

Aus der
Klinik und Poliklinik für
Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Zentrum für Operative Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. J. M. Rueger

Experimentelle Untersuchungen zum Einfluss der Sexualhormone Östrogen und Testosteron auf die Frakturheilung

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Humanmedizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Marco Gesicki
aus Rostock

Hamburg, 2005

Angenommen von dem Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am:

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg

Dekan:

Referent:

Korreferent:

Für meine liebe Mutter und Großmutter

I	Inhaltsverzeichnis.....	4
II	Verzeichnis der Abbildungen.....	6
III	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen.....	7
IV	Verzeichnis der verwendeten Materialien.....	9
1	Einleitung.....	10
1.1	Probleme der Frakturheilung.....	10
1.2	Frakturheilungsmodulationen in der Literatur.....	12
1.3	Das Skelett	14
1.4	Die Knochenzellen.....	15
1.5	Modeling und Remodeling.....	19
1.6	Systemhormone.....	20
1.7	Sexualhormone und Knochen.....	20
1.8	Östrogen.....	21
1.8.1	Synthese.....	22
1.8.2	Wirkungen.....	23
1.8.3	Östrogen Rezeptoren.....	23
1.9	Testosteron.....	25
1.9.1	Synthese.....	25
1.9.2	Wirkungen.....	26
1.9.3	Bedeutung für das Skelettsystem.....	26
1.9.4	Testosteron Rezeptoren.....	27
1.9.5	Altersbedingte Veränderungen.....	28
1.9.6	Mutationsbedingte Veränderungen.....	28
1.10	Verlust der Gonadenfunktion.....	29
1.11	Zielsetzung.....	32
2	Material und Methoden.....	33
2.1	Tierversuchsgenehmigung.....	33
2.2	Einteilung der Versuchsgruppen.....	33
2.3	Versuchsdauer.....	33
2.4	Versuchstiere.....	34
2.5	Narkose.....	35
2.6	Operation.....	35

2.7	Kontaktradiographie.....	36
2.8	Histologie.....	37
2.9	Histomorphometrie.....	38
2.10	Biomechanik.....	38
2.11	Mikro-CT-Analysen.....	39
2.12	Statistik.....	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Kontaktradiographie.....	42
3.2	Histologie.....	44
3.3	Histomorphometrie.....	48
3.4	Biomechanik.....	52
3.5	Mikro-CT-Analysen.....	55
4	Diskussion.....	57
5	Zusammenfassung.....	65
6	Literaturverzeichnis.....	67
7	Danksagung.....	75
8	Lebenslauf.....	76
8.1	Curriculum vitae.....	76
8.2	Publikationen, Vorträge im Rahmen der Dissertation.....	77
9	Erklärung.....	78

II Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1:	Schema: Aufbau des Osteoklasten.....	18
Abb. 2:	Strukturformel 17-beta-Östradiol.....	22
Abb. 3:	Synthese, Transport und Metabolismus von Östrogen.....	23
Abb. 4:	Struktur und funktionelle Domänen der Östrogenrezeptoren.....	24
Abb. 5:	Strukturformel von Dihydrotestosteron.....	26
Abb. 6:	Kontaktradiographie einer osteoporotischen Wirbelsäule.....	31
Abb. 7:	Frakturmaschine, osteosynthetisch versorgte Femur.....	37
Abb. 8:	Darstellung 3–Punkt–Biegeversuch, Zwickmaschine.....	39
Abb. 9:	Verlauf des physiologischen Knochenbruchheilungsprozesses.....	42
Abb. 10:	Kontaktradiographie von Kontrollfemur vs. Östrogenapplikation.....	44
Abb. 11:	Kontaktradiographie Kontrollfemur vs. Testosteronapplikation.....	44
Abb. 12:	Histologie von Kontrollfemur vs. Östrogenapplikation.....	46
Abb. 13:	Histologie von Kontrollfemur vs. Testosteronapplikation.....	46
Abb. 14:	Vergleich BV/TV Kontrolle vs. Östrogen.....	48
Abb. 15:	Vergleich BV/TV Kontrolle vs. Testosteron.....	48
Abb. 16:	Histomorphometrie Kontrolle vs. Östrogenapplikation.....	50
Abb. 17:	Histomorphometrie Kontrolle vs. Testosteronapplikation.....	50
Abb. 18:	Knochenformation pro Kallusfläche Kontrolle vs. Östrogen.....	52
Abb. 19:	Knochenformation pro Kallusfläche Kontrolle vs. Testosteron.....	52
Abb. 20:	Biomechanische Kompetenz Kontrolle vs. Östrogenapplikation.....	54
Abb. 21:	Biomechanische Kompetenz Kontrolle vs. Testosteronapplikation....	54
Abb. 22:	Vergleich Bruchkraft Kontrolle Tag 20 vs. Östrogen Tag 15.....	56
Abb. 23:	Mikro–CT–Analyse Kontrolle vs. Östrogen.....	57

III Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ArKo	Aromatase Knockout
BMD	Knochendichte (Bone mineral density)
BMP	Bone morphogenetic protein
BV/TV	Knochen- /Gewebevolumen (Bone Volume/Tissue Volume)
Cox-1	Cyclooxygenase 1
Cox-2	Cyclooxygenase 2
DHT	Dihydrotestosteron
DNA	Deoxy-Ribonuklein-säure (Deoxy ribonucleic acid)
ER-alpha	Östrogenrezeptor alpha
ER-beta	Östrogenrezeptor beta
F	Bruchkraft in Newton
FGF	Wachstumsfaktor (Fibroblast growth factor)
IGF	Wachstumsfaktor (Insulin-like growth factor)
IL	Interleukin
kV	Kilovolt
LH	Luteinisierendes Hormon
m	milli (10^{-3})
μ	mikro (10^{-6})
M-CSF	Wachstumsfaktor (Macrophage-colony stimulating factor)
NSAR	Nicht steroidales Antirheumatikum
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerinligand (=RANKL=ODF=TRANCE)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate buffered saline)
PDGF	Wachstumsfaktor (platelet-derived growth factor)
PGE	Prostaglandin E
PTH	Parathormon
RANK	Receptor activator for NFkappaB
RANKL	Ligand von RANK (Receptor activator for NFkappaB ligand)
Runx 2	ehem. Cbfa1, Runx 2 (core binding transcription factor)
SD	Standardabweichung
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

TRAP	Tartratresistente saure Phosphatase (Tartratresistent acid phosphatase)
UV	Ultraviolett
Vs	versus
Wt	Wildtyp

IV Verzeichnis der verwendeten Materialien

Autoklav:	Blitz, KSG-Sterilisatoren (Olching)
Durchlichtmikroskop:	Axioskop II, Zeiss (Jena)
Inverses Mikroskop:	IX50/IX70, Olympus (Hamburg)
Kontaktradiograph:	Faxitron Cabinet System, Faxitron (Wheeling, USA)
Kühltruhen:	Economy, Liebherr (Biberach an der Riß)
Mikrotom:	CUT 4060/E Microtec (München)
Mikro- CT:	µCT40, Scanco Medical AG, Bassersdorf, Schweiz
Osteosynthese:	Insyte W, Infusion Therapy Systems Inc., (Sandy, Utah 84070, USA)
Röntgenfilm:	X-omat MA, Firma Kodak, (Frankreich)
Zwick Maschine:	Z2.5/TN 1S Test Maschine, Zwick GmbH&Co, (Ulm, Deutschland)

1 Einleitung

1.1 Probleme der Frakturheilung

Frakturen und deren Folgen begegnen uns fast jeden Tag. Sie sind eines der größten klinischen Probleme in der Unfall- und Orthopädischen Chirurgie und sind nicht selten mit einer Erkrankung des Knochens assoziiert.

Sportverletzungen, Unfälle, zu hohe Belastungen oder aber auch Strukturveränderungen des Knochens selbst, sind nur einige Beispiele für Frakturursachen.

Als Folgen resultieren eine eingeschränkte Bewegungsfähigkeit, Immobilisation, geringere Belastbarkeit und demzufolge eine Minderung oder gar eine dauerhafte Einschränkung der Lebensqualität.

Ein weiterer wichtiger Aspekt sind die sozioökonomischen Folgen von Frakturen, welche aus den anfallenden Kosten der Versorgung, der Nachsorge, der Rehabilitation, der Behandlung von Folgeschäden sowie der gegebenenfalls assoziierten Arbeitsunfähigkeit resultieren.

Um eine Vorstellung vom Ausmaß der Belastung des Gesundheitssystems durch Frakturen zu bekommen, muss man sich vor Augen führen, dass allein in den USA jährlich ca. 6 Millionen Frakturen auftreten, wovon ungefähr 10% mit Komplikationen durch gestörte Abläufe der Knochenheilung behaftet sind¹⁴ und dass allein durch Osteoporose und die damit assoziierten Behandlungen täglich allein in Europa ein Budget von 24 Mio. Euro benötigt wird⁴.

Die Traumatologie, d.h. die Versorgung von Verletzungs- und Unfallfolgen stellt einen der ältesten Zweige der Medizin dar. Die Reposition und Schienung frakturierter Knochen ist bereits mehrere tausend Jahre alt. Schon die babylonische Medizin bediente sich exakter Techniken zur Behandlung von Knochenbrüchen und Luxationen. Anatomisch fundierte Handgriffe zur Reposition sowie mechanische Hilfsmittel zur Erzeugung einer Dauerextension sind auch von Hippokrates beschrieben worden⁸⁶. Man hatte damals nicht nur das Wissen, dass der gebrochene Knochen wieder zusammenheilen wird, man wusste überraschenderweise auch, dass die Art und Weise mit der der Knochen die Heilung vollzieht, von der Stellung der Frakturrenden und der Immobilisation abhängig ist. Die Autoren der hippokratischen Schriften formulierten ihr Wissen

damals so: „Ferner aber erlangen auch alle Knochen ihre Festigkeit wieder, wenn sie nicht, in natürlicher Weise gelagert, in ein und derselben Stellung regungslos verharren, und die Kallusbildung wird eine schwächere“³³. Diese Formulierung zeigt, dass Frakturheilung und Kallusbildung bereits damals bekannte Begriffe waren, die es galt näher zu erforschen.

Die Mechanismen der Frakturheilung sollten jedoch nicht als einzelne Vorgänge betrachtet, sondern als komplexer Zusammenhang der Skelettbiologie gesehen werden. Die Frakturheilung, bestehend aus der Interaktion von Hormonen, Zytokinen, extrazellulärer Matrix und verschiedenen Wachstumsfaktoren^{17,40,77,94}, muss also als ein komplexer Prozess verstanden werden.

So zeigte sich in den letzten Jahren ein rapider Fortschritt auf dem Gebiet des molekularen Verständnisses der Frakturheilung, der letztendlich zu neuen experimentellen Therapien, wie z.B. der Applikation von *bone morphogenetic proteins* und Wachstumsfaktoren führte⁵⁴. Trotz der Tatsache, dass die Bedeutung der therapeutischen Intervention in all den Jahren signifikant gestiegen ist, wird die Biologie der Frakturheilung immer noch nicht vollständig verstanden.

So existiert bis heute keine Therapie, die routinemäßig bei Patienten mit Knochenbrüchen angewendet werden kann, um deren Frakturheilung zu verbessern oder gar zu beschleunigen.

Einer der wohl wichtigsten Bausteine im Prozess der Knochenhomöostase sind die Sexualhormone Östrogen und Testosteron. Von ihnen ist bekannt, dass sie am Prozess des Knochenremodelings beteiligt sind und einen wichtigen Einfluss auf das Gleichgewicht des Skelettsystems haben.

Obwohl zum einen belegt ist, dass sie für die Entwicklung des Knochens während des Wachstums unabdinglich sind und entscheidend die Stärke des Knochens verbessern, ist es überraschend und erstaunlich, dass trotz vieler Daten über Sexualhormone und ihren Einfluss auf den Knochen, die Rolle dieser für den Knochen so wichtigen Hormone Östrogen und Testosteron in der Frakturheilung bis heute nicht klar definiert ist.

Unter diesem Gesichtspunkt wäre es interessant, wenn man zusätzlich zu dem großen Wissen über den vielfältigen Einfluss von Östrogen und Testosteron auf das Skelettsystem, auch den Einfluss der Sexualhormone auf die Reparationsmechanismen des Skelettsystems genauer ergründen könnte. Alles in

Hinblick auf die Hypothese, dass Sexualhormone zur Verbesserung und Beschleunigung der Frakturheilung nach intramedullärer Nagelung benutzt werden könnten.

1.2 Frakturheilungsmodulationen in der Literatur

Dass das Interesse und die Forschung in Bezug auf Verbesserung und Beschleunigung der Frakturheilung keine neuen Ansätze sind, wird deutlich, wenn man in der Literatur zu diesem Thema nachschlägt. So gibt es vielerlei verschiedene Ansätze und Herangehensweisen, um sich diesem Thema zu widmen.

So hat sich z.B. die Arbeitsgruppe um Lee⁵³ mit der Verbesserung der Frakturheilung durch die in den letzten Jahren an Bedeutung gewinnende Gentherapie beschäftigt. In ihrer Studie isolierten sie menschliche Skelettmuskelzellen und behandelten sie ex vivo mit Adeno- und Retroviren so, dass sie hinterher in der Lage waren, *bone morphogenetic protein 2* (BMP-2) zu exprimieren. Die so behandelten Zellen wurden in nicht heilende Knochendefekte von SCID-Mäusen implantiert und der Verschluss der Knochendefekte wurde nach 4 und 8 Wochen makroskopisch und histologisch ausgewertet. Mäuse, welche die BMP-2 produzierenden menschlichen Muskelzellerivate erhalten hatten, zeigten einen vollständigen Verschluss der Knochendefekte während nicht behandelte SCID-Mäuse weiterhin einen Defekt aufwiesen.

In dieser ex vivo Studie wird gezeigt, dass mit Hilfe der relativ jungen Gentherapie eine Modulation der Frakturheilung möglich war.

Eine völlig andere Herangehensweise zeichnet dagegen die Studie von Hu und Mitarbeitern⁴⁵ aus. In ihr wird eine Beschleunigung der Frakturheilung mit Hilfe der Anwendung verschiedener Serien von alter traditioneller chinesischer Medizin beschrieben.

Anhand dieser zwei, aus zeitlich sehr weit auseinanderliegenden Wissens- und Forschungsständen resultierenden Ansätze, der Gentechnik und der alten chinesischen Medizin, lässt sich ersehen, dass man sich dem goldenen Weg zur

Verbesserung der Frakturheilung aus verschiedenen Richtungen nähern kann, ihn aber noch nicht endgültig gefunden hat.

Einige der in den letzten Jahren angefertigten Arbeiten nutzten die Möglichkeiten der Mausgenetik, indem die Frakturheilung in Mäusen mit unterschiedlichen Gendelektionen untersucht wird.

Eine sehr interessante Arbeit zu diesem Thema lieferte die Gruppe um Zhang⁹⁶, die Cyclooxygenase-1 (Cox-1) und Cyclooxygenase-2 (Cox-2) defiziente Mäuse untersuchte. Es wurden standardisierte Tibiafrakturen gesetzt und die Heilungsdauer untersucht. Die Heilung in den Cox-2 defizienten Mäusen war gegenüber den Kontrollen und den Cox-1 defizienten Mäusen deutlich verzögert. Der Defekt in der Osteogenese ließ sich durch Zugabe von Prostaglandin-E2 (PGE) komplett aufheben. Bei Anwesenheit von BMP-2 war die *bone nodule formation* gleich der, wie bei Zugabe von PGE(2) allein.

Weiterhin fand die Gruppe heraus, dass die Kulturen von den Cox-2 defizienten Mäusen deutlich niedrigere Level von Osterix und Runx2, zwei für die Knochenformation unabdingbaren Genen, aufwiesen. Diese Resultate stellen ein für Frakturheilungsmodulationen interessantes Modell vor, in welchem Cox-2 die Induktion von Runx2 und Osterix im normalen Reparationsvorgang des Skelettes steuert.

Im Rahmen dieser Studien trat ein weiterer interessanter Aspekt zu Tage. So konnten Simon und Mitarbeiter⁸² in einer Studie zur Frakturheilungsmodulation zeigen, dass die Frakturheilung und die Entwicklung des Skelettes unterschiedlichen Regelkreisen unterliegen müssen. Mäuse mit einem Mangel an Cox-2 zeigten trotz deutlich verzögerter Frakturheilung einen normalen Skelettaufbau.

Anhand der oben aufgeführten Studien soll ein kleiner Einblick in die Vielfältigkeit der bis dato zum Thema Frakturheilungsmodulation angefertigten Arbeiten gegeben werden. Jede dieser verschiedenen Herangehensweisen an die Modulation der Frakturheilung stellt interessante und für eventuelle spätere klinische Anwendung wichtige Daten vor.

Überraschenderweise fällt jedoch bei allen Literaturrecherchen auf, dass es trotz vielfältiger Studien zur Knochenbruchheilung nach wie vor keine Arbeit gibt, die den Einfluss der für die Skelettentwicklung und spätere Skeletthomöostase so essentiellen Sexualhormone, Östrogen und Testosteron, auf die Frakturheilung abschließend und zufriedenstellend klärt.

Bevor jedoch eine Zusammenfassung der heutigen wissenschaftlichen Vorstellungen und Erkenntnisse über die Frakturheilung und Kallusbildung dargestellt werden kann, sollte erst der Skelettaufbau, die Skeletthomöostase und deren Regulationsmechanismen genauer beschrieben werden.

1.3 Das Skelett

Das Skelettsystem hat verschiedenste Aufgaben zu erfüllen. Es gibt dem Körper zum einen strukturelle Unterstützung, ermöglicht den aufrechten Gang und verschiedenartigste Bewegungsabläufe, zum anderen umhüllt es die inneren Organe und schützt sie so vor äußeren Einwirkungen³². Weiterhin ist es für das menschliche Leben unabdingbar, da es die Knochenmark als Blutbildner beherbergt⁷³.

Des Weiteren fungiert das Skelettsystem als Reservoir für Calcium- und Phosphationen und spielt eine wichtige Rolle für die Homöostase dieser Minerale⁶⁶.

Scheint das Skelettsystem auf den ersten Blick auch der stabilste und am wenigsten veränderliche Teil des Körpers zu sein, fällt bei genauerer Betrachtung jedoch auf, dass es sich in einem ständigen Wandel befindet. Da es sich dabei um einen sehr langsamen Prozess handelt, bleibt er dem Auge jedoch normalerweise verborgen. Dieser ständige Umbau ist die Grundlage dafür, dass sich der Knochen an die aktuelle funktionelle Belastung adaptieren kann. Stark belastete Strukturen werden verstärkt, an wenig belasteten Stellen kommt es zur Knochenresorption und defekte Bereiche werden repariert. Dieser Prozess wird Remodeling genannt⁷⁰.

Die Zellpopulationen von Endost, Havers-Systemen und Periost bilden die Blasteme dieses Umbaus. Sie bauen als Osteoklasten alten Knochen ab, als Osteoblasten neuen Knochen auf. Im Falle einer Fraktur wird die osteogenetische Potenz der eben erwähnten Blasteme akut gesteigert, um die Frakturzone rasch

zu stabilisieren und danach wieder zu einer funktionell optimalen Struktur umzubauen³².

Zu den Konditionen für eine ungestörte Frakturheilung zählen der Kontakt der Bruchfragmente, eine ausreichende Durchblutung dieser Fragmente und eine Ruhigstellung des Knochenbruches⁸¹.

1.4 Knochenzellen

Die Aufgabe, den ausgewachsenen Knochen an alle diese Anforderungen anzupassen, wird im Wesentlichen von drei hochspezialisierten Zelltypen übernommen: Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten. Die beiden erstgenannten Zelltypen fungieren dabei als Antagonisten im Wechselspiel von Knochenbildung und Knochenresorption.

Auf der Seite der Knochenbildung steht der Osteoblast. Osteoblasten stammen von mesenchymalen Vorläuferzellen ab, die sich aus mesodermalen Keimbahnzellen entwickeln¹⁵.

