

Aus dem
Institut für Veterinär-Physiologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Julius Wolff Institut,
Charité-Universitätsmedizin Berlin

**Histologische Beurteilung der Auswirkungen des Proteins Sklerostin und
der mechanischen Belastung auf die Knochenstruktur und die
Knochenheilung in einem Mausmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Sophie Damerow
Tierärztin
aus Berlin

Berlin 2016
Journal-Nr.: 3883

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Jörg Aschenbach
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Georg Duda
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. vet. Johanna Plendl

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):
mice, animal models, histology, bone fractures, fracture fixation, healing,
neutralizing antibodies, mechanical stimulation

Tag der Promotion: 26. Juni 2017

Meinen Eltern

In lieber Erinnerung an meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Stand des Wissens	2
2.1	Knochen	2
2.2	Aufbau der Röhrenknochen	2
2.3	Knochenarchitektur	3
2.3.1	Geflechtknochen	3
2.3.2	Lamellenknochen	3
2.4	Knochenhaut	4
2.5	Blutversorgung	5
2.6	Komponenten des Knochengewebes	5
2.6.1	Osteoblasten	5
2.6.2	Osteozyten	6
2.6.3	Osteoklasten	7
2.6.4	Zusammenspiel Osteoblasten - Osteoklasten	8
2.6.5	Knochenmatrix	10
2.7	Frakturheilung	10
2.7.1	Direkte Frakturheilung	10
2.7.2	Indirekte Frakturheilung	11
2.7.2.1	Entzündungsphase	12
2.7.2.2	Reparaturphase	12
2.7.2.3	Remodelingphase	13
2.8	Die Rolle der Vaskularisation während der Frakturheilung	14
2.9	Komplikationen der Frakturheilung	15
2.9.1	Schlecht heilende Frakturen/ Non-union	15
2.9.2	Fehlheilung	16
2.10	Einflussfaktoren auf die Knochenarchitektur und die Knochenheilung	16
2.10.1	Alter	17
2.10.2	Bewegung	18
2.11	Mechanische Belastung und Frakturheilung	18
2.12	Osteoporose	20
2.13	Osteoporose und Frakturheilung	21
2.14	Der Wnt-Signalweg	22
2.14.1	Übersicht Wnt-Signalweg	22
2.14.2	Regulierung des Wnt-Signalweges	23
2.14.3	Wnt-Signalweg und Knochen	23
2.15	Sklerostin	24
2.16	Sklerosteose und van-Buchem-Erkrankung	25
2.17	Gegenwärtige pharmakologische Therapieoptionen in der Knochenregeneration	26
2.17.1	Antiresorptiva	27
2.17.1.1	Stickstoffhaltige Bisphosphonate	27
2.17.1.2	Denosumab	27
2.17.1.3	Weitere Antiresorptiva	27
2.17.2	Anabolika	28
2.17.2.1	Parathormon (PTH)	28
2.17.2.2	Bone morphogenic proteins (BMPs)	28
2.17.3	Neue Ansätze der Osteoporose-Therapie	29
2.18	Hemmung des Wnt-Signalwegs als Therapieoption	29
2.19	Die Maus als Tiermodell	31
3	Tiere, Material und Methoden	32
3.1	Versuchstiere	32
3.2	Versuchsaufbau	32

3.3	Fixateur Externe	33
3.4	Sklerostin-neutralisierende Antikörper	35
3.5	Operation	35
3.6	Postoperative Versorgung	36
3.7	Euthanasie	37
3.8	Präparation der Knochen	37
3.9	Präparataufbereitung	38
3.9.1	Entkalkung	38
3.9.2	Entwässerung	38
3.9.3	Einbettung	38
3.9.4	Schneiden am Rotationsmikrotom	39
3.10	Histologische Färbungen	39
3.10.1	Movat's Pentachrom	40
3.10.2	Alpha sma	41
3.11	Auswertung	43
3.11.1	Digitales Einlesen der Präparate	43
3.11.2	Definition der Region of Interest (ROI)	43
3.11.3	Deskriptive Auswertung	44
3.11.4	Histomorphometrische Auswertung	45
3.11.5	Osteotomieüberbrückung	47
3.11.6	Immunhistologische Auswertung	47
3.11.7	Statistik	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Deskriptive Auswertung	49
4.2	Histomorphometrische Auswertung	52
4.2.1	Prozentuale Flächenverteilung	52
4.2.2	Totale Kallusfläche	58
4.2.3	Menge des Knorpelgewebes im gesamten Kallus	59
4.2.4	Menge an neu gebildetem Knochen im gesamten Kallus	61
4.2.5	Menge an Bindegewebe im gesamten Kallus	62
4.2.6	Menge an Knochenmark im gesamten Kallus	64
4.2.7	Periostaler Kallus	64
4.2.8	Intrakortikaler Kallus	67
4.2.9	Endostaler Kallus	70
4.3	Osteotomieüberbrückung	75
4.4	Immunhistologische Auswertung	79
5	Diskussion	80
5.1	Diskussion von Material und Methoden	81
5.1.1	Tiermodell	81
5.1.2	Versuchsaufbau	81
5.1.3	Operation	83
5.1.4	Probenentnahme und histologische Aufbereitung	83
5.1.5	Deskriptive Auswertung	84
5.1.6	Histomorphometrie	84
5.1.7	Osteotomieüberbrückung	85
5.1.8	Immunhistologie	85
5.2	Diskussion der Ergebnisse	85
5.2.1	Deskriptive Histologie und Histomorphometrie	85
5.2.2	Osteotomieüberbrückung	90
5.2.3	Immunhistologie	91
5.3	Vergleich mit anderen Studien	91
5.4	Schlussfolgerung	95
6	Zusammenfassung	97

7	Summary	98
	Literatur	99

Abkürzungsverzeichnis

Aa.	Arteriae
Alpha sma	Alpha-Smooth Muscle Actin
APC	Adenomatous polyposis coli
aqua dest.	Aqua destillata
ATPase	Adenosintriphosphatase
BDGF	Bone-derived growth factor
BMPs	Bone morphogenic proteins
BMU	Bone multicellular units
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d.h.	das heißt
Dkk	Dickkopf
Dvl	Dishevelled
et al.	et alii
GSK-3 β	Glykogen synthase kinase-3 β
HIF	Hypoxia-inducible factor
IL	Interleukin
kb	Kilo-Basenpaare
Lrp	Low-density lipoprotein receptor-related protein
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
M.	Musculus
micro-CT	Mikro-Computertomographie
Nmm	Newtonmillimeter
Nr.	Nummer
OPG	Osteoprotegerin
PEEK	Polyetheretherketon
PFA	Paraformaldehyd
PGE2	Prostaglandin E2
Placebo & rigid	Placebo und steifer Fixateur
Placebo & semi-rigid	Placebo und semi-steifer Fixateur
PTH	Parathormon
RANK	Receptor activator of nuclear factor $\kappa\beta$
RANK-Ligand	Receptor activator of nuclear factor $\kappa\beta$ -Ligand
rhBMP	Recombinant human bone morphogenetic protein
ROI	Region of Interest
s.c.	subcutan
SFRP	Secreted frizzled related protein
Sk1-Ak	Sklerostin-neutralisierende Antikörper
Sk1-Ak & rigid	Sklerostin-neutralisierende Antikörper und steifer Fixateur
Sk1-Ak & semi-rigid	Sklerostin-neutralisierende Antikörper und semi-steifer Fixateur
SOST-Gen	Sclerostin-Gen
TaN	Tantalnitrid
TGF- β	Transforming growth factor- β
TNF-alpha	Tumornekrosefaktor-alpha
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Wif-1/2	Wnt inhibitory factor-1/2
Wnt	Wingless and Int-1
z.B.	zum Beispiel
&	und

1. Einleitung

Die Bevölkerung wird zunehmend älter und damit steigt auch die Zahl der Osteoporosepatienten weiter an. Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die zu einer niedrigen Knochendichte führt, in deren Folge es zu einem erhöhten Frakturrisiko kommt. Aufgrund der schlechten Knochenstruktur ist die Frakturheilung bei diesen Patienten beeinträchtigt, und es liegt eine erhöhte Komplikationsrate vor. Es wird von Nonunion-Raten von 2-10% berichtet und von Fehlstellungsraten nach Operationen von 4-40% (Giannoudis et al., 2007). Diese Sachlage führt zu einer zunehmenden finanziellen Belastung des Gesundheitssystems und einem steigenden Forschungsinteresse mit dem Ziel einer verbesserten Frakturheilung.

Die Knochenheilung wird unter anderem durch lokale mechanische Belastung beeinflusst. Eine zu hohe interfragmentäre Belastung kann zu einer verzögerten Frakturheilung führen. Eine totale Abwesenheit von mechanischer Stimulation kann jedoch ebenso Heilungsstörungen verursachen. Mit Hilfe von externen Fixateuren, die kontrollierte, reproduzierbare biomechanische Konditionen ermöglichen, ist eine Untersuchung von dynamisierten Frakturen möglich. Die genauen Mechanismen der Mechanotransduktion sind noch nicht bekannt, es gibt jedoch Hinweise, dass die Sensitivität von Knochen auf mechanische Stimulation durch das Protein Sklerostin reguliert wird. Es scheint, als ob die anabole Wirkung der mechanischen Stimulation zumindest teilweise durch die Unterdrückung des Sclerostin-Gens (SOST-Gens) ausgelöst wird (Robling et al., 2008).

Das Protein Sklerostin ist ein Produkt des SOST-Gens und ein wichtiger negativer Regulator der Knochenbildung durch die Hemmung des Wnt-Signalweges. Die Abwesenheit von Sklerostin im Körper, wie sie bei Sklerosteose- und van-Buchem-Patienten beobachtet wird, führt zu einer deutlich erhöhten Knochenmasse. Es gibt Hinweise darauf, dass postmenopausale Frauen, die einem erhöhten Osteoporoserisiko unterliegen, ein höheres Sklerostinlevel als prämenopausale Frauen aufweisen. Des Weiteren wurde mit dem Alter eine Steigerung des Sklerostinspiegels in beiden Geschlechtern beobachtet (Mödder et al., 2011). Durch die pharmakologische Hemmung von Sklerostin mit Hilfe von Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern kann eine Steigerung der Knochenbildung und der Knochenmineraldichte erreicht werden (Agholme et al., 2011a; Padhi et al., 2011). Die Sklerostin-neutralisierenden Antikörper versprechen eine effektive Behandlung der Osteoporose und möglicherweise auch der Knochenheilung.

Es liegen bisher noch keine Studien über die Wirkung von Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern in Zusammenhang mit mechanischer Stimulation während der Knochenheilung vor. Ihre Interaktion ist bisher weitestgehend unklar. Ein größeres Wissen über die Wechselwirkungen während der Knochenheilung könnte einen effektiveren Einsatz der Sklerostin-neutralisierenden Antikörper ermöglichen und letztlich Behandlungsstrategien der Frakturheilung verbessern. Durch die Entwicklung fortgeschrittener Osteosynthesetechniken für Mäuse und Ratten sind standardisierte Knochenheilungsstudien an diesen Tieren möglich geworden und damit die Kombination aus kontrollierter, reproduzierbarer mechanischer Stimulation und Sklerostin-Antikörper-Behandlung.

Im Rahmen dieses Projektes wurde eine standardisierte Osteotomie am linken Femur von Mäusen durchgeführt. Die Osteotomien wurden mit Hilfe von externen Fixateuren stabilisiert, die zwei unterschiedliche Steifigkeiten zuließen. Sie erlaubten eine mehr oder weniger große interfragmentäre Beweglichkeit. Gleichzeitig wurde bei der Hälfte der Tiere eine Hemmung von Sklerostin mittels neutralisierender Antikörper vorgenommen. Mit Hilfe von histomorphometrischen und immunhistologischen Untersuchungen wurde die Entwicklung des Kallus nach unterschiedlichen Standzeiten der Tiere analysiert.

Folgende Hypothesen sollen in dieser Studie überprüft werden:

1. Die Hemmung von Sklerostin durch neutralisierende Antikörper führt zu einer erhöhten Knochenbildung während der Heilung.
2. Bei Applikation von Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern führt eine größere interfragmentäre Beweglichkeit (und die damit verbundene, natürliche Unterdrückung des SOST-Gens) zu keiner zusätzlichen Knochenbildung.

2. Stand des Wissens

2.1. KNOCHEN

Knochen sind Bestandteil des passiven Bewegungsapparates (Spornitz, 2010; Johannes und Pretterklieber, 2012). Ihre Funktion besteht darin, das Nervensystem und die inneren Organe zu schützen und den Körper zu tragen. Die Knochen dienen als Befestigungspunkt für Muskeln und Bänder. Somit bilden sie in Zusammenhang mit den von ihnen gebildeten Gelenken die Grundlage der Bewegung. Die Speicherung von Kalzium und Phosphat ist eine weitere wichtige Aufgabe von Knochen (Shea und Miller, 2005; Liebich, 2010; Johannes und Pretterklieber, 2012).

Knochen passen sich zeitlebens den biologischen Bedürfnissen durch Auf-, Ab- und Umbauvorgänge an (Schünke, 2014; König und Liebich, 2014). Die Architektur der Knochen und ihre funktionelle Anpassungsfähigkeit ermöglichen es dem Gewebe, bei einem Minimum an Material ein Maximum an Stabilität zu erreichen (Schiebler und Korf, 2007; Spornitz, 2010).

2.2. AUFBAU DER RÖHRENKNOCHEN

Nach der äußeren Form der Knochen unterscheidet man:

- Lange Knochen oder Röhrenknochen
- Kurze Knochen
- Platte Knochen
- Lufthaltige Knochen
- Unregelmäßige Knochen (König und Liebich, 2014)

Im Folgenden wird näher auf die Röhrenknochen eingegangen.

Röhrenknochen bestehen aus dem Mittelstück (Diaphyse) und den beiden Gelenkenden (Epiphysen) (Sniekers et al., 2010). Die Diaphyse ähnelt einem Rohr und besteht aus einem dichten Knochenmantel, der Substantia compacta, die nach Innen die Markhöhle begrenzt und zu den Epiphysen hin in die Substantia corticalis übergeht. (Johannes und Pretterklieber, 2012; König und Liebich, 2014) Die Diaphyse muß hauptsächlich Biege- und Rotationskräfte abfangen, die im Randbereich am größten sind. Im Inneren wirken wesentlich geringere Kräfte, sodass dort an Material gespart werden kann. Durch diese Bauweise erhält der Knochen Stabilität und bleibt zugleich leicht (Spornitz, 2010; Van den Berg, 2010).

Die Knochenenden sind von Knorpel überzogen und schließen ein inneres Bälkchenwerk, die Substantia spongiosa (Spongiosa), ein. An den Epiphysen muss das Gewebe hauptsächlich Druckbelastung abfangen. Dazu ist die Spongiosa entlang der Kraftwirkungslinien angeordnet. Die Knochenbälkchen richten sich entlang der externen Kräfte aus und reagieren auf Veränderungen der Gelenkbelastung. Julius Wolff stellte schon 1892 die Annahme auf, dass sich sowohl die äußere Form wie auch die innere Struktur eines Knochens im Zuge der mechanischen Belastung verändern und sich dieser anpassen (Wolff, 1892; Barak et al., 2011; Johannes und Pretterklieber, 2012).

Das Knochengewebe ist von einer äußeren (Periost) und inneren Knochenhaut (Endost) überzogen und schließt Knochenmark, Gefäße und Nerven ein. Das Knochenmark ist in der Markhöhle und der Spongiosa lokalisiert und ist Bildungsstätte der roten und weißen Blutkörperchen.

Zwischen der Epi- und Diaphyse liegt während des Längenwachstums eine Knorpelzone (Wachstumszone), die mit dem Ende des Wachstums allmählich schmaler wird, schlussendlich verknöchert und durch Bälkchenknochen ersetzt wird. Dieser Übergangsbereich von der Epi- zur Diaphyse wird Metaphyse genannt (Van den Berg, 2010; Schünke, 2014; König und Liebich, 2014). Zwischen der Metaphyse und der Epiphyse liegt die Epiphysenfuge (Schünke, 2014).

2.3. KNOCHENARCHITEKTUR

Grundsätzlich kann man zwei Knochenarten unterscheiden: Geflechtknochen und Lamellenknochen.

2.3.1. *Geflechtknochen*

Geflechtknochen ist der phylogenetisch ältere Knochen (Schünke, 2014; König und Liebich, 2014). In seiner mechanischen Festigkeit ist er dem lamellären Knochen weit unterlegen. Er tritt in Säugetieren normalerweise nur während der Knochenentwicklung und bei Reparaturprozessen auf und bildet den Kallus, der zur Stabilisierung von Frakturen gebildet wird. Der größte Anteil des bei der Geburt vorhandenen Knochens ist Geflechtknochen, der im Rahmen der Entwicklung durch Lamellenknochen ersetzt wird. Er bleibt zeitlebens nur im knöchernen Labyrinth des Ohres, im äußeren Gehörgang und an den Ansatzstellen größerer Sehnen am Knochen erhalten (König und Liebich, 2014). Dieser primäre Knochen zeichnet sich durch ein System miteinander verbundener, in allen Richtungen angeordneter Leisten aus. Bei der Entstehung des Geflechtknochens bilden Osteoblasten zunächst eine unverkalkte organische Extrazellulärmatrix, die vorwiegend aus Kollagen und Proteoglykanen besteht und im nachfolgenden Prozess mineralisiert. Der Mineralisierungsgrad der Interzellulärsubstanz ist geringer als in Lamellenknochen und die Stabilität daher herabgesetzt. Der primäre Knochen entspricht einem erhärteten faserreichen Bindegewebe (Schiebler und Korf, 2007; Schünke, 2014).

Geflechtknochen besitzt eine größere Wachstumspotenz als Lamellenknochen und ist dazu in der Lage, in einer relativ kurzen Zeit ein weiträumiges Gerüstwerk auszubilden. Er ist das erste Knochengewebe, das bei der Frakturheilung entsteht (Kallus). Im Rahmen des Remodeling wird der primäre Knochen fast überall in Lamellenknochen umgewandelt (Junqueira et al., 2004; Schünke, 2014).

2.3.2. *Lamellenknochen*

Am Lamellenknochen sind makroskopisch zwei Bauformen zu unterscheiden: Kortex (unterteilt in Substantia compacta und Substantia corticalis) und Substantia spongiosa. Die stabile Außenschicht des Knochens bildet der Kortex. Der Kortex ist im gesamten äußeren Bereich eines Röhrenknochens vorhanden und besteht aus dicht gepackter Knochensubstanz. Im Bereich der Diaphyse ist der Kortex besonders dicht und wird auch als Substantia compacta oder Kompakta bezeichnet. Im Bereich der Epiphysen wird er auch Substantia corticalis oder Kortikalis genannt. Dies sind die anatomisch korrekten Bezeichnungen. In der englischsprachigen Literatur sowie der Chirurgie wird der Begriff Kortikalis hingegen für die Substantia corticalis ebenso wie für die Substantia compacta verwendet. Diese Bezeichnung soll auch im folgenden Text Anwendung finden. Etwa 80% des gesamten knöchernen Skeletts ist aus Kortikalis aufgebaut und nur 20% entfallen auf die Spongiosa (Hecht, 2012; Schünke, 2014).

Das Grundbauelement ist das Osteon, ein System aus Knochenlamellen, die konzentrisch um einen Zentralkanal geschachtelt sind. Dieser sogenannte Havers-Kanal ist mit lockerem Bindegewebe, ernährenden Blutgefäßen und vegetativen Nerven gefüllt. Die ca 5-10 µm dicken Lamellen bestehen aus kollagenen Fasern und mineralisierter Knochenmatrix. Die Lamellen verlaufen schraubenförmig, wobei die Drehrichtung von einer zur anderen Lamelle wechselt. Die Lamellen stehen durch Querverbindungen in Kontakt. Dieses Prinzip stabilisiert den Knochen bei Zug- und Druckbelastungen (Paulsen und Lüllmann-Rauch, 2012; König und Liebich, 2014). Der Steigungswinkel der Lamellen ist von der funktionellen Beanspruchung abhängig. Osteone mit flach verlaufenden Kollagenfasern sind druckfester, solche mit steilerem Verlauf eher zugfest (Schünke, 2014). Zwischen den einzelnen Lamellen liegen die Osteozyten, die über Zytoplasmafortsätze in Verbindung stehen. Dadurch wird der Nährstoff- und Sauerstofftransport aus dem zentralen Blutgefäß für alle Lamellen gewährleistet. Ein Osteon besteht aus circa 5-20 Lamellen, wobei die äußerste Lamelle durch eine stärker mineralisierte Kittlinie von benachbarten Strukturen abgegrenzt ist. Die Lücken zwischen den Osteonen sind mit Resten alter Osteone, sogenannter Schaltlamellen, gefüllt. Die Kortikalis wird von anderen Strukturen durch eine äußere bzw. innere Generallamelle abgegrenzt (Paulsen und Lüllmann-Rauch, 2012; Schünke, 2014). Mäuse und Ratten unterscheiden sich von größeren Säugetieren und dem Menschen durch eine primitivere Knochenstruktur. Anstelle von Havers-Kanälen haben sie Resorptionskavernen mit Hilfe derer sie Remodeling betreiben. (Histing et al., 2011) Mit zunehmender Körpergröße und steigender Lebenserwartung der Tierart nimmt die Komplexität der Knochenstruktur zu (Hörner et al., 1997).

Der Kortikalis steht die Spongiosa im Innern gegenüber, die nach Art eines Schwammes organisiert ist. Sie besteht aus einem feinen Gitterwerk von Knochenbälkchen (Trabekeln), die entsprechend den

Spannungslinien ausgerichtet sind. Demzufolge sind die Trabekel so organisiert, dass sie nur bei Druck oder Zug beansprucht werden. Man unterscheidet Druck- und Zugtrabekel, die sich auch an veränderte Belastungen gut anpassen können. Die Bälkchen sind nur etwa 200-300 µm dick und, wie auch die Kortikalis, lamellenartig aufgebaut. Im Gegensatz zur Kortikalis sind die Lamellen der Trabekel allerdings plattenartig aufeinander liegend und gefäßlos (Paulsen und Lüllmann-Rauch, 2012). Der Raum zwischen den Trabekeln ist mit Knochenmark gefüllt. Die Osteozyten werden aus den Gefäßen des Knochenmarks versorgt. Ca. 60% der gesamten Knochenoberfläche entfallen auf die Spongiosa. Sie befindet sich vor allem in der Metaphyse, da sie besonders geeignet ist, die dort herrschenden Druckbelastungen abzufangen (Schünke, 2014; König und Liebich, 2014).

2.4. KNOCHENHAUT

Alle Knochen werden an ihrer inneren und äußeren Oberfläche von einer bindegewebigen Hüllschicht überzogen. An der Außenfläche befindet sich Periost, das an den Metaphysen in die Gelenkkapsel übergeht. Nur der Gelenkknorpel und die Sehnenansätze bleiben frei. An der Innenfläche heißt die Knochenhaut Endost, welches die Trabekel der Spongiosa und die Innenfläche der Kortikalis überzieht und so die Grenzschicht zum Knochenmark darstellt.

Das Periost ist für die Blutversorgung, das Wachstum, die Regeneration, die Bruchheilung sowie die muskuläre Kraftübertragung von großer Bedeutung (König und Liebich, 2014). Man unterscheidet zwei Schichten: eine äußere Faserschicht und eine innere zellreiche Schicht (Liebich, 2010).

Die äußere Schicht (Stratum fibrosum) besteht aus einem Geflecht zugfester Fasern. Von dieser Schicht ziehen Kollagenfaserbündel in die äußere Schicht der Kortikalis. Dadurch wird das Periost fest mit dem Knochen verbunden. Die Endabschnitte von Muskeln, Sehnen und Bändern ziehen in das Stratum fibrosum, fächern sich dort auf und gehen so eine feste Verbindung mit dem Knochen ein (König und Liebich, 2014). Diese Faserschicht kann noch einmal unterteilt werden (Dwek, 2010). Der oberflächliche, unelastische Teil ist relativ zellarm und mit wenigen elastischen Fasern durchmischt. Er enthält viele Fibroblasten und Kollagenfasern. Er enthält nur etwa halb so viele Blutgefäße wie der tiefe Anteil. Der tiefere Anteil der äußeren Schicht des Periosts enthält mehr elastische Fasern. Er ist die am besten durchblutete Schicht des Periost und leistet einen wichtigen Beitrag zur Blutversorgung des Knochens und auch der Skelettmuskulatur. Er enthält zudem ein reiches Netz an Nervenfasern. Die meisten dieser Nervenfasern enden in einer tieferen Schicht des Periosts. Nur wenige ziehen durch die Kortikalis in den Knochen (Squier et al., 1990; Dwek, 2010; Barckman et al., 2013).

Das innere Stratum osteogenicum, die knochenbildende Schicht, liegt dem Knochengewebe unmittelbar auf. Es enthält Osteoblasten, Osteoprogenitorzellen (Vorläuferzellen), die sich zu knochenbildenden Osteoblasten differenzieren können, sowie Fibroblasten, die in wenig kollagene Matrix gebettet sind. Diese innere Schicht ist sehr wichtig für das Knochenwachstum des Fetus. Der wachsende Knochen ist reich an Osteoblasten, deren Anzahl im adulten Knochen stark abnimmt. Ebenso sinkt mit dem Alter die Menge an Blutgefäßen und die Dicke des Stratum osteogenicum. Osteoblasten können sich jedoch jederzeit wieder aus Vorläuferzellen differenzieren. Dies gilt für physiologische Knochenumbauvorgänge genauso wie für die Knochenheilung nach einer Fraktur (Squier et al., 1990; Dwek, 2010; König und Liebich, 2014).

Das Endost kleidet die Oberflächen innerhalb des Knochens aus. Es überzieht die Innenseite der Kortikalis, die Trabekel der Spongiosa sowie die Wände der Havers-Kanäle und grenzt an das Kapillarnetz des Knochenmarks (Dwek, 2010; Toben et al., 2011). Es besteht aus einer dünnen Schicht von nicht-mineralisierten Kollagenfibrillen und einer Lage von mesenchymalen Stammzellen, Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten und Osteoklasten (Paulsen und Lüllmann-Rauch, 2012).

Es deutet einiges darauf hin, dass das Periost, das Knochenmark und das Endost die wichtigsten Entstehungsorte von skeletalen Stammzellen für die Knochenheilung sind. Ein starkes mechanisches Zerreißen des Periosts oder des Knochenmarks (zum Beispiel bei einer Fraktur durch sehr hohe Krafteinwirkung) führt zu einer verzögerten Knochenheilung. Endost und Knochenmark bilden hauptsächlich Osteoblasten, wohingegen das Periost auch Chondrozyten bildet (Colnot, 2009).

2.5. BLUTVERSORGUNG

Der Knochen ist ein sehr gut durchblutetes Gewebe. Dies ist Ausdruck für die hohe Stoffwechsellistung des Gewebes. Eine Unterbrechung der Blutversorgung kann zum Absterben von Gewebe und zu Knochennekrosen führen. Im gesamten Knochen trifft man Gefäße an. Große Arterien (Aa. nutriciae) treten in der Mitte der Diaphyse durch Knochenöffnungen (Foramina nutritia) in der Kortikalis bis in den Knochenmarksbereich ein, wo sie sich aufteilen, um den Rest der Diaphyse zu versorgen. Die kleinen Gefäße im Bereich des Endosts versorgen die Kortikalis mit Blut. Sie sind über Verbindungskanäle mit den Havers-Gefäßen, die in den Havers-Kanälen der Osteone liegen, verbunden. Diese Verbindungen werden Volkmannsche Kanäle genannt. Sie verbinden auch die Havers-Kanäle untereinander. Von außen ziehen periostale Gefäße an die Kortikalis, um sich auch mit den Volkmannschen Kanälen zu verbinden. Die Aa. nutriciae verlaufen bis in den Bereich der Metaphysen und bilden unter dem Gelenkknorpel schleifenförmige Endarterien (Pazzaglia et al., 2008; König und Liebich, 2014). Bei der Geburt ist die Diaphyse sehr gut vaskularisiert, mit dem Älterwerden und dem Abschluß des Wachstums nimmt die Durchblutung der Diaphyse ab (Calmar, 2002). Die Epiphysen werden durch epiphysale Gefäße versorgt, die durch die Kortikalis hindurch treten und sich dann zum Gelenkknorpel und zur Epiphysenfuge hin aufteilen (Adler, 2005).

Der Lamellenknochen der Spongiosa ist im Gegensatz zu der Kortikalis gefäßlos und wird nicht über die Volkmannschen Gefäße versorgt. Durch die geringe Dicke der Trabekel findet die Ernährung über Diffusion vom angrenzenden Markraum statt (Lüllmann-Rauch, 2012; Schünke, 2014).

2.6. KOMPONENTEN DES KNOCHENGEWEBES

Knochengewebe ist aus Zellen und Matrix aufgebaut. Im Gegensatz zu anderen Formen des Bindegewebes enthält Knochen einen hohen Anteil an Mineralien.

2.6.1. Osteoblasten

Aktive Osteoblasten sind knochenproduzierende Zellen, die kettenförmig an der Knochenoberfläche aufgereiht sind (Beck, 2003). Osteoblasten synthetisieren die organischen Komponenten der Knochenmatrix (Kollagen Typ I, Glykoproteine, Proteoglykane) und das Enzym alkalische Phosphatase, das anorganisches Phosphat produziert, welches wichtig für die Kalzifizierung des Knochens ist (Junqueira et al., 2004; Kim et al., 2014). Des Weiteren produzieren Osteoblasten Osteokalzin, Osteopontin und Osteonektin, die in die Regulation der Matrixmineralisation involviert sind, RANKL (Receptor Activator of nuclear Factor- κ B Ligand), der für die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten notwendig ist, und den Rezeptor für PTH (Parathormon) (Eriksen, 2010; Erben, 2015).

Die zahlreichen sekretionsaktiven Organellen (endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Felder, Lysosomen) spiegeln die hohe Syntheseaktivität der Osteoblasten wider. Osteoblasten bilden täglich einen etwa 1 μ m breiten Osteoidsaum. Osteoid (organische Knochenmatrix) besteht zu 90 bis 95% aus Kollagen Typ I und ist anfangs noch unverkalkt. 3-4 Tage nach der Bildung des Osteoids sind etwa 70% davon verkalkt. Die Mineralisation des Osteoids, d.h. die Einlagerung von Hydroxylapatitkristallen (die hauptsächlich aus Kalzium und Phosphor bestehen) zwischen den Kollagenfibrillen, verleiht dem Knochen seine Stärke und Festigkeit. Durch Restmineralisation wird dieser Vorgang in sechs Wochen bis zu mehreren Monaten abgeschlossen (Kalfas, 2001). Die Tätigkeit der Osteoblasten wird durch kalzitrope Hormone (Parathormon, Kalzitronin), Steroidhormone und durch eine Vielzahl anderer Faktoren (u.a. Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6 (IL-6), Bone-derived growth factor (BDGF), Bone morphogenetic Proteins (BMPs)) gesteuert (Jerosch et al., 2002; Eriksen, 2010; Liebich, 2010).

Bisher ist nur wenig über das weitere Schicksal der Osteoblasten bekannt. Sie können zu Osteozyten werden, die in der Knochenmatrix eingemauert sind, zu inaktiven Osteoblasten oder zu Knochendeckzellen an der Oberfläche. Ein Großteil der Osteoblasten scheint allerdings durch Apoptose zu sterben. Zu welchem Prozentsatz die Osteoblasten den unterschiedlichen Zellschicksalen folgen, wann und warum sie das tun, ist bisher noch nicht ausreichend erforscht (Jerosch et al., 2002; Franz-Ondendaal et al., 2006).

Knochendeckzellen ("Bone lining cells") werden auch als inaktive Osteoblasten bezeichnet. Es handelt sich um flache, endothelartige Zellen, die ruhende Oberflächen bedecken. Bisher ist nicht viel,

einschließlich ihrer Funktion, über diese Zellen bekannt. Sie haben ein osteogenes Potenzial und können wieder in den Präosteoblasten-Pool zurückkehren. Die Knochendeckzellen stehen über Zellausläufer mit den Nachbarzellen und peripheren Osteozyten in direktem Kontakt. Auch Osteozyten und Osteoblasten kommunizieren untereinander, dadurch wird eine direkte Kommunikation zwischen den Zellen ermöglicht. Diese ist vor allem für die Calciumhomöostase und die Adaptation an mechanische Stimuli von großer Bedeutung (Liebich, 2010; Erben, 2015). Die untereinander kommunizierenden Osteoblasten und die Bildung des Osteoids sind in Abb. 1 dargestellt.

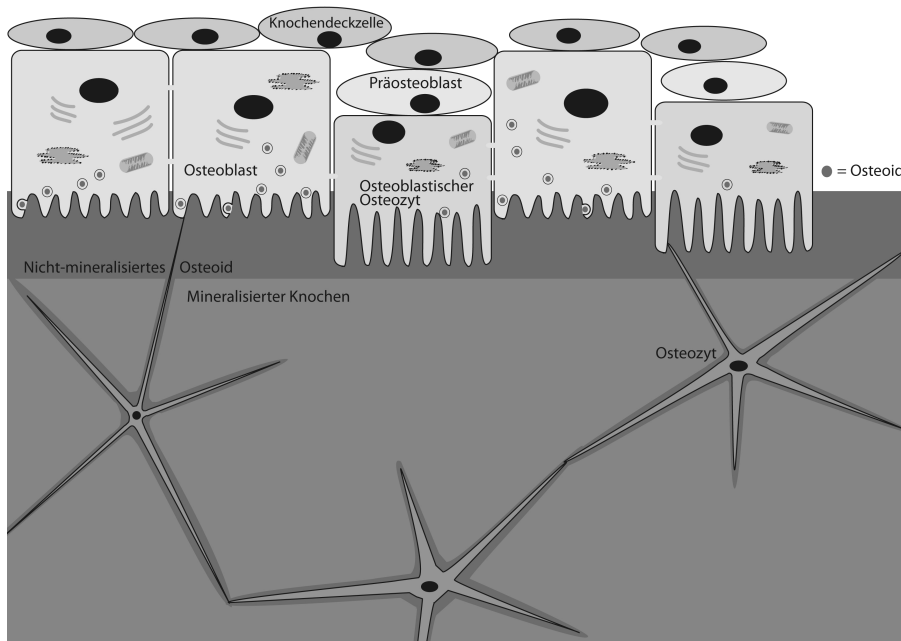


Abbildung 1. Schematische Darstellung von Osteoblasten und Osteozyten: Osteoblasten bilden Osteoid, welches mineralisiert und dann die Osteozyten umgibt. Um die Osteozyten herum bleibt ein dünner Saum nicht-mineralisierter Matrix erhalten. Die Osteoblasten stehen untereinander und mit den Osteozyten durch Gap junctions in Verbindung, um eine direkte Verbindung zwischen den Zellen zu ermöglichen. (Nach: Franz-Odendaal et al., 2006 und Dallas et al., 2010)

2.6.2. Osteozyten

Etwa 10-20% der Osteoblasten entwickeln sich zu reifen Knochenzellen (Osteozyten). Osteozyten machen mit ca. 95% den Großteil der Knochenzellen aus, es sind ca. zehnmal mehr Osteozyten als Osteoblasten vorhanden (Franz-Odendaal et al., 2006). Sie haben ein dendritisches Aussehen. Während der Entwicklung der Osteozyten erfolgt eine Größenabnahme der Zelle um bis zu 70% und eine Reduktion auf nur wenige stoffwechselaktive Organellen (Liebich, 2010). Zahlreiche Zellfortsätze verbinden die Osteozyten über gap junctions untereinander und bilden ein Osteozyten-Synzytium (Jerosch et al., 2002). Ähnlich wie das dendritische Netzwerk des Nervensystems erlauben diese Verbindungen eine schnelle Kommunikation der Osteozyten untereinander und mit den Zellen der Knochenoberfläche. Die Zellen sind vollständig in verkalkte Knochengrundsubstanz (Ossein) eingebettet und liegen abgeflacht zwischen den lamellären Knochenschichten in schmalen Lakunen. Die Zellfortsätze verlaufen in Knochenkanälchen (Canaliculi) und dienen dem interzellulären Stofftransport von Ionen, niedermolekularen Substanzen, Nähr- und Abfallstoffen. Über die Zellfortsätze stehen die Osteozyten auch mit Osteoblasten in Verbindung und stimulieren diese, sich zu differenzieren. Durch ihre Lage im Knochen und ihr komplexes dendritisches Netzwerk dienen die Osteozyten als sensorisches Netzwerk des Knochens, das auf externe Einflüsse reagieren kann (Bonewald, 2011; Schaffler und Kennedy, 2012). Osteozyten scheinen auch eine Schlüsselrolle in der Regulation des Phosphatmetabolismus zu haben (Lippuner, 2012), und sie nehmen an der Feinregulation der Blut-Kalzium-Homöostase teil (Kalfas, 2001; Liebich, 2010). Zudem spielen sie eine wichtige Rolle in der Regulation der Knochenbildung. Sie sind die Hauptquelle für den

Wnt-Signalweg-Hemmer Sklerostin, einen potenten Inhibitor der Osteoblastenaktivität (van Bezooijen et al., 2005b; Jawad et al., 2013).

Aufgrund der reduzierten Nährstoffdiffusion haben vollständig eingebettete Osteozyten eine stark reduzierte metabolische Aktivität, tragen aber entscheidend zur Erhaltung des Knochens bei. Degenerieren Osteozyten, geht auch die Matrix zugrunde (Liebich, 2010; Lippuner, 2012). Eine wichtige Rolle spielen Osteozyten in der Mechanotransduktion, d.h. in der Umwandlung von mechanischen Reizen in chemische Aktivität. Über ein Netzwerk an Zellfortsätzen stehen die Osteozyten mit den Nachbarzellen in Kontakt, so kann der Knochen auf mechanische Krafteinwirkung reagieren. Pierkarski und Munro vermuteten, dass die durch mechanische Belastungen hervorgerufenen schwachen Deformationen des Knochens Flüssigkeitsbewegungen in dem Lakunen-Caniculi-Hohlraum verursachen. Diese Flüssigkeitsströmungen dienen als Transportmechanismus zwischen den Osteozyten und den Blutgefäßen (Piekarski und Munro, 1977) sowie auch zur Mechanotransduktion (Fritton und Weinbaum, 2009; Price et al., 2011). Es ist noch nicht genau bekannt, wie Osteozyten die mechanische Stimulation erkennen, aber es wird angenommen, dass die Flüssigkeitsströmungen Schubspannungen auf die Zellkörper ausüben (Schaffler und Kennedy, 2012). Nur ein Teil der Moleküle ist bekannt, die von Osteozyten produziert werden, um die Knochenbildung zu regulieren. Mechanisch aktivierte Osteozyten produzieren u.a. BMPs, Wnts, Prostaglandin E₂ (PGE₂) und NO, welche die Aktivität und Differenzierung von Osteoblasten und Osteoklasten beeinflussen können (Robling et al., 2008; Klein-Nulend et al., 2012).

2.6.3. Osteoklasten

Osteoklasten bauen Knochen ab. Im Zusammenspiel mit Osteoblasten sind sie wichtig für die Entwicklung und das Remodeling des Knochens sowie für die Adaptation an mechanische Belastung (Liebich, 2010). Sie sind vielkernige, bewegliche Riesenzellen, die vom hämatopoetischen Zellsystem abstammen und durch Differenzierung und Fusion von Monozyten/Makrophagen-Vorläuferzellen entstehen (Szewczyk et al., 2013). Sie können bis zu 100 Zellkerne haben. Es sind stoffwechselaktive Zellen, die reich an Mitochondrien und Vakuolen sind. Aktive Osteoklasten bilden proteolytische Enzyme, die die Knochengrundsubstanz zersetzen (Liebich, 2010).

Osteoklasten sind meistens an der Knochenoberfläche zu finden. Die aktive Zelle ist polarisiert, d.h. es sind mehrere Zonen zu unterscheiden, die in Abb. 2 dargestellt sind. An der der Knochenoberfläche zugewandten Seite liegt der Bürstensaum. Ihre spezifischen bürstensaumartigen Resorptionsstrukturen der Cytoplasmamembran bewirken eine starke Oberflächenvergrößerung. An diesen Mikrovilli-ähnlichen Zellausstülpungen findet der Knochenabbau statt. Der Bürstensaum ist reich an Adenosintriphosphatase (ATPase), die für den energieverbrauchenden Schritt der Säureproduktion für die Knochenauflösung erforderlich ist (Blair und Athanasou, 2004). Begrenzt wird der Bürstensaum durch die Haftzone, an der der Osteoklast fest an der Knochenmatrix befestigt ist. Dadurch entsteht ein begrenzter Raum zwischen Osteoklast und Knochenmatrix, in dem die Knochenzerstörung stattfindet, die Resorptionslakune. Die der Knochenoberfläche abgewandte Seite, die sogenannte "clear zone", dient der Adhäsion der Zelle an die extrazelluläre Matrix (Liebich, 2010; Erben, 2015).

Knochenresorption findet in der Resorptionslakune statt. Ausdifferenzierte Osteoklasten produzieren über die Carboanhydrase II Wasserstoffionen, die über Protonenpumpen in dem Bürstensaum in den Resorptionsspalt gelangen und ihn ansäuern. Im weiteren Verlauf findet in der Resorptionslakune über den abgesenkten pH-Wert eine Lösung der fest gepackten Hydroxylapatitkristalle statt und somit eine Demineralisierung der Knochenmatrix (Väänänen et al., 2000; Itzstein et al., 2011). Im nächsten Schritt werden von den Osteoklasten Proteinasen gebildet, u.a. Kathepsin K und Matrix Metalloproteinase-9, welche die organische Matrix des Knochens in dem niedrigen pH-Wert zersetzen. Die Rolle des Kathepsin K wird an Patienten verdeutlicht, die an einer Mutation des Gens leiden, das für Kathepsin K codiert. Sie erkranken an Pyknodysostose, einer seltenen genetischen Erkrankung, bei der es aufgrund einer Unterfunktion von Kathepsin K zu einer Anhäufung von Knochensubstanz kommt. Die Patienten zeigen, neben einer generell erhöhten Knochendichte, v.a. Kleinwuchs und Veränderungen im Gesichtsschädel. Der bekannteste Betroffene ist der Maler Toulouse Lautrec (Väänänen et al., 2000; Kamak et al., 2012).

Nachdem die Knochenmatrix demineralisiert und zersetzt ist, werden die abgebauten Bestandteile durch den Osteoklasten über Transzytose aus der Resorptionslakune ausgeschleust auf der gegenüberliegenden Seite des Osteoklasten in den Extrazellulärraum ausgeschüttet. Der Osteoklast wandert anschließend weiter und heftet an anderer Stelle am Knochen wieder an. Die Höhlen, die durch den

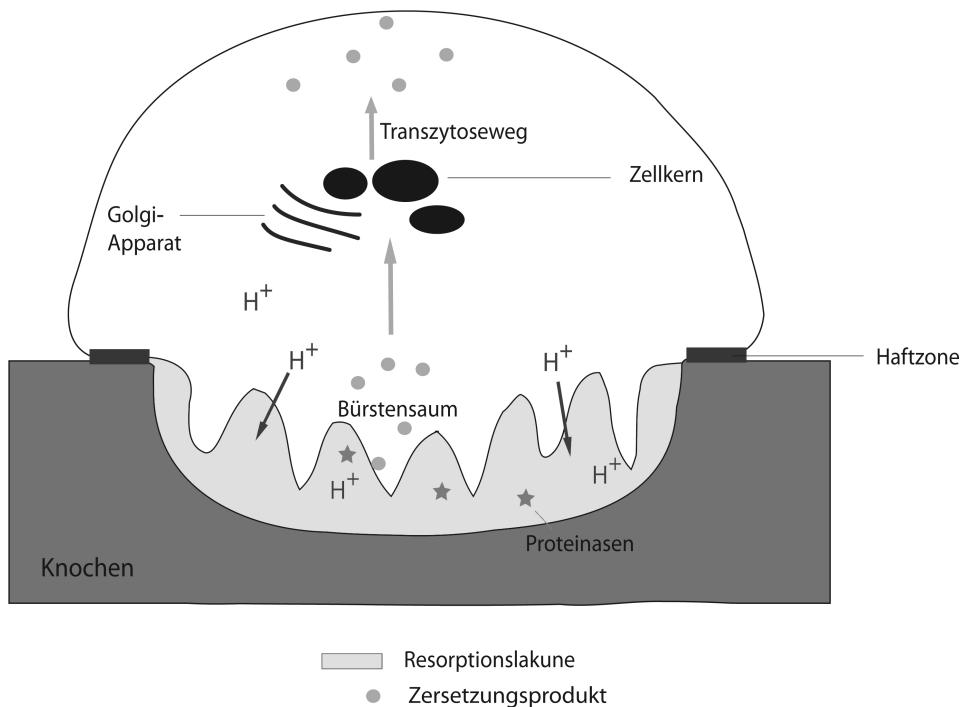


Abbildung 2. Schematische Darstellung eines aktiven, knochen-resorbierenden Osteoklasten: Der aktive Osteoklast ist im Bereich der Haftzone mit der Knochenmatrix verbunden und bildet zur Knochenresorption den Bürstensaum. Wasserstoffionen werden in die Resorptionslakune transportiert, um die Hydroxylapatitkristalle im Knochen zu lösen. Proteinasen zersetzen die organische Matrix, und die Zersetzungsprodukte werden über Transzytose in Vesikeln von dem Bürstensaum durch die Zellen in den Extrazellulärraum transportiert. (Nach: Väänänen, 2000 und Lippuner, 2012)

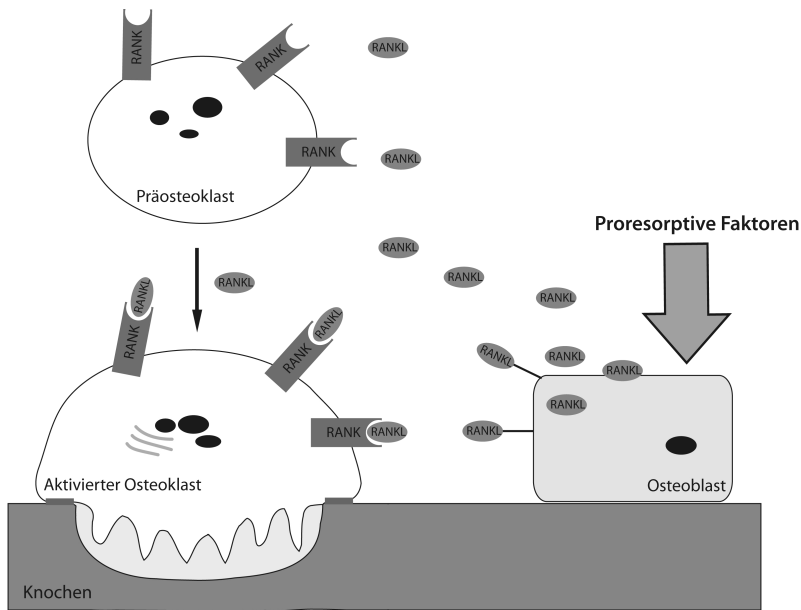
Knochenabbau entstehen, werden Howship-Lakunen genannt (Szewczyk et al., 2013; Tanaka et al., 2013).

Die Rekrutierung, Differenzierung und Fusion von Präosteoklasten und die Aktivierung von reifen Osteoklasten werden vor allem durch das RANKL-System gesteuert (Silva und Branco, 2010).

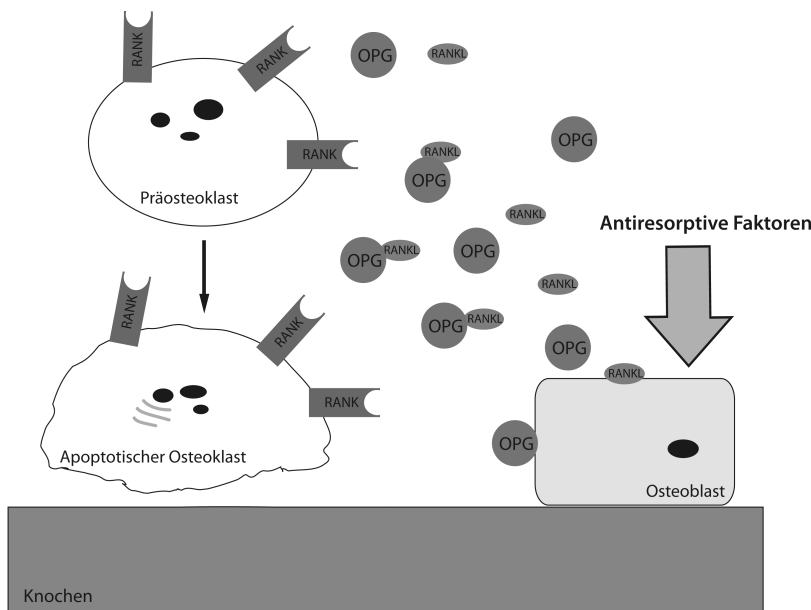
2.6.4. Zusammenspiel Osteoblasten - Osteoklasten

Osteoblasten und Osteoklasten beeinflussen sich gegenseitig. Der stetige Auf- und Abbau des Knochens sichert die ständige Anpassung des Skelettes an die mechanischen Bedürfnisse. Schon während der Osteoklastogenese wird der RANKL, der von Osteoblasten gebildet wird, benötigt. Abb. 3 (a) zeigt wie RANKL an den Receptor Activator of Nuclear factor κ B (RANK) bindet, der auf der Oberfläche der Osteoklastenvorläuferzellen sitzt. Es kommt zur Aktivierung von RANK, was die Proliferation, Reifung und Aktivierung des Osteoklasten zur Folge hat (Lippuner, 2012). Bei Abwesenheit von RANKL oder RANK werden keine Osteoklasten gebildet (Erben, 2015). RANKL-knockout-Mäuse haben eine hohe Knochenmasse und so gut wie keine Osteoklasten (Geusens, 2009).

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Regulierung der Osteoklasten- und Osteoblastenaktivität ist das Osteoprotegerin (OPG), ein sogenannter löslicher Decoy-Rezeptor (Täuschungsrezeptor) der die Osteoklastenreifung hemmt. Es wird in vielen Geweben gebildet, neben Lymphknoten, Lungengewebe und Muskulatur auch in den Osteoblasten. Er ist der endogene Hauptregulator des RANKL-RANK-Pfades (McClung et al., 2007) und agiert als ein natürlicher Antagonist von RANKL, indem er an RANKL bindet und somit die Bindung von RANKL an RANK inhibiert. Dadurch wird die Reifung der Osteoklasten, die Osteoklastenaktivität und folglich der Knochenabbau gehemmt (Eriksen, 2010; Lippuner, 2012). (Siehe Abb. 3 (b)) In OPG-knockout-Mäusen wurde eine geringe Knochenmineraldichte und eine erhöhte Anzahl an Osteoklasten beobachtet. Diese Tiere entwickelten schneller Spontanfrakturen (Bucay et al., 1998). Die OPG-Expression ist durch die meisten Faktoren reguliert, die auch die RANKL-Expression der Osteoblasten induzieren. Im Allgemeinen ist die Heraufregulierung von RANKL mit einer Herabregulierung von OPG assoziiert (Boyce und Xing, 2007).



(a) Proresorptive Faktoren wie Kortikosteroide führen zu einer gesteigerten Bildung von RANKL in den Osteoblasten. Freies und Membranständiges RANKL bindet an den spezifischen und membranständigen RANK-Rezeptor, was zu einer Aktivierung der Osteoklasten und dem Abbau der Knochenoberfläche führt.



(b) Antiresorptive Faktoren wie Östrogen führen zu einer verminderten Expression von RANKL und einer gesteigerten OPG-Bildung. OPG bindet an RANKL und verhindert somit die Interaktion von RANKL und RANK. Dadurch wird die Osteoklastenaktivierung verhindert und die Knochenresorption gehemmt.

Abbildung 3. Regulatorische Mechanismen im Knochenremodeling: Die Rolle von RANK, RANKL und OPG in der Osteoklastenaktivierung

Neben einer Reihe von Zytokinen, Hormonen und Wachstumsfaktoren wird OPG auch durch Wnt/ β -Katenin reguliert, der gleiche Signalweg, der die Knochenbildung durch Osteoblasten regelt (Boyce und Xing, 2007). Der Wnt-Signalweg und sein Signalmolekül β -Katenin scheinen zu einer Steigerung der OPG-Expression zu führen. Osteoblasten mit einem Mangel an β -Katenin weisen eine gesteigerte Expression von RANKL und eine herabgesetzte OPG-Bildung auf (Rawadi und Roman-Roman, 2005; Hartmann, 2006). Eine Überexpression von β -Katenin hingegen führt zu einer gesteigerten OPG-Bildung und

einer hohen Knochenmasse. Diese Beobachtungen zeigen, dass der Wnt-Signalweg die Fähigkeit besitzt, die Osteoklastendifferenzierung zu hemmen (Glass et al., 2005; Geusens, 2009).

Östrogen beeinflusst ebenfalls das RANKL/OPG-Verhältnis und reguliert dadurch die Knochenresorption. Es steigert die Bildung von OPG und senkt die RANKL-Expimierung und führt dadurch zu einer gesteigerten Knochenbildung. Postmenopausaler Knochenverlust ist unter anderem auf das Östrogendefizit und dem damit erhöhten Knochenabbau zurückzuführen (Eriksen, 2010).

Die OPG-Expression wird unter anderem von Glukokortikoiden und PTH gehemmt (Silva und Branco, 2010). PTH, als tägliche Injektionen gegeben, reduziert RANKL und steigert OPG Level. Allerdings wird das Gegenteil bei chronisch erhöhten PTH Level im Körper wie bei primärem Hyperparathyreoidismus beobachtet. Es kommt zu einem erhöhten RANKL und reduzierten OPG Level (Eriksen, 2010; Silva und Branco, 2010).

Durch die Osteoklastenaktivität werden Faktoren aus dem Knochen freigesetzt, welche Osteoblasten zu der Resorptionsfläche hinlocken, um den Defekt wieder aufzufüllen. Die Osteoblastendifferenzierung und -funktion wird über den Wnt-Signalweg reguliert (Das und Crockett, 2013).

2.6.5. *Knochenmatrix*

Die Trockenmasse von Knochen besteht zu zwei Dritteln aus Mineralien und zu einem Drittel aus organischer Matrix. Die organische Matrix setzt sich zu 90% aus Kollagen zusammen, wobei es sich fast ausschließlich um Kollagen Typ I handelt. Es dient als Kristallisationskern bei der Mineralisation des Knochens. Der Rest der organischen Matrix besteht vor allem aus Syntheseprodukten der Osteoblasten, u.a. Osteocalcin, Osteonectin, Proteoglykane, Wachstumsfaktoren und andere nicht-kollagene Proteine.

Der anorganische Anteil der Matrix besteht vor allem aus Calcium und Phosphat, die in Form kristalliner Verbindungen als Hydroxylapatitkristalle an die Kollagenfasern angelagert werden (Liebich, 2010; Erben, 2015).

2.7. FRAKTURHEILUNG

Frakturheilung ist ein sehr komplexer Prozess, der zu einer vollständigen Wiederherstellung der normalen Knochenarchitektur und ihrer physikalischen und mechanischen Eigenschaften führt (Kalfas, 2001). Damit nimmt Knochengewebe eine Sonderstellung im Körper ein, da es als eines der wenigen Gewebe in der Lage ist, ohne Narbenbildung zu heilen. Man unterscheidet primäre (direkte) von sekundärer (indirekter) Frakturheilung. Sekundäre Frakturheilung tritt auf, wenn keine steife Fixation stattfindet oder ein Spalt von über 1mm zwischen den Knochenenden liegt und geht mit Kallusbildung einher. Dieser Vorgang ist häufiger, aber etwas komplizierter als die primäre Heilung und lässt sich in drei Phasen unterteilen (Liebermann und Friedlaender, 2005).

2.7.1. *Direkte Frakturheilung*

Die direkte, primäre Frakturheilung kommt kaum spontan vor und tritt nur bei sehr hoher Frakturstabilität und bei einem Frakturspalt von unter 1mm auf. Dieser Zustand ist nahezu nur gegeben bei exakter Reposition der Frakturrenden und einer stabilen Osteosynthese. Es darf keine Bewegung der Fragmentenden gegeneinander mehr möglich sein. Es werden die physiologischen Umbauprozesse des Knochens mobilisiert. Über direktes Remodeling von lamellärem Knochen, den Havers-Kanälen und Blutgefäßen wird neuer Knochen gebildet. Man unterscheidet die Kontaktheilung von der Spaltheilung. Beide Vorgänge führen direkt zu anatomisch korrekten und biomechanisch kompetenten lamellären Knochenstrukturen (Scharf et al., 2011; Marsell und Einhorn, 2011).

Sind diese Voraussetzungen erfüllt und liegt zwischen den Frakturrenden ein Spalt von unter 0,01mm vor, so kommt es zur Kontaktheilung (Marsell und Einhorn, 2011). Dabei werden neue Osteone gebildet, die ähnlich wie beim Remodeling die beiden Bruchteile verbinden und über eine Verzapfung stabilisieren (Probst, 2005). Sie wachsen parallel zur Längsachse des Knochens und können, wie in Abb. 4 dargestellt, direkt in das gegenüberliegende Frakturende einwachsen. Im einzelnen erfolgte dies mit Hilfe von Osteoklasten, die durch Resorption von Knochen an den Frakturrenden Tunnel erzeugen ("cutting cones"), die den Frakturspalt kreuzen. In diese Kanäle können Blutgefäße einwachsen und dadurch Endothelzellen und Vorläuferzellen der Osteoblasten in den Frakturspalt gelangen. Anschließend werden Osteoblasten

aktiviert, die neue Osteone erzeugen und den Frakturspalt überbrücken (Liebermann und Friedlaender, 2005; Marsell und Einhorn, 2011; Claes et al., 2012).

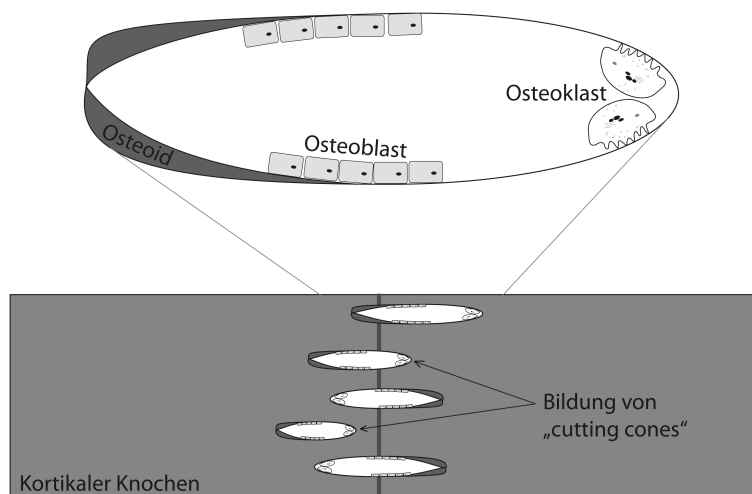


Abbildung 4. Schema primärer Frakturheilung mittels Kontakttheilung: Am Ende der Osteone, die dem Frakturspalt am nächsten sind, bilden sich "cutting cones". Die Spitze der "cutting cones" besteht aus Osteoklasten, welche quer über den Frakturspalt longitudinale Hohlräume bilden. Diese Hohlräume werden anschließend von den Osteoblasten, die im hinteren Teil der "cutting cones" liegen, mit Knochen gefüllt.

Liegt ein Frakturspalt von unter 1mm vor, spricht man von Spaltheilung. Hierbei wird in den ersten Wochen der Spalt mit Geflechtknochen ausgefüllt, der quer zum lamellären Knochen ausgerichtet ist (Chao et al., 1989; Liebermann und Friedlaender, 2005). Dieser Geflechtknochen dient nur als Platzhalter und führt nicht zu einer Überbrückung der Frakturenden (Chao et al., 1989). Im zweiten Schritt wird der Spalt vom Periost und vom Knochenmark her vaskularisiert, bevor er mit Hilfe von Osteonen in der ursprünglichen Richtung überbrückt wird (Probst, 2005; Claes et al., 2012). Der Geflechtknochen dient dabei als eine Art Gerüst, an dem die Osteone entlang wachsen können.

Primäre Knochenheilung vollzieht sich ausgesprochen langsam und nur mit Hilfe einer starren Osteosynthese über einen längeren Zeitraum. Durch diese bewegungslose Fixation wird die Knorpel- und Kallusbildung unterdrückt. Da die meisten Frakturen im Prozess ihrer Stabilisierung einem gewissen Grad an Bewegung ausgesetzt sind, findet eine primäre Knochenheilung selten statt (Reitzik und Schoorl, 1983; Scharf et al., 2011). Häufig zeigt sie keine wesentlichen Vorteile gegenüber der sekundären Frakturheilung (Schenk und Willenegger, 1964).

2.7.2. Indirekte Frakturheilung

Die indirekte oder sekundäre Frakturheilung ist die häufigste Art der Knochenheilung und entspricht der natürlichen Form der Bruchheilung. Sie findet bei Frakturen ohne Stabilisation und bei bestimmten Bruchbehandlungen mit fragmentärer Beweglichkeit statt, wie Marknagelung, externe Fixation oder interne Fixation von komplizierten Splitterbrüchen (Marsell und Einhorn, 2011). Bei der sekundären Frakturheilung findet eine Kombination aus intramembranöser und enchondraler Ossifikation statt, sie bezieht das Periost und das umliegende Weichteilgewebe in den Heilungsverlauf mit ein (Einhorn, 1998).

Indirekte Knochenheilung ist durch die Bildung eines Kallus gekennzeichnet, dessen Aufgabe es ist, die Fraktur vorläufig zu stabilisieren. Die fragmentäre Beweglichkeit und die Kallusgröße stehen im Zusammenhang; je instabiler die Fraktur ist, desto mehr Kallus wird gebildet (Probst et al., 1999). Im weiteren Verlauf der Knochenheilung findet eine Kalzifizierung und Stabilisierung des Kallus statt, der anschließend während des Remodeling durch lamellären Knochen ersetzt wird (Probst, 2005).

Die sekundäre Frakturheilung kann in drei Phasen unterteilt werden, die jedoch nicht klar voneinander abgegrenzt werden können. Die Dauer der einzelnen Phasen ist neben der Spezies auch abhängig von der Lokalisation und Schwere der Fraktur, weiteren Verletzungen und dem Alter des Patienten (Hoppenfeld und Murthy, 2000).

Durch die Kraft, die zu einer Fraktur führt, wird neben dem Bruch des Knochengewebes auch eine Zerreißung des Weichteilgewebes und der Blutgefäße hervorgerufen. Dieses Ereignis leitet die Entzündungsphase ein und es kommt zur Bildung eines Frakturhmatoms. Das Hämatom besteht neben Zellen des peripheren Blutes und Blut aus dem Knochenmark auch aus Knochenmarkszellen (Marsell und Einhorn, 2011). Als Folge des vaskulären Traumas wird die Frakturregion hypoxisch. Die Osteozyten in diesem Bereich und das umliegende beschädigte Weichteilgewebe werden nicht mehr ausreichend mit Nährstoffen versorgt und nekrotisieren (Geris et al., 2008). Dies kann histologisch an leeren Osteozytenlakunen nachgewiesen werden, die sich von der Fraktur unterschiedlich weit ausdehnen (McKibbin, 1978). Nach einer anfänglichen Vasokonstriktion im Rahmen der Blutgerinnung folgt die Phase der akuten Entzündung, die wichtig für den Heilungsverlauf ist. Durch die Aktivierung des Komplementsystems wird die Gefäßpermeabilität erhöht, Leukozyten wandern ein und Mastzellen und Thrombozyten werden aktiviert (Probst, 2005). Die nekrotisierenden Prozesse im Frakturbereichverstrken die Entzündungsreaktion. Es kommt zur Ödembildung und damit einhergehendem Schmerz. Im Frakturspalt wandelt sich Fibrinogen zu Fibrin und innerhalb der ersten Stunden bis Tage entsteht ein Frakturhämatom, das durch Hypoxie und einen niedrigen pH-Wert charakterisiert ist (Claes et al., 2012).

