

Aus dem Julius Wolff Institut für Biomechanik und
Muskuloskeletale Regeneration
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Alters- und geschlechterspezifische Effekte von mechanischer
Belastung auf den durch das SOST-Gen regulierten
Knochenumbau

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexander Büttner

aus Berlin

Datum der Promotion: 23.06.2019

Vorwort

Teile meiner Arbeit sind bereits in der Publikation:

Yang H, Büttner A, Pflanz D, Albiol L, Birkhold A, Thiele T, Kramer I, Kneissel M, Duda GN, Kornak U, Checa S, Willie BM, Bone (re)modeling Response To Mechanical Loading In Sost Deficient Mice Is Age And Gender Dependent, Transactions of the 63rd Annual Meeting of the Orthopedic Research Society, Poster presentation, San Diego, CA, 2017

veröffentlicht.

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	1
TABELLENVERZEICHNIS	4
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
ABSTRACT	6
ABSTRACT	8
1. EINLEITUNG	10
1.1. Der Knochenstoffwechsel	10
1.2. Erkrankungen des Knochenstoffwechsels.....	12
1.2.1. Osteoporose.....	12
1.2.1.1. <i>Risiken für die Entstehung einer Osteoporose</i>	13
1.2.1.2. <i>Zahlen zur Osteoporose</i>	17
1.2.1.3. <i>Therapieansätze der Osteoporose</i>	18
1.3. Sklerostin	20
1.3.1. Entdeckung	20
1.3.2. Wirkung.....	21
1.3.3. Stand der aktuellen Forschung.....	24
1.4. Geschlechterrelevanz	25
1.4.1. Die Osteoporose, eine Erkrankung der postmenopausalen Frau?.....	25
1.4.2. Geschlechterrelevanz in der Knochenforschung	27
1.4.3. Geschlechterrelevanz in Bezug auf den Wnt/ β -Catenin Signalweg	28
1.5. Zielsetzung der Arbeit	30
2. METHODIK	31
2.1. Tierzucht und Genotypisierung	31
2.2. Belastungs- / Dehnungsanalyse.....	33
2.2.1. Präparation der Dehnungsmessstreifen	33
2.2.2. <i>In vivo</i> Kalibrierung der Belastung/Dehnung.....	35
2.3. <i>In vivo</i> Belastung der Tibia	40
2.4. <i>In vivo</i> Micro-Computertomographie der kortikalen mittleren Diaphyse und der trabekulären proximalen Metaphyse	42
2.5. Auswertung der Mikro-Computertomographiedaten	46
2.5.1. Ermittlung des Schwellenwertes.....	46
2.5.2. Ausrichtung der Tibia in den Scanebenen	47
2.5.3. Konturierung und Evaluation der kortikalen Tibia-Scans	48
2.5.4. Dynamische 3D-Morphometrie-Analyse der kortikalen Tibia-Scans	49
2.5.5. Konturierung und Evaluation der trabekulären Tibia-Scans	50

2.6.	Dynamische Histomorphometrie der Tibia.....	51
2.6.1.	Vorbereitung und Einbettung der Knochen.....	51
2.6.1.1.	<i>Entwässerung und Entfettung</i>	51
2.6.1.2.	<i>Präinfiltration und Infiltration</i>	52
2.6.1.3.	<i>Einbettung</i>	53
2.6.2.	Sägen der eingebetteten Knochen.....	54
2.6.3.	Weiterverarbeitung der Präparate und Fluoreszenzmikroskopie.....	56
2.7.	Statistische Analyse.....	58
2.8.	Geschlechtervergleich.....	58
3.	ERGEBNISSE	59
3.1.	Tibia-Längen und Gewichte der Versuchstiere.....	59
3.2.	<i>In vivo</i> Kalibrierung für eine Dehnung von 900 microstrain ($\mu\epsilon$).....	59
3.3.	Evaluation des kortikalen Knochens.....	60
3.3.1.	Evaluation der Micro-CT Untersuchung.....	60
3.3.1.1.	<i>Einfluss von Alter & Genotyp auf den kortikalen Knochen an Tag 0</i>	60
3.3.1.2.	<i>Kortikale Knochenreaktion von Tag 15 zu 0</i>	64
3.3.1.3.	<i>Evaluation der dynamischen 3D-Morphometrie-Analyse</i>	69
3.3.2.	Dynamische Histomorphometrie.....	72
3.3.2.1.	<i>Periostal</i>	72
3.3.2.2.	<i>Endostal</i>	76
3.4.	Evaluation des trabekulären Knochens.....	81
3.4.1.	Evaluation der Micro-CT Untersuchung.....	81
3.4.1.1.	<i>Einfluss von Alter & Genotyp auf den trabekulären Knochen an Tag 0</i>	81
3.4.1.2.	<i>Trabekuläre Knochenreaktion von Tag 15 zu 0</i>	85
3.4.2.	Dynamische Histomorphometrie.....	90
3.5.	Vergleich zu weiblichen Versuchstieren.....	94
3.5.1.	Geschlechtervergleich des kortikalen Knochens an Tag 0.....	94
3.5.2.	Vergleich der Kortikalen Knochenreaktion von Tag 15 zu 0.....	97
3.5.3.	Vergleich der 3D-Morphometrie-Analyse.....	97
3.5.4.	Vergleich der dynamischen Histomorphometrie.....	99
3.5.4.1.	<i>Vergleich der endostalen Reaktion beider Geschlechter</i>	99
3.5.4.2.	<i>Vergleich der periostalen Reaktion beider Geschlechter</i>	101
4.	DISKUSSION	103
4.1.	Zusammenfassung der Resultate.....	103
4.1.1.	Hypothese 1.....	104
4.1.2.	Hypothese 2.....	104
4.1.3.	Hypothese 3.....	105