Der Mechanismus über welchen die Ausbildung zum Osteoblasten gesteuert wird, ist noch nicht gänzlich geklärt, jedoch wurde herausgefunden, dass der *core binding transcription factor*, Runx2, essentiell für die Differenzierung der Osteoblasten ist. Die Unabdinglichkeit dieses Faktors wird mit einer Studie belegt, die zeigt, dass Mäuse denen dieser Faktor Runx2 fehlt, keine Ossifikation des Knorpels zeigen^{50,68}. Heterozygote Tiere zeigen einen Phänotyp mit offenen Fontanellen, abnormaler Zahnbildung, kleiner Statur und hypoplastischen Claviculae⁶³, ein Krankheitsbild welches als CCD (cleidocraniale Dysplasie) bekannt ist.

Terminal differenzierte Osteoblasten synthetisieren Osteoid, die Knochenmatrix, die zum größten Teil aus Kollagen Typ-I besteht. Durch Anlagerung von Hydroxylapatitkristallen an diese organische Matrix bildet sich die mineralisierte Knochensubstanz^{64,79}.

Nach Ablauf der physiologischen Lebensspanne gehen die aktiv sezernierenden und formenden Osteoblasten durch Apoptose unter, werden *bone-lining cell's* oder Osteozyten. Die Funktion der *bone-lining cell's* ist noch nicht vollständig geklärt, aber es wird angenommen, dass sie eine Rolle in der Aktivierung des Prozesses des Knochenremodelings spielen²².

Auf der Seite des Knochenabbaus steht der Osteoklast. Um zu verstehen, dass der Osteoklast eine der wichtigsten Zellen im Knochenstoffwechsel darstellt, muss man sich vor Augen führen, dass er die einzige Zelle mit der Fähigkeit zur Knochenresorption ist^{8,16}. Da Osteoklasten die einzigen Zellen sind die Knochen resorbieren können, sind sie für jede Knochenumstrukturierung, auch für die, die im Rahmen der Frakturheilung auftritt, von besonderer Bedeutung. Eine Frakturheilungsstörung bei gesteigerter Resorption und / oder verminderter Knochenneubildung ist unmittelbar nachvollziehbar. Aber auch eine zu geringe Resorptionsfähigkeit verhindert die nötige Dynamik eines ideal an die, nach einer Fraktur, veränderten biomechanischen Verhältnisse angepassten Knochenremodelings⁵⁸.

Um die Funktionsweise des Osteoklasten besser zu verstehen, soll er kurz charakterisiert werden. Der Osteoklast ist eine große, mehrkernige, knochenresorbierende Zelle, die von hämatopoetischen Vorläufern aus der Monozyten / Makrophagen Linie abstammt. Er wird durch die Fusion von mononukleären Zellen gebildet und ist charakterisiert durch die Ausbildung einer sogenannten *ruffled border*, welche aus einem Komplex von eingewölbter Plasmamembran und einem prominenten Zytoskelett besteht.

Er ist reich an lysosomalen Enzymen, einschließlich *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP).

Eine essentielle Voraussetzung für die Resorption ist die Bindung von Osteoklasten an die Knochenoberfläche. Sie wird durch Integrine, potentielle Liganden wie Osteopontin, Knochen-Sialoprotein, Thrombospondin, Osteonectin und Typ-I Kollagen vermittelt. Morphologisch muss die Bindung von Osteoklasten an die Knochenoberfläche als ein Aktin-enthaltender Ring gesehen werden⁵², der den Bürstensaum (*ruffled border*) komplett umschließt.

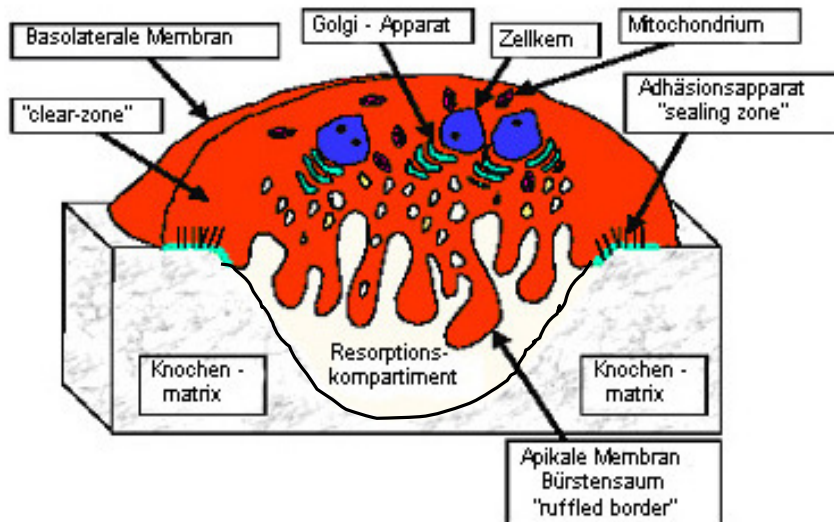


Abb.1: Schema eines aktiv resorbierenden Osteoklasten. Wasserstoffionen und proteolytische Enzyme werden auf der knochenzugewandten Seite des Osteoklasten sezerniert. Das entstehende saure Milieu im Resorptionskompartiment führt zur Lösung anorganischer Bestandteile des Knochens, so dass die freigelegten organischen Bestandteile von den Enzymen degradiert werden können. (Untersuchungen zur osteoklastären Knochenresorption im Rahmen der Skeletthomöostase, Arndt Friedrich Schilling, 2002)

Während des Prozesses der Knochenresorption werden Wasserstoffionen durch Carboanhydrase 2 erzeugt und mit Hilfe einer Protonenpumpe (ATP6i) durch die Plasmamembran gebracht, um das Knochenmineral aufzulösen. Im Anschluss werden lysosomale Enzyme, wie Kollagenase und Kathepsine, sezerniert, welche organische Anteile der Knochenmatrix zersetzen.

Die Aktivität der Osteoklasten ist aber auch durch die Apoptose bestimmt, denn genau wie die Osteozyten, sind die Osteoklasten terminal differenzierte Zellen mit einer begrenzten Lebensdauer. Während die Zytokine Interleukin I, TNF- α und M-CSF alle einen Rückgang der Osteoklastenapoptose bewirken⁸⁷ und damit die Lebensdauer dieser Zellen verlängern, steigert das Sexualhormon Östrogen interessanterweise die Apoptoserate der Osteoklasten⁴⁶ und verkürzt damit die Schaffensperiode dieser Zellart. Dies ist ein weiterer Grund für die Auswahl des Sexualhormons Östrogen für Untersuchungen auf dem Gebiet der Verbesserung oder gar Beschleunigung der Frakturheilung.

Die Bedeutung dieser Vorgänge auf den Knochenstoffwechsel zeigt sich in Gen-Mutationen. Diese sind z. B. mit dem Krankheitsbild der Osteopetrose³⁸

vergesellschaftet, welches zum ersten Mal vom Hamburger Professor Heinrich Ernst Albers-Schönberg beschrieben wurde⁷.

Ebenfalls zu Stabilitätsverlust, und zwar durch Abbau von Knochen, führt eine Überfunktion der Osteoklasten. Wichtigstes Beispiel hierfür ist die Osteoporose, bei der es zu einer Stimulation der osteoklastären Resorption nach Ausfall der Gonadenfunktion kommt. Die Wahrscheinlichkeit, eine Wirbelkörperfraktur zu erleiden steigt ab dem 60. Lebensjahr um das 20fache, das Risiko eine Schenkelhalsfraktur zu erleiden sogar um das 50fache⁹⁵.

Eine Störung der Osteoklastenphysiologie erhöht somit nicht nur die Wahrscheinlichkeit, dass ein Knochen bricht, sondern beeinträchtigt auch den anschließenden Heilungsprozeß^{58,80}.

Als dritte Zellart im Skelettsystem sind die Osteozyten zu erwähnen. Sie sind kleine flache Zellen in der Knochenmatrix und liegen in den Lakunen des Knochengewebes. Eine Besonderheit dieser Zellen ist, dass sie miteinander verbunden sind und weiterhin auch mit den osteoblastären Zellen auf der Knochenoberfläche mit Hilfe eines kanalartigen Netzwerkes, das extrazelluläre Knochenflüssigkeit enthält, in Verbindung stehen⁵. Die zytoplasmatischen Vorsprünge der Kanalikuli kommunizieren via *gap junctions* und ermöglichen den Osteozyten die Reaktion auf mechanische und biochemische Stimulation^{34,71}.

Es wird angenommen, dass Osteozyten eine zentrale Rolle bei der Antwort auf mechanische Stimulation haben, d. h., dass sie die mechanische Belastung registrieren und daraufhin eine angemessene Modeling- oder Remodelingantwort mit Hilfe mehrerer chemischer Botenstoffe, wie z.B. Glukose-6-phosphat Dehydrogenase und *Insulin-like growth factors* geben. Hierfür gibt es jedoch bisher keine *in vivo* Evidenz, so dass die Frage nach der Umschaltung mechanischer in biologische Signale im Knochen bisher ebenso wenig abschließend beantwortet ist, wie auch die nach der Osteozytenfunktion.

Die eben beschriebenen Zellen und ihre spezifischen Funktionen spielen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Skeletthomöostase durch die Prozesse des Modeling und Remodeling.

1.5 Modeling und Remodeling

Der Prozess des Knochen-Modeling setzt sich aus den Faktoren Wachstum und Formgebung des Knochens zusammen. Es tritt in den ersten zwei Dekaden des Menschenlebens auf, da im Laufe dieses Zeitabschnitts die Wachstumsfugen noch offen sind.

Im reifen Skelett des Erwachsenen tritt Modeling z.B. noch als Antwort auf vermehrte biomechanische Beanspruchung wie etwa Krafttraining auf, wobei die Fähigkeit des Skelettes zu diesem Prozess mit steigendem Alter deutlich abnimmt. Ein für diese Arbeit wichtiger Aspekt ist, dass Modeling auch im Verlauf des Frakturheilungsvorgangs zu Tage tritt⁶⁶. Im Laufe dieses Vorgangs umfasst das Modeling nicht nur die Knochenformation sondern auch die Resorption, wobei die Formation gegenüber der Resorption überwiegt und beide Prozesse scheinbar zeitlich und räumlich nicht aneinander gekoppelt sind, wie dies beim Remodeling der Fall ist.

Knochenresorption durch Osteoklasten, die gleichzeitig an vielen Stellen des Körpers Knochensubstanz abbauen^{13,35}, sowie Knochenformation durch Osteoblasten^{13,35}, welche Osteoid sezernieren, das in der Folge mineralisiert wird, führen im Rahmen des Remodelings zu einem ständigen Umbau des Knochens. Erst durch diese permanente Erneuerung des Knochens erhält das Skelett die Flexibilität, sich an veränderte Belastungssituationen anzupassen und jederzeit die Knochenstruktur optimieren zu können.

Resorption und Formation sind unter physiologischen Bedingungen dabei so balanciert, dass am Ende ein stabiler, allen Anforderungen genügender Knochenbau steht. Die zielgerichtete Aktivität von Osteoklasten, die durch Resorption der von Osteoblasten gebildeten Knochensubstanz die biomechanisch optimierte dreidimensionale Struktur geben, ist für diesen Prozess essentiell. Folglich führen Beeinträchtigungen dieser Funktionen unweigerlich zu pathologischen Veränderungen des Skelettsystems.

1.6 Systemhormone:

Viele der uns bekannten Systemhormone üben einen Einfluss auf das Knochenmodeling und –remodeling aus. Innerhalb dieser Gruppe spielen die Sexualhormone Östrogen und Testosteron die wichtigste Rolle beim Einfluss auf eben diese Vorgänge.

Zusätzlich zu Sexualhormonen haben auch das Parathormon (PTH), die Schilddrüsenhormone, Wachstumshormone und Glukokortikoide einen Einfluss auf das Remodeling.

Die meisten dieser Hormone wirken über die Produktion von lokalen Faktoren und interagieren zusätzlich auch mit der mechanischen Belastung, um das Modeling und Remodeling den Anforderungen entsprechend zu gestalten⁶⁶.

1.7 Sexualhormone und Knochen

Die Tatsache, dass Sexualhormone einen Einfluss auf den Knochen haben, ist gut bekannt und untersucht. Sie sind für die Knochenformation und die Entwicklung des Knochens während des Wachstums unabdinglich. Weiterhin sind sie in die eben erörterten Vorgänge des Remodelings und die Aufrechterhaltung der Homöostase des Skelettsystems involviert und verbessern auf diese Weise die Stärke des Knochens.

Hervorzuhebende Eigenschaft der Sexualhormone ist ihre Fähigkeit, den postmenopausalen Verlust an Knochenmasse zu verhindern oder aufzuhalten. Diese Eigenschaft wird im klinischen Alltag weltweit stark genutzt und sie unterstreicht die klinische Bedeutung der Sexualhormone⁶⁶.

1.8 Östrogen

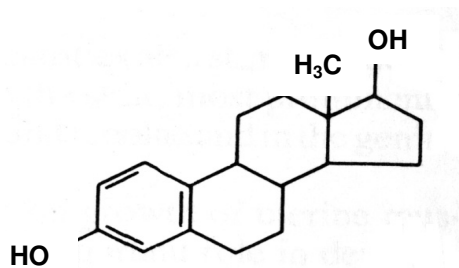


Abb. 2: Strukturformel von 17β-Östradiol²

Jedes einzelne der natürlich auftretenden Östrogene, zu welchen 17-beta-Östradiol (E2), Östron (E1) und Östriol (E3) gehören, sind C-18-Steroid Derivate von Cholesterol. Dieses wird nach der Bindung an Lipoprotein-Rezeptoren von den Zellen aufgenommen, gespeichert und zu den Orten der Steroidsynthese transportiert. Die verschiedenen Steroide werden durch die Reduktion der C-Atome von 27 auf 18 gebildet.

Weiterer Schritt ist der Transfer von Cholesterol aus dem Zytosol zur inneren Mitochondrienmembran, wo das Enzym Zytochromoxidase P450 lokalisiert ist. Der Transferprozess wird von dem *steroidogenic acute regulatory protein* gesteuert, das als essentieller Faktor in diesem Prozess gilt⁴⁷. Als Beleg dafür dient die Beobachtung, dass Mutationen dieses Proteins zu einer Unfähigkeit der Steroidsynthese führen und deshalb potentiell letal enden²³.

Letzter Schritt in der Entstehung des Östrogens ist die Aromatisierung, die vom P450-Aromatase-Monooxygenase-Komplex katalysiert wird.

1.8.1 Synthese

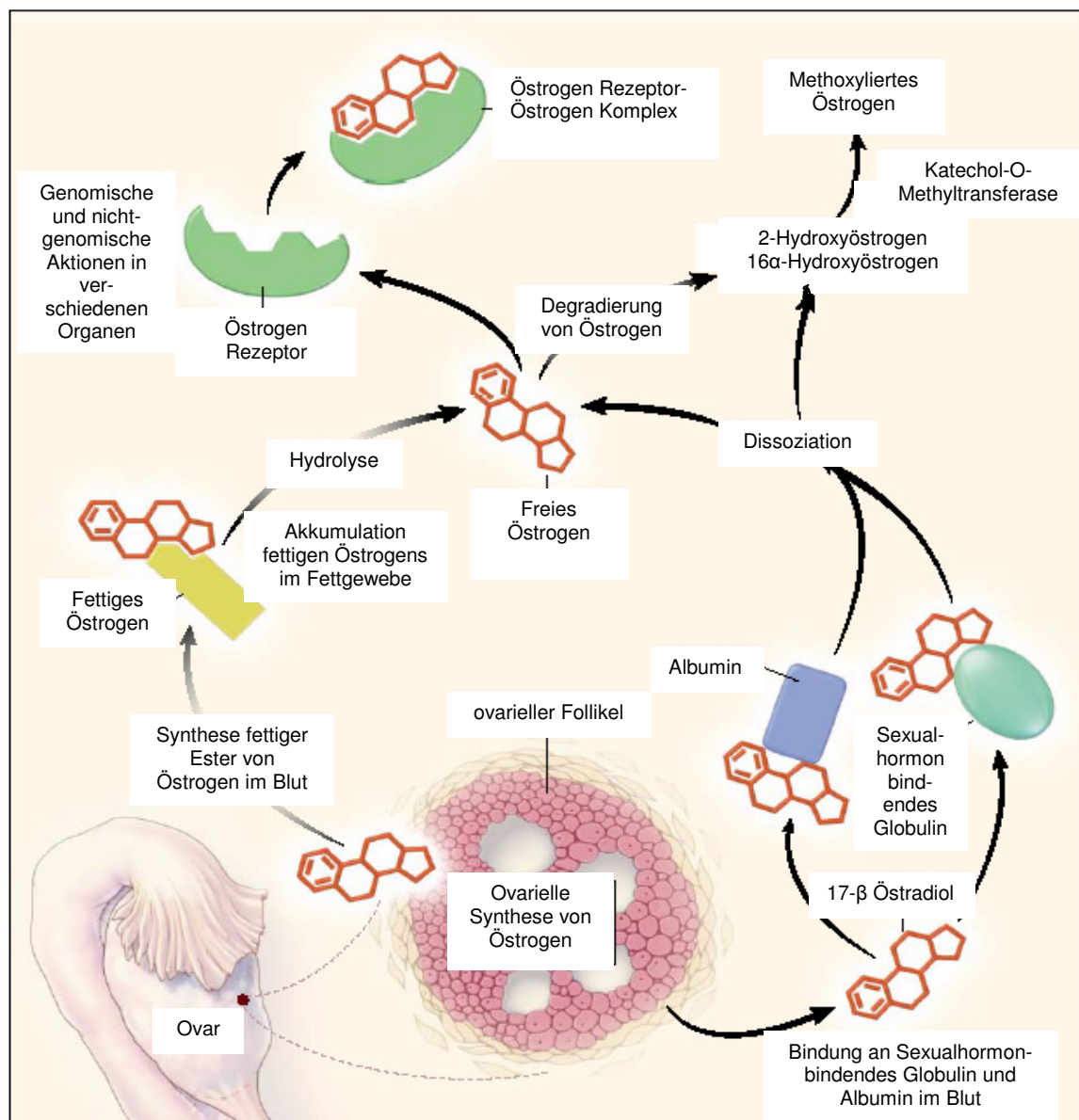


Abb. 3: Ovarielle Synthese, Transport und Metabolismus von Östrogen¹

Hauptbildungsort des Hormons Östradiol bei Frauen sind die Theca- und Granulosazellen der Ovarien und die luteinisierten Derivate dieser Zellen. Wenn man sich auf die *two-cell*-Theorie der Östrogensynthese bezieht, sezernieren die Theca-Zellen Androgene, die zu den Granulosazellen diffundieren und dort zu Östrogenen aromatisiert werden⁴².

Interessant ist, dass es Belege dafür gibt, dass beide Zelltypen in der Lage sind, sowohl Androgene als auch Östrogene zu bilden⁵⁵. Die Aromatase-Aktivität wurde

weiterhin auch im Muskel⁵⁹, im Fett⁶⁰, in Nervengewebe⁶⁵ und in den Leydig-Zellen des Hodens²⁵ nachgewiesen.

Die zwei anderen Vertreter, Östron und Östriol, werden dagegen hauptsächlich in der Leber aus Östradiol gebildet.

1.8.2 Wirkungen

Die spezifischen Wirkungen von Östrogen hängen von der Struktur des Hormons, des Subtyps oder der Isoform des Östrogenrezeptors, den Eigenschaften des Zielgen-Promoters und der Balance zwischen Co-Aktivatoren und Co-Repressoren ab.