Das Frakturhämatom wirkt wie ein Gitter, das weitere Entzündungszellen anzieht. Granulozyten werden von den Zelltrümmern ange lockt und sammeln sich schnell innerhalb der ersten Stunden am Entzündungsort. Sie haben nur eine kurze Lebensdauer, aktivieren allerdings endostal und periostal liegende Makrophagen ("Osteomacs"), die sehr bedeutend für die intramembranöse Knochenheilung zu sein scheinen (Alexander et al., 2011; Claes et al., 2012). Durch die chemotaktische Wirkung von aus Thrombozyten freigesetztem transforming growth factor- (TGF-) und die Freisetzung weiterer Mediatoren (u.a. IL-1, IL-6, Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha), RANKL und BMP) werden Fibroblasten und weitere Entzündungszellen ange lockt (Monozyten, Lymphozyten) (McKibbin, 1978; Kalfas, 2001), die den Frakturspalt von Zellresten befreien (Lindholm et al., 1969).

Weiterhin werden durch die hypoxische Versorgungslage und IL-1 und 6 Angiopoetin-1 und später Vascular endothelial growth factor (VEGF) freigesetzt, die bereits innerhalb der ersten Tage nach der Fraktur die Vaskularisation des Spaltes bewirken. Die Angiogenese ist ein wichtiger Bestandteil der Knochenheilung, da über die neuen Gefäße Sauerstoff, Nährstoffe und Zellen transportiert werden. Die Gefäße wandern vom Periost her in das Hämatom ein und machen den Weg für die Vorläuferzellen der Osteoblasten frei (Probst, 2005; Claes et al., 2012).

In Ratten wurde diese akute Phase der Entzündung über 7 Tage beobachtet, mit einem Maximum innerhalb der ersten 24 Stunden (Cho et al., 2002; Claes et al., 2012). Die Entzündung dauert an, bis die Knorpel- und Knochenbildung beginnt (Südkamp, 2000).

Die Entzündungsphase überlappt mit der Reparaturphase, in deren Verlauf es zur Ausbildung eines Kallus kommt. Es kommt zunächst zur verstärkten Einwanderung von Fibroblasten und mesenchymalen Stammzellen in das Frakturhämatom, das zu dieser Zeit aus einem Fibrinnetz mit Kollagenfibrillen besteht. Blutgefäße und faseriges Bindegewebe wachsen in den Frakturspalt ein und bilden Kollagenfasern und Matrix, die später mineralisiert wird. Auf diese Weise wird nach und nach das Hämatom durchbaut und durch gut durchblutetes, fibrinreiches Granulationsgewebe ersetzt. Das Granulationsgewebe führt zur ersten Brückenbildung zwischen den Knochenenden (Liebermann und Friedlaender, 2005).

Während nekrotisches Gewebe abtransportiert wird, proliferieren und differenzieren sich die mesenchymalen Stammzellen weiter. Wo diese Zellen herkommen, ist bis jetzt noch nicht genau bekannt. Die Zellen scheinen aber aus dem umliegenden Weichteilgewebe und dem Knochenmark zu kommen und in geschädigtes Gewebe einzudringen (Marsell und Einhorn, 2011).

Es wurde des Weiteren beobachtet, dass mesenchymale Stammzellen eine Verbesserung des Heilungsverlaufs und eine Erhöhung des Kallusvolumens und der knorpeligen und knöchernen Bestandteile hervorrufen (Granero-Molt et al., 2009). In vitro wurde eine Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen in Chondrozyten und Osteozyten beobachtet (Pittenger et al., 1999). In welche Richtung sich die Zellen entwickeln, hängt von äußeren Einflüssen ab. Es gibt einige Theorien dazu; die Fraktur-beweglichkeit, die Kallusvaskularisation und die Sauerstoffspannung scheinen in diesem Prozess eine Rolle zu spielen. Nach Thompson et al. (2002) scheinen diese äußeren Einwirkungen schon innerhalb von vier Tagen nach der Fraktur das Zellschicksal beeinflusst zu haben.

Im weiteren Verlauf kommt es zur Bildung von Knorpel vor allem in der Peripherie des Kallus. Der Kallus wird größer und erreicht nach Claes et al. (2006) bei Ratten an Tag 14 nach der Osteotomie sein maximales Volumen. Nach Einhorn (1998) kommt es im Tiermodell an Ratten, Kaninchen und Mäusen nach sieben bis neun Tagen nach der Osteotomie zu einem Höhepunkt der Neubildung von weichem Kallus. Die Bildung von Knorpelgewebe v.a. in den Randbezirken könnte die Folge einer stärkeren Bewegung in diesen Bereichen sein. Dort herrscht eine höhere Gewebespannung, wodurch das Einwachsen von Blutgefäßen gehemmt wird und die Sauerstoffversorgung entsprechend niedrig ist. Dieser Zustand hemmt die Osteoblastenaktivität in diesen Arealen und fördert die Chondroblastenproliferation (Liebermann und Friedlaender, 2005; Claes et al., 2012). Es scheint, dass wenn der Kallus über die vaskuläre Versorgung hinaus wächst, Knorpelgewebe entsteht, das relativ unabhängig von der Sauerstoffversorgung vorläufig den Frakturspalt überbrückt und mechanisch stabilisiert (McKibbin, 1978). Der weiche Kallus und Knorpelgewebe werden bei einer erhöhten interfragmentären Beweglichkeit größer (Goodship und Kenwright, 1985; Yamaji et al., 2001).

Zeitgleich zur Bildung des weichen Kallus beginnt die Entstehung von intramembranösem Knochengewebe (Marsell und Einhorn, 2011). Nach Einhorn (1998) beginnt die Bildung von intramembranösem Knochengewebe bereits direkt nach dem Trauma und die Proliferation stoppt nach circa zwei Wochen. Die Osteoblasten, die den neuen intramembranösen Knochen bilden, scheinen von periostalen Vorläuferzellen abzustammen (Nakahara et al., 1990). Die Knochenbildung beginnt wenige Millimeter vom Frakturende entfernt (Einhorn, 1998), wo der Knochen noch durchblutet und vom Trauma weitestgehend unbeeinträchtigt ist. In diesem Bereich ist auch nur ein geringes Maß an Frakturinstabilität vorhanden, was eine bessere Knochenbildung gewährleistet (Claes et al., 2012). Die intramembranöse Knochenbildung findet ohne einen Zwischenschritt über Knorpelgewebe statt, es wird direkt Geflechtknochen gebildet.

Die Kalzifizierung des knorpeligen Kallus ähnelt stark den Prozessen, die in der Wachstumsfuge ablaufen. Anfangs ist eine Fülle an langgestreckten, proliferierenden Chondrozyten zu beobachten (Einhorn, 1998). Nach geraumer Zeit stoppt die Zellteilung, die Chondrozyten werden hypertroph und kalzifizieren. In den Chondrozyten bilden sich Matrixvesikel, die Kalzium und Enzyme enthalten. Sie migrieren in den Extrazellulärraum, wo es mit Hilfe der Enzyme zur Ausfällung von Kalzium und Phosphat kommt (Einhorn, 1998; Marsell und Einhorn, 2011). Wenn der Knorpel kalzifiziert, beginnt auch das Einwachsen von Blutgefäßen. Die Vaskularisation wird hauptsächlich durch Angiopoetin-1 und -2 und durch VEGF reguliert. Angiopoetin sorgt vor allem in der frühen Heilungsphase für das Einwachsen von Blutgefäßen aus dem Periost. VEGF wird in großen Mengen von Osteoblasten und hypertrophen Chondrozyten gebildet und fördert so das Umformen von nicht durchbluteter Knorpelmatrix in vaskularisiertes Knochengewebe (Marsell und Einhorn, 2011). Die gesteigerte Durchblutung geht mit einem Eindringen von Monozyten und mesenchymalen Stammzellen einher. Die Monozyten differenzieren zu Osteoklasten, die den kalzifizierten Knorpel abbauen. Mesenchymale Stammzellen differenzieren hingegen zu Osteoblasten, welche neuen Knochen (Geflechtknochen) bilden (Claes et al., 2012). Der erste Knochen wird im Bereich der Knochenenden beobachtet, wo er den Kallus mit den Frakturende verbindet (McKibbin, 1978). Mit der Bildung des knöchernen Kallus hat der Knochen gewöhnlich genügend Kraft, um vorsichtig wieder seine volle Funktion aufzunehmen (Frost, 1989).

Obwohl der harte Kallus eine gute mechanische Stabilität gewährleistet, hat er nicht die mechanischen Eigenschaften des normalen Knochens. Daher beginnt nach der Entstehung des harten Kallus die Phase des Remodeling, in der die ursprüngliche Form, Struktur und mechanische Stärke des heilenden Knochens wieder hergestellt werden (Kalfas, 2001; Marsell und Einhorn, 2011).

Wie auch beim Remodeling im normalen Knochen laufen die Knochenbildung und -resorption der Remodelingphase dicht nebeneinander in "bone multicellular units" (BMU) ab. Eine BMU besteht aus einer Gruppe von Osteoklasten, Osteoblasten, Osteozyten, deren Vorläuferzellen und Endothel- und Nervenzellen (Papachroni et al., 2009). Sie sind zeitlich und örtlich organisiert und kommunizieren untereinander. In jeder Einheit wird Knochen durch organisierte Osteoklasten resorbiert, gefolgt von Osteoblasten, die neuen Knochen bilden (Frost, 1989; Papachroni et al., 2009). Während des Remodeling werden 3 Funktionen erfüllt: 1. Geflechtknochen wird durch Lamellenknochen ersetzt, 2. Kallus zwischen den Frakturende der Kortikalis wird durch Lamellenknochen ersetzt, 3. durch die Resorption

von Kallus wird die ursprüngliche Markhöhle wieder hergestellt (Frost, 1989; Klaushofer und Peterlik, 1994).

Die Vorgänge während der Remodelingphase sind vergleichbar mit dem Remodeling in normalem Knochen, das in geringem Maß lebenslang stattfindet. Durch die konstante Erneuerung können gezielt Mikroschäden im Knochen ausgebessert werden, aber es wird auch an beliebigen Stellen Knochengewebe ausgewechselt. Dadurch kann die mechanische Integrität des Knochens über Jahrzehnte bewahrt werden (Erben, 2015). Die Phase des Remodeling während der Frakturheilung erfolgt langsam über Monate bis Jahre, kann aber anfangs beschleunigt ablaufen (Liebermann und Friedlaender, 2005). Osteoklasten bauen überschüssigen Kallus ab, während der Geflechtknochen im Frakturspalt durch stabileren Lamellenknochen ersetzt wird (Claes et al., 2012). Der Kallus zwischen den Knochenenden der Kortikalis wird durch Osteone ersetzt und der Knochenmarkskanal wiederhergestellt (McKibbin, 1978; Frost, 1989). Durch die Resorption von Knochen der konvexen Oberfläche und Knochenbildung auf der konkaven Seite ist es dem Knochen möglich, Achsabweichungen, die während des Zusammenwachsens entstehen, in gewissem Umfang auszugleichen (Hoppenfeld und Murthy, 2000).

2.8. DIE ROLLE DER VASKULARISATION WÄHREND DER FRAKTURHEILUNG

Die Vaskularisation der Frakturregion ist eine wichtige Komponente der Knochenheilung. Die Blutgefäße bringen Sauerstoff und Nährstoffe in den Kallus. Sie bilden einen Transportweg für Entzündungszellen sowie Knorpel- und Knochenvorläuferzellen. Die Bildung von Gefäßen ist für die intramembranöse Knochenbildung genauso wichtig wie für die enchondrale. Eine beeinträchtigte Angiogenese kann zu einer verzögerten Heilung oder sogar zu einem Nichtheilen von Frakturen führen (Geris et al., 2008; Hankenson et al., 2011).

In den ersten Tagen nach einer Fraktur ist der Blutfluss in dem betroffenen Bereich reduziert. Durch das Frakturtrauma kommt es zu einem Zerreißen der Blutgefäße im Knochen und einer reaktiven Vasokonstriktion der periostalen sowie der medullären Gefäße. Es entsteht ein Hämatom im Frakturspalt. In der Folge entwickelt sich eine Hypoxie und es kommt zu kleinen Nekrosen von an der Fraktur beteiligtem Knochen. Diese abgestorbenen Knochenteile entstehen durch mechanische Verletzungen einerseits und durch die Zerstörung von nährstoffliefernden Blutgefäßen andererseits. Der nekrotische Knochen muss resorbiert werden und führt zu einer Steigerung der Entzündungsreaktion, bevor es dann über die Bildung von weichem und hartem Kallus zur Knochenheilung kommt (Hankenson et al., 2011).

Während der enchondralen Knochenbildung wachsen Blutgefäße in die avaskuläre Umgebung des Knorpels, der sich in den zentralen, hypoxischen Bereichen des Spaltes gebildet hat, um die Fraktur zu stabilisieren. Osteoklasten bauen den verkalkten Knorpel ab, damit Gefäße einwachsen können. Dadurch kommen Osteoblasten und Sauerstoff in den Kallus, die zur Bildung von Knochen führen (Geris et al., 2008; Hankenson et al., 2011). Auch für die intramembranöse Knochenbildung ist die Bildung von neuen Gefäßen wichtig, vermutlich, um den Zufluss von Osteoblastenvorläuferzellen zu ermöglichen (Hankenson et al., 2011).

Neue Blutgefäße entstehen durch zwei unterschiedliche Prozesse, Angiogenese und Vaskulogenese. Der häufigere Vorgang ist die Angiogenese, bei der es zu einem Sprießen neuer Gefäße aus bereits bestehenden kommt (Südkamp, 2000). Bei der Vaskulogenese kommt es zur Bildung neuer Blutgefäße durch Differenzierung endothelialer Vorläuferzellen zu einem Gefäßgeflecht ohne vorher bereits bestehende Gefäße (Lu et al., 2008; Hankenson et al., 2011).

Die Vaskulogenese und die Angiogenese während der Frakturheilung werden unter anderem auch von der mechanischen Stabilität beeinflusst. Eine geringere interfragmentäre Beweglichkeit führt im Vergleich zu höherer Beweglichkeit zu einer vermehrten Bildung von Blutgefäßen im Frakturkallus (Claes et al., 2002; Lienau et al., 2005). Des Weiteren wird die Vaskularisation durch die Stärke des mit einer Fraktur verbundenen Weichteiltraumas beeinflusst. Ein mittelmäßiges Muskeltrauma scheint die Durchblutung der Frakturregion in den ersten Tagen zu reduzieren, hat aber keinen Einfluss auf die Frakturheilung (Claes et al., 2006; Melnyk et al., 2008; Claes et al., 2012). Ein schweres Weichteiltrauma hingegen reduziert die Knochenheilung im Rattenmodell deutlich (Utvag et al., 2003).

Die Vaskularisation wird hauptsächlich über zwei Wege reguliert, ein Angiopoetin-ab-hängiger und ein VEGF-abhängiger Weg. VEGF ist der wichtigste Regulator der Gefäßbildung und fördert neben der

Angiogenese auch die Vaskulogenese. Er wird im Frakturkallus in nahezu dem selben Maß exprimiert wie während des Wachstums der langen Röhrenknochen (Street et al., 2002). Osteoblasten und hypertrophe Chondrozyten exprimieren eine große Menge an VEGF und fördern somit das Einwachsen von Blutgefäßen in den Kallus. Viele Stimuli und Zytokine, wie bestimmte Matrixmetalloproteinasen und Prostaglandine, beeinflussen die Bildung von VEGF (Hankenson et al., 2011). Unter anderem scheint auch der Sauerstoffgehalt Einfluss auf die Expression von VEGF zu haben. In Bereichen mit einer niedrigen Sauerstoffspannung, wie dem knorpeligen Kallus, kommt es zu einer Aktivierung des hypoxia-inducible-factor (HIF)-Signalweges. HIF ist ein Transkriptionsfaktor, der die Genexpression von VEGF steigert (Komatsu und Hadjiargyrou, 2004). Cramer et al. (2004) zeigten, dass Hypoxie die Bildung von VEGF in epiphysalen Chondrozyten induzieren kann. Der avaskuläre knorpelige Kallus wird so in gefäßreiches Knochengewebe verwandelt. Angiopoetine (hauptsächlich Angiopoetin-1 und -2) sind Proteine, die früh in der Heilungskaskade exprimiert werden. Vermutlich fördert Angiopoetin bei Anwesenheit von VEGF das initiale Einwachsen von Gefäßen aus bereits existierenden Gefäßen des Periosts (Lehmann et al., 2005; Marsell und Einhorn, 2011).

Die Bedeutung der Vaskularisation wird verdeutlicht durch deren Hemmung. Die Gabe eines Angiogenesehemmers (TNP-470) an Ratten stört die Proliferation von vaskulären Zellen und führt damit zu einer gestörten intramembranösen und enchondralen Ossifikation (Hausman et al., 2001). Ähnlich resultiert die Gabe eines Inhibitors von VEGF in einem experimentellen Frakturmodell in einer verringerten Angiogenese, Knochenbildung und Kallusmineralisation und damit in einer verzögerten oder inkompletten Heilung (Street et al., 2002; Geris et al., 2008). Die Zugabe von VEGF steigert die Bildung von Blutgefäßen und neuem Knochen und fördert somit die Frakturheilung (Street et al., 2002; Keramaris et al., 2008; Marsell und Einhorn, 2011).

2.9. KOMPLIKATIONEN DER FRAKTURHEILUNG

2.9.1. *Schlecht heilende Frakturen/ Non-union*

Eine verzögerte Heilung liegt vor, wenn der Knochen langsamer heilt als für den Typ der Fraktur und die Lokalisation zu erwarten wäre. Eine Non-union, also eine nicht heilende Fraktur, geht mit Schmerz und Funktionsverlust einher (Garcia et al., 2013). Sie ist vorhanden, wenn keine Anzeichen einer fortschreitenden, anhaltenden Heilung mehr zu sehen sind. Persistierende Frakturlinien, Sklerosen der Frakturenden und ein hypertropher oder fehlender Kallus sind als Zeichen für eine Non-union zu sehen (McKee, 2000).

Weber und Czech teilten nicht heilende Frakturen in zwei Hauptgruppen ein (Weber und Czech, 1973). Dieses System ist bis heute noch weit verbreitet. Eine hypertrophe Non-union bedeutet demnach, dass die Fraktur übermäßig vaskularisiert ist und einen großen Kallus aufweist. Sie besitzt noch biologisches Potential. Das Problem einer solchen Heilungsstörung ist wahrscheinlich mechanischer Art. Durch eine ungenügende Immobilisierung kommt es zwar zur Kallusbildung, allerdings nicht zur knöchernen Überbrückung, die für die Heilung nötig ist. Eine atrophe Non-union hingegen bedeutet, dass die Fraktur wenig vaskularisiert und inaktiv ist und keine biologische Aktivität mehr zu haben scheint. In einem solchen Fall reicht es nicht aus, die mechanischen Bedingungen zu verbessern (Harwood et al., 2010). Risikofaktoren für das Entstehen einer atropen Non-union sind neben einem starken Weichteiltrauma und einer herabgesetzten Vaskularisation auch ein schlechter Allgemeinzustand des Patienten und eine übermäßig steife Fixation der Fraktur. Weitere Risikofaktoren sind bisher nicht bekannt (Kaspar et al., 2008; Harwood et al., 2010).

Als Ursachen für eine gestörte Knochenheilung sind vor allem vier Faktoren von Bedeutung:

- Mangel an osteogenen Zellen: Osteogene Zellen sind wesentlich für die Frakturheilung und werden zu einem großen Teil über den systemischen Blutfluss an die Frakturstelle transportiert. Eine gute Durchblutung der Frakturregion ist dafür von hoher Bedeutung. Während eines Knochenbruchs zerreißen Blutgefäße des Knochens und des umgebenden Weichteilgewebes. Abhängig von der Energie, die auf den Knochen einwirkt, kommt es zu einer mehr oder weniger stark herabgesetzten Blutversorgung der Frakturenden. Vor allem offene Frakturen haben ein hohes Risiko einer

Fehlheilung, da durch die hohe Energie, die während des Traumas auf den Knochen einwirkt, die Blutversorgung herabgesetzt und die biologische Umgebung inaktiviert wird. Eine Infektion, lokal als auch systemisch, hat ebenfalls einen schädlichen Effekt auf die osteogenen Zellen, genauso wie die Einnahme von bestimmten Medikamenten (McKee, 2000; Harwood et al., 2010).

- Mangel an Signalmolekülen: Signalmoleküle (wie Wachstumsfaktoren) werden von Endothelzellen, Thrombozyten, Makrophagen, Monozyten, Chondrozyten, mesenchymalen Stammzellen und Osteoblasten im Frakturhämatom gebildet und regulieren den komplexen Prozess der Knochenheilung. Ein schwach ausgeprägtes Frakturhämatom oder eine Zerstörung, zum Beispiel durch eine interne Fixation, führt zu einer negativen Beeinflussung der Frakturumgebung und damit auch der Freisetzung von Wachstumsfaktoren (Harwood et al., 2010).
- Mangel an Stabilität: Auch übermäßige Bewegung in der Frakturregion kann eine schlechte Heilung bewirken. Meistens ist eine hypertrophe Non-union die Folge einer solchen zu schwachen Fixation. Im Gegensatz dazu kann allerdings auch eine zu steife Fixation zu einer ausbleibenden Wiederherstellung des Knochens führen. Wenn der Frakturspalt zu weit für eine primäre Knochenheilung ist, die Fixation aber so fest ist, dass ein mechanischer Stimulus zur Anregung einer sekundären Knochenheilung fehlt, kann es zu einer atrophischen Heilungsstörung kommen (Harwood et al., 2010).
- Mangel eines osteokonduktiven Scaffolds: Unter einem osteokonduktiven Scaffold versteht man ein Leitgerüst, das das natürliche Knochenwachstum erleichtert. Nekrotischer Knochen in der Frakturregion wirkt als eine Art Gerüst für die osteogenen Zellen. In einem großen Bereich ohne ein solches Gerüst fehlt den Zellen der Stimulus zur knöchernen Überbrückung des Frakturspaltes. Dies kann nach einem traumatischen Knochenverlust oder auch nach einer starken Zertrümmerung des Knochens im Frakturbereich der Fall sein (Harwood et al., 2010).

2.9.2. Fehlheilung

Eine Fehlheilung einer Fraktur besteht, wenn eine Fraktur in einer von der normalen Anatomie abweichenden Position zusammenwächst. Fehlheilungen kommen vor allem in Frakturen vor, die geschlossen repositioniert werden, da sich die Genauigkeit schwer beurteilen lässt und es dadurch zu einer nicht-anatomiegerechten Reposition kommen kann. Des Weiteren führen eine unzureichende Stabilisierung und eine unzureichend lange Dauer der Ruhigstellung häufig zu einer Fehlheilung. Man unterscheidet sie aufgrund ihrer Lokalisation in metaphysal, diphysal und intra-artikulär (Marti et al., 2000). Sie werden unterteilt in Längs-Fehlheilungen, die gewöhnlich in einer Verkürzung der Gliedmaße resultieren, Rotationsfehler, die zu gedrehten Fehlbildungen führen, und Achsenfehler, die zu Varus- oder Valgus-Stellungen führen. Diese fehlerhaften Heilungen mit Ausnahme der gedrehten Fehlstellung können zu einem gewissen Grad noch durch Remodeling korrigiert werden, was bis zu einigen Jahren dauern kann. Einige Fehlstellungen stellen ein rein kosmetisches Problem dar, wohingegen andere falsch verheilte Frakturen auch zu einer Funktionsbeeinträchtigung führen können (Durst und Allenberg, 1997; Ebnezar, 2003). Vor allem intra-artikuläre Fehlheilungen benötigen eine chirurgische Korrektur, da sie für den Patienten meist schmerzhaft sind und durch die artikuläre Inkongruenz zu arthrotischen Veränderungen führen (Marti et al., 2000).

2.10. EINFLUSSFAKTOREN AUF DIE KNOCHENARCHITEKTUR UND DIE KNOCHENHEILUNG

Die Knochenheilung wird von vielen verschiedenen Faktoren beeinflusst. Neben systemischen Einflüssen, wie zum Beispiel dem Alter oder manchen von der Fraktur unabhängigen Erkrankungen, wird die Frakturheilung auch von lokalen Faktoren beeinflusst. So behindern zum Beispiel Infektionen in der Frakturregion oder eine beeinträchtigte vaskuläre Versorgung die Heilung zum Teil erheblich. Auch biochemische Faktoren wie bestimmte Hormone und Wachstumsfaktoren beeinflussen die Knochenheilung und werden zum Teil in Hinblick auf den medizinischen Nutzen erforscht und in der Behandlung eingesetzt (Hecht, 2012).

Nachfolgend sollen nur zwei Faktoren näher ausgeführt werden, das Alter des Patienten und der Einfluss von Bewegung.

2.10.1. *Alter*

Mit zunehmendem Alter kommt es im Knochen zu regelhaften Veränderungen der Kortikalis und der Spongiosa. Nach Öhman et al. (2011) bleibt der organische Anteil im trabekulären Knochen des Menschen das ganze Leben über eher gleich, wohingegen der Wassergehalt mit zunehmendem Alter abnimmt. Des Weiteren wurde herausgefunden, dass Knochen junger Menschen zwar schwächer und weniger fest als Knochen älterer Menschen ist, allerdings mehr Energie ableiten und absorbieren kann, bevor er bricht.

Knochengewebe unterliegt ständigen Erneuerungsprozessen, dem Remodeling, um Mikrorisse auszubessern und auf mechanische Belastung zu reagieren. Dabei wird alter Knochen abgebaut und durch neuen ersetzt. Auf- und Abbau von Knochen stehen dabei im Gleichgewicht. (Klein-Nulend et al., 2012) Mit dem Alter kippt diese Balance in eine negative Richtung und es kommt zu einem langsamen Knochenverlust. Der Abbau von Knochen durch Osteoklasten überwiegt dabei, was letzten Endes zu Osteoporose führen kann. Bei Frauen liegt der Zeitpunkt der höchsten Knochenmasse zwischen dem 15. und 20. Lebensjahr. Bereits ab einem Alter von 30 bis 49 Jahren kann ein Knochenverlust nachgewiesen werden. Dieser Zeitpunkt liegt noch vor der Menopause der Frau, in der es zu einem Östrogenmangelbedingten Knochenverlust kommt (Raisz und Seeman, 2001; Demontiero et al., 2012). Die Elastizität und Festigkeit von Knochen beider Geschlechter nimmt ab, und der Knochen wird brüchiger und poröser (Remmele, 1997).

Mit steigendem Alter kommt es zu einem Anstieg der endostalen Knochenresorption an der Innenseite des Knochens bei beiden Geschlechtern und gleichzeitig zu einer herabgesetzten periostalen Knochenbildung an der Außenseite. Die Folgen dieser Veränderungen sind eine Verdünnung und eine erhöhte Porosität der Kortikalis. Des Weiteren wurden auch Veränderungen in der Mikroarchitektur der Trabekel beobachtet. Die Trabekel werden dünner, und ihre Verbindungen untereinander gehen verloren. All diese Veränderungen führen zu einer reduzierten Knochenqualität und damit zu einer herabgesetzten Knochenfestigkeit (Demontiero et al., 2012).

Eine weitere wichtige Veränderung ist die Dichtezunahme der Osteone, die vermutlich durch das exzessive Remodeling im Alter bedingt ist. Im alten Knochen kann sich die Dichte der Osteone fast verdoppeln, was in einer geringeren Belastbarkeit des Knochens und damit einer größeren Gefahr für Frakturen resultiert (Ager III et al., 2006; Zimmermann et al., 2011). Ferner beeinflusst das Alter den Grad der Mineralisation sowie die Anzahl und Frequenz von Mikrorissen im Knochen (Bouxsein, 2003; Rosen et al., 2013). Die Dichte der Mikrorisse nimmt im alternden Knochen zu, bei älteren Frauen mehr als bei älteren Männern. Und es wird angenommen, dass dieses vermehrte Auftreten von Mikrorissen durch die Dichtezunahme der Osteone bedingt ist (Ager III et al., 2006). Mikrorisse können den Knochen in geringem Maße vor Frakturen bewahren, verringern mit ihrem Auftreten allerdings die Festigkeit des Knochens (Currey, 2002; Chan und Nicolella, 2012).

Die Unterschiede von alterndem im Vergleich zu jungem Knochen können unter anderem durch lokale und systemische Veränderungen in der Sekretion von Hormonen und Wachstumsfaktoren verursacht sein. Kalzium- und Vitamin-D-Defizite kommen vermehrt bei älteren Personen vor und werden unter anderem durch eine veränderte Ernährung, geringeren Kontakt mit Sonnenlicht und vermehrte Medikamenteneinnahme verursacht. Solche Mängel fördern die Knochenresorption ebenso wie die hormonelle Umstellung in der Menopause der Frau (Rosen et al., 2013). Die Beendigung der Ovarfunktion geht mit einem herabgesetzten Östrogenlevel und einem Knochenverlust bei der Frau einher (Demontiero et al., 2012).

Die Fähigkeit des Knochens zur Heilung nach einer Fraktur besteht lebenslang, allerdings sinkt mit zunehmendem Alter die Regenerationsfähigkeit. Verzögerte Knochenheilung bei älteren Menschen ist ein bekanntes Problem. In experimentellen Arbeiten wurde die verzögerte Knochenheilung bei mittelalten und alten Tieren im Vergleich zu Jungtieren bestätigt (Lu et al., 2005; Xing et al., 2010). Es gibt Hinweise, dass die Mineralisierung des Kallus bei älteren Tieren reduziert ist (Meyer et al., 2001; Lu et al., 2005).

Die Mechanismen, die dafür verantwortlich sind, sind bisher weitestgehend unklar (Xing et al., 2010). Es wird vermutet, dass eine Vielzahl von Faktoren an den altersbedingten Veränderungen in der Frakturheilung mitwirken. Laut Liebermann et al. (2005) kommt es zu einer herabgesetzten Proliferationsrate und einer reduzierten Osteoblastenfunktion während der Zellalterung. Mehta et al. (2010) fanden eine

gesteigerte Knochenresorption und eine erhöhte Osteoklastenaktivität während der Knochenheilung in 52 Wochen alten Ratten verglichen mit jungen Tieren, was der Grund für altersbedingte Veränderungen der Struktur und Mineralisation von Kallusgewebe sein könnte. Lu et al. (2008) beobachteten eine Verzögerung der Zelldifferenzierung, eine verminderte Knochenbildung und einen verlängerten Zeitraum der enchondralen Ossifikation während der Frakturheilung. Mittelalte Tiere zeigten einen signifikant größeren Kallus und ein schnelleres Einwachsen von Blutgefäßen in den Knorpel als alte Tiere. Des Weiteren wird auch eine verminderte Anzahl (Zheng et al., 2007) und ein herabgesetztes Potential zur Proliferation und Differenzierung von Stammzellen diskutiert (Strube et al., 2008). Kasper et al. (2009) zeigten, dass die Konzentration an mesenchymalen Stammzellen im Knochenmark mit dem Alter sinkt und sich ihre Funktion verändert. Genauso werden strukturelle oder zelluläre Veränderungen im Periost (Fan et al., 2008) und ein herabgesetztes chondrogenes Potential des Periosts (O'Driscoll et al., 2001) im alternden Knochen angenommen (Liebermann und Friedlaender, 2005; Lu et al., 2008).

2.10.2. *Bewegung*

Mechanische Belastung des Skeletts ist wichtig für die Entwicklung und das Wachstum der Knochen. Die Knochenstärke kann sich auch im Erwachsenen noch anpassen und es ist bekannt, dass externe Belastungen Knochenmasse und -architektur verändern können (Frost, 1987; Turner et al., 1991; Turner et al., 2009). Eine Veränderung der Gelenkbelastung führt zu einer Anpassung der Trabekelausrichtung. Nach dem Wolffschen Gesetz kann man aus einer ähnlichen Form zweier Knochen auf eine ähnliche Belastungsfunktion schließen (Wolff, 1892; Barak et al., 2011).

Studien an Sportlern haben gezeigt, welchen starken Einfluss mechanische Kräfte auf die externe Morphologie und interne Struktur von Knochen haben. So wurde bei professionellen Tennisspielern im dominanten Spielerarm im Vergleich zum kontralateralen Arm eine deutlich größere kortikale Stärke gemessen (Jones et al., 1977). Auch wurde eine höhere Dichte im Femur von Athleten im Vergleich zu Nicht-Athleten beobachtet (Nigg et al., 2000). Es scheint allerdings auch eine reduzierte Belastung Einfluss auf den Knochen zu haben. So wurde beim Menschen bei einer herabgesetzten Beanspruchung in Form von Bettruhe über mehrere Wochen eine signifikante Abnahme der Knochendichte gesehen (Leblanc et al., 1990).

Osteozyten sind stark mechanosensitive Zellen. Durch ihre Menge, Verteilung, ihre strategische Lokalisation und ihre Verbindungen untereinander sind sie prädestiniert als Mechanosensoren zu fungieren (Bonewald und Johnson, 2008; McBride und Silva, 2012). Sie wandeln mechanische Energie in elektrische oder biochemische Signale um (Komori, 2013). Die drei Hauptprozesse der Mechanotransduktion sind das "Mechanosensing", die Signaltransduktion und die Effektorzellen-Antwort (Morgan et al., 2008). Werden Osteozyten *in vitro* durch einen mechanischen Reiz aktiviert, produzieren sie Signalmoleküle, unter anderem BMP, Prostaglandin E₂ und Stickstoffmonoxid. Diese Moleküle übertragen die Informationen dann an die Effektorzellen und stimmen die Differenzierung und Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten ab. Dadurch wird die Neubildung bzw. Resorption von Knochen veranlasst (Burger und Klein-Nulend, 1999; Klein-Nulend et al., 2012; Komori, 2013). Die genauen zellulären und molekularen Mechanismen, die dafür verantwortlich sind, sind noch immer unklar (Tu et al., 2012). Es wurde aber bewiesen, dass der Zelloberflächenrezeptor low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (Lrp5) und der Wnt/ β -Katenin-Signalweg unbedingt nötig für die belastungsinduzierte Knochenbildung sind (Sawakami et al., 2006; Bonewald und Johnson, 2008).

Des Weiteren wird angenommen, dass die Mechanosensitivität von Osteozyten mit zunehmendem Alter abnimmt. Auch eine verminderte anabole Reaktion von Knochen im Alter ist in der Diskussion (Klein-Nulend et al., 2012).

2.11. MECHANISCHE BELASTUNG UND FRAKTURHEILUNG

In einer Vielzahl von Studien wurde bereits gezeigt, dass die mechanischen Bedingungen während der Frakturheilung die Kallusbildung beeinflussen und eine flexible Fixation die Kallusgröße steigern kann (Goodship und Kenwright, 1985; Yamaji et al., 2001; Perren, 2002; Schell et al., 2005). Dennoch sind die Mechanismen der Mechanotransduktion noch nicht sehr gut verstanden.

Die Ziele einer chirurgischen Frakturbehandlung sind die anatomische Rekonstruktion der Frakturfragmente, eine stabile Fixation, die Erhaltung der Blutversorgung und eine frühe, schmerzfreie Be-

wegung des Patienten. Neben der konservativen Therapie von Frakturen spielt die chirurgische Therapie eine bedeutende Rolle. Die unterschiedlichen Fixationssysteme von Frakturen erlauben eine unterschiedlich steife Fixation. So führt die nicht invasive Stabilisation mit Hilfe einer Gipsschiene zu einer Reduktion der gesamten Beweglichkeit, während die Mikrobewegungen bestehen bleiben, da die hohe Stabilität der Schiene durch das umliegende Weichteilgewebe abgemindert wird. Die Fixation durch Verwendung einer Platte hat eine sehr steife Fixation zur Folge, da in diesem Fall die Schiene dem Knochen direkt anliegt. Ein intramedullärer Nagel hingegen lässt eine recht hohe axiale Bewegung und Rotationsbewegung zu. Im Folgenden wird näher auf die Stabilisierung mittels eines Fixateur externe eingegangen.

Externe Fixateure ermöglichen eine Stabilisierung der Fraktur von einer gewissen Distanz aus. Der Vorteil einer solchen Fixation ist folglich, dass der Frakturbereich unbeeinflusst von der Anwesenheit des Implantats ist. Das umliegende Weichteilgewebe und die Durchblutung der Frakturregion werden kaum gestört. Ein weiterer Vorteil des Fixateurs ist die Möglichkeit, die Flexibilität dieser Schienung zu ändern. Vor allem für experimentelle Studien ergibt sich daraus der Vorzug, während des Heilungsprozesses die Steifheit der Fixation ohne weitere Operation zu modifizieren. Der Fixateur externe ermöglicht eine hohe Achsen- und Rotationsstabilität (Histing et al., 2011; Rosen et al., 2013).

Komplikationen bei der Frakturversorgung mittels eines Fixateur externe können vor allem Infektionen des Pinkanals, Pinlockerung und Störungen der Gelenkbewegung sein. Nachteile dieser operativen Frakturversorgung sind der komplexe und hochinvasive operative Eingriff und das relativ hohe Gewicht des Fixateurs (Histing et al., 2011).

Die mechanische Umgebung von Frakturen wird durch verschiedenen Faktoren bedingt. Neben der Stabilität und dem Frakturtyp spielt die Belastung eine wichtige Rolle in der Knochenheilung. Der Einfluss der Belastung hängt von der Art und dem Maß der Belastungsstärke sowie der Weite des Frakturspaltes ab (Goodship et al., 1998; Morgan et al., 2008). Ist die interfragmentäre Belastung zu hoch, kann es zu einer verzögerten Knochenheilung oder sogar zu einer Fehlheilung kommen (Kenwright und Goodship, 1989). Andererseits kann auch die totale Abwesenheit von mechanischer Stimulation zu Heilungsstörungen führen (Goodship und Kenwright, 1985; Mehta et al., 2011).

Goodship und Kenwright (1985) beobachteten, dass zyklische, kompressive Verschiebungen die Knochenheilung durch eine verstärkte Kallusbildung und eine schnellere Verknöcherung verbessern können. Es herrscht allerdings keine einhellige Meinung darüber, ob Kompression oder Distraction der effektivere Reiz ist (Jagodzinski und Krettek, 2007). Matsushita und Kurokawa (1998) untersuchten die Wirkung von Distraction und Kompression auf die Frakturheilung an Kaninchen und stellten keinen Unterschied fest. Sie folgerten daraus, dass axiale Belastungen, egal welcher Kraftrichtung, die Knochenheilung zu fördern scheinen.

Im Gegensatz zur axialen Belastung ist der Einfluss der interfragmentären Scherkräfte noch nicht eindeutig geklärt. Laut Augat et al. (2003) führen Scherkräfte der gleichen Stärke scheinbar eher zu einer Verzögerung der Heilung. So wurde bei diaphysalen Querfrakturen an Schafen, die interfragmentären Scherkräften ausgesetzt waren, ein geringerer periostaler Kallus als bei axialer Belastung und eine verzögerte Knochenbildung im Frakturspalt beobachtet. Es wurde angenommen, dass die Scherkräfte zu einem Zerreißen der Blutgefäße und dadurch zu einer verzögerten Heilung führen. Allerdings zeigten Park et al. (1998), dass interfragmentäre Scherbewegungen bei Schrägfrakturen an Kaninchen zu einem größeren Kallus und einer besseren Torsionsfestigkeit im Vergleich zu axialer Belastung und unbeweglicher Frakturfixation führen. Demzufolge scheinen die Effekte von Scher- und Achsenbewegungen im Frakturspalt stark von weiteren Faktoren wie Zeitpunkt, Stärke und Frakturspaltgröße abzuhängen (Augat et al., 2005).

Der Zeitpunkt des Belastungsreizes im Heilungsverlauf scheint eine wichtige Rolle zu spielen. Eine Untersuchung von Goodship et al. (1998) an Schafen ergab, dass mechanische Stimulation in einer frühen Phase der Frakturheilung zu einer verstärkten Kallusbildung, einer erhöhten Knochendichte und -festigkeit führt. Im Gegensatz dazu wurde bei einer späteren Stimulation 6 Wochen post operationem eine herabgesetzte Knochenfestigkeit und eine verringerte Frakturüberbrückung beobachtet. Weaver et al. (2010) beobachteten eine verstärkte Mineralisierung und eine erhöhte Torsionssteifigkeit, wenn die mechanische Belastung des Frakturspaltes nach der anfänglichen Entzündungsphase statt fand. Sehr frühe und spätere Belastungen führten zu einer schlechteren Frakturheilung. Eine Studie von Willie et al. (2011) an Ratten ergab, dass eine flexible Stabilisierung eine Woche post operationem zu einer

schlechteren Heilung im Vergleich zu einer permanenten steifen Stabilisierung führte. Im Gegensatz dazu wurde bei einer Osteotomie, die erst nach 3 bzw. 4 Wochen dynamisiert wurde, eine bessere Frakturüberbrückung beobachtet. Daher kommen Willie et al. (2011) zu der Annahme, dass eine flexible Stabilisierung in einer frühen Heilungsphase während der Knorpeldifferenzierung zu einer verzögerten Heilung führt. Findet die Dynamisierung erst zu Beginn der knöchernen Überbrückung statt, kommt es zu einer Verbesserung der Heilung. Eine sehr frühe Instabilität der Fraktur führt zu einem Zerreißen von überbrückendem Gewebe und den versorgenden Blutgefäßen, zu einer verstärkten Knorpel- und Bindegewebsbildung und dadurch zu einer verzögerten Heilung (Carter et al., 1998; Lienau et al., 2005; Mehta et al., 2011).

Welcher bestimmte mechanische Reiz die Differenzierung von pluripotenten mesenchymalen Zellen zu Knochen-, Knorpel- oder Bindegewebszellen anregt und damit die Knochenheilung fördert, ist bisher nicht eindeutig geklärt. Carter et al. (1998) vermuteten, dass verschiedene Kombinationen von hydrostatischem Druck und Zugbelastung die Differenzierung begünstigen. Lacroix et al. (2002) hingegen sehen die Scherkräfte und Flüssigkeitsströmungen im Lakunen-Kanalikuli-System als die beiden bedeutendsten mechanischen Reize zur Gewebedifferenzierung während der Frakturheilung.

2.12. OSTEOPOROSE

Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die durch eine niedrige Knochenmasse und eine veränderte Mikroarchitektur des Knochengewebes charakterisiert ist. Als Folge kommt es bei den Patienten zu einer erhöhten Knochenbrüchigkeit und damit zu einem erhöhten Frakturrisiko (Faienza et al., 2013). Das Frakturrisiko von Osteoporosepatienten kann bis zu 40% betragen und betrifft am häufigsten die Wirbelkörper, der proximale Femur und das Handgelenk. Osteoporotische Frakturen der Wirbelsäule und des proximalen Femurs haben eine Mortalitätsrate von bis zu 20%, da sie durch die lange Immobilisation häufig andere Komplikationen nach sich ziehen wie Pneumonie oder Thromboembolische Erkrankungen (Center et al., 1999; Rachner et al., 2011). Bei der Osteoporose handelt es sich um eine komplexe Störung mit einer Vielzahl an umweltbedingten Risikofaktoren wie der Ernährung, dem Lebensstil und anderen Erkrankungen. Dazu zählen unter anderem der Gehalt an Vitamin D und Calcium in der Nahrung, körperliche Aktivität, Rauchen und endokrine Erkrankungen wie Morbus Cushing, Rheuma und Östrogenmangel. Auch die Einnahme von Medikamenten wie Kortikosteroiden, Antikonvulsiva und Chemotherapeutika können eine Osteoporose begünstigen (Peacock et al., 2002).

Das Knochendefizit entsteht durch eine Imbalance von Knochenbildung und Knochenresorption. In gesundem Knochen steht die Aktivität von knochenresorbierenden Osteoklasten und knochenbildenden Osteoblasten im Gleichgewicht. Im Rahmen des Remodeling wird alter Knochen durch neuen ersetzt und stress-induzierte Mikrofrakturen werden repariert (Raisz, 2005). Das Remodeling findet in BMUs statt, die aus Osteoklasten, Osteoblasten und Osteozyten bestehen. Osteoklasten leiten sich von Osteoklastenvorläuferzellen ab, die im peripheren Blut zirkulieren. Unter dem Einfluss von zwei Zytokinen, dem macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) und RANKL, differenzieren die Zellen zu Osteoklasten. RANKL fördert nicht nur die Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen, sondern aktiviert auch mature Osteoklasten durch Bindung an den Rezeptor RANK (Faienza et al., 2013).

Für gewöhnlich tritt die reduzierte Knochenmasse generalisiert auf. Eine hohe Anzahl an ungefüllten Howship-Lakunen und Havers-Kanälen führt zu einer Schwächung des Knochens (Raisz, 2005). Der Mineralisierungsgrad in osteoporotischem Knochen ist herabgesetzt (Giannoudis et al., 2007). Kortikaler Knochen ist genauso betroffen wie die Spongiosa, wenn auch nicht immer im gleichen Maße. Im kortikalen Knochen kommt es zu einer Ausdünnung der Kortikalis und einer erhöhten Porosität. In der Spongiosa wird eine Verdünnung der Trabekel und ein Verlust der trabekulären Verbindungen beobachtet. Starke Resorption kann zu einem kompletten Verlust von trabekulären Strukturen führen (Peacock et al., 2002; Raisz, 2005). Die Dichte des Knochens steht in direktem Verhältnis zur Stärke des Knochens. Mit einer Abnahme der Dichte kommt es daher zu einer Schwächung des Knochens (Giannoudis et al., 2007).

Da die Knochenresorption und die abbauende Phase des Remodeling kurz sind und die Phase des Knochenersatzes länger dauert, führt jede Steigerung der Remodelingrate zu einem Verlust an Knochenmasse (Raisz, 2005). Einfach ausgedrückt, lassen sich drei pathogene Mechanismen, die zu Osteoporose

führen können, unterscheiden: 1. Eine Störung während des Skelettwachstums, die zu einer geringen maximalen Knochenmasse führt, 2. eine gesteigerte Knochenresorption, nachdem die maximale Knochenmasse erreicht wurde, und 3. eine gestörte Knochenbildung während des Remodeling. Störungen während des Skelettwachstums sind vor allem genetisch bedingt. Eine gesteigerte Knochenresorption tritt vor allem mit zunehmendem Alter und während der Menopause der Frau auf, was durch den Verlust an Sexualhormonen und durch ein Calciumdefizit erklärt werden kann. Auch die herabgesetzte physische Aktivität älterer Menschen und damit die reduzierte mechanische Belastung auf den Knochen spielen eine Rolle (Raisz, 2001; Bilezikian et al., 2008). Östrogen ist der hormonelle Hauptregulator des Knochenstoffwechsels bei Männern wie bei Frauen. Es hemmt das Remodeling und die Knochenresorption hauptsächlich über direkte Beeinflussung der Osteoklasten, aber auch über Regulierung der Osteoblasten/Osteozyten-Aktivität. Die direkten Effekte von Östrogen auf Osteoklasten sind eine Induktion von Osteoklastenapoptose und eine Hemmung der Osteoklastenbildung. Dabei wird die Ansprechbarkeit von Osteoklastenvorläuferzellen auf das osteoklastogene Zytokin RANKL herabgesetzt. Die herabgesetzte Ovarfunktion in der Menopause der Frau führt zu einer reduzierten Östrogenproduktion und damit zu einer gesteigerten Osteoklastenbildung (Faenza et al., 2013).

2.13. OSTEOPOROSE UND FRAKTURHEILUNG

Durch die herabgesetzte Knochendichte und gestörte Mikroarchitektur von osteoporotischem Knochen führt Osteoporose zu einem gesteigerten Frakturrisiko. Osteoporotische Frakturen sind bei älteren Menschen häufig. Ein Verlust von 10% der Knochenmasse in den Wirbeln kann das Risiko einer Wirbelfraktur verdoppeln, und ein Verlust von 10% Knochenmasse in dem proximalen Femur kann mit einem 2,5-fach erhöhten Risiko zu einer Hüftfraktur führen (Goldhahn et al., 2008). Eine 50-jährige weiße Frau hat ein 16%iges Risiko, während ihres verbleibenden Lebens eine Oberschenkelhalsfraktur zu bekommen, und ein Risiko von 32%, eine Wirbelfraktur zu erleiden (Cummings et al., 1989). Aufgrund der schlechten Knochenstruktur ist das Management solcher Frakturen schwierig. Vor allem Frakturen der Metaphysenregion von langen Knochen gehen mit einer erhöhten Komplikationsrate einher. Es wird von Nonunion-Raten von 2-10% berichtet und Fehlstellungen nach Operation von 4-40% (Giannoudis et al., 2007). Eine osteoporotisch bedingte Fraktur beruht auf verschiedenen Veränderungen des Knochens: herabgesetzte Knochendichte, Unausgewogenheit von Kortikalis und Spongiosa, osteoklastische Perforationen der Knochenbälkchen, minderwertiger Aufbau der Knochensubstanz, mangelhafte Mineralisation der Knochenmatrix, fehlerhafte Struktur und Verknüpfung der Kollagenmoleküle und mangelhafte Reparaturmechanismen (Bartl, 2010).

Viele Studien haben die Hypothese untersucht, dass Osteoporose die Frakturheilung stört. Kubo et al. (1999) beobachteten, dass niedrige Östrogen- und Kalziumlevel in Ratten den frühen Heilungsverlauf kaum beeinflussen. In der späteren Heilungsphase waren allerdings osteoporotische Veränderungen und ein geringerer Mineralgehalt im neu gebildeten Knochen in der osteoporotischen Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe vorhanden. Meyer et al. (2001) berichteten, dass Alter und Ovariectomie die Frakturheilung in weiblichen Ratten verschlechtern. Sie beobachteten Veränderungen in der Festigkeit und Bruchkraft und in der Knochenmineraldichte des Frakturkallus. Eine verzögerte Heilung von zwei Wochen beobachteten Lill et al. (2003) in einem osteoporotischen Schafmodell. Allerdings wurde kein Unterschied in der endgültigen Festigkeit im Vergleich zu gesunden Schafen gesehen. Wang et al. (2005b) untersuchten den Einfluss von Osteoporose auf die mittlere und späte Phase der Frakturheilung in Ratten. Sie beobachteten eine geringe Knochenmineraldichte und geringe Bruchspannung im Kallus in der osteoporotischen Gruppe. Die enchondrale Knochenbildung war verzögert, und die neu gebildeten Knochen trabekel waren irregulär angeordnet. Wang et al. (2005b) sahen das als eine Folge einer verlängerten enchondralen Kalzifizierung, verstärkt aktivierter Osteoklasten und einer Verlangsamung der Knochenmineraldichtenzunahme.

Klinisch zeigt sich, dass Fragilitätsfrakturen trotz der Veränderungen des Knochenremodeling in Osteoporosepatienten heilen. Eine herabgesetzte Heilungsfähigkeit von Osteoporosepatienten zeigt sich allerdings in einer hohen Rate an Heilungskomplikationen bei interner Fixation (Barrios et al., 1993; Cornell, 2003). Es ist nicht eindeutig, ob Heilungskomplikationen auf Probleme der Implantatsfixierung im osteoporotischen Knochen zurückzuführen sind oder möglicherweise auf die verzögerte Heilung

in älteren Patienten (Hoang-Kim et al., 2009). Egermann et al. (2005) vermuten, dass der gestörten Heilungskapazität bei älteren Patienten ein Defekt in den mesenchymalen Stammzellen zu Grunde liegt, der zu einer reduzierten Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten führt.

Viele Osteoporosepatienten erhalten anti-katabole Medikamente, und es ist fraglich, ob diese Medikamente langfristig einen negativen Einfluss auf die Heilung von Frakturen haben. Es gibt keinen Hinweis dafür, dass solche Medikamente die Wiederherstellung der Knochenstruktur stören, außer dass sie das Remodeling verzögern können (McDonald et al., 2008). Dies kann anhand der verschiedenen Stadien der Frakturheilung erklärt werden. Während die Entzündungsphase und die Knochenbildung im Zuge der Reparaturphase größtenteils von Osteoklasten unabhängig sind, ist das Remodeling von Geflecht- zu Lamellenknochen am Ende der Frakturheilung abhängig von der Osteoklastenaktivität. Von anabolen Medikamenten, die in der Osteoporosebehandlung eingesetzt werden, wird hingegen ein positiver Effekt auf die Frakturheilung angenommen (Hoang-Kim et al., 2009).

2.14. DER WNT-SIGNALWEG

2.14.1. Übersicht Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg wurde erstmals in den 1980er Jahren in Gesäugetumoren der Maus entdeckt. Seitdem wurde diese Signalkaskade intensiv erforscht und als einer der wichtigsten Signalwege in einer Vielzahl biologischer Prozesse beschrieben. Es handelt sich um eine Signaltransduktionskaskade, durch die grundlegende zelluläre Interaktionen gesteuert werden. Der Name setzt sich zusammen aus dem Namen des Gens "int-1" der Maus, das durch das Maus-Mammatumovirus aktiviert wird und des homologen Gens "Wg" (wingless) der Drosophila, bei dessen Mutation es zu einer flügellosen Variante der Drosophila kommt (Johnson und Kamel, 2007).

Es existieren 19 bekannte Wnt-Proteine, die Oberflächenrezeptoren aktivieren und damit eine spezifische intrazelluläre Signalkaskade auslösen, um die Genexpression kontrollieren zu können. Es werden vier Signalwege unterschieden, die in kanonische und nicht-kanonische unterteilt werden. Der kanonische Weg vermittelt die Signalweiterleitung über Stabilisierung von β -Katenin, während die nicht-kanonischen Wege unabhängig von β -Katenin arbeiten (Bonewald und Johnson, 2008; Kim et al., 2013). Zu den nicht-kanonischen Wegen zählen der Kalzium-abhängige Weg, der Planar cell polarity pathway und der Protein-Kinase-A-Signalweg (Johnson und Kamel, 2007). Der Wnt/ β -Katenin-Signalweg ist der am besten untersuchte, auch im Hinblick auf sein therapeutisches Potential im Knochenstoffwechsel (Bonewald und Johnson, 2008; Kim et al., 2013).

Der Wnt/ β -Katenin-Pathway wird durch Bindung eines bestimmten Wnt-Proteins an einen Korezeptor-Komplex auf der Zelloberfläche aktiviert, der in Vertebraten aus Lrp5 oder 6 und einem Frizzled-Rezeptor besteht. Diese Bindung führt zur Aktivierung des intrazellulären Proteins Dishevelled (Dvl) und der Bindung des Proteins Axin an den zytoplasmatischen Schwanz von Lrp5 bzw. 6. Die Aktivierung von Dvl löst nachfolgend eine Phosphorylierung von der Glykogen Synthase Kinase-3 β (GSK-3 β) aus. GSK-3 β ist eine Schlüsselkomponente eines großen abbauenden Komplexes, der für die Kontrolle von freiem intrazellulären β -Katenin zuständig ist. Normalerweise ist GSK-3 β verantwortlich für die Phosphorylierung von β -Katenin, was zur Ubiquitinierung und dem Abbau durch Proteosomen führt, ohne dass β -Katenin eine Signalfunktion erfüllt hat. Dadurch wird das β -Katenin-Level dauerhaft niedrig gehalten. Dieser Zustand ist in Abb. 5 a) dargestellt. Bindet nun Wnt an den Lrp5/Frizzled-Korezeptor, wird GSK-3 β daran gehindert, β -Katenin zu phosphorylieren. Wie in Abb. 5 b) zu sehen bleibt β -Katenin dadurch stabil und wird in den Zellkern transloziert, wo es die Gentranskription beeinflusst. Es reguliert unter anderem die Gene, die wichtig für die Differenzierung, die Proliferation, Apoptose und Funktionsweise der Knochenzellen sind (Logan und Nusse, 2004; Johnson und Kamel, 2007; Bonewald und Johnson, 2008; Kim et al., 2013).

Der Wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen und postnatalen Entwicklung und in der adulten Gewebshomöostase. Dafür koordiniert er die Zellproliferation, die Entscheidung über das Zellschicksal, die Zelldifferenzierung und die Zellpolarität (Logan und Nusse, 2004; Kim et al., 2013). Seit den frühen 1990er Jahren ist die Bedeutung des Wnt-Signalweges für die Entwicklung und die Strukturierung des Skeletts bekannt. Studien zeigten, dass Wnt-3a Mutationen in Mäusen zu einer veränderten Körperachsenentwicklung führten (Greco et al., 1996). Einige Jahre später wurden Defekte

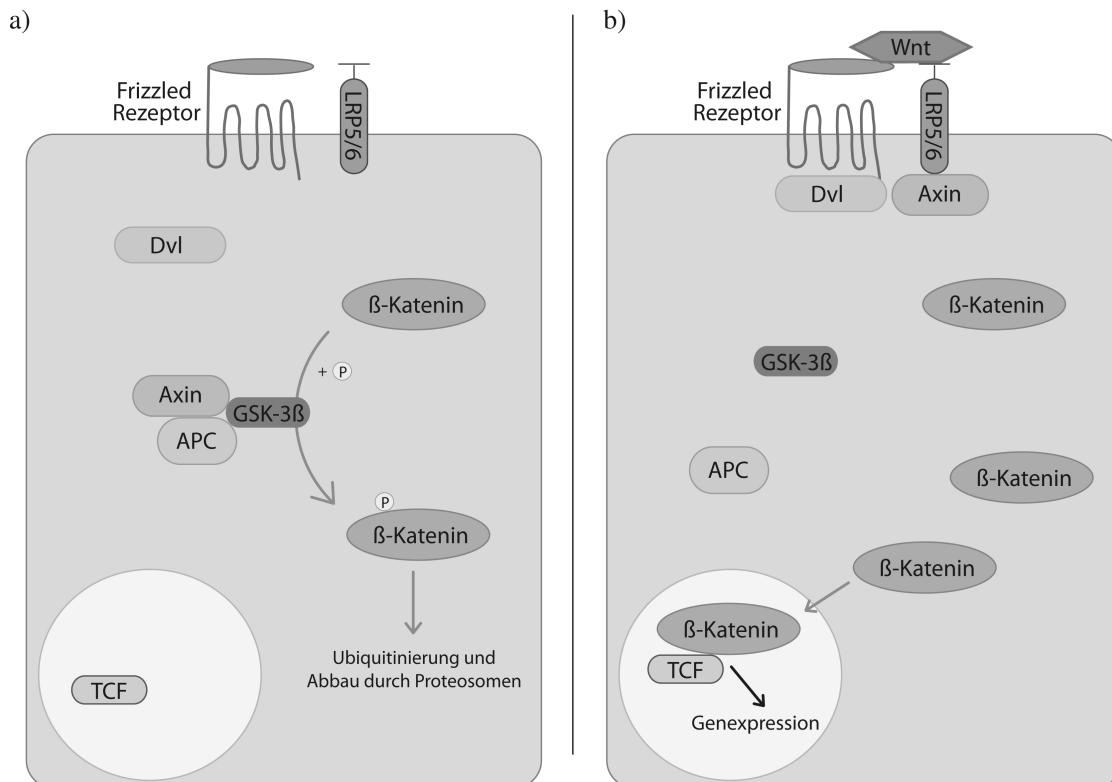


Abbildung 5. Wnt-Signalweg: a) In Zellen, an die kein Wnt-Protein gebunden ist, wird β -Katenin durch den Komplex aus Axin, APC und GSK-3 β markiert und anschließend durch Proteosomen abgebaut. b) Bindet Wnt an den Lrp5/6/Frizzled-Korezeptor, reagiert Dvl mit dem Frizzled-Rezeptor und Axin mit Lrp5/6 und Dvl. Dies führt zu einer Inaktivierung des abbauenden Komplexes und damit zu einer Stabilisierung von β -Katenin und dessen Translokation in den Zellkern, wo β -Katenin zu einer Transkription der Zielgene führt. (Nach: Kim et al., 2013)

an Lrp6-knockout-Mäusen beobachtet, die denen von Mäusen mit einer Mutation in Wnt-3a, Wnt-1 oder Wnt-7a Genen ähnelten. Mutationen in menschlichem Lrp5 äußern sich in niedriger oder sehr hoher Knochenmasse und zeigen damit die Wichtigkeit des Wnt-Signalweges für die Regulierung der Knochenmasse im adulten Knochen (Bonewald und Johnson, 2008).

2.14.2. Regulierung des Wnt-Signalweges

Angesichts der Bedeutung des Wnt-Signalweges ist es nicht verwunderlich, dass der kanonische Wnt-Signalweg einer komplexen Regulation unterliegt. Die endogenen Regulatoren des kanonischen Wnt-Signalweges können in extrazelluläre und intrazelluläre Antagonisten unterteilt werden. Zu den extrazellulären Inhibitoren gehören unter anderem Sklerostin, Dickkopf (Dkk), Wnt inhibitory factor 1/2 (Wif-1/2) und secreted frizzled-related protein (SFRP). Mehrere dieser Proteine spielen eine zentrale Rolle im Knochenstoffwechsel. Sie binden entweder mit den Wnt-Rezeptoren oder mit den Wnt-Liganden. Sklerostin und Dkk-1 zum Beispiel binden an den Korezeptor Lrp-5 und hemmen damit die Bindung von Wnt-Liganden an Lrp5. SFRP und Wif-1 hingegen binden direkt an den Wnt-Liganden und verhindern somit deren Bindung an den Lrp5/6/Frizzled-Korezeptor (Johnson und Kamel, 2007; Kim et al., 2013). Zu den intrazellulären Antagonisten gehören unter anderem Axin, Adenomatous polyposis coli (APC) und Groucho. Diese Antagonisten beeinflussen hauptsächlich die β -Katenin-Stabilität und -Lokalisierung (Rawadi und Roman-Roman, 2005).

2.14.3. Wnt-Signalweg und Knochen

Vieles von dem, was wir über den Wnt-Signalweg wissen, wurde von Versuchen an transgenen oder an Knockout-Mäusen hergeleitet, in denen wichtige Komponenten des Signalweges verändert wurden (Johnson und Kamel, 2007; Xu et al., 2014). Eine wichtige Schlussfolgerung aus den verschiedenen Versuchen ist, dass ein aktivierter Wnt/ β -Katenin-Signalweg positive Effekte auf die Knochenbildung hat, während eine Hemmung des Signalweges zu Osteopenie führt (Rawadi und Roman-Roman, 2005).