4.1.4. Hypothese 4.....	106
4.2. Vergleich mit anderen Studienarbeiten	107
4.3. Studienlimitation.....	110
4.4. Potenzielle Verwendung von Sklerostin-Antikörpern	114
4.5. Schlussfolgerung und Ausblick	116
LITERATURVERZEICHNIS.....	117
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG.....	138
ANTEILSERKLÄRUNG AN ETWAIGEN ERFOLGTEN PUBLIKATIONEN	139
LEBENS LAUF.....	140
PUBLIKATIONS LISTE	142
DANKSAGUNG.....	143

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Aufbau des Knochens mit Einblick in den strukturellen Aufbau, Quelle: https://www.britannica.com/science/cancellous-bone ; Encyclopædia Britannica; Stand: 04.08.2017	11
Abbildung 2 - Wirkungsmechanismus von Sklerostin im Wnt- β -Catenin-Signalweg. Quelle: Shah AD, Shoback D, Lewiecki EM: Sclerostin inhibition: a novel therapeutic approach in the treatment of osteoporosis. International Journal of Women's Health 2015, 7:565-580.....	23
Abbildung 3 - Stammbaum zur Gewinnung des SOST-KO Mausmodelles.....	32
Abbildung 4 - Dehnungsmessstreifen nach Lötung der Kabel an	34
die Kontaktstellen	
Abbildung 5 - Zeitachse zum Versuchsablauf der Belastungs-/ Dehnungs-Kalibration.....	36
Abbildung 6 - Ermittlung des Zugangs zur Anbringung des Dehnungsmessstreifens	37
Abbildung 7 - Zugang zur Anbringung des Dehnungsmessstreifens	37
Abbildung 8 - Anatomische Festlegung des Auftragsortes des Dehnungsmessstreifens.....	37
Abbildung 9 - Intraoperative Fotografie der Auftragsfläche.....	37
Abbildung 10 - Intraoperative Fotografie nach Applikation des Dehnungsmessstreifens.....	38
Abbildung 11 - Anschluss des Dehnungsmessstreifens und Einspannen der linken Maustibia in die Belastungsmaschine	39
Abbildung 12 - Zeitstrahl zum Ablauf des Belastungsversuches	40
Abbildung 13 - Versuchsablauf an Tagen des Belastungsexperimentes	41
Abbildung 14 - Maus auf Kunststoffschlitten vor Micro-CT-Scan	43
Abbildung 15 - Maus mit eingespannter Tibia in Belastungsmaschine nach Micro-CT-Scan	44
Abbildung 16 - Querschnitt der Tibiadiaphyse im Micro-CT-Scan	47
Abbildung 17 - Technovit 9100 Neu Schema.....	52
Abbildung 18 - Schnittführung für die Untersuchung des trabekulären Knochens der proximalen Tibiametaphyse	55

Abbildung 19 - Schnittführung für die Untersuchung des kortikalen Knochens der mittleren Tibiadiaphyse.	55
Abbildung 20 - Fluoreszenzmikroskopie des kortikalen Horizontalschnittes (links) und des trabekulären Saggital-/Koronarschnittes (rechts).....	57
Abbildung 21 - Genotypische Differenz der kortikalen Knochenparameter an Tag 0...	62
Abbildung 22 - Diagramme der Ergebnisse der Micro-CT-Scans an Tag 0 zur Beurteilung des kortikalen Knochens	63
Abbildung 23 - Differenz der kortikalen Knochenfläche prozentual von Tag 15 zu Tag 0	64
Abbildung 24 - Differenz der kortikalen Knochenfläche zur Gesamtfläche prozentual von Tag 15 zu Tag 0	65
Abbildung 25 - Differenz der kortikalen Dicke prozentual von Tag 15 zu Tag 0.....	66
Abbildung 26 - 3D-Morphometrie-Analyse Diagramme.....	71
Abbildung 27 - Anteil der Mineralisierten Oberfläche an der Gesamtoberfläche des periostalen Knochens.....	73
Abbildung 28 - Mineralisationsrate des periostalen Knochens.....	74
Abbildung 29 - Knochenbildungsrate des periostalen Knochens	75
Abbildung 30 - Doppelbanden eines kortikalen Ausschnittes in der Fluoreszenzmikroskopie.....	76
Abbildung 31 - Anteil der Mineralisierten Oberfläche an der Gesamtoberfläche des endostalen Knochens.....	77
Abbildung 32 - Mineralisationsrate des endostalen Knochens.....	78
Abbildung 33 - Knochenbildungsrate des endostalen Knochens	79
Abbildung 34 - Genotypische Differenz der trabekulären Knochenparameter	83
Abbildung 35 - Diagramme der Ergebnisse der Micro-CT-Scans an Tag 0 zur Beurteilung des trabekulären Knochens.....	84
Abbildung 36 - Differenz des trabekulären Knochenvolumen zu Gesamtknochenmarkvolumen prozentual von Tag 15 zu Tag 0.	85
Abbildung 37 - Differenz der Trabekelanzahl pro Millimeter prozentual von Tag 15 zu Tag 0	86
Abbildung 38 - Differenz der trabekulären Dicke prozentual von Tag 15 zu Tag 0	87
Abbildung 39 - Anteil der Mineralisierten Oberfläche an der Gesamtoberfläche des trabekulären Knochens	91
Abbildung 40 - Mineralisationsrate des trabekulären Knochens	92

