 10.1359/jbmr.091037.
- [84] D. D. Pierroz u. a. „Beta 1-2-adrenergic receptor KO mice have decreased total body and cortical bone mass despite increased trabecular number“. In: *J Bone Miner Res* 19 (2004).
- [85] S. N. Pramojane u. a. „Possible roles of insulin signaling in osteoblasts“. In: *Endocr Res* 39.4 (2014), S. 144–51. DOI: 10.3109/07435800.2013.879168.
- [86] P. A. Price, J. W. Poser und N. Raman. „Primary structure of the gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bovine bone“. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 73.10 (1976), S. 3374–5.

- [87] M. T. Rached u. a. „FoxO1 expression in osteoblasts regulates glucose homeostasis through regulation of osteocalcin in mice“. In: *J Clin Invest* 120.1 (2010), S. 357–68. DOI: 10.1172/jci39901.
- [88] R. C. Riddle und T. L. Clemens. „Insulin, osteoblasts, and energy metabolism: why bone counts calories“. In: *J Clin Invest* 124.4 (2014), S. 1465–7. DOI: 10.1172/jci75554.
- [89] C. J. Rosen und A. Klibanski. „Bone, fat, and body composition: evolving concepts in the pathogenesis of osteoporosis“. In: *Am J Med* 122.5 (2009), S. 409–14. DOI: 10.1016/j.amjmed.2008.11.027.
- [90] T. Roszer u. a. „Leptin receptor deficient diabetic (db/db) mice are compromised in postnatal bone regeneration“. In: *Cell Tissue Res* 356.1 (2014), S. 195–206. DOI: 10.1007/s00441-013-1768-6.
- [91] K. Bezerra dos Santos Magalhaes u. a. „Metabolic syndrome and central fat distribution are related to lower serum osteocalcin concentrations“. In: *Ann Nutr Metab* 62.3 (2013), S. 183–8. DOI: 10.1159/000342561.
- [92] E. L. Scheller u. a. „Leptin functions peripherally to regulate differentiation of mesenchymal progenitor cells“. In: *Stem Cells* 28.6 (2010), S. 1071–80. DOI: 10.1002/stem.432.
- [93] R. Seemann u. a. „Leptin-deficiency eradicates the positive effect of traumatic brain injury on bone healing: histological analyses in a combined trauma mouse model“. In: *J Musculoskelet Neuronal Interact* 18.1 (2018), S. 32–41.
- [94] J. Shao u. a. „Bone Regulates Glucose Metabolism as an Endocrine Organ through Osteocalcin“. In: *Int J Endocrinol* 2015 (2015), S. 967673. DOI: 10.1155/2015/967673.
- [95] Y. Song u. a. „Increased levels of calcitonin gene-related peptide in serum accelerate fracture healing following traumatic brain injury“. In: *Mol Med Rep* 5.2 (2012), S. 432–8. DOI: 10.3892/mmr.2011.645.
- [96] C. M. Steppan u. a. „Leptin is a potent stimulator of bone growth in ob/ob mice“. In: *Regul Pept* 92.1-3 (2000), S. 73–8.
- [97] A. K. Stunes u. a. „Systemic leptin administration in supraphysiological doses maintains bone mineral density and mechanical strength despite significant weight loss“. In: *Endocrinology* 153.5 (2012), S. 2245–53. DOI: 10.1210/en.2011-1848.
- [98] S. Takeda. „Osteoporosis: a neuroskeletal disease?“ In: *Int J Biochem Cell Biol* 41.3 (2009), S. 455–9. DOI: 10.1016/j.biocel.2008.08.002.
- [99] S. Takeda, F. Eleftheriou und G. Karsenty. „Common endocrine control of body weight, reproduction, and bone mass“. In: *Annu Rev Nutr* 23 (2003), S. 403–11. DOI: 10.1146/annurev.nutr.23.011702.073312.
- [100] S. Takeda und G. Karsenty. „Central control of bone formation“. In: *J Bone Miner Metab* 19.3 (2001), S. 195–8.