Die Wnt-Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Skelettentwicklung. Sie sind erforderlich für Prozesse, welche die Anlage der Kopf-Schwanz-Achse, die Gliedmaßenpolarität, die Neuralleistendifferenzierung, die Nierenentwicklung und die Geschlechtsbestimmung regulieren. Abnormale Expression von Wnt-Signalmolekülen während der embryonalen Entwicklung können zu Fehlbildungen führen. Wnt-Antagonisten sind allerdings ebenso wichtig (Rawadi und Roman-Roman, 2005; Agholme und Aspenberg, 2011). Zum Beispiel entwickeln Embryos, denen Dkk-1 fehlt, keinen Kopf (Mukhopadhyay et al., 2001), wohingegen ein Fehlen von Sklerostin nur die Entwicklung des Skeletts beeinflusst (Agholme und Aspenberg, 2011).

β -Katenin fördert die frühe Osteoblasten-Proliferation und Differenzierung und hemmt Osteoklasten. Eine präzise Regulierung des β -Katenin über den Wnt-Signalweg ist daher für eine gute Heilung erforderlich (Agholme und Aspenberg, 2011). Loss-of-function Mutationen von Lrp5 führen zu einer herabgesetzten Knochenmasse und im Menschen zum Osteoporose-Pseudoglioma-Syndrom. Dabei werden keine Abweichungen im Kollagen oder in anderen Knochenmatrix-Proteinen gefunden oder eine veränderte Morphologie im mineralisierten Knochen, sondern es wird schlicht zu wenig Knochen gebildet (Robling und Turner, 2009). Interessanterweise haben Mäuse wie auch Menschen, die eine Loss- oder Gain-of-Function-Mutation im Lrp5-Gen haben, eine veränderte Knochenbildung, ohne die resorbierenden Parameter zu beeinflussen. Diese Beobachtung weist darauf hin, dass Osteoblasten die wichtigsten Zielzellen der Wnt-Effekte im Knochen sind (Baron und Rawadi, 2007). Day et al. (2005) zeigten, dass β -Katenin essenziell ist für die Entscheidung, ob mesenchymale Progenitorzellen zu Osteoblasten oder Chondrozyten werden. Funktionsverlustmutationen, die das hemmende Protein Sklerostin betreffen, führen zu einer sehr hohen Knochenmasse und zu dem Krankheitsbild der van-Buchem-Erkrankung mit einer generalisierten kortikalen Hyperostose (Glass et al., 2005; Agholme und Aspenberg, 2011).

Neben der Knochenhaltung und -reparatur scheint der Wnt-Signalweg auch eine Rolle in der Antwort des Knochens auf mechanische Belastung zu haben. Mäuse mit einer Funktionsverlustmutation in Lrp5 zeigten neben einer geringen Knochenmasse auch eine Unfähigkeit, auf mechanische Stimulation mit einer anabolen Reaktion im Knochen zu reagieren (Sawakami et al., 2006). Der Wnt/Lrp5-Signalweg scheint daher eine wichtige Rolle in der Mechanotransduktion im Knochen zu spielen. Ein weiterer Hinweis besteht in der Beobachtung, dass Osteozyten eine große Bedeutung als Mechanosensoren im Knochen haben. Gleichzeitig sind Osteozyten die Hauptquelle von Sklerostin im Knochen. Robling et al. (2008) zeigten, dass mechanische Belastung zu reduziertem Sklerostin-Level im Knochen führt. Es besteht daher der Verdacht, dass Sklerostin über die Hemmung des Wnt-Signalweges eine wichtige Rolle in der Mechanotransduktion spielt. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass Dkk1 ebenfalls an der Antwort des Knochens auf mechanische Belastung beteiligt ist, allerdings in einem geringeren Maße (Robling et al., 2008).

β -Katenin ist wichtig für die Knochenheilung. Durch Regulierung des Wnt-Signalweges kann die Frakturheilung beeinflusst werden. Abhängig vom Stadium der Heilung scheint β -Katenin unterschiedliche Effekte auf den Knochen zu haben. Früh im Heilungsverlauf kontrolliert es das Verhältnis von Osteoblasten und Chondrozyten, die aus den pluripotenten Mesenchymzellen hervorgehen. Zu viel oder zu wenig an β -Katenin kann zu diesem Zeitpunkt schädlich für den Heilungsverlauf sein. Später fördert β -Katenin die Differenzierung von Osteoblasten und steigert die Produktion von Knochenmatrix (Chen et al., 2007; Agholme und Aspenberg, 2011). Kakar et al. (2007) zeigten, dass Lrp5- und -6-Rezeptoren vom ersten Tag der Fraktur an hochreguliert werden. In der gleichen Studie wurde beobachtet, dass unter PTH-Gabe Lrp5 und -6 weiter zunahm. Es scheint also eine Interaktion zwischen PTH, dem momentan einzigen anabolen Osteoporosemedikament, und dem Wnt-Signalweg zu geben.

2.15. SKLEROSTIN

Sklerostin ist ein Produkt des SOST-Gens und ein wichtiger negativer Regulator der Knochenbildung. Es ist einer der bisher am besten untersuchten Wnt-Antagonisten. Es wird hauptsächlich in Osteozyten gebildet, wurde aber auch schon in Zementozyten der Zähne, mineralisierten hypertrophen Chondrozyten der Wachstumsfuge und in osteoarthritischem Knorpel entdeckt (van Bezooijen et al., 2009). Die Wichtigkeit von Sklerostin im Körper wird durch die seltenen Erkrankungen Sklerosteose und van-Buchem-Erkrankung verdeutlicht. Sie werden durch Mutationen des SOST-Gens verursacht und führen

zu einer deutlich erhöhten Knochenmasse. Postmenopausale Frauen weisen ein höheres Sklerostinlevel auf als premenopausale Frauen mit einer signifikanten Korrelation zwischen Östrogen- und Sklerostin-Level sowie Parathormon- und Sklerostin-Level (Mirza et al., 2010). Männer haben einen höheren Sklerostinspiegel als Frauen, und in beiden Geschlechtern steigt der Sklerostinspiegel mit dem Alter (Mödder et al., 2011).

Sklerostin gehört zu einer Familie von Glykoproteinen, von denen viele Antagonisten von BMP und/oder Wnt sind. Es beeinträchtigt die Osteoblastenentwicklung *in vitro* durch Hemmung der Proliferation und Differenzierung von Osteoblasten. Des Weiteren stimuliert Sklerostin die Osteoblastenapoptose, ein weiterer Mechanismus, durch den es die Knochenbildung einschränkt (Sutherland et al., 2004; van Bezooijen et al., 2004; van Bezooijen et al., 2005b). Durch eine den Wachstumsfaktoren wie BMP oder Wnt entgegengesetzte Aktion könnte Sklerostin diese Effekte erreichen. Alternativ könnte es allerdings auch an bisher unbekannte Rezeptoren binden und so die Osteoblasten beeinflussen. Es wird angenommen, dass Sklerostin von den Osteozyten an die Knochenoberfläche transportiert wird, wo es dann die Knochenbildung der Osteoblasten behindert. Die Möglichkeit, dass Sklerostin direkt an den Osteozyten wirkt, welche dann ein hemmendes Signal an die Osteoblasten senden, kann allerdings noch nicht ausgeschlossen werden (ten Dijke et al., 2008). In SOST-knockout-Mäusen wurde eine erhöhte Knochenmasse gesehen mit einer Knochenbildung an den typischen Skelettoberflächen, an denen neuer Knochen gebildet wird, die Oberfläche des trabekulären Knochens und die interne und externe Oberfläche des kortikalen Knochens (Li et al., 2009).

Da beobachtet wurde, dass Sklerostin der BMP-induzierten Osteoblastendifferenzierung entgegenwirkt, lag die Vermutung nahe, dass Sklerostin BMP hemmt (Brunkow et al., 2001). Sklerostin bindet allerdings nur schwach an BMPs, und es wurden keine direkten hemmenden Effekte von Sklerostin auf die BMP-induzierte Antwort beobachtet (ten Dijke et al., 2008). Li et al. (2005) fanden heraus, dass Sklerostin mit einer hohen Affinität an Lrp5/6 bindet und damit deren Bindung mit Frizzled Rezeptor und Wnts verhindert. Der Signalweg, über den Sklerostin agiert, ist bisher nicht komplett verstanden, und es gibt Hinweise, dass weitere Wege neben denen über BMP und Lrp existieren (Wijenayaka et al., 2011).

Wie bereits oben erwähnt, scheint Sklerostin auch eine Rolle in der Mechanotransduktion zu spielen. Durch seine hohe Affinität, an Lrp5/6 zu binden, die wichtiger Bestandteil der Mechanotransduktionskaskade sind, ist Sklerostin ein attraktiver Kandidat, um die mechanisch induzierten Signale im Knochen zu regulieren. Robling et al. (2008) zeigten, dass SOST-Transkription und Sklerostin-Level in der belasteten Gliedmaße im Vergleich zur weniger belasteten stark sanken. Lin et al. (2009) beobachteten, dass mechanisch gering belastete Wildtyp-Mäuse eine herabgesetzte Wnt/ β -Katenin-Signalaktivität und eine Hochregulierung von SOST aufwiesen. Des Weiteren scheinen SOST-knockout-Mäuse auf reduzierte mechanische Belastung nicht mit einem Knochenverlust zu reagieren. In einem Mausmodell mit transgen veränderten Tieren wurde die Rolle von Sklerostin während mechanischer Belastung näher untersucht. Mäuse, in denen humanes SOST in den Osteozyten exprimiert wurde, das nicht durch mechanische Stimulation herabreguliert wird, zeigten keine anabole Antwort auf mechanische Belastung. Des Weiteren wurde in diesen transgenen Mäusen im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen keine durch Belastung induzierte Wnt-Zielgen-Expression beobachtet. SOST-Downregulierung in den Osteozyten scheint daher essenziell für die gesteigerte Knochenbildung als Antwort auf Belastung zu sein und ist damit ein zwingender Schritt der Mechanotransduktion (Tu et al., 2012).

2.16. SKLEROSTEOSE UND VAN-BUCHEM-ERKRANKUNG

Sklerosteose und van-Buchem-Erkrankung sind zwei autosomal rezessiv vererbte Krankheiten mit einem ähnlichen Phänotyp. Untersuchungen an Sklerosteose- und van-Buchem-Patienten führten zur Entdeckung des SOST-Gens (Balemans et al., 2001).

Der Begriff "Sklerosteose" wurde das erste Mal 1967 von Hansen verwendet (Hansen, 1967), 1929 wurde die Krankheit allerdings schon zum ersten Mal beschrieben (Hirsch, 1929; van Bezooijen et al., 2005b). Es handelt sich um eine seltene Skeletterkrankung, die mit einem stark erhöhten Knochenwachstum, erhöhter Knochendichte, -volumen und -stärke einher geht (Brunkow et al., 2001). Vor allem der Schädel und der Unterkiefer sind betroffen, aber auch in den Rippen, dem Schlüsselbein, dem Becken,

der Diaphyse der langen Knochen und den Finger- und Zehenknochen wird eine Vergrößerung mit verdickter Kortikalis und erhöhter Dichte beobachtet (Balemans et al., 2005). Diese Veränderungen äußern sich in Gigantismus, Verformung des Gesichtsschädels und Einengung des siebten und achten Hirnnerves. Ebenso kann es zu einer Prognathie sowie einer Prominenz des Os Frontale kommen. Betroffene Kinder zeigen bei der Geburt meist keine Auffälligkeiten bis auf eine häufig vorkommende Syndaktylie, die insbesondere den 2. und 3. Finger betrifft. Eine exzessive Zunahme der Schädelkalotte kann im späteren Verlauf zu einer Erhöhung des intrakraniellen Druckes führen und prädisponiert für einen plötzlichen Tod durch Druck auf das Gehirn im Foramen magnum (Brunkow et al., 2001). Klinische Konsequenzen dieser Veränderungen können Taubheit, Sehstörungen, Gesichtslähmungen und neurologische Schmerzen sein (Balemans et al., 2005).

Histologisch lassen sich verdickte Trabekel und Kortizes beobachten, die mit einer erhöhten Knochendichte einhergehen. In Knochenbiopsien wurden überwiegend kubische, aktiv erscheinende Osteoblasten und ein erhöhtes Maß an Ostoid, das normal mineralisiert war, gefunden (van Bezooijen et al., 2005b). In einer retrospektiven Studie wurden röntgenologische Merkmale von 6 bis 69 Jahre alten Patienten mit van-Buchem-Erkrankung verglichen, wobei die Merkmale in älteren Patienten ausgeprägter waren. Diese Beobachtung führte zu der Annahme, dass der Anstieg der Knochendichte ein Leben lang anhält (Vanhoenacker et al., 2003).

Über 60 Fälle von Sklerosteose wurden inzwischen dokumentiert, wobei überwiegend Südafrikaner betroffen sind. Es handelt sich um Nachkommen weißer Farmer, die sich im 16. Jahrhundert von der Niederländischen Ostindien-Kompanie getrennt hatten und in das Hinterland von Südafrika gezogen waren. Vereinzelt Fälle wurden auch in den USA, der Schweiz, Japan, Brasilien und Spanien beschrieben (Brunkow et al., 2001; van Bezooijen et al., 2005b).

Die van-Buchem-Erkrankung wurde das erste Mal 1955 noch unter dem Namen "Hyperostosis corticalis generalisata familiaris" beschrieben. Bisher wurden nur weniger als 30 Fälle weltweit dokumentiert, die hauptsächlich in einem kleinen Fischerdorf in den Niederlanden auftraten. Die van-Buchem-Erkrankung ist der Sklerosteose in ihrem Phänotyp ähnlich, hat aber einen eher benignen Verlauf, und eine Syndaktylie wird nicht beobachtet. Frakturen wurden in keinem der Patienten mit Sklerosteose und van-Buchem-Erkrankung beobachtet (van Bezooijen et al., 2005b).

Beide Krankheitsbilder werden zusammen als endostale Hyperosteose klassifiziert und die Frage nach der syndromischen Gleichheit wurde lange diskutiert. Da die afrikanischen Patienten niederländische Vorfahren haben, ist es möglich, dass diese beiden Krankheiten eine grundlegende genetische Verbindung haben (Beighton et al., 1984). Durch die Beobachtung, dass die Sklerosteose ebenso wie die van-Buchem-Erkrankung in einer Störung auf dem Chromosom 17 beruhen, wurde diese Annahme verstärkt. 2001 wurden loss-of-function Mutationen auf einem neuen Gen (SOST-Gen) entdeckt, welche sich für die Sklerosteose verantwortlich zeigten (Brunkow et al., 2001; Balemans et al., 2001). SOST kodiert für das Protein Sklerostin, welches in den Knochen von Sklerosteosepatienten, aber auch in Patienten mit van-Buchem-Erkrankung, nicht vorhanden ist (van Bezooijen et al., 2005a). In Patienten der van-Buchem-Erkrankung wurde keine solche Mutation im SOST-Gen gefunden. Allerdings lässt sich eine 52-kb-Deletion, welche sich 35 kb downstream des SOST-Gens befindet, erkennen. Da diese Deletion scheinbar nicht für ein bestimmtes Gen kodiert, wird vermutet, dass sie die SOST-Expression unterdrückt und damit die Sklerostinbildung hemmt (Balemans et al., 2005; van Bezooijen et al., 2005b). Studien an transgenen Mäusen zeigten, dass eine Überexpression von normalen humanen SOST-Allelen in Mäusen zu einer Osteopenie führen. Weiterhin wurde gezeigt, dass in der Region, die bei der van-Buchem-Erkrankung gelöscht ist, ein Verstärkungselement liegt, das die SOST-Expression im Skelett fördert (Loots et al., 2005; ten Dijke et al., 2008). Beide Erkrankungen stellen sozusagen ein natürliches SOST-knockout-Modell im Menschen dar, welches wegweisend für die Entwicklung der Sklerostin-neutralisierenden Antikörper als anabole Knochentherapie war.

2.17. GEGENWÄRTIGE PHARMAKOLOGISCHE THERAPIEOPTIONEN IN DER KNOCHENREGENERATION

Die Osteoporose stellt ein wachsendes medizinisches und sozialökonomisches Problem der Industrieländer dar, dessen Bedeutung durch den demographischen Wandel der Bevölkerung weiter zunehmen

wird. Eine Reihe an Schlüsselmolekülen der Knochenregeneration wurden bereits identifiziert und befinden sich schon in klinischer Anwendung oder werden dahingehend untersucht (Dimitriou et al., 2011; Lippuner, 2012). Ausgehend von den Mechanismen kann man die Stoffe grob in antiresorptive Präparate, welche hauptsächlich die Osteoklastenaktivität unterdrücken, und in anabole Stoffe, welche die Osteoblastenaktivität verbessern, unterteilen (Demontiero et al., 2012). Zu allen Behandlungsstrategien der Osteoporose wird eine Kalzium und Vitamin D Supplementation empfohlen (Das und Crockett, 2013). Beide stimulieren die Mineralisation von Knochen und haben einen antiresorptiven Effekt durch die Hemmung von PTH im Serum (Langdahl und Harslof, 2011).

2.17.1. *Antiresorptiva*

Stickstoffhaltige Bisphosphonate sind Mittel der ersten Wahl für die Behandlung der Osteoporose. Sie haben einen deutlichen hemmenden Effekt auf die osteoklastenmedierte Knochenresorption. Sie steigern die Osteoklastenapoptose und hemmen die Osteoklasten, Knochen zu resorbieren. Des Weiteren gibt es Hinweise, dass Bisphosphonate die Osteoblastenproliferation und -reifung fördern (Goodship et al., 1994; Peter et al., 1996).

Es gibt unterschiedliche Bisphosphonate, unter anderem Alendronat, Risedronat und Ibadronat, die sich in ihrem Nebenwirkungsprofil, ihrer Verträglichkeit und der Komplikationsrate unterscheiden. Die meisten von ihnen reduzieren das Frakturrisiko bei postmenopausaler Osteoporose, und einige Medikamente senken auch das Risiko von Femurhalsfrakturen und glucocorticoid-induzierter Osteoporose (Johnson-Lynn et al., 2008; Langdahl und Harslof, 2011; Demontiero et al., 2012).

Denosumab ist ein humaner monoklonaler Antikörper gegen RANKL. RANKL fördert durch Bindung an RANK die Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen und die Aktivierung von Osteoklasten. Denosumab verhindert, dass RANKL an RANK bindet, wodurch die Osteoklasten und ihre Vorläuferzellen gehemmt werden. Dadurch wird die Knochenresorption verhindert und die Knochenmasse und -stärke im kortikalen Knochen wie auch in der Spongiosa gesteigert (Lippuner, 2012). Studien an postmenopausalen Frauen, die alle 3-6 Monate Denosumab injiziert bekamen, zeigten eine erhöhte Knochendichte und ein reduziertes Frakturrisiko (McClung et al., 2007; Cummings et al., 2009). Da RANKL nicht nur in Knochenzellen, sondern auch in Immunzellen exprimiert wird, lag der Verdacht nahe, dass eine Langzeitanwendung von Denosumab auch Effekte auf das Immunsystem haben könnte. Bisher wurde eine erhöhte Rate von Ekzemen, Neoplasien und Infektionen in der mit Denosumab behandelten Gruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe beobachtet. Die Vorteile von Denosumab sind die nur zweimal jährliche Injektion, das Fehlen gastrointestinaler Nebenwirkungen, die Reversibilität, da RANKL nicht in den Knochen eingebaut wird, und die Schonung der Nieren, da es nicht renal ausgeschieden wird (Demontiero et al., 2012).

Es gibt noch weitere antiresorptive Medikamente, unter anderem Calcitonin, welches ein Hormon der Schilddrüse und ein Antagonist des Parathormons ist. Es senkt den Serumkalziumspiegel durch eine verminderte Absorption von Kalzium aus dem Darm und eine herabgesetzte Reabsorption der Niere. Des Weiteren senkt es die Osteoklastenaktivität und reduziert dadurch die Knochenresorption (Johnson-Lynn et al., 2008; Das und Crockett, 2013). Es scheint, dass die Calcitoningabe nicht so effektiv wie andere Medikamente die Knochendichte verbessert und das Frakturrisiko senkt (Downs et al., 2000). Es gibt derzeit Hinweise, dass die Calcitoningabe mit einem erhöhten Krebsrisiko einhergeht, daher wird die Anwendung von Calcitonin von der European Medicines Agency inzwischen nicht mehr empfohlen (European Medicines Agency, 2012; Overman et al., 2013).

Hormonersatztherapie und selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren werden seit den letzten Jahren nicht mehr empfohlen. Sie bewirken eine Hemmung der Osteoklastenbildung und -aktivierung durch eine reduzierte Produktion von RANKL. Hormontherapie wurde lange Jahre zur Prävention und Behandlung der postmenopausalen Osteoporose eingesetzt und es wurde auch nachgewiesen, dass sie zu einer Verbesserung der Frakturheilung führt. Allerdings wurde auch ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs und kardiovaskuläre Erkrankungen beobachtet. Daher wird es heute nicht mehr zur Osteoporosebehandlung empfohlen (Langdahl und Harslof, 2011; Demontiero et al., 2012).

Um die unerwünschten Effekte der Hormontherapie auszuschalten, wurden die selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren untersucht. Sie binden in unterschiedlicher Weise an die Östrogenrezeptoren. Man-

che Effekte sind ähnlich zu denen von Östrogenen, wie zum Beispiel der Schutz vor Knochenresorption. Andere Effekte sind entgegengesetzt, wie das Risiko für Brustkrebs. Der selektive Östrogenrezeptor-Modulator Raloxifen senkt das Brustkrebsrisiko um mehr als 60%. Allerdings führt es zu einem erhöhten Risiko für venöse Thromboembolien, periphere Ödeme und Hitzewallungen (Demontiero et al., 2012; Das und Crockett, 2013).

Strontiumranelat scheint eine Mischform aus Anabolikum und Antiresorptivum zu sein durch eine Steigerung der Knochenbildung und eine Senkung der Knochenresorption. Dies erfolgt durch eine erhöhte Osteoblastenreplikation, -differenzierung und -aktivierung, eine Steigerung des Osteoprotegrin/RANKL-Verhältnisses und eine erhöhte Osteoklastenapoptose (Demontiero et al., 2012). Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht vollständig verstanden. Es senkt das Frakturrisiko und steigert die Knochendichte und kann neben Übelkeit auch zu Dermatitis, venösen Thromboembolien und Kopfschmerzen führen (Langdahl und Harslof, 2011; Das und Crockett, 2013).

2.17.2. Anabolika

PTH, welches in der Nebenschilddrüse gebildet wird, hat gegensätzliche Effekte auf den Knochen. Eine kontinuierliche, hohe Hormonausschüttung, wie es zum Beispiel bei chronischer Nierenerkrankung oder primärem Hyperparathyreoidismus der Fall sein kann, kann zu einem katabolen Effekt auf den Knochen führen. Ein anaboler Effekt auf den Knochen wird durch eine nur kurze Exposition einer hohen PTH-Konzentration erreicht (Poole und Reeve, 2005). Es gibt einige Tierstudien, die zeigen, dass intermittierende Parathormongaben die Regeneration von trabekulärem und kortikalem Knochen steigern und die Kallusbildung verbessern. Sie erhöhen die Knochenmasse und steigern die Knochenstärke und -dichte (Andreassen et al., 1999; Andreassen et al., 2001; Dimitriou et al., 2011). Zwei PTH-Analoga werden bereits klinisch in der Behandlung der Osteoporose eingesetzt (Johnson-Lynn et al., 2008; Dimitriou et al., 2011; Meier et al., 2014).

Teriparatid ist ein Parathormon-Analogon, welches bereits klinisch angewendet wird. Es steigert die Knochenbildung und wirkt dem Auftreten von osteoporotischen Frakturen entgegen. Als alleinige Medikation kann es die Knochendichte in der Lendenwirbelsäule und dem Femurhals steigern. Ebenso kann es auch in Kombination mit unterschiedlichen Antiresorptiva eingesetzt werden (Leder et al., 2014; Song et al., 2014).

BMPs sind die bisher am besten untersuchten dieser Moleküle. Es handelt sich um eine Gruppe von circa 20 (im Menschen) verschiedenen Proteinen, die eine Subgruppe der TGF- β -Superfamilie darstellen. BMPs steigern die Knochenregeneration und die Frakturheilung, wobei allerdings nicht alle osteogenes Potential haben. Im Knochen werden BMPs in Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten, Chondrozyten und Thrombozyten gebildet. Sie induzieren eine Reihe von Ereignissen, die die Chondrogenese, Osteogenese und Angiogenese fördern (Lissenberg-Thunnissen et al., 2011). BMPs regen mesenchymale Stammzellen und andere Knochenvorläuferzellen zur Mitose und zur Differenzierung zu Osteoblasten an. Die Wirkung von BMPs hängt unter anderem von der Zielzelle, der lokalen Konzentration der BMPs und deren Interaktion mit anderen Proteinen ab (Lissenberg-Thunnissen et al., 2011; Dimitriou et al., 2011). In Studien an osteopenischen Mäusen kehrte recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) den Knochenverlust dieser Tiere wieder um (Turgeman et al., 2002). Daher scheint es relevant für den Einsatz in Osteoporosepatienten und bei osteoporotischen Frakturen. Rekombinantes BMP-2 und BMP-7 sind in den USA seit 2001 bzw. 2002 für den klinischen Gebrauch zugelassen und werden bei nicht heilenden Frakturen, offenen Frakturen, Gelenkversteifungen und aseptischer Knochennekrose angewendet (Govender et al., 2002; Kanakaris et al., 2008; Dimitriou et al., 2011). Seit 2001 besteht in Europa eine Zulassung für rhBMP-7 zur Behandlung von Pseudarthrosen langer Röhrenknochen. Trotz vielversprechender erster Studien hat sich die Anwendung von rhBMP-2 und rhBMP-7 als suboptimal und unbeständig herausgestellt. Zu seitdem beobachteten Nebenwirkungen gehören in erster Linie immunologische Reaktionen auf das rekombinante BMP, die allerdings positiv korreliert zu der Dosis sind. Des Weiteren wurden im Tiermodell unter hohen Dosen an BMP ektopische Knochenbildung und Weichteilgewebsschwellungen beobachtet (Lissenberg-Thunnissen et al., 2011).

2.17.3. *Neue Ansätze der Osteoporose-Therapie*

Es befinden sich momentan neue Medikamente in der Erforschung. Neben den Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern, auf die im nächsten Kapitel näher eingegangen wird, sind das vor allem Cathepsin-K-Inhibitoren. Deren Zielobjekt ist Cathepsin K, eine Cystein-Protease, die von Osteoklasten freigesetzt wird. Sie spielt eine wichtige Rolle im enzymatischen Knochenabbau und der Auflösung der organischen Matrix (Wang et al., 2005a; Das und Crockett, 2013). Ein Defizit an Cathepsin K ist verantwortlich für die seltene Knochenerkrankung Pycnodysostosis, die durch nicht funktionierende Osteoklasten charakterisiert ist (Blair und Athanasou, 2004). Da Cathepsin K nicht die Differenzierung und Apoptose der Osteoklasten und damit deren Anzahl beeinflusst, sondern nur die Resorptionsstärke bestimmt, führt die Hemmung von Cathepsin K zur Suppression der Osteoklastenfunktion bei Erhalt ihrer Vitalität. Dadurch kann ein Osteoklasten-Osteoblasten-Kontakt erhalten bleiben und damit die Osteoblastenrekrutierung und -funktion (Rachner et al., 2011; Das und Crockett, 2013).

Odanacatib ist der zur Zeit am besten entwickelte Cathepsin K Inhibitor, der die Knochenresorption hemmt, während die Knochenbildung erhalten bleibt. Er ist hoch selektiv und bindet reversibel an Cathepsin K. Weniger selektive Stoffe zeigten mehr Nebenwirkungen. Odanacatib ist daher momentan der einzige Cathepsin K Inhibitor, der klinisch getestet wird. In einer Phase-2-Studie zeigte Odanacatib nach 24 Monaten eine Erhöhung der Knochendichte in dem proximalen Femur und der Lendenwirbelsäule im Vergleich zur Placebo-Gruppe, und es wurde generell gut toleriert (Bone et al., 2010; Rachner et al., 2011). Es steigert die Knochenstärke und scheint auch das Frakturrisiko zu senken. Es scheint, dass Odanacatib eine wichtige Rolle in der Zukunft der Osteoporosebehandlung spielen könnte (Chapurlat, 2014).

2.18. HEMMUNG DES WNT-SIGNALWEGS ALS THERAPIEOPTION

Wnt-abhängige Ansammlungen von β -Catenin sind ein wesentlicher Auslöser für die Osteoblastendifferenzierung und Knochenbildung. Der Wnt-Signalweg ist daher zu einem attraktiven therapeutischen Angriffspunkt in der Behandlung von Knochenerkrankungen wie Osteoporose und Frakturheilung und bei nicht heilenden Frakturen geworden (Rachner et al., 2011). Dieser Signalweg kann auf verschiedenen Ebenen beeinflusst werden: neben den Wnt-Rezeptoren direkt können auch die Wnt-Antagonisten oder die intrazellulären Mediatoren manipuliert werden. Hierbei ist vor allem die Hemmung der extrazellulären Antagonisten Sklerostin und Dkk-1 ins Blickfeld geraten (Kim et al., 2013).

Das Protein Sklerostin ist ein Produkt des SOST-Gens. Es hemmt die Bindung von Wnt-Liganden an den Lrp5/6-Rezeptor auf Osteoblasten und wirkt dadurch der Knochenbildung entgegen. Wenn Sklerostin anwesend ist, werden die Osteoblastenvorläuferzellen nicht dem Wnt-Signal ausgesetzt. Dadurch wird β -Katenin herabgesetzt und die Osteoblastendifferenzierung und -rekrutierung gestoppt (Lippuner, 2012; Das und Crockett, 2013). Mutationen des SOST-Gens, wie sie in Patienten mit Sklerosteose und van-Buchem-Erkrankung beobachtet werden, führen zu einer erhöhten Knochenmasse (Brunkow et al., 2001). SOST-knockout-Mäuse zeigen einen beiden Krankheiten ähnlichen Phänotyp mit einer hohen Knochenmasse und einer gesteigerten Knochendichte und -stärke, sowie einem gesteigerten Knochenvolumen (Li et al., 2008). Antikörper gegen Sklerostin steigern folglich β -Katenin und damit die Knochenbildung, was bereits in einigen Studien nachgewiesen werden konnte. In einer Studie an ovariectomierten Ratten, die Sklerostin-neutralisierende Antikörper in einer Menge von 25mg/kg zweimal pro Woche erhielten, wurde eine Steigerung der Knochenmasse an trabekulären, periostalen, endokortikalen und intrakortikalen Oberflächen beobachtet. Es kam nicht nur zu einem Ausgleich des Knochenverlustes durch das Östrogendefizit, sondern es wurde sogar ein Anstieg der Knochenmasse über die der nicht-ovarektomierten Tiere beobachtet (Li et al., 2009). Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass die Behandlung mit Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern die Anzahl und Aktivität der Osteoblasten steigert (Ke et al., 2012). Auch in Frakturheilungsstudien wurde eine Verbesserung der Heilung unter Gabe von Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern bei Nagetieren und nicht-menschlichen Primaten beobachtet, mit signifikanter Steigerung der Knochenmasse in der Frakturregion und Stärkung der Frakturverbindung. 10 Wochen nach einer fibularen Osteotomie an Cynomolgus-Affen führte die Gabe von Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern zu einem kleineren, knorpeligen Kallus und einem schmaleren Frakturspalt mit mehr Knochen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Agholme et al., 2010; Ominsky et al.,

2011). Diese Ergebnisse sind nicht überraschend, da bereits bei SOST-knockout-Mäusen eine verbesserte Frakturheilung mit einem reiferen Kallus in der frühen Heilungsphase und einem stärkeren Kallus in der späteren Phase der Heilung beobachtet wurde (Li et al., 2011).

Sklerostin scheint wesentlich für die Antwort des Knochens auf mechanische Belastung zu sein. Sklerostin wird während mechanischer Entlastung hoch reguliert, was mit einer reduzierten Knochendichte einhergeht. Belastung führt zu einer herabgesetzten SOST-Transkription und zu niedrigeren Sklerostin-Level (Robling et al., 2008). Tian et al. (2011) beobachteten in Ratten mit einer Immobilisation des rechten Hinterbeins unter Gabe von Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern eine Steigerung von Knochenmasse und Mineralisation im Vergleich zu immobilisierten Kontrollgruppe ohne Sklerostin-Antikörpergabe. Agholmen et al. (2011) untersuchten die Knochenheilung in belasteten und unbelasteten Knochen. Sklerostin-neutralisierende Antikörper steigern demnach die Knochenbildung und verbessern die Schraubenfixation im belasteten und im unbelasteten Knochen in gleichem Maße. Diese Resultate weisen darauf hin, dass die Hemmung von Sklerostin mit Hilfe von Antikörpern zu einem Schutz vor Knochenverlust durch Immobilisierung beiträgt.

Momentan befinden sich die Sklerostin-neutralisierenden Antikörper noch in der klinischen Testphase. In einer klinischen Phase-1-Studie wurden monoklonale Sklerostin-neutralisierende Antikörper einmalig in einer Dosis von 0,1 - 10mg/kg subkutan oder 1 oder 5mg/kg intravenös an gesunde Männer und postmenopausale Frauen verabreicht. Nach maximal 85 Tagen, abhängig von der verabreichten Dosis, wurde ein dosis-abhängiger Anstieg an Knochenbildungsmarkern (Prokollagen type 1 N-propeptide, knochenspezifische alkalische Phosphatase und Osteokalzin) und ein Abfall an Knochenresorptionsmarkern (Serum C-telopeptide) beobachtet. Dies weist auf ein breites Fenster anabolischer Wirkung hin. Des Weiteren wurde über eine erhöhte Knochendichte in der Lendenwirbelsäule und dem Femurhals im Vergleich zur Kontrollgruppe berichtet. Die Antikörpergabe wurde gut vertragen (Padhi et al., 2011). Sklerostin-neutralisierende Antikörper sind die bisher einzigen bekannten Wirkstoffe, die in der Lage sind, im menschlichen Körper gleichzeitig die Knochenbildung zu stimulieren und die Knochenresorption zu hemmen (Ke et al., 2012). In einer klinischen Dosis-Wirkungs-Studie erhielten postmenopausale Frauen und Männer mit einer niedrigen Knochenmasse 6 beziehungsweise 3 Dosen Sklerostin-neutralisierender Antikörper von 1-3 mg/kg alle zwei oder vier Wochen. Es wurde ein Anstieg von Typ-1 aminoterminalen Propeptid im Serum und ein Abfall von Serum-C-Telopeptid beobachtet und ein Anstieg der Mineraleichte in der Lendenwirbelsäule. Unerwünschte Ereignisse waren in allen Gruppen aufgetreten, ohne besondere Hinweise bezüglich ungünstiger Verträglichkeiten (Padhi et al., 2014).

Ein erhöhtes Wnt-Signaling wurde allerdings schon mit einem erhöhten Risiko für kolorektale und hepatozelluläre Tumoren in Verbindung gebracht. Während in Patienten von van-Buchem-Erkrankung und Sklerosteose über kein erhöhtes Vorkommen von solchen Tumoren berichtet wurde, sollte bei der Langzeitgabe von Wnt-Antagonisten besonderes Augenmerk darauf gelegt werden (Giles et al., 2003; Rachner et al., 2011).

Dkk-1 ist ebenso wie Sklerostin ein extrazellulärer Antagonist des Wnt-Signalweges und ist assoziiert mit dem Auftreten von osteolytischen Läsionen in Patienten mit multiplem Myelom (Lippuner, 2012). Eine Hemmung von Dkk-1 in Mäusen führte zu einer erhöhten Knochenmasse und einer gesteigerten Knochenbildung (Morvan et al., 2006). Die Neutralisierung von Dkk-1 ist daher eine weitere therapeutische Möglichkeit, die momentan erforscht wird. Dkk-1-Antikörper steigern die trabekuläre Knochenmasse und Knochendichte in Mäusen und stellen die Knochendichte in osteopenischen Mäusen wieder her (Glantschnig et al., 2010; Glantschnig et al., 2011). Ebenso wurde eine stimulierende Wirkung auf die Heilung von Frakturen und auf die Implantatfixierung beobachtet (Agholme et al., 2011a). Dkk-1-Antikörper unterdrücken die Hemmung von Osteoblasten in einem Multiplen-Myelom-Mausmodell und hemmen die Osteoklasten (Fulciniti et al., 2009). Solche Antikörper werden derzeit in Patienten mit refraktärem multiplem Myelom untersucht. Die Wirkung der Antikörper in Osteoporosepatienten wurde bisher noch nicht weiter erforscht (Rachner et al., 2011).

Da der Wnt-Signalweg nicht spezifisch für das Knochengewebe ist, kann eine gesteigerte Aktivierung des Wnt-Signalweges zu Konsequenzen außerhalb des Knochens führen. Eine Proliferation und Erneuerung von Stammzellen als Konsequenz dieser gesteigerten Signalkaskade trägt das Risiko, Krebs auszulösen. Ein solches erhöhtes Risiko wurde bereits für einige Mutationen von Wnt-Signalmediatoren,

wie unter anderem β -Katenin und Axin, festgestellt (Kim et al., 2013). Mutationen von β -Katenin zum Beispiel können zu verschiedenen Krebsarten führen, unter anderem Hepatoblastomen, Haarfollikeltumoren und Leukämie (Polakis, 2007). Jede externe Beeinflussung des Signalweges sollte daher eingehend auf das potentielle onkogene Risiko untersucht werden. Im Bereich des Knochens betrifft das vor allem das Osteosarkomrisiko. Entgegengesetzt ist es vorstellbar, dass eine therapeutische Hemmung des Wnt-Signalweges als Anti-Krebstherapie eingesetzt werden könnte. Es werden daher weitere Studien benötigt, die das optimale Level der Beeinflussung des Wnt-Signalweges zur Behandlung von osteogenen Erkrankungen herausfinden, so dass das Krebsrisiko minimiert wird (Kim et al., 2013).

2.19. DIE MAUS ALS TIERMODELL

Nagetiere sind heute aus der Forschung nicht mehr wegzudenken und ein wichtiger Bestandteil der Erforschung des muskuloskeletalen Systems. Vor allem Mäuse und Ratten sind durch ihren kurzen Reproduktionszyklus schnell und leicht zu züchten, und ihre Zucht ist mit einem relativ geringen Kostenaufwand verbunden. Im Vergleich zu großen Tieren, wie Schafen und Hunden, kann eine hohe Anzahl von Tieren auf einer geringen Fläche untergebracht werden. Operationen können bei Ratten und Mäusen meist von einer Person durchgeführt werden, wohingegen bei großen Tieren mehr Personal für die Operationen und die Pflege benötigt werden. Im Hinblick auf Studien zur Knochenheilung ist die kürzere Heilungsdauer von Frakturen bei Nagetieren im Gegensatz zu größeren Tieren ein weiterer wichtiger Aspekt. Alle diese Fakten zusammen genommen, können in Studien, die mit Hilfe von Nagetieren durchgeführt werden, mehr Tieren in einer kürzeren Zeit untersucht werden. Durch die Entwicklung einer Vielzahl an genetisch modifizierten Stämmen und ein breites Spektrum an verfügbaren Antikörpern gegen Mausproteine, lassen Studien an diesen Tieren einen tieferen Einblick in die molekularen Mechanismen der Frakturheilung zu. Diese Möglichkeiten haben ein ganz neues Feld der Forschung eröffnet (Histing et al., 2011; Garcia et al., 2013).

Tiermodelle zur Untersuchung der Pathophysiologie von verzögerter Frakturheilung und nicht heilenden Frakturen sollten standardisiert sein und vor allem die klinische Situation im Menschen widerspiegeln. Während in der Vergangenheit hauptsächlich größere Tiere wie Schafe, Hunde und Kaninchen für Frakturstudien zum Einsatz kamen, da deren Knochenheilung ähnlich der des Menschen ist und Daten daher leichter übertragen werden können, wuchs später der Anteil an Ratten und Mäusen (Histing et al., 2011). Lange Zeit wurden Nagetiere nicht als Versuchstiere in der Knochenforschung eingesetzt auf Grund ihres fehlenden Epiphysenfugenschlusses, des fehlenden Havers-Systems und der fehlenden Menopause (Conn, 2013). Die frühere Ansicht, dass Ratten und Mäuse durch ihre primitive Knochenstruktur ohne ein Havers-System schlechter für Knochenheilungsstudien geeignet sind, hat sich geändert. Die kleinen Nagetiere betreiben Knochenremodeling mit Hilfe von Resorptionskavernen und es hat sich gezeigt, dass dieser Vorgang ähnlich dem Remodeling mit Havers-Kanälen in großen Tieren ist. Die Kortikalis der Diaphyse in jungen Mäusen besteht größtenteils aus Geflechtknochen. Mit dem Älterwerden nimmt der Knochendurchmesser der Diaphyse durch Bildung von umlaufendem Lamellenknochen an der äußeren Knochenoberfläche zu und Knochen an der inneren Oberfläche wird abgebaut. Dadurch sinkt der Anteil an Geflechtknochen. Der kortikale Knochen der Maus enthält keine oder sehr wenige Osteone und unterliegt nicht dem Havers-Remodeling, allerdings kommt es mit dem Älterwerden der Maus durch Resorption an der endokortikalen Oberfläche zu mit Knochenmark gefüllten, intrakortikalen Poren (Treuting und Dintzis, 2012). Das Fehlen der Havers-Kanäle ist kein Ausschlussgrund mehr für solche Frakturstudien (Histing et al., 2011), und folglich werden inzwischen Frakturstudien zu knapp der Hälfte an Ratten und Mäusen durchgeführt (Garcia et al., 2013). Nichtsdestotrotz stieg die Zahl der Frakturstudien von verzögerten und nicht-heilenden Frakturen erst während der letzten Jahre deutlich an. Dies kann damit begründet werden, dass Ratten und Mäuse eine höhere Heilungskapazität haben als andere Tiere. In diesen Tieren heilen meist auch Frakturen mit einer schlechten oder gar keinen Fixierung ohne eine signifikante Verzögerung der Heilung (Histing et al., 2011; Garcia et al., 2013).

In Mäusen liegt die höchste Knochenmasse in einem Alter von 4 bis 6 Monaten vor. Das Längenwachstum der Knochen endet nicht mit der Geschlechtsreife, aber es verlangsamt sich stark nach den ersten 3 Lebensmonaten. Die Wachstumsfugen schließen sich im Gegensatz zum Menschen nicht

vollständig. Nach 3 Monaten verkleinern sich die Wachstumsfugen schrittweise und bestehen dann hauptsächlich aus nicht-proliferierendem Knorpel (Treuting und Dintzis, 2012; Jilka, 2013).

Des Weiteren stellt die geringe Größe von Mäusen und Ratten eine Herausforderung in der Durchführung von Frakturstudien dar. Erst neuere Entwicklungen erlauben standardisierte Osteosynsetechniken in diesen kleinen Tieren, die eine stabile Fixierung einer Osteotomie zulassen. Lange Knochen, wie der Femur und die Tibia, eignen sich besonders für solche Studien. Der Femur ist im Gegensatz zur Tibia ein Knochen mit relativ gleichmäßigem und größerem Durchmesser. Dadurch können auch größere Implantate wie Schrauben zur Fixierung von internen oder externen Fixateuren oder Platten zur Anwendung kommen. Durch die relativ gerade longitudinale Achse des Femurs ist eine standardisierte Frakturstabilisierung leichter möglich als in der Tibia, die durch ihre irreguläre und gebogene dreieckige Form für Implantate schlechter zugänglich ist (Holstein et al., 2009). Durch die relativ dicke Muskelschicht, die den Femur im Gegensatz zu Tibia und Fibula umgibt, ist die Durchführung standardisierter geschlossener Frakturen erschwert. Allerdings kann hier der Einfluss des umgebenden Weichteilgewebes auf die Frakturheilung besser untersucht werden.

Diaphysale und metaphysale Frakturen sind gleichfalls für Frakturstudien geeignet, allerdings wird in Mäusen und Ratten meist eine diaphysale Fraktur durchgeführt, da dieser Bereich des Knochens besser zugänglich ist. Frakturmodelle können in offene und geschlossene Frakturen unterteilt werden. Für offene Frakturmodelle wird eine Frakturbreite von maximal 20% des Knochendurchmessers empfohlen, da ein größerer Frakturspalt zu einer verzögerten Heilung führen kann. Eine Schädigung des umliegenden Weichteilgewebes sollte weitestgehend vermieden werden, um negative Einflüsse auf die Heilung zu vermeiden (Histing et al., 2011).

3. Tiere, Material und Methoden

3.1. VERSUCHSTIERE

Als Versuchstiere dienten weibliche Mäuse der Linie C57BL/6J. Es wurden ausgewachsene Tiere mit einem Alter von 26 Wochen verwendet und einem Körpergewicht zwischen 19 und 30 Gramm. Sie wurden von Charles River Laboratories Germany/ Jackson Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Tiere waren untergebracht in den Räumen der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité, Campus Virchow-Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin. Sie wurden in Gruppen zu maximal acht Tieren in klimatisierten Räumen gehalten bei gleichbleibender Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit. Eine ausreichende Lichtzufuhr wurde durch einen 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gewährleistet. Den Tieren stand Wasser und Futter ad libitum zur Verfügung. Die Einstreu der Käfige bestand aus staubfreiem Feinholzgranulat, welches täglich gereinigt und wöchentlich gewechselt wurde.

Die operativen Eingriffe fanden im Zeitraum von Juni 2011 bis September 2012 statt. Die Genehmigung des Tierversuchsvorhabens erteilte das Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin (unter der Bearbeitungsnummer G0021/11).

3.2. VERSUCHSAUFBAU

Um den Zusammenhang von Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern und der mechanischen Stimulation während der Frakturheilung zu untersuchen, wurde an allen Versuchstieren eine Osteotomie des linken Femurs durchgeführt und mittels eines Fixateur externe (RISystem AG, Davos, Schweiz) stabilisiert. Es wurden zwei unterschiedlich flexible Fixateure verwendet, um an der Osteotomiestelle eine unterschiedliche interfragmentäre Beweglichkeit zu provozieren. Der Fixateur wurde lateral mittels 4 Pins mittig auf dem Knochen befestigt. Die Tiere wurden zufällig in 4 Gruppen eingeteilt. Die Hälfte der Tiere erhielt zur Überbrückung des Osteotomiespaltes einen steifen Fixateur externe, die restlichen Tiere erhielten einen semi-steifen Fixateur. Die beiden Gruppen wurden nochmals in je zwei Gruppen unterteilt. Jeweils die Hälfte jeder Tiergruppe erhielt zweimal pro Woche (Tag 1, 5, 8, 12, 15 und 19) Sklerostin-neutralisierende Antikörper (Amgen Inc., Thousand Oaks, USA) s.c. injiziert. Die Antikörper wurden in einer Dosis von 25 mg/kg verabreicht. Die andere Hälfte diente als Kontrollgruppe und erhielt 0,9%iges Natriumhydrochlorid (B. Braun, Melsungen, Deutschland) s.c. zu den gleichen Zeitpunkten.

Um den Verlauf der Knochenheilung untersuchen zu können, wurde je ein Drittel der Tiere nach 7 Tagen, 14 Tagen und 21 Tagen schmerzlos getötet und die Knochen zur weiteren Bearbeitung entnommen. Post mortem wurde jeweils ein möglichst dorsoplantares Röntgenbild des osteotomierten Femurs und der contralateralen Seite angefertigt. Neben der histologischen Untersuchung der Knochenheilung wurden auch in vivo Micro-CTs und in vitro Torsionstests durchgeführt. Die in vivo Micro-CTs wurden an den gleichen Tieren durchgeführt wie die histologischen Untersuchungen. Dazu wurden die Mäuse mit einer Standzeit von 21 Tagen an den Tagen 0, 7, 14 und 21 zur Erstellung eines in vivo Micro-CTs in Narkose gelegt. Für die Torsionstests waren weitere Tiere nötig, auf die im weiteren allerdings nicht näher eingegangen wird. Die Torsionstests und die Micro-CT-Untersuchungen sind nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit, sondern werden in einer gesonderten Dissertation besprochen. Die angesetzte Tierzahl für die vorliegende Studie ist in Tabelle 1 dargestellt. Sie betrug 120 Tiere, das entspricht 10 Mäusen pro Gruppe und Zeitpunkt.

Tabelle 1. Angesetzte Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe

Standzeit:	Tag 7	Tag 14	Tag 21
Skl-Ak & rigid	10	10	10
Placebo & rigid	10	10	10
Skl-Ak & semi-rigid	10	10	10
Placebo & semi-rigid	10	10	10

Die ursprünglich angesetzten Tierzahlen reduzierten sich im Laufe der Versuchszeit aus unterschiedlichen Gründen, die in Tabelle 2 angegeben sind. In der Gruppe der Mäuse, die einmal pro Woche für das in vivo Micro-CT narkotisiert wurden, kam es aufgrund der Narkose und der damit einhergehenden Hypothermie vereinzelt zu Tierverlusten. Einzelne Ausfälle entstanden durch postoperative Komplikationen (Fehlplatzierung und Ausbrechen von Pins) und durch Refrakturen beim Entfernen des Fixateurs post mortem. Bei einem Heilungszeitpunkt von 7 Tagen, wenn die Frakturüberbrückung noch sehr instabil war, konnte es durch Manipulation des Knochens (wie z.B. das Herausdrehen der Pins) leicht zu einem Zerreißen des vorhandenen Kallus kommen. Die endgültige Anzahl der auswertbaren Proben ist aus Tabelle 3 zu entnehmen. Die erhöhte Anzahl von 12 Tieren in der Placebo & semi-rigid Gruppe nach 14 Tagen kam durch Tieraufälle während des Micro-CTs an Tag 14 zustande. Diese Tiere konnten für die Histologie verwendet werden.

Tabelle 2. Komplikationen, die zu einem Ausscheiden der Tiere führten

Ursache für Tierauffälle	Tierzahl
Komplikationen intra operationem (Fraktur, gebrochener Pin, Todesfall intra operationem)	4
Postoperative Komplikationen (starke Lahmheiten, frakturierter Femurkopf, falscher Sitz des Pins)	3
Fehlheilungen (verschobener oder zu weiter Osteotomiespalt, starke Osteolyse der Kortikalis)	7
Präparationsartefakte (Fraktur während Präparation)	7

3.3. FIXATEUR EXTERNE

Es wurden zwei unterschiedliche unilaterale externe Fixateure verwendet, die eine unterschiedliche interfragmentäre Beweglichkeit erlaubten. Zur Anwendung kamen Fixateure, die zuvor bereits in einer anderen Studie erprobt wurden (Histing et al., 2009; Röntgen et al., 2010). Beide Fixateure wurden speziell nach unseren Angaben von der RISystem AG, Davos, Schweiz angefertigt und sind

Tabelle 3. Ausgewertete Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe

Standzeit:	Tag 7	Tag 14	Tag 21
Skl-Ak & rigid	7	8	7
Placebo & rigid	7	7	8
Skl-Ak & semi-rigid	10	10	7
Placebo & semi-rigid	9	12	7

in Abb. 6 zu sehen. Sie setzten sich zusammen aus einem Fixationselement, das außerhalb des Knochens verblieb, und 4 Pins, mit denen der Fixateur am Knochen befestigt wurde. Die Fixateure bestanden aus Polyetheretherketon (PEEK), einem hochtemperaturbeständigen, thermoplastischen Kunststoff und Tantalnitrid (TaN), einer keramischen Verbindung, die als Beschichtungsmaterial verwendet wird. Sie wurden mit je zwei Pins proximal und distal des Osteotomiespaltes am Knochen befestigt und erlaubten kontrollierte, reproduzierbare, biomechanische Bedingungen an der Osteotomiezone (Histing et al., 2011).

Die Fixateure wiesen eine unterschiedliche Flexibilität auf, so dass es während der Frakturheilung zu unterschiedlich starker Bewegung zwischen den Fragmenten kam. Zum Einsatz kam zum einen ein steifer Fixateur, der eine geringe interfragmentäre Beweglichkeit erlaubte. Mit dieser interfragmentären Beweglichkeit wurde in vorgangs erwähneter Studie ein guter Heilungsverlauf beobachtet. Innerhalb von 3 Wochen waren bei einem 0,5mm weiten Osteotomiespalt Knochenbrücken zu sehen (Röntgen et al., 2010). Als zweiter Fixateur wurde ein semi-steifer gewählt. Die axiale Steifigkeit betrug für den steifen Fixateur 18,18 N/mm und 1,89 N/mm für den semi-steifen Fixateur (9,6-fach niedrigere Steifigkeit). Die Torsionssteifigkeit betrug für den steifen Fixateur 1,99 Nmm/Grad und 1,52 Nmm/Grad für den semi-steifen Fixateur (1,3-fach niedrigere Steifigkeit).

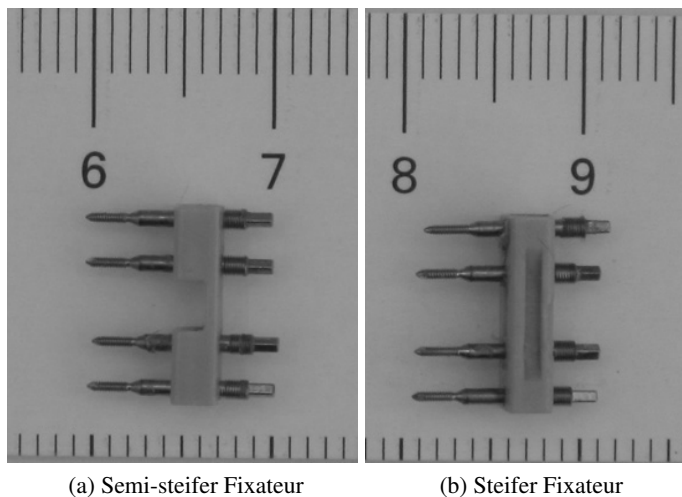


Abbildung 6. Fixateur externe bestehend aus einer Tantalnitrid-beschichteten Polyetheretherketon-Platte mit vier Pins. Maßstab in cm angegeben.

Mit dieser Wahl sollte umgangen werden, dass durch eine zu hohe Beweglichkeit des Osteotomiespaltes die Heilung verzögert wird, wie bei einem flexiblen Fixateur mit einer hohen interfragmentären Beweglichkeit beobachtet wurde (22-fach niedrigere axiale Steifigkeit im Vergleich zu dem steifen Fixateur), der sich als zu flexibel erwies (Röntgen et al., 2010).

3.4. SKLEROSTIN-NEUTRALISIERENDE ANTIKÖRPER

Die in dieser Arbeit verwendeten ratized (in der Ratte gebildeten) monoklonalen Sklerostin-neutralisierenden Antikörper (Sk1-Ak III) wurden uns von der Firma Amgen (Amgen Inc., Thousand Oaks, USA) zur Verfügung gestellt. Sie wurden bei -80°C gelagert und kurz vor dem Gebrauch in kleinen Mengen im Kühlschrank aufgetaut. Um den Mäusen mit einem Gewicht von 19-30 Gramm eine Dosis von 25mg/kg verabreichen zu können, wurden die Antikörper unter sterilen Bedingungen mit Natriumhydrochlorid (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verdünnt, in 1ml Spritzen aufgezogen und bis zur Verabreichung im Kühlschrank bei maximal 4°C gelagert. Aufgrund der geringen Körpergewichte der Tiere, die im überwiegenden Fall bei 26-28 Gramm lagen, wurde nur eine Verdünnung der Antikörper angesetzt und allen Tieren das gleiche Volumen von 0,1ml verabreicht. 2 mal pro Woche, an den Tagen 1, 5, 8, 12, 15 und 19, erhielten die Mäuse den verdünnten Antikörper s.c. injiziert, wobei Tag 0 der Tag der Operation war. Die Kontrollgruppe erhielt zur gleichen Zeit die selbe Menge reines Natriumhydrochlorid subkutan unter die Nackenhaut.

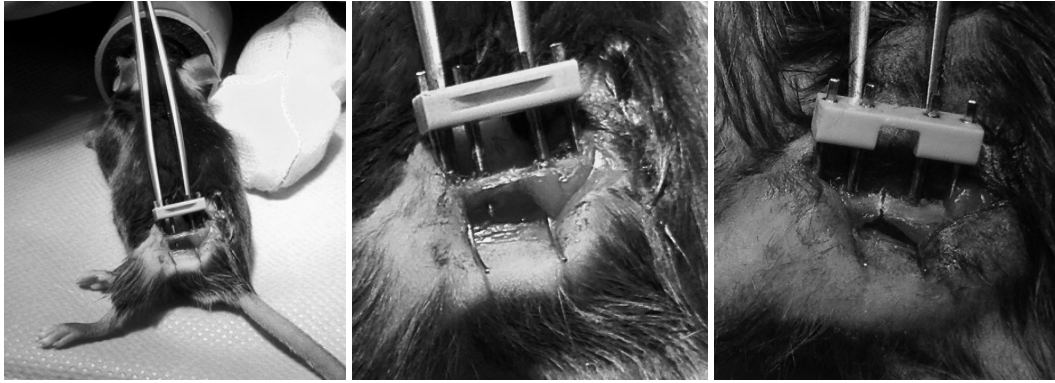
3.5. OPERATION

Die Operationen wurden in den Räumen der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité, Campus Virchow-Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin in gleicher standardisierter Weise durchgeführt. Vor der Operation wurde das Gewicht der Tiere ermittelt und dokumentiert.

Die Narkoseeinleitung und -aufrechterhaltung erfolgte mit Isofluran (Forene®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland). Dazu wurde die Maus in einen Narkosekäfig gesetzt, in den ein 2-2,5%iges Isofluran-Sauerstoff-Gemisch eingeleitet wurde. Nachdem das Tier ausreichend tief anästhesiert war, wurde die Narkose mit einer speziellen Atemmaske für Mäuse aufrechterhalten, durch die dem Tier ein 2%iges Isofluran-Sauerstoff-Gemisch zugeführt wurde. Zum Schutz der Kornea während der Narkose wurden beide Augen mit Bepanthen® Augensalbe (Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) bedeckt. Um Infektionen zu vermeiden, erhielten die Tiere vor der Operation einmalig 45mg/kg Clindamycin (Clindamycin-ratiopharm® 300mg/2ml Injektionslösung, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) subkutan gespritzt. Zur Analgesie während der Operation bekamen die Tiere subkutan 0,1mg/kg Buprenorphin (Temgesic® Ampullen, Injektionslösung, RB Pharmaceuticals, Berkshire, Großbritannien) präoperativ verabreicht. Zur Verhinderung einer Hypothermie der Tiere wurden sie während der Operation auf eine Wärmematte gelegt.

Das Tier wurde in rechte Seitenlage gebracht und der linke Oberschenkel mit einem Einwegnassrasierer lateral geschoren und mit Povidon-Jod (Braunol®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Auf Höhe des Femurs wurde mit einem Skalpell (Feather® Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan) ein Hautschnitt von dem Hüftgelenk bis zum Knie gemacht. Unter Schonung des Nervus ischiadicus wurde der Femur zwischen den Muskelbäuchen des M. gluteus superficialis und des M. biceps femoris stumpf freipräpariert. An der Stelle des Femur, an der die Osteotomie geplant war, wurde die Diaphyse rundherum freipräpariert. Der Fixateur externe wurde mittig in cranio-lateraler Richtung auf dem Femur fixiert, wie in Abb. 7 a) und b) zu sehen ist. Zur Fixation kamen vier Pins zur Anwendung, die in den Femur gedreht wurden. Mit einem Handbohrer (RISystem AG, Davos, Schweiz) wurde distal knapp über dem Knie das erste Bohrloch gesetzt, anschließend der Pin eingedreht und somit der Fixateur am Knochen befestigt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass durch beide Kortices gebohrt wurde und dass der Verbindungsbalken parallel zum Femur zu liegen kam. Beim Setzen der drei weiteren Bohrlöcher wurde der Verbindungsbalken des Fixateurs als Schablone verwendet. Als zweite Befestigung wurde der proximalste Pin gesetzt und anschließend die beiden mittleren Pins. Nachdem der Fixateur exakt positioniert wurde, wurde mit einer Gigli-Säge (RISystem AG, Davos, Schweiz) mit einem Durchmesser von 0,44mm eine Osteotomie mittig zwischen den beiden innersten Pins gesetzt. Durch den Sägevorgang entstand ein 0,5mm breiter Osteotomiespalt. Der Osteotomiespalt ist in Abb. 7 c) zu sehen.

Anschließend wurde der Operationsbereich durch eine Fasciennaht und eine Hautnaht mittels Einzelknopfnähten (Prolene® 5-0, Ethicon GmbH, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Die Dauer der Operation betrug ca. 30 Minuten. Anschließend wurden die Tiere in einen gesonderten Käfig in Brust-



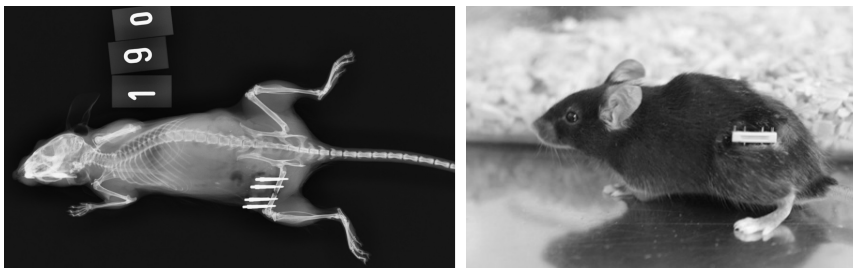
(a) Maus intra operationem. Der Femur ist freipräpariert und der Fixateur externe mit 4 Pins am Knochen befestigt.

(b) Femur vor der Osteotomie

(c) Femur mit Osteotomiespalt

Abbildung 7. Operationssitus

Bauch-Lage verbracht und bis zum selbstständigen Aufstehen unter einer Wärmelampe gehalten. Auf den Abbildungen 8 a) und b) ist der Sitz des Fixateurs nach der Operation im Röntgenbild und in vivo zu sehen.



(a) Röntgenbild post operationem. Der Fixateur externe ist dorsal am Femur befestigt.

(b) Fixateur externe in vivo

Abbildung 8. Maus post operationem

3.6. POSTOPERATIVE VERSORGUNG

Postoperativ erhielten die Tiere zur Analgesie für drei Tage Tramadolhydrochlorid über das Trinkwasser. Es wurden 12,5mg Tramadolhydrochlorid (Tramal® Tropfen 100 mg/ml, Lösung zum Einnehmen, Grünenthal GmbH, Aachen, Deutschland) in 500ml Wasser gegeben, das den Tieren ad libitum zur Verfügung stand. Zweimal wöchentlich an den Tagen 1, 5, 8, 12, 15 und 19 wurden der Allgemeinzustand und das Gangbild der Tiere beurteilt und Sklerostin-neutralisierende Antikörper bzw. Natriumhydrochlorid subkutan gespritzt. Die Mäuse der Gruppe mit 21 Tagen Standzeit wurden an den Tagen 0, 7, 14 und 21 zur Anfertigung eines in vivo Micro-CT-Scans (Scanco Medical AG, Brüttisellen, Schweiz) in Narkose gelegt. Dazu wurden sie in einem Narkosekäfig mit Isofluraneinleitung anästhesiert, um anschließend eine intraperitoneale Injektion aus Ketaminhydrochlorid (75mg/kg) (Ketamin® 50 mg, Actavis, Zug, Schweiz) und Medetomidin (1mg/kg) (Domitor®, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland) zu erhalten. Die Dauer für den Micro-CT-Scan betrug ca. 1 Stunde. Danach wurden die Tiere bis zum selbstständigen Aufstehen unter eine Wärmelampe verbracht. Alle Tiere wurden regelmäßig einmal pro Woche gewogen, um den Allgemeinzustand besser bewerten zu können.