Abbildung 41 - Knochenbildungsrate des trabekulären Knochens.....	93
Abbildung 42 - Geschlechtervergleich der Kortikalen Fläche an Tag 0	94
Abbildung 43 - Geschlechtervergleich des kortikalen Knochenanteiles an Tag 0.....	95
Abbildung 44 - Geschlechtervergleich der Kortikalen Dicke an Tag 0	95
Abbildung 45 - Genotypische Differenz der kortikalen Knochenparameter beider Geschlechter an Tag 0	96
Abbildung 46 - Einfluss der Belastung auf das Mineralisierte Volumen zum Gesamtknochenvolumen für beide Geschlechter.....	98
Abbildung 47 - Einfluss der Belastung auf die Mineralisierte Oberfläche zur Gesamtknochenoberfläche für beide Geschlechter	98
Abbildung 48 - Endostaler Mineralisierter Oberflächenanteil im Geschlechtervergleich	99
Abbildung 49 - Endostale Mineralisationsrate im Geschlechtervergleich.....	100
Abbildung 50 - Endostale Knochenbildungsrate im Geschlechtervergleich	100
Abbildung 51 - Periostaler Mineralisierter Oberflächenanteil im Geschlechtervergleich	101
Abbildung 52 - Periostale Mineralisationsrate im Geschlechtervergleich.....	102
Abbildung 53 - Periostale Knochenbildungsrate im Geschlechtervergleich	102

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Kortikale Micro-CT Daten der Tibiadiaphyse von Tag 0, 5, 10 und 15	68
Tabelle 2 - 3D-Morphometrie-Analyse Daten.....	70
Tabelle 3 - Histomorphometrie Daten	80
Tabelle 4 - Trabekuläre Micro-CT Daten der proximalen Tibiametaphyse von Tag 0, 5, 10 und 15.....	89

Abkürzungsverzeichnis

BMD	Bone Mineral Density
BMI	Body-Mass-Index
BMP	bone morphogenetic proteins
DKK1	Dickkopf 1
DXA	dual energy X-ray absorptiometry
FRAX	Fracture Risk Assessment Tool
IL-1 β	Interleukin-1 β
LRP5/6	Low-density lipoprotein receptor-related proteins 5 oder 6
NOF	National Osteoporosis Foundation
OPG	Osteoprotegerin
PBM	Peak bone mass
PTH	Parathyroid Hormon
RANK	Receptor Activator of NF- κ B
RANKL	Receptor Activator of NF- κ B Ligand
SOST-KO	SOST-knock-out
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
USA	United States of America
v.A.	vor Allem

Abstract

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, bei der durch Knochendichtereduktion und Verschlechterung des Knochengewebes die Stabilität der Knochen abnimmt und das Frakturrisiko steigt.

Zur Therapie dieser Erkrankung gibt es mehrere Angriffspunkte. Ein neu erforschter Ansatz ist die Wirkung von Sklerostin, ein Produkt des SOST-Genes. Es bietet einen neuen Ansatz, der eine positive Knochenbilanz bewirken soll, ohne jedoch eine unkontrollierte überschießende Knochenproduktion zu erzeugen. Daher werden in klinischen Studien bereits Sklerostininhibitoren getestet.

Sklerostin-Inhibition und die bereits bekannte Therapiemethode der physischen Belastung sind Methoden zur Erhöhung der Knochenmasse und damit der Reduktion von Osteoporose. Diese Effekte werden in Bezug auf kortikale und trabekuläre Knochenparameter im Mausmodell in dieser Arbeit thematisiert und untersucht. Hauptaugenmerk der Untersuchungen waren (1.) den positiven Effekt von Sklerostininhibition auf den kortikalen und trabekulären Knochen nachzuweisen, (2.) eine Unabhängigkeit der belastungsinduzierten Knochenbildung oder -resorption von der Sklerostin-Inhibition zu ermitteln, (3.) eine abgeschwächte Knochenbildung und verstärkte -resorption mit zunehmendem Alter zu beobachten und (4.) einen Unterschied in der Wirkung von Sklerostininhibition in Abhängigkeit vom Geschlecht auszumachen, mit der Vermutung, dass das Knochenwachstum im weiblichen Mausmodell stärker ausgeprägt ist.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde ein in-vivo Belastungsversuch durchgeführt bei männlichen SOST-KO Mäusen und bei männlichen Wurfgeschwistern des Wildtyps im Alter von 10 und 26 Wochen. Anschließend wurden die Resultate mit denen eines parallel durchgeführten Versuches am weiblichen Mausmodell verglichen. Im Versuch wurde die linke Tibia der Mäuse für 5 Minuten täglich mit einer vorher determinierten Kraft (Dehnungsadaptiert) axial komprimiert, um einen Belastungsstimulus zu erzeugen. Dabei wurden an Tag 0, 5, 10 und 15 Micro-CT-Scans von der mittleren Tibiadiaphyse zur Beurteilung des kortikalen Knochens und der proximalen Tibiametaphyse zur Beurteilung des trabekulären Knochens durchgeführt. Zusätzlich wurden an Tag 3 und 10 Calcein Injektionen zur histologischen Beurteilung des Knochenwachstumes appliziert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Sklerostininhibition eine Steigerung der Knochenmasse kortikal und trabekulär bewirkt, dass die Knochenbildung und -resorption,