- [101] S. Takeda und G. Karsenty. „Molecular bases of the sympathetic regulation of bone mass“. In: *Bone* 42.5 (2008), S. 837–40. DOI: 10.1016/j.bone.2008.01.005.
- [102] S. Takeda u. a. „Leptin regulates bone formation via the sympathetic nervous system“. In: *Cell* 111.3 (2002), S. 305–17.
- [103] S. Tsitsilonis u. a. „The effect of traumatic brain injury on bone healing: an experimental study in a novel in vivo animal model“. In: *Injury* 46.4 (2015), S. 661–5. DOI: 10.1016/j.injury.2015.01.044.
- [104] R. T. Turner u. a. „Peripheral leptin regulates bone formation“. In: *J Bone Miner Res* 28.1 (2013), S. 22–34. DOI: 10.1002/jbmr.1734.
- [105] L. Wang u. a. „Elevated leptin expression in rat model of traumatic spinal cord injury and femoral fracture“. In: *J Spinal Cord Med* 34.5 (2011), S. 501–9. DOI: 10.1179/2045772311y.0000000034.
- [106] J. Wei u. a. „Bone-specific insulin resistance disrupts whole-body glucose homeostasis via decreased osteocalcin activation“. In: *J Clin Invest* 124.4 (2014), S. 1–13. DOI: 10.1172/jci72323.
- [107] J. Wei u. a. „Glucose Uptake and Runx2 Synergize to Orchestrate Osteoblast Differentiation and Bone Formation“. In: *Cell* 161.7 (2015), S. 1576–91. DOI: 10.1016/j.cell.2015.05.029.
- [108] Y. Wei u. a. „Elevated leptin expression in a rat model of fracture and traumatic brain injury“. In: *J Pharm Pharmacol* 60.12 (2008), S. 1667–72. DOI: 10.1211/jpp/60.12.0013.
- [109] V. K. Yadav u. a. „A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure“. In: *Cell* 138.5 (2009), S. 976–89. DOI: 10.1016/j.cell.2009.06.051.
- [110] S. Yang u. a. „Arachidonic acid: a bridge between traumatic brain injury and fracture healing“. In: *J Neurotrauma* 29.17 (2012), S. 2696–705. DOI: 10.1089/neu.2012.2442.
- [111] S. Yaturu. „Diabetes and skeletal health“. In: *J Diabetes* 1.4 (2009), S. 246–54. DOI: 10.1111/j.1753-0407.2009.00049.x.
- [112] L. C. Zanatta u. a. „Osteocalcin, energy and glucose metabolism“. In: *Arq Bras Endocrinol Metabol* 58.5 (2014), S. 444–51.
- [113] D. Zhang u. a. „The influence of brain injury or peripheral nerve injury on calcitonin gene-related peptide concentration variation and fractures healing process“. In: *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 37.2 (2009), S. 85–91. DOI: 10.1080/10731190902743149.
- [114] J. Zhang u. a. „Leptin promotes ossification through multiple ways of bone metabolism in osteoblast: a pilot study“. In: *Gynecol Endocrinol* 29.8 (2013), S. 758–62. DOI: 10.3109/09513590.2013.798278.

-
- [115] Y. Zhang, P. Zhou und J. W. Kimondo. „Adiponectin and osteocalcin: relation to insulin sensitivity“. In: *Biochem Cell Biol* 90.5 (2012), S. 613–20. DOI: 10.1139/o2012-022.
- [116] Yiyang Zhang u. a. „Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue“. In: *Nature* 372.6505 (1994), S. 425–432.
- [117] B. Zhou u. a. „Osteocalcin reverses endoplasmic reticulum stress and improves impaired insulin sensitivity secondary to diet-induced obesity through nuclear factor-kappaB signaling pathway“. In: *Endocrinology* 154.3 (2013), S. 1055–68. DOI: 10.1210/en.2012-2144.
- [118] M. L. Zoch, T. L. Clemens und R. C. Riddle. „New insights into the biology of osteocalcin“. In: *Bone* (2015). DOI: 10.1016/j.bone.2015.05.046.

Lebenslauf

MEIN LEBENSLAUF WIRD AUS DATENSCHUTZRECHTLICHEN GRÜNDEN
IN DER ELEKTRONISCHEN VERSION MEINER ARBEIT NICHT VERÖFFENT-
LICHT.