3.7. EUTHANASIE

Nach den angegebenen Versuchszeiten von 7, 14 bzw. 21 Tagen wurden die Tiere euthanasiert. Dazu wurden die Mäuse in den Narkosekäfig verbracht und mit einem 5%igen Isofluran-Sauerstoff-Gemisch in eine tiefe Narkose versetzt. Die Narkosetiefe wurde anhand der Tiefensensibilität (Kneifen zwischen die Zehen) überprüft. Erst wenn keine Reaktion des Tieres auf das Kneifen mehr erfolgte, wurden sie durch zervikale Dislokation getötet.

3.8. PRÄPARATION DER KNOCHEN

Unmittelbar im Anschluss an die Euthanasie der Versuchstiere wurden die Oberschenkelknochen beider Hinterbeine entnommen. Dazu wurde auf Höhe des Femurs mit einem Einwegskalpell (Feather® Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan) über einen ringförmigen Hautschnitt die Muskulatur des kompletten Beines freigelegt. Über einen medialen Zugang wurde das Hüftgelenk exartikuliert und nach Durchtrennung der Muskulatur und Sehnen das Bein vom Körper abgetrennt. Anschließend wurden die Patellarsehne und die Ligamenta cruciata durchtrennt und der Unterschenkel vom Femur abgetrennt. Die am Knochen verbliebene Muskulatur wurde vorsichtig unter besonderer Schonung des Osteotomiebereichs vom Oberschenkel abpräpariert. Der weitestgehend von Muskulatur befreite Knochen mit dem Fixateur ist in Abb. 9 dargestellt. Um das Risiko einer Zerstörung des Kallus durch zu starke Manipulation des Knochens zu verringern, wurde die Demontage des externen Fixateurs erst nach der Fixation vorgenommen, da durch diesen Prozess die Festigkeit des Gewebes zunimmt.

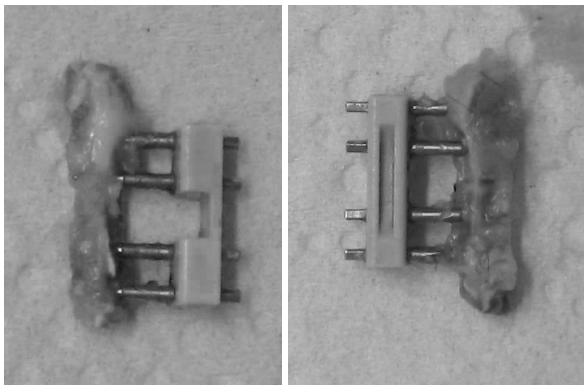


Abbildung 9. Femur mit Fixateur nach Entnahme des Femurs und Entfernung der Muskulatur vom Knochen.

Die Knochen wurden einzeln in beschriftete, flüssigkeitsdurchlässige Einbettkassetten (Tissue-Tek®, Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande) verbracht und direkt in gekühltes Paraformaldehyd (PFA) 4% (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) überführt. Zur Fixation kam PFA zur Anwendung, anstatt 4%-iges Formaldehyd, um das Material der externen Fixateure zu schonen, die bis zur Entkalkung am Knochen verblieben. Es wurde 4%-iges PFA anstatt von 4%-igem Formaldehyd in Phosphat-gepufferter Salzlösung (pH 7,4) verwendet, da in einem vorausgegangenen Versuch gute Ergebnisse mit 4%-igem PFA erzielt wurden. Die Fixierlösung bestand aus 40 g PFA (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 750 ml unter 60°C heißes Aqua dest., einigen Tropfen 2 molarer Natronlauge (bis die Lösung klar wurde) und 100 ml konzentrierter Phosphatpufferlösung (pH 7,2, Waldeck GmbH & CoKG, Münster, Deutschland). Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur wurde der pH-Wert auf einen Bereich von 7,3 bis 7,4 eingestellt und anschließend auf einen Liter mit Aqua dest. aufgefüllt. Das 4%ige PFA wurde maximal eine Woche vorher frisch angesetzt. Um eine optimale Infiltration der Fixierlösung zu erzielen, wurden die Enden des Femurs mit einem Skalpell geringgradig angeschnitten. Die Proben wurden in der Lösung im Verhältniss 1:20 für 48 Stunden im Kühlschrank gelagert, um eine ausreichende Aushärtung des Gewebes zu erzielen. Das kontralaterale, gesunde Bein wurde für zukünftige Studien mit entnommen und die Femora in Paraffin eingebettet. Die kontralateralen Knochen sind allerdings nicht Bestandteil dieser Arbeit.

3.9. PRÄPARATAUFBEREITUNG

Nach der zweitägigen Fixierung der Proben wurden die Knochen ca. 30 Minuten lang unter fließendem Leitungswasser gespült, um das PFA herauszuwaschen. Es wurden die externen Fixateure vorsichtig entfernt, die bis zur besseren Stabilisierung der Osteotomie nach der Fixation in PFA noch im Knochen verblieben waren.

3.9.1. *Entkalkung*

Anschließend wurden die Proben zur Entkalkung in EDTA-Lösung (Ethyldiamintetraessigsäure) (Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland) in einem Verhältniss Knochen zur Lösung von 1:20 eingelegt. EDTA ist ein Komplexbildner, der freie Kalziumionen bindet. Um das Reaktionsgleichgewicht zu halten, werden somit ständig Kalziumionen aus dem Knochen freigesetzt. Zweimal pro Woche wurde die Lösung gewechselt. Insgesamt dauerte die Entkalkung ca. zwei Wochen. Um den Prozess zu beschleunigen, wurden die Proben im Wärmeschrank (Heraeus®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Großbritannien) bei 37°C aufbewahrt. Nach zwei Wochen wurde die Biegsamkeit der nicht-osteotomierten Knochen getestet. Der Entkalkungszeitpunkt wurde als erreicht betrachtet, wenn eine Biegung des Knochens manuell ohne großen Kraftaufwand möglich war. Dieser Test wurde nur an den nicht-osteotomierten Knochen ausgeführt, um den Kallus der frakturierten Knochen zu schonen.

3.9.2. *Entwässerung*

Nach erfolgreicher Entkalkung wurden die Knochen erneut für 30 Minuten unter fließendem Leitungswasser gewässert und anschließend maschinell mit Hilfe eines Entwässerungsautomaten (Leica TP 1020, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) nach folgendem standardisiertem Schema entwässert:

1. Alkohol (Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland) 70% 1 Stunde
2. Alkohol 80% 1 Stunde
3. Alkohol 80% 2 Stunden
4. Alkohol 96% 2 Stunden
5. Alkohol 96% 2 Stunden
6. Alkohol 100% 2 Stunden
7. Alkohol 100% 2 Stunden
8. Alkohol 100% 3 Stunden
9. Xylol (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland) 1 Stunde
10. Xylol 1,5 Stunden

3.9.3. *Einbettung*

Nach Beendigung der Entwässerung wurden die Knochen direkt für zweimal je zwei Stunden in warmes, flüssiges Paraffin (Paraplast® plus, McCormick Scientific LLC, St. Louis, USA) verbracht. Anschließend mussten die Proben noch am selben Tag in Paraffin eingebettet werden. Dazu wurde mit Hilfe eines Paraffinspenders (Leica EG1120, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) 60°C warmes, flüssiges Paraffin (Paraplast® plus, McCormick Scientific LLC, St. Louis, USA) in eine metallene Gussform gegossen. Der Femur wurde in immer gleicher Ausrichtung mit seiner dorsalen Fläche nach unten zeigend in die Form gelegt und der beschriftete Einbettkasten oben auf die Metallform gedrückt. Der Einbettkasten diente später als Halterung für das Rotationsmikrotom. Nach einem wiederholten Auffüllen mit Paraffin wurde zur Kennzeichnung ein mit Bleistift beschriftetes Papierstück auf das noch flüssige Paraffin gelegt. Anschließend wurden die Paraffinblöcke zur Aushärtung bei -15°C

auf eine Kühlplatte (Leica EG1130, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) gestellt und nach Erkalten aus der Gussformen entfernt (siehe Abb.10).

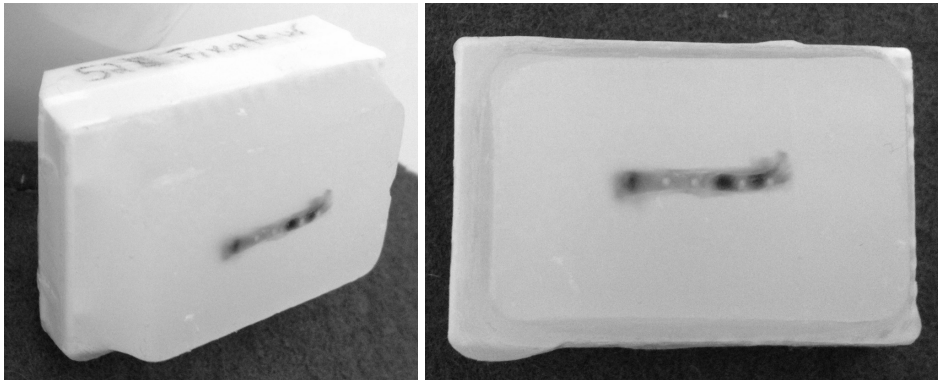


Abbildung 10. Angeschnittener Knochen im Paraffinblock

3.9.4. Schneiden am Rotationsmikrotom

Das Schneiden der Paraffinblöcke erfolgte am Rotationsmikrotom (Leica jung RM 2055, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland). Die Paraffinblöcke wurden vor sowie zwischen den Schneidevorgängen auf einem Eisblock gekühlt. Dadurch wurde die Schneidefähigkeit des Paraffinblocks erhöht, und es entstanden gleichmäßig dicke Paraffinschnitte. Der gekühlte Paraffinblock wurde so in das Mikrotom eingespannt, dass die Schnittfläche parallel zum Schneidemesser (Disposable Microtome Blade R35, Feather® Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan) lag. Das Paraffin wurde bis auf wenige Millimeter an das Gewebe heran grob weggeschnitten. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf dem Anschnitt des Osteotomiespaltens, nach Möglichkeit sollten auch die 4 Pinlöcher mit in der Anschnittsebene liegen. Dabei musste die Ausrichtung des Paraffinblocks gelegentlich noch korrigiert werden. Danach wurden 4µm dicke Schnitte des Knochens im Serienschritt angefertigt und in ein Wasserbad überführt, das mit 20°C warmem, destilliertem Wasser gefüllt war. Etwaige Falten wurden mit Hilfe eines Pinsels geglättet. Anschließend wurden die Schnitte auf einen Objektträger (Marienfeld-Superior, Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen, Deutschland) gezogen und so auf die Wasseroberfläche eines 43°C warmen Wasserbades (Leica HI 1210, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) befördert. Da sich Paraffin bei Wärme ausdehnt, wurde dadurch eine weitere Glättung der Schnitte erzielt. Nach einigen Minuten in dem warmen Wasserbad wurden die Schnitte auf beschriftete Objektträger aufgezogen und zum Trocknen mindestens einen Tag in den 36°C warmen Wärmeschrank (Heraeus®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Großbritannien) gebracht. Die Trocknung der Paraffinschnitte im Wärmeschrank bewirkt eine bessere Haftung der Schnitte auf dem Objektträger.

3.10. HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN

Histologische Färbungen dienen dazu, an sich farblose Gewebe sichtbar zu machen und je nach Färbemethode unterschiedliche Gewebetypen voneinander zu unterscheiden. Die meisten dieser Farbstoff-Gewebeverbindungen kommen durch Ionenbindungen zustande. Bestimmte zur Anwendungen kommende Farbstoffe haben eine unterschiedliche Affinität zu den verschiedenen Geweben, dadurch kommt es zur differenzierten Anfärbung der Gewebe- und Zellbestandteile. In dieser Arbeit kamen zwei Färbemethoden zur histologischen Beurteilung zur Anwendung. Beide Färbungen wurden an jeweils benachbarten Serienschritten vorgenommen. Erstens die Movat's-Pentachrom-Färbung zur histomorphometrischen Auswertung. Mit Hilfe dieser Färbung konnten die Knochenfläche, die Knorpelfläche, die Knochenmarksfläche und die Bindegewebsfläche im Kallus bestimmt werden. Und zweitens die immunhistochemische Färbung auf Alpha-Smooth Muscle Actin (Alpha sma), mit der die Gefäßdichte im Kallus bestimmt werden konnte, das heißt die Anzahl der Blutgefäße pro mm^2 Bindegewebe. Beide Färbungen werden im Folgenden näher erläutert.

3.10.1. *Movat's Pentachrom*

Diese Mehrfach-Färbung erlaubt eine generelle Übersicht über die an der Frakturheilung beteiligten Gewebe. Sie wird für Studien der Frakturheilung angewendet, da eine gute Unterscheidung von mineralisiertem und nicht-mineralisiertem Knochen- und Knorpelgewebe möglich ist.

Es wurde nach folgendem Färbeprotokoll vorgegangen:

1. Schnitte entparaffinieren in 2x 10 Minuten Xylol (J.T. Baker, Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holland)
2. Rehydrieren in absteigender Alkoholreihe (Herbeta-Arzneimittel, Berlin, Deutschland) (selbstständige Verdünnung mit destilliertem Wasser) 2x 100%iger, 1x 96%iger, 1x 80iger und 1x 70%iger Alkohol je 2 Minuten
3. Spülen in Aqua dest. 2 Minuten
4. Färben in Alcianblau 10 Minuten
5. Spülen in fließendem Leitungswasser 5 Minuten
6. Stabilisieren in alkalischem Ethylalkohol (10ml Ammoniumhydroxid in 90ml Ethylalkohol) 1 Stunde
7. Spülen in fließendem Leitungswasser 10 Minuten
8. Kurz eintauchen in Aqua dest.
9. Kernfärbung in Weigert's Eisenhämatoxylin 10 Minuten
10. Gut spülen in fließendem Leitungswasser 10 Minuten
11. Spülen in Aqua dest. 2 Minuten
12. Färben in Brillant Crocein-Säurefuchsin 15 Minuten
13. Kurz Spülen in 0,5%iger Essigsäure
14. Differenzieren in 5%iger Phosphorwolframsäure 20 Minuten
15. Kurz spülen in 0,5%iger Essigsäure
16. 3mal spülen in 100%igem Alkohol je 5 Minuten
17. Färben in Saffron du Gâtinais 1 Stunde
18. 3mal spülen in 100%igem Alkohol
19. Spülen in 100%igem Alkohol mindestens 2 Minuten
20. Entfetten in Xylol 2 x 2 Minuten
21. Eindecken mit Vitrocloud (R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland)

Färbelösungen:

- Alcianblau: 1%ige wässrige Lösung, 8GS Chroma, (Waldeck GmbH & Co, Division Chroma, Münster, Deutschland)

- Weigert's Eisenhämatoxylin: Fertige Lösungen Eisen-Hämatoxylin A (2E 032) & B (2E 052), zu gleichen Teilen vor Gebrauch frisch zusammengegeben (Waldeck GmbH & Co KG, Division Chroma, Münster, Deutschland)
- Brillant Crocein-Säurefuchsin:

Lösung A: 0,1g Brillant Crocein R (Chroma 1B109, Waldeck GmbH & Co KG, Division Chroma, Münster, Deutschland) in 99,5ml Aqua dest. & 0,5ml Eisessig gelöst

Lösung B: 0,1g Säurefuchsin (Chroma 1B525, Waldeck GmbH & Co KG, Division Chroma, Münster, Deutschland) in 99,5ml aqua dest. & 0,5ml Eisessig gelöst

Zur Herstellung der Brillant Crocein-Säurefuchsin-Gebrauchslösung wurden 4 Teile A mit einem Teil B gemischt.

- 5%ige Phosphorwolframsäure: 5g Phosphorwolframsäure (Chroma 3D092, Waldeck GmbH & Co KG, Division Chroma, Münster, Deutschland) in 100 ml aqua dest. gelöst
- Saffron du Gâtinais: 6g Saffron du Gâtinais (Chroma 5A394, Waldeck GmbH & Co KG, Division Chroma, Münster, Deutschland) in 100ml 100%igem Ethanol gelöst, vor Gebrauch in luftdicht verschlossener Flasche für 48 Stunden bei 50°C im Brutschrank extrahiert.

Um die Präparate dauerhaft haltbar zu machen, wurden sie nach dem Abschluss der Färbung mit Vitrocloud als Einschlussmedium beträufelt, damit sie dann mit einem Deckglas (Marienfeld-Superior, Laboratory Glassware, Lauda-Königshofen, Deutschland) luftdicht abgeschlossen werden konnten.

Als Ergebnis erhält man eine sehr farben- und kontrastreiche Färbung, die eine Unterscheidung der verschiedenen Gewebe leicht möglich macht. Mineralisierter Knochen und Kollagen stellen sich in der Movat's-Pentachrom-Färbung leuchtend gelb dar. Nicht-mineralisierter Knorpel färbt sich blau-grün, während mineralisiertes Knorpelgewebe gelb ist. Das Bindegewebe stellt sich in unterschiedlichen Grün- und Blautönen dar, wohingegen sich die Zellkerne dunkel darstellen.

3.10.2. *Alpha sma*

Immunhistologische Färbungen dienen dazu, bestimmte Antigene in Geweben und auf Zelloberflächen spezifisch zu identifizieren. Die Alpha-sma-Färbung ist ein immunhistochemischer Nachweis des Proteins alpha-Smooth Muscle Actin, das in den glatten Muskelzellen zu finden ist und somit auch in der Tunica media von Gefäßen. Diese Färbung dient unter anderem dem Nachweis von Blutgefäßen und Myofibroblasten. Der Nachweis erfolgt durch Antigen-Antikörper-Bindungen, die mit Hilfe einer Färbereaktion sichtbar gemacht werden.

Zuerst wird das gesuchte Protein markiert. Dies geschieht mittels eines primären Antikörpers, der wie in Abb. 11 a) das Protein erkennt und spezifisch daran bindet. Der primäre Antikörper wird anschließend durch einen zweiten (sekundären) Antikörper oder auch Brückenantikörper detektiert. Durch die Verwendung eines sekundären Antikörpers wird die Sensitivität der Färbung gesteigert. Dieser Vorgang wird als indirekte Methode bezeichnet. Der Brückenantikörper war im Rahmen dieser Arbeit mit dem Enzym Alkalische Phosphatase markiert (Abb. 11 b), das im Folgenden die Hydrolyse von Phosphatenthaltenden Substanzen katalysiert. Diese Enzymaktivität führt zu einem sichtbaren Farbumschlag (Abb. 11 c). Der häufig verwendete biotinmarkierte Sekundärantikörper (Avidin-Biotin-Komplex) zur Steigerung der Sensitivität hat in vorangehenden Tests an Schnitten, die nicht zur Auswertung kamen, eine zu starke unspezifische Hintergrundfärbung ergeben. Daher wurde auf den Alkalische-Phosphatasegekoppelten Sekundärantikörper zurück gegriffen.

Im ersten Arbeitsschritt wurden die getrockneten Paraffinschnitte in Xylol entparaffiniert (2x 10 Minuten in Xylol) und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (je 2 Minuten in 2x 100%igem Alkohol, 96-80-70%igem Alkohol und Aqua dest.). Anschließend folgte eine zweimalige

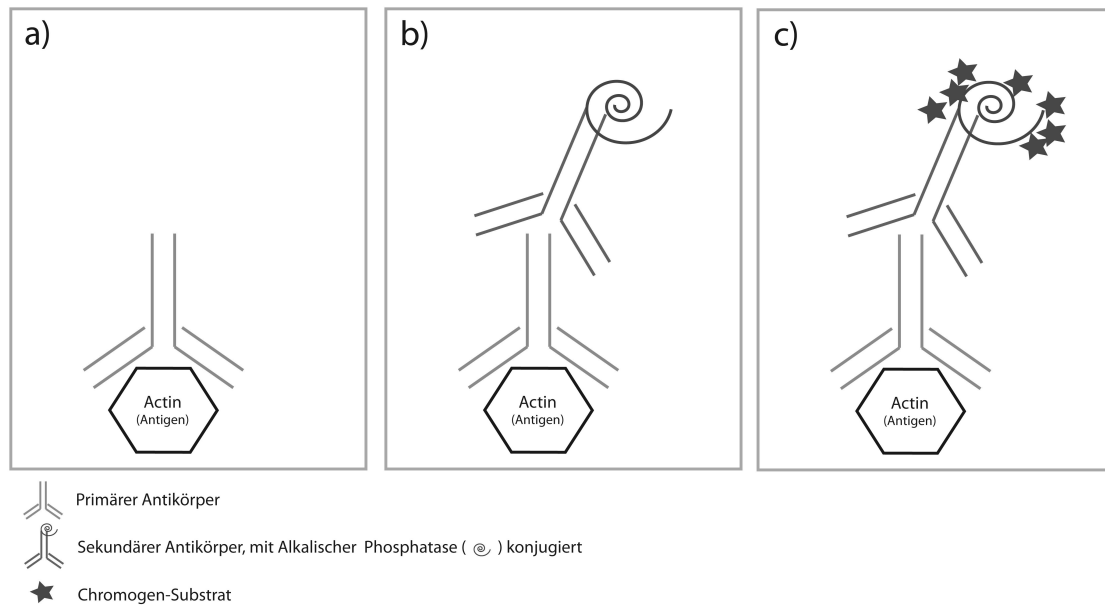


Abbildung 11. Prinzip der immunhistologischen Färbung: a) Primärer Antikörper bindet an das Antigen, b) Alkalische-Phosphatase-konjugierter Sekundärantikörper bindet an den primären Antikörper, c) Nach Zugabe des Substrat-Kits kommt es zu einem Farbumschlag am Sekundären Antikörper

Spülung der Präparate je 5 Minuten mit Phosphatpufferlösung (pH 7,2, Waldeck GmbH & CoKG, Münster, Deutschland; Mischungsverhältnis 1 Teil Phosphatpufferlösung und 9 Teile Aqua dest.). Nach dem Spülen wurden die Schnitte mit einem Fettstift (Pap Pen, Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt, Deutschland) umrandet, damit die aufgetragenen Flüssigkeiten nicht verliefen.

Im nächsten Schritt wurden die Schnitte mit Normalserum inkubiert. Das Normalserum stammte von derselben Spezies wie der sekundäre Antikörper und diente dazu, alle unspezifischen Bindungsstellen zu besetzen. Dadurch konnte der sekundäre Antikörper im weiteren Verlauf spezifisch an den primären Antikörper binden. Das Normalserum stammte vom Pferd (Normal Horse Serum, S-2000, Vector Laboratories, Burlingame, USA) und wurde mit 1:10 verdünnter Phosphatpufferlösung verdünnt (1960µl Phosphatpufferlösung und 40µl Normalserum). Die Präparate inkubierten mit dem Normalserum 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer, und das Serum wurde anschließend durch Abkippen entfernt. Im weiteren Verlauf wurde der Primärantikörper (Monoclonal Mouse Anti-Human, Actin (Smooth Muscle), Clone 1A4, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) auf die Präparate pipettiert, nachdem er im Verhältnis 1:100 mit Antibody Diluent (S.3022, Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark) verdünnt wurde. Die optimale Verdünnungsstufe wurde im Vorfeld an Präparaten, die nicht in die Auswertung gingen, ermittelt. In der einstündigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer band der primäre Antikörper an die darzustellenden Proteine (Alpha-sma positive Zellen). Nach anschließendem zweimaligem 5-minütigem Spülen mit 1:10 verdünnter Phosphatpufferlösung (pH 7,2, Waldeck GmbH & CoKG, Münster, Deutschland) folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Alkaline Phosphatase Horse Anti-mouse IgG Antibody, Vector Laboratories, Burlingame, USA). Dieser Antikörper wurde mit Normalserum (Normal Horse Serum, S-2000, Vector Laboratories, Burlingame, USA) und 1:10 verdünnter Phosphatpufferlösung (pH 7,2, Waldeck GmbH & CoKG, Münster, Deutschland) verdünnt (1920µl Phosphatpufferlösung und 40µl Normalserum und 40µl Sekundärantikörper) und die Präparate wurden 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. In dieser Zeit band der Sekundärantikörper an den primären Antikörper.

Nach einem erneuten zweimaligen 5-minütigen Spülen mit 1:10 verdünnter Phosphatpufferlösung folgte ein Auftragen von Chromogenpuffer, pH 8,2 (3,96g Sigma HCLT 3253, 0,54g Sigma T 1503, 2,63g Merck 6404 NaCl, aufgefüllt mit destilliertem Wasser auf 300ml) 2 x für je 5 Minuten. Der Chromogenpuffer stellte den pH-Wert auf das pH-Optimum der alkalische Phosphatase ein. Zur Visualisierung wurden die Präparate unter Sichtkontrolle mit einem Alkaline Phosphatase Substrat (Alkaline Phosphatase Substrat Kit I, Sk-5100, Vector Laboratories, Burlingame, USA) für ca. 5 Minuten inkubiert.

Das Substrat wurde entsprechend der Anleitung aus 5ml Chromogenpuffer und je 2 Tropfen der 3 Reagenzien des Substrat Kits hergestellt. In diesem Schritt setzte die Alkalische Phosphatase das angebotene organische Phosphat durch Hydrolyse um. Die entstandene Substanz verband sich mit dem Chromogen zu einem sichtbaren Azo-Farbstoff, und eine rote Färbung wurde sichtbar. Unter mikroskopischer Kontrolle (Axioskop 2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) wurde die Reaktion durch zweimaliges 5-minütiges Spülen mit 1:10 verdünntem Phosphatpuffer abgestoppt und anschließend mit Aqua dest. für 3 Minuten gespült.

Im nächsten Schritt folgte zur besseren Darstellung der Gewebe eine Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin nach Mayer. Dazu wurden die Schnitte 3 Minuten in Hämatoxylin (Mayers Hämalanlösung, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) (1:2 verdünnt mit aqua dest.) getaucht und anschließend 5 Minuten unter Leitungswasser gebläut. Zum Ende wurden die Präparate mit Aquatex (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

3.11. AUSWERTUNG

3.11.1. *Digitales Einlesen der Präparate*

Um eine standardisierte Auswertung möglich zu machen, wurden die gefärbten Präparate im nächsten Schritt digital eingelesen. Das Einlesen erfolgte mittels eines Hochleistungsmikroskopes Axioskop 40 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland), welches mit einer hochauflösenden Digitalkamera AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) und einem automatisch verschiebbaren Objektisch ausgestattet war. Das digitale Einlesen der Präparate erfolgte mit der Computersoftware AxioVision Release 4.8. (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland) in 50facher (für die Movat's-Pentachrom-Färbung) bzw. in 100facher (für die Alpha-sma-Färbung) Vergrößerung. Mit Hilfe der Mosaik-Funktion wurde der gesamte Knochenschnitt in Einzelbildern abfotografiert und die Überschneidungen im Stitching-Modus ausgeglichen und zu einem Gesamtbild zusammengefügt. Anschließend wurde ein Maßstabsbalken eingefügt, um eine genaue Größenangabe zu gewährleisten.

Für die histologische Auswertung wurde jeder Schnitt in derselben Ausrichtung des Femurs abfotografiert, damit die Aufnahmen besser miteinander zu vergleichen waren. Dabei lag das proximale Ende des Femurs im Bild links und der Femurkopf zeigte nach unten.

3.11.2. *Definition der Region of Interest (ROI)*

Die Definition einer Region of Interest war nötig, um eine einheitliche und möglichst standardisierte Auswertung der Präparate zu erreichen. Mit diesem Vorgehen sollte ein direkter Vergleich der Gruppen untereinander und der beiden Färbungen ermöglicht werden. Der Bereich ausserhalb der ROI blieb unberücksichtigt. Eine schematische Darstellung der Region of Interest ist in Abb. 12 zu sehen.

Ausgangspunkt zur Festlegung der ROI war der Osteotomiespalt. Da man von einer Osteotomiespaltbreite von 0,5mm ausging, wurde die Breite der ROI auf 1mm festgelegt. Da zur Bestimmung der ROI die kortikalen Osteotomieanten zu Hilfe genommen wurden, wurde zunächst eine Begradigung von schief auf den Objektträger aufgezogenen Schnitten vorgenommen, wie in Abb. 13 dargestellt ist. Mit Hilfe von Adobe Photoshop C3S (Adobe Systems, San José, Kalifornien, USA) wurde der Knochen so gedreht, dass die mediale und die laterale Osteotomieante direkt übereinander zu liegen kamen. So war eine einheitliche Bestimmung der Region of Interest möglich.

An den mittels Movat's Pentachrom gefärbten Schnitten wurde die ROI mit Hilfe der Computersoftware KS 400 3.0. (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) ermittelt, mit der auch die Auswertung dieser Schnitte erfolgte. Es wurden jeweils distal und proximal beide kortikalen Schnittkanten markiert und die beiden Werte vom Computer jeweils distal und proximal gemittelt. Diese Mittelwerte wurden anschließend als Osteotomiespaltbegrenzung angesehen. Ausgehend von diesen festgelegten Punkten wurde die ROI nach distal und proximal auf insgesamt 1mm erweitert. Durch den engen Bereich der ROI um den Osteotomiespalt herum sollte verhindert werden, dass Kallusgewebe der Pins mit in der Auswertung betrachtet wird.

Die Höhe der ROI wurde auf 4mm festgelegt, ausgehend vom weitesten Kallus, der eine Breite von ca 3,7mm hatte (siehe Abb. 14). Zusätzlich wurden jeweils die lateralen und medialen Grenzen der Kortizes festgelegt, um später eine Unterteilung der ROI in periostal, endostal und intrakortikal vornehmen zu können.

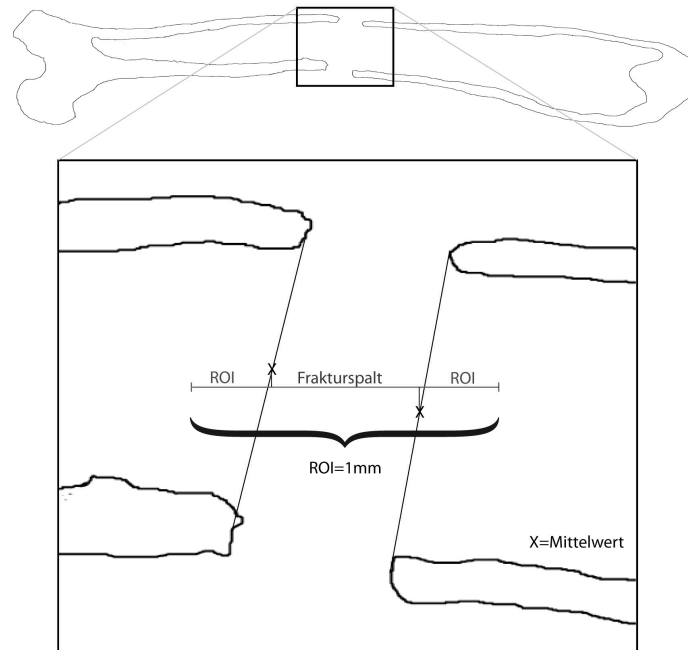


Abbildung 12. Definition der Breite der ROI. Da die distalen bzw. proximalen Osteotomieanten häufig nicht direkt senkrecht übereinander lagen, wurde eine Hilfslinie zwischen den jeweiligen Osteotomieanten gezogen. Jeweils vom Mittelpunkt der proximalen und distalen Hilfslinie wurde ein Lot gefällt. Von diesen beiden Senkrechten ausgehend wurde die ROI auf insgesamt 1 mm nach proximal und distal festgelegt.

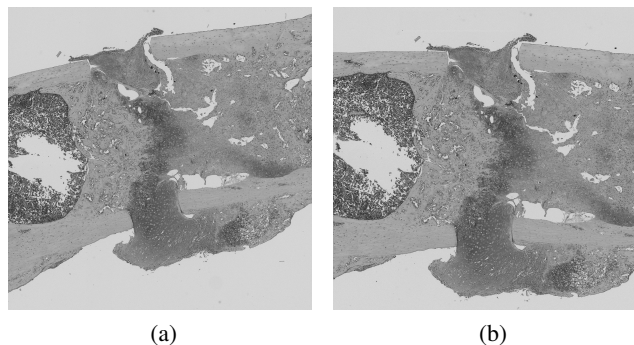


Abbildung 13. Vor und nach Bearbeitung mit Photoshop. Der schräg eingescannte Knochen (a) wurde mittels Hilfslinien so ausgerichtet, dass die proximalen bzw. distalen Osteotomieanten möglichst senkrecht übereinander lagen (b).

An den Alpha-sma-gefärbten Schnitten wurde die ROI manuell gesetzt. Dies war möglich, da es sich bei den Präparaten um benachbarte Serienschnitte handelte. Mit Hilfe des 1mm-Maßstabsbalkens wurde die Breite der ROI bestimmt und anschließend so auf den Schnitt gelegt, dass sie der ROI der Movat's-Pentachrom-Färbung entsprach. Dabei wurden vor allem Knochenstrukturen zur Orientierung herangezogen. Das Resultat ist in Abb. 15 sichtbar.

3.11.3. Deskriptive Auswertung

Für die deskriptive Auswertung wurde von jedem Schnittpräparat der Movat's-Pentachrom-Färbung ein Exemplar lichtmikroskopisch beurteilt. Dabei wurde neben der Verteilung der Gewebe im Kallus vor allem auch auf den Bereich außerhalb der ROI geachtet, um mögliche Sklerostinwirkungen außerhalb der Osteotomie erkennen zu können. Besonderes Augenmerk wurde dabei auf übermäßige Knorpel- und Knochenproduktion gelegt.

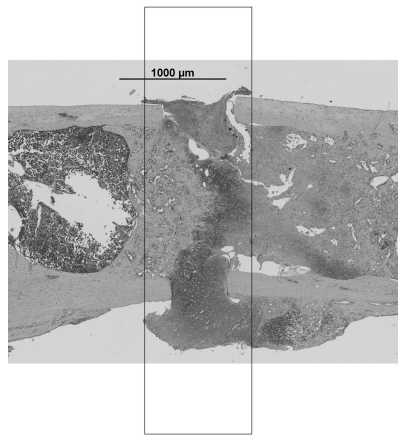


Abbildung 14. Berechnete ROI der Movat's Pentachrom Färbung. Die ROI wurde ausgehend von dem weitesten Kallus mit einer Breite von 3,7mm einheitlich auf 1 x 4mm festgelegt, auch wenn dadurch bei einigen Präparaten oben und unten Leerflächen entstanden.

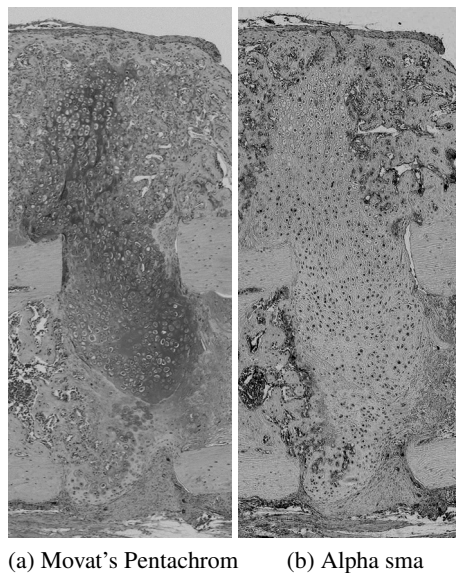


Abbildung 15. Region of Interest vergleichend. Mit Hilfe von Knochenpunkten und markanten Strukturen des Kallus wurde die 1mm breite ROI möglichst identisch zu der Movat's-Pentachrom-Färbung auf die Alpha-sma-gefärbten Schnitte gelegt.

3.11.4. Histomorphometrische Auswertung

Die Auswertung der Movat's-Pentachrom-Färbung erfolgte mit der Computersoftware KS 400 3.0. (Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland). Dazu wurde ein benutzerdefiniertes Makro erstellt (ein den Messzwecken angepasstes Computerprogramm), durch das eine Flächenberechnung der unterschiedlichen Gewebe anhand bestimmter Farbpixel möglich war.

Im ersten Schritt fand eine Kalibrierung anhand der auf dem Foto eingefügten Messskala statt, um ein dem Makro vorgegebenes Rechteck auf eine Breite von 1mm zu setzen.

Im nächsten Schritt wurde die in der ROI liegende Kortikalis umfahren, um diese aus der Auswertung auszuschließen. Nachdem die Weite des Kallus gemessen wurde, erfolgte die Festlegung der kortikalen Osteotomieanten, um anschließend die ROI auf dem digitalen Bild zu fixieren.

Zur Bestimmung der endostalen, intrakortikalen und periostalen ROI wurden jeweils die lateralen und medialen Eckpunkte der kortikalen Osteotomieanten festgelegt. Im Anschluss erfolgte die halbau-

tomatische Flächenbestimmung. Teilweise mit Hilfe einer Farbmaske und teilweise manuell wurden die folgenden Gewebetypen segmentiert:

- Leerflächen (die Fläche ausserhalb des Schnittes, die noch in der ROI lag und gewebefreie Artefakte innerhalb des Kallus),
- neu gebildeter Knochen,
- Knorpel,
- Knochenmark,
- Bindegewebe und
- Muskel.

Die Flächenanteile wurden vom Computer errechnet und auf die verschiedenen Lokalisationen innerhalb der ROI bezogen. Folgende Parameter wurden erfasst:

- Kallusweite (mm), breiteste Kallusweite
- Totale endostale, intrakortikale und periostale Fläche (mm^2) (siehe Abb. 16)
- Totale Leerfläche (mm^2)
- Totale kortikale Fläche (mm^2) (siehe Abb. 17 (b))
- Totale Knochenfläche (mm^2), Kortikalis ausgeschlossen (siehe Abb. 17 (c))
- Totale Knorpelfläche (mm^2) (siehe Abb. 17 (d))
- Totale Knochenmarksfläche (mm^2) (siehe Abb. 17 (e))
- Totale Muskelfläche (mm^2) (siehe Abb. 17 (f))
- Totale Bindegewebsfläche (mm^2) (siehe Abb. 17 (g))

Schematisch sind die Flächen in Abb. 17 dargestellt.

Des Weiteren wurden die verschiedenen Gewebetypen im intrakortikalen, peri- und endostalen Bereich (in mm^2) bestimmt.

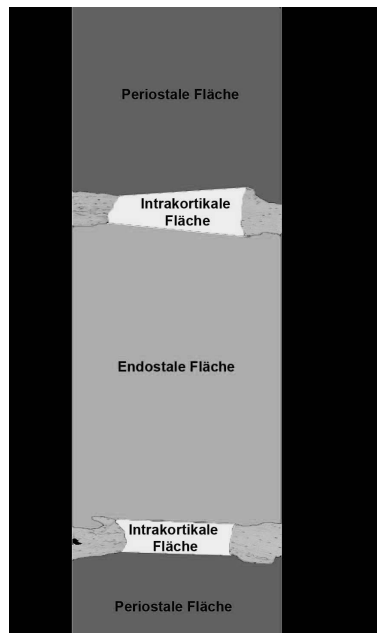


Abbildung 16. Bestimmung der totalen endostalen, intrakortikalen und periostalen Fläche. Mit Hilfe von Linien zwischen den medialen und lateralen Eckpunkten der Osteotomieekanten konnte die gesamte Fläche in endostale, intrakortikale und periostale Flächen unterteilt werden.

3.11.5. Osteotomieüberbrückung

Die biomechanischen Eigenschaften des geheilten Knochens hängen stark von der erreichten knöchernen Überbrückung des Osteotomiespaltes ab. Zur Beurteilung der Osteotomieüberbrückung (auch “bridging”) wurde jedes Präparat einzeln hinsichtlich der knöchernen Überbrückung beurteilt. Es wurden nur die Tiere ausgewertet, die 14 und 21 Tage post operationem getötet wurden, da sieben Tage nach der Operation noch keine Überbrückung erwartet wurde. Dabei wurde eine Unterteilung in endostal, peri- und intrakortikal und medial und lateral vorgenommen, so dass sechs Überbrückungen möglich waren. Die endostalen Überbrückungen wurden dabei allerdings unabhängig von der medialen oder lateralen Seite gezählt. Es wurden nur solche Überbrückungen gewertet, bei denen ein eindeutiger, wenn auch nur schmaler, knöcherner Überbrückungsstreifen sichtbar war.

Die Auswertung erfolgte mittels eines ja/nein-Schemas (ja=1, nein=0). Im Anschluss wurde bestimmt in wievielen Knochen keine, ein, zwei, drei oder vier Überbrückungen periostal und intrakortikal vorlagen. Die endostale Überbrückung wurde ebenfalls mit Hilfe eines ja/nein-Schemas beurteilt, wobei eine endostale Überbrückung egal ob ein- oder beidseitig als “Ja” gewertet wurde. Die endostale Überbrückung wurde anschließend als Prozent ausgedrückt.

3.11.6. Immunhistologische Auswertung

Die Auswertung der Alpha-sma-Färbung erfolgte mit Hilfe der Computersoftware Image J (National Institutes of Health, Bethesda, USA). Dazu erfolgte zunächst die Freistellung der ROI. Mittels des nach der Digitalisierung der Schnitte eingefügten Maßstabsbalkens wurde ein 1mm breiter Bereich festgelegt, der so auf das Bild gelegt wurde, dass er mit der errechneten ROI der Movat’s Pentachrom übereinstimmte.

Anschließend wurden in diesem Bereich die Blutgefäße gezählt. Angeschnittene Gefäße am Bildrand wurden von der Auswertung ausgeschlossen. Die ROI wurde mäanderförmig durchmustert und dabei alle Gefäße mit einem Punkt versehen. Dadurch sollte eine doppelte Zählung vermieden werden. Jede Markierung wurde automatisch durch die Computersoftware gezählt. Um die Genauigkeit zu erhöhen, wurde parallel zur Betrachtung der digitalisierten Schnitte eine Beurteilung unter dem Lichtmikroskop vorgenommen. Wie in Abb. 18 dargestellt, wurden nur solche Strukturen als Gefäße gezählt, die eine deutliche rote Anfärbung der Gefäßwand zeigten und/oder bei denen Endothelzellen identifiziert wurden. Das Vorhandensein eines Hohlraums half bei der Identifizierung der Gefäße. Längs angeschnittene

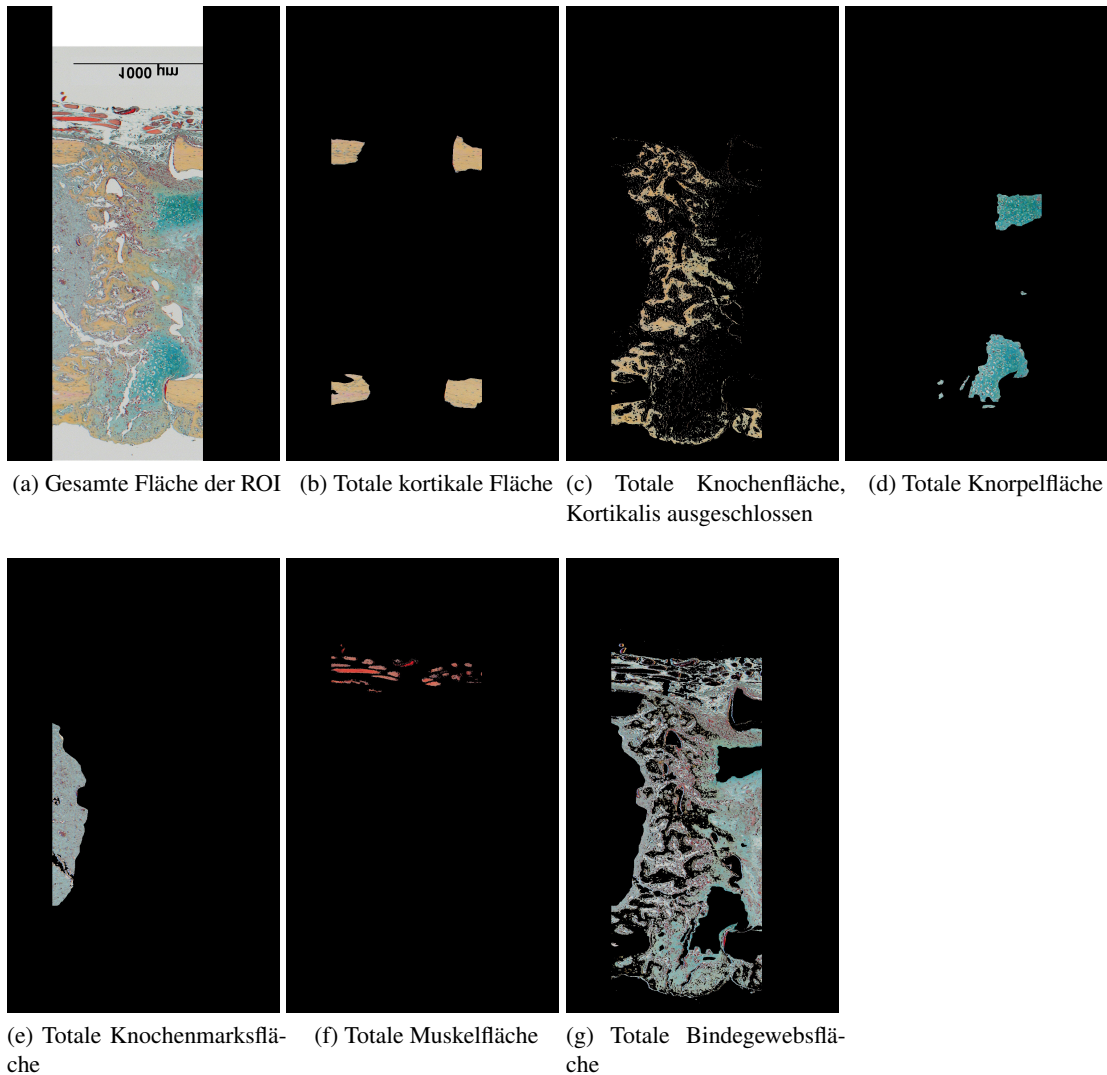


Abbildung 17. Flächenbestimmung. Die unterschiedlichen Gewebetypen sind teilweise mit Hilfe einer Farbmaske (wie z.B. die totale Knochenfläche) und teilweise durch manuelles Umfahren (wie z.B. die totale Knorpelfläche) errechnet worden.

Gefäße wurden nicht gezählt, da hierbei ein geschlängelter Verlauf der Gefäße angenommen wurde und dadurch die Gefahr einer doppelten Zählung bestand.

Die Anzahl der Gefäße wurde anschließend im Verhältnis zum vorhandenen Bindegewebe ausgedrückt. Dazu bediente man sich der Bindegewebsfläche, die zuvor in der Movat's-Pentachrom-Färbung ermittelt wurde, da es sich um benachbarte Schnitte handelte. Die Gefäßdichte ergab sich durch Division der Gefäßzahl durch die Bindegewebsfläche.

3.11.7. Statistik

Für die Statistische Auswertung der absoluten Gewebeverteilung wurde das Statistikprogramm SAS (SAS® 9.2; SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) verwendet. Die Zwischengruppenvariablen der Behandlung (Sklerostin-Antikörpergabe bzw. Placebo-Gabe) und der Fixationssteifigkeit (steifer Fixateur, semi-steifer Fixateur) genauso wie die Beziehungen zwischen diesen Gruppen wurden mit Hilfe eines zweifaktoriellen ANOVA analysiert. Anschließend wurde mit Hilfe eines Zweistichproben-t-Tests die Interaktion zwischen den Gruppen verglichen. Von allen Ergebnissen wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichungen errechnet.

Für die statistische Auswertung der Frakturüberbrückung, der zeitlichen Veränderung der absoluten Gewebeverteilung und der prozentualen Verteilung der Gewebe wurde das Statistikprogramm SPSS (IBM SPSS Statistics 22) verwendet. Die Unterschiede zwischen den Verfahren hinsichtlich Frakturüber-

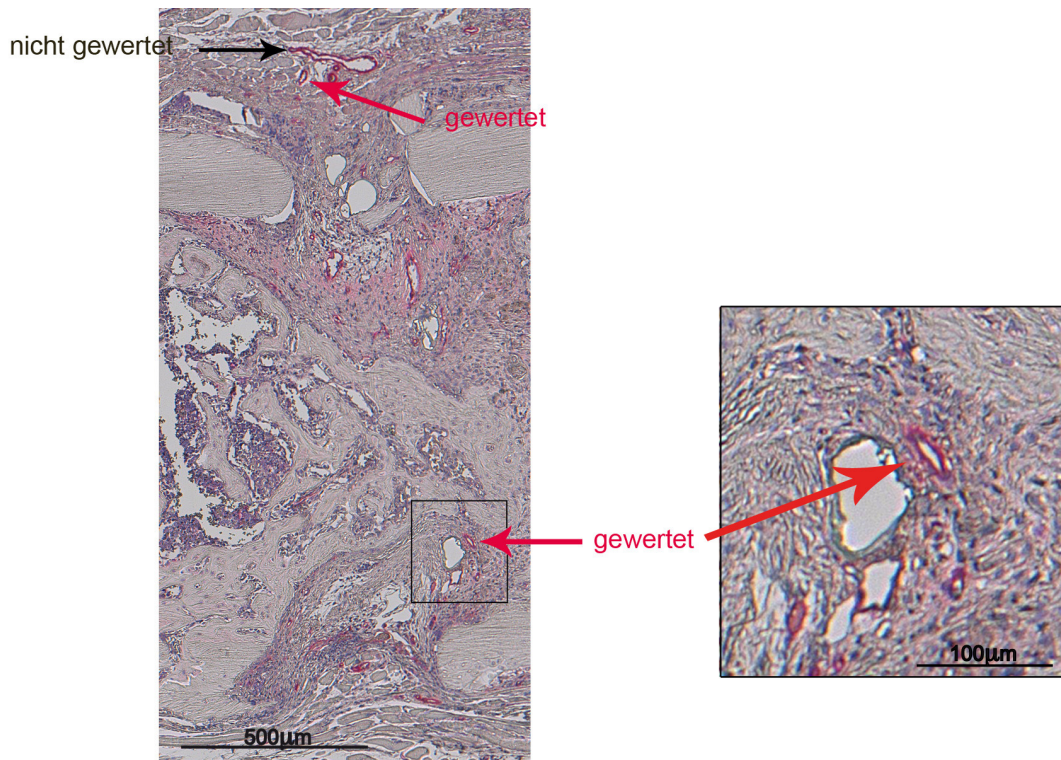


Abbildung 18. Auswertung Alpha sma. Es wurden Gefäße mit einer deutlichen Anfärbung der Gefäßwand und/oder identifizierten Endothelzellen gewertet. Längs angeschnittene Gefäße fielen aus der Zählung heraus, um eine doppelte Zählung zu vermeiden.

brückung wurde mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests bzw. des Fisher-Exact-Tests statistisch ausgewertet. Für den Vergleich der absoluten Gewebeverteilung zwischen den unterschiedlichen Heilungszeitpunkten wurde ein zweifaktorieller ANOVA durchgeführt. Die prozentuale Verteilung der Gewebe wurde mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Test analysiert und anschließend ein post-hoc Test zum Kruskal-Wallis-Test durchgeführt.

Die Signifikanz gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit an. Als signifikant wurde ein Ergebnis bezeichnet, wenn der „P-Wert“ kleiner als 5% war ($P < 0,05$).

4. Ergebnisse

Aus den zwölf Gruppen gingen von den anfangs angesetzten 120 Tieren insgesamt 99 in die Auswertung ein. Pro Gruppe wurde dabei ein Minimum von sieben Mäusen festgesetzt.

4.1. DESKRIPTIVE AUSWERTUNG

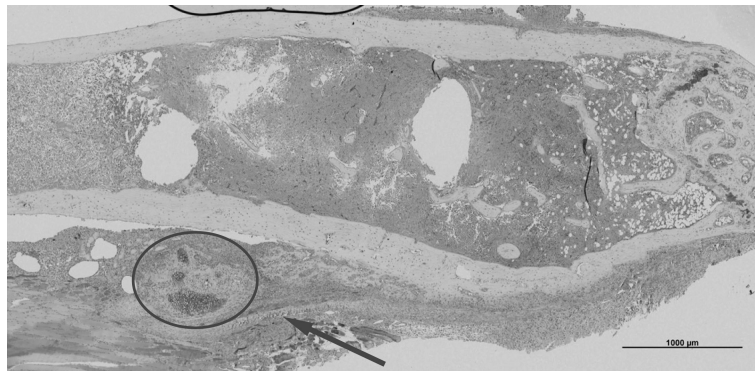
Die deskriptive Auswertung erfolgte gruppenweise zu den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten. Hierzu wurden die Movat's-Pentachrom-gefärbten Schnitte herangezogen, mit denen die Beurteilung von Knorpel- und Knochengewebe möglich war. Neben der Beurteilung der Osteotomieenden und deren Verschiebungen zueinander, wurde auch die Verteilung von Knorpel und neu gebildetem Knochen am gesamten Präparat beurteilt. Dadurch sollte neben der Frakturheilung auch die Wirkung der Sklerostin-neutralisierenden Antikörper auf den gesamten Knochen begutachtet werden.

Um die Wirkung der Antikörper und der Fixateure auf den Bereich außerhalb der ROI zu beurteilen, wurden Knorpel- und Knochenzubildungen, die nicht in der Nähe des Osteotomiespaltes lagen, betrachtet.

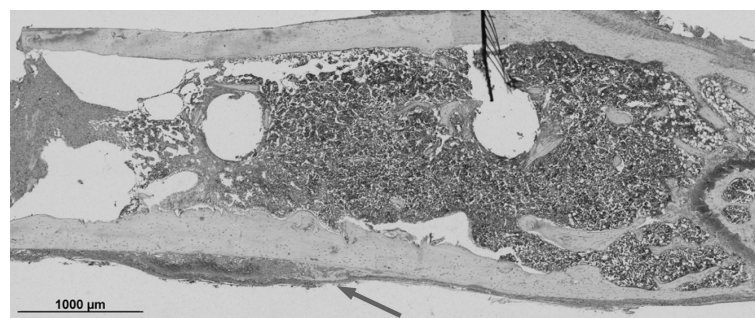
Sieben Tage post operationem wurden in allen vier Gruppen Knorpelzubildungen außen an den Kortizes der Diaphyse beobachtet. In der Skl-Ak & semi-rigid-Gruppe waren in einem Fall eine starke Knorpelzubildung an der distalen Femurdiaphyse zu beobachten und in zwei Fällen eine geringe

Knorpelbildung mit geringer, von der Kortikalis ausgehender Mineralisierung. In der Skl-Ak & rigid-Gruppe kam es an fünf Knochen zu wenig Knorpelbildung an der distalen Kortikalis, teilweise mit Verknöcherung. An einem Knochen wurde eine verstärkte Knochenbildung beobachtet. In diesem Fall lag der zugebildete Knorpel nicht direkt der Kortikalis an, und der neue Knochen schien zwischen die Muskelfasern einzuwachsen (Abb. 19 (a)). Drei Knochen der Placebo & semi-rigid-Gruppe zeigten eine schmale Knorpelzubildung an der distalen Kortikalis mit Mineralisierung (Abb. 19 (b)) und ein Knochen eine etwas breitere Knorpelbildung mit angrenzender geringer kortikaler Knochenbildung. In der Placebo & rigid-Gruppe wurden an einem Knochen eine schmale mediale Knorpelbildung und an einem Knochen eine verstärkte Knorpelbildung distal an beiden Kortizes auf Höhe des vierten Bohrloches beobachtet. An einem Knochen wurde eine knöcherne distale kortikale Zubildung gesehen. In allen Fällen lagen die Zubildungen auf Höhe der distalen, quer angeschnittenen Bohrlöcher oder zwischen ihnen.

Nach 7 Tagen war kein Effekt der Sklerostin-Antikörper oder der Fixationssteifigkeit auf den Bereich außerhalb der Osteotomiezone zu sehen. In den beiden Gruppen, die die Antikörper bekamen, war jeweils einmal eine im Vergleich zu den Placebo-Gruppen übermäßig starke Knorpelbildung zu beobachten. Aufgrund des vereinzelt Auftretens konnte diese Beobachtung allerdings nicht auf die Wirkung der Sklerostin-Antikörper zurückgeführt werden.



(a) Skl-Ak & rigid; die Knorpelzubildung liegt inselartig nicht direkt der Kortikalis an (eingekreist). Ein knöcherner Streifen zieht vom distalen Ende zwischen die Muskulatur (Pfeil).



(b) Placebo & semi-rigid; schmale Knorpelzubildung auf Höhe des dritten Bohrloches. Der Pfeil zeigt auf die beginnende Mineralisierung der Zubildung.

Abbildung 19. Knorpel- und Knochenbildungen 7 Tage post operationem

14 Tage nach der Osteotomie wurden in der Skl-Ak & semi-rigid-Gruppe in fast allen Präparaten (8 von 10) knöcherne Zubildungen an der Kortikalis beobachtet. Zum Teil waren diese Zubildungen stark ausgeprägt, und in allen Fällen waren sie auf Höhe der distalen und teilweise auch der proximalen Bohrkanäle. In zwei Fällen überwogen die starken knorpeligen Zubildungen (Abb. 20).

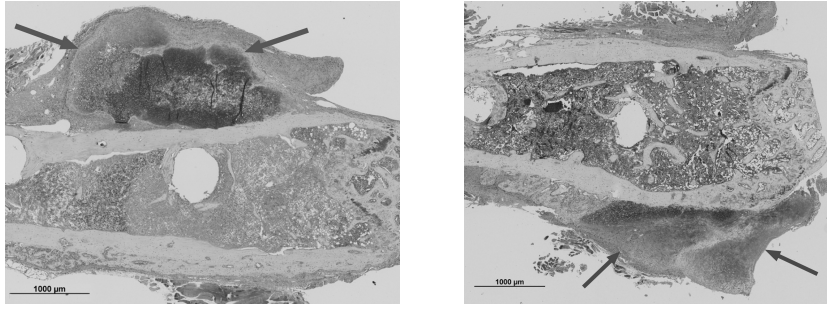


Abbildung 20. Skl-Ak & semi-rigid, 14 Tage post operationem; starke knorpelige Zubildung am distalen Knochenende (Pfeile).

In der Skl-Ak & rigid-Gruppe zeigten 6 von 8 Knochen geringe knöcherne Zubildungen an der distalen Kortikalis. In zwei Präparaten war eine vermehrte Knorpelbildung zu sehen (Abb. 21), die allerdings in beiden Fällen an der distalen Epiphyse lag und von der knorpeligen Epiphysenfuge auszugehen schien.

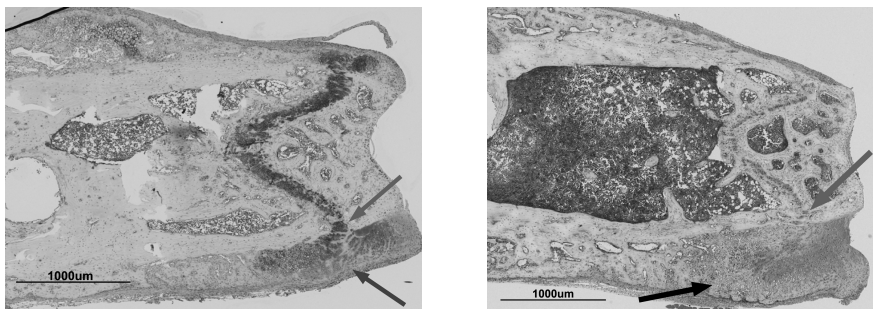


Abbildung 21. Skl-Ak & rigid, 14 Tage post operationem; die Knorpelzubildungen (schwarzer Pfeil) an der Epiphyse scheinen von der Epiphysenfuge auszugehen. Der graue Pfeil markiert den Übergang zwischen der Knorpelzubildung und der Epiphysenfuge.

Ein Drittel der Knochen der Placebo & semi-rigid-Gruppe zeigte eine mittlere kortikale Knochenbildung und ein Drittel eine geringe. In nur einem Präparat war eine Knorpelbildung an der Kortikalis sichtbar. Dieses Präparat war durch eine starke, knorpelige Kallusbildung gekennzeichnet. Das in Abb. 22 gezeigte Präparat wies eine knöcherne Struktur auf, die nicht in direktem Kontakt zur Kortikalis oder zum Kallus zu stehen schien.

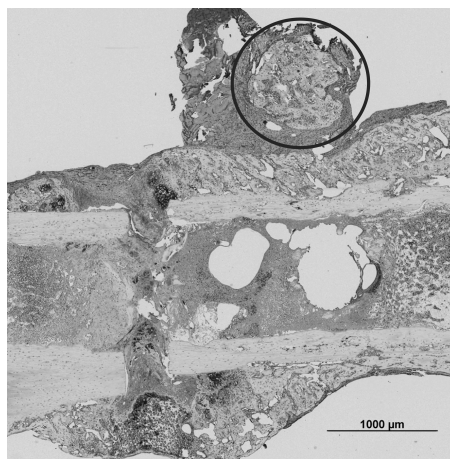


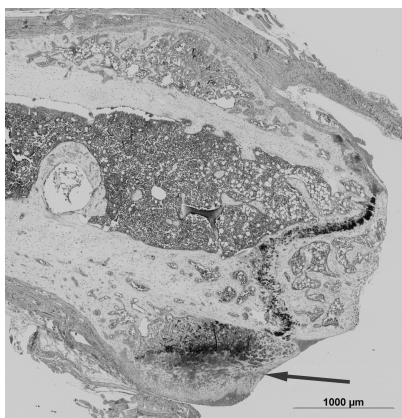
Abbildung 22. Placebo & semi-rigid, 14 Tage post operationem; auf Höhe des 3. Bohrloches ist eine knöcherne Struktur (eingekreist) sichtbar, die nicht in Kontakt mit dem Kallus oder der Kortikalis zu liegen scheint.

In der Placebo & rigid-Gruppe wurde bei etwa der Hälfte der Knochenpräparate eine Knochenbildung an der Kortikalis gesehen, teilweise mit knorpeligen Anteilen. In einem Präparat kam es an der distalen Epiphyse zu einer starken Knorpelbildung.

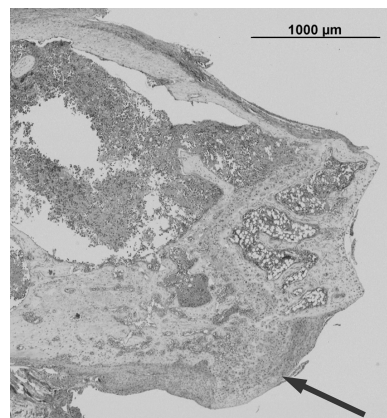
Auch nach 14 Tagen war somit kein eindeutiger Effekt der Antikörper auf die Knochenbildung außerhalb des Osteotomiebereichs sichtbar. In jeder Gruppe kam es vereinzelt zu starken Knorpelbildungen außerhalb des Osteotomiebereichs, die jedoch weder auf die Behandlung noch auf die Fixationssteifigkeit zurückzuführen waren.