1.8.3 Östrogen Rezeptoren

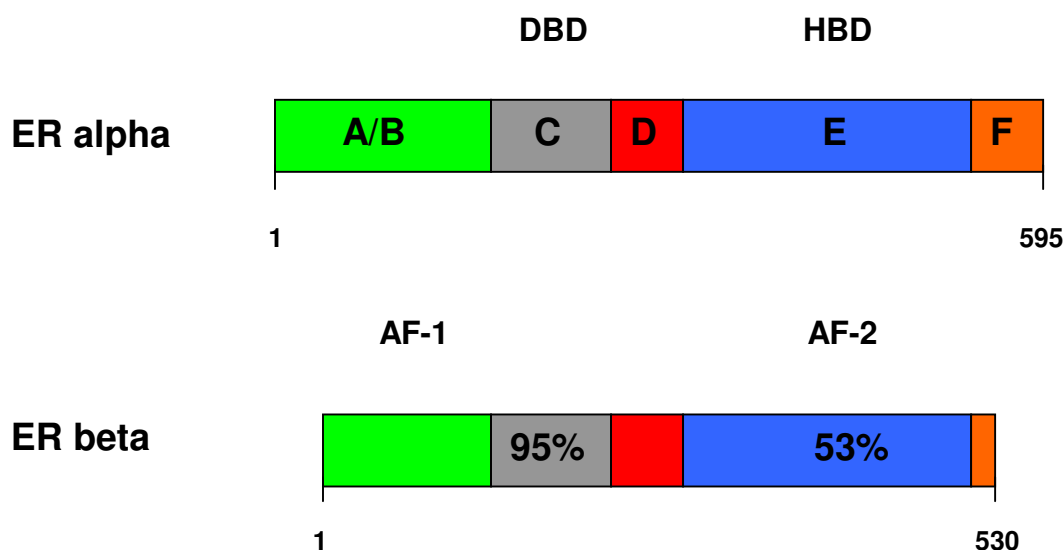


Abb. 4: Struktur und funktionelle Domänen von Östrogenrezeptor alpha (ER- α) und Östrogenrezeptor beta (ER- β). Die Prozentangaben beziehen sich auf die strukturelle Homologie der jeweiligen Domäne der zwei Rezeptorsubtypen. Diese sind ähnlich in Ratte, Maus und Mensch.

Es gibt zwei Subtypen des Östrogen Rezeptors mit jeweils mehreren Isoformen und Splice-Varianten eines jeden Subtyps. Der erste Subtyp, der klassische Östrogen-Rezeptor-alpha⁴¹, wurde erstmals 1986 geklont.

Der zweite Subtyp, Östrogen–Rezeptor–beta, wurde erst später entdeckt⁵¹. Diese beiden Rezeptoren variieren in ihrer Struktur und die für sie codierenden Gene liegen auf verschiedenen Chromosomen.

Wenn man die DNA–bindende Domäne der beiden Rezeptoren vergleicht, fällt eine relativ große Übereinstimmung auf, wohingegen die Gesamthomologie der Rezeptoren doch eher gering ist. Als Resultat dessen, und das ist ein wichtiger Punkt, binden unterschiedliche Liganden mit verschiedener Affinität an die beiden Subtypen.

Auch die Ausprägung der Rezeptoren in den verschiedenen Geweben ist nicht gleichmäßig und es gibt in ihrem Vorkommen Überlappungen. So enthalten z.B. Granulosazellen, Lunge, Niere, Knochenmark und auch Knochen hauptsächlich den Subtyp ER–beta³⁶. Im Kontrast dazu enthalten das ovarielle Stroma, das Endometrium und Brustkrebszellen hauptsächlich ER–alpha.

Als ein Beispiel für die unterschiedliche Funktion der beiden Subtypen und ihre Abhängigkeit vom jeweiligen Geschlecht mag folgende Studie dienen.

Zum Nachweis der Funktion der Rezeptoren bedienten sich die Autoren der folgenden Arbeit eines Defizienz–Modells. Ihnen gelang bei vollständiger Deletion des ER–alpha der Nachweis eines Abfalls, nicht eines Anstiegs, im Knochenumbau. Des weiteren war ein Anstieg und nicht etwa Abfall im Volumen des trabekulären Knochens, sowohl in weiblichen als auch in männlichen Mäusen⁸³, nachweisbar.

Die Deletion des ER–beta hingegen, führte erstaunlicherweise in beiden Geschlechtern zu unterschiedlichen Beobachtungen. In männlichen Mäusen zeigte sich keinerlei Auswirkung auf den Knochen. In weiblichen Tieren hingegen, zeigte sich ein Abfall der Knochenresorption bei Anstieg des trabekulären Knochenvolumens⁸³. Im Kontrast zu diesen Beobachtungen, zeigte sich bei gleichzeitiger Deletion beider Rezeptoren ein starker Abfall im Volumen des trabekulären Knochens in Weibchen, welcher mit einem Rückgang des Knochenumbaus assoziiert war⁸³.

Zusammenfassend konnte diese Studie belegen, dass die Deletion des ER–alpha, nicht jedoch des ER–beta, zu einem großen Unterschied im zirkulierenden Level von Östradiol und Testosteron führt, was wiederum das Remodeling und die

Knochenmasse affektiert⁸³ und somit die Wichtigkeit des ER-alpha für den Knochen erkennen lässt.

Anhand dieser aufgeführten Arbeiten ist zusammenfassend zu sagen, dass der für den Knochen und somit auch für die Frakturheilung wichtige Rezeptor der Östrogenrezeptor-alpha (ER-alpha) ist.

1.9 Testosteron

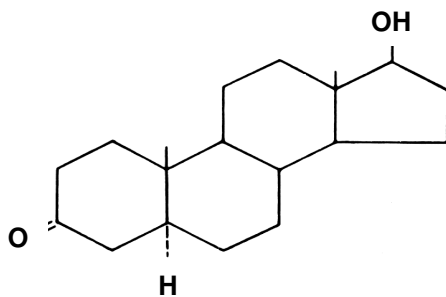


Abb. 5: Strukturformel von Dihydrotestosteron³. DHT stellt die wirksame Form von Testosteron im Körper dar.

Bei Betrachtung des in den letzten Jahren durch die Forschung und Wissenschaft erhaltenen Wissens über die Effekte und Wirkungsweisen von Östrogen, ist über die von Testosteron vergleichsweise wenig bekannt.

Bekannt ist zwar, dass Testosteron für die Entwicklung des Skelettes und die Skeletthomöostase verantwortlich ist, aber so bedeutsame Fragen wie z.B. die Ursache der Entstehung von Osteoporose in Männern oder der Einfluss von Testosteron auf die Frakturheilung, ist immer noch nicht vollständig verstanden.

1.9.1 Synthese

Testosteron ist das stärkste der natürlichen Androgene. Es wird vor allem in den Leydig-Zwischenzellen des Hodens gebildet, kleine Mengen jedoch werden auch in der Nebennierenrinde und im Ovar produziert. Diese Bildung wird vom hypophysären LH gesteuert. Der Abbau erfolgt größtenteils in der Leber, sowie in Haut und Prostata. Sein wichtigster Metabolit ist das 5 α -Dihydrotestosteron, welches die wirksame Form darstellt.

Das interessante an diesem Metaboliten DHT ist, dass für ihn mitogene Effekte bei Osteoblasten nachgewiesen werden konnten⁸⁵. Des Weiteren ist DHT in der Lage die Aktivität der alkalischen Phosphatase (ALP) und die der Kollagen Typ-I Synthese zu regulieren⁴³. Weiterhin ist DHT, genauso wie Testosteron, in der Lage die IL-6 Produktion zu inhibieren^{18,44} und übt über diese Effekte Einfluss auf den Knochenstoffwechsel aus.

1.9.2 Wirkungen

Testosteron hat verschiedenste physiologische Wirkungen. Auf das Skelettsystem hat es in niedriger Dosis eine anregende Wirkung auf die Proliferation des epiphysären Knorpels und es fördert das Längenwachstum der Knochen. In hoher Dosierung allerdings bewirkt es den Schluss der Epiphysenfugen und steigert die Kalzifizierung.

Als weiteren Wirkungen des Testosterons sind die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale in männlichen Individuen, sowie die Förderung der Spermatogenese⁷³ beschrieben worden.

Auf den Stoffwechsel hat es allgemein eine anabole Wirkung, bedingt durch vermehrte Nukleinsäure- und Proteinsynthese, wobei in den Zielorganen die Stimulation spezifischer Stoffwechselleistungen erfolgt.

1.9.3 Bedeutung für das Skelettsystem

Genau wie bei Östrogen, ist die Hauptaktion von Testosteron auf Gewebeebene die Reduktion der Knochenresorption¹⁸. Ein Großteil dieser Aktion erfolgt indirekt durch Aromatisierung von Testosteron zu Östrogen³⁷ und durch die Inhibition der Knochenresorption durch Senkung der IL-6 Produktion, ähnlich wie es durch Östrogen der Fall ist.

Ebenso hat Testosteron, genau wie auch Östrogen, die Eigenschaft, die Lebensspanne von Osteoblasten zu verlängern⁵⁷ und die Apoptoserate von Osteoklasten zu beeinflussen. Als weiterer Aspekt wird für Testosteron auch ein leichter Effekt auf die Osteoblastenproliferation beschrieben^{26,48}.

Diese beiden Wirkungsweisen, Stimulation der Proliferation von Osteoblasten und die Beeinflussung der Osteoklastenapoptose, führen zu der Eigenschaft von Testosteron, die Knochenmasse zu erhöhen.

Des Weiteren scheint sich Testosteron von Östrogen dahingehend zu unterscheiden, dass es in anderen Stadien der Osteoblastendifferenzierung eingreift und Osteoblasten an differierenden Orten des Skelettsystems affiziert. So steigert Testosteron z.B. den periostalen Knochenanbau⁹³, während Östrogen auf diesen inhibitorisch wirkt⁹⁰.

Dieser Unterschied in der Wirkungsweise von Testosteron und Östrogen ist, wenigstens zu einem Teil, für die unterschiedliche Skelettgröße von Männern und Frauen nach Ablauf der Pubertät verantwortlich.

1.9.4 Testosteron Rezeptoren

Über die Wirkmechanismen von Testosteron auf Knochenzellen ist belegt, dass Osteoblasten und Osteoklasten hoch affinitive Androgenrezeptoren besitzen.

Diese Androgenrezeptoren wurden erstmals 1988 geklont^{29,56}. Ihre Anwesenheit wurde in osteoblastenartigen Zellen und in Osteoblasten *in vitro*^{30,67,91} eindeutig belegt. Ein für uns interessanter Nachweis von Androgenrezeptoren, nämlich in menschlichem Knochen, dort gefunden in hypertrophen Chondrozyten, Osteoblasten, Osteozyten, mononukleären Zellen und dem Endothel der Blutgefäße des Knochenmarks, ist in einer weiteren Studie beschrieben worden⁶. Zum Bindungsverhalten lässt sich sagen, dass die Affinität zur Bindung von Testosteron und Dihydrotestosteron gleich zu sein scheint¹⁹.

Für die oben genannten Knochenzellen, insbesondere Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten, wurde aber auch die Anwesenheit von Östrogenrezeptoren (ER) nachgewiesen. Da bekannt ist, dass der ER- α die meisten Effekte auf den Knochen vermittelt, ist nicht eindeutig geklärt, ob die Effekte der Sexualhormone auf den Knochen in männlichen Individuen durch Testosteron oder aber auch durch Konvertierung zu Östrogen vermittelt werden.

In der Literatur zu diesem Thema recherchierbaren Artikel beschreiben interessante Beobachtungen.

So weist z.B. eine männliche Ratte mit testikulärer Feminisierung eine homozygote Nullmutation des Androgenrezeptor–Gens auf, woraus folglich eine Androgenresistenz resultiert⁹². Dieses Tier weist einen weiblichen Skelettphänotyp auf, zeigt jedoch sonst keinerlei osteoporotische Veränderungen.

Die Aromatase–Defizienz–Maus (ArKO) ist aufgrund einer gezielten Eliminierung des CYP19 Gens Östrogen–defizient. Sowohl die männlichen als auch die weiblichen ArKO–Mäuse weisen osteoporotische Veränderungen auf. Durch Messung des Serum–Osteocalcin–Spiegels und histomorphometrischer Analysen konnte für die weiblichen ArKO–Mäuse ein erhöhter Knochenumbau festgestellt werden, während die männlichen Tiere einen verminderten Knochenumbau aufwiesen⁶⁹.

Eine vollständige Erklärung für diese Beobachtungen konnte bis jetzt noch nicht gefunden werden.

1.9.5 Altersbedingte Veränderungen:

Tatsache ist, dass eine Störung oder Veränderung im Stoffwechsel bezogen auf die Sexualhormone nicht nur in postmenopausalen Frauen verheerende Wirkungen haben kann, sondern auch das gealterte männliche Geschlecht affektiert^{32,66,73}. Das ist zu ersehen, wenn man bedenkt, dass die Rate der altersbedingten Hüft– und Wirbelkörperfrakturen die von Männern erlitten wird, 50% der Rate der von Frauen erlittenen Frakturen erreicht hat⁷⁵ und sich die Kosten durch die Behandlung allein dieser Patientengruppe zur Zeit in den USA auf ca. 2,7 Milliarden US\$ belaufen⁷².

1.9.6 Mutationsbedingte Veränderungen:

Auch Mutationen können einen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel ausüben. Als ein Beispiel mag eine Studie von Smith et al.⁸⁴ dienen. In ihr wird über einen Mann mit homozygoter Mutation im ER–Gen berichtet. Dieser Mann weist im Vergleich mit der Normalbevölkerung normale Testosteron–Serumspiegel auf, hat aber erstaunlicherweise trotzdem eine Osteopenie, nicht geschlossene Epiphysenfugen und einen stark erhöhten Knochenumbau.

In zwei weiteren sich mit diesem Aspekt beschäftigenden Studien berichten Morishima et al.⁶² und Carani et al.²⁸ über zwei Männer mit einer homozygoten Mutation im Aromatase-Gen, welches für die Metabolisierung von Testosteron zu Östrogen unabdinglich ist.

Diese Männer weisen eine verringerte Knochendichte [*bone mineral density* (BMD)] bei erhöhtem Knochenumbau auf. Die Spiegel für Testosteron waren auch hier im Normbereich. Einer der Männer erhielt eine Behandlung mit Testosteron, die jedoch keinerlei signifikante Änderung des Knochenphänotyps zeigte. Dem anderen Mann wurde eine Therapie mit Östrogen zuteil, was zu einer signifikanten Erhöhung der BMD und einer Normalisierung des Knochenumbaus führte.

Anhand der dargelegten Daten ist zu vermuten, dass Testosteron eine Rolle in der Frakturheilung in beiden Geschlechtern spielen könnte, aber bezogen auf die oben angeführten Studien muss man die Frage aufwerfen, ob dieser Effekt nicht durch eine Konvertierung von Testosteron zu Östrogen begünstigt wird oder gar größtenteils auf diesem Mechanismus beruht und somit nicht ein direkter Testosteroneffekt wäre.

1.10 Verlust der Gonadenfunktion

In der Zeit um die Menopause, also der perimenopausalen Periode, kommt es infolge des Funktionsabfalls der ovariellen Follikel zu einer stetigen Abnahme der Östradiol Produktion und somit zu einem Sinken der Serum-Östradiol Konzentration. In eben diesen postmenopausalen Frauen liegt der Serum-Östradiol Spiegel oftmals sogar unter 20 pg/Milliliter (73 pmol/Liter). Der Hauptbestand an Östradiol wird zu diesem Zeitpunkt aus Testosteron gebildet.

So gilt es heute als gesichert, dass der stetige Verlust von Sexualhormonen zu einem wachsenden Verlust an Knochenmasse sowohl in postmenopausalen Frauen, als auch ebenso in alten Männern führt⁷⁴.

Bezogen auf diese Bevölkerungsgruppe, weist die Osteoporose eine Prävalenz von annähernd 30% auf und ist ebenso wie die daraus resultierenden Frakturen noch immer nicht befriedigend therapierbar^{31,76}.

Bedingt durch Sexualhormondefizienz kommt es nicht nur zum Verlust von Knochenmasse, sondern auch zu einer Veränderung der Knochenstruktur und Mikroarchitektur des Knochens und daraus resultierender erhöhter Anfälligkeit für Frakturen⁹⁻¹¹.

Einen Überblick über das Ausmaß der Folgen des stetigen Knochenmasseverlustes bekommt man, wenn man sich vor Augen führt, dass ein Verlust von nur 10% der Knochenmasse das Frakturrisiko schon verdoppelt⁷⁶.

Das führt dazu, dass z.B. eine 50jährige kaukasisch-amerikanische Frau ein Risiko von 45% mit sich trägt, einmal in ihrem Leben eine osteoporotisch bedingte Fraktur zu erleiden^{31,76}.



Abb. 6: Kontakt-radiographie einer osteoporotisch veränderten Wirbelsäule. Deutlich zu erkennen sind die rarefizierte Spongiosastruktur, die fast nur noch aus cranial-caudal gerichteten Elementen besteht und die multiplen Wirbelkörperfrakturen (7.-12.Brustwirbelkörper; Mensch, weiblich, 78 Jahre).

Entgegen weitläufiger Annahme ist dies nicht nur ein Problem postmenopausaler Frauen. Das wird deutlich wenn man bedenkt, dass nahezu 30% aller Schenkelhalsfrakturen, eine häufige osteoporotische Fraktur, bei Männern auftreten⁷⁶.

Da diese häufige Art von Frakturen mit hohen Kosten, Morbidität und Mortalität vergesellschaftet ist und ebenso wie auch alle anderen Frakturen eine mehr oder

minder starke Einschränkung des täglichen Lebens für die Betroffenen darstellt, ist es wichtig eine möglichst schnelle, qualitativ hochwertige und erfolgreiche Behandlung bieten zu können.

Aus diesem Grunde ist es unerlässlich, mehr über die Vorgänge in der Frakturheilung zu lernen und zu verstehen und den Einfluss sowie die Wirkungsweise der so elementar in den Knochenstoffwechsel eingebundenen Sexualhormone Östrogen und Testosteron, auf den komplexen Prozess der Knochenbruchheilung weiter zu klären.

1.11 Zielsetzung

Bei eingehender Betrachtung der vielfältigen oben beschriebenen Effekte von Östrogen und Testosteron auf das Skelettsystem und die am Knochenauf- und umbau beteiligten Zellen, verwundert es doch, dass trotz einer Vielzahl von Studien über Sexualhormone und Knochen, nur sehr wenig über den Einfluss eben dieser Sexualhormone auf einen so wichtigen und komplexen Prozess wie die Frakturheilung bekannt ist.

So soll es Ziel dieser Dissertation sein, den physiologischen Knochenheilungsprozess in Mäusen zu charakterisieren, um so einen verlässlichen physiologischen Referenzwert für die Frakturheilungsmodulationen im Mausmodell zu erstellen.

Anhand dieses Modells soll, durch Modulation der Frakturheilung mit Hilfe des Sexualhormons Östrogen, der Einfluss und die Wirkungsweise dieses Hormons auf den Frakturheilungsverlauf in weiblichen Wildtypmäusen dargelegt werden.

Weiterhin soll in dieser Dissertation mit Hilfe des entwickelten Modells evaluiert werden, ob auch das für die Skeletthomöostase so wichtige Sexualhormon Testosteron eine vergleichbare Wirkung auf die Knochenbruchheilung in männlichen Tieren entfaltet.

Anhand der erhaltenen Daten und Beobachtungen soll geklärt werden, ob mit der Applikation der Sexualhormone Östrogen und Testosteron im jeweils entsprechenden Geschlechtsmodell, die Frakturheilung im Mausmodell nachhaltig verbessert und im günstigsten Fall zusätzlich sogar beschleunigt werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuchsgenehmigung

Vor Beginn der Untersuchungen wurde ein Antrag zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren bei der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales (BAGS), der Freien und Hansestadt Hamburg gestellt. Der Antrag beinhaltet die Durchführung von Untersuchungen zum Einfluss der Sexualhormone auf die Skelettrepauratur. Alle Versuche dieser Arbeit erfolgten unter Aufsicht des Versuchsleiters.

Die Experimente dieser Arbeit sind nach Paragraph 8 des Tierschutzgesetzes, in der Fassung vom 25. Mai 1998 (BGBl.I S. 1106, 1818), durch die Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales (BAGS), der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt und bestätigt worden.

2.2 Einteilung der Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden nach dem Zufallsprinzip in verschiedene Gruppen eingeteilt. Jeder Gruppe wurde eine entsprechende Gruppe von Kontrolltieren zugeteilt, welche bis auf die zu verabreichenden Medikamente, im Falle der Kontrollgruppen Placebopräparate, einer völlig gleichen operativen Behandlung und Haltung ausgesetzt waren.

2.3 Versuchsdauer

Um eine optimale Versuchsanordnung gewährleisten zu können, wurde die Versuchsdauer anhand der physiologischen Frakturheilungsdauer für die Maus festgelegt.

Dazu wurde der Frakturheilungsverlauf und die biomechanische Stabilität in Wildtypmäusen mit den genetischen Background C57bl6n, zu verschiedenen Zeitpunkten analysiert (Tag 10, 15, 20 und 40).