die durch Belastung induziert wird, von einer Sklerostininhibition unabhängig ist und dass die Knochenbildung mit zunehmendem Alter abnimmt und die Knochenresorption steigt. Außerdem wurde dargestellt, dass das Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf den Knochenmetabolismus und die Mechanotransduktion nimmt. Somit ist die Notwendigkeit belegt, den Knochenstoffwechsel geschlechterspezifisch zu erforschen und mögliche Differenzen zu ermitteln. Da die mechanisch induzierte Knochenbildung und -resorption unter Sklerostininhibition anscheinend alter- und geschlechtsabhängig ist, sollten in zukünftigen klinischen Studien, die eine Antikörpertherapie zur Sklerostinblockierung thematisieren, sowohl das Alter als auch das Geschlecht als Einflussgröße für Wirkung und Nebenwirkung berücksichtigt werden.

Abstract

Osteoporosis is a systemic skeletal disease in which bone density reduction and deterioration of bone tissue reduces bone stability and increases fracture risk. Therapy concepts are researched worldwide. One newly researched approach is the effect of sclerostin, a SOST-gene-product. It provides a new point of attack to produce a positive bone balance, but without creating an uncontrolled, oversized bone production. Therefore, inhibitors of sclerostin are already being tested in clinical trials. Sclerostin inhibition and the already known therapy method of physical stress are methods for increasing bone mass and thus the reduction of osteoporosis.

This study has investigated this effect with respect to cortical and trabecular bone parameters using the mouse model. The main effect of this work was (1) to demonstrate the positive effect of sclerostin inhibition on the cortical and trabecular bone, (2) to determine the independence of stress-induced bone formation or resorption from the sclerostin inhibition, (3) to observe a weakened bone formation and strengthened bone resorption with aging and (4) to show a difference in the effect of sclerostin inhibition as a function of gender, with the assumption that bone growth is more pronounced in the female mouse model.

To answer these questions, an in-vivo stress test was performed in male SOST-KO mice and male wild-type littermates at age 10 and 26 weeks. Subsequently, the results were compared with those of a parallel experiment on the female mouse model. For the trial the left tibia of the mice was axially compressed for 5 minutes daily with a previously determined force (strain-adapted) to create a stress stimulus. On day 0, 5, 10 and 15, micro-CT scans were performed from the middle tibial diaphysis to evaluate cortical bone and the proximal tibial metaphysis for assessment of trabecular bone. In addition, calcein-injections were applied on days 3 and 10 for the histological evaluation of bone growth.

In summary of the results obtained, it was shown that sclerostin inhibition causes an increase in bone mass cortically and trabecularly, that bone formation and resorption induced by stress is independent of sclerostin inhibition and that bone formation decreases, and bone resorption increases with aging. In addition, it was clearly shown that sex has a significant influence on bone metabolism and mechanotransduction and

thus demonstrates the necessity to investigate bone metabolism in a gender-specific manner and to identify possible differences. Since it appears that mechanically induced bone formation and resorption under sclerostin inhibition is age-dependent and sex-dependent, both age and sex should be considered in future clinical studies addressing sclerostin-antibody-therapy.

1. Einleitung

1.1. Der Knochenstoffwechsel

Das Skelett ist kein starres Gerüst, sondern ein sehr dynamisches System, das ständigen Wandel und Erneuerung erfährt. Dafür sind spezielle Zellen von Nöten, die das mineralisierte Bindegewebe, vor allem das anorganische Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) und die organischen Matrixproteine, strukturieren, reparieren und anpassen [1],[2]. Diese Zellen sind vor allem die Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten. Osteoblasten dienen der Bildung der Bindegewebsmatrix, welche anschließend mineralisiert werden kann [3-5]. Osteozyten sind inaktive Platzhalter, die mechanische Belastung wahrnehmen und eine Adaption des Knochens durch Aktivierung von Osteoblasten und/oder Osteoklasten bewirken können [6-8]. Die Osteoklasten dienen dem Abbau von Knochensubstanz und spielen bei der Anpassung auf Belastung, der Frakturheilung und der stetigen Erneuerung des Skelettes eine große Rolle [5, 9]. Diese Zellen sind maßgeblich für die Entstehung und den Erhalt des Skelettes verantwortlich. Die Knochen des menschlichen Skelettes können in zwei Gruppen eingeteilt werden: Röhrenknochen und platte Knochen. Letztere entstehen durch desmale Ossifikation, das heißt der Knochen entsteht auf direktem Wege aus Bindegewebe indem mesenchymale Stammzellen zu Osteoblasten differenzieren. Anschließend mineralisiert die von den Osteoblasten gebildete Bindegewebsmatrix mit dem von den Osteoblasten sezernierten Hydroxylapatit [5, 10]. Dieser Variante steht die chondrale Ossifikation der Röhrenknochen entgegen, bei der es vorerst zu einer Differenzierung zu Chondroblasten, also Knorpelzellen, kommt. Nachdem ein Knorpelgerüst von den Chondroblasten errichtet wurde kommt es zum Einwachsen von Blutgefäßen und einem damit einhergehenden Anstieg von mesenchymalen Stammzellen, die nun entweder zu Chondroblasten differenzieren um den Knorpel abzubauen und weiteren Blutgefäßen Platz zu verschaffen oder zu Osteoblasten um die Knochenmatrix zu bilden [5, 11]. Ein weiterer Unterschied der Ossifikationsvarianten ist das Knochenwachstum. Bei der desmalen Ossifikation kommt es zu einer Knochenanlagerung an der äußeren Knochenoberfläche, während bei der chondralen Ossifikation der Knochen in Diaphyse (Knochenschaft) und Epiphyse (Knochenende) unterschieden werden kann und sich zwischen diesen Beiden die Metaphyse (Wachstumsfuge) befindet. In dieser kommt es bis zum Abschluss des Körperwachstums zu einer Bildung von Knorpel mit

anschließender Ossifikation in Richtung Diaphyse, sodass es zu einem Längenwachstum kommt [5, 12].