21 Tage post operationem zeigte in der Skl-Ak & semi-rigid-Gruppe nur ein Knochen von sieben eine mittlere kortikale Knochenbildung über die gesamte Länge des Knochens. An einem Präparat war an der distalen Epiphyse eine starke Knorpelbildung sichtbar. In der Skl-Ak & rigid-Gruppe wurde bei 57% der Knochen eine geringe bis mittlere Zubildung von neuem Knochen an der Kortikalis beobachtet. Auch hier zeigte ein Präparat an der distalen Epiphyse eine knorpelige Zubildung mit voranschreitender Verknöcherung (Abb. 23 (a)). In der Placebo & semi-rigid-Gruppe zeigte sich ein ähnliches Bild. Bei 43% der Knochen bildete sich neuer Knochen vor allem an der distalen Kortikalis. Ein Präparat wies an der distalen Epiphyse eine mittlere Menge an Knorpelneubildungen auf. Unter den Knochen der Placebo & rigid-Gruppe waren 25% der Knochen mit einer geringen Knochenneubildung im Kortikalisbereich und 25% mit einer mittleren. Ein Knochen zeigte eine geringe Menge an neu gebildetem Knorpel an der distalen Epiphysenfuge, und an einem weiteren Knochen (Abb 23 (b)) lag eine verknöcherte Zubildung im Bereich der distalen Epiphysenfuge vor.

Auch nach 21 Tagen schienen die Sklerostin-Antikörper im Vergleich zu den Placebogruppen keinen steigernden Effekt auf die Knochenbildung außerhalb der Osteotomieregion zu haben. Vielmehr waren in der Gruppe mit semi-steifem Fixateur, die Sklerostin-Antikörper bekam, am wenigsten knöcherne Zubildungen zu finden.



(a) Skl-Ak & rigid; knorpelige Zubildung (Pfeil) mit voranschreitender Verknöcherung an der distalen Epiphyse.



(b) Placebo & rigid; verknöcherte Zubildung (Pfeil) im Bereich der Epiphyse.

Abbildung 23. Knorpel- und Knochenzubildungen 21 Tage post operationem

4.2. HISTOMORPHOMETRISCHE AUSWERTUNG

Mit Hilfe der histomorphometrischen Auswertung konnte die Verteilung der Gewebe im Osteotomiespalt bestimmt und miteinander verglichen werden. Die evaluierten Flächen wurden in mm^2 und die Flächenanteile in % angegeben. Zur Auswertung kam jeweils ein Längsschnitt, der möglichst mittig durch den Femur ging.

4.2.1. Prozentuale Flächenverteilung

7 Tage post operationem war nur bei der Verteilung des Knorpelgewebes ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen sichtbar ($p=0,006$) (siehe Tab. 4 und Abb. 24). In der Skl-Ak & semi-rigid-Gruppe war ein geringer Anteil an Knorpel sichtbar, wohingegen der mediane Knorpelanteil in den restlichen Gruppen Null war. Der paarweise Vergleich der Gruppen zeigte, dass nur zwischen der Skl-Ak & semi-rigid-Gruppe und der Placebo & rigid-Gruppe ein signifikanter Unterschied in der Knorpelverteilung vorlag ($p=0,019$) (siehe Tab. 5).

Es war in allen vier Gruppen kaum neu gebildeter Knochen vorhanden und es war kein Unterschied zwischen den Gruppen sichtbar ($p=0,266$) (siehe Tab. 4 und Abb. 24). In beiden Gruppen mit steifem Fixateur wurde ein höherer Prozentsatz an Knochenmark beobachtet als in den beiden Gruppen mit semi-steifem Fixateur. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant, er lag knapp über dem Signifikanzniveau von 0,05 ($p=0,053$).

7 Tage post operationem war in allen vier Gruppen Bindegewebe der vorherrschende Gewebetyp. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu sehen ($p=0,257$).

Tabelle IV. Gewebeverteilung in Prozent im gesamten Kallus 7 Tage nach der Osteotomie mit Median, 25%- und 75%-Quantil und Signifikanzen

			rigid				semi-rigid				Signifikanz ($p<0,05$)
			Skl-Ak		Placebo		Skl-Ak		Placebo		
Knochenmark	Median		8,28		2,68		0,00		0,00		0,053
	25%	75%	3,59	13,84	1,89	15,86	0,00	2,22	0,00	4,06	
Bindegewebe	Median		86,93		95,29		92,73		97,54		0,257
	25%	75%	82,96	92,06	83,45	95,60	90,00	95,19	81,94	97,80	
Knorpel	Median		0,00		0,00		2,78		0,00		0,006
	25%	75%	0,00	0,31	0,00	0,00	0,00	4,15	0,00	0,74	
Knochen	Median		3,89		1,64		2,88		2,26		0,266
	25%	75%	1,79	5,90	0,69	2,01	1,82	4,35	1,10	5,07	

Tabelle V. Paarweise Vergleiche der Knorpelverteilung im gesamten Kallus 7 Tage nach der Osteotomie

		rigid		semi-rigid	
		Skl-Ak	Placebo	Skl-Ak	Placebo
rigid	Skl-Ak	-	1,000	0,065	1,000
	Placebo	-	-	0,019	1,000
semi-rigid	Skl-Ak	-	-	-	0,053
	Placebo	-	-	-	-

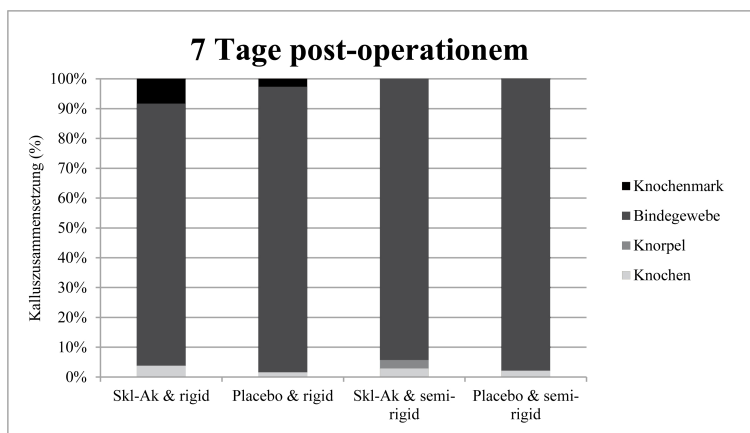


Abbildung 24. Gewebeverteilung in Prozent im gesamten Kallus 7 Tage nach der Osteotomie

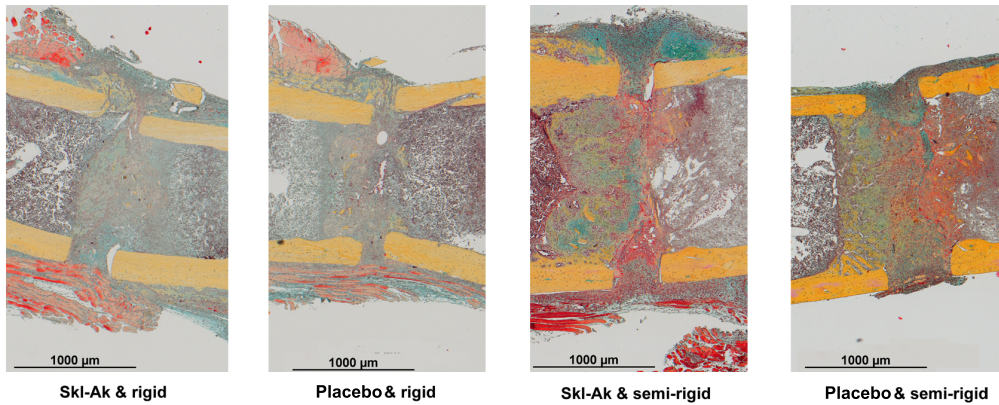


Abbildung 25. Movat's-Pentachrom-gefärbte histologische Schnittpräparate 7 Tage post operationem. Knochen - gelb, Knorpel - grün, Knochenmark - violett

14 Tage nach der Operation waren signifikante Unterschiede in der Verteilung von Knochengewebe zwischen den Gruppen sichtbar ($p < 0,001$) (siehe Tab. 6 und Abb. 26). Paarweise Vergleiche zeigten, dass signifikant weniger Knochen in der Skl-Ak & semi-rigid-Gruppe im Vergleich mit der Skl-Ak & rigid-Gruppe ($p = 0,001$) vorhanden war (siehe Tab. 7). Ebenso war signifikant weniger Knochen in der Skl-Ak & semi-rigid-Gruppe verglichen mit der Placebo & rigid-Gruppe ($p = 0,044$) vorhanden. Des Weiteren war ein signifikanter Unterschied zwischen der Skl-Ak & rigid-Gruppe und der Placebo & semi-rigid-Gruppe zu finden ($p = 0,016$).

Bei Betrachtung der Verteilung des Knorpelgewebes war in der Placebo & semi-rigid-Gruppe mehr Knorpel zu sehen als in den anderen Gruppen, allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant ($p = 0,159$) (siehe Tab. 6 und Abb. 26).

14 Tage nach der Osteotomie war auch ein signifikanter Unterschied in der Verteilung von Knochenmark zwischen den Gruppen sichtbar ($p < 0,001$) (siehe Tab. 6 und Abb. 26). In den paarweisen Vergleichen zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Skl-Ak & rigid-Gruppe und den Gruppen mit semi-steifem Fixateur ($p = 0,002$ bzw. $p = 0,013$) und der Placebo & rigid-Gruppe und den Gruppen mit semi-steifer Fixation ($p = 0,003$ bzw. $p = 0,020$) (siehe Tab. 8).

Auch in der Verteilung von Bindegewebe lagen Unterschiede zwischen den Gruppen vor ($p = 0,001$) (siehe Tab. 6 und Abb. 26). Die Skl-Ak & rigid-Gruppe wies deutlich weniger Bindegewebe auf als die Gruppen mit semi-steifem Fixateur ($p = 0,011$ bzw. $p = 0,005$) (siehe Tab. 9).

Tabelle VI. Gewebeverteilung in Prozent im gesamten Kallus 14 Tage nach der Osteotomie mit Median, 25%- und 75%-Quantil und Signifikanzen

			rigid				semi-rigid				Signifikanz ($p < 0,05$)
			Skl-Ak		Placebo		Skl-Ak		Placebo		
Knochenmark	Median		11,36		17,61		1,13		0,00		<0,001
	25%	75%	3,91	25,46	5,81	23,16	0,00	2,13	0,00	0,54	
Bindegewebe	Median		51,90		51,41		79,10		75,92		0,001
	25%	75%	41,97	61,01	42,75	74,19	76,60	90,40	68,90	87,82	
Knorpel	Median		3,16		2,34		1,60		10,11		0,159
	25%	75%	0,93	14,08	0,00	7,10	0,00	3,00	4,68	16,55	
Knochen	Median		23,33		20,78		18,08		9,61		<0,001
	25%	75%	17,80	28,79	12,90	28,87	9,09	19,68	5,16	15,61	

Tabelle VII. Paarweise Vergleiche der Knochenverteilung im gesamten Kallus 14 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau $p < 0,05$

		rigid		semi-rigid	
		SkI-Ak	Placebo	SkI-Ak	Placebo
rigid	SkI-Ak	-	1,000	0,001	0,016
	Placebo	-	-	0,044	0,443
semi-rigid	SkI-Ak	-	-	-	1,000
	Placebo	-	-	-	-

Tabelle VIII. Paarweise Vergleiche der Knochenmarksverteilung im gesamten Kallus 14 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau $p < 0,05$

		rigid		semi-rigid	
		SkI-Ak	Placebo	SkI-Ak	Placebo
rigid	SkI-Ak	-	1,000	0,002	0,013
	Placebo	-	-	0,003	0,020
semi-rigid	SkI-Ak	-	-	-	1,000
	Placebo	-	-	-	-

Tabelle IX. Paarweise Vergleiche der Bindegewebsverteilung im gesamten Kallus 14 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau $p < 0,05$

		rigid		semi-rigid	
		SkI-Ak	Placebo	SkI-Ak	Placebo
rigid	SkI-Ak	-	1,000	0,005	0,011
	Placebo	-	-	0,082	0,177
semi-rigid	SkI-Ak	-	-	-	1,000
	Placebo	-	-	-	-

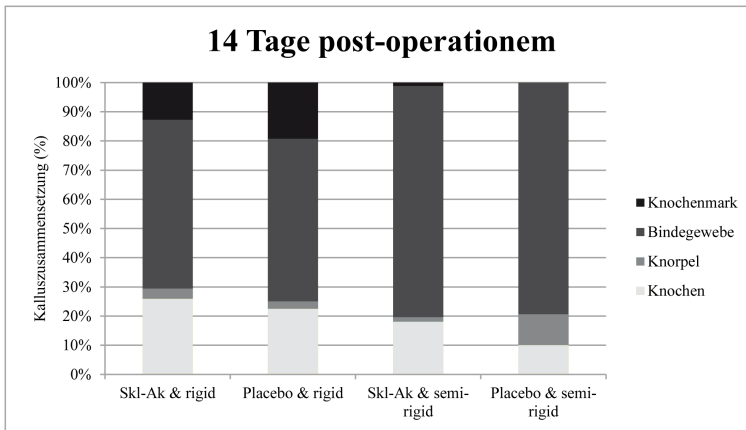


Abbildung 26. Gewebeverteilung in Prozent im gesamten Kallus 14 Tage nach der Osteotomie

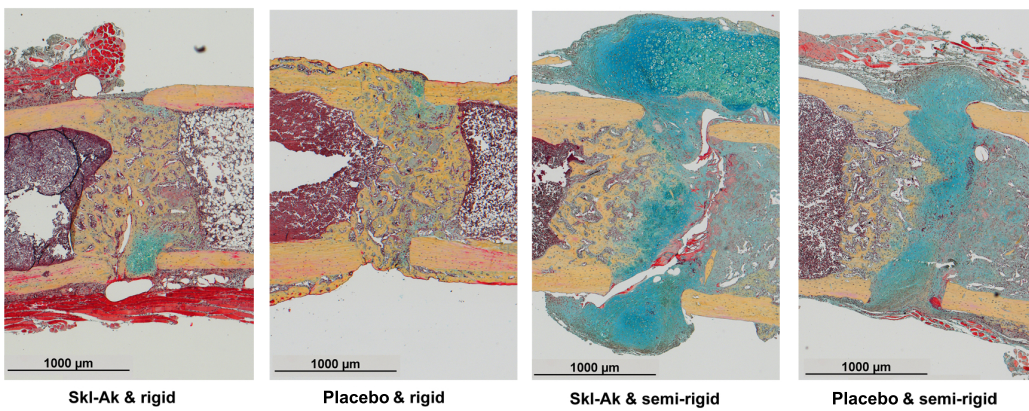


Abbildung 27. Movat's-Pentachrom-gefärbte histologische Schnittpräparate 14 Tage post operationem. Knochen - gelb, Knorpel - grün, Knochenmark - violett

Nach 21 Tagen wies die Skl-Ak & rigid-Gruppe prozentual zwar den meisten Knochen auf, es waren allerdings keine signifikanten Unterschiede zwischen den vier Gruppen in der Verteilung des Knochengewebes vorhanden ($p=0,164$) (siehe Tab. 10 und Abb. 28). Ebenso lagen keine signifikanten Unterschiede in der prozentualen Verteilung von Knorpelgewebe vor ($p=0,371$).

Die Verteilung von Knochenmark ($p=0,003$) und Bindegewebe ($p=0,009$) wies signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen auf (siehe Tab. 10 und Abb. 28). Bei Betrachtung der paarweisen Vergleiche waren diese Unterschiede zwischen den beiden mit Sklerostin-Antikörpern behandelten Gruppen sichtbar ($p=0,008$ bzw. $p=0,012$) (siehe Tab. 11 und 12), wobei die Skl-Ak & semi-rigid-Gruppe weniger Knochenmark und mehr Bindegewebe als die Skl-Ak & rigid-Gruppe aufwies.

Ergebnisse

Tabelle X. Gewebeverteilung in Prozent im gesamten Kallus 21 Tage nach der Osteotomie mit Median, 25%- und 75%-Quantil und Signifikanz

			rigid				semi-rigid				Signifikanz (p<0,05)
			Skl-Ak		Placebo		Skl-Ak		Placebo		
Knochenmark	Median		23,56		14,06		1,13		1,62		0,003
	25%	75%	10,56	37,74	6,89	29,17	0,00	2,13	0,73	5,40	
Bindegewebe	Median		43,67		65,87		79,10		77,87		0,009
	25%	75%	32,38	63,85	44,51	80,88	76,60	90,40	63,34	89,89	
Knorpel	Median		0,00		0,00		1,60		4,21		0,371
	25%	75%	0,00	0,46	0,00	0,88	0,00	3,00	0,00	14,20	
Knochen	Median		27,91		18,02		18,08		12,08		0,164
	25%	75%	14,26	36,20	7,70	25,20	9,09	19,68	5,49	17,54	

Tabelle XI. Paarweise Vergleiche der Knochenmarksverteilung im gesamten Kallus 21 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau p<0,05

		rigid		semi-rigid	
		Skl-Ak	Placebo	Skl-Ak	Placebo
rigid	Skl-Ak	-	1,000	0,008	0,072
	Placebo	-	-	0,063	0,366
semi-rigid	Skl-Ak	-	-	-	1,000
	Placebo	-	-	-	-

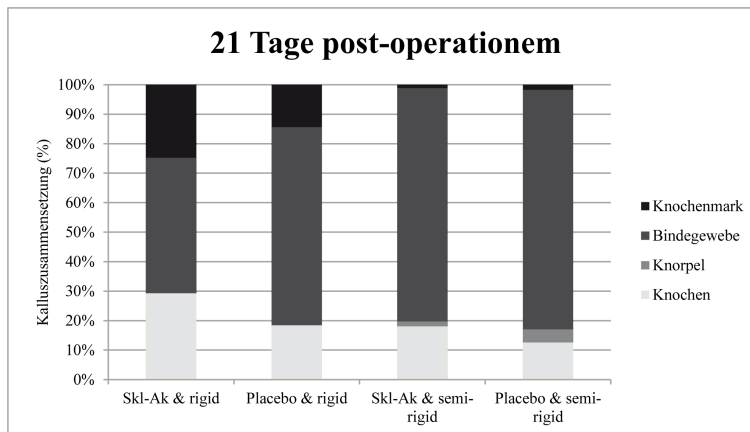


Abbildung 28. Gewebeverteilung in Prozent im gesamten Kallus 21 Tage nach der Osteotomie

Tabelle XII. Paarweise Vergleiche der Bindegewebsverteilung im gesamten Kallus 21 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau $p < 0,05$

		rigid		semi-rigid	
		SkI-Ak	Placebo	SkI-Ak	Placebo
rigid	SkI-Ak	-	0,806	0,012	0,060
	Placebo	-	-	0,595	1,000
semi-rigid	SkI-Ak	-	-	-	1,000
	Placebo	-	-	-	-

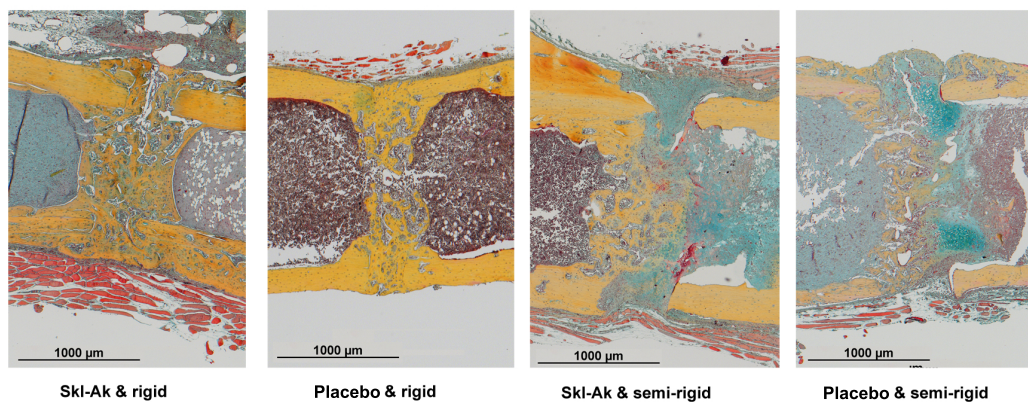


Abbildung 29. Movat's-Pentachrom-gefärbte histologische Schnittpräparate 21 Tage post operationem. Knochen - gelb, Knorpel - grün, Knochenmark - violett

4.2.2. Totale Kallusfläche

Die totale Kallusfläche setzt sich aus der gesamten Knorpel-, Knochen-, Bindegewebs- und Knochenmarksfläche in der ROI zusammen.

An Tag 7 nach der Operation wiesen die beiden Gruppen, die mit Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern behandelt wurden, den größten Kallus auf ($p=0,003$) (siehe Tab. 13 und Abb. 30) mit dem größten Kallus in der SkI-Ak & semi-rigid-Gruppe. Es bestand allerdings nur ein kleiner Unterschied zwischen der SkI-Ak & rigid-Gruppe und der Placebo & semi-rigid-Gruppe. Daher war die Kallusfläche eine Woche nach der Operation auch durch die Fixation beeinflusst ($p=0,029$). Von Tag 7 bis Tag 14 post operationem kam es in der Placebo & semi-rigid-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der gesamten Kallusfläche ($p=0,015$). Nach 14 Tagen war somit ein großer Unterschied zwischen den Gruppen mit steifem und mit semi-steifem Fixateur zu sehen ($p < 0,001$) (siehe Tab. 13 und Abb. 30). Nach diesem Peak an Tag 14 post operationem in den semi-rigid-Gruppen nahm die Kallusfläche in diesen beiden Gruppen numerisch wieder ab. Dennoch war auch nach 21 Tagen in den semi-rigid-Gruppen ein signifikant größerer Kallus vorhanden als in den rigid-Gruppen ($p=0,002$). Die SkI-Ak & rigid-Gruppe wies über die 21 Tage nach der Operation eine annähernd gleichgroße Kallusfläche auf. Die Placebo & rigid-Gruppe zeigte dagegen den numerisch kleinsten Kallus.

Tabelle XIII. Totale Kallusfläche in mm^2 mit Standardabweichung und Signifikanzen

	rigid		semi-rigid		Signifikanz (p<0,05)		
	Skl-Ak	Placebo	Skl-Ak	Placebo	Fixation	Behandlung	Interaktion
7 Tage	1,647 ± 0,160	1,383 ± 0,265	1,893 ± 0,307	1,571 ± 0,289	0,029	0,003	0,763
14 Tage	1,643 ± 0,123	1,483 ± 0,172	2,061 ± 0,316	2,086 ± 0,519	<0,001	0,923	0,444
21 Tage	1,656 ± 0,299	1,553 ± 0,188	1,866 ± 0,149	1,877 ± 0,135	0,002	0,459	0,454
	Signifikanz (p<0,05)						
7->14 Tage	0,999	0,655	0,387	0,015			
14->21 Tage	0,997	0,801	0,349	0,503			

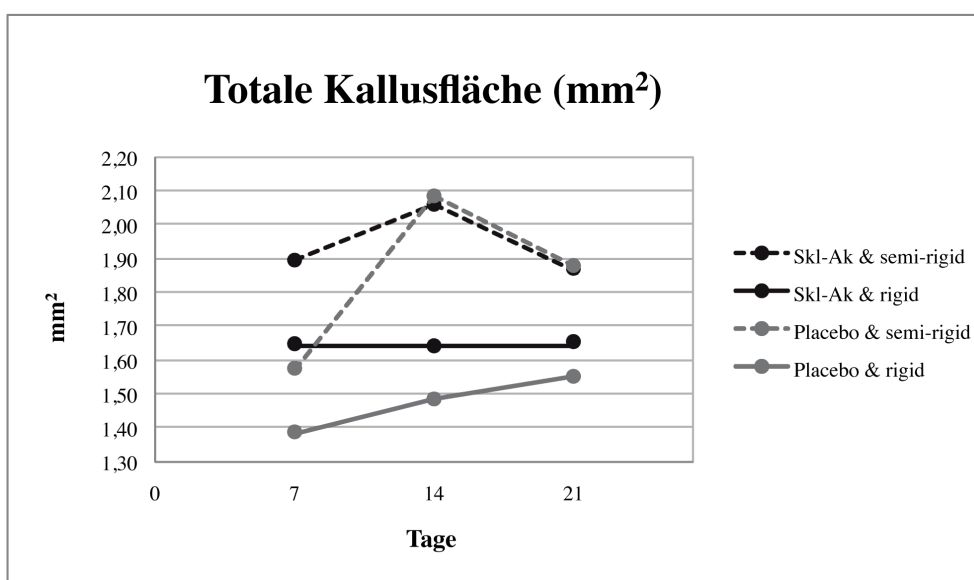


Abbildung 30. Totale Kallusfläche in mm^2 7, 14 und 21 Tage post operationem

4.2.3. Menge des Knorpelgewebes im gesamten Kallus

7 Tage nach der Operation war in allen vier Gruppen relativ wenig Knorpelgewebe vorhanden (siehe Tab. 14 und Abb. 31). Der mit Abstand meiste Knorpel war in der Skl-Ak & semi-rigid-Gruppe zu sehen. Zu diesem Zeitpunkt war ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Fixation ($p=0,001$), der Behandlung ($p=0,001$) sowie der Interaktion ($p=0,009$) vorhanden und es lagen relativ niedrige Standardabweichungen vor. Die paarweisen Vergleiche (siehe Tab. 15) zeigten signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit steifem Fixateur sowie zwischen den beiden Gruppen mit semi-steifem Fixateur. Ebenso lagen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen vor, die mit Sklerostin-Antikörpern behandelt wurden, sowie zwischen den beiden Gruppen, die ein Placebo bekamen.

In allen vier Gruppen war der meiste Knorpel nach 14 Tagen sichtbar (siehe Tab. 14 und Abb. 31) und es war ein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Fixateuren vorhanden ($p=0,009$) mit dem meisten Knorpel in den beiden Gruppen mit semi-steifem Fixateur. In beiden Gruppen mit semi-steifem Fixateur war von Tag 7 zu Tag 14 eine starke Zunahme an Knorpelgewebe zu beobachten ($p=0,021$ bzw. $p=0,048$). Allerdings kam es auch in der Placebo & rigid-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg von Knorpelgewebe ($p=0,016$).

In der dritten Woche nach der Operation war in der Placebo & rigid-Gruppe ein signifikanter Abfall der Knorpelmenge sichtbar ($p=0,045$) (siehe Tab. 14 und Abb. 31). Auch in der Skl-Ak & semi-rigid-Gruppe nahm die Menge an Knorpel wieder stark ab ($p=0,036$). In den beiden Gruppen mit steifem Fixateur war an Tag 21 kaum noch Knorpel sichtbar. Nur die Placebo & semi-rigid-Gruppe wies auch drei Wochen nach der Operation noch eine relativ große Menge an Knorpel auf. Dennoch war auch 21 Tage post operationem noch ein signifikanter Unterschied zwischen den steifen und den semi-steifen Fixateuren sichtbar ($p=0,02$).

Tabelle XIV. Totale Knorpelfläche in mm^2 mit Standardabweichung und Signifikanzen

	rigid		semi-rigid		Signifikanz ($p<0,05$)		
	Skl-Ak	Placebo	Skl-Ak	Placebo	Fixation	Behandlung	Interaktion
7 Tage	0,001 $\pm 0,004$	0 ± 0	0,054 $\pm 0,042$	0,006 $\pm 0,007$	0,001	0,001	0,009
14 Tage	0,076 $\pm 0,109$	0,054 $\pm 0,053$	0,356 $\pm 0,372$	0,282 $\pm 0,318$	0,009	0,709	0,777
21 Tage	0,003 $\pm 0,008$	0,010 $\pm 0,024$	0,051 $\pm 0,086$	0,214 $\pm 0,270$	0,020	0,144	0,146
	Signifikanz ($p<0,05$)						
7->14 Tage	0,091	0,016	0,021	0,048			
14->21 Tage	0,083	0,045	0,036	0,838			

Tabelle XV. Paarweise Vergleiche der Knorpelflächen 7 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau $p<0,05$

		rigid		semi-rigid	
		Skl-Ak	Placebo	Skl-Ak	Placebo
rigid	Skl-Ak	-	0,021	0,025	-
	Placebo	-	-	-	0,033
semi-rigid	Skl-Ak	-	-	-	0,037
	Placebo	-	-	-	-

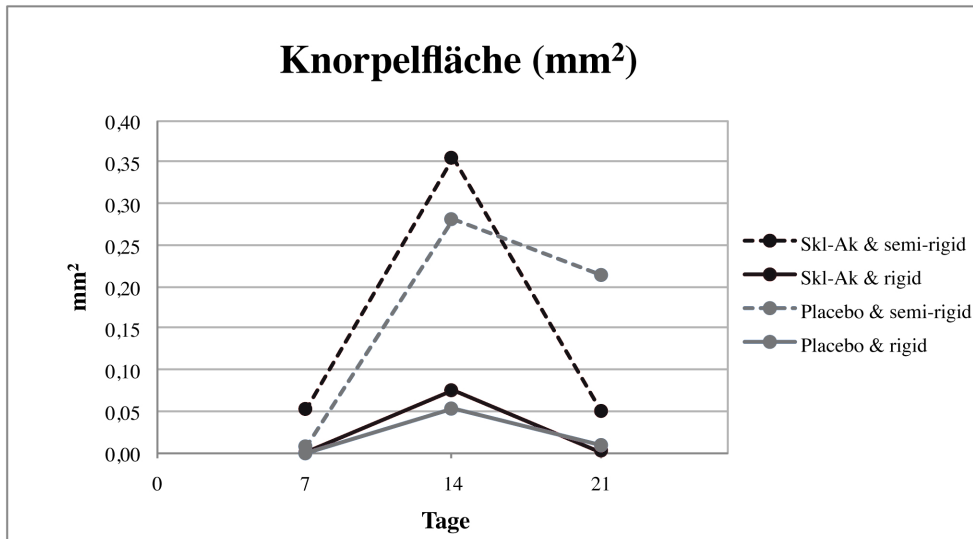


Abbildung 31. Totale Knorpelfläche in mm^2 7, 14 und 21 Tage post operationem

4.2.4. Menge an neu gebildetem Knochen im gesamten Kallus

An Tag 7 nach der Operation war in allen vier Gruppen kaum neu gebildeter Knochen sichtbar (siehe Tab. 16 und Abb. 32).

In der zweiten Woche post operationem war in den beiden Gruppen mit steifem Fixateur ($p=0,001$ bzw. $p=0,005$) und in der Placebo & semi-rigid-Gruppe ($p=0,007$) eine signifikante Zunahme an Knochen zu verzeichnen. In beiden Gruppen mit steifem Fixateur war nach 2 Wochen mehr Knochen vorhanden als in den beiden Gruppen mit semi-steifem Fixateur ($p<0,001$). Zu diesem Zeitpunkt lag außerdem eine Signifikanz der Interaktion von Fixation und Behandlung vor ($p=0,008$). Die Sklerostin-Antikörper-Gruppe mit steifem Fixateur wies nach 14 Tagen das meiste Knochengewebe auf, wohingegen bei der Sklerostin-Antikörper-Gruppe mit semi-steifem Fixateur am wenigsten Knochengewebe vorlag. Die paarweisen Vergleiche zeigten, dass bei den beiden Gruppen mit steifem Fixateur die Gruppe, die Sklerostin-Antikörper bekam, deutlich mehr Knochen gebildet hatte ($p=0,040$). Bei den beiden Gruppen, die Sklerostin-Antikörper bekamen, wies die Gruppe mit steifem Fixateur mehr Knochengewebe auf ($p<0,001$) (siehe Tab. 17).

Erst in der dritten Woche stieg auch in der Skl-Ak & semi-rigid-Gruppe die Menge an Knochen signifikant an ($p=0,008$) (siehe Tab. 16 und Abb. 32). Nachdem an Tag 14 hier noch die geringste Menge an Knochen zu verzeichnen war, wies die Skl-Ak & semi-rigid-Gruppe nach 21 Tagen die numerisch zweitgrößte Menge an neu gebildetem Knochen auf. Dadurch kam es nach 21 Tagen zu einer signifikant größeren Knochenmenge in den Sklerostin-Antikörper-Gruppen im Vergleich zu den Placebo-Gruppen ($p=0,013$).

Tabelle XVI. Totale Knochenfläche in mm^2 mit Standardabweichung und Signifikanzen

	rigid		semi-rigid		Signifikanz (p<0,05)		
	SkI-Ak	Placebo	SkI-Ak	Placebo	Fixation	Behandlung	Interaktion
7 Tage	0,053 ± 0,034	0,041 ± 0,037	0,063 ± 0,040	0,051 ± 0,075	0,584	0,505	0,990
14 Tage	0,430 ± 0,118	0,271 ± 0,150	0,144 ± 0,083	0,208 ± 0,121	<0,001	0,314	0,008
21 Tage	0,486 ± 0,217	0,245 ± 0,133	0,277 ± 0,120	0,217 ± 0,114	0,050	0,013	0,120
	Signifikanz (p<0,05)						
7->14 Tage	0,001	0,005	0,091	0,007			
14->21 Tage	0,998	0,904	0,008	0,983			

Tabelle XVII. Paarweise Vergleiche der Knochenflächen 14 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau p<0,05

		rigid		semi-rigid	
		SkI-Ak	Placebo	SkI-Ak	Placebo
rigid	SkI-Ak	-	0,040	<0,001	-
	Placebo	-	-	-	0,329
semi-rigid	SkI-Ak	-	-	-	0,170
	Placebo	-	-	-	-

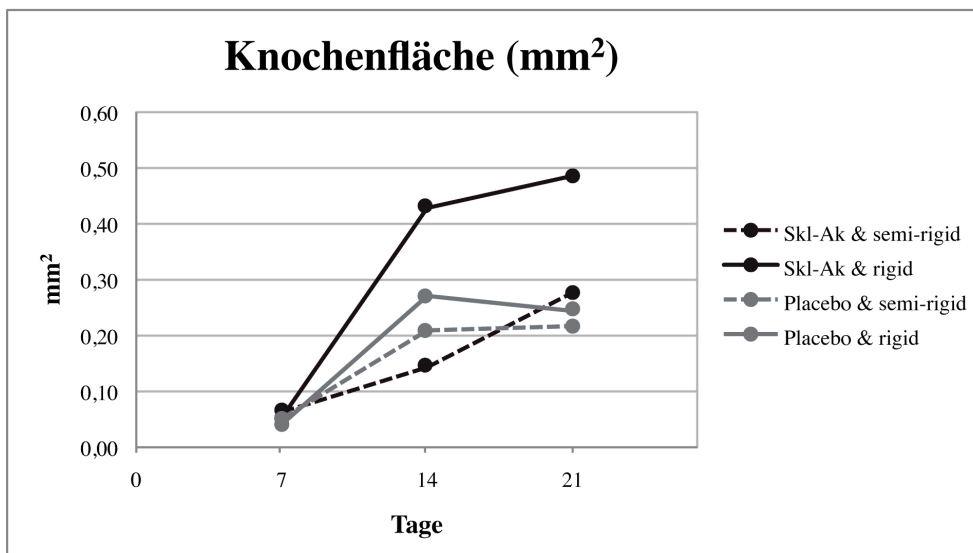


Abbildung 32. Totale Knochenfläche in mm^2 7, 14 und 21 Tage post operationem

4.2.5. Menge an Bindegewebe im gesamten Kallus

Die Menge an Bindegewebe im Kallus wurde vor allem durch die Fixationssteifigkeit beeinflusst. An Tag 7 post operationem war in der SkI-Ak & semi-rigid-Gruppe die größte Menge an Bindegewebe vorhanden und in der Placebo & rigid-Gruppe am wenigsten (siehe Tab. 18 und Abb. 33). Die SkI-Ak

& rigid-Gruppe und die Placebo & semi-rigid-Gruppe hatten fast die gleiche Menge an Bindegewebe. Daher war an Tag 7 eine Signifikanz in der Fixationssteifigkeit ($p=0,002$) ebenso wie in der Behandlung ($p=0,007$) zu verzeichnen.

In der zweiten Woche kam es zu einer signifikanten Abnahme der Bindegewebsfläche in der Skl-Ak & rigid-Gruppe ($p<0,001$) (siehe Tab. 18 und Abb. 33). Nach 14 ($p<0,001$) ebenso wie nach 21 ($p<0,001$) Tagen lag eine Signifikanz in der Fixationssteifigkeit vor mit deutlich mehr Bindegewebe in den beiden Gruppen mit semi-steifem Fixateur.

Tabelle XVIII. Totale Bindegewebsfläche in mm^2 mit Standardabweichung und Signifikanzen

	rigid		semi-rigid		Signifikanz ($p<0,05$)		
	Skl-Ak	Placebo	Skl-Ak	Placebo	Fixation	Behandlung	Interaktion
7 Tage	1,457 $\pm 0,159$	1,183 $\pm 0,227$	1,760 $\pm 0,290$	1,508 $\pm 0,323$	0,002	0,007	0,907
14 Tage	0,825 $\pm 0,182$	0,850 $\pm 0,291$	1,555 $\pm 0,269$	1,592 $\pm 0,295$	<0,001	0,323	0,948
21 Tage	0,826 $\pm 0,294$	0,933 $\pm 0,394$	1,514 $\pm 0,182$	1,394 $\pm 0,237$	<0,001	0,841	0,307
	Signifikanz ($p<0,05$)						
7->14 Tage	<0,001	0,148	0,200	0,793			
14->21 Tage	0,904	0,870	0,945	0,345			

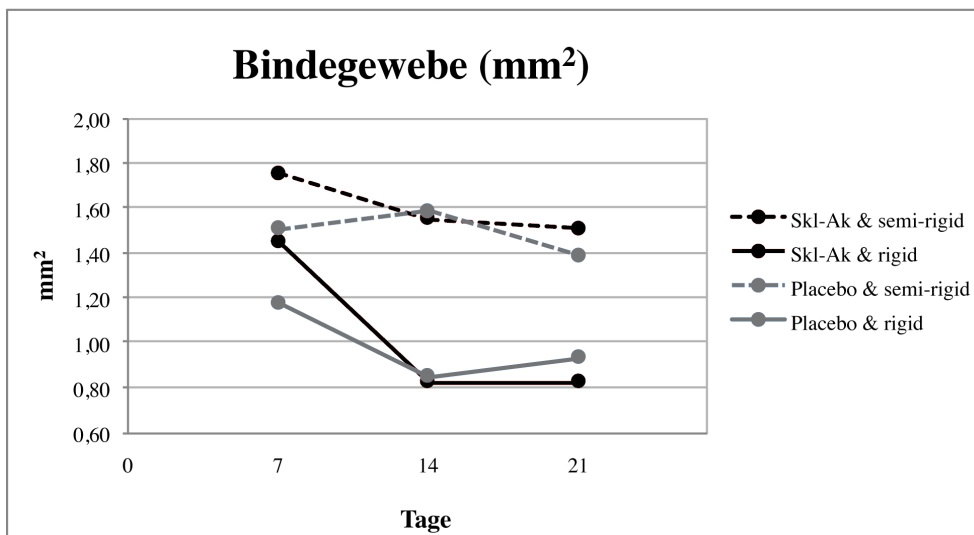


Abbildung 33. Totale Bindegewebsfläche in mm^2 7, 14 und 21 Tage post operationem

4.2.6. Menge an Knochenmark im gesamten Kallus

Die Menge an Knochenmark war ebenso durch die Fixationssteifigkeit beeinflusst wie das Bindegewebe, allerdings gegenläufig. Beide Gruppen mit semi-steifem Fixateur wiesen zu allen drei Zeitpunkten eine sehr geringe Menge an Knochenmark auf (siehe Tab. 19 und Abb. 34). Schon an Tag 7 war ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen mit steifem und mit semi-steifem Fixateur zu sehen ($p < 0,001$). Die beiden Gruppen mit steifem Fixateur zeigten einen kontinuierlichen wenngleich nicht signifikanten Anstieg an Knochenmark über die drei Wochen. In der Placebo & semi-rigid-Gruppe kam es in der dritten Woche zu einer signifikanten Zunahme von Knochenmark ($p = 0,009$). Dennoch kam es zu einem immer größer werdenden Unterschied zwischen den rigid und den semi-rigid Gruppen mit einer Signifikanz an Tag 14 und an Tag 21 von $p < 0,001$.

Tabelle XIX. Totale Knochenmarksfläche in mm^2 mit Standardabweichung und Signifikanzen

	rigid		semi-rigid		Signifikanz ($p < 0,05$)		
	SkI-Ak	Placebo	SkI-Ak	Placebo	Fixation	Behandlung	Interaktion
7 Tage	0,136 ± 0,099	0,159 ± 0,107	0,016 ± 0,032	0,007 ± 0,011	<0,001	0,746	0,512
14 Tage	0,311 ± 0,243	0,307 ± 0,159	0,006 ± 0,013	0,004 ± 0,007	<0,001	0,553	0,980
21 Tage	0,341 ± 0,180	0,365 ± 0,304	0,023 ± 0,022	0,051 ± 0,060	<0,001	0,602	0,972
	Signifikanz ($p < 0,05$)						
7->14 Tage	0,185	0,412	0,626	0,981			
14->21 Tage	0,990	0,861	0,344	0,009			

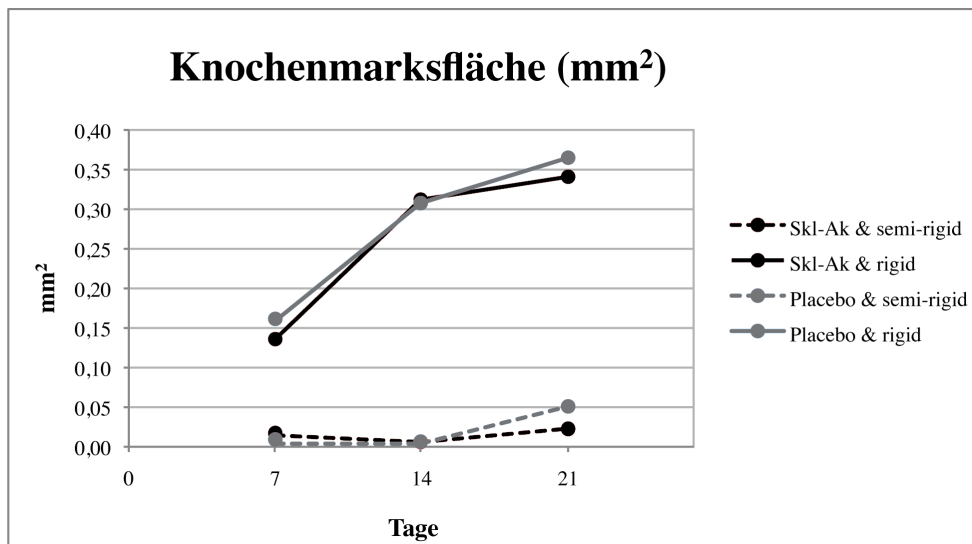


Abbildung 34. Totale Knochenmarksfläche in mm^2 7, 14 und 21 Tage post operationem

4.2.7. Periostaler Kallus

7 Tage nach der Osteotomie zeigte sich im periostalen Kallus ein ähnliches Bild wie im gesamten Kallus. Im Gegensatz zum gesamten Kallus war allerdings nur in der SkI-Ak & rigid-Gruppe bereits Knochen zu sehen. Die drei anderen Gruppen wiesen keinen Knochen im periostalen Kallus auf, dafür aber mehr Knorpel als im gesamten Kallus (siehe Tab. 20 und Abb. 35). Nur bei der Verteilung des Knorpelgewebes waren signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen sichtbar ($p = 0,046$). Die paarweisen

Vergleiche zeigten allerdings keine signifikanten Unterschiede (siehe Tab. 21). In allen vier Gruppen war Bindegewebe der vorherrschende Gewebetyp und es war kein Knochenmark vorhanden.

Tabelle XX. Gewebeverteilung in Prozent im periostalen Kallus 7 Tage nach der Osteotomie mit Median, 25%- und 75%-Quantil und Signifikanz

			rigid				semi-rigid				Signifikanz (p<0,05)
			Skl-Ak		Placebo		Skl-Ak		Placebo		
Knochen- mark	Median		0,00		0,00		0,00		0,00		1,000
	25%	75%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Binde- gewebe	Median		96,15		100,00		96,55		100,00		0,220
	25%	75%	92,38	100,00	98,11	100,00	91,04	100,00	96,27	100,00	
Knorpel	Median		0,00		0,00		3,03		0,00		0,046
	25%	75%	0,00	1,67	0,00	0,00	0,00	6,78	0,00	0,00	
Knochen	Median		3,33		0,00		0,00		0,00		0,424
	25%	75%	0,00	6,21	0,00	0,00	0,00	1,49	0,00	1,88	

Tabelle XXI. Paarweise Vergleiche der Knorpelverteilung im periostalen Kallus 7 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau p<0,05

		rigid		semi-rigid	
		Skl-Ak	Placebo	Skl-Ak	Placebo
rigid	Skl-Ak	-	1,000	0,632	1,000
	Placebo	-	-	0,182	1,000
semi-rigid	Skl-Ak	-	-	-	0,069
	Placebo	-	-	-	-

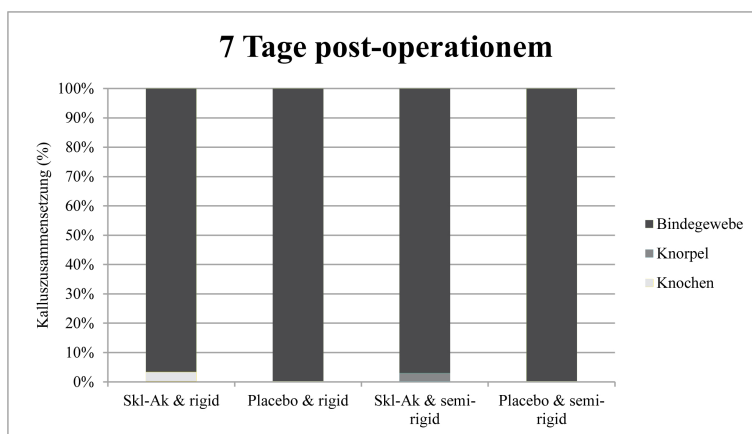


Abbildung 35. Periostale Kalluszusammensetzung 7 Tage nach der Osteotomie

14 Tage nach der Osteotomie war in allen vier Gruppen verhältnismäßig wenig neu gebildeter Knochen zu sehen (siehe Tab. 22 und Abb. 36). Periostal war in der Placebo & rigid-Gruppe nach 14 Tagen die meiste Menge an Knochen sichtbar. Im gesamten Kallus war allerdings die Skl-Ak & rigid-Gruppe die Gruppe mit der größten Menge an neu gebildetem Knochen (siehe Tab. 6).

Es gab zwischen den Gruppen signifikante Unterschiede in der Verteilung des Knochengewebes ($p=0,005$). Diese Unterschiede lagen vor allem zwischen den beiden Sklerostin-Antikörper-Gruppen ($p=0,037$) sowie der Skl-Ak & semi-rigid-Gruppe und der Placebo & rigid-Gruppe ($p=0,037$) vor (siehe Tab. 23).

Tabelle XXII. Gewebeverteilung in Prozent im periostalen Kallus 14 Tage nach der Osteotomie mit Median, 25%- und 75%-Quantil und Signifikanz

			rigid				semi-rigid				Signifikanz ($p<0,05$)
			Skl-Ak		Placebo		Skl-Ak		Placebo		
Knochenmark	Median		0,00		0,00		0,00		0,00		1,000
	25%	75%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Bindegewebe	Median		84,00		75,00		92,21		74,72		0,923
	25%	75%	57,79	93,30	67,86	88,37	60,22	98,13	63,44	98,55	
Knorpel	Median		0,00		0,00		5,63		18,13		0,252
	25%	75%	0,00	25,37	0,00	10,53	0,00	39,78	1,45	27,78	
Knochen	Median		9,38		14,29		1,41		2,24		0,005
	25%	75%	4,85	18,70	5,26	25,00	0,00	3,25	0,00	6,65	

Tabelle XXIII. Paarweise Vergleiche der Knochenverteilung im periostalen Kallus 14 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau $p<0,05$

		rigid		semi-rigid	
		Skl-Ak	Placebo	Skl-Ak	Placebo
rigid	Skl-Ak	-	1,000	0,037	0,120
	Placebo	-	-	0,037	0,115
semi-rigid	Skl-Ak	-	-	-	1,000
	Placebo	-	-	-	-

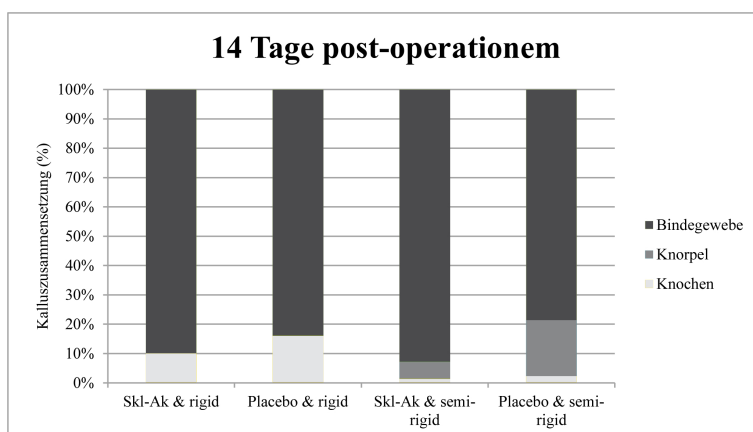


Abbildung 36. Periostale Kalluszusammensetzung 14 Tage nach der Osteotomie

21 Tage nach der Operation zeigte sich in den Gruppen mit steifem Fixateur ein ähnliches Bild wie im gesamten Kallus mit dem meisten neu gebildeten Knochen in der Skl-Ak & rigid-Gruppe. Allerdings gab es keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung von Knochengewebe ($p=0,144$), Knorpelgewebe

($p=0,994$) und Bindegewebe ($p=0,077$) zwischen den Gruppen (siehe Tab. 24 und Abb. 37). Es war in allen vier Gruppen eine prozentual geringere Menge an Knochen im periostalen Kallus als im gesamten Kallus vorhanden.

Tabelle XXIV. Gewebeverteilung in Prozent im periostalen Kallus 21 Tage nach der Osteotomie mit Median, 25%- und 75%-Quantil und Signifikanzen

			rigid				semi-rigid				Signifikanz ($p<0,05$)
			SkI-Ak		Placebo		SkI-Ak		Placebo		
Knochenmark	Median		0,00		0,00		0,00		0,00		1,000
	25%	75%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Bindegewebe	Median		76,79		81,68		94,44		90,21		0,077
	25%	75%	65,93	82,26	76,73	96,54	87,23	95,45	77,39	98,61	
Knorpel	Median		0,00		0,00		0,00		0,00		0,994
	25%	75%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	6,09	
Knochen	Median		20,71		14,19		5,56		5,37		0,144
	25%	75%	8,00	30,57	3,46	19,32	4,55	12,77	1,39	16,19	

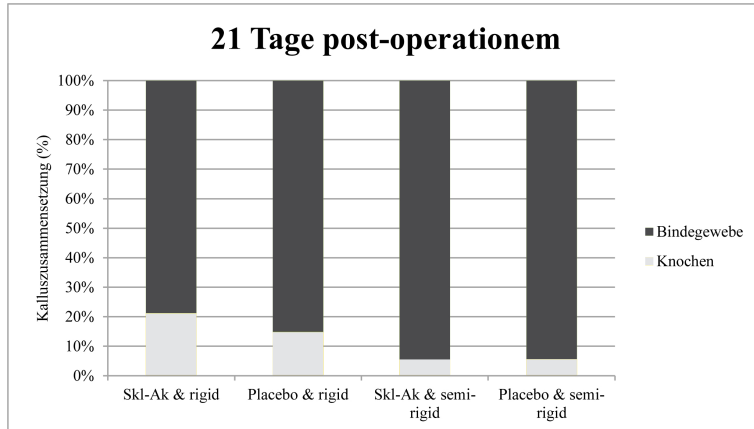


Abbildung 37. Periostale Kalluszusammensetzung 21 Tage nach der Osteotomie

4.2.8. Intrakortikaler Kallus

Bindegewebe war nach 7 Tagen der vorherrschende Gewebetyp im intrakortikalen Kallus (siehe Tab. 25 und Abb. 38). Es waren keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung von Bindegewebe ($p=0,400$) zwischen den Gruppen im intrakortikalen Kallus vorhanden. Knochenmark, Knochen- und Knorpelgewebe ($p=0,572$) waren im Kallus zwischen den Kortizes in allen Gruppen zu allen drei Heilungszeitpunkten nicht vorhanden.

Tabelle XXV. Gewebeverteilung in Prozent im intrakortikalen Kallus 7 Tage nach der Osteotomie mit Median, 25%- und 75%-Quantil und Signifikanzen

			rigid				semi-rigid				Signifikanz (p<0,05)
			Skl-Ak		Placebo		Skl-Ak		Placebo		
Knochenmark	Median		0,00		0,00		0,00		0,00		1,000
	25%	75%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Binde- gewebe	Median		100,00		100,00		100,00		100,00		0,400
	25%	75%	87,86	100,00	100,00	100,00	93,33	100,00	96,43	100,00	
Knorpel	Median		0,00		0,00		0,00		0,00		0,572
	25%	75%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Knochen	Median		0,00		0,00		0,00		0,00		0,356
	25%	75%	0,00	12,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,57	

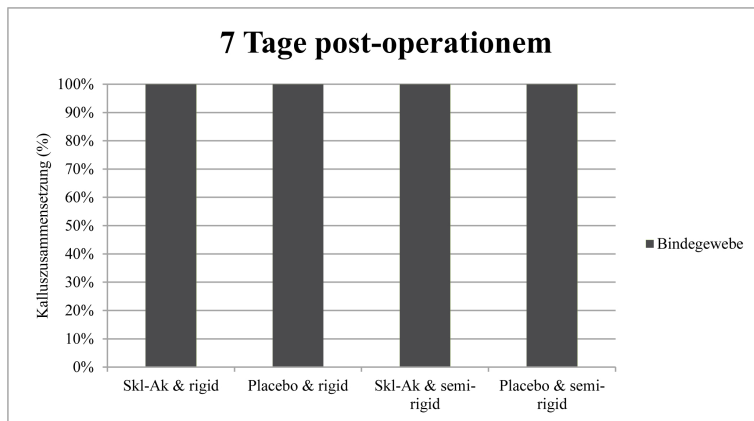


Abbildung 38. Intrakortikale Kalluszusammensetzung 7 Tage nach der Osteotomie

14 Tage nach der Osteotomie waren signifikante Unterschiede in der Verteilung des Knochengewebes im intrakortikalen Kallus sichtbar ($p < 0,001$) (siehe Tab. 26 und Abb. 39). Beide Gruppen mit semi-steifem Fixateur hatten deutlich weniger Knochengewebe im intrakortikalen Kallus als die Skl-Ak & rigid-Gruppe ($p = 0,003$ bzw. $p = 0,012$) und die Placebo & rigid-Gruppe ($p = 0,021$ bzw. $p = 0,049$) (siehe Tab. 28).

Die Unterschiede zwischen den Gruppen in der Verteilung des Knorpelgewebes im intrakortikalen Kallus waren nicht signifikant ($p = 0,091$). Hingegen waren deutliche Unterschiede in der Verteilung des Bindegewebes zwischen der Skl-Ak & rigid-Gruppe und den Gruppen mit semi-steifem Fixateur ($p = 0,008$ bzw. $p = 0,001$) zu sehen (siehe Tab. 27).

Ergebnisse

Tabelle XXVI. Gewebeverteilung in Prozent im intrakortikalen Kallus 14 Tage nach der Osteotomie mit Median, 25%- und 75%-Quantil und Signifikanz

			rigid				semi-rigid				Signifikanz (p<0,05)
			SkI-Ak		Placebo		SkI-Ak		Placebo		
Knochenmark	Median		0,00		0,00		0,00		0,00		1,000
	25%	75%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Bindegewebe	Median		50,00		56,25		94,12		96,88		0,001
	25%	75%	27,84	53,59	55,56	70,00	75,43	100,00	83,63	100,00	
Knorpel	Median		23,08		12,50		0,00		0,00		0,091
	25%	75%	5,00	55,11	0,00	27,78	0,00	23,73	0,00	9,07	
Knochen	Median		25,00		26,67		0,00		0,00		<0,001
	25%	75%	15,66	40,00	10,00	31,25	0,00	5,57	0,00	7,81	

Tabelle XXVII. Paarweise Vergleiche der Bindegewebsverteilung im intrakortikalen Kallus 14 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau p<0,05

		rigid		semi-rigid	
		SkI-Ak	Placebo	SkI-Ak	Placebo
rigid	SkI-Ak	-	0,643	0,008	0,001
	Placebo	-	-	0,981	0,343
semi-rigid	SkI-Ak	-	-	-	1,000
	Placebo	-	-	-	-

Tabelle XXVIII. Paarweise Vergleiche der Knochenverteilung im intrakortikalen Kallus 14 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau p<0,05

		rigid		semi-rigid	
		SkI-Ak	Placebo	SkI-Ak	Placebo
rigid	SkI-Ak	-	1,000	0,012	0,003
	Placebo	-	-	0,049	0,021
semi-rigid	SkI-Ak	-	-	-	1,000
	Placebo	-	-	-	-

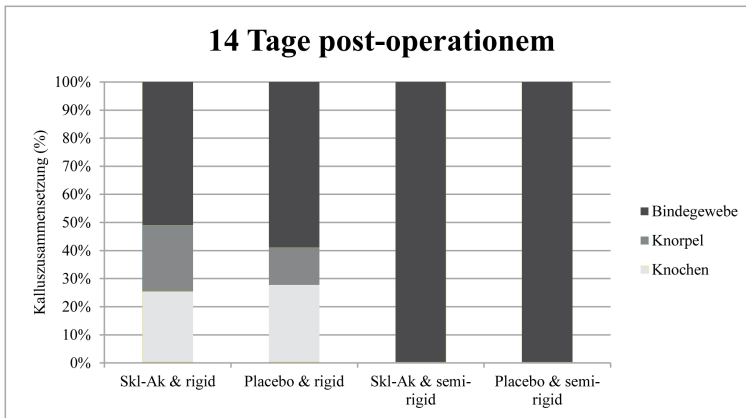


Abbildung 39. Intrakortikale Kalluszusammensetzung 14 Tage nach der Osteotomie

21 Tage nach der Operation war in beiden Gruppen mit steifer Fixation ein ähnlicher Prozentsatz an Knochenmenge vorhanden (siehe Tab. 29 und Abb. 40). Beide Gruppen mit semi-steifem Fixateur wiesen einen niedrigeren Prozentsatz an Knochenmenge auf. Daher war ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen in der Verteilung des Knochengewebes im intrakortikalen Kallus zu beobachten ($p=0,049$). Die paarweise Vergleiche zwischen den einzelnen Gruppen zeigen allerdings keine signifikanten Unterschiede (siehe Tab. 30).

In den Gruppen mit steifem Fixateur war im intrakortikalen Kallus kein Knorpel vorhanden. Auch in der Skl-Ak & semi-rigid-Gruppe war intrakortikal kein Knorpel zu sehen. Die Placebo & semi-rigid-Gruppe war die einzige Gruppe mit Knorpel nach 21 Tagen. Allerdings war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen in der Verteilung von Knorpelgewebe zu sehen ($p=0,109$), ebenso wenig in der Verteilung des Bindegewebes ($p=0,052$).

Tabelle XXIX. Gewebeverteilung in Prozent im intrakortikalen Kallus 21 Tage nach der Osteotomie mit Median, 25%- und 75%-Quantil und Signifikanz

			rigid				semi-rigid				Signifikanz ($p<0,05$)
			Skl-Ak		Placebo		Skl-Ak		Placebo		
Knochenmark	Median		0,00		0,00		0,00		0,00		1,000
	25%	75%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
Bindegewebe	Median		54,17		57,27		91,67		83,33		0,052
	25%	75%	28,37	66,67	50,00	95,83	82,14	100,00	64,30	100,00	
Knorpel	Median		0,00		0,00		0,00		8,82		0,109
	25%	75%	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	32,50	
Knochen	Median		37,50		42,73		8,33		2,27		0,049
	25%	75%	8,33	68,75	4,17	50,00	0,00	17,86	0,00	7,94	

4.2.9. Endostaler Kallus

7 Tage nach der Operation war in allen Gruppen wenig Knochen und kaum Knorpel sichtbar (siehe Tab. 31 und Abb. 41). In der Verteilung des Knochengewebes war zwischen den Gruppen kaum ein Unterschied sichtbar ($p=0,153$). In der Verteilung von Knorpelgewebe gab es jedoch Unterschiede ($p=0,020$). Es war in der Skl-Ak & semi-rigid-Gruppe signifikant mehr Knorpelgewebe im Kallus vorhanden als in der Placebo & rigid-Gruppe ($p=0,046$) (siehe Tab. 33).

Tabelle XXX. Paarweise Vergleiche der Knochenverteilung im intrakortikalen Kallus 21 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau $p < 0,05$

		rigid		semi-rigid	
		SkI-Ak	Placebo	SkI-Ak	Placebo
rigid	SkI-Ak	-	1,000	0,645	0,103
	Placebo	-	-	0,905	0,159
semi-rigid	SkI-Ak	-	-	-	1,000
	Placebo	-	-	-	-

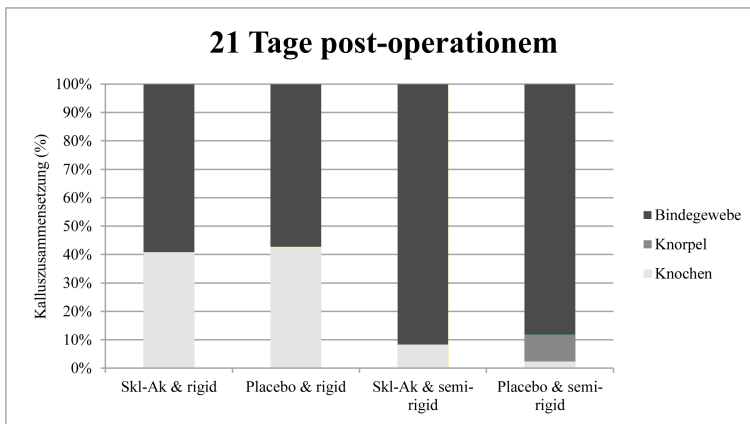


Abbildung 40. Intrakortikale Kalluszusammensetzung 21 Tage nach der Osteotomie

Tabelle XXXI. Gewebeverteilung in Prozent im endostalen Kallus 7 Tage nach der Osteotomie mit Median, 25%- und 75%-Quantil und Signifikanzen

		rigid				semi-rigid				Signifikanz ($p < 0,05$)
		SkI-Ak		Placebo		SkI-Ak		Placebo		
Knochen- mark	Median	11,92		3,49		0,00		0,00		0,044
	25% 75%	4,55 23,18	3,16 21,90	0,00 3,57	0,00 5,76					
Binde- gewebe	Median	84,30		93,02		91,89		97,17		0,187
	25% 75%	68,73 91,60	77,14 95,16	89,00 94,17	77,63 98,13					
Knorpel	Median	0,00		0,00		0,69		0,00		0,020
	25% 75%	0,00 0,00	0,00 0,00	0,00 3,36	0,00 0,20					
Knochen	Median	2,90		1,09		4,20		2,39		0,153
	25% 75%	2,18 10,20	0,91 3,49	1,82 5,83	1,27 3,63					

Tabelle XXXII. Paarweise Vergleiche der Knochenmarksverteilung im endostalen Kallus 7 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau $p < 0,05$

		rigid		semi-rigid	
		SkI-Ak	Placebo	SkI-Ak	Placebo
rigid	SkI-Ak	-	1,000	0,193	0,259
	Placebo	-	-	0,270	0,369
semi-rigid	SkI-Ak	-	-	-	1,000
	Placebo	-	-	-	-

Tabelle XXXIII. Paarweise Vergleiche der Knorpelverteilung im endostalen Kallus 7 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau $p < 0,05$

		rigid		semi-rigid	
		SkI-Ak	Placebo	SkI-Ak	Placebo
rigid	SkI-Ak	-	1,000	0,102	1,000
	Placebo	-	-	0,046	1,000
semi-rigid	SkI-Ak	-	-	-	0,251
	Placebo	-	-	-	-

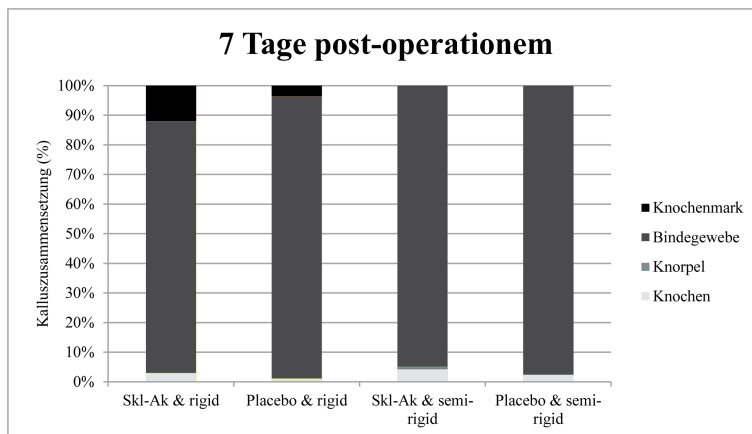


Abbildung 41. Endostale Kalluszusammensetzung 7 Tage nach der Osteotomie

14 Tage nach der Osteotomie waren im endostalen Kallus signifikante Unterschiede in der Verteilung des Knochengewebes vorhanden ($p=0,001$) (siehe Tab. 34 und Abb. 42). In der SkI-Ak & rigid-Gruppe war deutlich mehr Knochengewebe vorhanden als in den beiden Gruppe mit semi-steifer Fixation ($p=0,001$ bzw. $p=0,012$) (siehe Tab. 37). Hingegen lag in letzteren Gruppen signifikant mehr Bindegewebe vor ($p=0,003$ bzw. $p=0,001$) (siehe Tab. 36).