Gleichzeitig zur biomechanischen Analyse der in den Experimenten frakturierten linken Femora, wurden auch die Femora der Gegenseite biomechanisch getestet.

Anhand dieses Kurvenverlaufes wurde der Tag 20 der Frakturheilung als physiologische Referenz festgelegt, da zu diesem Zeitpunkt die frakturierten Femora die Stabilität der Femora der Gegenseite wieder erreicht haben.

Anhand der so gewonnenen Daten über den physiologischen Knochenbruchheilungsverlauf in Mäusen, wurde für die Studien der modulierten Frakturheilung der Tag 20 des Frakturheilungsprozesses als Vergleichswert für die Experimente festgelegt, d.h. sowohl die Kontrollgruppen (Placebo), als auch die Gruppen mit Sexualhormonapplikation (Östrogen / Testosteron), durchliefen nach Frakturinduktion einen Versuchszeitraum von 20 Tagen.

Diesen Zeitpunkt findet man bestätigt, wenn man in der Literatur nach anderen Frakturheilungsexperimenten in Mäusen sucht²⁴.

Anders verhält es sich in der Versuchreihe zur Beobachtung einer etwaigen Beschleunigung der Frakturheilung.

In diesen Experimenten wurden die Femora der Tiere mit Östrogenapplikation mit denen der Kontrolltiere nach 10, 15 und 20 Tagen verglichen, um ein vorzeitiges und somit beschleunigtes Erreichen der physiologischen biomechanischen Stabilität erkennen zu können.

2.4 Versuchstiere

Die in der Studie verwendeten Mäuse wiesen den genetischen Background C57bl6n auf und wurden von der Firma Charles River Deutschland bezogen. Bis zu Beginn der Versuche wurden die Tiere in einer Virus- und Parasitenfreien Zucht aufgezogen und einem 12 Stunden Tag-Nacht Rhythmus ausgesetzt.

In dieser Studie wurden 3 Gruppen eines Genotyps untersucht.

- Weibliche Tiere (Östrogenapplikation) versus weibliche Kontrollen (keine Östrogensubstitution), 20 Tage, Frakturheilung
- Männliche Tiere (Testosteronapplikation) versus männliche Kontrollen (keine Testosteronsubstitution), 20 Tage, Frakturheilung
- Weibliche Tiere (Östrogenapplikation) versus weibliche Kontrollen, (keine Östrogensubstitution), 15 Tage, Frakturheilung

Zu Beginn der Studie waren die Versuchstiere 10 Wochen alt und wiesen ein Körpergewicht von ca. 20g auf.

In jedem der verschiedenen Versuche wurden alle Tiere der gleichen Operation zur osteosynthetischen Versorgung der in den Experimenten gesetzten standardisierten geschlossenen Femurschaftfraktur unterzogen.

Nach Ablauf der jeweiligen Versuchsdauer wurden die Tiere vor der weiteren Begutachtung und Analysierung der Daten mit Hilfe von CO₂ eingeschläfert.

2.5 Narkose

Vor der Operation erfolgte die Einleitung einer Allgemeinnarkose. Dazu erhielten die Tiere eine intraperitoneale Injektion einer Ketanest / Rompun Lösung. Diese Lösung setzt sich aus 0,8ml Rompun, 2,4ml Ketanest und 6,8ml physiologischer Kochsalzlösung zusammen. Als Allgemeinnarkosedosis wurden 0,1ml Lösung pro 10g Körpergewicht injiziert.

Nach Ablauf von einigen Minuten wurde die Wirkung der Narkosemedikamente durch einen Schmerzauslöseversuch überprüft. Im Anschluss erfolgte die Operation.

2.6 Operation

Die Stabilisation der Frakturrenden spielt in der Frakturheilung eine entscheidende Rolle. Um diese Fixierung gewährleisten zu können, entschieden wir uns für die retrograde Marknagelung des zu frakturierenden linken Femur. Als Osteosynthese diente dazu in allen Versuchen eine Venenverweilkanüle mit einem Durchmesser von 0,7mm (Insyte W, Infusion Therapy Systems Inc., Sandy, Utah 84070, USA). Die intramedulläre Nagelung erfolgte jeweils über einen kleinen lateralen parapatellaren Hautschnitt an der linken hinteren Extremität.

Um einen korrekten Sitz der Osteosynthese zu verifizieren, wurden im Anschluss an die Marknagelung Lagekontrollen mit Hilfe von kontaktradiologischen Untersuchungen durchgeführt. Die Röntgenkontrolle wurde mit einer Spannung von 30 kV für eine Dauer von einer Minute durchgeführt. Nach erfolgter

Röntgenbestätigung der Osteosynthesenlage, erfolgte die Induktion einer standardisierten Femurschaftfraktur des linken Femur.

Um das Mausmodell für Studien zur Modulation der Frakturheilung nutzbar zu machen, welche auch die biomechanische Testung ermöglichen, modifizierten wir das von Einhorn²¹ beschriebene Tibiafrakturmodell.

So wurde von unserer Arbeitsgruppe ein Frakturmodell (Hamburg Maus Femur Fraktur Modell) entwickelt, welches das Setzen von standardisierten geschlossenen Femurschaftfrakturen ermöglicht. Wir halten dieses Modell für Analysen der Frakturheilung für geeigneter als das Tibiafrakturmodell, da es die störenden Einflüsse der Fibula eliminiert und eine bessere und standardisierte biomechanische Testung ermöglicht.

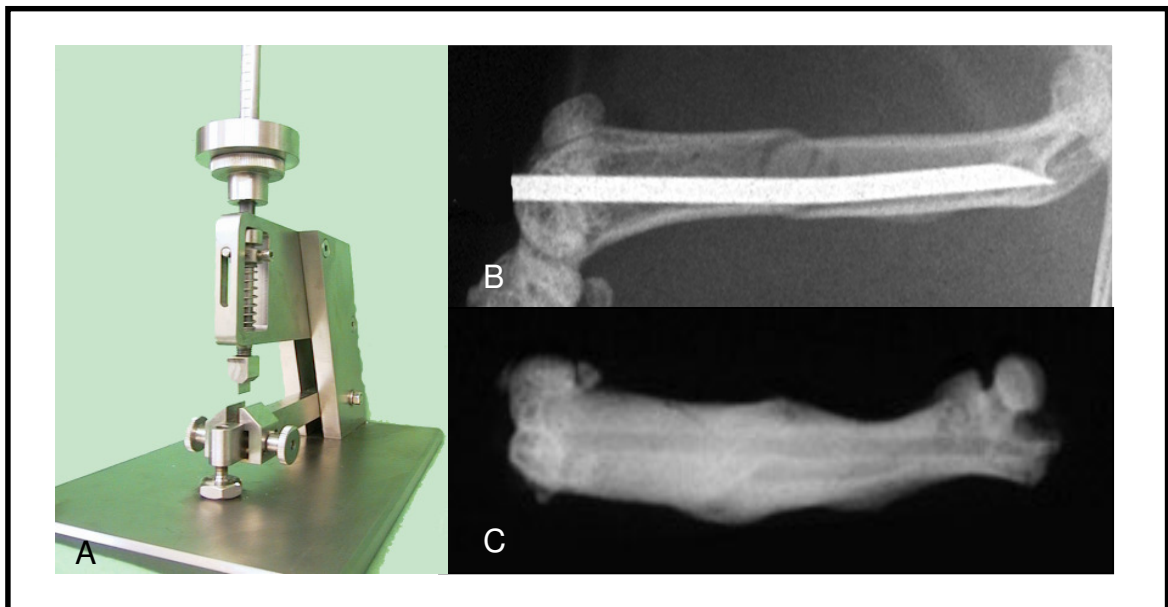


Abb. 7: A: Frakturvorrichtung. B: Kontaktradiographie einer osteosynthetisch versorgten Femurfraktur. C: Femur nach abgeschlossener physiologischer Frakturheilung an Tag 20.

2.7 Kontaktradiographie

Um eine standardisierte Operation mit einheitlicher Fraktur und guter osteosynthetischer Versorgung zu garantieren, wurden die Mäuse während und nach der Operation mehrfach röntgenologisch untersucht.

Nach Versuche und ebenso nach erfolgter biomechanischer Testung, wurden die explantierten Extremitäten jeweils einer Kontaktradiographie unterzogen und anschließend analysiert.

Die Kontaktradiographie (x-ray cabinet, Faxitron Corp., USA) wurde jeweils mit 30 kV für die Dauer von einer Minute durchgeführt.

Für die Aufnahmen diente der Film mit der Bezeichnung x-omat MA der Firma Kodak, Frankreich.

2.8 Histologie

Für die histologische Begutachtung der Frakturheilung zum jeweils erwünschten Zeitpunkt, wurden nach Tötung der Versuchstiere die entsprechenden Femora exartikuliert und vom Weichteilgewebe befreit.

Die Knochen wurden anschließend in 3,7% PBS-gepufferter Formaldehydlösung fixiert.

Nach der folgenden Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe [(80% Ethanol (2 Stunden), 90% Ethanol (2 Stunden), 96% Ethanol (2 Stunden), 100% Ethanol (3 Stunden), 100% Ethanol+Aceton (3 Stunden) und 100% Ethanol (3–8 Stunden)], wurden die Femora zur Infiltration des Gewebes in Methylmetacrylat (Merck, Darmstadt) überführt.

Im Anschluss an diesen Vorgang, erfolgte die Einbettung der Präparate in ein ausgehärtetes LPG-BPO-Methylmetacrylat Gemisch, wodurch sie für eine Anfertigung histologischer Schnitte schneidbar gemacht wurden.

Nach der Aushärtung und dem Anschleifen wurden 5 µm Sagittalschnitte der Präparate an einem Rotationsmikrotom (Cut 4060E, MicroTech, München) angefertigt.

Die auf diese Art angefertigten histologischen Schnitte wurden nach von Kossa versilbert. Mit dieser Methode lässt sich der Anteil des mineralisierten Knochens im histologischen Schnittbild schwarz darstellen. Die Methode nach van Gieson diente als Gegenfärbung der Präparate.

Die mikroskopische Auswertung der Präparate erfolgte mit Hilfe eines Axioskopes II (Carl Zeiss, Jena).

2.9 Histomorphometrie

Um die Knochenformation pro Kallusfläche ermitteln zu können, wurde allen Versuchstieren zwei Tage vor Ablauf der Versuchsreihe Calcein intraperitoneal injiziert. Calcein ist ein unter UV-Licht grün fluoreszierender Marker, welcher die Eigenschaft besitzt, in neu geformten Knochen eingelagert zu werden. Die unter dem UV-Mikroskop grün fluoreszierende Fläche stellt somit den in den letzten zwei Tagen vor Tötung neu formierten Knochen dar.

Für die Analyse dieses Parameters wurden 12µm dicke Schnitte angefertigt, die für die Auswertung unter dem UV-Mikroskop bestimmt waren und somit nicht gefärbt wurden.

Die Berechnung der Knochenformation pro Kallusfläche erfolgte mit einem eigens dafür entworfenen Computerprogramm. Unter Verwendung des Osteomeasure-Histomorphometrie-Systems (Osteometrix, Atlanta, GA) wurde das trabekuläre Knochenvolumen (bone volume per tissue volume BV/TV) analysiert.

2.10 Biomechanik

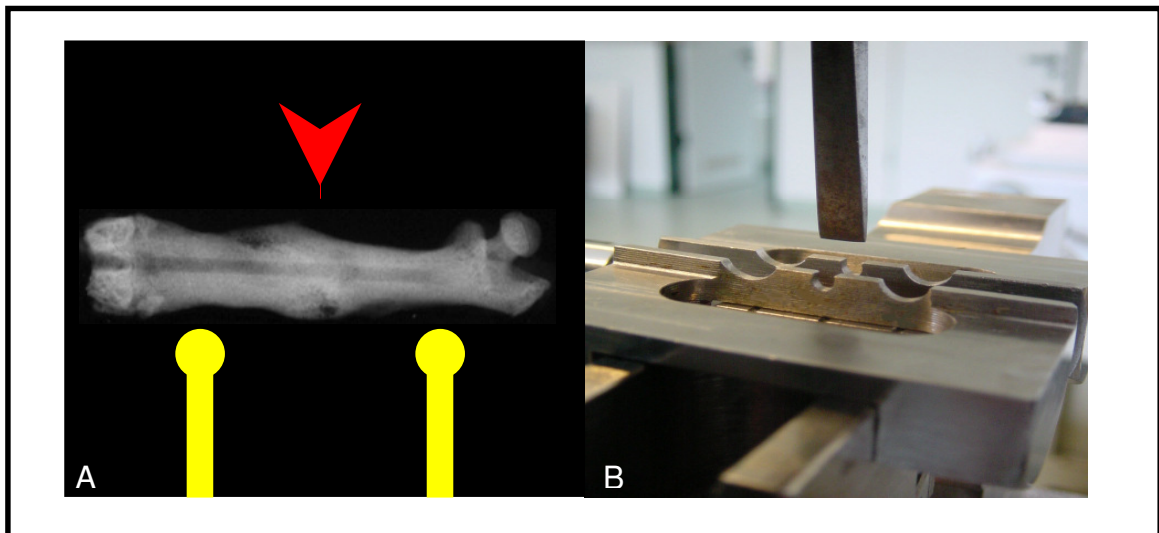


Abb. 8 : A: Schematische Darstellung des 3-Punkt-Biegeversuches bei biomechanischer Analyse.
B: Zwickmaschine für die biomechanische Analyse der explantierten Femora.

Um die Knochen der biomechanischen Testung zugänglich machen zu können, mussten nach erfolgter Tötung der Tiere beide Femora freipräpariert, exartikuliert, vom Weichteilgewebe befreit und in isotonische Kochsalzlösung überführt werden.

Um physiologische Verhältnisse zu simulieren, wurden die Präparate vor Versuchsbeginn auf 37° Celsius erwärmt⁸⁹.

Die biomechanische Testung erfolgte direkt im Anschluss an die Präparation der Femora und deren Überführung in der angewärmten Lösung zum biomechanischen Zentrum. Auf diese Weise verstrichen nur wenige Minuten, so dass es zu keiner Ergebnisverfälschung kommen konnte.

Zur biomechanischen Testung wurde eine Hochpräzisionsmaschine verwendet (Z2.5/TN 1S Test Maschine, Zwick GmbH & Co, Ulm, Deutschland). Mit Hilfe dieser Maschine wurden 3–Punkt–Biegeversuche, ein sogenanntes *anterior–midshaft–testing*, durchgeführt. Bei diesem Test handelt es sich um einen Versuchsaufbau, bei dem die beiden Enden des Knochens von zwei Auflagen unterstützt werden, die einen Abstand von 5mm zueinander aufweisen. Dem Versuchsaufbau gemäß, wurden die Femora somit einem axialen Druck in antero–posteriorer Richtung ausgesetzt. Der Druck wurde mit Hilfe eines Stempels ausgeübt, der in der Mitte zwischen den beiden Auflagen mit einer Geschwindigkeit von 10mm / Minute heruntergefahren wurde.

Während dieses Vorganges, wurde über einen Computer eine Kraft–Dehnungs–Kurve aufgezeichnet. Aus den aufgezeichneten Daten können die maximale Kraft die auf den Knochen gewirkt hat, die Dehnung des Knochens, die bis zum Bruchereignis erfolgte Arbeit sowie die Steifigkeit abgelesen oder berechnet werden^{49,12}.

2.11 Mikro–CT–Analysen

Um einen dreidimensionalen Überblick über die strukturellen Gegebenheiten des Knochens an Tag 20 der Frakturheilung zu bekommen, wurden im Anschluss an die Experimente Mikro–CT–Analysen der zu untersuchenden Femora angefertigt. Als Gerät diente dazu ein Mikro–CT (μ CT 40) der Firma SCANCO Medical AG (8303 Bassersdorf, Schweiz). Die Analysen wurden mit einer Schichtdicke von 12 μ m, einer Spannung von 70kV und einer Stromstärke von 114mA durchgeführt. Die Daten wurden mit dem Programm μ CT Ray V3.0 visualisiert.

2.12 Statistik

Alle erhobenen Ergebnisse wurden mittels des student's t-Tests (StatView, Abacus Concepts In. 1993) statistisch analysiert. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert $< 0,05$ akzeptiert. Die in den Abbildungen dargestellten Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung (SD).

3 Ergebnisse

Um die mit dieser Dissertation aufgeworfene Fragestellung zu beantworten, ob die Sexualhormone Östrogen und Testosteron einen Einfluss auf die Frakturheilung im Mausmodell ausüben, mit Hinblick auf Verbesserung oder Beschleunigung der Frakturheilung, wurde zuerst eine Charakterisierung des Verlaufs der physiologischen Knochenbruchheilung der unbehandelten Mäuse mit dem genetischen Background C57bl6n vorgenommen.

Diese Charakterisierung diente für alle folgenden Versuche, in welchen eine Applikation der Sexualhormone Östrogen und Testosteron vorgenommen wurde, als Referenz.

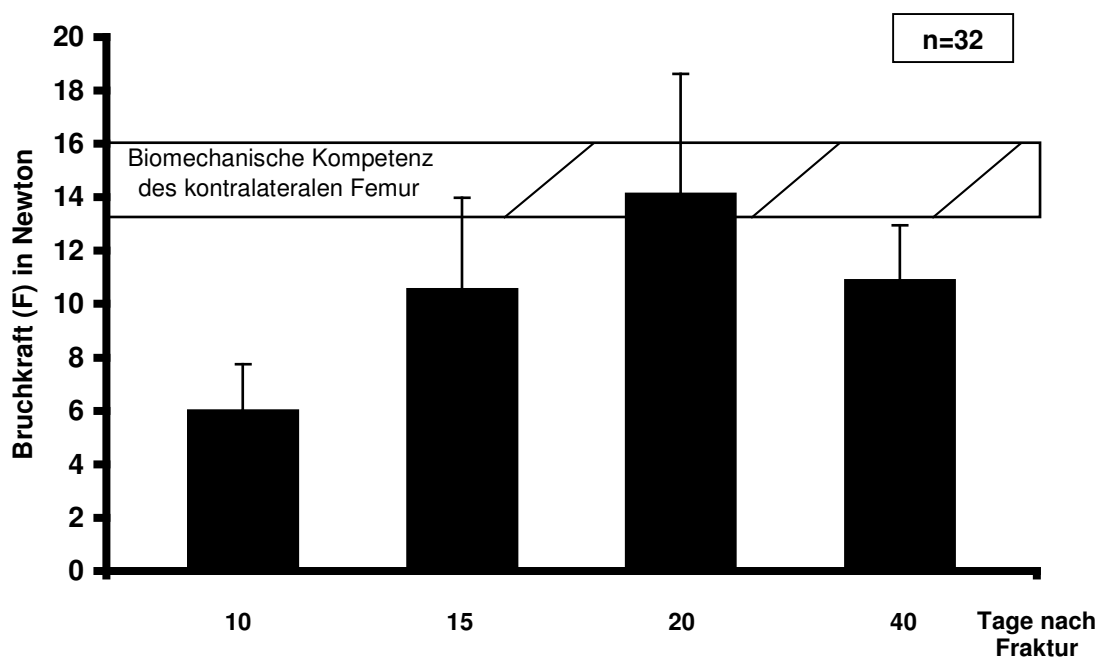


Abb. 9: Graphische Darstellung des physiologischen Knochenbruchheilungsverlaufes in Wildtypmäusen an Tag 10, 15, 20 und 40 (x-Achse). Frakturierte Femora erreichen die physiologische biomechanische Kompetenz des kontralateralen Femur nach 20 Tagen Heilungsdauer.

Die nach dem jeweiligen Versuche erfolgte initiale Kontaktradiographie, lieferte den ersten orientierenden Überblick über den Einfluss der Sexualhormonapplikation auf die Frakturheilung in den verschiedenen Versuchsgruppen. Dies geschah immer im Vergleich zu den vorher charakterisierten Kontrollgruppen.

Nach Auswertung der kontaktradiologischen Bilder wurden im Anschluss histologische und histomorphometrische Analysen durchgeführt. Diese dienten der Überprüfung der im kontaktradiologischen Bild gesehenen Unterschiede auf zellulärer Ebene und ermöglichten weiterhin die Quantifizierung eben dieser Unterschiede.