Neben der Kategorisierung nach Entstehung kann man Knochen nach seiner Anatomie in zwei strukturell unterschiedliche Gruppen unterteilen. Zum einen gibt es kortikalen Knochen, welcher sehr kompakt und dicht in Lamellen und Osteonen strukturiert ist und die äußere Hülle eines Knochens bildet. Seine Hauptaufgabe besteht darin Stabilität und mechanische Widerstandsfähigkeit zu gewährleisten. Er kann auch in den Mineralienhaushalt des Körpers eingreifen, zum Beispiel bei langanhaltender Hypocalcämie oder Hyperparathyreodismus [13-15]. Der trabekuläre Knochen hingegen bildet die innere Struktur der Röhrenknochen und ist teilweise auch in den großen platten Knochen, wie das Becken oder den Wirbelkörpern, zu finden. Er ist wichtiger Bestandteil für die Stabilität der Knochen und ist für die Anpassung auf Belastung äußerst relevant. Denn beim Knochenumbau werden nicht Osteone gebildet, sondern Howship-Lakunen, welche eine viel höhere Knochenumsatzrate aufweisen. Kommt es zu Mineraldefiziten wird deshalb auch der trabekuläre Knochen zuerst zum Ausgleich herangezogen. [16, 17]

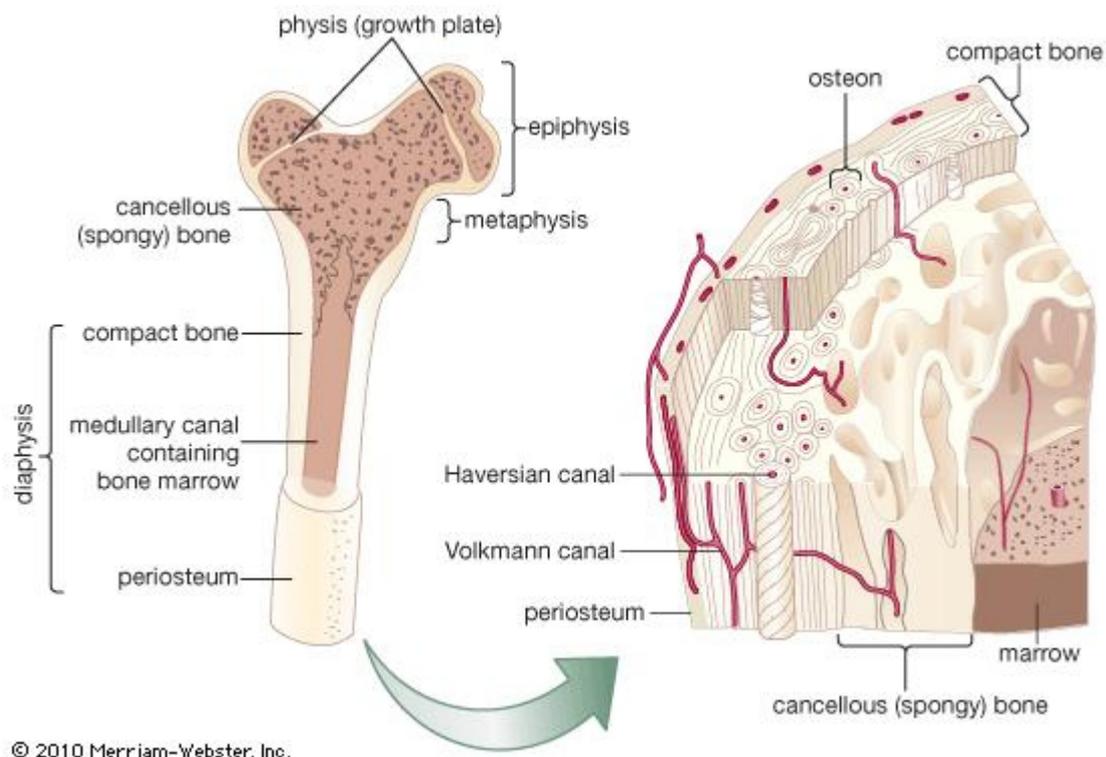


Abbildung 1 Aufbau des Knochens mit Einblick in den strukturellen Aufbau.

All diese Mechanismen und Komponenten des Knochenstoffwechsels stehen mittels unterschiedlichster Mediatoren, die in komplexen Signalwegen strukturiert sind (RANK-RANKL-OPG-System, Wnt- β -Catenin-Signalweg) im Kontakt und bilden ein stark verstricktes Kommunikationsnetz. Sofern es keine Störung in diesem System gibt, kommt es zum physiologischen Wachstum bis zum Abschluss in der späten Pubertät und zum anschließenden ständigen Knochenumbau, sodass etwa 4% des kortikalen und 28% des trabekulären Knochens jährlich ausgetauscht werden [5, 18, 19]. Ist jedoch das System an einer Stelle gestört kann es zu schwerwiegenden Erkrankungen kommen.