Veröffentlichungen

„Leptin-deficiency eradicates the positive effect of traumatic brain injury on bone healing: histological analyses in a combined trauma mouse model“. In: *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2018 Mar 1;18 (1):32-41. Seemann R, Graef F, Garbe A, Keller J, Huang F, Duda G, Schmidt-Bleek K, Schaser KD, Tsitsilonis S.

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

„Therapeutic options in periprosthetic joint infections of the hip“. In: *Chirurgische Praxis* 2017 Jan 83(2):246-259. Garbe A, Renz N, Trampuz A.

„Traumatic brain injury and bone healing: radiographic and biomechanical analyses of bone formation and stability in a combined murine trauma model“. In: *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2015 Dec;15(4):309-15. Locher RJ, Lünemann T, Garbe A, Schaser K, Schmidt-Bleek K, Duda G, Tsitsilonis S.

„Extra-intracranial standard bypass in the elderly: perioperative risk, bypass patency and outcome“. In: *Cerebrovasc Dis* 2013;36 (3):228-35. doi: 10.1159/000354159. Epub 2013 Oct 12. Sandow N, von Weitzel-Mudersbach P, Rosenbaum S, König S, Buchert R, Mehl SR, Garbe A, Vajkoczy P.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Anja GARBE, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Über die Auswirkung des Schädel-Hirn-Traumas und der Fraktur der langen Röhrenknochen auf den posttraumatischen Hormonhaushalt am Wildtyp- und leptin-defizienten Mausmodell“ 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 kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) 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. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. 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.

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

Datum:

Unterschrift:

Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt meinen Doktorvätern *Prof. Dr. med. Klaus-Dieter Schaser* und *PD Dr. med. Sven Märdian* für die Überlassung des Dissertationsthemas, die regelmäßigen und konstruktiven Arbeitsgruppen-Treffen sowie die wertvollen Hinweise bei der Erstellung sowie Korrektur der vorliegenden Arbeit.

Mein großer Dank geht des Weiteren an meinen Betreuer *PD Dr. med. Serafeim Tsitsilonis*, der mich von Beginn an für die Unfallchirurgie und das Thema Knochenheilung begeisterte und ohne dessen Ideen und Tatkraft die vorliegende Arbeit nicht denkbar gewesen wäre. Mein tiefer Dank geht insbesondere auch an meine Betreuerin *Dr. med. Ricarda Seemann*, ohne deren stetige Motivation und wissenschaftliche Anregung sowie handfeste Unterstützung die Durchführung der, dieser Arbeit zugrundeliegenden, Hormonanalysen nicht möglich und in jedem Fall weniger unterhaltsam und mitreißend gewesen wäre.

Ferner gilt mein Dank meinen ehemaligen Mitdoktoranden und nun Kollegen, *Dr. med. Frank Graef* und *Tim Linnemann*, für ihre praktische und freundschaftliche Unterstützung bei allen Experimenten und den einzigartigen Humor, den sie in unsere Arbeitsgruppe gebracht haben.

Mein Dank gilt weiter auch den Mitarbeitern des Julius-Wolff-Instituts und der Tierexperimentellen Einrichtung der Charité-Universitätsmedizin Berlin Campus Virchow Klinikum. Insbesondere *Dr. rer. nat. Katharina Schmidt-Bleek*, die stets als kompetente Ansprechpartnerin für sämtliche Experimente und Fragestellungen dieser Dissertation zur Verfügung stand; außerdem *Gabriela Korus*, *Dr. rer. nat. Claudia Schlundt* und *Mario Thiele* die sowohl wissenschaftlich als auch menschlich eine große Hilfe beim Verfassen dieser Arbeit waren und von denen ich im Rahmen meiner Promotion viel lernen durfte.

Zudem danke ich meinen Freundinnen *Sanne Burkert*, *Franziska Braun*, *Linda Burmeister*, *Ina Steiding*, *Katja Kiefer* und *Judith Kauper* für ihre jahrelange Unterstützung und ihren unermüdlichen Zuspruch auf allen Etappen meines Studiums und Lebens.

Schließlich, danke ich von ganzem Herzen meinen Eltern, *Elfriede Garbe* und *Wolf-Dieter Bruschi*, sowie meinem Freund *Jan Nicholas Kellermann* für ihre stets bedingungslose Liebe, ihren unerschütterlichen Glauben in meine Fähigkeiten und die Geduld, mit der sie mich tagtäglich auf meinem Weg begleiten.