Weiterhin soll mit dieser Arbeit ein Eindruck über die physiologische Relevanz der ermittelten Unterschiede dargelegt werden. Aus diesem Grunde wurden die Femora der Versuchstiere nach Abschluss der jeweiligen Versuchsreihe der biomechanischen Testung zugeführt.

Um eine bessere Veranschaulichung, in diesem Falle eine dreidimensionale Darstellung der strukturellen Gegebenheiten der Auswirkungen der Sexualhormonapplikation auf die Frakturheilung in Mäusen, erzielen zu können, erfolgte nach Ablauf der Experimente eine Mikro-CT-Analyse der behandelten Femora und der Kontrollfemora.

3.1 Kontaktradiographie

Bei der vergleichenden Betrachtung von Kontaktradiographien ist zu beachten, dass die Sensitivität der Analyse bezüglich der Darstellung von Unterschieden in der Knochenmasse nur gering ist.

Als um so aussagekräftiger müssen also konventionell-radiologisch darstellbare Unterschiede in der Röntgendichte aufgefasst werden.

In den Abbildungen 10 und 11 sind repräsentative Kontaktradiographien der linken Femora der Kontrolltiere denen der Versuchstiere mit Östrogen- oder Testosteronapplikation gegenübergestellt.

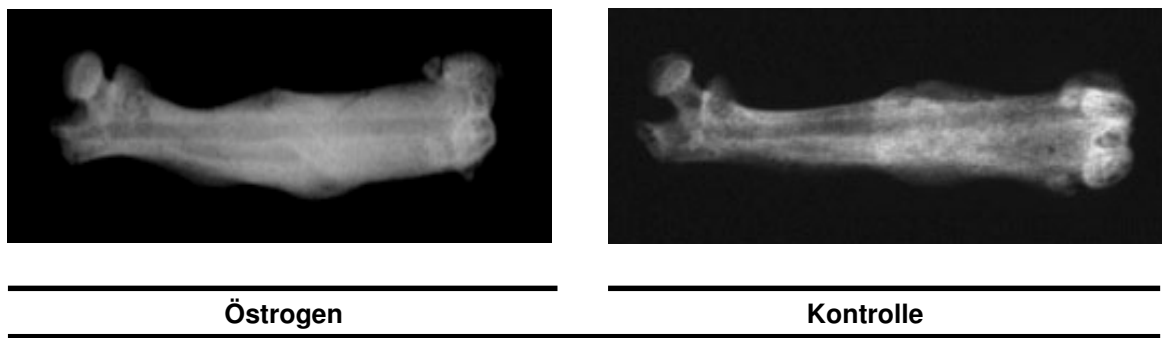


Abb. 10: Deutlich erhöhte Röntgendichte und erhöhter Kalksalzgehalt in den Femora der mit Östrogenapplikation behandelten weiblichen Mäuse im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe. Kontaktradiographie 10 Wochen alter Mäuse nach 20 Tagen Frakturheilungsdauer. (30kV; 1 Minute Belichtungszeit)

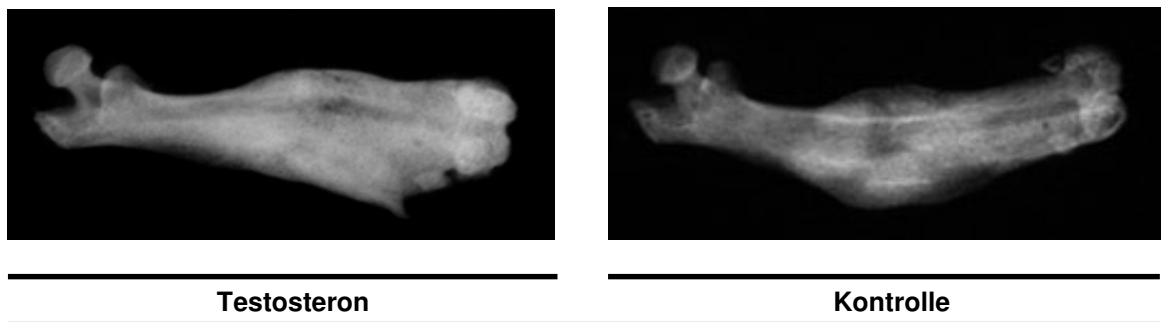


Abb. 11: Deutlich erhöhte Röntgendichte und erhöhter Kalksalzgehalt in den Femora der mit Testosteronapplikation behandelten männlichen Mäuse im Vergleich mit der entsprechenden Kontrollgruppe. Kontaktradiographie 10 Wochen alter Mäuse nach 20 Tagen Frakturheilungsdauer. (30kV; 1 Minute Belichtungszeit)

Anhand der dargestellten Kontaktradiographien ist erkennbar, dass sowohl in der Gruppe, in welcher die Tiere (weibliche Mäuse) nach Frakturinduktion mit Östrogen behandelt worden sind, als auch in der Gruppe, die eine Testosteronapplikation erhielt (männliche Mäuse), kontaktradiologisch ein deutlich erkennbarer Unterschied in Kallusgröße, Mineralisierungsgrad des Kallusgebietes und der Knochendichte im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren an Tag 20 der Frakturheilung besteht.

In Bezug auf die dargestellten Kontaktradiographien kann man zusammenfassend konstatieren, dass die Femora aller mit Sexualhormonen behandelten Tiere, weibliche (Östrogen) wie auch männliche (Testosteron), nach Ablauf von 20 Tagen Frakturheilung einen deutlich größeren und signifikant stärker mineralisierten Kallus aufwiesen, als die der Kontrolltiere. Der so gesehene Unterschied im Kalksalzgehalt wiegt um so mehr, wenn man sich vor Augen führt, dass erst Differenzen von etwa 30% der Knochendichte im konventionellen kontaktradiologischen Bild ersichtlich sind.

3.2 Histologie

Um einen differenzierten Überblick über die Knochenarchitektur der mit Sexualhormonen behandelten Tiere auf mikroskopischer Ebene zu bekommen, wurden histologische Schnitte der in Frakturheilung befindlichen Femora angefertigt und nach von Kossa versilbert.

In den folgenden Abbildungen 12 und 13 sind repräsentative Histologien aus dem Bereich der linken Femora der mit Östrogen- und Testosteronapplikation behandelten Tiere denen der jeweiligen Kontrollgruppe gegenübergestellt.

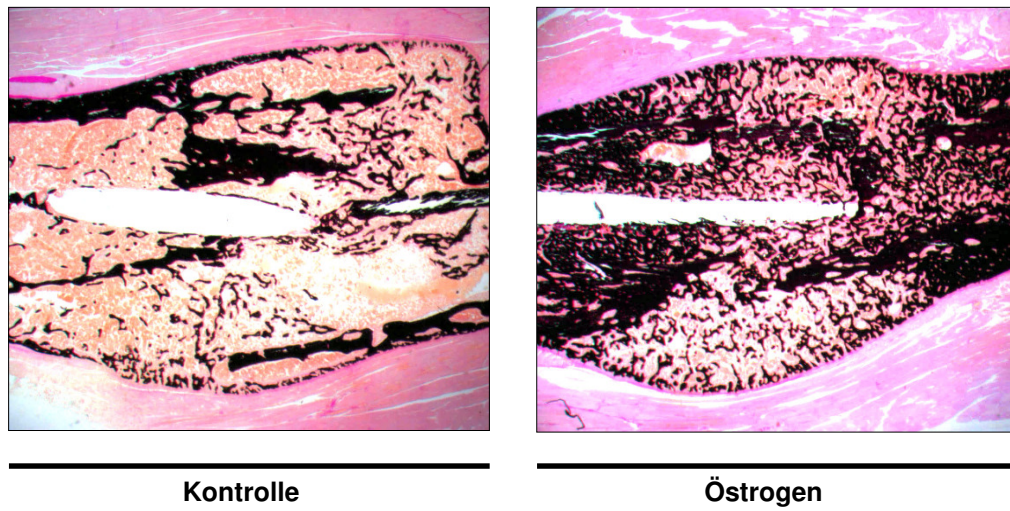


Abb. 12: Deutlich erhöhte trabekuläre Knochenmasse und bessere Durchbauung der Frakturzone in den Femora der weiblichen, mit Östrogenapplikation behandelten Mäuse im Vergleich mit der entsprechenden Kontrollgruppe. Die Knochenmasse der Femora von weiblichen mit Östrogen behandelten Mäusen liegt über dem Niveau der Kontrolltiere. Histologie 10 Wochen alter weiblicher Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren. (*Unentkalkte Histologie, Färbung: von Kossa, 5 μ m Dicke, 10fache Vergrößerung*)

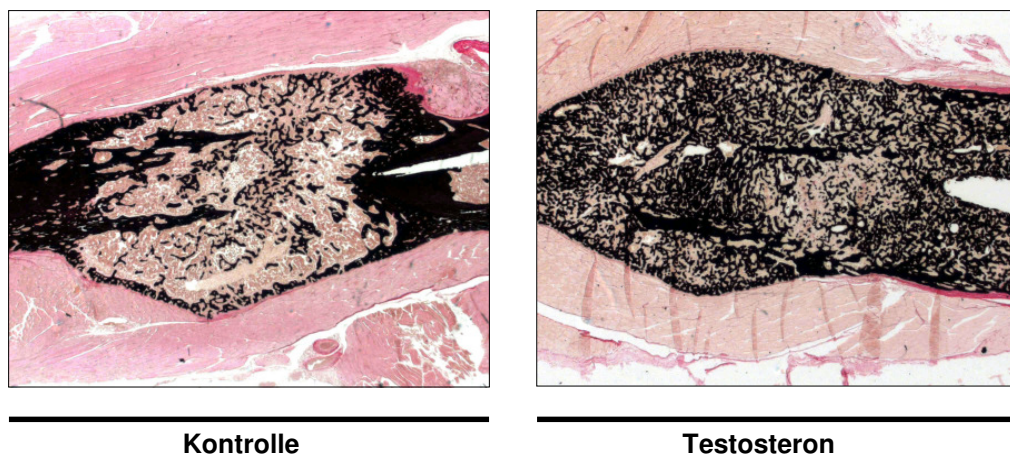


Abb. 13: Deutlich erhöhte trabekuläre Knochenmasse und bessere Durchbauung der Frakturzone in den Femora der männlichen mit Testosteronapplikation behandelten Mäuse im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe. Die Knochenmasse der Femora von männlichen mit Testosteron behandelten Mäusen liegt über dem Niveau der Kontrolltiere. Histologie 10 Wochen alter männlicher Mäuse im Vergleich zu Kontrolltieren. (*Unentkalkte Histologie, Färbung: von Kossa, 5 μ m Dicke, 10fache Vergrößerung*)

Die bereits in den Kontaktradiographien dargestellten Unterschiede hinsichtlich Kallusgröße, Durchbauung des Kallus und höherem Mineralisierungsgrad dieses Bereiches in den untersuchten Femora, werden durch die histologische Analyse noch eindrucksvoller belegt.

Der im Schnittbild sichtbare schwarze Bereich stellt den Anteil des mineralisierten Knochens am Gesamtgewebe dar.

Im Kontrast zu den Tieren der Kontrollgruppen, weisen alle von uns angefertigten histologischen Präparate auf die Tatsache hin, dass die mit den Sexualhormonen Östrogen und Testosteron behandelten Tiere auch auf mikroskopischer Ebene eine deutlich bessere knöcherne Durchbauung des Frakturkallusbereiches und einen deutlich höheren Mineralisierungsgrad an den Stellen der Knochenbruchheilung aufweisen.

Diese Erkenntnis steht im Einklang mit den in den Kontaktradiographien erhobenen Befunden.

Um die in der Mikroskopie gesehenen Unterschiede zu quantifizieren, wurde anhand der angefertigten histologischen Präparate das *bone volume per tissue volume* (BV/TV) der jeweiligen Femora berechnet. Die Abbildungen 14 und 15 stellen den Vergleich des gemessenen BV/TV von Östrogen- bzw. Testosteronapplikation zur jeweiligen Kontrollgruppe graphisch dar.

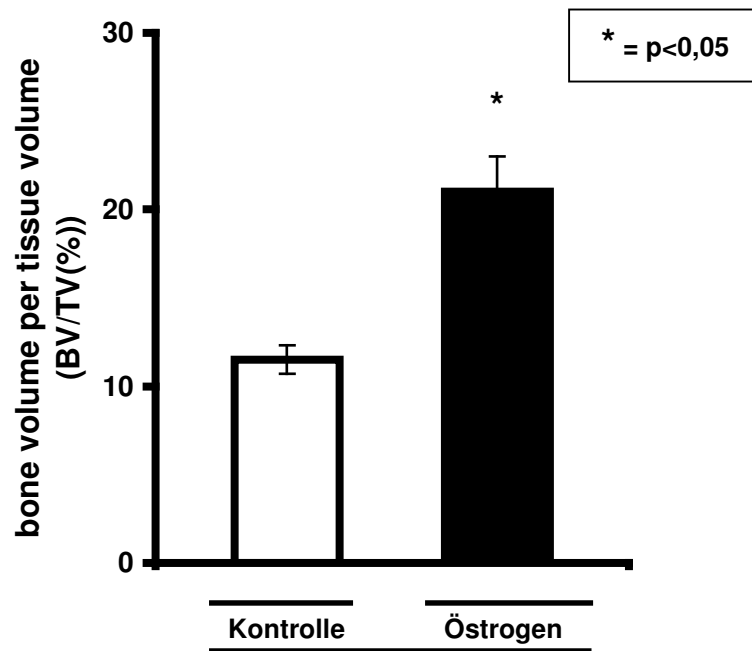


Abb. 14: Gesteigerte Knochenmasse im Bereich des Frakturkallus nach Östrogenapplikation bei weiblichen Mäusen im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe.

(Histomorphometrie der linken Femora)

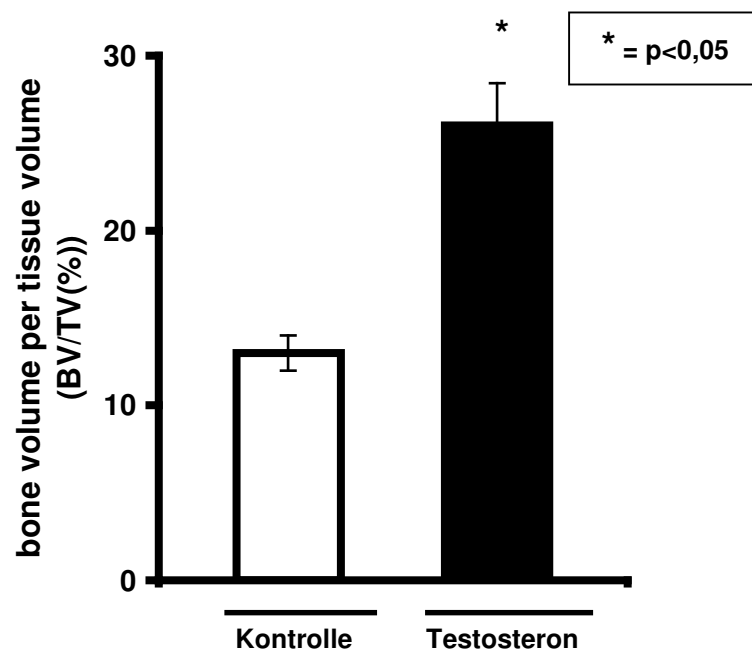


Abb. 15: Gesteigerte Knochenmasse im Bereich des Frakturkallus nach Testosteronapplikation bei männlichen Mäusen im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe.

(Histomorphometrie der linken Femora)

Die obigen Abbildungen verdeutlichen, dass sowohl die Östrogensubstitution bei Weibchen, wie auch die Testosteronsubstitution bei Männchen, im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu einer deutlich erkennbaren Erhöhung der Knochenmasse nach 20 Tagen Frakturheilungsdauer im Bereich der frakturierten Femora führt.

3.3 Histomorphometrie

Die oben mit Hilfe von Kontaktradiographie und Histologie erhobenen Unterschiede hinsichtlich Mineralisierungsgrad und Durchbauung des Fakturkallus wurden mittels Histomorphometrie quantifiziert.

Hierbei wurde als zu messender Parameter die Knochenformation pro Kallusfläche in Prozent gewählt und mit den dazugehörigen Kontrollgruppen verglichen.

In den folgenden Abbildungen 16 und 17 sind repräsentative histomorphometrische Bilder aus dem Kallusbereich der linken Femora denen der jeweiligen Kontrollgruppe gegenübergestellt.

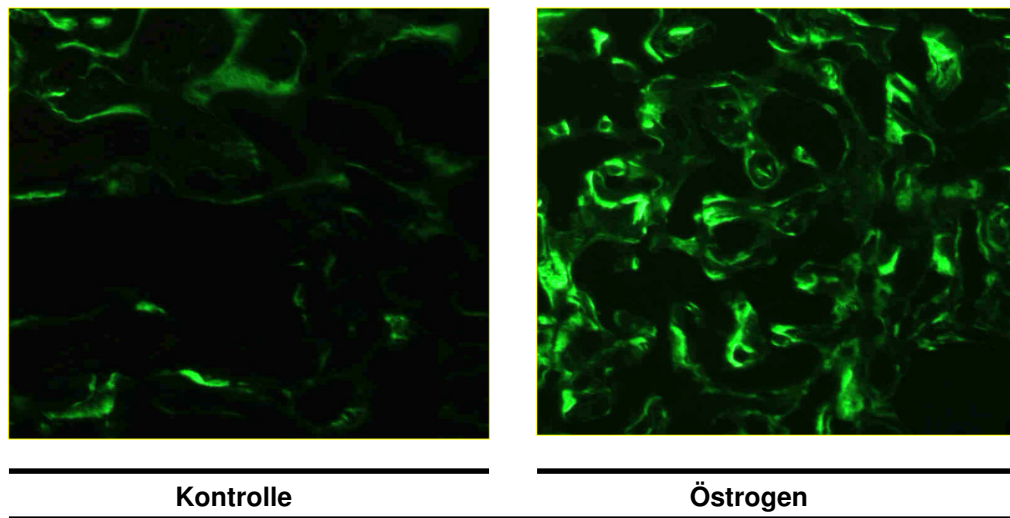


Abb. 16: Deutlich gesteigerte Knochenformation pro Kallusfläche in weiblichen mit Östrogenapplikation behandelten Mäusen im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe. Histomorphometrie an 10 Wochen alten Mäusen nach 20 Tagen Frakturheilungsdauer. (Calcein markierter Kallusbereich)

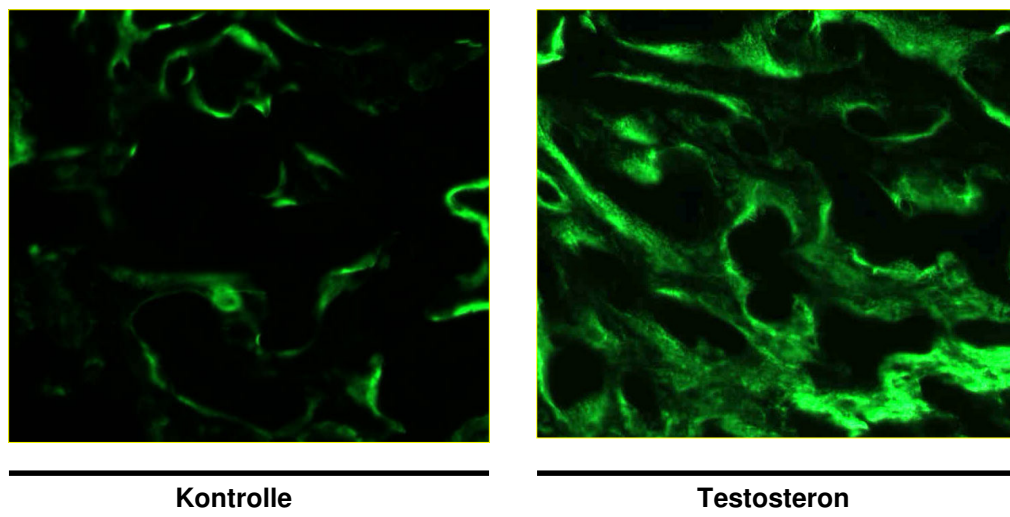


Abb. 17: Deutlich gesteigerte Knochenformation pro Kallusfläche in männlichen mit Testosteronapplikation behandelten Mäusen im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe. Histomorphometrie an 10 Wochen alten Mäusen nach 20 Tagen Frakturheilungsdauer. (Calcein markierter Kallusbereich)

Mit den so angefertigten histomorphometrischen Analysen gelang es, die in der Histologie wahrgenommenen Differenzen hinsichtlich des Mineralisierungsgrades zu bestätigen.