1.2. Erkrankungen des Knochenstoffwechsels

Wie zuvor beschrieben kann man zusammenfassend sagen, dass der Knochenstoffwechsel von einem stark vernetzten und sehr komplexen System reguliert wird. Sind alle Komponenten dieses Systems intakt, findet man ein stabiles Skelett, welches ständig erneuert wird. Kommt es zu einem Ungleichgewicht können daraus Krankheiten resultieren. Überwiegt beispielsweise der Knochenaufbau durch einen Defekt des Knochenabbaus kann die relativ seltene Osteopetrose entstehen [20, 21]. Kommt es hingegen zu einem vermehrten Knochenabbau durch gesteigerte Resorption, liegt das weitaus häufigere Krankheitsbild der Osteoporose vor [22-24].

1.2.1. Osteoporose

Die Osteoporose ist eine weltweit verbreitete systemische Skeletterkrankung, bei der durch Abnahme der Knochendichte und einer Verschlechterung des Knochengewebes die Stabilität der Knochen abnimmt und das Frakturrisiko steigt [5, 23, 25, 26]. Hauptmechanismus der Erkrankung ist die Negativbilanz des Knochenumsatzes, welcher sich zuerst durch Veränderung und Abnahme des trabekulären Knochengengerüsts bemerkbar macht. Der kortikale Knochen kann ebenfalls betroffen sein, ist es aber auf Grund seines geringeren Knochenumsatzes erst in fortgeschrittenen Stadien. Daher betrifft die Osteoporose vor allem Knochen mit hohem Anteil trabekulären Knochen [5, 27]. Daher sind die häufigsten Frakturen an den Wirbelkörpern, dem proximalen Femur und den Knochen des Unterarmes (v.A. Radius) zu finden [23, 25, 28].

1.2.1.1. Risiken für die Entstehung einer Osteoporose

Die Osteoporose ist eine systemische Skeletterkrankung, die auf Grund von verminderter Knochenstabilität, das Risiko für Frakturen erhöht. Daher wird die Osteoporose oft mit der Abnahme an Knochendichte, messbar durch Bone mineral density (BMD) in der Doppelröntgen-Absorptiometrie (DXA, dual energy X-ray absorptiometry) synonym verwendet. Jedoch können auch andere Faktoren das Frakturrisiko erhöhen, wie ungünstige anatomische Größenverhältnisse oder kortikale Porosität [29, 30]. Viele Risiken eine Fraktur zu erleiden wurden von John A. Kanis zusammengetragen und daraus das „Fracture Risk Assessment Tool“ (FRAX) entwickelt, welches ergänzend zur BMD-Messung oder selbstständig zur Bestimmung des Frakturrisikos der nächsten 10 Jahre verwendet wird [31]. Einzelne Studien zeigten, dass das FRAX auch ohne BMD eine gute Voraussagewahrscheinlichkeit besitzt [32-34]. Andere Studien jedoch belegten keinen Zugewinn durch das FRAX [35]. Diese Studien verdeutlichen die Notwendigkeit, die Diagnostik der Osteoporose und auch die Wahrnehmung der Ärzte für das Vorliegen einer Osteoporose als Ursache einer Fraktur zu verbessern. Die Eignung des FRAX für die klinische Nutzung muss sich in der Zukunft erst noch beweisen. Aktuell wird daher noch die BMD als Hauptdiagnostikum der Osteoporose verwandt. Jedoch kann auch die BMD sehr variieren und es wird davon ausgegangen, dass der Zeitpunkt an dem sie ihren Höhepunkt erreicht, auch bekannt als Peak bone mass (PBM), ein besserer prognostischer Faktor für das Erkrankungsrisiko der Osteoporose ist [36-38]. Es gibt keine bestätigten Daten, in welchem Alter die PBM erreicht wird. Man geht davon aus, dass es Ende der zweiten/Anfang der dritten Lebensdekade erfolgt. Andere Studien zeigten, dass die PBM für jeden Knochen zu unterschiedlichen Lebenszeitpunkten erlangt wird [36]. Außerdem konnten geschlechterspezifische Unterschiede bei der Entwicklung der Knochendichte festgestellt werden [39]. Faktoren, die die Knochendichte und damit das Osteoporoserisiko beeinflussen sind Genetik, ethnische Herkunft, Umweltfaktoren, Alter, Sexualhormone, Glukokortikoide und Lipidoxidation.

Genetisch konnten bisher etwa 56 Genloki entdeckt werden, die die Knochendichte beeinflussen, von denen 14 direkten Einfluss auf das Frakturrisiko nahmen. Diese Gene kodieren vor allem für Faktoren des RANK-RANKL-OPG-Systems, Wnt- β -Catenin-Signalweges, der Mesenchymalen Stammzellendifferenzierung oder für Ossifikationsprozesse [40, 41].

Ethnische Herkunft scheint ebenfalls eine wesentliche Rolle für das Risikoprofil der Osteoporose zu spielen [42-44]. Wie eine Studie aus dem Jahr 2005 von Barrett-Connor zeigt, war die Knochendichte bei fast 200000 postmenopausalen Frauen unterschiedlicher ethnischer Herkunft sehr verschieden. Afroamerikanerinnen hatten die höchsten, Asiatinnen die geringsten Werte für BMD. Die Knochendichten wurden anschließend in Bezug auf das Körpergewicht verglichen und die Unterschiede konnten damit erklärt werden, bis auf die hohe Knochendichte bei Afroamerikanerinnen. In Bezug auf das Frakturrisiko wurden ebenfalls Unterschiede festgestellt. Lateinamerikanerinnen und „weiße“ Amerikanerinnen waren am häufigsten von Frakturen betroffen [44]. Dies verdeutlicht die Relevanz der ethnischen Herkunft für das Risiko der Entstehung einer Osteoporose und dem damit erhöhten Frakturrisiko.