Ebenfalls lagen signifikante Unterschiede in der Verteilung von Knochenmark vor ($p < 0,001$) (siehe Tab. 34). In den beiden Gruppen mit steifem Fixateur wurde mehr Knochenmark gebildet als in den beiden Gruppen mit semi-steifem Fixateur (siehe Tab. 35).

Ergebnisse

Tabelle XXXIV. Gewebeverteilung in Prozent im endostalen Kallus 14 Tage nach der Osteotomie mit Median, 25%- und 75%-Quantil und Signifikanzen

			rigid				semi-rigid				Signifikanz (p<0,05)
			Skl-Ak		Placebo		Skl-Ak		Placebo		
Knochenmark	Median		19,61		24,55		0,00		0,00		<0,001
	25%	75%	4,86	43,72	7,26	33,61	0,00	0,38	0,00	0,92	
Bindegewebe	Median		45,10		49,09		77,59		81,28		<0,001
	25%	75%	28,81	53,00	35,29	74,19	70,47	95,02	67,08	87,02	
Knorpel	Median		2,12		1,06		9,76		4,16		0,403
	25%	75%	0,68	7,38	0,00	3,64	0,00	14,05	0,81	10,47	
Knochen	Median		28,95		22,73		9,48		12,53		0,001
	25%	75%	20,26	38,06	11,70	26,13	3,14	14,95	8,06	18,51	

Tabelle XXXV. Paarweise Vergleiche der Knochenmarksverteilung im endostalen Kallus 14 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau p<0,05

		rigid		semi-rigid	
		Skl-Ak	Placebo	Skl-Ak	Placebo
rigid	Skl-Ak	-	1,000	0,002	0,012
	Placebo	-	-	0,006	0,034
semi-rigid	Skl-Ak	-	-	-	1,000
	Placebo	-	-	-	-

Tabelle XXXVI. Paarweise Vergleiche der Bindegewebsverteilung im endostalen Kallus 14 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau p<0,05

		rigid		semi-rigid	
		Skl-Ak	Placebo	Skl-Ak	Placebo
rigid	Skl-Ak	-	1,000	0,001	0,003
	Placebo	-	-	0,070	0,151
semi-rigid	Skl-Ak	-	-	-	1,000
	Placebo	-	-	-	-

Tabelle XXXVII. Paarweise Vergleiche der Knochenverteilung im endostalen Kallus 14 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau $p < 0,05$

		rigid		semi-rigid	
		Skl-Ak	Placebo	Skl-Ak	Placebo
rigid	Skl-Ak	-	0,845	0,001	0,012
	Placebo	-	-	0,279	1,000
semi-rigid	Skl-Ak	-	-	-	1,000
	Placebo	-	-	-	-

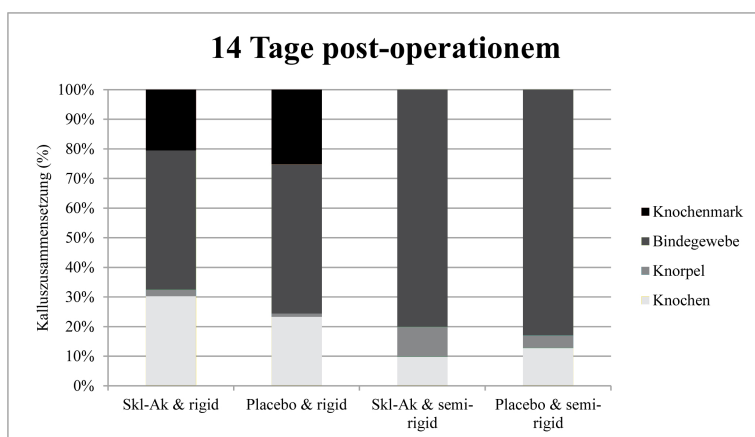


Abbildung 42. Endostale Kalluszusammensetzung 14 Tage nach der Osteotomie

Nach drei Wochen waren im endostalen Kallus zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Verteilung von Knochen- ($p=0,336$) und Knorpelgewebe ($p=0,292$) zu sehen (siehe Tab. 38 und Abb. 43). Es waren deutliche Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, die Sklerostin-Antikörper bekamen, in der Verteilung von Knochenmark ($p=0,004$) und Bindegewebe ($p=0,016$) vorhanden, wobei die Gruppe mit steifem Fixateur mehr Knochenmark und weniger Bindegewebe aufwies (siehe Tab. 39 und 40).

Tabelle XXXVIII. Gewebeverteilung in Prozent im endostalen Kallus 21 Tage nach der Osteotomie mit Median, 25%- und 75%-Quantil und Signifikanzen

		rigid				semi-rigid				Signifikanz ($p < 0,05$)
		Skl-Ak		Placebo		Skl-Ak		Placebo		
Knochen- mark	Median	32,97		18,76		1,61		2,83		0,002
	25%	19,43	44,63	9,75	43,39	0,00	3,13	2,01	7,76	
	75%									
Binde- gewebe	Median	35,61		59,68		75,00		69,55		0,012
	25%	25,71	56,35	30,43	80,34	67,19	95,65	56,85	89,29	
	75%									
Knorpel	Median	0,00		0,00		0,00		4,58		0,292
	25%	0,00	0,71	0,00	0,00	0,00	2,42	0,00	16,15	
	75%									
Knochen	Median	26,13		17,11		20,97		14,83		0,336
	25%	15,61	36,78	7,54	28,17	4,35	26,40	7,72	19,89	
	75%									

Tabelle XXXIX. Paarweise Vergleiche der Knochenmarksverteilung im endostalen Kallus 21 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau $p < 0,05$

		rigid		semi-rigid	
		SkI-Ak	Placebo	SkI-Ak	Placebo
rigid	SkI-Ak	-	1,000	0,004	0,084
	Placebo	-	-	0,056	0,523
semi-rigid	SkI-Ak	-	-	-	1,000
	Placebo	-	-	-	-

Tabelle XL. Paarweise Vergleiche der Bindegewebsverteilung im endostalen Kallus 21 Tage nach der Osteotomie, Signifikanzniveau $p < 0,05$

		rigid		semi-rigid	
		SkI-Ak	Placebo	SkI-Ak	Placebo
rigid	SkI-Ak	-	0,677	0,016	0,060
	Placebo	-	-	0,854	1,000
semi-rigid	SkI-Ak	-	-	-	1,000
	Placebo	-	-	-	-

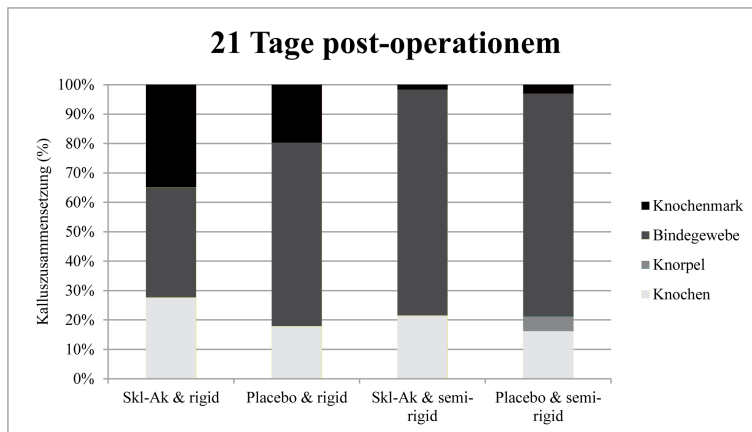


Abbildung 43. Endostale Kalluszusammensetzung 21 Tage nach der Osteotomie

4.3. OSTEOTOMIEÜBERBRÜCKUNG

Im Rahmen der Auswertung der Osteotomieüberbrückung wurden die knöcherne Überbrückung des Osteotomiespaltes periostal und intrakortikal auf der lateralen und der medialen Seite der Osteotomie und die endostale Überbrückung betrachtet (siehe Abb. 44). Die endostale Überbrückung wurde gesondert betrachtet, da eine endostale Brücke als ein Zeichen für eine langsamere Heilung und ein verzögertes Remodeling angesehen werden konnte. Zur Beurteilung des Überbrückungsgrades als Zeichen für eine fortschrittliche Heilung wurde ermittelt an wievielen Knochen keine Überbrückung, eine, zwei, drei oder vier Überbrückungen an intrakortikaler und periostaler Stelle vorlagen.

Es war ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen zu sehen, nach 14 Tagen ($p < 0,001$) ebenso wie nach 21 Tagen ($p = 0,006$) (siehe Tab. 41 und 42).

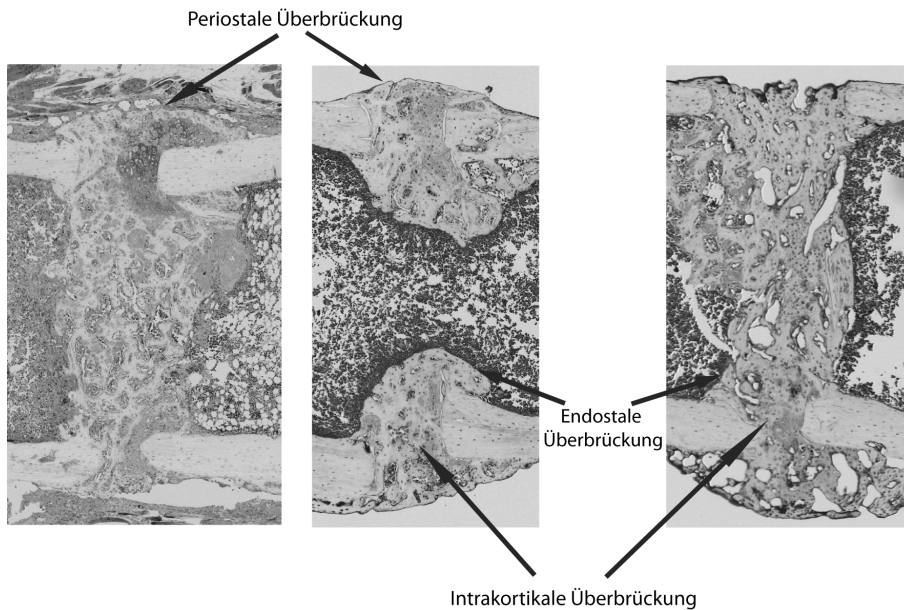


Abbildung 44. Periostale, intrakortikale und endostale knöcherne Osteotomieüberbrückung

Nach 14 Tagen war ein deutlicher Unterschied zwischen den beiden Gruppen, die Sklerostin-Antikörper bekamen ($p < 0,001$) sowie den beiden Gruppen, die ein Placebo bekamen ($p < 0,001$), zu sehen (siehe Tab. 41 und Abb. 45). In beiden Gruppen mit semi-steifem Fixateur waren größtenteils keine Überbrückungen vorhanden, maximal jedoch eine Überbrückung pro Knochen. Im Gegensatz dazu wiesen die beiden Gruppen mit steifer Fixation ein höheres Maß an Überbrückung auf. In der Skl-Ak & rigid-Gruppe lag bei jedem Knochen mindestens an 2 Stellen eine Überbrückung vor. Es gab keinen Knochen an dem gar keine oder nur eine Überbrückung zu sehen war. In der Placebo & rigid-Gruppe war bei knapp der Hälfte der Knochen keine oder nur eine Überbrückung sichtbar während bei den restlichen Knochen mindestens 2 Überbrückungen vorlagen. Zwischen den beiden Gruppen mit semi-steifem Fixateur war kein signifikanter Unterschied sichtbar ($p = 0,323$). Ebenso war zwischen den beiden Gruppen mit steifem Fixateur nach 14 Tagen kein signifikanter Unterschied zu sehen ($p = 0,482$) (siehe Tab. 41 und Abb. 45).

Nach 21 Tagen waren ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, die Sklerostin-Antikörper bekamen ($p = 0,001$) sowie den beiden Gruppen, die ein Placebo bekamen ($p = 0,001$) zu sehen (siehe Tab. 42 und Abb. 46).

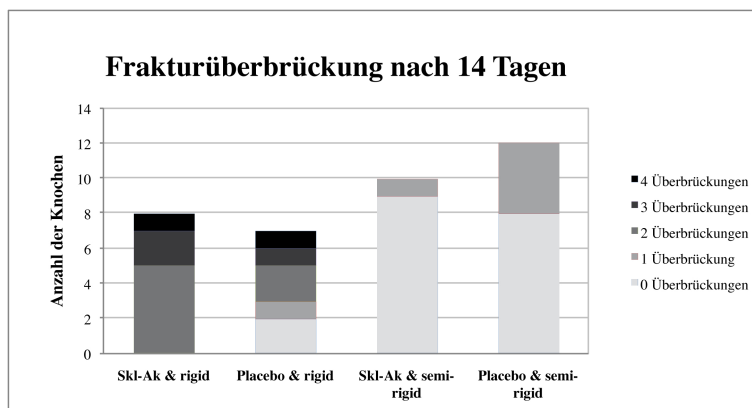


Abbildung 45. Osteotomieüberbrückung nach 14 Tagen. Dargestellt ist die Anzahl der Knochen pro Gruppe, die keine, eine, zwei, drei oder vier Überbrückungen periostal oder intrakortikal aufwiesen.

Auch nach 21 Tagen lag in den beiden Gruppen mit semi-steifem Fixateur nur ein geringes Maß an Überbrückung vor. Ebenso wie nach 14 Tagen war in den Knochen maximal an einer Lokalisation

Tabelle XLI. Anzahl der Überbrückung je Knochen an periostaler und intrakortikaler Lokalisation 14 Tage nach der Osteotomie.

	rigid		semi-rigid	
	Skl-Ak	Placebo	Skl-Ak	Placebo
keine Überbrückung	0	2	9	8
1 Überbrückung	0	1	1	4
2 Überbrückungen	5	2	0	0
3 Überbrückungen	2	1	0	0
4 Überbrückungen	1	1	0	0
Signifikanz (p<0,05)				
Gruppen	p<0,001			
Behandlung	rigid 0,482		semi-rigid 0,323	
Fixation	Skl-Ak p<0,001		Placebo p<0,001	

eine Überbrückung zu beobachten. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen mit semi-steifem Fixateur sichtbar (p=0,266).

In den beiden Gruppen mit steifem Fixateur hingegen zeigte mehr als die Hälfte der Knochen eine Überbrückung an mindestens 2 Stellen. Jeweils ein Knochen war sogar an vier Stellen überbrückt. Allerdings kamen in beiden Gruppen auch Knochen vor, die gar keine Überbrückung aufwiesen. Auch nach 21 Tagen war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit steifem Fixateur sichtbar (p=0,459)

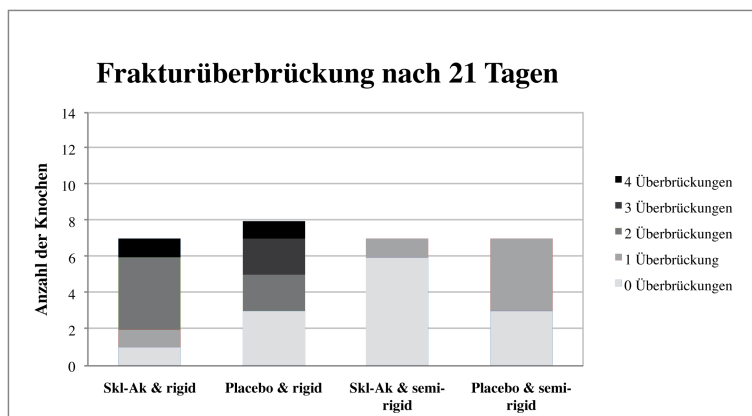


Abbildung 46. Osteotomieüberbrückung nach 21 Tagen. Dargestellt ist die Anzahl der Knochen pro Gruppe, die keine, eine, zwei, drei oder vier Überbrückungen periostal oder intrakortikal aufwiesen.

Tabelle XLII. Anzahl der Überbrückung je Knochen an periostaler und intrakortikaler Lokalisation 21 Tage nach der Osteotomie.

	rigid		semi-rigid	
	Skl-Ak	Placebo	Skl-Ak	Placebo
keine Überbrückung	1	3	6	3
1 Überbrückung	1	0	1	4
2 Überbrückungen	4	2	0	0
3 Überbrückungen	0	2	0	0
4 Überbrückungen	1	1	0	0
Signifikanz (p<0,05)				
Gruppen	p=0,006			
Behandlung	rigid 0,459		semi-rigid 0,266	
Fixation	Skl-Ak p=0,001		Placebo p=0,001	

Die Auswertung der endostalen Überbrückung erfolgte mit Hilfe eines einfachen Ja/Nein-Schemas, wobei eine endostale Überbrückung egal ob ein- oder beidseitig als "Ja" gewertet wurde. Die endostale Überbrückung wurde als Prozent ausgedrückt, um die Gruppen besser vergleichen zu können, da in den Gruppen unterschiedliche Tierzahlen vorlagen.

Eine endostale Osteotomieüberbrückung wurde am meisten in der Skl-Ak & rigid-Gruppe gefunden (siehe Tab. 43 und Abb. 47). Nach 14 Tagen war eine endostale Überbrückung von 75% (bei 6 von 8 Tieren; 6/8) vorhanden. Das heißt, dass 75% der Knochen in dieser Gruppe nach 14 Tagen ein- oder beidseitig endostal überbrückt waren. In der dritten Woche betrug die Überbrückung 71% (5/7). Die Placebo & rigid-Gruppe zeigte nach zwei Wochen eine endostale Überbrückung von knapp 60% (4/7), in der dritten Wochen von knapp 40% (3/8). In der Skl-Ak & semi-rigid-Gruppe war nach 14 Tagen eine endostale Überbrückung von 10% (1/10) zu sehen und nach 21 Tagen keine (0/7) endostale Überbrückung. Die Placebo & semi-rigid-Gruppe wies eine endostale Überbrückung von 8,33% (1/12) nach 14 Tagen und 28,57% (2/7) nach 21 Tagen auf.

Tabelle XLIII. Endostale Osteotomieüberbrückung nach 14 und nach 21 Tagen. Angegeben sind die Anzahl der Tiere mit einer oder zwei endostalen Überbrückungen in Relation zur Tierzahl pro Gruppe.

	rigid		semi-rigid	
	Skl-Ak	Placebo	Skl-Ak	Placebo
14 Tage	6/8	4/7	1/10	1/12
21 Tage	5/7	3/8	0/7	2/7

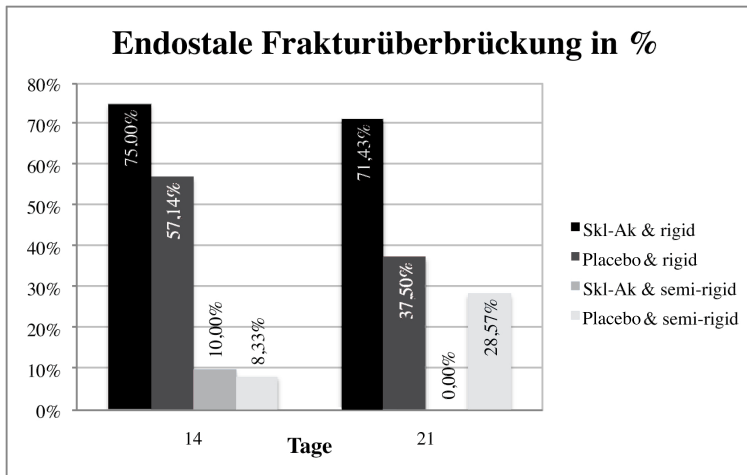


Abbildung 47. Endostale Osteotomieüberbrückung in %

4.4. IMMUNHISTOLOGISCHE AUSWERTUNG

Mit Hilfe der Alpha-sma-Färbung wurden die Blutgefäße in der Region of Interest sichtbar gemacht, um somit eine Aussage über die Vaskularisation des Kallus zu machen.

7 Tage nach der Osteotomie waren in den Gruppen mit steifem Fixateur signifikant mehr Blutgefäße pro mm^2 Bindegewebsfläche sichtbar ($p= 0,002$) (siehe Tab. 44 und Abb. 48). An Tag 14 zeigte sich eine Signifikanz in der Behandlung ($p= 0,040$). Beide Gruppen, die mit Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern behandelt wurden, zeigten jeweils mehr Blutgefäße pro Bindegewebsfläche als die entsprechenden Placebo-Gruppen. Nach drei Wochen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Tabelle XLIV. Durchschnittliche Gefäßdichte in n/mm^2 mit Standardabweichung und Signifikanzen

	rigid		semi-rigid		Signifikanzen ($p<0,05$)		
	Skl-Ak	Placebo	Skl-Ak	Placebo	Fixation	Behandlung	Interaktion
7 Tage	4 ± 2	6 ± 5	2 ± 1	2 ± 1	0,002	0,511	0,223
14 Tage	7 ± 3	5 ± 3	5 ± 1	4 ± 4	0,183	0,040	0,494
21 Tage	7 ± 3	7 ± 4	4 ± 2	7 ± 5	0,241	0,411	0,187

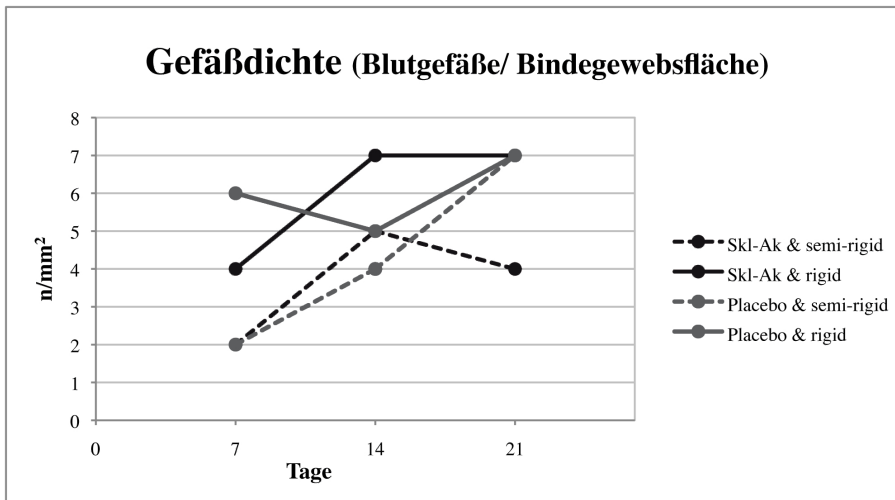


Abbildung 48. Durchschnittliche Menge an Blutgefäße in der ROI bezogen auf die Bindegewebsfläche nach 7, 14 und 21 Tagen

5. Diskussion

Trotz der wachsenden Erkenntnisse über den Knochenstoffwechsel und die Mechanismen der Knochenheilung bleiben verzögerte oder ausbleibende Frakturheilungen im klinischen Alltag ein Problem. Neben einer instabilen Fixation, einer gestörten Gefäßversorgung und Infektionen im Frakturbereich ist vor allem die schlechte Knochenstruktur bei Osteoporosepatienten als wichtige Ursache von Fehlleistungen zu nennen. Osteoporose führt zu einer Beeinträchtigung der Frakturheilung und durch eine veränderte Knochenstruktur auch zu einem erhöhten Frakturrisiko des Knochens. Weltweit wird jede dritte Frau und jeder fünfte Mann über 50 eine osteoporotische Fraktur erleiden (Kanis et al., 2000; Prelevic, 2001). Mit zunehmendem Alter steigt die Gefahr, an Osteoporose zu erkranken. Durch das steigende Bevölkerungsalter ist die Osteoporose daher von zunehmender Bedeutung. Es wird angenommen, dass bis 2050 die Zahl der Oberschenkelhalsfrakturen bei Männern um 310% und bei Frauen um 240% ansteigen wird (Gullberg et al., 1997). Trotz der verbesserten Behandlungsmöglichkeiten bleibt die Osteoporose mit ihren Folgen neben der medizinischen auch eine ökonomische Herausforderung. Für 2010 wurden die durch Osteoporose verursachten Kosten in der EU auf 37 Milliarden Euro geschätzt (Hernlund et al., 2013).

Verschiedene Ansatzpunkte, die Knochenheilung zu beeinflussen, werden derzeit untersucht. Es ist schon seit längerem bekannt, dass mechanische Belastung einen anabolen Effekt auf den Knochen hat und einer Knochenresorption entgegenwirkt. Des Weiteren hat mechanische Stimulation auch einen Einfluss auf die Knochenheilung. Eine zu starke Beweglichkeit in einer frühen Heilungsphase kann zu einer schlechten oder sogar ausbleibenden Knochenheilung führen. Andererseits führt auch eine komplett fehlende mechanische Reizung zu einer gestörten Heilung (Goodship und Kenwright, 1985; Perren, 2002). Schon Goodship und Kenwright (1985) untersuchten den Einfluß von kontrollierten Mikrobewegungen auf die Frakturheilung bei Schafen. Trotz anhaltender Forschung sind die optimalen mechanischen Voraussetzungen für die Frakturheilung und ihre Mechanismen noch nicht komplett verstanden.

Ein pharmakologischer Ansatzpunkt, Einfluss auf die Knochenstruktur und die Frakturheilung zu nehmen, besteht in dem Einsatz von Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern. Sklerostin reduziert die Knochenbildung durch Hemmung des Wnt-Signalweges und scheint auch eine Rolle in der Mechanotransduktion zu spielen. Der genaue Mechanismus, über den Sklerostin das Knochenwachstum reguliert, ist bisher noch nicht vollständig erforscht. Des Weiteren gibt es Daten, die darauf hinweisen, dass die anabole Wirkung der mechanischen Stimulation auf eine Unterdrückung des SOST-Gens, das für Sklerostin codiert, zurückzuführen ist (Robling et al., 2008; Moustafa et al., 2009). Sklerostin-neutralisierende Antikörper werden bereits in klinischen Studien getestet, bisher existieren aber kaum Kenntnisse über die Interaktion von mechanischer Stimulation und Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern. Ziel dieser Studie war es, diese Wechselwirkungen im Rahmen der Knochenheilung besser zu

verstehen und Behandlungsstrategien zu verbessern.

5.1. DISKUSSION VON MATERIAL UND METHODEN

5.1.1. Tiermodell

Die Frakturheilung ist ein komplexer Prozess, der in mehreren Phasen abläuft. Neben dem Knochengewebe sind unter anderem auch das umliegende Weichteilgewebe und das Herz-Kreislauf-System an der Knochenheilung beteiligt. Daher sind In vitro-Untersuchungen in diesem Bereich nur sehr begrenzt aussagekräftig und Versuchstiermodelle unumgänglich. Es sollten allerdings immer die Unterschiede der Anatomie und des Stoffwechsels zwischen Mensch und Tier bedacht und bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden. Der Mensch mit einem aufrechten Gang weist eine andere Biomechanik der Gliedmaßen auf als die meisten Tiere. Versuche an Menschen oder Primaten sind allerdings aus ethischen Gründen abzulehnen, weshalb nur Vierbeiner und Vögel in Betracht kommen.

In dieser Studie wurde auf die Maus als Versuchstier zurückgegriffen. Trotz der eher primitiven Knochenstruktur mit Resorptionskavernen eignen sich Mäusen und Ratten für Knochenheilungsstudien. Es hat sich gezeigt, dass dieses System den Havers-Kanälen in großen Tieren ähnelt und daher kein Ausschlusskriterium ist (Holstein et al., 2009). Mäuse haben durch ihren hohen metabolischen Umsatz eine gesteigerte Knochenbildungsrate und folglich eine schnellere Frakturheilung. Dadurch ist ein kürzerer Beobachtungszeitraum nötig, und es kann in einer kürzeren Zeit eine größere Anzahl an Tieren analysiert werden (Garcia et al., 2013). In der vorliegenden Studie wurde von einem Minimum von sieben Tieren pro Gruppe ausgegangen, um eine ausreichend hohe Fallzahl und signifikante Ergebnisse zu bekommen. Durch den Versuchsaufbau mit zwei unterschiedlichen Fixateuren und der Gabe von Antikörpern wurde eine relativ hohe Anzahl an Tieren benötigt.

Durch die Entwicklung fortgeschrittener Osteosynthesetechniken für Mäuse und Ratten sind standardisierte Knochenheilungsstudien an diesen Tieren möglich geworden. Durch eine stabile und reproduzierbare Fixation sind kontrollierte biomechanische Konditionen im Frakturspalt realisierbar (Hiltunen et al., 1993; Garcia et al., 2008; Garcia et al., 2013). Dennoch bleiben Osteosynthesen auf Grund der geringen Größe dieser Tiere eine Herausforderung für den Chirurgen.

Ein weiterer wichtiger Vorzug von Versuchen an Mäusen liegt in der Entschlüsselung des Mausgenoms begründet. Dadurch lassen sich molekulare Aspekte der Knochenheilung besser erforschen. Mit Hilfe von transgenen oder Knockout-Mäusen können gezielt Gene beeinflusst werden, was für spätere Studien mit SOST-knockout-Mäusen von Interesse sein könnte. Des Weiteren existieren vor allem für die Maus eine Vielzahl spezifischer Antikörper, mit denen die zellulären Mechanismen der Knochenheilung und -regeneration noch besser erforscht werden können (Histing et al., 2011).

5.1.2. Versuchsaufbau

Für die vorliegende Osteotomiestudie wurde an 26 Wochen alten, ausgewachsenen Mäusen eine Osteotomie des linken Femurs durchgeführt und mittels zwei unterschiedlich flexiblen Fixateurs externes stabilisiert. Die Hälfte der Tiere erhielt Sklerostin-neutralisierende Antikörper, die restlichen Mäuse bekamen ein Placebo. Das Alter der Mäuse entsprach ausgewachsenen Tieren, deren Knochenmasse altersabhängig bereits wieder abnahm. Dadurch ergab sich eine schwierigere Heilungssituation, da ausgewachsene Mäuse eine herabgesetzte Heilungskapazität im Vergleich zu jüngeren Tieren haben. Die Sklerostin-neutralisierenden Antikörper sollten in einer erschwerten Heilungssituation getestet werden.

Die Entscheidung für ein Osteotomiemodell am Femur ergab sich aus den anatomischen Gegebenheiten der fragilen Mäuseknochen. Folglich eignen sich vor allem die langen Röhrenknochen wie Femur und Tibia für Frakturstudien dieser Art. Die Tibia weist einen nach distal abnehmenden Durchmesser auf und führt dadurch zu schlechter standardisierten und vergleichbaren Osteotomien. Eine nur geringe Abweichung der Frakturhöhe kann zu deutlichen Unterschieden in der Kallusgröße führen. Der dreieckige Durchmesser und die gebogene Achse der Tibia haben zur Folge, dass eine stabile Fixation erschwert wird, da sich der Fixateur schlechter anbringen lässt. Ein weiteres Problem bei Osteotomien der Tibia ist ihre Nähe zur Fibula. Ein gleichzeitiger Bruch der Fibula hat entweder einen gemeinsamen Kallus oder zwei unterschiedliche Kalli zur Folge (Holstein et al., 2009).

Im Gegensatz dazu ist der Femur größer und mehr röhrenförmig mit einem relativ gleichbleibenden inneren Durchmesser. Dadurch ist eine standardisierte Osteotomie besser möglich. Die verhältnismäßig

gerade Knochenachse lässt eine Stabilisierung besser zu als bei der gebogenen Tibia. Der Femur ist von einer dicken Muskelschicht umgeben, was einerseits den Zugang zum Knochen erschwert, andererseits aber eine gute Blutversorgung sichert und vor Komplikationen von außen wie Infektionen schützt (Cheung et al., 2003; Holstein et al., 2009).

Da in dieser Studie der Einfluss von kontrollierter mechanischer Belastung untersucht wurde, musste eine stabile, aber veränderbare Fixationstechnik gewählt werden. Eine nicht-stabilisierte Fraktur, wie sie in anderen Studien schon untersucht wurde, war für diese Arbeit nicht geeignet, da sie keine Kontrolle über die Qualität und Stärke der Bewegung im Frakturspalt zulässt (Le et al., 2001). Der Gedanke, dass in Mausmodellen keine biomechanischen Standards nötig sind, da in Mäusen nur die molekularen Aspekte der Frakturheilung untersucht werden, ist zu hinterfragen. Da die Stabilität der Osteosynthese auch in der Maus einen großen Einfluss auf die Knochenheilung hat, sind auch die zellulären und molekularen Mechanismen der Frakturheilung von der mechanischen Umgebung abhängig. Folglich sollte auch hier eine standardisierte Osteosynthesetechnik angestrebt werden (Holstein et al., 2009).

Ein geschlossenes Frakturmodell weist den Vorteil eines relativ einfachen Zugangsweges und eines geringen Weichteiltraumas auf. Allerdings lässt sich eine geschlossene Fraktur schlecht standardisieren, da eine kontrollierte Osteotomie unter Sicht nicht möglich ist und es zu komplexen Frakturen kommen kann. Des Weiteren besteht bei einem intramedullären Implantat die Gefahr, das Endost und das Knochenmark zu beschädigen und die endostale Blutversorgung zu beeinflussen. Am häufigsten wird die Marknagelung angewandt, bei der große Gefahr einer Dislokation des Frakturspaltes besteht (Röntgen et al., 2010; Histing et al., 2011). Häufig lassen sich bei einer solchen Fixation auch die axialen Bewegungen und Rotationsbewegungen nicht ausreichend stabilisieren (Garcia et al., 2008; Holstein et al., 2009). Des Weiteren ist es durch den schmalen Durchmesser der Diaphyse nur sehr begrenzt möglich, die mechanische Umgebung durch Variation der Pinstärke zu verändern (Cheung et al., 2003). Da allerdings in dieser Studie eine unterschiedliche mechanische Belastung untersucht werden sollte, schien ein intramedulläres Implantat in diesem Fall ungeeignet.

Bei offenen Frakturmodellen erfolgt eine Frakturierung des Knochens unter Sichtkontrolle. Dadurch wird ein relativ großes Weichteiltrauma herbeigeführt, um den Knochen auf seiner kompletten Länge freizulegen. Als Folge entsteht eine nicht zu unterschätzende Beeinflussung der Vaskularisation des Knochens. Durch das extramedulläre Implantat wird allerdings eine Schonung des Knochenmarks und des Endosts erreicht (Holstein et al., 2009; Histing et al., 2011). In der vorliegenden Arbeit wurde auf den Fixateur externe zur Stabilisierung zurückgegriffen. Die große Herausforderung besteht dabei in der Größe des Mäusefemurs und des Fixateur externe. Er muss leicht genug sein, um der Maus eine normale Funktion der Gliedmaße zu erlauben. Ein solcher Fixateur, der kontrollierte, reproduzierbare, biomechanische Konditionen erlaubt, wurde bereits in anderen Studien erprobt (Cheung et al., 2003; Connolly et al., 2003; Histing et al., 2009). Er weist unterschiedliche Fixationssteifigkeiten und eine hohe Achsen- und Rotationssteifigkeit auf. Histing et al. untersuchten verschiedene Osteosynthesetechniken am Femur und fanden heraus, dass eine Frakturstabilisierung mit einem Fixateur externe zu einer annähernd gleichen Rotationssteifigkeit führt wie im intakten Femur (Histing et al., 2009). Ein großer Vorteil des Fixateur externe ist, dass die Frakturzone von dem Implantat nicht beeinflusst wird, da nur die vier Pins direkten Kontakt zum Knochen haben (Cheung et al., 2003).

Wie oben bereits erwähnt, erlaubt die Anwendung eines Fixateur externe die Untersuchung von unterschiedlichen Fixationssteifigkeiten. Es ist bekannt, dass mechanische Belastung die Frakturheilung beeinflusst. Aber die molekularen Faktoren, welche die enchondrale und intramembranöse Knochenheilung bedingen, sind immer noch schlecht verstanden (Le et al., 2001; Garcia et al., 2008). Auch die Frage, wieviel Bewegung für die Heilung förderlich ist, ist noch nicht abschließend geklärt. In einer Studie von Claes und Heigele (1999) wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine geringe Belastung von unter 5% zu einer intramembranösen Ossifikation führen kann. Belastungen von über 15% hingegen führen danach zur Bildung von Knorpel und Bindegewebe. Die Belastungen wurden mit Hilfe der Finite Element Methode berechnet. Gröngröft et al. (2009) untersuchten die Frakturheilung bei Mäusen mit einer steifen und einer semi-steifen Platte und beobachteten bei der steifen Fixation ausschließlich intramembranöse Ossifikation. Bei der semi-steifen Platte wurde hingegen eine Mischung aus enchondraler und intramembranöser Knochenbildung gesehen und eine Verzögerung der Heilung von nur wenigen Tagen. Röntgen et al. (2010) untersuchten Fixateurs externes unterschiedlicher Steifigkeiten an der Maus.

Sie verwendeten einen steifen Fixateur, der eine interfragmentäre Beweglichkeit von 2,8% zuließ und einen flexiblen mit einer interfragmentären Beweglichkeit von 61%. Dabei konnte bei der flexiblen Fixation eine verzögerte Frakturheilung im Vergleich zum steifen Fixateur beobachtet werden. Es wurde zwischen den verschiedenen Fixateuren kein Unterschied in der Belastung des operierten Beins festgestellt. Damit konnten Unterschiede in der Heilung nicht auf eine unterschiedliche Belastung durch das Tier zurückgeführt werden. Da in der vorliegenden Arbeit eine normale Knochenheilung in Verbindung mit der Gabe von Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern untersucht werden sollte, wurde von einer flexiblen Fixation abgesehen. Stattdessen wurde neben der steifen eine semi-steife Fixation gewählt, bei der keine Verzögerung der Heilung erwartet wurde.

Die Osteotomie wurde mit einer Gigli-Säge mit einem Durchmesser von 0,44mm durchgeführt, um einen Osteotomiespalt von 0,5mm zu erhalten. Damit wurde den Empfehlungen von Histing et al. gefolgt, die einen Osteotomiespalt von maximal 20% des Knochendurchmessers anraten. Bei einem breiteren Spalt besteht die Gefahr einer verzögerten oder nicht-heilenden Fraktur, was in der vorliegenden Arbeit nicht beabsichtigt war (Histing et al., 2011).

5.1.3. *Operation*

Die Anästhesie und die Operation der Mäuse verliefen im Allgemeinen ohne besondere Vorkommnisse. Selten kam es zu Komplikationen während des Eingriffs. Neben einem geringgradig zu weiten Osteotomiespalt, der wahrscheinlich durch eine nicht exakte Positionierung der Gigli-Säge zustandekam, traten vereinzelt Frakturen des Knochens beim Eindrehen der Pins auf. In einem anderen Fall brach der Pin während des Eindrehens. Diese Komplikationen sind auf die geringe Größe und die komplexen Vorgänge zurückzuführen und lagen in einem tolerierbaren Rahmen. In einer Studie von Cheung et al. (2003) kam es zu Komplikation während der Operation durch exzessiven Blutverlust. Hiltunen et al. (1993) beobachteten bei einer Frakturstudie an der Tibia von Mäusen eine Wundinfektion. In der vorliegenden Arbeit kam es zu keinen vergleichbaren Vorfällen.

Die Isofluran-Anästhesie während der Operation wurde von den Tieren gut vertragen, und es kam nur zweimal zu Narkosezwischenfällen. Die Inhalationsanästhesie ist durch ihre gute Kontrollierbarkeit eine empfohlene Narkose für kurze Eingriffe (Histing et al., 2011). Zu Beginn vereinzelt auftretende Komplikationen während des Micro-CT-Scans konnten schnell behoben werden.

Die Mäuse wiesen wenige Tage nach der Operation bereits wieder ein physiologisches Gangbild auf. Es konnte visuell kein Unterschied zwischen den verschiedenen Fixateuren festgestellt werden. Daher ist davon auszugehen, dass die Gliedmaßen gleichmäßig belastet wurden. Nur zwei Tiere zeigten eine post-operativ anhaltende Lahmheit. Dies entspricht Beobachtungen in anderen Studien (Cheung et al., 2003; Kaspar et al., 2008; Röntgen et al., 2010).

Am Ende der Standzeiten wurde bei vielen Tiere ein Fehlen der Hautnähte beobachtet. Trotz der selbstständig entfernten Fäden wurden keine Infektionen oder Anzeichen von Wundheilungsstörungen bemerkt.

5.1.4. *Probenentnahme und histologische Aufbereitung*

Nach den jeweiligen Standzeiten von 7, 14 und 21 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und der linke Femur sowie der kontralaterale Femur entnommen. Die Knochen wurden anschließend in PFA fixiert (Cheung et al., 2003). Im Gegensatz zu der Arbeit von Cheung et al. (2003) verblieb der Fixateur externe allerdings für die Dauer der Fixation von 24 Stunden am Knochen, um vor der Fixateurentfernung eine bestmögliche Aushärtung der Osteotomie zu erreichen. Nach diesem Härtingsprozess wurde der Fixateur vom Knochen heruntergenommen (Connolly et al., 2003). Dabei musste sehr behutsam vorgegangen werden, da die Osteotomie trotz der Fixierung teilweise noch sehr instabil war. Vor allem bei einer Standzeit von 7 Tagen kam es gelegentlich während des Entfernens des Fixateurs zu Refrakturen, da die Osteotomie zu diesem Zeitpunkt meist nur durch Bindegewebe stabilisiert war. Ohne die vorherige Fixation in PFA wären deutlich mehr Komplikationen im Rahmen von Zerreißen und Verschiebungen im Osteotomiespalt aufgetreten.

Nach der Fixierung wurden die Knochen entwässert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die exakte Einbettung der Knochen war wichtig für den Schneidvorgang, um eine ähnliche Anschnittsfläche zu bekommen. Die Knochen sollten möglichst alle in der gleichen Ausrichtung und im gleichen Winkel eingebettet werden, da es sich bei dem Frakturkallus um eine heterogene, dreidimensionale Struktur handelt (Holstein et al., 2009). Dies war allerdings nicht immer möglich, da durch die individuelle

Kallusgröße und die Knochenform ein Kippen des Knochens nach links und rechts auftrat, was eine gerade Positionierung teilweise erschwerte. Durch ein schwaches Andrücken im langsam fest werden- den Paraffin konnte eine bessere Fixierung der Knochenposition erreicht werden. Dennoch war auch dadurch eine identische Positionierung der filigranen Knochen schwer möglich. Während der Schnei- dearbeit am Mikrotom musste daher teilweise der Schnittwinkel manuell nachkorrigiert werden. Durch den geringen Diaphysendurchmesser musste auch während des Schneidevorgangs sehr genau gearbeitet werden. Ein zu schiefes oder zu tiefes Schneiden konnte schnell zu einem unbrauchbaren Präparat führen. Ein schiefer Anschnitt konnte bewirken, dass der Osteotomiespalt nicht gleichmäßig mittig getroffen wurde. Ein zu tiefer Schnitt konnte in einem Verlust von zu viel Gewebe resultieren. Aufgrund dieser Umstände kam es gelegentlich zu nicht genau parallel zur Längsachse des Femurs liegenden Schnit- ten. Gewisse Abweichungen wurden in Kauf genommen, da sich auf Grund der Größe der Knochen und deren Heilungszustandes ein exakt paralleler Schnitt häufig nicht realisieren ließ und andernfalls keine ausreichenden Tierzahlen zu erreichen waren. Transversale Schnitte, wie von Gerstenfeld et al. (2005) empfohlen, wurden nicht angefertigt, da im longitudinalen Anschnitt alle vier Kortizes und die Heterogenität des Gewebes im Kallus besser sichtbar sind.

Wichtig für das Schneiden am Rotationsmikrotom war des Weiteren eine gute Kühlung der Proben. Eine nicht ausreichend gekühlte Probe hatte eine Auffältelung der Paraffinschnitte zur Folge. Häufig lösten sich Teile des lockeren Knochenmarks aus den Schnitten und führten dann zu leeren Stellen im Präparat. Selten kamen solche Stellen auch im Kallus vor. In einem solchen Fall musste vorsichtig tiefer geschnitten werden, um feststellen zu können, ob diese Lücke nur in dem jeweiligen Anschnitt lag oder ein Gewebestück aus dem Knochen herausgebrochen war. Im zweiten Fall wurde vorsichtig versucht, einen tieferen Anschnitt mit komplettem Kallus zu bekommen. Gelegentlich kam es auch zu einem Aufrollen der Kortizes, die anschließend auf dem Wärmebad vorsichtig mit dem Pinsel wieder entrollt werden mussten.

5.1.5. Deskriptive Auswertung

Die deskriptive histologische Auswertung erfolgte anhand von selbsterstellten Kriterien des Unter- suchers und ist daher rein subjektiv. Mit Hilfe der deskriptiven Auswertung sollte ein Blick auf die Bereiche außerhalb der ROI geworfen werden. Die mechanische Belastung und vor allem die Sklerostin- neutralisierenden Antikörper wirken nicht nur lokal auf den Osteotomiespalt, sondern können auch das darum liegende Gewebe beeinflussen. Vor allem im Hinblick auf die Sklerostin-neutralisierenden Anti- körper, die bereits klinisch erprobt werden, ist von besonderem Interesse, welche Nebenwirkungen und Folgen für den restlichen Körper und die Bereiche außerhalb der Osteotomiezone entstehen. Mit der deskriptiven Auswertung sollte dieser Aspekt berücksichtigt werden.

Die Auswertung unter Zuhilfenahme eines Scores, wie sie von Chhabra et al. (2005) vorgenommen wurde, war für die vorliegenden Aspekte eher ungeeignet, da eine solche Auswertung nicht direkt für die Qualität der Frakturheilung von Bedeutung ist. Bei der Verwendung eines Scores werden Punkte für bestimmte Merkmale gegeben. Mit der Höhe der Punktzahl kann anschließend eine Aussage über die Heilung gemacht werden.

5.1.6. Histomorphometrie

Für die histomorphometrische Auswertung kamen jeweils mindestens sieben Movat's Penta- chrom- gefärbte Präparate zum Einsatz. Ziel der Untersuchung war die quantitative Bestimmung der Gewebs- flächen. Mit Hilfe der Movat's Pentachromfärbung wurde der beste Kontrast zwischen Knochen- und Bindegewebe erreicht (Kaspar et al., 2008). Die bestimmte Bindegewebsfläche wurde später für die Berechnung der Gefäßdichte bei der Auswertung der Alpha-sma-Färbung herangezogen. Mit Hilfe der computergestützten Bildanalyse wurden die Schnitte der Movat's-Pentachrom-Färbung ausgewertet. Als Erstes wurden die Kortizes ausgeschlossen, da nur der neu gebildete Knochen in der Auswertung erfasst werden sollte (Willie et al., 2011). Dabei war es mitunter schwierig, eine Grenze zwischen der Kortikalis und dem neu gebildeten Knochen zu ziehen, da die Abgrenzung nicht immer eindeutig war. Um diese Fehlerquelle zu minimieren, wurde parallel mit dem Mikroskop gearbeitet, wo die Unterschiede deutli- cher zu sehen waren. Anschließend wurde die ROI ausgehend von den Rändern der Kortizes festgelegt. Da die kortikalen Osteotomiekannten meist nicht direkt senkrecht übereinanderlagen, wurde durch den Computer ein Mittelwert der proximalen und der distalen Kortizes errechnet und anhand dieser Werte eine 1mm breite und 4mm hohe ROI festgelegt. Die ROI wurde nicht wie bei Röntgen et al. (2010)

in unterschiedliche Bereiche unterteilt. Durch dieses Vorgehen war für alle Präparate eine einheitlich große ROI sichergestellt. Im Folgenden wurde mit der Flächenbestimmung begonnen. Diese wurde teilweise mit Hilfe einer Farbmaske und teilweise manuell bestimmt. Der Vorteil der computergestützten Bildanalyse ist die standardisierte Auswertung. Allerdings kann es zu Fehlern kommen, wenn subjektive Entscheidungen des Untersuchers getroffen werden. Dies ist vor allem bei der manuellen Flächenbestimmung der Fall und bei der manuellen Korrektur der Farbmaske. Da die Auswertung nur von einer Person durchgeführt wurde, ist allerdings anzunehmen, dass sie für jedes Präparat ähnlich erfolgte.

5.1.7. *Osteotomieüberbrückung*

Die Auswertung der Osteotomieüberbrückung erfolgte in Anlehnung an Willie et al. (2011) mit Hilfe eines Ja/Nein-Schemas. Dadurch sind keine Abstufungen oder eine Beurteilung der Qualität der Überbrückung möglich. Es sollte lediglich ein grober Überblick der knöchernen Osteotomiedurchbauung gegeben werden, um zusammen mit der histomorphometrischen Auswertung den Heilungsverlauf bestmöglich zu beschreiben. Im Gegensatz zu Mehta et al. (2010), die die Überbrückung mit Hilfe des μ CTs bewerteten und eine Unterteilung in komplette Überbrückung (vier Kortizes überbrückt), inkomplette Überbrückung (ein bis drei Kortizes überbrückt), keine Überbrückung und Pseudarthrose unterteilten, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Unterteilung in eine, zwei, drei oder vier Überbrückungen vorgenommen.

Zur Ermittlung der gesamten Osteotomieüberbrückung wurden nur die periostale und die intrakortikale Überbrückung betrachtet. Nach Willie et al. (2011) ist eine endostale Überbrückung kein Zeichen für eine fortgeschrittene Heilung, da es im späteren Heilungsverlauf zur Resorption des endostalen Kallus und dessen Ersatz mit Knochenmark kommt. Daher ist das Vorhandensein von endostaler knöcherner Überbrückung kein Zeichen für eine gute Heilung und wurde folglich separat betrachtet.

5.1.8. *Immunhistologie*

Die immunhistologische Färbung erfolgte mit Hilfe von Antikörpern, die gegen das Protein alpha-Smooth Muscle Actin gerichtet sind. In den Vorversuchen der Alpha-sma-Färbung kam es zu Problemen bei der Anfärbung der Gefäße. Nach mehreren Versuchen wurde jedoch ein zufriedenstellendes Färbeprotokoll gefunden. Jedoch wurden auch innerhalb eines Färbedurchganges Unterschiede in der Qualität der Färbung beobachtet. Diese Beobachtung stellte allerdings kein Problem dar, da nicht die Intensität der Färbung beurteilt wurde. Um auch schwach angefärbte Gefäße zu erkennen, wurde bei der Auswertung parallel mit dem Mikroskop gearbeitet.

Da das Alpha-Smooth Muscle Actin in der Tunica media liegt, lassen sich kleine, neu gebildete Gefäße, die nur aus Endothelzellen bestehen, nicht anfärben. Da dieses Problem bei allen Schnitten bestand, sollte dieser Umstand keinen Einfluß auf die Ergebnisse haben. Die tatsächliche Anzahl der Gefäße dürfte daher allerdings höher sein. Nach Lienau et al. (2005) liegt die Anzahl nicht angefarbter Blutgefäße bei der Alpha-sma-Färbung unter 10%.

5.2. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

5.2.1. *Deskriptive Histologie und Histomorphometrie*

Die totale Kallusfläche wurde in der vorliegenden Studie von der Fixationssteifigkeit beeinflusst. Beide Gruppen mit semi-steifem Fixateur hatten einen größeren Kallus an Tag 14 und 21 als die beiden Gruppen mit steifem Fixateur. Die Gruppe mit semi-steifem Fixateur und Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern hatte an Tag 7 den größten Kallus, während die Placebo-Gruppe mit semi-steifem Fixateur nach sieben Tagen noch eine mittlere Menge an Kallusgewebe hatte, die erst anschließend deutlich zunahm. Nach 14 Tagen war ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen mit steifem Fixateur und eher kleinem Kallus und mit semi-steifem Fixateur und deutlich größerem Kallus sichtbar. Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen anderer Studien, in denen die Auswirkungen verschiedener Fixationssteifigkeiten untersucht wurden. Eine erhöhte interfragmentäre Beweglichkeit führt demnach zu einer Hemmung der Vaskularisation und dadurch zu einer verstärkten enchondralen Knochenheilung, die einen großen Kallus zur Folge hat (Claes et al., 1997; Utvag et al., 2001; Schell et al., 2005; Willie et al., 2009). Eine große interfragmentäre Beweglichkeit kann zwar zu einem großen Kallus führen, dabei muss es sich aber nicht auch um einen qualitativ guten, belastbaren Kallus handeln (Augat et al., 2005). Beide Gruppen mit steifem Fixateur hatten einen vergleichsweise kleineren Kallus. Röntgen et al. (2010)

fürten eine Osteotomie an Mäusefemora durch und beobachteten bei der steifen ebenso wie bei der flexiblen Frakturfixation mittels Fixateur externe eine Mischung aus intramembranöser und enchondraler Ossifikation. Da in der vorliegenden Arbeit ebenfalls von einer gemischten Ossifikation auszugehen ist, ist der kleine Kallus der Gruppen mit steifem Fixateur vermutlich auf eine verstärkte intramembranöse Knochenbildung und eine geringere Knorpelbildung zurückzuführen. Die steife Fixation führt zu einer schnelleren Heilung der Osteotomie mit einem kleineren Kallus, wohingegen der semi-steife Fixateur über eine verlängerte enchondrale Ossifikation zu einem größeren Kallus und zu einer langsameren Heilung führte.

Die Fixationssteifigkeit beeinflusste die Knorpelbildung im Osteotomiebereich. Während nach sieben Tagen in allen Gruppen kaum Knorpel vorhanden war, war nach zwei Wochen ein deutlicher Unterschied zwischen den Gruppen mit steifem und mit semi-steifem Fixateur sichtbar. Eine steife Fixation führte zu einer geringen Menge an Knorpelgewebe im Kallus, und es war während der Beobachtungszeit von drei Wochen kaum ein Unterschied zwischen der Sklerostin-Antikörper-Gruppe und der Placebo-Gruppe mit steifem Fixateur vorhanden. Die Gruppen mit semi-steifer Fixation zeigten in der zweiten Woche eine starke Zunahme an Knorpelgewebe. Ebenso nahm die Knorpelmenge in der Placebo & rigid-Gruppe signifikant zu. Die Skl-Ak & rigid-Gruppe hingegen wies keine signifikante Steigerung der Knorpelmenge auf. Es ist bekannt, dass unterschiedliche Faktoren die Knorpelbildung beeinflussen. Mechanische Instabilität in der Osteotomiezone führt zu einer herabgesetzten Vaskularisation und einer geringeren Neubildung von Gefäßen im Osteotomiebereich (Lienau et al., 2005). Eine folglich niedrige Sauerstoffspannung hat eine gesteigerte Zelldifferenzierung zu Chondroblasten zur Folge und damit eine verstärkte Bildung von knorpeligem Kallus (Chao et al., 1998; Mark und Nilsson, 2004). Eine instabile Fraktur führt demnach zu einer gesteigerten Knorpelbildung und einer verlängerten enchondralen Knochenheilung. Eine stark stabilisierte Fraktur hingegen heilt vermehrt über eine direkte Differenzierung von mesenchymalen Zellen in Osteoblasten (Thompson et al., 2002). Allerdings ist eine adäquate Belastung der Fraktur für die Angiogenese sowie die Osteogenese nötig (Augat et al., 2005).

In der dritten Woche waren nur in der Placebo & rigid-Gruppe und der Skl-Ak & semi-rigid-Gruppe eine signifikante Abnahme der Knorpelmenge zu verzeichnen. In den anderen beiden Gruppen waren keine signifikanten Veränderungen zu sehen. Es scheint, bei flexibler Fixation, die zu einer großen Knorpelmenge führt, unter Sklerostin-Antikörper-Gabe zu einer schnelleren Ossifikation des Knorpelgewebes zu kommen. Neben Osteozyten wird Sklerostin auch in hypertrophen Chondrozyten exprimiert (van Bezooijen et al., 2009) und Chan et al. (2011) beobachteten, dass SOST in artikulären Chondrozyten exprimiert wird. Zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht bekannt, welche Effekte Sklerostin auf die Chondrozyten hat. Aufgrund von zellbasierten Studien wurde vermutet, dass Sklerostin eine chondroprotektive Rolle in der Entstehung von Osteoarthritis ausübt. Es konnte bisher allerdings weder durch genetische Abwesenheit von Sklerostin noch durch die pharmakologische Hemmung mittels Sklerostin-neutralisierender Antikörper eine Veränderung bei der Entwicklung von Osteoarthritis nachgewiesen werden (Roudier et al., 2013). Der Effekt von Sklerostin auf den Knorpel im Kallus während der Frakturheilung wurde bisher kaum untersucht. Es ist fraglich, inwieweit die unterschiedliche Entwicklung des Knorpelgewebes in der semi-steifen Sklerostin-Antikörper-Gruppe und in der semi-steifen Placebo-Gruppe auf die Effekte von Sklerostin in den Knorpelzellen zurückzuführen ist und welche Mechanismen dem zu Grunde liegen. Es hat allerdings den Anschein, als wenn das Sklerostin einen schützenden Effekt auf die Knorpelzellen im Kallus hat.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine erhöhte Frakturbeweglichkeit zu einer gesteigerten Knorpelbildung führt. Die Sklerostin-neutralisierenden Antikörper scheinen zu einer schnelleren Verknöcherung des Knorpels zu führen.

Betrachtet man die Lokalisation des Knorpelgewebes, war der meiste Knorpel intrakortikal und periostal zu finden. Während in den beiden Gruppen mit steifem Fixateur nach 14 Tagen prozentual deutlich mehr Knorpel intrakortikal als periostal lag und nach 21 Tagen weder intrakortikal noch periostal Knorpel zu finden war, verhielt sich die Verteilung in der semi-steifen Placebo-Gruppe anders. Nach 14 Tagen lag mehr Knorpelgewebe im periostalen Bereich. Nach 21 Tagen hingegen war intrakortikal mehr Knorpel zu finden. In der semi-steifen Sklerostin-Antikörper-Gruppe lag kaum Knorpel vor. Die Knorpelverteilung hängt von der Gefäßversorgung ab. Eine schlechte Blutversorgung führt zur Bildung von Knorpelgewebe. Dies ist einerseits in den Randbereichen des Kallus der Fall, die weit vom Periost entfernt liegen und einer

höheren Beweglichkeit ausgesetzt sind. Andererseits führt auch eine hohe Gewebespannung in der Nähe der Fraktur zu einer herabgesetzten Gefäßbildung und damit zur Bildung von Knorpel (Claes et al., 2012). In den Gruppen mit semi-steifem Fixateur kommt es durch die höhere Frakturbeweglichkeit zu einem größeren Kallus und dadurch zu mehr schlecht vaskularisierten Randbereichen des Kallus, in dem Knorpel entsteht, um die Osteotomie zu stabilisieren. In den Gruppen mit steifem Fixateur liegt ein eher kleinerer Kallus vor mit weniger Beweglichkeit im Osteotomiespalt. Hier kommt es wahrscheinlich vornehmlich zu einer Knorpelbildung auf Grund einer erhöhten mechanischen Gewebespannung in der Nähe des Osteotomiespalt (Claes und Heigele, 1999; Claes et al., 2012). Daher ist in den Gruppen mit steifem Fixateur vor allem Knorpel im intrakortikalen Kallus zu sehen. Endostal liegt in beiden Gruppen mit semi-steifem Fixateur eine geringe Menge an Knorpel nach 14 und 21 Tagen vor, der vermutlich nahe des Osteotomiespalt liegt und auf die erhöhte Gewebespannung in diesem Bereich zurückzuführen ist.

Bei Betrachtung der Knorpelverteilung außerhalb der ROI fielen nach sieben Tagen in allen Gruppen Knorpelzubildungen an der Kortikalis auf Höhe der Bohrlöcher auf. In der Sklerostin-Antikörper-Gruppe mit semi-steifem Fixateur und der Placebo-Gruppe mit steifem Fixateur wurde jeweils eine starke Knorpelzubildung an der Kortikalis beobachtet. Diese Beobachtungen scheinen allerdings keine Verbindung zur Fixationssteifigkeit oder Antikörperbehandlung zu haben und wurden auch von Kaspar et al. (2008) beobachtet. In einer anderen Studie von Kaspar et al. (2007), in der ein Fixateur externe zur Anwendung kam, der mit Hilfe von Kirschnerdrähten am Knochen befestigt wurde, wurde keine exzessive Kallusbildung um die Kirschnerdrähte beobachtet. Diese Zubildungen an der Kortikalis sind wahrscheinlich eher auf individuelle Störfaktoren zurückzuführen. Vermutlich können ein nicht genau mittig am Knochen platzierter Pin oder minimale Achsenabweichungen des Fixateurs zu einer veränderten Mechanik am Fixateur führen und dadurch zu übermäßigen Knorpel- beziehungsweise Knochenbildungen außerhalb der ROI. Auch eine exakte Befestigung des Fixateurs mittels der vier Pins am Knochen übt Stress auf den Knochen aus, der zu Reaktionen des Gewebes führen kann (Huiskes et al., 1985). Des Weiteren wurden nach 14 und 21 Tagen zum Teil starke Knorpelbildungen an der distalen Epiphysenfuge beobachtet. Dieses Phänomen trat nach 14 Tagen zweimal in der Sklerostin-Antikörper-Gruppe unter steifer Fixation auf und nach 21 Tagen in jeder Gruppe je einmal, wobei die Knorpelzubildung in der Placebo-Gruppe mit steifem Fixateur sehr schwach ausfiel. Ob Sklerostin die Chondrozyten beeinflusst und wenn ja in welcher Weise ist bisher nicht geklärt (Roudier et al., 2013; Lewiecki, 2014). Daher ist bisher auch fraglich, ob die Sklerostin-neutralisierenden Antikörper Einfluss auf die Knorpelbildung haben.