So wiesen die während der Frakturheilungsphase mit Östrogen behandelten Tiere eine mit einem Wert von 40% signifikant höhere Knochenformation pro Kallusfläche auf als die Kontrolltiere, welche eine Knochenformation von 20% pro Kallusfläche entgegensetzen hatten.

Signifikant waren die Unterschiede auch bei den männlichen Tieren die eine Testosteronapplikation nach Frakturinduktion erhielten. Sie wiesen mit einer Knochenformation von 39% pro Kallusfläche gegenüber 21% in der Kontrollgruppe nahezu eine Verdopplung der Knochenformationsrate auf.

Diese Differenz in der Knochenformation pro untersuchter Kallusfläche sei in den Abbildungen 18 und 19 noch einmal graphisch veranschaulicht.

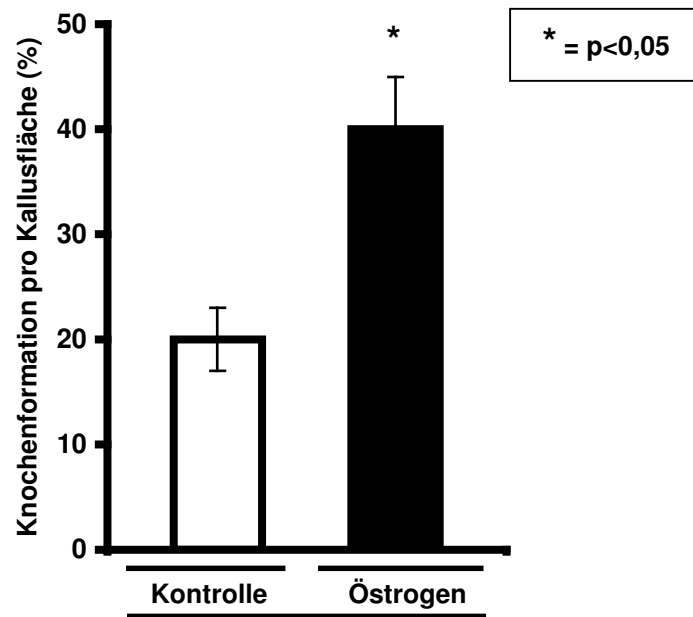


Abb. 18: Deutlich erhöhte Knochenformationsrate pro Kallusfläche in % in den mit Östrogenapplikation behandelten weiblichen Mäusen. Vergleich von Kontrolltieren und mit Östrogenapplikation behandelten weiblichen Mäusen an Tag 20 der Frakturheilung.
(Calcein markierter Kallusbereich)

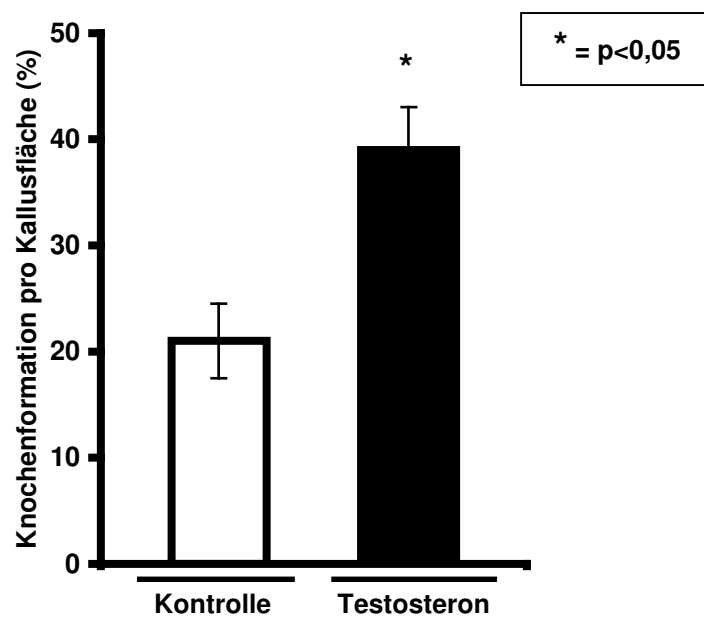


Abb. 19: Deutlich erhöhte Knochenformationsrate pro Kallusfläche in % in den mit Testosteronapplikation behandelten männlichen Mäusen. Vergleich von Kontrolltieren und mit Testosteronapplikation behandelten männlichen Mäusen an Tag 20 der Frakturheilung.
(Calcein markierter Kallusbereich)

3.4 Biomechanik

Um einen Eindruck von der physiologischen Relevanz der gesteigerten Mineralisierung, der signifikant erhöhten Knochenformation und der besseren Durchbauung zu bekommen, wurden die Femora der Tiere der biomechanischen Testung unterzogen.

Hierfür wurde ein 3-Punkt-Biegeversuch verwendet, bei welchem ein *anterior-midshaft-testing* durchgeführt wurde.

Die zu bestimmenden Parameter waren die Bruchkraft (F), die nötig war um die Femora zu refrakturieren, die bis zum Bruchereignis verrichtete Arbeit (W) und die Steifigkeit (N/mm) der untersuchten Femora.

Die so erhobenen Daten spiegeln die in den vorangegangenen Analysen ermittelten Unterschiede zwischen Kontrolltieren und den mit Sexualhormonen behandelten Tieren wider.

Nach der in allen Experimenten zu durchlaufenden Versuchsdauer von 20 Tagen fanden sich sowohl in weiblichen mit Östrogen behandelten Tieren, als auch in männlichen Tieren mit Testosteronapplikation signifikant höhere Werte in der biomechanischen Stabilität und der bis zum Bruchereignis zu verrichtenden Arbeit, im Vergleich zu ihrer jeweiligen Kontrollgruppe.

Die Daten der biomechanischen Belastbarkeit werden durch die folgenden Abbildungen 20 und 21, in welchen die Werte der gemessenen Bruchkraft der verschiedenen Gruppen an Tag 20 der Knochenbruchheilung dargestellt sind, graphisch veranschaulicht.

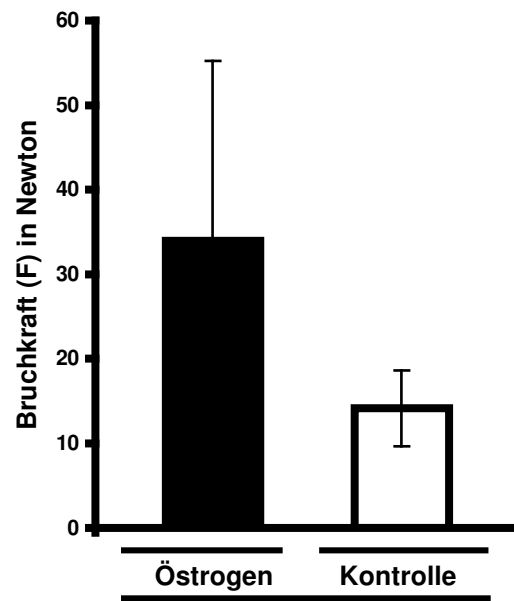


Abb. 20: Biomechanische Untersuchungen am Femur. Deutlich bessere biomechanische Kompetenz in den mit Östrogenapplikation behandelten weiblichen Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 20 der Frakturheilung. (Bruchkraft(F) in Newton)

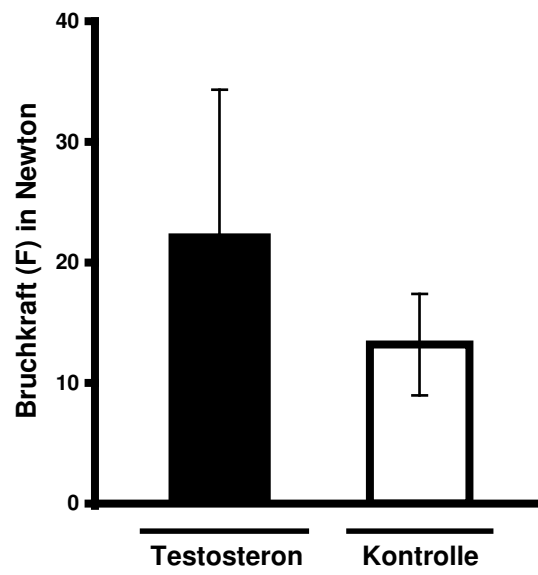


Abb. 21: Biomechanische Untersuchungen am Femur. Deutlich bessere biomechanische Kompetenz in den mit Testosteronapplikation behandelten männlichen Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 20 der Frakturheilung. (Bruchkraft(F) in Newton)

Beim Vergleich der Werte der biomechanischen Kompetenz hinsichtlich der aufzubringenden Bruchkraft die nötig war, um die Femora zu refrakturieren, zeigten die mit Östrogen behandelten Tiere [Bruchkraft (F)= $33,92 \pm 21,26\text{N}$] gegenüber den Kontrolltieren [Bruchkraft (F)= $14,12 \pm 4,49\text{N}$] eine um das Doppelte gesteigerte Bruchkraft.

Bei Betrachtung der Versuchsgruppe der mit Testosteronapplikation behandelten Tiere [Bruchkraft (F)= $22,32 \pm 12,04\text{N}$], fällt, ähnlich wie in der Östrogengruppe, eine signifikant gesteigerte biomechanische Kompetenz gegenüber ihrer Kontrollgruppe [Bruchkraft (F)= $13,2 \pm 4,2\text{N}$] auf.

Bei den eben erörterten Untersuchungen zur biomechanischen Kompetenz der Femora der mit Sexualhormonen substituierten Tiere, fiel ein weiterer überraschender Aspekt ins Auge.

Bei Betrachtung des Verlaufs der biomechanischen Kurve von Kontrolltieren im Vergleich zum Kurvenverlauf der biomechanischen Kompetenz der mit Östrogen substituierten Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten (Tag 10, 15 und 20), fällt eine überraschende Beobachtung ins Auge. So belegen die erhobenen Daten, dass die mit Östrogensubstitution behandelten Tiere bereits an Tag 15 der Frakturheilung die als physiologisch anzusehende biomechanische Belastbarkeit des kontralateralen Femur erreicht haben.

Die biomechanische Kompetenz der Femora der Östrogensubstituierten Tiere an Tag 10, 15 und 20 der Frakturheilung, ist in Abbildung 22 der jeweils entsprechenden physiologischen biomechanischen Kompetenz der Kontrolltiere zum jeweiligen Zeitpunkt gegenübergestellt. Anhand dieser Abbildung lässt sich die Beschleunigung der Frakturheilung und somit die Verkürzung der Heilungsdauer graphisch ablesen. Die Femora der substituierten Tiere erreichen die als normal anzusehende physiologische biomechanische Kompetenz (grau markierter Bereich) bereits nach 15 Tagen Heilungsdauer, wohingegen die Femora der Kontrolltiere 20 Tage benötigten.

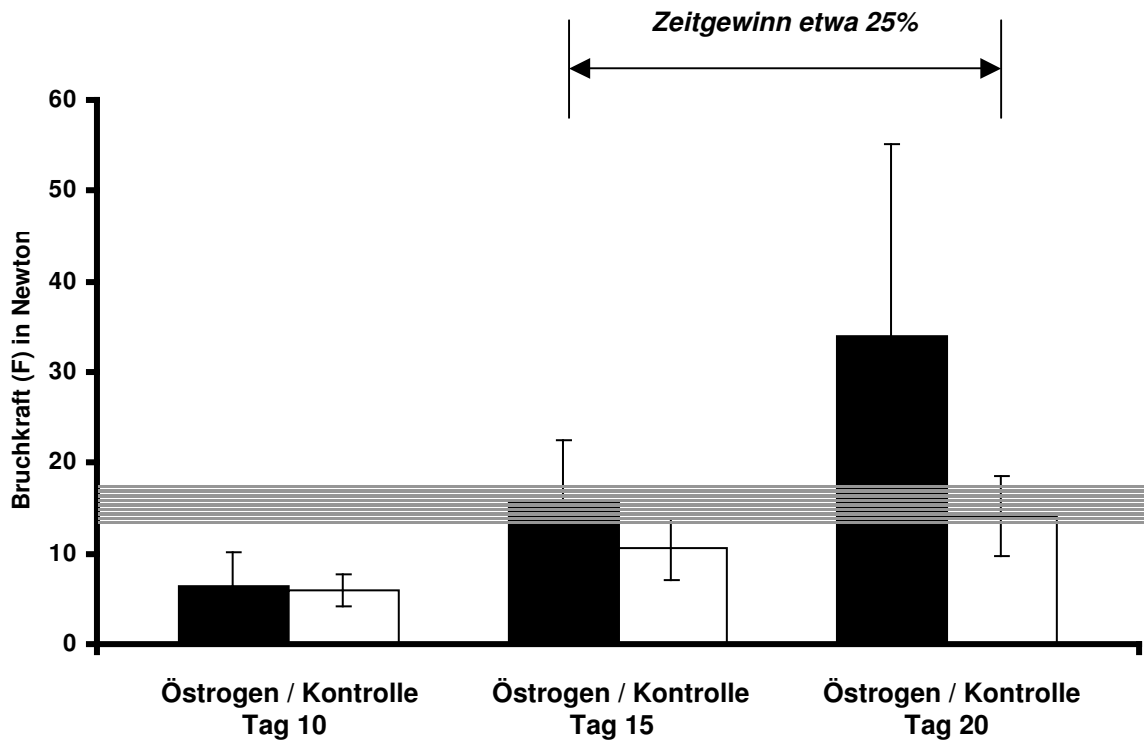


Abb. 22: Biomechanische Untersuchung am Femur an Tag 15 (Östrogen) vs. Tag 20 (Kontrolle). Die Femora der mit Östrogenapplikation behandelten weiblichen Mäuse weisen an Tag 15 der Frakturheilung die normale (kontralaterale) physiologische biomechanische Kompetenz auf. Dies entspricht einer Beschleunigung der Frakturheilung von 25% im Vergleich zu den Kontrolltieren.

(Bruchkraft (F) in Newton)

Aus der Auswertung der Daten über die biomechanische Kompetenz der Femora lässt sich somit der Schluss ziehen, dass hier durch Applikation des Sexualhormons Östrogen bei weiblichen Mäusen während der akuten Phase der Frakturheilung, eine Beschleunigung der Frakturheilung von 25% erreicht werden kann und sich damit die Heilungsperiode deutlich verkürzen lässt.

3.5 Mikro-CT-Analysen

Um die in dieser Arbeit durch Kontaktradiographie, Histologie, Histomorphometrie und Biomechanik erhobenen Daten auch dreidimensional als strukturelle Gegebenheiten darstellen zu können, wurden an Tag 20 der Knochenbruchheilungsphase Analysen der Femora mit Hilfe eines Mikro-CT's angefertigt.

Abbildung 23 zeigt den strukturellen Vergleich von Kontrollfemur und Femur mit Östrogensubstitution nach 20 Tagen Knochenbruchheilung.

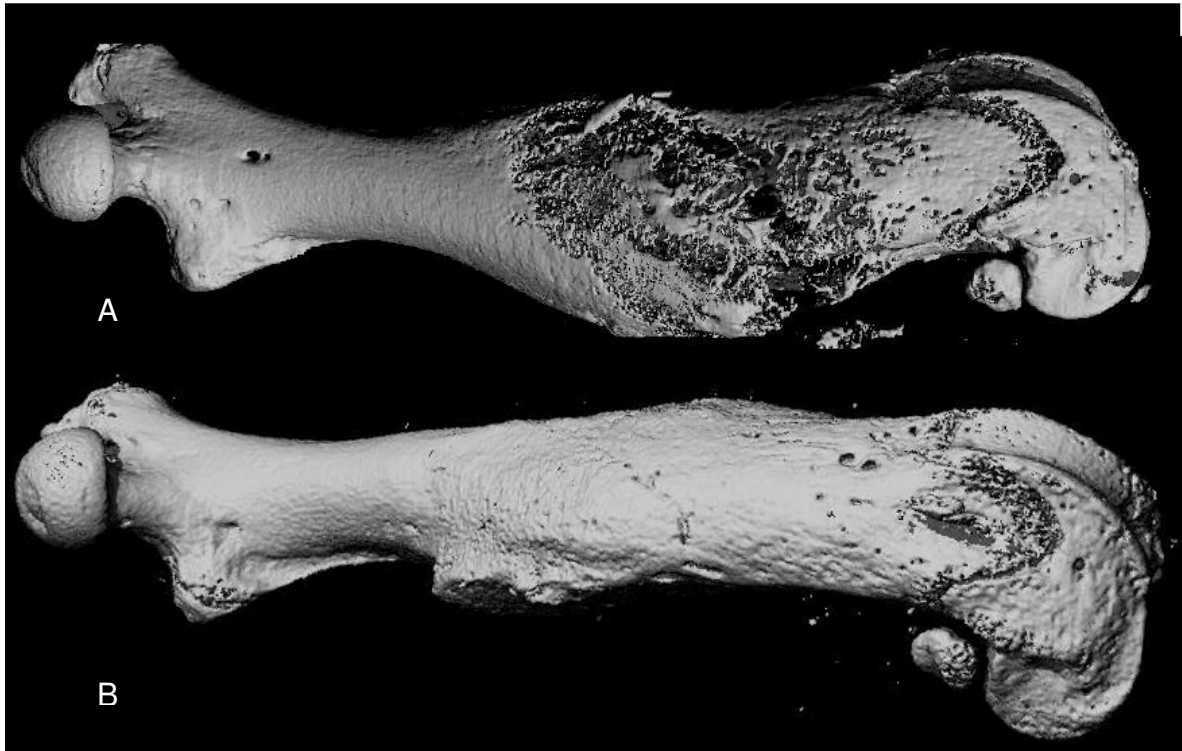


Abb. 23: Dreidimensionale Darstellung der strukturellen Gegebenheiten der Femora an Tag 20 der Frakturheilung. Im Kontrollfemur (A) ist der Frakturspalt nach 20 Tagen Frakturheilung noch erkennbar. Der mit Östrogen (B) behandelte Femur hingegen, hat seine strukturelle Integrität nach dieser Periode bereits erlangt hat. (Mikro-CT-Analyse; Schichtdicke: 12 μ m, 12kV, 114mA)

Wie anhand der oben gezeigten Mikro-CT-Analyse erkennbar ist, besteht hinsichtlich der strukturellen Gegebenheiten an Tag 20 der Frakturheilung ein deutlicher Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe mit Östrogenapplikation.

So zeigt der Kontrollfemur zum Zeitpunkt der Untersuchung eine noch nicht vollständig durchbaute Frakturzone. Der Femur des mit Östrogenapplikation behandelten Tieres hingegen, hat seine strukturelle Integrität innerhalb dieser Periode bereits wiedererlangt.

4 Diskussion

Um eine aussagefähige Studie anfertigen zu können, musste ein Modell gefunden werden, das den Anspruch erfüllt, in großem Maße mit dem Bezugsfaktor menschliche Frakturheilung vergleichbar zu sein.

Das Verstehen von komplexen Systemen wie z.B. dem Skelett als solches und seinen Reparaturmechanismen, erfordert manchmal Vereinfachungen. Modelle können oft diese Vereinfachungen einiger Facetten von viel komplexeren Systemen beschaffen.

Unter den Säugetieren sind Mäuse vielversprechende Tiere für diese Art von experimenteller Arbeit⁷⁸, da sie weltweit verfügbar, leicht reproduzierbar und kostengünstig sind.

Das Ziel dieser Studie war es, eine genaue Analyse des Knochenbruchheilungsverhaltens von männlichen und weiblichen Mäusen vorzunehmen, um klären zu können, ob und in welcher Dimension Sexualhormone am Prozess der Frakturheilung beteiligt sind und welche Auswirkung sie auf die Knochenbruchheilung haben. Diese Frage ist von entscheidender Bedeutung, da über ihre Beantwortung ein Hinweis für einen möglichen speziesübergreifenden Zusammenhang geliefert wird.