Umweltfaktoren können eine große Rolle für die Knochenqualität spielen und damit entscheidende Auswirkung auf das Osteoporoserisiko haben. Neben den typischen Umweltfaktoren, wie lange Bettlägerigkeit, Chronische Systemische Entzündungen und Ernährung, sei hier die körperliche Betätigung erwähnt. Diese ist sowohl bei Kindern im Wachstum als auch bei Erwachsenen ein wesentlicher protektiver Faktor. Die Knochendichte eines belasteten Knochens ist wesentlich höher als, die eines Unbelasteten [45-47]. Eine Studie an professionellen Tennisspielern konnte zeigen, dass die Verstärkung des Knochens bei Belastung vor allem durch ein Wachstum des gesamten Knochens erreicht wird. Insbesondere an den distalen Enden von langen Röhrenknochen wird eine Adaptation mittels Verstärkung des trabekulären Knochens vermutet [48]. Außerdem scheint der Grad der Belastung ebenfalls relevant zu sein, da in einer weiteren Studie an postmenopausalen Frauen mit drei unterschiedlichen Belastungsgraden (sitzende Tätigkeit, aktive Tätigkeit aber kein Sport, Ausdauersportlerinnen) festgestellt werden konnte, dass Frauen bei einer leichten bis moderaten Belastung eine höhere Knochendichte aufweisen als bei ausbleibender oder hoher Belastung [47]. Natürlich spielen neben der physischen Belastung noch viele weitere Faktoren aus der Umwelt eine wichtige Rolle für die Knochenqualität und damit auf für das Osteoporoserisiko. Jedoch würden weitere Ausführungen den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

Die Osteoporose, eine Erkrankung des alternden Menschen? Wie bereits bekannt, nimmt das Gleichgewicht von Knochenbildung und -resorption mit dem Alter zu Gunsten der Resorption ab [22, 49, 50]. Aber warum ist das so? Es wird vermutet, dass der mit dem Altern einhergehende Anstieg an reaktiven Oxidantien der Hauptgrund für den Knochenschwund ist. Die reaktiven Oxidantien nehmen Einfluss auf das Überleben und die Regeneration aller Knochenzellen und sind daher wichtige Faktoren im Gleichgewicht des Knochenstoffwechsels [9, 51, 52]. Mit dem Wegfall von Östrogen und Androgenen fällt ein Schutzmechanismus gegen reaktive Oxidantien weg. Dies würde erklären, warum es in der Menopause verstärkt zu Knochensubstanzverlust kommt. Die Glukokortikoidproduktion wird mit zunehmendem Alter gesteigert und auch die Sensitivität nimmt zu, wodurch die Hydrierung des Knochens abnimmt und dieser fragiler wird [9, 51, 52]. All diese Faktoren erhöhen die Wahrscheinlichkeit einer Osteoporosebedingten Fraktur. Etwa die Hälfte aller Frauen über 50 Jahren und ein Fünftel aller Männer über 50 Jahren sind von einer solchen Fraktur betroffen [26]. Zusammenfassend lässt sich deshalb sagen, dass ein höheres Alter als eindeutiger Risikofaktor für die Erkrankung Osteoporose ausgemacht werden kann.

Die Sexualhormone konnten durch reine Beobachtung der Prävalenz als relevanter Einflussfaktor der Osteoporose identifiziert werden. Ein Östrogen- und Androgenüberschuss, wie er zum Beispiel bei Nierenrindentumoren vorkommt, kann zu einem beschleunigten Knochenwachstum führen, welches durch vorzeitiges Verschließen der Wachstumsfugen, jedoch verfrüht abbricht und es insgesamt zu einer verminderten Körpergröße kommt [53, 54]. Jedoch am einfachsten ist der Einfluss der Sexualhormone auf den Knochenstoffwechsel durch die deutlich erhöhte Prävalenz von Osteoporose bei Frauen nach der Menopause festzustellen. Östrogene kommen in beiden Geschlechtern vor und nehmen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel. Somit können auch Männer durch Östrogenmangel, wie zum Beispiel bei Aromatasehemmertherapie, an Osteoporose leiden [55-58]. Östrogen scheint mehrere Angriffspunkte zu haben. Beschrieben sind Wirkungen auf das RANK-RANKL-OPG-System, auf Sklerostin und damit auf den Wnt- β -Catenin-Signalweg, aber auch auf die Produktion von Mediatoren wie TNF- α und IL-1 β [55]. Außerdem konnte der Einfluss von Östrogen auf die Elimination von reaktiven Oxidantien im Rahmen des Alterns bereits vorab beschrieben werden und damit kann den Sexualhormonen, vor allem dem Östrogen, eine Schutzfunktion für altersbedingten Knochenverlust zugesprochen werden

[51]. In Summe konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an Sexualhormonen ein eindeutiger Risikofaktor für die Entstehung der Osteoporose ist.