Weiterhin zeigten sich nach 14 Tagen in der Sklerostin-Antikörper-Gruppe mit semi-steifem Fixateur viele Knochen mit teilweise starken knöchernen Zubildungen außerhalb der ROI an der Kortikalis. Allerdings waren auch in der Sklerostin-Antikörper-Gruppe mit steifem Fixateur und der Placebo-Gruppe mit semi-steifem Fixateur über die Hälfte der Knochen mit knöchernen Zubildungen. Das Zusammenwirken der Sklerostin-neutralisierenden Antikörper und der erhöhten Beweglichkeit im Osteotomiespalt scheinen hier einen leichten additiven Effekt auf kortikale Knochenzubildungen zu haben. Diese Beobachtungen sind allerdings nicht statistisch ausgewertet und daher mit Vorsicht zu interpretieren. Abschließend kann daher kein signifikanter Effekt der Sklerostin-neutralisierenden Antikörper auf die Bereiche außerhalb des Osteotomiespalt postuliert werden.

Bei Betrachtung der Knochenverteilung ist ersichtlich, dass die Sklerostin-neutralisierenden Antikörper bei steifer Fixation einen positiven Einfluss auf die Knochenbildung haben. Hingegen ist in den Gruppen mit semi-steifem Fixateur die Knorpelbildung durch die erhöhte interfragmentäre Bewegung gesteigert und die Phase der enchondralen Ossifikation in diesen Gruppen verlängert (Thompson et al., 2002; Röntgen et al., 2010). Dadurch setzt die Phase der Knochenbildung, in der die Sklerostin-neutralisierenden Antikörper wirken und die mechanische Stimulation einen positiven Effekt auf die Knochenbildung hat, erst verspätet ein. Nach drei Wochen war eine Signifikanz in der Behandlung mit Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern sichtbar. Dass Sklerostin-neutralisierende Antikörper zu einer Steigerung der Knochenbildung führen, beobachteten unter anderem auch Ominsky et al. (2011). Die signifikant erhöhte Knochenfläche in den Sklerostin-Antikörper-Gruppen nach 21 Tagen ist daher nicht verwunderlich. Sklerostin wird hauptsächlich von den Osteozyten gebildet. Über eine Hemmung des Wnt/ β -Katenin-Signalweges führt es zu einer negativen Regulierung der Knochenbildung. Die Unterdrückung von Sklerostin mittels Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern steigert die Knochenbildung, und es kommt zu einer verbesserten Frakturheilung. Sklerostin wirkt über Bindung an den

Wnt-Corezeptor Lrp5/6 der Osteoblasten und hemmt auf diese Weise den Wnt/ β -Katenin-Signalweg (Li et al., 2009; Ominsky et al., 2011; Jawad et al., 2013).

Interessant ist der Einfluss der Fixationssteifigkeit. Während beide Placebo-Gruppen einen recht ähnlichen Verlauf zeigten, war dies bei den Sklerostin-Antikörper-Gruppen weniger der Fall. In der Skl-Ak & rigid-Gruppe war in der zweiten Woche eine signifikante Zunahme an Knochengewebe zu verzeichnen. In der Skl-Ak & semi-rigid-Gruppe war dies hingegen erst in der dritten Woche der Fall. Es war jedoch auch nach 21 Tagen noch ein deutlicher Unterschied zwischen der Sklerostin-Antikörper-Gruppe mit semi-steifem Fixateur und der Antikörpergruppe mit steifem Fixateur zu sehen. Letztere wies nach 2 ebenso wie nach 3 Wochen die mit Abstand größte Knochenmenge von allen Gruppen auf. Wie oben bereits erwähnt, wird Sklerostin vor allem in Osteozyten exprimiert, welche als Mechanosensoren des Knochens gelten. Während mechanischer Stimulation des Knochens findet eine Herabregulierung von Sklerostin statt und gleichzeitig eine Steigerung der Expression von Zielgenen des Wnt-Signalweges (Robling et al., 2008). In einem Entlastungsmodell zeigte sich das Gegenteil, und es kam zu einem Anstieg von Sklerostin und einer verringerten Expression von Wnt-Zielgenen. In SOST-knockout-Mäusen zeigte sich durch die Entlastung allerdings kein Effekt auf diese Zielgene und es kam zu keinem Verlust der Knochenmasse, was die große Bedeutung von Sklerostin an der Regulation der Mechanotransduktion verdeutlicht (Li et al., 2008). Die Sklerostin-neutralisierenden Antikörper ebenso wie die mechanische Belastung wirken demnach beide über eine Hemmung von Sklerostin. Sie scheinen in unserer Studie allerdings keinen additiven Effekt auf die Knochenbildung zu haben, da der semi-steife Fixateur scheinbar eine zu große Beweglichkeit zulässt. Der semi-steife Fixateur führt eher zu einer verzögerten Knochenbildung. Er steigert, wie von Mark et al. (2004) beschrieben, die Bildung von Knorpel und führt zu einer verlängerten enchondralen Ossifikation. Röntgen et al. (2010) beobachteten ebenfalls einen großen Kallus mit einem großen Anteil an Knorpelgewebe nach einer Frakturfixation mit flexiblem Fixateur externe. Die Wirkung der Sklerostin-neutralisierenden Antikörper unter semi-steifer Fixation setzt erst nach anfänglicher Stabilisierung der Osteotomie mittels eines großen, knorpeligen Kallus ein. Die Sklerostin-neutralisierenden Antikörper wirken hauptsächlich in der Phase der Knochenbildung, die unter semi-steifer Fixation erst verspätet einsetzt. Eventuell war die interfragmentäre Beweglichkeit, die der semi-steife Fixateur zuließ, noch zu groß und damit die Phase der enchondralen Ossifikation zu lang, um einen positiven Effekt auf die Frakturheilung zu haben. Es sind daher weitere Studien nötig, die den Effekt interfragmentärer Beweglichkeit auf die Frakturheilung untersuchen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der semi-steife Fixateur die Phase der enchondralen Ossifikation verlängert und damit die positiven Effekte der Sklerostin-neutralisierenden Antikörper und der mechanischen Belastung erst später einsetzen können. In einer nachfolgenden Studie sollte eine spätere Dynamisierung nach 10-14 Tagen, wenn die Knochenbildung beginnt, erfolgen, um zu überprüfen, ob es zu diesem Zeitpunkt zu einem synergistischen Effekt von mechanischer Stimulation und Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern kommt.

Die konstante Neubildung von Knochen über drei Wochen in den Sklerostin-Antikörper-Gruppen lässt die Frage aufkommen, wann die Knochenbildung unter dem Einfluss von Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern stoppt und das Remodeling beginnt. Jawad et al. (2013) beobachteten in einer Knochendefekt-Studie nach 2-3 Wochen eine Abnahme des Knochenvolumens unter Sklerostin-Antikörper-Gabe. Sie schlussfolgerten daraus, dass es bereits zu einem Remodeling des Defektes kam. Allerdings verabreichten Jawad et al. (2013) die Sklerostin-neutralisierenden Antikörper nur einmalig an Tag 3 nach der Operation. In der vorliegenden Arbeit zeigten beide Placebo-Gruppen im Gegensatz zu den Sklerostin-Antikörper-Gruppen nach 14 Tagen ihre maximale Menge an Knochen. In der dritten Woche kam es allerdings noch nicht zu einer signifikanten Abnahme der Knochenmenge. Man kann daher nicht sicher sagen, ob in den Placebo-Gruppen nach 14 Tagen bereits das Remodeling beginnt, währenddem Geflechtknochen durch Lamellenknochen ersetzt wird, der Kallus abgebaut und die Markhöhle wiederhergestellt wird (Frost, 1989). Es existieren Untersuchungen an Ratten und Cynomolgus Affen (Ominsky et al., 2014), die darauf hinweisen, dass die Gabe von Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern die Knochenbildung steigert ohne eine vorherige Aktivierung der Knochenresorption, wie sie bei einem Großteil der Remodelingprozesse abläuft. Auch an Knochenoberflächen, an denen vor der Sklerostin-Antikörpergabe bereits Knochenresorption im Rahmen des Remodeling stattfand, wurde eine vermehrte Knochenbildung beobachtet, so dass es zu einer positiven Knochenbalance kam (Tian et al., 2010; Ke et al., 2012).

Ebenso beobachteten Ominsky et al. (2014), dass die Gabe von Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern über eine modeling-basierende Knochenbildung funktioniert. Das heißt, während einer gesteigerten Knochenbildung kommt es zu einer herabgesetzten Knochenresorption. Im Gegensatz dazu führt die Therapie mit PTH zu einer remodeling-basierenden Knochenbildung, bei der es neben einer gesteigerten Knochenbildung zu einer gleichzeitigen Knochenresorption kommt. Diese Beobachtungen decken sich auch mit den Ergebnissen der Phase-1- und Phase-2-Studien am Menschen, bei denen nach der Gabe von Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern eine Abnahme des Resorptionsmarkers Serum C-Telopeptid nachgewiesen wurde (Padhi et al., 2011; Martin, 2014). Es gibt allerdings auch Studien, die keinen Effekt auf die Knochenresorption beobachteten. So fanden Li et al. (2008) keine signifikanten Veränderungen der Osteoklasten in SOST-knockout-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Für eine normale Frakturheilung ist das Remodeling unerlässlich, um eine physiologische Knochenform und -anatomie zu erhalten. Auch bei Osteoporosepatienten ist das Remodeling wichtig, damit sich der Knochen an veränderte Belastungen anpassen kann.

Abschließend kann in der vorliegenden Studie keine eindeutige Aussage über das Remodeling unter Sklerostin-Antikörper-Gabe gemacht werden, da es zu keiner signifikanten Abnahme der Knochenmenge kam. Es sind daher Untersuchungen nötig, die das Remodeling unter Sklerostin-Antikörpergabe weiter untersuchen, um unerwünschte Effekte der Therapie zu erkennen und entsprechend gegenregulieren zu können.

Die Verteilung des Bindegewebes wies einen deutlichen Unterschied zwischen den verschiedenen Fixateuren auf. Eine größere interfragmentäre Beweglichkeit führte zu einem größeren weichen Kallus mit einer verstärkten Bindegewebsbildung (Claes et al., 2012). Während 14 und 21 Tage nach der Operation kaum ein Unterschied zwischen der Behandlung mit Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern und Placebo sichtbar war, war sieben Tage post operationem in den Sklerostin-Antikörper-Gruppen jeweils mehr Bindegewebe vorhanden als in den Kontrollgruppen. Der prozentuale Anteil des Bindegewebes am Gesamtkallus nach sieben Tagen war allerdings in allen Gruppen annähernd gleich, da die Sklerostin-Antikörper-Gruppen nach sieben Tagen auch einen größeren Kallus aufwiesen als die Placebo-Gruppen. Es ist fraglich welchen Effekt die Sklerostin-neutralisierenden Antikörper auf das Bindegewebe haben.

Die Knochenmarksfläche war deutlich durch die Fixationssteifigkeit beeinflusst, und es war kaum ein Unterschied in der Behandlung mit Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern und Placebo sichtbar. Beide Gruppen mit steifem Fixateur hatten schon nach sieben Tagen deutlich mehr Knochenmark als die Gruppen mit semi-steifem Fixateur. Diese Beobachtung weist einerseits darauf hin, dass eine hohe interfragmentäre Beweglichkeit nicht nur zu einem größeren periostalen Kallus führt, sondern auch zu einer Zunahme des endostalen Kallus und damit zu einer geringeren Menge an Knochenmark. Andererseits kommt es in den Gruppen mit steifem Fixateur über die drei Wochen vermutlich zu einer zunehmenden Wiederherstellung der Knochenmarkshöhle, wie sie während des Remodelings stattfindet. Daraus entsteht der Verdacht, dass es wahrscheinlich auch unter Sklerostin-Antikörpergabe in gewissem Maße zu einer Knochenresorption kommt. Allerdings war die Analyse der Osteoklasten nicht Bestandteil dieser Arbeit, daher kann keine Aussage über die Osteoklastenaktivität gemacht werden. Dieser Verdacht der Knochenresorption unter Sklerostin-Antikörpergabe bestätigt die Beobachtungen von Li et al. (2008), die in SOST-knockout-Mäusen keine Veränderungen in der Osteoklasten-Oberfläche fanden. Die Beobachtungen von Tian et al. (2010) hingegen widersprechen denen der vorliegenden Arbeit. Sie fanden in weiblichen Ratten unter Sklerostin-Antikörper-Gabe eine starke Hemmung der Osteoklastenaktivität und damit der Knochenresorption. Diese herabgesetzte Knochenresorption beobachteten Tian et al. (2010) nicht nur bei einer Dosierung der Sklerostin-neutralisierenden Antikörper, wie sie in der vorliegenden Studie verwendet wurde sondern ebenfalls in einer geringeren Dosierung. Es bedarf daher weiterer Studien, die untersuchen, inwieweit eine Sklerostin Antikörper-Gabe die Knochenresorption verändert und das Remodeling nach einer Fraktur beeinflusst.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Knochenmarksfläche durch die Fixationssteifigkeit beeinflusst wird. Die Sklerostin-Antikörper scheinen die Knochenmarksfläche nicht zu beeinflussen. Des Weiteren scheinen sie keinen nachteiligen Effekt auf das Remodeling zu haben.

Bei Betrachtung der Gewebeverteilung war eine Woche nach der Operation Bindegewebe der vorherrschende Gewebetyp in allen Gruppen in den drei Kallusregionen. Zu diesem Zeitpunkt sorgt das Bindegewebe für eine erste Stabilisation der Osteotomie und fördert das Einwachsen von Gefäßen (Kalfas, 2001). In beiden Gruppen mit steifem Fixateur war mehr Knochenmark zu sehen als in den anderen beiden Gruppen, wobei das Knochenmark ausschließlich endostal lag. In den beiden Gruppen mit semi-steifem Fixateur war die Fraktur noch so instabil, dass es noch nicht zur Bildung von neuem Knochenmark kommen konnte.

Nach zwei Wochen war vor allem in den Gruppen mit semi-steifem Fixateur eine deutliche Zunahme der Knorpelmenge zu sehen. Dieser Knorpel lag in den Gruppen mit semi-steifem Fixateur im periostalen und endostalen Bereich, während er in den Gruppen mit steifem Fixateur vor allem intrakortikal lag. Durch die größere interfragmentäre Beweglichkeit entstehen bei semi-steifer Fixation vor allem in den Randbezirken des Kallus Bereiche mit höherer Gewebespannung und niedrigerer Sauerstoffversorgung. Dadurch kommt es dort zu einer herabgesetzten Osteoblastenaktivität und zu vermehrter Bildung von Knorpel, der den Osteotomiespalt vorläufig überbrückt. Bei steifer Fixation ist die Blutversorgung des Osteotomiespales besser, und es kann zu direkter Knochenbildung kommen (Claes et al., 2012). Allerdings ist auch bei der Stabilisierung mittels steifem Fixateur periostal vermutlich noch so viel Bewegung vorhanden, dass die Osteotomie nicht komplett durch direkte Ossifikation heilt. Zudem ist der Osteotomiespalt vermutlich nicht eng genug, um ohne die Bildung von Knorpel zu heilen.

Nach 21 Tagen lag fast nur noch in der Placebo-Gruppe mit semi-steifem Fixateur Knorpel vor. Zum größten Teil lag dieser intrakortikal und in geringer Menge auch endostal. In dieser Gruppe war der meiste Knochen endostal vorhanden und nur sehr wenig periostal und intrakortikal. Nach McKibbin (1978) scheint der endostale Kallus weitestgehend unbeeinflusst von mechanischen Manipulationen. Daher kam es auch unter größerer interfragmentärer Bewegung zu Knochenbildung in diesem Bereich. In der Sklerostin-Antikörper-Gruppe mit semi-steifem Fixateur war die Knochenverteilung ähnlich. In der Placebo-Gruppe mit steifem Fixateur war prozentual am meisten Knochen intrakortikal vorhanden und weniger peri- und endostal. In der Sklerostin-Antikörper-Gruppe mit steifem Fixateur war die Verteilung ähnlich.

5.2.2. Osteotomieüberbrückung

Nach 14 Tagen zeigte sich in der Sklerostin-Antikörper-Gruppe mit steifem Fixateur die mit Abstand stärkste gesamte Osteotomieüberbrückung gefolgt von der Placebo-Gruppe mit steifem Fixateur. Allerdings waren diese Unterschiede in der Behandlung nicht signifikant und daher zu vernachlässigen. Auch nach 21 Tagen waren keine signifikanten Unterschiede der Behandlung sichtbar. Ein deutlicher Unterschied war hingegen jeweils zwischen den Fixationsmethoden zu beobachten. Eine zu flexible Fixation führt zu einer verlangsamten Knochenbildung, da die Osteotomie zuerst durch Bildung von Knorpel stabilisiert wird, bevor es zum Einwachsen von Gefäßen in die Osteotomiezone und zur Bildung von Knochen kommt. Erst eine ausreichende Bildung von Knochen führt zu einer stabilen Überbrückung der Fragmente. Dadurch wird die Bewegung im Osteotomiespalt so weit eingeschränkt, dass das Remodeling erfolgreich stattfinden kann (McKibbin, 1978). Ein hoher Prozentsatz an knöcherner Überbrückung ist also ein Zeichen für eine weit fortgeschrittene Heilung. In der vorliegenden Studie kam es unter semi-steifer Fixation zu einer gesteigerten Knorpelbildung, wodurch die Phase der Knochenbildung verspätet einsetzte und damit die Überbrückung der Osteotomie ebenfalls verzögert ablief. Ein Einfluss der Sklerostin-Antikörper auf das Ausmaß der Überbrückung war in der vorliegenden Studie nicht nachzuweisen. Da die Antikörper allerdings erst in der Phase der Knochenbildung wirken und diese in der vorliegenden Arbeit teilweise erst verspätet einsetzte, ist eine Aussage über die Wirkung der Sklerostin-Antikörper nur begrenzt möglich. Ähnlich verhält es sich mit dem positiven Effekt von mechanischer Belastung auf die Knochenbildung. Durch die verlängerte enchondrale Ossifikation kann eine Steigerung der Knochenbildung durch mechanische Belastung erst später einsetzen.

Die endostale Überbrückung war nach 14 sowie nach 21 Tagen in der Sklerostin-Antikörper-Gruppe mit steifem Fixateur am größten. Die Placebo-Gruppe mit steifem Fixateur zeigte nach 14 Tagen eine etwas geringere Osteotomieüberbrückung. Es kam jedoch in dieser Gruppe in der dritten Woche zu einer stärkeren Abnahme der knöchernen endostalen Brückenbildung. Die endostale Überbrückung ist im Gegensatz zum periostalen und intrakortikalen Bridging kein Zeichen für eine progressive Heilung. Im fortgeschrittenen Heilungsverlauf kommt es zu einer Resorption des endostalen Kallus und einer Wieder-

herstellung des Knochenmarkskanals (Willie et al., 2011). Eine Reduktion der endostalen Überbrückung wie sie in der Placebo-Gruppe mit steifem Fixateur beobachtet wurde, weist daher auf eine fortgeschrittene Frakturheilung hin. Die im Gegensatz dazu geringere Abnahme der endostalen Überbrückung in der Sklerostin-Antikörper-Gruppe mit steifem Fixateur lässt vermuten, dass in dieser Gruppe in geringerem Maße Remodeling ablief.

5.2.3. Immunhistologie

Die Angiogenese ist wichtig für die Frakturheilung, da die Blutgefäße als Transportwege fungieren und unter anderem Nährstoffe und Knorpel- und Knochenvorläuferzellen in die Frakturregion bringen. Es wird daher angenommen, dass eine höhere Gefäßdichte zu einem reiferen Kallus mit weniger Knorpel führt, da Knorpel vor allem in schlecht versorgten Bereichen entsteht (Weaver et al., 2010; Mehta et al., 2010). Bei Betrachtung der Blutgefäße pro Bindegewebsfläche im Osteotomiespalt fiel auf, dass nach sieben Tagen signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen mit unterschiedlicher Fixationssteifigkeit vorlagen. Beide Gruppen mit steifem Fixateur hatten deutlich mehr Gefäße pro Bindegewebsfläche im Osteotomiespalt als die Gruppen mit semi-steifer Fixation. Es ist bekannt, dass mechanische Instabilität der Fraktur ebenso wie ein größerer Frakturspalt zu einer Hemmung der Vaskularisation führen (Claes et al., 2002; Lienau et al., 2005). Es gibt allerdings unterschiedliche Berichte über den Einfluss des Belastungszeitpunktes. Wallace et al. fanden eine stärkere Vaskularisation unter früher mechanischer Belastung im Vergleich zu einer schwächeren Belastung zum gleichen Zeitpunkt (Wallace et al., 1994). Andere Autoren sahen dagegen eine frühe interfragmentäre Bewegung als schädlich für eine schnelle Vaskularisation. Es wird vermutet, dass eine zu frühe Belastung der Fraktur zu einem Zerreißen neuer Gefäße führt. Des Weiteren scheint die Frakturfixation auch Einfluss auf die angiogenen Gene in mesenchymalen Zellen zu haben. Eine Belastung sollte daher erst einsetzen, wenn eine erste Stabilisierung mittels Frakturhämatom gewährleistet ist und eine initiale Gefäßbildung erfolgt ist (Lienau et al., 2005; Gardner et al., 2006; Weaver et al., 2010; Mehta et al., 2010). Gardner et al. (2008) nahmen an, dass dieser Zeitpunkt bei der Maus nach vier Tagen erreicht ist und begannen daher mit der Belastung erst an Tag vier. Die höhere Gefäßdichte in den Gruppen mit steifer Fixation in der vorliegenden Arbeit geht daher mit den Ergebnissen der meisten anderen Studien konform.

In der Sklerostin-Antikörper-Gruppe mit steifem Fixateur ging die deutliche Steigerung der Gefäßdichte nach 14 Tagen mit einem starken Anstieg der Knochenfläche einher. Zur Entstehung von neuem Knochen ist die Bildung von Blutgefäßen essentiell, da sie Sauerstoff und Nährstoffe liefern (Hankenson et al., 2011). In der dritten Woche gab es keine signifikanten Unterschiede in der Gefäßdichte zwischen den Gruppen. Es sind bisher keine Studien bekannt, die die Angiogenese unter Sklerostin-Antikörpergabe untersuchten. Es sind daher weitere Untersuchungen nötig, um diese Beobachtung zu überprüfen.

5.3. VERGLEICH MIT ANDEREN STUDIEN

Es existieren viele Frakturstudien an Mäusen, allerdings nur wenige, die sich mit den Abläufen der Heilung unter Anwendung eines Fixateur externe befassen haben. Ebenso sind Daten zu verschiedenen Fixationssteifigkeiten während der Frakturheilung nur begrenzt vorhanden, weshalb es nicht leicht ist, Studien mit vergleichbaren Bedingungen zu finden.

In einer Studie von Röntgen et al. (2010) wurden die gleichen Fixateurs externes verwendet wie in der vorliegenden Arbeit. Es wurden Osteotomien an sechs Monate alten Mäusen vorgenommen, die mittels zwei unterschiedlichen Fixateurs externes stabilisiert wurden. Der steife Fixateur bestand aus einem Polymer-Block, der mit vier Mini-Schanzschrauben am Femur befestigt wurde und eine interfragmentäre Beweglichkeit von 2,8% zuließ. Der flexible Fixateur bestand aus zwei kleineren Polymer-Blöcken, die in der Mitte mit einem Stahldraht verbunden wurden und der eine interfragmentäre Beweglichkeit von 61% zu ließ. Mit einer Gigli-Säge wurde eine 0,5mm breite Osteotomie durchgeführt. Beide Fixateure ließen eine physiologische Belastung der Gliedmaßen zu, wie anhand der Tierbeobachtungen und der Bodenreaktionskraft festgestellt werden konnte. Nach 21 Tagen wurden alle Tiere euthanasiert und histologische Schnitte angefertigt, die mittels einer Paragon-Färbung beurteilt wurden. In beiden Gruppen wurde ein Kallus mit einer Mischung aus intramembranöser und enchondraler Ossifikation beobachtet, allerdings zeigte die Gruppe mit flexiblem Fixateur einen größeren Kallus mit weniger Knochen und einer größeren Menge an Knorpelgewebe. Röntgen et al. (2010) folgerten daraus, dass der Fixateur

externe zur Untersuchung der Mechanotransduktion unter kontrollierter mechanischer Belastung in der Maus geeignet ist, und dass ein flexibler Fixateur externe zu einer verzögerten Heilung führt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in der vorliegenden Arbeit von der Verwendung eines flexiblen Fixateurs abgesehen und stattdessen der semi-steife Fixateur eingesetzt, da in dieser Arbeit die normale und nicht die verzögerte Knochenheilung untersucht werden sollte. Es bestand die Vermutung, dass eine geringradig höhere Beweglichkeit als mit dem steifen Fixateur, die Knochenbildung durch Herabregulierung von Sklerostin (durch Reduktion der SOST-Transkription) (Robling et al., 2008) stimuliert. Dennoch ist die Heilung im Vergleich zur Stabilisierung mit einem steifen Fixateur auch unter semi-steifer Fixation zu den gewählten Zeitpunkten noch verzögert. Es kam in der vorliegenden Studie in der Placebo-Gruppe mit semi-steifem Fixateur nach 21 Tagen zu einem merklich größeren Kallus mit deutlich mehr Knorpelgewebe und weniger Knochen als in der Placebo-Gruppe mit steifem Fixateur. Allerdings wählten Röntgen et al. (2010) eine ROI, die den gesamten Kallus umfasste, während in der vorliegenden Arbeit eine ROI von einer vorgegebenen Breite gewählt wurde. Dabei war es möglich, dass bei einem großen Kallus, wie er vor allem in der Gruppe mit semi-steifem Fixateur vorkam, die Ränder nicht mehr in der ROI lagen und somit eine beginnende Verknöcherung vom Randbereich des Kallus nicht mehr in die Auswertung einging. Dennoch ist davon auszugehen, dass die Gruppe mit semi-steifem Fixateur eine geringere Knochenfläche im Kallus aufwies als die Gruppe mit steifer Fixation. Des Weiteren untersuchten Röntgen et al. (2010) nur die Heilung nach einer Standzeit von 21 Tagen. Es fehlen daher Vergleichswerte für den Heilungsverlauf nach sieben und 14 Tagen.

Gröngröft et al. (2009) untersuchten ebenfalls den Einfluss unterschiedlicher Fixationssteifigkeiten auf die Knochenheilung am Mausmodell, allerdings mit Hilfe von MouseFix-Platten. Der Nachteil solcher Platten im Vergleich zu einem Fixateur externe liegt vor allem in dem relativ dichten Kontakt von Fixationsmaterial und Osteotomiespalt. Dadurch ist eine größere Beeinflussung der Heilung durch das Implantat möglich (Histing et al., 2011). An 20 bis 25 Wochen alten Mäusen wurden zwei unterschiedlich starre Platten mit vier Schrauben am Femur befestigt, wobei die steife Platte eine vierfach stärkere Biegefestigkeit als die flexible Platte aufwies. Mit einer Gigli-Säge wurde anschließend eine 0,45mm weite Osteotomie durchgeführt. Die Tiere wurden nach 4, 9, 14, 21, 28 und 42 Tagen euthanasiert und histologische Schnittpräparate angefertigt, an denen neben der Knorpelmenge auch der Lamellen- und Geflechtknochen separat bestimmt wurde. Unter der Fixation mit steifer Platte wurde nur intramembranöse Ossifikation beobachtet, während die flexiblere Platte eine Mischung aus intramembranöser und enchondraler Knochenheilung auslöste. Die steife Platte war demnach starr genug, damit die Fraktur unter minimaler Knorpel- und Kallusbildung heilte. Sie erlaubte eine hohe Fixationsstabilität (Histing et al., 2011) und unterschied sich vermutlich in ihren mechanischen Auswirkungen auf den Osteotomiespalt von dem steifen Fixateur externe der hier vorgestellten Studie. Bei dem steifen ebenso wie dem semi-steifem Fixateur der vorliegenden Arbeit kam es neben intramembranöser auch zu einer enchondralen Ossifikation.

Gröngröft et al. (2009) beobachteten in der Gruppe mit flexibler Platte eine deutlich größere Kallusbildung und eine erheblich größere Menge an Knorpelgewebe im Vergleich zu der Gruppe mit steifer Platte, die kaum Knorpelbildung aufwies. Unter flexibler Fixation kam es des Weiteren zu signifikant mehr Geflechtknochen und mehr Lamellenknochen. Nach 42 Tagen war in der Gruppe mit steifer Platte kaum noch Geflechtknochen zu sehen, während die Gruppe mit flexibler Platte noch geringe Mengen an Geflechtknochen aufwies. Gröngröft et al. (2009) schlussfolgerten daraus, dass in der Gruppe mit flexibler Platte, die lediglich ein Viertel der Festigkeit der normalen Platte aufwies, nur eine Heilungsverzögerung von wenigen Tagen vorlag. Folglich führte eine flexible Fixation im Mäuseknochen nicht zu einer erheblich verzögerten Heilung im Vergleich zu einer normalen Fixation. Diese Behauptung lässt sich in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigen. Der Beobachtungszeitpunkt reichte zwar nicht wie bei Gröngröft et al. (2009) bis zur radiologischen Heilung, allerdings war nach 14 ebenso wie nach 21 Tagen in der Placebo-Gruppe mit steifem Fixateur ein deutlich höherer Grad an Osteotomieüberbrückung sichtbar als in der Placebo-Gruppe mit semi-steifem Fixateur. Ebenso zeigte die Gruppe mit steifem Fixateur zu beiden Zeitpunkten mehr Knochengewebe und Knochenmark als die Gruppe mit semi-steifem Fixateur, hingegen aber deutlich weniger Knorpel. Diese Beobachtungen weisen auf eine merklich fortgeschrittenere Heilung in der Gruppe mit steifem Fixateur hin. Allerdings kam hier ein semi-steifer Fixateur zum Einsatz, der eine siebenfach größere Flexibilität im Vergleich zu dem

steifen Fixateur aufwies. Des Weiteren weisen der Fixateur externe und die MouseFix-Platte vermutlich Unterschiede in der Biegefestigkeit sowie der axialen und Rotationsstabilität auf. Dieser Unterschied zwischen den flexiblen Fixationssystemen scheint einen beträchtlichen Unterschied in der Heilung auszumachen. Es sind daher weitere Studien nötig, die neben dem Einfluss der Fixationsstärke auch die Art der interfragmentären Bewegung näher untersuchen.

Auch Gardner et al. (2011) untersuchten die Fixationssteifigkeit von Frakturen an Mäusen, allerdings unter Verwendung unterschiedlich steifer Marknägel. Die Frakturfixation mit einem Marknagel führt zu keiner außerordentlich stabilen Fixation, und die Beschädigung der Markhöhle kann die Heilung beeinflussen (Histing et al., 2011). Die Untersuchungen fanden an 10 Wochen alten Mäusen statt, denen entweder ein Wolfram-Nagel, der ein hohes Elastizitätsmodul besitzt, oder ein Aluminium-Nagel, der eine geringere Steifigkeit aufweist, in den Femur eingesetzt wurde. Dazu wurde die Patella subluxiert, der Markraum eröffnet und der Nagel über die komplette Länge des Knochens in den Femur vorgeschoben. Anschließend wurde mit Hilfe einer Drei-Punkt-Biegevorrichtung eine geschlossene Fraktur durchgeführt. Eine geschlossene Fraktur ist im Vergleich zu einer offenen Fraktur schwer zu standardisieren, und es besteht die Gefahr einer Dislokation des Frakturspaltes. Die Tiere wurden nach zwei und fünf Wochen euthanasiert. Anschließend wurden Schnittpräparate angefertigt, die histomorphometrisch mittels Sirius-Red- und Alcian-Blau-Färbung ausgewertet wurden. In beiden Gruppen heilten die Frakturen über enchondrale Ossifikation. Nach zwei Wochen war in der Gruppe mit der größeren Flexibilität der Frakturfixation ein größerer Kallus und ein höherer Prozentsatz an Knorpel im Kallus zu beobachten. Diese Ergebnisse waren den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit ähnlich. Des Weiteren waren auch Ähnlichkeiten in der absoluten Menge an neu gebildetem Knochen festzustellen. Beide Gruppen in der Studie von Gardner et al. (2011) hatten nach zwei Wochen eine nahezu gleiche Menge an Knochen im Kallus. Auch in der vorliegenden Studie war in den beiden Placebo-Gruppen nach zwei Wochen nur ein geringer Unterschied in der Menge an Knochengewebe zu beobachten, was ebenso wie in der Arbeit von Gardner et al. (2011) zu einer geringeren Knochendichte im Kallus in der Gruppe mit semi-steifem Fixateur führte. Trotz der verschiedenen Fixationssysteme und der unterschiedlichen Art der Osteotomie lässt sich eine ähnliche Reaktion der Knochen auf die unterschiedliche interfragmentäre Beweglichkeit beobachten. Für einen genaueren Vergleich wären allerdings Untersuchungen zu weiteren Heilungszeitpunkten in der Studie von Gardner et al. (2011) von Vorteil. Nach fünf Wochen zeigten beide Gruppen eine vollständige Frakturheilung, so dass keine Unterschiede mehr feststellbar waren und die Daten nicht für einen näheren Vergleich der Gruppen herangezogen werden konnten. Um den Verlauf der Heilung besser beurteilen und mit der vorliegenden Arbeit vergleichen zu können, wären Untersuchungen nach sieben und nach 21 Tagen hilfreich.

Die Anwendung von Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern wird bereits in klinischen Studien geprüft. Es existieren daher auch einige Arbeiten über die Wirkung von Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern im Tiermodell, allerdings nur wenige, die die Antikörper in Verbindung mit der Knochenheilung untersuchten. Jawad et al. (2013) führten eine Knochendefektstudie an acht bis zehn Wochen alten Nacktmäusen durch. Dazu wurde mit einem Draht ein 0,8mm breiter unikortikaler Knochendefekt in der Mitte des linken Femurschaftes gesetzt. Nach der venösen Gabe von Reporter-Präosteoblasten, die mit Hilfe von Bioluminescence und Immunhistologie sichtbar gemacht werden konnten, bekam die Hälfte der Tiere an Tag vier nach der Operation Sklerostin-neutralisierende Antikörper (25mg/kg) subkutan gespritzt und die andere Hälfte ein Placebo. Für die histologische Auswertung wurden die Mäuse an Tag 0, 2, 7, 14, 21 und 28 nach der Injektion getötet und Schnittpräparate der Knochen angefertigt, die mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt wurden. Nach einer Woche war bereits Geflechtknochen in dem Knochendefekt in beiden Gruppen sichtbar, und nach zwei Wochen war eine komplette knöcherne Überbrückung des Defektes zu beobachten. In der Sklerostin-Antikörper-Gruppe war diese Brücke allerdings breiter und großflächiger. Die Ergebnisse von Jawad et al. (2013) konnten in der vorliegenden Studie nur zum Teil bestätigt werden. Es kam nach zwei Wochen nicht zu einer vollständigen Überbrückung, da es sich in der vorliegenden Arbeit um eine Frakturstudie handelte und Jawad et al. (2013) nur einen Knochendefekt untersuchten, der voraussichtlich schneller heilte als eine komplette Fraktur des Femurs. Es wurde in der vorliegenden Studie kein signifikanter Unterschied in der Überbrückung zwischen der Sklerostin-Antikörper-Gruppe und der Placebo-Gruppe beobachtet. Bei Jawad et al. (2013) erreichte die gesamte Knochenfläche in beiden Gruppen nach zwei Wochen ihr Maximum. Zu diesem Zeitpunkt

lag der neu gebildete Knochen in der Sklerostin-Antikörper-Gruppe dichter vor, und die gesamte Knochenfläche war 37% größer als in der Kontrollgruppe. Zwischen der zweiten und der dritten Woche kam es in beiden Gruppen zu einer Verringerung der Knochenmenge. In der Sklerostin-Antikörper-Gruppe fiel diese Abnahme sehr stark aus, was hinweisend auf ein rasantes Remodeling war. Auch in der vorliegenden Arbeit war in der Placebo-Gruppe die maximale Knochenmenge zwei Wochen post operationem zu sehen. In der Sklerostin-Antikörper-Gruppe mit steifem Fixateur war wie bei Jawad et al. (2013) mehr Knochen vorhanden als in der Placebo-Gruppe, allerdings kam es nach zwei Wochen nicht zu einer Abnahme an Knochengewebe. Dieser Unterschied zu der Studie von Jawad et al. (2013) kann vermutlich durch die dauerhafte Hemmung von Sklerostin in der vorliegenden Arbeit erklärt werden. Die zweimal wöchentliche Injektion der Antikörper führte demnach wahrscheinlich zu einer anhaltenden gesteigerten Knochenproduktion über mehrere Wochen. Im Gegensatz dazu injizierten Jawad et al. (2013) die Sklerostin-neutralisierenden Antikörper nur einmalig und erreichten damit eine frühzeitige, aber keine dauerhafte Hemmung von Sklerostin. Nach der Überbrückung des kortikalen Spaltes konnte es daher vermutlich zu einem schnelleren Remodeling kommen. Jawad et al. (2013) kamen zu dem Schluss, dass die Sklerostin-neutralisierenden Antikörper neben einer gesteigerten Knochenproduktion auch zu einem beschleunigten Remodeling führen. Diese Schlussfolgerung kann in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Es kam zwar in der Sklerostin-Antikörper-Gruppe mit steifem Fixateur zu einer deutlich vermehrten Knochenbildung und auch einer Steigerung der Knochenmarksfläche, was ein Zeichen für eine Wiederherstellung des Knochenmarkskanals im Rahmen des Remodelings ist. Es fehlte aber die Abnahme der Knochenmenge, wie sie beobachtet wird, wenn der Kallus während des Remodeling abgebaut wird. Es sind daher weitere Untersuchungen nötig, die den effektivsten Zeitpunkt und die Dauer der Sklerostin-Antikörpergabe näher erforschen.

In der Studie von Jawad et al. (2013) wurde die Heilung eines Knochendefektes untersucht. Cui et al. (2013) dagegen führten ähnlich der vorliegenden Arbeit eine Osteotomie an Femora von 8 bis 10 Wochen alten Mäusen durch, die durch eine in die Knochenmarkshöhle vorgeschobene Nadel stabilisiert wurden. Dazu wurde eine 21 G Kanüle mit einem Durchmesser von 0,8mm von den distalen Kondylen aus in die Knochenmarkshöhle vorgeschoben. Anschließend wurde die Kanüle auf halber Länge wieder zurückgezogen und eine Osteotomie mit Hilfe einer niedertourigen Handsäge durchgeführt. Danach wurde die Nadel wieder bis zum Trochanter major vorgeschoben und das Ende umgebogen. Die Nadel wurde dann so fest wie möglich zurückgezogen, um den Frakturspalt zu verkleinern. Anschließend wurde das Ende abgeschnitten. Die Hälfte der Tiere bekam zweimal pro Woche Sklerostin-neutralisierende Antikörper (25mg/kg) subkutan injiziert, beginnend einen Tag post operationem. Die andere Hälfte bekam ein Placebo. Zwei, vier und sechs Wochen nach der Osteotomie wurden die Tiere getötet und die Femora nach einer Micro-CT-Untersuchung für die Histologie in MMA (Methyl methacrylate) eingebettet. Die Sklerostin-Antikörper-Gruppe zeigte nach zwei Wochen eine größere Kallusfläche und nach sechs Wochen einen weiter entwickelteren Kallus als in der Placebo-Gruppe. Zu allen Zeitpunkten war unter Sklerostin-Antikörpergabe eine größere Menge an neu gebildetem Knochengewebe zu beobachten. Cui et al. (2013) schlossen daraus, dass die Sklerostin-neutralisierenden Antikörper die Knochenheilung durch eine Beschleunigung der Knochenbildung verbessern. Diese Vermutung lässt sich durch die vorliegende Arbeit bestätigen, da in der Sklerostin-Antikörper-Gruppe mit steifem Fixateur eine deutlich größere Knochenmenge vorlag. Allerdings setzt unter flexibler Fixation die Knochenbildung erst verzögert ein. Eventuell wäre bei einem verlängerten Beobachtungszeitraum, wenn auch unter semi-steifer Fixation die Phase der Knochenbildung eingesetzt hat, ein synergistischer Effekt von mechanischer Stimulation und Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern sichtbar geworden. Diese Behauptung ist allerdings rein hypothetischer Natur. Die Hypothese, dass die Sklerostin-Antikörpergabe zusammen mit einer erhöhten interfragmentären Beweglichkeit nicht zu gesteigerter Knochenbildung führt, konnte in der vorliegenden Untersuchung weder bestätigt noch widerlegt werden. Es kam allerdings stattdessen zu einer verzögerten Heilung. Diese Beobachtung lässt die Vermutung zu, dass der flexible Fixateur für einen normalen Heilungsverlauf eine zu hohe Beweglichkeit im Osteotomiespalt zulässt. Die in der vorliegenden Arbeit gewählte Osteotomiespaltbreite lag bei 0,5mm. Bei einem durchschnittlichen Femurdurchmesser der Maus von 5mm (Cheung et al., 2003) betrug die Spaltbreite ca. 10% des Knochendurchmessers und lag damit unter der Empfehlung von Histing et al. (2011) von 20% für eine normale Heilung. Es ist demnach davon auszugehen, dass die verzögerte Heilung nicht auf Grund eines

zu breiten Osteotomiespaltes, sondern infolge einer zu großen interfragmentären Beweglichkeit auftrat. Daher sind weitere Studien nötig, die die Heilung unter unterschiedlich flexibler Fixation untersuchen, um die optimale interfragmentäre Beweglichkeit zu ermitteln, die die Knochenheilung positiv beeinflusst.

Des Weiteren sind Cui et al. (2013) der Ansicht, dass die Gabe der Antikörper zu einem frühen Heilungsstadium die Frakturheilung vorantreibt. Auch diese Beobachtung kann in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden, da wie bei Cui et al. (2013) nach zwei Wochen ein deutlicher Unterschied in der Knochenmenge zwischen der Sklerostin-Antikörper-Gruppe und der Placebo-Gruppe mit steifem Fixateur sichtbar war. Es konnte zu einem früheren Zeitpunkt sieben Tage nach der Operation zwar noch kein Unterschied in der Knochenmenge festgestellt werden, da in allen Gruppen kaum Knochen vorhanden war. Jedoch waren in den Sklerostin-Antikörper-Gruppen ein größerer Kallus, mehr Bindegewebe und teilweise auch mehr Knorpel als in den Placebo-Gruppen mit gleichem Fixateur vorhanden. Auch diese Beobachtungen bekräftigen die Annahme von Cui et al. (2013). Allerdings können diese Effekte der Sklerostin-Antikörper auf den Kallus, das Bindegewebe und den Knorpel zum jetzigen Zeitpunkt nicht erklärt werden.

Morse et al. (2015) untersuchten den Einfluss von Sklerostin auf die Frakturheilung an Wildtyp- und SOST-knockout-Mäusen. Es wurde eine geschlossene Fraktur der Tibia durchgeführt und mittels eines externen Fixateurs stabilisiert. Die Heilung wurde an Tag 7, 10, 14 und 28 nach der Fraktur mittels Micro-CT und Histomorphometrie beurteilt. In den Wildtyp- ebenso wie in den SOST-knockout-Mäusen wurde eine normale enchondrale Ossifikation beobachtet und eine ähnliche Menge an Bindegewebsknorpel. Nach 28 Tagen war in beiden Gruppen eine knöcherne Verbindung der Fraktarenden zu beobachten. Die SOST-knockout-Mäuse zeigten allerdings eine verbesserte frühe Knochenbildung mit einem größeren Knochenvolumen. Ebenso hatte der Kallus der SOST-knockout-Mäuse nach 28 Tagen einen größeren Knochenanteil als der Kallus der Wildtyp-Mäuse. Nach 14 Tagen wurde in den SOST-knockout-Mäusen eine signifikante Abnahme von Bindegewebsknorpel und Knorpelgewebe beobachtet. Morse et al. (2015) folgerten daraus, dass es in der SOST-knockout-Gruppe zu einem schnelleren Abbau von Knorpel und Bindegewebsknorpel kam und damit zu einem früheren Fortschreiten der enchondralen Ossifikation. Nach 28 Tagen war in beiden Gruppen das Kallusgewebe bis auf den Knochen abgebaut und es waren keine Unterschiede mehr sichtbar.

Die Beobachtungen von Morse et al. (2015) ähneln denen der vorliegenden Studie. Zwar kamen in der vorliegenden Studie keine SOST-knockout-Mäuse zum Einsatz, es wurde aber Sklerostin, das Produkt des SOST-Gens, von Beginn des Versuchs an mittels Antikörpern gehemmt. In den Gruppen mit steifer Fixation zeigte sich kaum ein Unterschied in der Knorpelfläche nach 14 und 21 Tagen. In den Gruppen mit semi-steifem Fixateur kam es unter Sklerostin-Antikörper-Gabe allerdings zu einem signifikanten Abfall der Knorpelmenge im Kallus wohingegen es unter Placebogabe zu keiner signifikanten Veränderung kam. Diese Beobachtung unterstreicht die Vermutung von Morse et al. (2015), dass es durch die Unterdrückung von SOST zu einem früheren Voranschreiten der enchondralen Ossifikation kommt. Allerdings wurde dies in der vorliegenden Studie nur in Verbindung mit der semi-steifen Fixation beobachtet. Es ist fraglich welche Bewegung der Fixateur extern, den Morse et al. (2015) verwendeten, zuließ und in wie weit die Beobachtung von Morse et al. (2015) von der interfragmentären Bewegung abhängt.

Ebenso wie bei Morse et al. (2015) wurde auch in der vorliegenden Studie eine größere Knochenfläche in den Sklerostin-Antikörper-Gruppen als in den Vergleichsgruppen gesehen. Diese Ergebnisse bestätigen die Beobachtungen von vorangegangenen Studien, dass die Hemmung von Sklerostin zu einer gesteigerten Knochenbildung führt (Ominsky et al., 2011). Im Gegensatz zu Ominsky et al. (2011) wurden allerdings in der Studie von Morse et al. (2015) ebenso wie in der vorliegenden Arbeit trotz der gesteigerten Knochenmenge unter Sklerostin-Hemmung keine verbesserte Frakturüberbrückung beobachtet.

5.4. SCHLUSSFOLGERUNG

Ziel der hier diskutierten Studie war es, die Wechselwirkungen zwischen mechanischer Stimulation und Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern näher zu untersuchen. Es existieren bereits einige Daten zur Wirkung der Antikörper auf den Knochen in der Maus. Ebenso wurden Studien zur interfragmentären

Beweglichkeit während der Frakturheilung durchgeführt. Bisher liegen allerdings keine Daten zu den Wechselwirkungen beider Faktoren und ihrem Einfluss auf die Knochenheilung vor.

Die Ergebnisse dieser Studie haben gezeigt, dass die Frakturstabilität die Reaktion des Knochens auf die Sklerostin-neutralisierenden Antikörper beeinflusst. Die erste in dieser Arbeit aufgestellte Hypothese, die besagt, dass die Hemmung von Sklerostin durch neutralisierende Antikörper zu einer erhöhten Knochenbildung während der Heilung führt, konnte bestätigt werden, da in der Gruppe mit steifem Fixateur eine Sklerostin-Antikörpergabe in einer deutlich erhöhten Knochenproduktion resultierte. Bei einer höheren interfragmentären Beweglichkeit setzte unter Sklerostin-Antikörpergabe eine gesteigerte Knochenbildung jedoch erst verspätet ein. Die Aussage von Cui et al. (2013), dass eine Sklerostin-Antikörpergabe zu einer verbesserten Frakturheilung führt, lässt sich jedoch nur begrenzt bestätigen. Nach 14 Tagen zeigte die Sklerostin-Antikörper-Gruppe mit steifem Fixateur eine größere Knochenmenge, welche als Zeichen für eine fortschrittliche Heilung gesehen werden kann. Allerdings wiesen beide Gruppe mit steifem Fixateur eine ähnliche Osteotomieüberbrückung und damit ein ähnliches Heilungsergebnis auf.

Des Weiteren war die Osteotomieüberbrückung in den Gruppen mit semi-steifem Fixateur deutlich schlechter als in den Gruppen mit steifem Fixateur. Eine zu hohe interfragmentäre Bewegung führt demnach in jedem Fall zu einer verzögerten Heilung. Eine Stimulation der Heilung durch mechanische Belastung scheint in diesem Versuch nicht vorzuliegen. Es besteht die Annahme, dass der semi-steife Fixateur eine zu große interfragmentäre Beweglichkeit zuließ, was in einer verzögerten Heilung resultierte. Die zweite Hypothese, die besagt, dass eine zusätzliche Hemmung von Sklerostin durch Unterdrückung des SOST-Gens infolge größerer interfragmentärer Bewegung mit Hilfe eines semi-steifen Fixateurs zu keiner zusätzlichen Knochenbildung führt, kann daher weder bestätigt noch widerlegt werden. Die genauen Bedingungen, unter denen mechanische Belastung zu einer verbesserten Frakturheilung führt, müssen demnach in zukünftigen Studien näher untersucht werden.

Unter steifer Fixation steigert die Gabe von Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern die Heilung nach 14 Tagen. Nach 21 Tagen zeigten allerdings beide Gruppen mit steifem Fixateur ähnliche Heilungsergebnisse, unter Sklerostin-Antikörpergabe jedoch mit einer höheren Knochenmenge. Die abnehmende endostale Überbrückung in der Placebo-Gruppe mit steifem Fixateur in der dritten Woche kann zu der Annahme führen, dass es in dieser Gruppe bereits zu einem langsam beginnenden Remodeling kam und damit eine weiter fortgeschrittene Heilung vorlag. Diese Vermutungen sind allerdings nicht ausreichend durch die vorliegenden Ergebnisse untermauert.

In der vorliegenden Studie wurden ältere Tiere verwendet, bei denen von einer altersbedingten Abnahme der Knochendichte auszugehen ist. Es fehlt aber eine Vergleichsuntersuchung an osteoporotischem Knochen, bei dem eine pathologisch verminderte Knochendichte vorliegt und aufgrund dessen es zu einer verzögerten Heilung kommt. Im gesunden Knochen ist der Effekt einer Sklerostin-Antikörpergabe auf die Frakturheilung aufgrund der oben beschriebenen Ergebnisse der Frakturüberbrückung als fraglich einzustufen. Ebenso ist der Effekt von Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern auf die Knorpelzellen bisher noch fraglich und bedarf näheren Untersuchungen.

6. Zusammenfassung

Histologische Beurteilung der Auswirkungen des Proteins Sklerostin und der mechanischen Belastung auf die Knochenstruktur und die Knochenheilung in einem Mausmodell

Das Frakturrisiko und die Gefahr, eine Knochenheilungsstörung zu entwickeln, ist mit zunehmendem Alter erhöht und wird durch eine Osteoporoseerkrankung weiter gesteigert. Die zunehmende Vergreisung der Gesellschaft führt daher auch zu einer wachsenden finanziellen Belastung des Gesundheitssystems und zu einem steigenden Forschungsinteresse im Bereich der Frakturheilung ebenso wie in der Osteoporose-Therapie. In der vorliegenden Arbeit sollten das Zusammenwirken zweier unterschiedlicher Ansatzpunkte, die Knochenheilung zu beeinflussen, untersucht werden. Sklerostin-neutralisierende Antikörper führen zu einer Steigerung der Knochenbildung und der Knochenmineraldichte und werden derzeit bereits in klinischen Studien geprüft (Agholme et al., 2011b; Padhi et al., 2011). Auch mechanische Belastung hat einen positiven Effekt auf die Knochenmineraldichte (Chilibeck et al., 1995) und einigen Studien zu Folge auch auf die Knochenheilung (Claes et al., 1995; Kim et al., 2003). Ziel des vorliegenden Projektes war es die Wechselwirkungen zwischen mechanischer Stimulation und Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern im Rahmen der Knochenheilung zu verstehen. Hierzu wurde bei 120 Mäusen jeweils am linken Femur eine Osteotomie durchgeführt, die mittels eines Fixateur externe unterschiedlicher Beweglichkeit (axiale Steifigkeit von a) 18,18 N/mm bzw. b) 1,89 N/mm) stabilisiert wurde. Die Hälfte der Tiere bekam zweimal pro Woche Sklerostin-neutralisierende Antikörper injiziert. Die übrigen Tiere dienten als Placebo-Gruppe. Nach Standzeiten von sieben, 14 und 21 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und die Knochen histologisch und immunhistologisch ausgewertet.

Wie erwartet führte die Sklerostin-Antikörpergabe zu einer erhöhten Knochenproduktion was bereits in anderen Studien (Cui et al., 2013; Jawad et al., 2013) beobachtet wurde. Unter semi-steifer Fixation setzte diese gesteigerte Knochenbildung allerdings verspätet ein. In beiden Gruppen war über die drei Wochen ein Anstieg an Knochenmenge zu verzeichnen, wohingegen die Placebo-Gruppe mit steifer Fixation nach 14 Tagen scheinbar bereits Remodeling mit einer wieder abnehmenden Knochenmenge aufwies. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, inwieweit ein adäquates Remodeling unter dauerhafter Sklerostin-Antikörpergabe möglich ist und welche Konsequenzen daraus für die Therapie von schlecht-heilenden Frakturen entsteht.

Weiterhin zeigten beide Gruppen mit semi-steifer Fixation in der zweiten Woche eine stark erhöhte Knorpelproduktion. Dies weist auf eine ungenügende Stabilisierung der Osteotomie durch den semi-steifen Fixateur hin. Eine erhöhte Beweglichkeit im Osteotomiespalt führt zu einer verminderten Vaskularisation und damit einhergehend zu einer verstärkten Bildung von knorpeligem Kallus (Mark und Nilsson, 2004; Lienau et al., 2005). Weiterhin wiesen beide Gruppen mit semi-steifem Fixateur eine signifikant schlechtere Frakturüberbrückung an Tag 14 sowie Tag 21 auf. Es ist daher anzunehmen, dass der in dieser Studie verwendete semi-steife Fixateur eine zu große Flexibilität aufwies, um einen positiven Effekt auf die Knochenheilung auszuüben. Auffällig war allerdings, dass unter semi-steifer Fixation die Gabe von Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern in der dritten Woche zu einem relativ starken Abfall der Knorpelmenge führte. Der Effekt, den Sklerostin und damit auch die Sklerostin-neutralisierenden Antikörper auf die Chondrozyten haben, ist bisher noch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Die Fixationssteifigkeit scheint die Heilung zu beeinflussen. Unter steifer Fixation war eine deutlich besser Osteotomieüberbrückung nach 14 ebenso wie nach 21 Tagen zu beobachten. Beide Gruppen mit steifem Fixateur zeigten eine ähnliche Osteotomieüberbrückung, allerdings mit mehr Knochen in der Gruppe, die Sklerostin-neutralisierende Antikörper bekam.

Schlussfolgernd kann gesagt werden, dass die Behandlung mit Sklerostin-neutralisierenden Antikörpern zu einer Steigerung der Knochenmenge führt, allerdings mit keiner eindeutigen Verbesserung der Heilung. Über die Wechselwirkung der Antikörper mit mechanischer Stimulation des Knochens lässt sich schwer eine Aussage treffen, da der semi-steife Fixateur vermutlich eine zu große Beweglichkeit zuließ, um einen positiven Einfluss auf die Heilung zu haben. Es sind daher weitere Studien nötig, die die mechanischen Bedingungen für einen positiven Effekt auf die Knochenheilung näher untersuchen.

7. Summary

A histological assessment of the effects of sclerostin and the mechanical strain on bone structure and fracture healing in mice

Risk of fracture and the possibility of developing a dysfunction in fracture healing increase with age and are heightened even further by osteoporosis. An aging society therefore leads to a higher financial burden for the health care system and to an intensified research interest in the fields of fracture healing and osteoporosis therapy. This dissertation examined the interaction of two different approaches to influence fracture healing. Sclerostin-neutralizing antibodies, which are currently being researched in clinical studies, lead to increased osteogenesis and bone mineral density (Agholme et al., 2011a; Padhi et al., 2011). Mechanical strain has a positive effect on bone mineral density (Chilibeck et al., 1995) as well, and some studies suggest that it also positively influences fracture healing (Claes et al., 1995; Kim et al., 2003). The goal of the project described in this dissertation was to understand the interaction between mechanical stimulation and sclerostin-neutralizing antibodies regarding fracture healing. Osteotomy was used on the left femur of 120 mice that was stabilized using an external fixation of various degrees of flexibility (axial stiffnesses of a) 18,18 N/mm and b) 1,89 N/mm, respectively). Half of the animals were injected with anti-sclerostin antibodies twice a week. The remaining animals were used as placebo group. After a period of seven, fourteen, and twenty-one days, the animals were euthanized and their bones were histologically and immune-histologically examined.

As observed in previous studies (Cui et al., 2013; Jawad et al., 2013), the injection of anti-sclerostin antibodies led to increased osteogenesis. However, using semirigid fixation, increased osteogenesis was delayed. Over the 3 weeks experimental period, an increase in bone volume could be observed in both groups. In contrast, the placebo group with rigid fixation exhibited remodeling with decreasing bone volume after 14 days. From these results the question arises to what extent an adequate remodeling with continuously administered anti-sclerostin antibodies is possible and what the consequences are for treating poorly healing fractures.

Both groups with semirigid fixation also showed a strongly increased production of cartilage in the second week. This suggests that the fracture was not sufficiently stabilized by the semirigid fixator. Increased flexibility of a fracture gap leads to decreased vascularization and as a result to an increased production of cartilaginous callus (Mark und Nilsson, 2004; Lienau et al., 2005). Furthermore on day 14, as well as day 21, both groups with semirigid fixation showed a worse fracture gap bridging than the groups with rigid fixation. It can therefore be assumed that the semirigid fixator used in this study is too flexible to positively influence fracture healing. However, it should be noticed that when using semirigid fixation, administering anti-sclerostin antibodies in the third week resulted in a strong decrease of cartilaginous volume. It still needs to be studied how sclerostin and therefore also sclerostin-neutralizing antibodies affect chondrocytes.

Fixation stiffness seems to influence fracture healing. Using rigid fixation, a better fracture gap bridging after fourteen, as well as twenty-one days, could be observed. Similar fracture bridging could be observed in both groups with rigid fixation. However, the group receiving anti-sclerostin antibodies produced more bone.

In summary, it can be said that a treatment with sclerostin-neutralizing antibodies leads to an increase in bone volume. However, a better healing cannot explicitly be observed. Regarding the interaction between anti-sclerostin antibodies and mechanical stimulation, it is difficult to draw a conclusion as the semistiff fixator most likely allowed for too much flexibility to positively influence the healing process. Further studies are necessary that examine how mechanical stimuli could have a positive effect on fracture healing.

Literatur

- Adler, C.-P. (2005). *Knochenkrankheiten: Diagnostik makroskopischer, histologischer und radiologischer Strukturveränderungen des Skeletts*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 3. Edition.
- Ager III, J. W., G. Balooch, and R. Ritchie (2006). "Fracture, aging, and disease in bone". *Journal of materials research* **21**.
- Agholme, F. und P. Aspenberg (2011). "Wnt signaling and orthopedics, an overview". *Acta orthopaedica* **82**(2), S. 125–30.
- Agholme, F., H. Isaksson, S. Kuhstoss, und P. Aspenberg (2011a). "The effects of Dickkopf-1 antibody on metaphyseal bone and implant fixation under different loading conditions". *Bone* **48**(5), S. 988–96.
- Agholme, F., H. Isaksson, X. Li, H. Z. Ke, und P. Aspenberg (2011b). "Anti-sclerostin antibody and mechanical loading appear to influence metaphyseal bone independently in rats". *Acta orthopaedica* **82**(5), S. 628–32.
- Agholme, F., X. Li, H. Isaksson, H. Z. Ke, und P. Aspenberg (2010). "Sclerostin antibody treatment enhances metaphyseal bone healing in rats". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **25**(11), S. 2412–8.
- Alexander, K. A., M. K. Chang, E. R. Maylin, T. Kohler, R. Müller, A. C. Wu, N. Van Rooijen, M. J. Sweet, D. A. Hume, L. J. Raggatt, und A. R. Pettit (2011). "Osteal macrophages promote in vivo intramembranous bone healing in a mouse tibial injury model". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **26**(7), S. 1517–32.
- Andreassen, T. T., C. Ejersted, und H. Oxlund (1999). "Intermittent parathyroid hormone (1-34) treatment increases callus formation and mechanical strength of healing rat fractures". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **14**(6), S. 960–8.
- Andreassen, T. T., C. Fledelius, C. Ejersted, und H. Oxlund (2001). "Increases in callus formation and mechanical strength of healing fractures in old rats treated with parathyroid hormone". *Acta orthopaedica Scandinavica* **72**(3), S. 304–7.
- Augat, P., J. Burger, S. Schorlemmer, T. Henke, M. Peraus, und L. Claes (2003). "Shear movement at the fracture site delays healing in a diaphyseal fracture model". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **21**(6), S. 1011–7.
- Augat, P., U. Simon, A. Liedert, und L. Claes (2005). "Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone". *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* **16 Suppl 2**, S. S36–43.
- Balemans, W., E. Cleiren, U. Siebers, J. Horst, und W. Van Hul (2005). "A generalized skeletal hyperostosis in two siblings caused by a novel mutation in the SOST gene". *Bone* **36**(6), S. 943–7.
- Balemans, W., M. Ebeling, N. Patel, E. Van Hul, P. Olson, M. Dioszegi, C. Lacza, W. Wuyts, J. Van Den Ende, P. Willems, A. F. Paes-Alves, S. Hill, M. Bueno, F. J. Ramos, P. Tacconi, F. G. Dikkers, C. Stratakis, K. Lindpaintner, B. Vickery, D. Foernzler, und W. Van Hul (2001). "Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST)". *Human molecular genetics* **10**(5), S. 537–43.
- Barak, M. M., D. E. Lieberman, und J.-J. Hublin (2011). "A Wolff in sheep's clothing: trabecular bone adaptation in response to changes in joint loading orientation". *Bone* **49**(6), S. 1141–51.
- Barckman, J., J. Baas, M. Sørensen, J. E. Bechtold, und K. Soballe (2013). "Periosteal augmentation of allograft bone and its effect on implant fixation - an experimental study on 12 dogs". *The open orthopaedics journal* **7**, S. 18–24.
- Baron, R. und G. Rawadi (2007). "Targeting the Wnt/beta-catenin pathway to regulate bone formation in the adult skeleton". *Endocrinology* **148**(6), S. 2635–43.
- Barrios, C., L. A. Broström, A. Stark, und G. Walheim (1993). "Healing complications after internal fixation of trochanteric hip fractures: the prognostic value of osteoporosis". *Journal of orthopaedic trauma* **7**(5), S. 438–42.
- Bartl, R. (2010). *Osteoporose: Prävention, Diagnostik, Therapie*. Georg Thieme Verlag, 4. Edition.
- Beck, T. (2003). "Der Knochen - lebendig und stoffwechsellaktiv". *Pharmazeutische Zeitung* **148**, S. 30–39.
- Beighton, P., A. Barnard, H. Hamersma, und A. van der Wouden (1984). "The syndromic status of sclerosteosis and van Buchem disease". *Clinical genetics* **25**(2), S. 175–81.
- Bilezikian, J. P., L. G. Raisz, und T. J. Martin (2008). *Principles of Bone Biology, Volume I*. Elsevier Inc., 3. Edition.
- Blair, H. C. und N. A. Athanasou (2004). "Recent advances in osteoclast biology and pathological bone resorption". *Histology and histopathology* **19**(1), S. 189–99.
- Bone, H. G., M. R. McClung, C. Roux, R. R. Recker, J. A. Eisman, N. Verbruggen, C. M. Hustad, C. DaSilva, A. C. Santora, und B. A. Ince (2010). "Odanacatib, a cathepsin-K inhibitor for osteoporosis: a two-year study in postmenopausal women with low bone density". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **25**(5), S. 937–47.
- Bonewald, L. F. (2011). "The amazing osteocyte". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **26**(2), S. 229–38.
- Bonewald, L. F. und M. L. Johnson (2008). "Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling". *Bone* **42**(4), S. 606–615.
- Bouxein, M. L. (2003). "Bone quality: where do we go from here?". *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* **14 Suppl 5**, S. S118–27.
- Boyce, B. F. und L. Xing (2007). "Biology of RANK, RANKL, and osteoprotegerin". *Arthritis research & therapy* **9 Suppl 1**, S. S1.