Um das Mausmodell für Frakturheilungsstudien, die ebenso die biomechanische Testung erlauben, zugänglich zu machen, modifizierten wir das von Einhorn beschriebene Tibia-Fraktur-Modell²¹. Auf diese Art entwickelten wir ein standardisiertes Femur-Fraktur-Modell der Maus, welches gegenüber dem Tibiamodell zwei Vorteile hat: 1.) Die Anatomie der femoralen Diaphyse ist bei biomechanischen Testungen der Tibia überlegen; 2.) am Oberschenkel entfallen mögliche störende Einflüsse eines weiteren Knochens, wie es beim Unterschenkel durch die Fibula der Fall ist.

Da es eine Menge von Daten über die Effekte von Sexualhormonen auf den Knochen gibt, ist es doch überraschend, dass unser Wissen über die Effekte eben dieser Sexualhormone im Rahmen der akuten Frakturheilung sehr limitiert ist.

Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass der Mechanismus der Knochenbruchheilung nur *in vivo* studiert werden kann.

Die in dieser *in vivo*-Arbeit im Mausmodell nach 20 Tagen Frakturheilungsdauer evaluierte erhöhte biomechanische Stabilität der frakturierten Femora der mit Östrogen und Testosteron behandelten Tiere lässt sich, wie durch die Histologie und Histomorphometrie bestätigt, auf eine gesteigerte Knochenformation im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren zurückführen.

Die histomorphometrischen Untersuchungen zeigten eine pro Kallusfläche signifikant um nahezu 100% gesteigerte Knochenmasse, welche durch Calcein-Labeling auf eine erhöhte Aktivität der Osteoblasten zurückgeführt werden konnte.

Weiterhin ist festzustellen, dass der Frakturheilungsbereich, also der Kallus, sowohl in den kontaktradiographischen, den histologischen und auch den Mikro-CT-Untersuchungen, in allen mit Sexualhormonen behandelten Tieren deutlich besser mineralisiert und durchbaut war, als in den Kontrollgruppen.

Dieser Aspekt wiegt um so mehr, wenn man bedenkt, dass erst Differenzen von ca. 30% mit kontaktradiologischen Analysen nachweisbar sind.

Aus diesen Beobachtungen lässt sich auch die im 3-Punkt-Biegeversuch ermittelte, durch bessere Mineralisierung und Durchbauung bedingte, höhere biomechanische Kompetenz und gesteigerte Belastbarkeit der Femora der Tiere mit Sexualhormonapplikation erklären.

Die im Vergleich zum Kontrolltier nachgewiesene gesteigerte Knochenformation und die erhöhte Bruchkraft sind um so bedeutender, wenn man bedenkt, dass die korrekte Kontrolle für die in den Experimenten frakturierten Femora, die Femora der Gegenseite des gleichen Tieres sind. Diese weisen aber im direkten Vergleich Werte auf, die mit denen aus den Kontrollgruppen übereinstimmen. So kommt man anhand der biomechanischen Daten und oben aufgeführter Beobachtung zu dem Schluss, dass es sich bei Sexualhormonen scheinbar um Steroide handelt, die im Skelettsystem spezifisch am Ort der Knochenbruchheilung zu wirken scheinen.

Somit ist eins der wichtigsten Resultate dieser Studie, dass Sexualhormone während der akuten Phase der Frakturheilung scheinbar spezifisch auf die am Heilungsprozess und –ort beteiligten Zellen einzuwirken scheinen.

Zu einer anderen Kernaussage der vorliegenden Arbeit führt die Auswertung der Ergebnisse in Bezug auf die Frakturheilungsdauer. In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass hinsichtlich der für die Frakturheilung benötigten Zeit enorme Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrolltieren bestehen. So erreichten die mit dem Sexualhormon Östrogen behandelten Versuchstiere die als physiologische Referenz gesetzte biomechanische Kompetenz bereits nach 15 Tagen Frakturheilungsdauer, während die Kontrolltiere 20 Tage benötigten.

Diese Beobachtung ist als einer der wichtigsten Aspekte dieser Arbeit anzusehen, da man anhand dieser Daten davon ausgehen kann, dass die Frakturheilung durch Sexualhormone nicht nur signifikant verbessert, sondern sogar entscheidend um 25% gegenüber den Kontrollen im Mausmodell beschleunigt werden kann.

Als physiologisches Korrelat zeigte sich in den nach den Versuchen durchgeführten Mikro-CT-Analysen, dass die Femora der mit den Sexualhormonen Östrogen und Testosteron behandelten Tiere bereits ihre volle strukturelle Integrität wiedergewonnen hatten, während die Kontrollen eine nicht vollständig wiederhergestellte Knochenstruktur aufwiesen.

Mit den *in vivo* Daten aus dieser Studie über den Einfluss von Sexualhormonen auf die Frakturheilung in Mäusen konnten wir zeigen, dass es möglicherweise vorstellbar ist, die Frakturheilung nach ausführlichen klinischen Studien auch in Menschen zu verbessern oder gar zu beschleunigen.

Diese neuen Einblicke in die Rolle und Wirkungsweise von Sexualhormonen im Verlauf der Frakturheilung, können möglicherweise neue Wege für die Behandlung von Frakturen im allgemeinen oder aber von mehr spezifischen Fällen wie z.B. osteoporotischen Frakturen, Trümmerfrakturen oder Fällen von

verzögerter Heilung (*delayed union*) oder Pseudarthrosenbildung (*non-union*) aufweisen.

Aufgrund der mit dieser Dissertation herausgearbeiteten Daten, die zeigen, dass Sexualhormone ihren Haupteffekt mit hoher Potenz an den Orten der akuten Frakturheilung entfalten, kann man spekulieren, dass es mit Hilfe zukünftiger Forschung möglich sein müsste, eine Art von Medikamenten zu entwickeln, die spezifisch auf die osteoblastäre Knochenformation zielen und so die Dynamik der Regeneration in Richtung verbesserter und beschleunigter Frakturheilung verändern.

Trotz all der positiven Daten dieser Studie, muss man bedenken, dass ein Modell nur ein Modell ist. Jedes Modell kann einige Aspekte eines komplexen Systems fokussieren, in diesem Fall die Frakturheilung. Aus der genetischen Perspektive gesehen, mit der hohen Übereinstimmung unter den Säugetieren, kann man annehmen, dass ein Maus-Modell wie dieses eine verlässliche Basis ist, um interessante und wichtige Einblicke in die Physiologie und Pathophysiologie der Frakturheilung und ihrer Mechanismen zu geben.

Hinsichtlich des Frakturheilungsverhaltens unter dem Einfluss von Sexualhormonen ist in der Literatur die Auswahl an entsprechenden Studien sehr gering.

Bei vergleichender Betrachtung der Ergebnisse dieser Studien wird deutlich, dass bisher viele sehr unterschiedliche Resultate erzielt worden sind.

Einige der sich mit Sexualhormonen beschäftigenden Studien seien im folgenden vorgestellt.

Die in dieser Arbeit in histologischen, histomorphometrischen und biomechanischen Analysen ermittelten positiven Einflüsse einer Östrogenapplikation auf die Knochenbruchheilung im Mausmodell, konnten bis dato noch von keiner anderen Studie belegt werden.

So zeigt eine Studie von Blythe et al.²⁰, welche die Frakturheilung Östrogen-behandelter erwachsener Ratten mit der von Kontrolltieren vergleicht, keinen signifikanten Unterschied in der biomechanischen Testung in einer dieser Gruppen.

Dieses Resultat steht auf den ersten Blick im Widerspruch zu den hier vorgelegten Ergebnissen. Man muss aber beachten, dass die Resultate dieses Autors schwer mit denen der hier vorgelegten Arbeit vergleichbar sind. Das liegt zum einen daran, dass die Autoren Ratten und nicht Mäuse als Versuchstiere verwendeten und sich zusätzlich eines für solche Experimente völlig ungewöhnlichen Modells, nämlich eines Fibulafrakturmodells, bedienten. Zum anderen wurden an den untersuchten Fibulae keine histologischen und histomorphometrischen Untersuchungen durchgeführt, so dass sich auch auf zellulärer Ebene keine Auswertungs- und Vergleichsmöglichkeit bietet.

Eine weitere Studie, die Cao und Mitarbeiter²⁷ in 2002 veröffentlichten, vergleicht die Frakturheilung in ovariectomierten und Östrogen- oder Raloxifene behandelten weiblichen Ratten mit der von Kontrolltieren. Den Autoren gelang es jedoch nicht, nach 6 und 16 Wochen signifikante Unterschiede hinsichtlich biomechanischer Kompetenz, Kontaktradiographie, CT-Auswertung und Histomorphometrie der mit Östrogen und Raloxifene behandelten Gruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu belegen. Es wurde lediglich ein nicht signifikanter Einfluss auf die Frakturheilung durch Suppression des Knochenbaus mittels Östrogenapplikation gezeigt.

Auch diese Resultate stehen in klarem Widerspruch zu den hier vorgestellten Ergebnissen. Aber auch in diesem Fall sind die Vergleichsmöglichkeiten der Daten stark eingeschränkt. Zum einen wurden als Versuchstiere auch hier Ratten verwendet, und in diesem Fall auch nur eine Population weiblicher Tiere. Zum anderen sind die Zeitpunkte der Datengewinnung mit 6 und 16 Wochen von denen dieser Dissertation zu weit entfernt, um eine vergleichende Aussage machen zu können. Nach dieser Zeitspanne kann man davon ausgehen, dass die Phase der akuten Frakturheilung abgeschlossen ist und der Prozess des Remodeling's die Knochen in ihrer alten Form und Belastbarkeit nahezu wiederhergestellt hat. Auf diese Weise sind die von uns beschriebenen Veränderungen während der akuten Phase der Frakturheilung mit diesem Modell nicht vergleichbar.

Wie oben bereits aufgezeigt, lässt sich mit Hilfe der in dieser Arbeit beschriebenen Versuche nachweisen, dass eine Applikation des Sexualhormons Östrogen während der ersten induktiven Tage der Frakturheilung, eine signifikante Steigerung der biomechanischen Kompetenz zur Folge hat. Einen erklärenden

Anhaltspunkt für diese signifikante Steigerung der biomechanischen Kompetenz, kann die Studie von Monaghan⁶¹ aufzeigen.

In einem Fibulafrakturmodell am Hasen wurde spezifisch nach der Expression von Östrogenrezeptoren im Kallusgebiet gesucht. Den Autoren gelang der Nachweis von Expressionsspitzen an Tag 3 und Tag 16 der Frakturheilung. Im weiteren Verlauf ließen sich jedoch keine Rezeptoren im Frakturgebiet mehr nachweisen. Die Autoren sehen darin einen Hinweis auf einen möglicherweise vorhandenen Einfluss von Östrogen auf die frühe induktive und die späte enchondrale Phase der Frakturheilung.

Die hier beschriebenen Ergebnisse der aufgeführten Studie lassen sich somit in Einklang mit den Resultaten der vorliegenden Dissertation bringen, da sie eine Beteiligung von Östrogen während der frühen Phase des Frakturheilungsprozesses als sehr wahrscheinlich erscheinen lassen.

Trotz intensiver Literaturrecherche ließ sich außer den eben diskutierten Punkten über die Wirkungen von Östrogen auf den Knochenbruchheilungsverlauf kein Anhalt für Studien zur Verkürzung der Heilungsdauer, also einer Heilungsbeschleunigung, finden. Die mit dieser Dissertation herausgearbeitete Verkürzung der Frakturheilungsperiode um 25% ist somit ein neuer, bisher im Schrifttum nicht belegter und diskutierter Aspekt der Östrogenwirkung auf den Knochen.

Ebenso wie das Sexualhormon Östrogen, hat auch Testosteron einen starken Einfluss auf die Frakturheilung.

Diese Dissertation kann aufgrund von histologischen, histomorphometrischen und biomechanischen Analysen den signifikant positiven Effekt von Testosteron auf die Frakturheilung in männlichen Wildtypmäusen belegen.

Betrachtet man eine Studie, publiziert von Frankle und Mitarbeitern³⁹ im Jahre 1990, findet man die Resultate dieser Dissertation teilweise bestätigt. Die Studie beschäftigt sich mit dem Einfluss von Testosteron-Propionat und Methenolon auf die Frakturheilung in Ratten. Die Knochenbruchheilung wurde von den Autoren zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit Hilfe von biochemischen, biomechanischen und histologischen Analysen untersucht. Den Verfassern gelang der Nachweis einer deutlich höheren Calciumkonzentration im Kallusgebiet in beiden behandelten

Gruppen, verglichen mit der Kontrolle. In der biomechanischen und histologischen Auswertung konnten die Autoren jedoch keine signifikanten Unterschiede feststellen. Sie schlussfolgern aus ihren Ergebnissen jedoch trotzdem, dass Testosteron–Propionat in der Unterstützung der Frakturheilung von klinischer Relevanz sein könnte.

Somit bestätigen die Autoren größtenteils die Daten dieser Arbeit, durch die eine deutlich bessere Mineralisierung und Durchbauung der Frakturgebiete in den mit Testosteron behandelten Tieren belegt wird. Allerdings gelang mit dieser Dissertation, im Gegensatz zur zitierten Studie, auch der Nachweis einer gesteigerten biomechanischen Kompetenz, sowie der histologische und histomorphometrische Nachweis einer gesteigerten Knochenformation während der Frakturheilung unter dem Einfluss von Testosteron.

Obwohl sich die Gruppe zum Nachweis der biomechanischen Kompetenz eines Kallusdistraktionsmodelles, welches mit unsere 3–Punkt–Biegeversuch nicht vergleichbar ist, bediente, sie als Frakturmodell eine Humerus–Osteotomie wählten und die Versuchstiere auch hier Ratten waren, bestätigen die Daten ihrer Studie trotz geringer Vergleichbarkeit die dieser Arbeit.

Außer dem Nachweis einer höheren Knochenformation und einer signifikant gesteigerten biomechanischen Belastbarkeit, gelang mit dieser Dissertation durch die Untersuchung der kontralateralen Femora auch der Beleg, dass der Effekt der Sexualhormone auf die Frakturheilung scheinbar direkt die Zellen am Ort der akuten Reparation betrifft. Der Rest des Skelettsystems scheint unbeeinflusst zu bleiben, da die kontralateralen Femora nach wie vor ihre unveränderte physiologische Kompetenz aufwiesen.

Eine in diesem Punkt interessante Studie zum Einfluss von Testosteron auf die Knochenbruchheilung stammt von Tarsoly und Mitarbeitern⁸⁸. Er unterzog Ratten einer Hypophysenektomie. Anschließend wurde eine Gruppe mit Testosteron–applikation behandelt, während der Kontrollgruppe keine Therapie zukam. Die Autoren konnten zeigen, dass Testosteron die Effekte der Hypophysenektomie auf die Knochenbruchheilung vollständig aufheben konnte. Als Schlussfolgerung sehen die Verfasser dieser Arbeit ein direktes peripheres Wirken von Testosteron auf die Zellen am Ort der Frakturheilung an.

Diese von den Verfassern gemachte Beobachtung bestätigt und bekräftigt somit die Resultate dieser Arbeit, die einen starken Einfluss von Testosteron auf die Frakturheilung belegen. Anhand der Daten dieser Dissertation und ihrer Bestätigung durch die vorliegende Studie, mag es in Zukunft vielleicht die Möglichkeit geben, mit Hilfe weiterer Forschung Medikamente entwickeln zu können, die eben diesen spezifischen Effekt auf die Frakturheilung haben.

Hinsichtlich der Darstellung der dreidimensionalen strukturellen Gegebenheiten, wie in dieser Dissertation mit Hilfe von computertomographischen Analysen aufgezeigt, findet sich in der Literatur weder zu Testosteron noch zu Östrogen eine Arbeit, die Vergleichsmöglichkeiten zur Diskussion bietet.

5 Zusammenfassung

Die Regulation des Frakturheilungsprozesses wird als ein Zusammenspiel von auto-, para- und endokrinen Mechanismen verstanden.

Diese Arbeit konzentriert sich dabei auf die zellulären Vorgänge am Ort der Frakturheilung und deren biomechanischer Relevanz unter einer während der Frakturheilung zugeführten Sexualhormontherapie mit Östrogen und Testosteron.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu klären, ob sich mit Hilfe der Applikation von Sexualhormonen während der akuten Phase der Knochenbruchheilung eine Änderung des Heilungsverlaufes, mit Aussicht auf Verbesserung oder gar Beschleunigung dieses Prozesses, erreichen lässt. Hierzu wurden Wildtypmäuse radiologisch, histologisch, histomorphometrisch, biomechanisch und computertomographisch untersucht.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass durch die Applikation von Sexualhormonen während der akuten Phase der Frakturheilung eine signifikante Steigerung der biomechanischen Kompetenz erreicht werden kann.

Als dafür ursächlich konnte die unter Sexualhormonapplikation stark signifikant gesteigerte Knochenformation durch Osteoblasten, sowie die daraus resultierende Steigerung des Knochenmasse-Phänotyps, nachgewiesen werden.

Als strukturelles Korrelat dieser Beobachtung ließ sich in den durchgeführten computertomographischen Analysen, nach Ablauf der jeweiligen Experimente, eine vollständig wiederhergestellte strukturelle Integrität der Femora der mit Sexualhormonen behandelten Tiere im Vergleich zu denen der entsprechenden Kontrollgruppe eruieren.

Wie histologisch und histomorphometrisch herausgearbeitet, betreffen diese Veränderungen nicht nur den trabekulären, sondern auch den kortikalen Knochen im Bereich der Knochenbruchheilungszone.

Dies ist von besonderer biologischer Relevanz, da der kortikale Knochen eine gesteigerte biomechanische Kompetenz zur Folge hat.

Ein weiterer Kernpunkt dieser Arbeit ist, dass als ein herausragender Effekt der Applikation von Sexualhormonen die Frakturheilung nicht nur verbessert, sondern

auch signifikant beschleunigt werden konnte. Dies wird beim Vergleich der Frakturheilungsdauer deutlich, die bis zum Erreichen der physiologischen biomechanischen Belastbarkeit zwischen den mit Östrogen behandelten Tieren und den Kontrollgruppen stark differiert. Hier ließ sich eine Reduktion der Knochenbruchheilungsdauer um bis zu 25% verzeichnen.

Besondere Aufmerksamkeit verdient weiterhin die Tatsache, dass Sexualhormone während der Dauer der Frakturheilung gegeben, scheinbar nur spezifisch am Ort der Knochenreparatur wirken und sich in anderen Bereichen des Skelettsystems keine signifikanten Abnormitäten finden.

Diese Dissoziation von Frakturheilungs- und Knochenstoffwechsel insgesamt, kann die Basis für einen etwaigen Einsatz von Sexualhormonen als Medikament für zukünftige Therapieprinzipien der Knochenbruchheilung bilden.

Der Frakturheilungsprozess könnte so positiv moduliert werden, ohne dass der Patient zwangsläufig durch Nebenwirkungen der Sexualhormontherapie auf den Rest des Skelettsystems gefährdet ist.

6 Literaturverzeichnis

1. Ovarielle Synthese, Transport und Metabolismus von Östrogen. *N Engl J Med* **5**, 346 (2002)
2. Strukturformel von 17-beta Östradiol. *N Engl J Med* **5**, 346 (2002)
3. Strukturformel von Dihydrotestosteron. *N Engl J Med* **5**, 346 (2002)
4. European Research in Space and Terrestrial Osteoporosis (ERISTO). <http://www.medes.fr/osteo.html>. (2004)
5. Aarden EM. Functions of osteocytes in bone. *J Cell Biochem* **55**, 287-299 (1994)
6. Abu E. The localisation of androgen receptors in human bone. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 3493-3497 (1997)
7. Albers-Schönberg H.E. Projektionsröntgenbilder einer seltenen Knochen-erkrankung. *Fortschr Geb Röntgenstrahlen* **7**, 158-159 (1903)
8. Amling M., Delling G. Biology of osteoclasts; their role in bone metastases. *Orthopäde* **27**, 214-223 (1998)
9. Amling M., Grote H.J., Posl M., Hahn M., Delling G. Polyostotic heterogeneity of the spine in osteoporosis. Quantitative analysis and three-dimensional morphology. *Bone Miner* **27**, 193-208 (1994)
10. Amling M., Herden S., Posl M., Hahn M., Ritzel H., Delling G. Heterogeneity of the skeleton: comparison of the trabecular microarchitecture of the spine, the iliac crest, the femur, and the calcaneus. *J Bone Miner Res* **11**, 36-45 (1996)
11. Amling M., Posl M., Ritzel H., Hahn M., Vogel M., Wening V.J., Delling G. Architecture and distribution of cancellous bone yield vertebral fracture clues. A histomorphometric analysis of the complete spinal column from 40 autopsy specimens. *Arch Orthop Trauma Surg* **115**, 262-269 (1996)
12. Amling M., Priemel M., Holzmann T., Chapin K., Rueger J.M., Baron R., Demay M.B. Rescue of the skeletal phenotype of vitamin D receptor-ablated mice in the setting of normal mineral ion homeostasis: formal histomorphometric and biomechanical analyses. *Endocrinology* **140**, 4982-4987 (1999)
13. Amling M., Takeda S., Karsenty G. A neuro (endo)crine regulation of bone remodeling. *Bioessays* **22**, 970-975 (2000)
14. Anonymus. Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis and treatment of osteoporosis. *Am J Med* **94**, 646-650 (1993)

15. Aubin J.E. Regulation of osteoblast formation and function. *Rev Endocr Metab Disord* **2**, 81-94 (2001)
16. Baron R. Molecular mechanisms of bone resorption. An update. *Acta Orthop Scand Suppl* **266**, 66-70 (1995)
17. Bax B.E., Wozney J.M., Ashhurst D.E. Bone morphogenetic protein-2 increases the rate of callus formation after fracture of the rabbit tibia. *Calcif Tissue Int* **65**, 83-89 (1999)
18. Bellido T., Jilka R.L., Boyce B.F., Girasole G., Broxmeyer H., Dalrymple S.A., Murray R., Manolagas S.C. Regulation of interleukin-6, osteoclastogenesis, and bone mass by androgens. The role of the androgen receptor. *J Clin Invest* **95**, 2886-2895 (1995)
19. Benz D.J., Haussler M.R., Thomas M.A., Speelman B., Komm B.S. High-affinity androgen binding and androgenic regulation of alpha 1(I)-procollagen and transforming growth factor-beta steady state messenger ribonucleic acid levels in human osteoblast-like osteosarcoma cells. *Endocrinology* **128**, 2723-2730 (1991)
20. Blythe J.G., Buchsbaum H.J. Fracture healing in estrogen-treated and castrated rats. *Obstet Gynecol* **48**, 351-352 (1976)
21. Bonnarens F., Einhorn T.A. Production of a standard closed fracture in laboratory animal bone. *J Orthop Res* **2**, 97-101 (1984)
22. Bord S. Production of collagenase by human osteoblasts and osteoclasts in vivo. *Bone* **19**, 35-40 (1996)
23. Bose H.S., Sugawara T., Strauss J.F.III, Miller W.L. The pathophysiology and genetics of congenital lipid adrenal hyperplasia. International Congenital Lipoid Adrenal Hyperplasia Consortium. *N Engl J Med* **335**, 1870-1878 (1996)
24. Bourque W.T., Gross M., Hall B.K. A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair. *Lab Anim Sci* **42**, 369-374 (1992)
25. Brodie A., Inkster S. Aromatase in the human testis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **44**, 549-555 (1993)
26. Bucay N., Sarosi I., Dunstan C.R., Morony S., Tarpley J., Capparelli C., Scully S., Tan H.L., Xu W., Lacey D.L., Boyle W.J., Simonet W.S. Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes Dev* **12**, 1260-1268 (1998)
27. Cao Y., Mori S., Mashiba T., Westmore M.S., Ma L., Sato M., Akiyama T., Shi L., Komatsubara S., Miyamoto K., Norimatsu H. Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* **17**, 2237-2246 (2002)

28. Carani C., Qin K., Simoni M., Faustini-Fustini M., Serpente S., Boyd J., Korach K.S., Simpson E.R. Effect of testosterone and estradiol in a man with aromatase deficiency. *N Engl J Med* **337**, 91-95 (1997)
29. Chang C.S., Kokontis J., Liao S.T. Structural analysis of complementary DNA and amino acid sequences of human and rat androgen receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**, 7211-7215 (1988)
30. Colvard D.S., Eriksen E.F., Keeting P.E., Wilson E.M., Lubahn D.B., French F.S., Riggs B.L., Spelsberg T.C. Identification of androgen receptors in normal human osteoblast-like cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 854-857 (1989)
31. Cooper C., Aihie A. Osteoporosis. *Baillieres Clin Rheumatol* **9**, 555-564 (1995)
32. Debrunner A.M. Orthopädie, Orthopädische Chirurgie. Verlag Hans Huber **3**. Auflage, 29, 335 (1994)
33. Diller H. Hippokratische Medizin und attische Philosophie. *Hermes* 389-409 (1952)
34. Doty SB. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int* **33**, 509-512 (1981)
35. Ducy P., Schinke T., Karsenty G. The osteoblast: a sophisticated fibroblast under central surveillance. *Science* **289**, 1501-1504 (2000)
36. Enmark E., Peltö-Huikko M., Grandien K., Lagercrantz S., Lagercrantz J., Fried G., Nordenskjöld M., Gustafsson J.A. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 4258-4265 (1997)
37. Falahati-Nini A., Riggs B.L., Atkinson E.J., O'Fallon W.M., Eastell R., Khosla S. Relative contributions of testosterone and estrogen in regulating bone resorption and formation in normal elderly men. *J Clin Invest* **106**, 1553-1560 (2000)
38. Felix R., Hofstetter W., Cecchini M.G. Recent developments in the understanding of the pathophysiology of osteopetrosis. *Eur J Endocrinol* **134**, 143-156 (1996)
39. Frankle M., Borrelli J. The effects of testosterone propionate and methenolone enanthate on the healing of humeral osteotomies in the Wistar rat. *J Invest Surg* **3**, 93-113 (1990)
40. Fujimoto R., Tanizawa T., Nishida S., Yamamoto N., Soshi S., Endo N., Takahashi H.E. Local effects of transforming growth factor-beta1 on rat calvaria: changes depending on the dose and the injection site. *J Bone Miner Metab* **17**, 11-17 (1999)

41. Green S., Walter P., Kumar V., Krust A., Bornert J.M., Argos P., Chambon P. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **320**, 134-139 (1986)
42. Hillier S.G., Whitelaw P.F., Smyth C.D. Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited. *Mol Cell Endocrinol* **100**, 51-54 (1994)
43. Hofbauer L.C., Hicok K.C., Khosla S. Effects of gonadal and adrenal androgens in a novel androgen-responsive human osteoblastic cell line. *J Cell Biochem* **71**, 96-108 (1998)
44. Hofbauer L.C., Ten R.M., Khosla S. The anti-androgen hydroxyflutamide and androgens inhibit interleukin-6 production by an androgen-responsive human osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res* **14**, 1330-1337 (1999)
45. Hu L.S., Sun Y., Cheng X.J., Zhao S.X. Acceleration of fracture healing by a series of Hu's traditional Chinese medicine prescriptions, sanqihuoxuewan, jiegudan and zhuangjinxugudan. *J Tradit Chin Med* **8**, 243-246 (1988)
46. Hughes DE. TGF beta 1 induces osteoclast apoptosis in vitro. *J Bone Miner Res* **9**, (1994)
47. Kallen C.B., Billheimer J.T., Summers S.A., Stayrook S.E., Lewis M., Strauss J.F.III. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein. *J Biol Chem* **273**, 26285-26288 (1998)
48. Kasperk C.H., Wergedal J.E., Farley J.R., Linkhart T.A., Turner R.T., Baylink D.J. Androgens directly stimulate proliferation of bone cells in vitro. *Endocrinology* **124**, 1576-1578 (1989)
49. Kiebzak G.M., Smith R., Gundberg C.C., Howe J.C., Sacktor B. Bone status of senescent male rats: chemical, morphometric, and mechanical analysis. *J Bone Miner Res* **3**, 37-45 (1988)
50. Komori T. Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* **89**, 755-764 (1997)
51. Kuiper G.G., Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J.A. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 5925-5930 (1996)
52. Lakkakorpi PT. Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle. *Microsc Res Tech* **32**, 171-181 (1995)
53. Lee J.Y., Peng H., Usas A., Musgrave D., Cummins J., Pelinkovic D., Jankowski R., Ziran B., Robbins P., Huard J. Enhancement of bone healing based on ex vivo gene therapy using human muscle-derived cells expressing bone morphogenetic protein 2. *Hum Gene Ther* **13**, 1201-1211 (2002)

-
54. Lieberman J.R., Daluiski A., Einhorn T.A. The role of growth factors in the repair of bone. Biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am* **84**, 1032-1044 (2002)
 55. Lieberman S. Are estradiol-producing cells incompletely endowed? A chronicle of the emergence of certitude from conjecture. *Gynecol Obstet Invest* **41**, 147-172 (1996)
 56. Lubahn D.B., Joseph D.R., Sar M., Tan J., Higgs H.N., Larson R.E., French F.S., Wilson E.M. The human androgen receptor: complementary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol Endocrinol* **2**, 1265-1275 (1988)
 57. Manolagas S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* **21**, 115-137 (2000)
 58. Marks S.C., Schmidt C.J. Bone remodeling as an expression of altered phenotype: studies of fracture healing in untreated and cured osteopetrotic rats. *Clin Orthop* 259-264 (1978)
 59. Matsumine H., Hirato K., Yanaihara T., Tamada T., Yoshida M. Aromatization by skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab* **63**, 717-720 (1986)
 60. Miller W.R. Aromatase activity in breast tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* **39**, 783-790 (1991)
 61. Monaghan B.A., Kaplan F.S., Lyttle C.R., Fallon M.D., Boden S.D., Haddad J.G. Estrogen receptors in fracture healing. *Clin Orthop* 277-280 (1992)
 62. Morishima A., Grumbach M.M., Simpson E.R., Fisher C., Qin K. Aromatase deficiency in male and female siblings caused by a novel mutation and the physiological role of estrogens. *J Clin Endocrinol Metab* **80**, 3689-3698 (1995)
 63. Mundlos S. Mutations involving the transcription factor *Cbfa1* cause cleidocranial dysplasia. *Cell* **89**, 774-779 (1997)
 64. Mundy G.R. Regulation of bone formation by bone morphogenetic proteins and other growth factors. *Clin Orthop* 24-28 (1996)
 65. Naftolin F., Ryan K.J., Davies J., Reddy V.V., Flores F., Petro Z., Kuhn M., White R.J., Takaoka Y., Wolin L. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Prog Horm Res* **31**, 295-319 (1975)
 66. Niethard F.U., Pfeil J. *Orthopädie*. Thieme Verlag **4**. Auflage, 146-312 (2003)
 67. Orwoll E.S., Stribrska L., Ramsey E.E., Keenan E.J. Androgen receptors in osteoblast-like cell lines. *Calcif Tissue Int* **49**, 183-187 (1991)

68. Otto F. Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* **89**, 765-771 (1997)
69. Oz O.K., Zerwekh J.E., Fisher C., Graves K., Nanu L., Millsaps R., Simpson E.R. Bone has a sexually dimorphic response to aromatase deficiency. *J Bone Miner Res* **15**, 507-514 (2000)
70. Ralston S.H. What determines peak bone mass and bone loss? *Baillieres Clin Rheumatol* **11**, 479-494 (1997)
71. Rawlinson SCF. Calvarial and limb bone cells in organ and monolayer culture do not show the same early responses to dynamic mechanical strain. *J Bone Miner Res* **10**, 1225-1232 (1995)
72. Ray N.F., Chan J.K., Thamer M., Melton L.J.III. Medical expenditures for the treatment of osteoporotic fractures in the United States in 1995: report from the National Osteoporosis Foundation. *J Bone Miner Res* **12**, 24-35 (1997)
73. Riede U.N., Werner M., Schäfer H.E. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Thieme Verlag **5. Auflage**, 163-335 (2004)
74. Riggs B.L., Melton L.J.III. Involutional osteoporosis. *N Engl J Med* **314**, 1676-1686 (1986)
75. Riggs B.L., Melton L.J.III. The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. *Bone* **17**, 505-511 (1995)
76. Rodan G.A., Martin T.J. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* **289**, 1508-1514 (2000)
77. Sakai R., Miwa K., Eto, Y. Local administration of activin promotes fracture healing in the rat fibula fracture model. *Bone* **25**, 191-196 (1999)
78. Schilling AF. Transgenic knock out mice in skeletal research. Towards a molecular understanding of the mammalian skeleton. *J Musculoskel Neuron Interact* 275-289 (2001)
79. Schinke T. McKee M.D., Karsenty G. Extracellular matrix calcification: where is the action? *Nat Genet* **21**, 150-151 (1999)
80. Schmidt C.J. Marks S.C.J., Jordan C.A., Hawes L.E. A radiographic and histologic study of fracture healing in osteoporotic rats. *Radiology* **122**, 517-519 (1977)
81. Schumpelick V., Bleese N.M., Mommsen U. *Chirurgie*. Ferdinand Enke Verlag **4. Auflage**, 1175 (1999)
82. Simon A.M., Manigrasso M.B., O'Connor J.P. Cyclo-oxygenase 2 function is essential for bone fracture healing. *J Bone Miner Res* **17**, 963-976 (2002)

83. Sims N.A., Dupont S., Krust A., Clement-Lacroix P., Minet D., Resche-Rigon M., Gaillard-Kelly M., Baron R. Deletion of estrogen receptors reveals a regulatory role for estrogen receptors-beta in bone remodeling in females but not in males. *Bone* **30**, 18-25 (2002)
84. Smith E.P., Boyd J., Frank G.R., Takahashi H., Cohen R.M., Specker B., Williams T.C., Lubahn D.B., Korach K.S. Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. *N Engl J Med* **331**, 1056-1061 (1994)
85. Spelsberg T.C., Subramaniam M., Riggs B.L., Khosla S. The actions and interactions of sex steroids and growth factors/cytokines on the skeleton. *Mol Endocrinol* **13**, 819-828 (1999)
86. Steinbrich W., Regazzoni P. *Frakturen und Luxationen*. Georg Thieme Verlag Stuttgart 3-27 (1999)
87. Suda T. Regulation of Osteoclast function. *J Bone Miner Res* **12**, 869-879 (1997)
88. Tarsoly E., Janossy J., Kosztura L. Effect of testosterone on fracture healing in hypophysectomized rats. *Acta Histochem* **65**, 25-33 (1979)
89. Turner C.H., Burr D.B. Basic biomechanical measurements of bone: a tutorial. *Bone* **14**, 595-608 (1993)
90. Turner R.T., Colvard D.S., Spelsberg T.C. Estrogen inhibition of periosteal bone formation in rat long bones: down-regulation of gene expression for bone matrix proteins. *Endocrinology* **127**, 1346-1351 (1990)
91. Vanderschueren D., Bouillon R. Androgens and bone. *Calcif Tissue Int* **56**, 341-346 (1995)
92. Vanderschueren D., Van Herck E., Suiker A.M., Visser W.J., Schot L.P., Chung K., Lucas R.S., Einhorn T.A., Bouillon R. Bone and mineral metabolism in the androgen-resistant (testicular feminized) male rat. *J Bone Miner Res* **8**, 801-809 (1993)
93. Wakley G.K., Schutte H.D.Jr., Hannon K.S., Turner R.T. Androgen treatment prevents loss of cancellous bone in the orchidectomized rat. *J Bone Miner Res* **6**, 325-330 (1991)
94. Welch R.D., Jones A.L., Bucholz R.W., Reinert C.M., Tjia J.S., Pierce W.A., Wozney J.M., Li X.J. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on fracture healing in a goat tibial fracture model. *J Bone Miner Res* **13**, 1483-1490 (1998)
95. Wüster C. *Klinik und Therapie der primären Osteoporosen*. In *Metabolische Osteopathien*. Seibel M.J., Stracke H. (Stuttgart, New York Schattauer) 161-190 (1997)

96. Zhang X., Schwarz E.M., Young D.A., Puzas J.E., Rosier R.N., O'Keefe R.J. Cyclooxygenase-2 regulates mesenchymal cell differentiation into the osteoblast lineage and is critically involved in bone repair. *J Clin Invest* **109**, 1405-1415 (2002)

7 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. med. Johannes M. Rueger für die Überlassung des Dissertationsthemas und die Förderung.

Herrn Professor Dr. med. Michael Amling möchte ich hiermit für die Einführung in die experimentelle Arbeit, sowie die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten danken. Durch seine fortwährende Unterstützung und Begleitung ist mit dieser Dissertation mein Interesse am wissenschaftlichen Arbeiten geweckt worden.

Herrn Dr. med. Michael Haberland möchte ich für die anregenden Ideen, Gespräche und die sehr gute Begleitung während der Zeit als mein Betreuer, sowie für einen kleinen Einblick in seine Sicht der Medizin und des Lebens danken.

Herrn Dr. med. Arndt Schilling und Herrn Dr. rer. nat. Thorsten Schinke danke ich für ihre Hilfe bei der Durchführung dieses Projektes.

Herrn Dr. med. Timo Beil gilt mein Dank für die gute Begleitung als nachfolgender Betreuer und für seine hilfreichen Tipps während der Anfertigung der Dissertation.

Frau Cordula Müldner danke ich für die tatkräftige Unterstützung und Zusammenarbeit bei allen labortechnischen Belangen und ihre Geduld bei allen Arbeiten.

Weiterhin möchte ich Jehad Tibba und Khoa Nguyen für die gute Zusammenarbeit bei vielen Teilen dieses Projektes und ihre über die Arbeit hinausreichende Freundschaft danken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Mutter und Großmutter sowie meiner Freundin, die mir in allen Situationen hilfreich zur Seite standen.

Lebenslauf

25.09.1977	Geboren in Rostock, als Sohn der Eheleute Andreas Gesicki und Angelika Gesicki, geb. Würschnitzer
1984 - 1991	Polytechnische Oberschule „Rudolf Klug“, Rostock
1991 - 1996	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife am „von Thünen“ Gymnasium, Rostock
1996 - 1997	Wehrdienst
1997	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität Hamburg (Herbst 1997)
1999	Ärztliche Vorprüfung (Herbst 1999)
2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Frühjahr 2001)
2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Frühjahr 2003)
2003 - 2004	Praktisches Jahr
1. Tertial	Zentr. für Innere Medizin, Abt. für Gastroenterologie und Hepatologie (Direktor: Dr. Jürgen Gebhardt) Allgemeines Krankenhaus Barmbek
2. Tertial	Klinik und Poliklinik für Orthopädie (Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Rüter), Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
3. Tertial (1. Hälfte)	Zentr. für operative Medizin, Abteilung für Unfall-, Gefäß-, Wiederherstellungs- und septische Chirurgie (Direktor: Dr. Knut Meinhövel) Allgemeines Krankenhaus Barmbek
(2. Hälfte)	Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie (Direktor: Prof. Dr. med. Dominguez), St. George`s General Hospital, St. George`s University, Grenada, West Indies
28. Oktober 2004	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

März 2005, Marco Gesicki

8.2 Publikationen, Vorträge im Rahmen der Dissertation

Publikationen:

Haberland M., Gesicki M., Nguyen C.K., Tibba J., Amling M., Rueger J.M. Antiinflammatory drugs impair fracture healing. Eur J Trauma **28**, Suppl.1, 80, (2002)

Haberland M., Gesicki M., Nguyen C.K., Tibba J., Beil T.F., Amling M., Rueger J.M. NSAIDs impair fracture healing. J Bone Miner Res **17**, Suppl.1,165 (2002)

Gesicki M., Tibba J., Nguyen C.K., Beil T.F., Rueger J.M., Haberland M., Amling M. Testosterone is a potent accelerator of fracture healing: Early structural reconstruction and improved biomechanical stability. Osteosynthesis And Trauma Care **11**, 3–5, (2003)

Nguyen C.K., Gesicki M., Tibba J., Beil T.F., Rueger J.M., Haberland M., Amling, M. Fracture repair and the role of antiinflammatory drugs: Deleterious effects of diclofenac but not of dexamethasone. Osteosynthesis And Trauma Care **11**, 6–7, (2003)

Vorträge

Gesicki M., Tibba J., Nguyen C.K., Beil T.F., Rueger J.M., Haberland M., Amling, M. Testosterone is a potent accelerator of fracture healing: Early structural reconstruction and improved biomechanical stability. Gerhard Küntscher Kreis, Osteosynthese International, Rethymno, Kreta (2002), Vortrag

März 2005, Marco Gesicki

9 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, März 2005

Marco Gesicki