- Brunkow, M. E., J. C. Gardner, J. Van Ness, B. W. Paeper, B. R. Kovacevich, S. Proll, J. E. Skonier, L. Zhao, P. J. Sabo, Y. Fu, R. S. Alisch, L. Gillett, T. Colbert, P. Tacconi, D. Galas, H. Hamersma, P. Beighton, und J. Mulligan (2001). "Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein". *American journal of human genetics* **68**(3), S. 577–89.
- Bucay, N., I. Sarosi, C. R. Dunstan, S. Morony, J. Tarpley, C. Capparelli, S. Scully, H. L. Tan, W. Xu, D. L. Lacey, W. J. Boyle, und W. S. Simonet (1998). "Osteoprotegerin-Deficient Mice Develop Early Onset Osteoporosis and Arterial Calcification". *Genes & development* **12**(9), S. 1260–8.
- Burger, E. H. und J. Klein-Nulend (1999). "Mechanotransduction in bone—role of the lacuno-canalicular network". *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **13** Suppl, S. S101–12.
- Calmar, E. A., R. J. V. E. J. J. I. F. N. M. T. J. O. C. B. J. O. S. E. S. S. J. C. G. B. J. M. R. F. T. L. D. O. J. O. J. O. M. R. R. S. u. W. H. (2002). "The Anatomy and Physiology of Bone Fracture and Healing". *Clinical Pediatric Emergency Medicine* **3**(2), S. 85–93.
- Carter, D. R., G. S. Beaupré, N. J. Giori, und J. A. Helms (1998). "Mechanobiology of skeletal regeneration". *Clinical orthopaedics and related research* **355**(Supplement), S. S41–55.
- Center, J. R., T. V. Nguyen, D. Schneider, P. N. Sambrook, und J. A. Eisman (1999). "Mortality after all major types of osteoporotic fracture in men and women: an observational study". *Lancet* **353**(9156), S. 878–82.
- Chan, B. Y., E. S. Fuller, A. K. Russell, S. M. Smith, M. M. Smith, M. T. Jackson, M. A. Cake, R. A. Read, J. F. Bateman, P. N. Sambrook, und C. B. Little (2011). "Increased chondrocyte sclerostin may protect against cartilage degradation in osteoarthritis". *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **19**(7), S. 874–85.
- Chan, K. S. und D. P. Nicolella (2012). "Micromechanical Modeling of R-Curve Behaviors in Human Cortical Bone". *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* **16**, S. 136–152.
- Chao, E. Y., H. T. Aro, D. G. Lewallen, und P. J. Kelly (1989). "The effect of rigidity on fracture healing in external fixation". *Clinical orthopaedics and related research* **241**, S. 24–35.
- Chao, E. Y., N. Inoue, J. J. Elias, und H. Aro (1998). "Enhancement of fracture healing by mechanical and surgical intervention". *Clinical orthopaedics and related research* **355**(Supplement), S. S163–78.
- Chapurlat, R. D. (2014). "Odanacatib for the treatment of postmenopausal osteoporosis". *Expert opinion on pharmacotherapy* **15**(1), S. 97–102.
- Chen, Y., H. C. Whetstone, A. C. Lin, P. Nadesan, Q. Wei, R. Poon, und B. A. Alman (2007). "Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing". *PLoS medicine* **4**(7), S. e249.
- Cheung, K. M. C., K. Kaluarachi, G. Andrew, W. Lu, D. Chan, und K. S. E. Cheah (2003). "An externally fixed femoral fracture model for mice". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **21**(4), S. 685–90.
- Chhabra, A., D. Zijerdi, J. Zhang, A. Kline, G. Balian, und S. Hurwitz (2005). "BMP-14 Deficiency Inhibits Long Bone Fracture Healing". *Journal of Orthopaedic Trauma* **19**(9), S. 629–634.
- Chilibeck, P. D., D. G. Sale, und C. E. Webber (1995). "Exercise and bone mineral density". *Sports medicine (Auckland, N.Z.)* **19**(2), S. 103–22.
- Cho, T.-J., L. C. Gerstenfeld, und T. A. Einhorn (2002). "Differential temporal expression of members of the transforming growth factor beta superfamily during murine fracture healing". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **17**(3), S. 513–20.
- Claes, L., P. Augat, G. Suger, und H. J. Wilke (1997). "Influence of size and stability of the osteotomy gap on the success of fracture healing". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **15**(4), S. 577–84.
- Claes, L., K. Eckert-Hübner, und P. Augat (2002). "The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **20**(5), S. 1099–105.
- Claes, L., N. Maurer-Klein, T. Henke, H. Gerngross, M. Melnyk, und P. Augat (2006). "Moderate soft tissue trauma delays new bone formation only in the early phase of fracture healing". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **24**(6), S. 1178–85.
- Claes, L., S. Recknagel, und A. Ignatius (2012). "Fracture healing under healthy and inflammatory conditions". *Nature reviews. Rheumatology* **8**(3), S. 133–43.
- Claes, L., H.-J. Wilke, P. Augat, S. Rübenacker, und K. J. Margevicius (1995). "Effect of dynamization on gap healing of diaphyseal fractures under external fixation". *Clinical biomechanics* **10**(5), S. 227–234.
- Claes, L. E. und C. a. Heigele (1999). "Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing". *Journal of biomechanics* **32**(3), S. 255–66.
- Colnot, C. (2009). "Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **24**(2), S. 274–82.
- Conn, P. M. (2013). *Animal models for the study of human disease*. Elsevier Science Publishing Co Inc, 1. Edition.
- Connolly, C. K., G. Li, J. R. Bunn, M. Mushipe, G. R. Dickson, und D. R. Marsh (2003). "A reliable externally fixated murine femoral fracture model that accounts for variation in movement between animals". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **21**(5), S. 843–9.

- Cornell, C. N. (2003). "Internal fracture fixation in patients with osteoporosis". *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* **11**(2), S. 109–19.
- Cramer, T., E. Schipani, R. S. Johnson, B. Swoboda, und D. Pfander (2004). "Expression of VEGF isoforms by epiphyseal chondrocytes during low-oxygen tension is HIF-1 alpha dependent". *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **12**(6), S. 433–9.
- Cui, L., H. Cheng, C. Song, C. Li, W. S. Simonet, H. Z. Ke, und G. Li (2013). "Time-dependent effects of sclerostin antibody on a mouse fracture healing model". *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* **13**(2), S. 178–84.
- Cummings, S. R., D. M. Black, und S. M. Rubin (1989). "Lifetime risks of hip, Colles', or vertebral fracture and coronary heart disease among white postmenopausal women". *Archives of internal medicine* **149**(11), S. 2445–8.
- Cummings, S. R., J. San Martin, M. R. McClung, E. S. Siris, R. Eastell, I. R. Reid, P. Delmas, H. B. Zoog, M. Austin, A. Wang, S. Kutilek, S. Adami, J. Zanchetta, C. Libanati, S. Siddhanti, und C. Christiansen (2009). "Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal women with osteoporosis". *The New England journal of medicine* **361**(8), S. 756–65.
- Currey, J. D. (2002). *Bones: Structure and Mechanics*. Princeton University Press.
- Das, S. und J. C. Crockett (2013). "Osteoporosis - a current view of pharmacological prevention and treatment". *Drug design, development and therapy* **7**, S. 435–48.
- Day, T. F., X. Guo, L. Garrett-Beal, und Y. Yang (2005). "Wnt/beta-catenin signaling in mesenchymal progenitors controls osteoblast and chondrocyte differentiation during vertebrate skeletogenesis". *Developmental cell* **8**(5), S. 739–50.
- Demontiero, O., C. Vidal, und G. Duque (2012). "Aging and bone loss: new insights for the clinician". *Therapeutic advances in musculoskeletal disease* **4**(2), S. 61–76.
- Dimitriou, R., E. Jones, D. McGonagle, und P. V. Giannoudis (2011). "Bone regeneration: current concepts and future directions". *BMC medicine* **9**, S. 66.
- Downs, R. W., N. H. Bell, M. P. Ettinger, B. W. Walsh, und M. J. Favus (2000). "Comparison of Alendronate and Intranasal Calcitonin for Treatment of Osteoporosis in Postmenopausal Women". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **85**(5).
- Durst, J. und J.-R. Allenberg (1997). *Traumatologische Praxis in einem Band; Standards in Diagnostik und Therapie für alle Fachgebiete*. Schattauer Verlag.
- Dwek, J. R. (2010). "The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence?". *Skeletal radiology* **39**(4), S. 319–23.
- Ebnezar (2003). *Essentials of Orthopaedics for Physiotherapist*. Jaypee Brothers Publishers.
- Egermann, M., E. Schneider, C. H. Evans, und A. W. Baltzer (2005). "The potential of gene therapy for fracture healing in osteoporosis". *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* **16 Suppl 2**, S. S120–8.
- Einhorn, T. A. (1998). "The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing". *Clinical orthopaedics and related research* (355), S. 7–21.
- Erben, R. G. (2015). "Knochen und Calciumhomöostase". In: W. von Engelhardt (Hrsg.): *Physiologie der Haustiere*. Georg Thieme Verlag, 4. Edition, Kapitel 27, S. 653–660.
- Eriksen, E. F. (2010). "Cellular mechanisms of bone remodeling". *Reviews in endocrine & metabolic disorders* **11**(4), S. 219–27.
- European Medicines Agency (2012). "Questions and answers on the review of calcitonin containing medicines - Outcome of a procedure under Article 31 of Directive 2001/83/EC". Technical Report July, European Medicines Agency.
- Faienza, M., A. Ventura, F. Marzano, und L. Cavallo (2013). "Postmenopausal Osteoporosis: The Role of Immune System Cells". *Clinical and Developmental Immunology* **2013**(Article ID 575936), S. 6.
- Fan, W., R. Crawford, und Y. Xiao (2008). "Structural and cellular differences between metaphyseal and diaphyseal periosteum in different aged rats". *Bone* **42**(1), S. 81–9.
- Franz-Ondendaal, T. A., B. K. Hall, und P. E. Witten (2006). "Buried alive: how osteoblasts become osteocytes". *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists* **235**(1), S. 176–90.
- Fritton, S. und S. Weinbaum (2009). "Fluid and Solute Transport in Bone: Flow-Induced Mechanotransduction". *Annual review of fluid mechanics* (41), S. 347–374.
- Frost, H. M. (1987). "The mechanostat: a proposed pathogenic mechanism of osteoporosis and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents". *Bone and mineral* **2**(2), S. 73–85.
- Frost, H. M. (1989). "The Biology of Fracture Healing, Part I". *Clinical orthopaedics and related research* (248), S. 283–93.
- Fulciniti, M., P. Tassone, T. Hideshima, S. Vallet, P. Nanjappa, S. A. Ettenberg, Z. Shen, N. Patel, Y.-T. Tai, D. Chauhan, C. Mitsiades, R. Prabhala, N. Raje, K. C. Anderson, D. R. Stover, und N. C. Munshi (2009). "Anti-DKK1 mAb (BHQ880) as a potential therapeutic agent for multiple myeloma". *Blood* **114**(2), S. 371–9.
- Garcia, P., T. Histing, J. H. Holstein, M. Klein, M. W. Laschke, R. Matthys, A. Ignatius, B. Wildemann, J. Lienau, A. Peters, B. Willie, G. Duda, L. Claes, T. Pohlemann, und M. D. Menger (2013). "Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review". *European cells & materials* **26**, S. 1–12; discussion 12–4.
- Garcia, P., J. H. Holstein, T. Histing, M. Burkhardt, U. Culemann, A. Pizanis, R. J. Wirbel, T. Pohlemann, und M. D. Menger (2008). "A new technique for internal fixation of femoral fractures in mice: impact of stability on fracture healing". *Journal of biomechanics* **41**(8), S. 1689–96.

- Gardner, M. J., S. M. Putnam, A. Wong, P. N. Streubel, A. Kotiya, und M. J. Silva (2011). "Differential fracture healing resulting from fixation stiffness variability: a mouse model". *Journal of orthopaedic science: official journal of the Japanese Orthopaedic Association* **16**(3), S. 298–303.
- Gardner, M. J., B. F. Ricciardi, T. M. Wright, M. P. Bostrom, und M. C. H. van der Meulen (2008). "Pause insertions during cyclic in vivo loading affect bone healing". *Clinical orthopaedics and related research* **466**(5), S. 1232–8.
- Gardner, M. J., M. C. H. Van der Meulen, D. Demetrakopoulos, T. M. Wright, E. R. Myers, und M. P. Bostrom (2006). "In Vivo Cyclic Axial Compression Affects Bone Healing in the Mouse Tibia". *Journal of Orthopaedic Research* **24**(8), S. 1679–86.
- Geris, L., A. Gerisch, J. V. Sloten, R. Weiner, und H. Van Oosterwyck (2008). "Angiogenesis in bone fracture healing: a bioregulatory model". *Journal of theoretical biology* **251**(1), S. 137–58.
- Gerstenfeld, L. C., T. J. Wronski, J. O. Hollinger, und T. a. Einhorn (2005). "Application of histomorphometric methods to the study of bone repair". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **20**(10), S. 1715–22.
- Geusens, P. (2009). "Emerging treatments for postmenopausal osteoporosis - focus on denosumab". *Clinical interventions in aging* **4**, S. 241–50.
- Giannoudis, P., C. Tzioupis, T. Almalki, und R. Buckley (2007). "Fracture healing in osteoporotic fractures: is it really different? A basic science perspective". *Injury* **38 Suppl 1**(2007), S. S90–9.
- Giles, R. H., J. H. van Es, und H. Clevers (2003). "Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer". *Biochimica et biophysica acta* **1653**(1), S. 1–24.
- Glantschnig, H., R. Hampton, P. Lu, J. Z. Zhao, S. Vitelli, L. Huang, P. Haytko, T. Cusick, C. Ireland, S. W. Jarantow, R. Ernst, N. Wei, P. Nantermet, K. R. Scott, J. E. Fisher, F. Talamo, L. Orsatti, A. a. Reszka, P. Sandhu, D. Kimmel, O. Flores, W. Strohl, Z. An, und F. Wang (2010). "Generation and selection of novel fully human monoclonal antibodies that neutralize Dickkopf-1 (DKK1) inhibitory function in vitro and increase bone mass in vivo". *The Journal of biological chemistry* **285**(51), S. 40135–47.
- Glantschnig, H., K. Scott, R. Hampton, N. Wei, und P. McCracken (2011). "A Rate-Limiting Role for Dickkopf-1 in Bone Formation and the Remediation of Bone Loss in Mouse and Primate Models of Postmenopausal Osteoporosis by an Experimental Therapeutic Antibody". *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **338**(2), S. 568–578.
- Glass, D. A., P. Bialek, J. D. Ahn, M. Starbuck, M. S. Patel, H. Clevers, M. M. Taketo, F. Long, A. P. McMahon, R. A. Lang, und G. Karsenty (2005). "Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation". *Developmental cell* **8**(5), S. 751–64.
- Goldhahn, J., N. Suhm, S. Goldhahn, M. Blauth, und B. Hanson (2008). "Influence of osteoporosis on fracture fixation—a systematic literature review". *Osteoporosis international* **19**(6), S. 761–72.
- Goodship, A. und J. Kenwright (1985). "The Influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures". *The Journal of bone and joint surgery. British volume* **67**(4), S. 650–655.
- Goodship, A. E., J. L. Cunningham, und J. Kenwright (1998). "Strain rate and timing of stimulation in mechanical modulation of fracture healing". *Clinical orthopaedics and related research* **355**, S. S105–15.
- Goodship, A. E., P. C. Walker, D. McNally, T. Chambers, und J. R. Green (1994). "Use of a bisphosphonate (pamidronate) to modulate fracture repair in ovine bone". *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **5 Suppl 7**, S. S53–5.
- Govender, S., C. Csimma, H. K. Genant, A. Valentin-Opran, Y. Amit, R. Arbel, H. Aro, D. Atar, M. Bishay, M. G. Börner, P. Chiron, P. Choong, J. Cinats, B. Courtenay, R. Feibel, B. Geulette, C. Gravel, N. Haas, M. Raschke, E. Hammacher, D. van der Velde, P. Hardy, M. Holt, C. Josten, R. L. Ketterl, B. Lindeque, G. Lob, H. Mathevon, G. McCoy, D. Marsh, R. Miller, E. Munting, S. Oevre, L. Nordsletten, A. Patel, A. Pohl, W. Rennie, P. Reynders, P. M. Rommens, J. Rondia, W. C. Rossouw, P. J. Daneel, S. Ruff, A. Rüter, S. Santavirta, T. A. Schildhauer, C. Gekle, R. Schnettler, D. Segal, H. Seiler, R. B. Snowdowne, J. Stapert, G. Taglang, R. Verdonk, L. Vogels, A. Weckbach, A. Wentzensen, und T. Wisniewski (2002). "Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients". *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **84-A**(12), S. 2123–34.
- Granero-Moltó, F., J. A. Weis, M. I. Miga, B. Landis, T. J. Myers, L. O'Rear, L. Longobardi, E. D. Jansen, D. P. Mortlock, und A. Spagnoli (2009). "Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing". *Stem cells (Dayton, Ohio)* **27**(8), S. 1887–98.
- Greco, T. L., S. Takada, M. M. Newhouse, J. A. McMahon, A. P. McMahon, und S. A. Camper (1996). "Analysis of the vestigial tail mutation demonstrates that Wnt-3a gene dosage regulates mouse axial development". *Genes & development* **10**(3), S. 313–24.
- Gröngröft, I., P. Heil, R. Matthys, P. Lezuo, A. Tami, S. Perren, P. Montavon, und K. Ito (2009). "Fixation compliance in a mouse osteotomy model induces two different processes of bone healing but does not lead to delayed union". *Journal of biomechanics* **42**(13), S. 2089–96.
- Gullberg, B., O. Johnell, und J. A. Kanis (1997). "World-wide projections for hip fracture". *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* **7**(5), S. 407–13.
- Hankenson, K. D., M. Dishowitz, C. Gray, und M. Schenker (2011). "Angiogenesis in bone regeneration". *Injury* **42**(6), S. 556–61.

- Hansen, H. G. (1967). "Sklerosteose". In: H. Opitz und F. Schmid (Hrsg.): *Handbuch der Kinderheilkunde*. Springer-Verlag Berlin, 6. Edition, S. 351–355.
- Hartmann, C. (2006). "A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis". *Trends in cell biology* **16**(3), S. 151–8.
- Harwood, P. J., J. B. Newman, und A. L. Michael (2010). "(ii) An update on fracture healing and non-union". *Orthopaedics and Trauma* **24**(1), S. 9–23.
- Hausman, M. R., M. B. Schaffler, und R. J. Majeska (2001). "Prevention of fracture healing in rats by an inhibitor of angiogenesis". *Bone* **29**(6), S. 560–4.
- Hecht, S. (2012). *Röntgendiagnostik in der Kleintierpraxis*. Schattauer Verlag, 2. Edition.
- Hernlund, E., A. Svedbom, M. Ivergard, J. Compston, C. Cooper, J. Stenmark, E. V. McCloskey, B. Jönsson, und J. A. Kanis (2013). "Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA)". *Archives of osteoporosis* **8**(1-2), S. 136.
- Hiltunen, A., E. Vuorio, und H. T. Aro (1993). "A standardized experimental fracture in the mouse tibia". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **11**(2), S. 305–12.
- Hirsch, I. S. (1929). "Generalized Osteitis Fibrosa". *Radiology* **12**(6), S. 505–516.
- Histing, T., P. Garcia, J. H. Holstein, M. Klein, R. Matthys, R. Nuetzi, R. Steck, M. W. Laschke, T. Wehner, R. Bindl, S. Recknagel, E. K. Stuermer, B. Vollmar, B. Wildemann, J. Lienau, B. Willie, A. Peters, A. Ignatius, T. Pohlemann, L. Claes, und M. D. Menger (2011). "Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting". *Bone* **49**(4), S. 591–9.
- Histing, T., J. H. Holstein, P. Garcia, R. Matthys, A. Kristen, L. Claes, M. D. Menger, und T. Pohlemann (2009). "Ex vivo analysis of rotational stiffness of different osteosynthesis techniques in mouse femur fracture". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **27**(9), S. 1152–6.
- Hoang-Kim, A., L. Gelsomini, D. Luciani, A. Moroni, und S. Giannini (2009). "Fracture healing and drug therapies in osteoporosis". *Clinical cases in mineral and bone metabolism: the official journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases* **6**(2), S. 136–43.
- Holstein, J. H., P. Garcia, T. Histing, A. Kristen, C. Scheuer, M. D. Menger, und T. Pohlemann (2009). "Advances in the establishment of defined mouse models for the study of fracture healing and bone regeneration". *Journal of orthopaedic trauma* **23**(5 Suppl), S. S31–8.
- Hoppenfeld, S. und V. L. Murthy (2000). *Treatment and rehabilitation of fractures*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Hörner, K., K. Loeffler, und M. Holtzmann (1997). "Comparison of the histologic structure of the compact bone of the long hollow bones of mouse, hamster, rat, guinea pig, rabbit, cat, and dog during development". *Anatomia, histologia, embryologia* **26**(4), S. 289–95.
- Huiskes, R., E. Y. Chao, und T. E. Crippen (1985). "Parametric analyses of pin-bone stresses in external fracture fixation devices". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **3**(3), S. 341–9.
- Itzstein, C., F. P. Coxon, und M. J. Rogers (2011). "The regulation of osteoclast function and bone resorption by small GTPases". *Small GTPases* **2**(3), S. 117–130.
- Jagodzinski, M. und C. Krettek (2007). "Effect of mechanical stability on fracture healing—an update". *Injury* **38** Suppl 1, S. S3–10.
- Jawad, M. U., K. E. Fritton, T. Ma, P.-G. Ren, S. B. Goodman, H. Z. Ke, P. Babij, und M. C. Genovese (2013). "Effects of sclerostin antibody on healing of a non-critical size femoral bone defect". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **31**(1), S. 155–63.
- Jerosch, J., A. Bader, und G. Uhr (2002). *Knochen - Curasan-Taschenatlas spezial*. Georg Thieme Verlag.
- Jilka, R. L. (2013). "The relevance of mouse models for investigating age-related bone loss in humans". *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* **68**(10), S. 1209–17.
- Johannes, S. und M. L. Pretterklieber (2012). "Bewegungsapparat". In: F. Anderhuber, F. Pera, und J. Streicher (Hrsg.): *Anatomie des Menschen*. Walter de Gruyter, 19. Edition, Kapitel 4, S. 95–426.
- Johnson, M. L. und M. A. Kamel (2007). "The Wnt signaling pathway and bone metabolism". *Current opinion in rheumatology* **19**(4), S. 376–82.
- Johnson-Lynn, S. E., R. Francis, und A. McCaskie (2008). "(iv) Osteoporosis treatments and their effect on fracture healing". *Current Orthopaedics* **22**(5), S. 336–340.
- Jones, H. H., J. D. Priest, W. C. Hayes, C. C. Tichenor, und D. A. Nagel (1977). "Humeral hypertrophy in response to exercise". *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **59**(2), S. 204–8.
- Junqueira, L. C. U., J. Carneiro, und M. Gratzl (2004). *Histologie*. Springer Medizin Verlag, 6th Edition.
- Kakar, S., T. A. Einhorn, S. Vora, L. J. Miara, G. Hon, N. A. Wigner, D. Toben, K. A. Jacobsen, M. O. Al-Sebaei, M. Song, P. C. Trackman, E. F. Morgan, L. C. Gerstenfeld, und G. L. Barnes (2007). "Enhanced chondrogenesis and Wnt signaling in PTH-treated fractures". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **22**(12), S. 1903–12.
- Kalfas, I. H. (2001). "Principles of bone healing". *Neurosurgical focus* **10**(4), S. E1.
- Kamak, H., G. Kamak, und I. Yavuz (2012). "Clinical, radiographic, diagnostic and cephalometric features of pycnodysostosis in comparison with Turkish cephalometric norms: A case report". *European journal of dentistry* **6**(4), S. 454–9.

- Kanakaris, N. K., G. M. Calori, R. Verdonk, P. Burssens, P. De Biase, R. Capanna, L. B. Vangosa, P. Cherubino, F. Baldo, J. Ristiniemi, G. Kontakis, und P. V. Giannoudis (2008). "Application of BMP-7 to tibial non-unions: a 3-year multicenter experience". *Injury* **39 Suppl 2**, S. S83–90.
- Kanis, J. A., O. Johnell, A. Oden, I. Sembo, I. Redlund-Johnell, A. Dawson, C. De Laet, und B. Jonsson (2000). "Long-term risk of osteoporotic fracture in Malmö". *Osteoporosis international* **11**(8), S. 669–74.
- Kaspar, K., G. Matziolis, P. Strube, U. Sentürk, S. Dormann, H. J. Bail, und G. N. Duda (2008). "A new animal model for bone atrophic nonunion: fixation by external fixator". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **26**(12), S. 1649–55.
- Kaspar, K., H. Schell, D. Toben, G. Matziolis, und H. J. Bail (2007). "An easily reproducible and biomechanically standardized model to investigate bone healing in rats, using external fixation". *Biomedizinische Technik. Biomedical engineering* **52**(6), S. 383–90.
- Kasper, G., L. Mao, S. Geissler, A. Draycheva, J. Trippens, J. Kühnisch, M. Tschirschmann, K. Kaspar, C. Perka, G. N. Duda, und J. Klose (2009). "Insights into mesenchymal stem cell aging: involvement of antioxidant defense and actin cytoskeleton". *Stem cells (Dayton, Ohio)* **27**(6), S. 1288–97.
- Ke, H. Z., W. G. Richards, X. Li, und M. S. Ominsky (2012). "Sclerostin and Dickkopf-1 as therapeutic targets in bone diseases". *Endocrine reviews* **33**(5), S. 747–83.
- Kenwright, J. und A. E. Goodship (1989). "Controlled mechanical stimulation in the treatment of tibial fractures". *Clinical orthopaedics and related research* **241**, S. 36–47.
- Keramaris, N. C., G. M. Calori, V. S. Nikolaou, E. H. Schemitsch, und P. V. Giannoudis (2008). "Fracture vascularity and bone healing: a systematic review of the role of VEGF". *Injury* **39 Suppl 2**, S. S45–57.
- Kim, C. H., E. Takai, H. Zhou, D. von Stechow, R. Müller, D. W. Dempster, und X. E. Guo (2003). "Trabecular bone response to mechanical and parathyroid hormone stimulation: the role of mechanical microenvironment". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **18**(12), S. 2116–25.
- Kim, J. H., X. Liu, J. Wang, X. Chen, H. Zhang, S. H. Kim, J. Cui, R. Li, W. Zhang, Y. Kong, J. Zhang, W. Shui, J. Lamplot, M. R. Rogers, C. Zhao, N. Wang, P. Rajan, J. Tomal, J. Statz, N. Wu, H. H. Luu, R. C. Haydon, und T.-C. He (2013). "Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases". *Therapeutic advances in musculoskeletal disease* **5**(1), S. 13–31.
- Kim, S., M.-Y. Shin, K.-H. Son, H.-Y. Sohn, J.-H. Lim, J.-H. Lee, und I.-S. Kwun (2014). "Yam (*Dioscorea batatas*) Root and Bark Extracts Stimulate Osteoblast Mineralization by Increasing Ca and P Accumulation and Alkaline Phosphatase Activity". *Preventive nutrition and food science* **19**(3), S. 194–203.
- Klaushofer, K. und M. Peterlik (1994). "Pathophysiology of fracture healing". *Der Radiologe* **34**(12), S. 709–14.
- Klein-Nulend, J., R. G. Bacabac, und A. D. Bakker (2012). "Mechanical loading and how it affects bone cells: the role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton". *European cells & materials* **24**, S. 278–91.
- Komatsu, D. E. und M. Hadjiargyrou (2004). "Activation of the transcription factor HIF-1 and its target genes, VEGF, HO-1, iNOS, during fracture repair". *Bone* **34**(4), S. 680–8.
- Komori, T. (2013). "Functions of the osteocyte network in the regulation of bone mass". *Cell and tissue research* **352**(2), S. 191–8.
- König, H. E. und H.-G. Liebich (2014). *Anatomie der Haussäugetiere: Lehrbuch und Farbatlas für Studium und Praxis*. Schattauer Verlag, 6 Edition.
- Kubo, T., T. Shiga, J. Hashimoto, M. Yoshioka, H. Honjo, M. Urabe, I. Kitajima, I. Semba, und Y. Hirasawa (1999). "Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet". *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **68**(5-6), S. 197–202.
- Lacroix, D. und P. J. Prendergast (2002). "A mechano-regulation model for tissue differentiation during fracture healing: analysis of gap size and loading". *Journal of biomechanics* **35**(9), S. 1163–71.
- Langdahl, B. L. und T. Harslof (2011). "Medical treatment of osteoporotic vertebral fractures". *Therapeutic advances in musculoskeletal disease* **3**(1), S. 17–29.
- Le, A. X., T. Miclau, D. Hu, und J. A. Helms (2001). "Molecular aspects of healing in stabilized and non-stabilized fractures". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **19**(1), S. 78–84.
- Leblanc, A. D., V. S. Schneider, H. J. Evans, D. A. Engelbretson, und J. M. Krebs (1990). "Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bed rest". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **5**(8), S. 843–50.
- Leder, B. Z., J. N. Tsai, A. V. Uihlein, S.-A. M. Burnett-Bowie, Y. Zhu, K. Foley, H. Lee, und R. N. Neer (2014). "Two years of denosumab and teriparatide administration in postmenopausal women with osteoporosis (The DATA Extension Study): a randomized controlled trial". *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **99**(5), S. 1694–1700.
- Lehmann, W., C. M. Edgar, K. Wang, T.-J. Cho, G. L. Barnes, S. Kakar, D. T. Graves, J. M. Rueger, L. C. Gerstenfeld, und T. A. Einhorn (2005). "Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing". *Bone* **36**(2), S. 300–10.
- Lewiecki, E. M. (2014). "Role of sclerostin in bone and cartilage and its potential as a therapeutic target in bone diseases". *Therapeutic advances in musculoskeletal disease* **6**(2), S. 48–57.
- Li, C., M. S. Ominsky, H.-L. Tan, M. Barrero, Q.-T. Niu, F. J. Asuncion, E. Lee, M. Liu, W. S. Simonet, C. Paszty, und H. Z. Ke (2011). "Increased callus mass and enhanced strength during fracture healing in mice lacking the sclerostin gene". *Bone* **49**(6), S. 1178–85.

- Li, X., M. S. Ominsky, Q.-T. Niu, N. Sun, B. Daugherty, D. D'Agostin, C. Kurahara, Y. Gao, J. Cao, J. Gong, F. Asuncion, M. Barrero, K. Warmington, D. Dwyer, M. Stolina, S. Morony, I. Sarosi, P. J. Kostenuik, D. L. Lacey, W. S. Simonet, H. Z. Ke, and C. Paszty (2008). "Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **23**(6), S. 860–9.
- Li, X., M. S. Ominsky, and K. S. Warmington (2009). "Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis". *Journal of bone and mineral research* **24**(4), S. 578–588.
- Li, X., Y. Zhang, H. Kang, W. Liu, P. Liu, J. Zhang, S. E. Harris, and D. Wu (2005). "Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling". *The Journal of biological chemistry* **280**(20), S. 19883–7.
- Liebermann, J. R. and G. E. Friedlaender (2005). *Bone Regeneration and Repair: Biology and Clinical Applications*. Humana Press Inc.
- Liebich, H.-G. (2010). "Binde- und Stützgewebe (Textus connectivus)". In: H.-G. Liebich (Hrsg.): *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel*. Schattauer Verlag, 5. Edition, Kapitel 3, S. 67–96.
- Lienau, J., H. Schell, G. N. Duda, P. Seebeck, S. Muchow, and H. J. Bail (2005). "Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **23**(3), S. 639–45.
- Lill, C. A., J. Hessel, U. Schlegel, C. Eckhardt, J. Goldhahn, and E. Schneider (2003). "Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **21**(5), S. 836–42.
- Lin, C., X. Jiang, Z. Dai, X. Guo, T. Weng, J. Wang, Y. Li, G. Feng, X. Gao, and L. He (2009). "Sclerostin Mediates Bone Response to Mechanical Unloading Through Antagonizing Wnt/b-Catenin Signaling". *Journal of bone and mineral research* **24**(10).
- Lindholm, R., S. Lindholm, P. Liukko, J. Paasimäki, S. Isokääntä, R. Rossi, E. Autio, and E. Tamminen (1969). "The mast cell as a component of callus in healing fractures". *The Journal of bone and joint surgery*. **51 B**.
- Lippuner, K. (2012). "The future of osteoporosis treatment - a research update". *Swiss medical weekly* **142**(July), S. w13624.
- Lissenberg-Thunnissen, S. N., D. J. J. de Gorter, C. F. M. Sier, and I. B. Schipper (2011). "Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing". *International orthopaedics* **35**(9), S. 1271–80.
- Logan, C. Y. and R. Nusse (2004). "The Wnt signaling pathway in development and disease". *Annual review of cell and developmental biology* **20**, S. 781–810.
- Loots, G. G., M. Kneissel, H. Keller, M. Baptist, J. Chang, N. M. Collette, D. Ovcharenko, I. Plajzer-Frick, and E. M. Rubin (2005). "Genomic deletion of a long-range bone enhancer misregulates sclerostin in Van Buchem disease". *Genome research* **15**(7), S. 928–35.
- Lu, C., E. Hansen, A. Sapozhnikova, D. Hu, T. Miclau, and R. S. Marcucio (2008). "Effect of age on vascularization during fracture repair". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **26**(10), S. 1384–9.
- Lu, C., T. Miclau, D. Hu, E. Hansen, K. Tsui, C. Puttlitz, and R. Marcucio (2005). "Cellular basis for age-related changes in fracture repair". *Journal of Orthopaedic Research* **23**(6), S. 1300–1307.
- Lüllmann-Rauch, R. (2012). *Histologie*. Georg Thieme Verlag, 4. Edition.
- Mark, H. and A. Nilsson (2004). "Effects of fracture fixation stability on ossification in healing fractures". *Clinical orthopaedics and related research* **419**, S. 245–250.
- Marsell, R. and T. A. Einhorn (2011). "The biology of fracture healing". *Injury* **42**(6), S. 551–5.
- Marti, R. K., F. P. Besselaar, and E. L. F. B. Raaymakers (2000). "Malunion". In: T. P. Rüedi und W. M. Murphy (Hrsg.): *AO principles of fracture management*. Georg Thieme Verlag, Kapitel 6.4, S. 779–795.
- Martin, T. J. (2014). "Bone biology and anabolic therapies for bone: current status and future prospects". *Journal of bone metabolism* **21**(1), S. 8–20.
- Matsushita, T. and T. Kurokawa (1998). "Comparison of cyclic compression, cyclic distraction and rigid fixation: Bone healing in rabbits". *Acta Orthopaedica* **69**(1), S. 95–98.
- McBride, S. and M. Silva (2012). "Adaptive and Injury Response of Bone to Mechanical Loading". *BoneKEy osteovision* S. 1–20.
- McClung, M. R., E. M. Lewiecki, S. B. Cohen, M. A. Bolognese, G. C. Woodson, and A. H. Moffett (2007). "Denosumab in postmenopausal women with low bone mineral density". *Current rheumatology reports* **9**(1), S. 48; discussion 48–9.
- McDonald, M. M., S. Dulai, C. Godfrey, N. Amanat, T. Szynda, and D. G. Little (2008). "Bolus or weekly zoledronic acid administration does not delay endochondral fracture repair but weekly dosing enhances delays in hard callus remodeling". *Bone* **43**(4), S. 653–62.
- McKee, M. D. (2000). "Aseptic Non-union". In: T. P. Rüedi und W. M. Murphy (Hrsg.): *AO principles of fracture management*. Georg Thieme Verlag, Kapitel 6.2, S. 749–763.
- McKibbin, B. (1978). "The Biology of Fracture Healing in Long Bones". *The Journal of bone and joint surgery. British volume* **60-B**, S. 150–162.
- Mehta, M., G. N. Duda, C. Perka, and P. Strube (2011). "Influence of gender and fixation stability on bone defect healing in middle-aged rats: a pilot study". *Clinical orthopaedics and related research* **469**(11), S. 3102–10.

- Mehta, M., P. Strube, A. Peters, C. Perka, D. Hutmacher, P. Fratzl, and G. N. Duda (2010). "Influences of age and mechanical stability on volume, microstructure, and mineralization of the fracture callus during bone healing: is osteoclast activity the key to age-related impaired healing?". *Bone* **47**(2), S. 219–28.
- Meier, C., O. Lamy, M.-A. Krieg, H.-U. Mellinshoff, M. Felder, S. Ferrari, and R. Rizzoli (2014). "The role of teriparatide in sequential and combination therapy of osteoporosis". *Swiss medical weekly* **144**, S. w13952.
- Melnyk, M., T. Henke, L. Claes, and P. Augat (2008). "Revascularisation during fracture healing with soft tissue injury". *Archives of orthopaedic and trauma surgery* **128**(10), S. 1159–65.
- Meyer, R. A., P. J. Tsahakis, D. F. Martin, D. M. Banks, M. E. Harrow, and G. M. Kiebzak (2001). "Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **19**(3), S. 428–35.
- Mirza, F. S., I. D. Padhi, L. G. Raisz, and J. A. Lorenzo (2010). "Serum sclerostin levels negatively correlate with parathyroid hormone levels and free estrogen index in postmenopausal women". *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **95**(4), S. 1991–7.
- Mödder, U. I., K. A. Hoey, S. Amin, L. K. McCreedy, S. J. Achenbach, B. L. Riggs, L. J. Melton, and S. Khosla (2011). "Relation of age, gender, and bone mass to circulating sclerostin levels in women and men". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **26**(2), S. 373–9.
- Morgan, E. F., R. E. Gleason, L. N. M. Hayward, P. L. Leong, and K. T. S. Palomares (2008). "Mechanotransduction and fracture repair". *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **90 Suppl 1**, S. 25–30.
- Morse, A., N. Y. C. Yu, L. Peacock, K. Mikulec, I. Kramer, M. Kneissel, M. M. McDonald, and D. G. Little (2015). "Endochondral fracture healing with external fixation in the Sost knockout mouse results in earlier fibrocartilage callus removal and increased bone volume fraction and strength". *Bone* **71**, S. 155–63.
- Morvan, F., K. Boulukos, P. Clément-Lacroix, S. Roman Roman, I. Suc-Royer, B. Vayssière, P. Ammann, P. Martin, S. Pinho, P. Pognonec, P. Mollat, C. Niehrs, R. Baron, and G. Rawadi (2006). "Deletion of a single allele of the Dkk1 gene leads to an increase in bone formation and bone mass". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **21**(6), S. 934–45.
- Moustafa, A., T. Sugiyama, L. K. Saxon, G. Zaman, A. Sunters, V. J. Armstrong, B. Javaheri, L. E. Lanyon, and J. S. Price (2009). "The mouse fibula as a suitable bone for the study of functional adaptation to mechanical loading". *Bone* **44**(5), S. 930–5.
- Mukhopadhyay, M., S. Shtrom, C. Rodriguez-Esteban, L. Chen, T. Tsukui, L. Gomer, D. W. Dorward, A. Glinka, A. Grinberg, S. P. Huang, C. Niehrs, J. C. Izpisua Belmonte, and H. Westphal (2001). "Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse". *Developmental cell* **1**(3), S. 423–34.
- Nakahara, H., S. P. Bruder, S. E. Haynesworth, J. J. Holecek, M. A. Baber, V. M. Goldberg, and A. I. Caplan (1990). "Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum". *Bone* **11**(3), S. 181–8.
- Nigg, B. M., B. R. MacIntosh, and J. Mester (2000). *Biomechanics and Biology of Movement*. Human Kinetics, 1. Edition.
- O'Driscoll, S. W., D. B. Saris, Y. Ito, and J. S. Fitzimmons (2001). "The chondrogenic potential of periosteum decreases with age". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **19**(1), S. 95–103.
- Öhman, C., M. Baleani, C. Pani, F. Taddei, M. Alberghini, M. Viceconti, and M. Manfrini (2011). "Compressive behaviour of child and adult cortical bone". *Bone* **49**(4), S. 769–76.
- Ominsky, M. S., C. Li, X. Li, H. L. Tan, E. Lee, M. Barrero, F. J. Asuncion, D. Dwyer, C.-Y. Han, F. Vlasseros, R. Samadfam, J. Jollette, S. Y. Smith, M. Stolina, D. L. Lacey, W. S. Simonet, C. Paszty, G. Li, and H. Z. Ke (2011). "Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody enhances bone healing and improves bone density and strength of nonfractured bones". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **26**(5), S. 1012–21.
- Ominsky, M. S., Q.-T. Niu, C. Li, X. Li, and H. Z. Ke (2014). "Tissue-level mechanisms responsible for the increase in bone formation and bone volume by sclerostin antibody". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **29**(6), S. 1424–30.
- Overman, R. A., M. Borse, and M. L. Gourlay (2013). "Salmon Calcitonin Use and Associated Cancer Risk". *The Annals of pharmacotherapy* **47**(12), S. 1675–84.
- Padhi, D., M. Allison, A. J. Kivitz, M. J. Gutierrez, B. Stouch, C. Wang, and G. Jang (2014). "Multiple doses of sclerostin antibody romosozumab in healthy men and postmenopausal women with low bone mass: A randomized, double-blind, placebo-controlled study". *Journal of clinical pharmacology* **54**(2), S. 168–178.
- Padhi, D., G. Jang, B. Stouch, L. Fang, and E. Posvar (2011). "Single-dose, placebo-controlled, randomized study of AMG 785, a sclerostin monoclonal antibody". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **26**(1), S. 19–26.
- Papachroni, K. K., D. N. Karatzas, K. A. Papavassiliou, E. K. Basdra, and A. G. Papavassiliou (2009). "Mechanotransduction in osteoblast regulation and bone disease". *Trends in molecular medicine* **15**(5), S. 208–16.
- Park, S. H., K. O'Connor, H. McKellop, and A. Sarmiento (1998). "The influence of active shear or compressive motion on fracture-healing". *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **80**(6), S. 868–78.
- Paulsen, F. and R. Lüllmann-Rauch (2012). *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag, 4. Edition.
- Pazzaglia, U. E., G. Bonaspetti, F. Ranchetti, and P. Bettinsoli (2008). "A model of the intracortical vascular system of long bones and of its organization: an experimental study in rabbit femur and tibia". *Journal of anatomy* **213**(2), S. 183–93.
- Peacock, M., C. H. Turner, M. J. Econs, and T. Foroud (2002). "Genetics of osteoporosis". *Endocrine reviews* **23**(3), S. 303–26.

- Perren, S. (2002). "Evolution of the internal fixation of long bone fractures: The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology". *The Journal of bone and joint surgery. British volume* **84**(8), S. 1093–1110.
- Peter, C. P., W. O. Cook, D. M. Nunamaker, M. T. Provost, J. G. Sedor, und G. A. Rodan (1996). "Effect of alendronate on fracture healing and bone remodeling in dogs". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **14**(1), S. 74–9.
- Piekarski, K. und M. Munro (1977). "Transport mechanism operating between blood supply and osteocytes in long bones". *Nature* **269**(5623), S. 80–2.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, und D. R. Marshak (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells". *Science (New York, N.Y.)* **284**(5411), S. 143–7.
- Polakis, P. (2007). "The many ways of Wnt in cancer". *Current opinion in genetics & development* **17**(1), S. 45–51.
- Poole, K. E. S. und J. Reeve (2005). "Parathyroid hormone - a bone anabolic and catabolic agent". *Current opinion in pharmacology* **5**(6), S. 612–7.
- Prelevic, G. M. (2001). "Osteoporosis in men". *Journal of the Royal Society of Medicine* **94**(12), S. 620–3.
- Price, C., X. Zhou, W. Li, und L. Wang (2011). "Real-time measurement of solute transport within the lacunar-canalicular system of mechanically loaded bone: direct evidence for load-induced fluid flow". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **26**(2), S. 277–85.
- Probst, A. (2005). "Physiologie und Pathophysiologie der Knochenbruchheilung". In: M. G. Krukemeyer und H.-U. Spiegel (Hrsg.): *Chirurgische Forschung*. Georg Thieme Verlag, S. 412–420.
- Probst, A., H. Jansen, A. Ladas, und H. U. Spiegel (1999). "Callus formation and fixation rigidity: a fracture model in rats". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **17**(2), S. 256–60.
- Rachner, T. D., S. Khosla, und L. C. Hofbauer (2011). "New Horizons in Osteoporosis". *Lancet* **377**(9773), S. 1276–1287.
- Raisz, L. (2005). "Pathogenesis of osteoporosis: concepts, conflicts, and prospects". *Journal of Clinical Investigation* **115**(12).
- Raisz, L. G. (2001). "Pathogenesis of postmenopausal osteoporosis". *Reviews in endocrine & metabolic disorders* **2**(1), S. 5–12.
- Raisz, L. G. und E. Seeman (2001). "Causes of age-related bone loss and bone fragility: an alternative view". *Journal of bone and mineral research: the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **16**(11), S. 1948–52.
- Rawadi, G. und S. Roman-Roman (2005). "Wnt signalling pathway: a new target for the treatment of osteoporosis". *Expert opinion on therapeutic targets* **9**(5), S. 1063–77.
- Reitzik, M. und W. Schoorl (1983). "Bone repair in the mandible: a histologic and biometric comparison between rigid and semirigid fixation". *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* S. 215–218.
- Remmele, W. (1997). *Pathologie 5: Männliches Genitale, Nieren, Ableitende Harnwege, Skelettsystem, Gelenke, Sehnen und Sehnnegleitgewebe, Bursen, Faszien, Haut*. Springer Verlag, 2. Edition.
- Robling, A. G., P. J. Niziolek, L. A. Baldrige, K. W. Condon, M. R. Allen, I. Alam, S. M. Mantila, J. Gluhak-Heinrich, T. M. Bellido, S. E. Harris, und C. H. Turner (2008). "Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin". *The Journal of biological chemistry* **283**(9), S. 5866–75.
- Robling, A. G. und C. H. Turner (2009). "Mechanical Signaling for Bone Modeling and Remodeling". *Critical Reviews™ in Eukaryotic Gene Expr.* **19**(4), S. 319–338.
- Röntgen, V., R. Blakytyn, R. Matthys, M. Landauer, T. Wehner, M. Göckelmann, P. Jermendy, M. Amling, T. Schinke, L. Claes, und A. Ignatius (2010). "Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **28**(11), S. 1456–62.
- Rosen, C., J. Compston, und J. Lian (2013). *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. John Wiley & Sons Inc, 8. Edition.
- Roudier, M., X. Li, Q.-T. Niu, E. Pacheco, J. K. Pretorius, K. Graham, B.-R. P. Yoon, J. Gong, K. Warmington, H. Z. Ke, R. A. Black, J. Hulme, und P. Babij (2013). "Sclerostin is expressed in articular cartilage but loss or inhibition does not affect cartilage remodeling during aging or following mechanical injury". *Arthritis and rheumatism* **65**(3), S. 721–31.
- Sawakami, K., A. G. Robling, M. Ai, N. D. Pitner, D. Liu, S. J. Warden, J. Li, P. Maye, D. W. Rowe, R. L. Duncan, M. L. Warman, und C. H. Turner (2006). "The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment". *The Journal of biological chemistry* **281**(33), S. 23698–711.
- Schaffler, M. B. und O. D. Kennedy (2012). "Osteocyte Signaling in Bone". *Current osteoporosis reports* **10**(2), S. 118–125.
- Scharf, H.-P., A. Rüter, T. Pohlemann, I. Marzi, D. Kohn, und K.-P. Günthe (2011). *Orthopädie und Unfallchirurgie: Facharztwissen nach der neuen Weiterbildungsordnung*. Elsevier, Urban & Fischer Verlag.
- Schell, H., D. R. Epari, J. P. Kassi, H. Bragulla, H. J. Bail, und G. N. Duda (2005). "The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **23**(5), S. 1022–8.
- Schenk, R. und H. Willenegger (1964). "Zur Histologie der primären Knochenheilung". *Langenbecks Archiv für Klinische Chirurgie* **308**(1), S. 440–452.
- Schiebler, T. H. und H.-W. Korf (2007). "Allgemeine Anatomie des Bewegungsapparates". In: *Anatomie*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 10. Edition, Kapitel 5., S. 155–176.
- Schünke, M. (2014). *Funktionelle Anatomie - Topographie und Funktion des Bewegungssystems*. Georg Thieme Verlag, 2. Edition.

- Shea, J. E. und S. C. Miller (2005). "Skeletal function and structure: implications for tissue-targeted therapeutics.". *Advanced drug delivery reviews* **57**(7), S. 945–57.
- Silva, I. und J. Branco (2010). "RANK/ RANKL/ OPG: Literature Review". *Acta reumatologica portuguesa* S. 209–218.
- Sniekers, Y. H., H. Weinans, G. J. V. M. van Osch, und J. P. T. M. van Leeuwen (2010). "Oestrogen is important for maintenance of cartilage and subchondral bone in a murine model of knee osteoarthritis". *Arthritis research & therapy* **12**(5), S. R182.
- Song, J., Z. Jin, F. Chang, L. Li, und Y. Su (2014). "Single and combined use of human parathyroid hormone (PTH) (1-34) on areal bone mineral density (aBMD) in postmenopausal women with osteoporosis: evidence based on 9 RCTs". *Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research* **20**, S. 2624–32.
- Spornitz, U. M. (2010). *Anatomie und Physiologie: Lehrbuch und Atlas für Pflege- und Gesundheitsfachberufe*. Springer Medizin Verlag, 6. Edition.
- Squier, C. a., S. Ghoneim, und C. R. Kremenak (1990). "Ultrastructure of the periosteum from membrane bone". *Journal of anatomy* **171**, S. 233–9.
- Street, J., M. Bao, L. DeGuzman, S. Bunting, F. V. Peale, N. Ferrara, H. Steinmetz, J. Hoeffel, J. L. Cleland, A. Daugherty, N. van Bruggen, H. P. Redmond, R. A. D. Carano, und E. H. Filvaroff (2002). "Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**(15), S. 9656–61.
- Strube, P., U. Sentuerk, T. Riha, K. Kaspar, M. Mueller, G. Kasper, G. Matziolis, G. N. Duda, und C. Perka (2008). "Influence of age and mechanical stability on bone defect healing: age reverses mechanical effects". *Bone* **42**(4), S. 758–64.
- Südkamp, N. P. (2000). "Soft-tissue injury: pathophysiology and its influence on fracture management". In: T. P. Rüedi und W. M. Murphy (Hrsg.): *AO principles of fracture management*. Georg Thieme Verlag, Kapitel 1.5, S. 59–77.
- Sutherland, M. K., J. C. Geoghegan, C. Yu, E. Turcott, J. E. Skonier, D. G. Winkler, und J. A. Latham (2004). "Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation". *Bone* **35**(4), S. 828–35.
- Szewczyk, K. A., K. Fuller, und T. J. Chambers (2013). "Distinctive subdomains in the resorbing surface of osteoclasts". *PLoS one* **8**(3), S. e60285.
- Tanaka, H., N. Tanabe, T. Kawato, K. Nakai, T. Kariya, S. Matsumoto, N. Zhao, M. Motohashi, und M. Maeno (2013). "Nicotine Affects Bone Resorption and Suppresses the Expression of Cathepsin K, MMP-9 and Vacuolar-Type H(+)-ATPase d2 and Actin Organization in Osteoclasts". *PLoS one* **8**(3), S. e59402.
- ten Dijke, P., C. Krause, D. J. J. de Gorter, C. W. G. M. Löwik, und R. L. van Bezooijen (2008). "Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation: its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling". *The Journal of bone and joint surgery. American volume* **90 Suppl 1**, S. 31–5.
- Thompson, Z., T. Miclau, D. Hu, und J. A. Helms (2002). "A model for intramembranous ossification during fracture healing". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **20**(5), S. 1091–8.
- Tian, X., W. S. S. Jee, X. Li, C. Paszty, und H. Z. Ke (2011). "Sclerostin antibody increases bone mass by stimulating bone formation and inhibiting bone resorption in a hindlimb-immobilization rat model". *Bone* **48**(2), S. 197–201.
- Tian, X., R. B. Setterberg, X. Li, C. Paszty, H. Z. Ke, und W. S. S. Jee (2010). "Treatment with a sclerostin antibody increases cancellous bone formation and bone mass regardless of marrow composition in adult female rats". *Bone* **47**(3), S. 529–33.
- Toben, D., I. Schroeder, T. El Khassawna, M. Mehta, J.-E. Hoffmann, J.-T. Frisch, H. Schell, J. Lienau, A. Serra, A. Radbruch, und G. N. Duda (2011). "Fracture healing is accelerated in the absence of the adaptive immune system". *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **26**(1), S. 113–24.
- Treuting, P. M. und S. M. Dintzis (2012). "Skeletal System". In: *Comparative anatomy and histology : a mouse and human atlas*. Academic Press, 1. Edition, Kapitel 5, S. 53–70.
- Tu, X., Y. Rhee, K. W. Condon, N. Bivi, M. R. Allen, D. Dwyer, M. Stolina, C. H. Turner, A. G. Robling, L. I. Plotkin, und T. Bellido (2012). "Sost downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading". *Bone* **50**(1), S. 209–17.
- Turgeman, G., Y. Zilberman, S. Zhou, P. Kelly, I. K. Moutsatsos, Y. P. Kharode, L. E. Borella, F. J. Bex, B. S. Komm, P. V. N. Bodine, und D. Gazit (2002). "Systemically administered rhBMP-2 promotes MSC activity and reverses bone and cartilage loss in osteopenic mice". *Journal of cellular biochemistry* **86**(3), S. 461–74.
- Turner, C. H., M. P. Akhter, D. M. Raab, D. B. Kimmel, und R. R. Recker (1991). "A noninvasive, in vivo model for studying strain adaptive bone modeling". *Bone* **12**(2), S. 73–9.
- Turner, C. H., S. J. Warden, T. Bellido, L. I. Plotkin, N. Kumar, I. Jasiuk, J. Danzig, und A. G. Robling (2009). "Mechanobiology of the skeleton". *Science signaling* **2**(68), S. pt3.
- Utvag, S. E., O. Grundnes, D. B. Rindal, und O. Reikeras (2003). "Influence of extensive muscle injury on fracture healing in rat tibia". *Journal of orthopaedic trauma* **17**(6), S. 430–5.
- Utvag, S. E., L. Korsnes, D. B. Rindal, und O. Reikeras (2001). "Influence of flexible nailing in the later phase of fracture healing: strength and mineralization in rat femora". *Journal of orthopaedic science: official journal of the Japanese Orthopaedic Association* **6**(6), S. 576–84.
- Väänänen, H. K., H. Zhao, M. Mulari, und J. M. Halleen (2000). "The cell biology of osteoclast function". *Journal of cell science* **113** (Pt 3), S. 377–81.
- van Bezooijen, R. L., A. L. Bronckers, R. A. Gortzak, P. C. W. Hogendoorn, L. van der Wee-Pals, W. Balemans, H. J. Oostentbroek, W. Van Hul, H. Hamersma, F. G. Dikkers, N. A. T. Hamdy, S. E. Papapoulos, und C. W. G. M. Löwik (2009). "Sclerostin in mineralized matrices and van Buchem disease". *Journal of dental research* **88**(6), S. 569–74.

- van Bezooijen, R. L., S. E. Papapoulos, N. A. Hamdy, P. ten Dijke, and C. W. Löwik (2005a). "Control of bone formation by osteocytes? lessons from the rare skeletal disorders sclerosteosis and van Buchem disease". *BoneKEY-Osteovision* **2**(12), S. 33–38.
- van Bezooijen, R. L., B. A. J. Roelen, A. Visser, L. van der Wee-Pals, E. de Wilt, M. Karperien, H. Hamersma, S. E. Papapoulos, P. ten Dijke, and C. W. G. M. Löwik (2004). "Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist". *The Journal of experimental medicine* **199**(6), S. 805–14.
- van Bezooijen, R. L., P. ten Dijke, S. E. Papapoulos, and C. W. G. M. Löwik (2005b). "SOST/sclerostin, an osteocyte-derived negative regulator of bone formation". *Cytokine & growth factor reviews* **16**(3), S. 319–27.
- Van den Berg, F. (2010). *Angewandte Physiologie, Volume 1*. Georg Thieme Verlag, 3. Edition.
- Vanhoenacker, F. M., W. Balemans, G. J. Tan, F. G. Dijkers, A. M. De Schepper, D. G. P. Mathysen, A. Bernaerts, and W. Van Hul (2003). "Van Buchem disease: lifetime evolution of radioclinical features". *Skeletal radiology* **32**(12), S. 708–18.
- Wallace, A. L., E. R. Draper, R. K. Strachan, I. D. McCarthy, and S. P. Hughes (1994). "The vascular response to fracture micromovement". *Clinical orthopaedics and related research* **301**, S. 281–90.
- Wang, D., S. C. Miller, P. Kopecková, and J. Kopecek (2005a). "Bone-targeting macromolecular therapeutics". *Advanced drug delivery reviews* **57**(7), S. 1049–76.
- Wang, J. W., W. Li, S. W. Xu, D. S. Yang, Y. Wang, M. Lin, and G. F. Zhao (2005b). "Osteoporosis influences the middle and late periods of fracture healing in a rat osteoporotic model". *Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi / Chinese Medical Association* **8**(2), S. 111–6.
- Weaver, A. S., Y.-P. Su, D. L. Begun, J. D. Miller, A. I. Alford, and S. A. Goldstein (2010). "The effects of axial displacement on fracture callus morphology and MSC homing depend on the timing of application". *Bone* **47**(1), S. 41–8.
- Weber, B. and O. Czech (1973). *Pseudarthrosen*. Huber Verlag.
- Wijenayaka, A. R., M. Kogawa, H. P. Lim, L. F. Bonewald, D. M. Findlay, and G. J. Atkins (2011). "Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway". *PloS one* **6**(10), S. e25900.
- Willie, B., K. Adkins, X. Zheng, U. Simon, and L. Claes (2009). "Mechanical characterization of external fixator stiffness for a rat femoral fracture model". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **27**(5), S. 687–93.
- Willie, B. M., R. Blakytyn, M. Glöckelmann, A. Ignatius, and L. Claes (2011). "Temporal variation in fixation stiffness affects healing by differential cartilage formation in a rat osteotomy model". *Clinical orthopaedics and related research* **469**(11), S. 3094–101.
- Wolff, J. (1892). *Das Gesetz der Transformation der Knochen*. Berlin: Verlag von August Hirschwald.
- Xing, Z., C. Lu, D. Hu, T. Miclau, and R. S. Marcucio (2010). "Rejuvenation of the inflammatory system stimulates fracture repair in aged mice". *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society* **28**(8), S. 1000–6.
- Xu, H., J. Duan, D. Ning, J. Li, R. Liu, and R. Yang (2014). "Role of Wnt signaling in fracture healing". *BMB reports* **47**(12), S. 666–672.
- Yamaji, T., K. Ando, S. Wolf, P. Augat, and L. Claes (2001). "The effect of micromovement on callus formation". *Journal of orthopaedic science: official journal of the Japanese Orthopaedic Association* **6**(6), S. 571–5.
- Zheng, H., J. A. Martin, Y. Duwayri, G. Falcon, and J. A. Buckwalter (2007). "Impact of aging on rat bone marrow-derived stem cell chondrogenesis". *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* **62**(2), S. 136–48.
- Zimmermann, E. A., E. Schaible, H. Bale, H. D. Barth, S. Y. Tang, P. Reichert, B. Busse, T. Alliston, J. W. Ager, and R. O. Ritchie (2011). "Age-related changes in the plasticity and toughness of human cortical bone at multiple length scales". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**(35), S. 14416–21.

Publikationen

Aus der vorgestellten Arbeit ging bis dato folgende Publikation hervor:

Kruck B, Damerow S, Wichlas F, Tsitsilonis S, Duda GN, Willie BM, Fixation stiffness modulates the efficacy of sclerostin-neutralizing antibody treatment during bone healing, American Society for Bone and Mineral Research, Poster presentation, Baltimore, MD, USA, 2013.

Danksagung

Mein großer Dank geht an Bettina Willie für die Überlassung des Themas und die wunderbare Betreuung meiner Arbeit. Danke für deine stets positiven Worte und deine ständige Erreichbarkeit bei Fragen oder Problemen.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Aschenbach danke ich für die Betreuung der externen Doktorarbeit und die Durchsicht meiner Arbeit als Erstgutachter.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Duda, dessen Institut mir die Durchführung der Arbeit ermöglicht hat.

Vielen Dank auch an Dr. Katharina Schmidt-Bleek für die Durchsicht meiner Arbeit.

Ein weiterer großer Dank geht an Gabriela Korus, Camilla Bergmann und Michele Demel für die unermüdliche Hilfe im Labor. Danke Gabriela für die Lösung all meiner Labor-Probleme und dass du in den Tiefen deiner Gefriertruhe stets genug PFA ausgraben konntest, wenn ich mal wieder vergessen habe, dir Bescheid zu geben.

Mario Thiele danke ich für die technische Unterstützung in der Bildanalyse.

Meiner Mitdoktorandin Bettina Kruck danke ich für die vielen netten Stunden und Gespräche im Op und die gute Zusammenarbeit.

Julia Fiebig und Jochen Bruns danke ich für die intensive Durchsicht meiner Arbeit und die Vernichtung jeglicher Komma- und Rechtschreibfehler.

Weiterhin danke ich Johannes Wiemers für die Unterstützung zu Hause. Ohne dich wäre die Wohnung wohl heruntergekommen und die Tiere verwaist.

Mein größter Dank gilt meiner Familie für die stete, uneingeschränkte Unterstützung all meiner Ideen und Pläne. Ohne euch wäre mein Studium und diese Arbeit sicher nie möglich gewesen. Danke Julia für die schnelle Hilfe aus der Ferne, wenn der Computer mal wieder nicht so wollte wie ich.

Und letztenendes sollen die vielen, vielen Mäuse nicht unerwähnt bleiben, die ungefragt für meine Doktorarbeit im Interesse der Forschung ihr Leben gelassen haben. Danke!

Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Tanyfron, 28.02.2016

Sophie Damerow