Glukokortikoidtherapien stellen die häufigste Ursache für die Entstehung einer sekundären Osteoporose da [59-61]. Denn diese, für zahlreiche Erkrankungen sehr wirksam eingesetzten Medikamente, haben auf den Knochenstoffwechsel vielseitige Auswirkungen. Glukokortikoide wirken hemmend auf die Osteoblastenbildung und -aktivität und steigern die Apoptoserate. Damit wird die Knochenbildung reduziert, während durch gesteigerte Bildung von Osteoklasten die Resorption zunimmt [62-64]. Aber nicht nur an den Knochenzellen nehmen Glukokortikoide Einfluss auf den Knochenstoffwechsel, sondern auch die Kalziumresorption am Darm wird reduziert bei gleichzeitiger Steigerung der Kalziumausscheidung aus der Niere [65, 66]. Dadurch entsteht ein Kalziummangel, der durch Abbau von Knochenmaterial behoben werden muss. Die Glukokortikoide bewirken ebenfalls einen Abfall der Sexualhormone [67], dessen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel vorab beschrieben wurde.

Es wird davon ausgegangen, dass eine Glukokortikoidtherapie das Risiko eine Osteoporose zu entwickeln bei postmenopausalen Frauen verdoppelt und das Frakturrisiko sogar verfünffacht [68]. Daher stellen Patienten mit Glukokortikoidmedikation eine wichtige Risikogruppe für die Entwicklung einer Osteoporose dar und sollten besonders gründlich diagnostiziert werden, um eine rechtzeitige Therapie einzuleiten [69, 70].

Die Oxidation von Lipiden und dem damit entstehenden Risiko zur Entwicklung einer kardiovaskulären Erkrankung scheinen ebenfalls relevant für die Entstehung einer Osteoporose zu sein. Es konnte in einigen Studien eine eindeutige Korrelation zwischen Lipidoxidation und Osteoporose gefunden werden [71, 72]. Kardiovaskuläre Erkrankungen und Osteoporose haben generell ähnliche Risiken und eine steigende Prävalenz mit dem Alter. Vermutet wird, dass sich durch Einlagerung von Lipoproteinen und Lipiden im Knochen, welche anschließend oxidieren, zu einer Störung der Osteoblasten kommt. Jedoch ist der genaue Mechanismus noch nicht ausreichend erforscht [73, 74]. Es wird ein Zusammenhang in der durch Lipidoxidation zunehmende Produktion von RANKL vermutet [74-76]. Außerdem konnte eine Korrelation zwischen der Blutviskosität und damit der Flusseigenschaften des Blutes und der Knochendichte gefunden werden. Bei schlechten Flusseigenschaften des Blutes, durch Hyperlipidämie oder Gefäßverlegung durch Arteriosklerose kommt es zur Abnahme der Knochendichte

[77, 78]. Damit ist die Lipidoxidation, die sonst mit den kardiovaskulären Erkrankungen vergesellschaftet ist, ebenfalls ein Risikofaktor für die Entstehung der Osteoporose. Neben den aufgeführten gibt es noch einige weitere Risikofaktoren für Osteoporose. In dieser Arbeit wurden nur die wichtigsten Faktoren erläutert, die für das Verständnis dieser Arbeit wesentlich sind. Bereits anhand der Ursachen konnte gezeigt werden, dass eine immense Bevölkerungsgruppe von der Osteoporose betroffen ist oder ein erhöhtes Risiko besitzt im Verlauf ihres Lebens an dieser zu erkranken. Welches Ausmaß die Erkrankung auf die Bevölkerung und welchen wirtschaftlichen Faktor die Osteoporose einnimmt, wird im anschließenden Kapitel erläutert.

1.2.1.2. Zahlen zur Osteoporose

Zahlen zur Prävalenz und Inzidenz liegen nur unzureichend vor. Insbesondere weil viele osteoporotische Frakturen asymptomatisch bleiben und die Zahl der Patienten mit osteoporotischen Knochen ohne Manifestation in Form einer Fraktur nur schwer zu evaluieren sind. Da die Prävalenz mit zunehmendem Alter steigt, ist aber mit einer Gesamtzunahme der Prävalenz auf Grund der alternden Bevölkerungsstruktur zu rechnen [79-81].

Eine Studie von Hadji, P. untersuchte gesetzlich Krankenversicherte einer Krankenkasse (Techniker Krankenkasse) ab 50 Jahren retrospektiv auf Prävalenz, Inzidenz und Häufigkeit von Frakturen zwischen 2006 und 2009 in Deutschland. Die Prävalenz betrug 14%, wobei fast jede vierte Frau ab 50 Jahren betroffen war (24%). Bei den Männern war die Erkrankung mit 6% deutlich seltener zu diagnostizieren. Die Inzidenz betrug etwa 2,1% pro Jahr, was bedeutet, dass etwa 885000 Personen pro Jahr in Deutschland an Osteoporose erkranken. Über den Zeitraum der Studie konnten bei 52% der Probanden Frakturereignisse, meist sogar mehrere, diagnostiziert werden. Diese Frakturen gehen mit einer erhöhten Mortalität einher und führen zu erheblichen Kosten durch häufige Leistungsansprüchen [82].

Dass die Osteoporose nicht nur Menschen in Deutschland betrifft, zeigt eine europaweite Studie aus dem Jahr 2010. Es wird angenommen, dass 2010 22 Millionen Frauen und 5,5 Millionen Männer in Europa an Osteoporose litten. Bei diesen kam es zu ca. 3,5 Millionen Osteoporose-bedingten Frakturen [79]. Die medizinischen Kosten diese Frakturen zu therapieren, aber auch die wirtschaftlichen Kosten, die durch Arbeitsausfall oder notwendiger privater Pflege entstehen, werden auf 37 Billionen Euro geschätzt.

Diese werden bis 2025 vermutlich um 25% ansteigen. In den USA wurden für 2005 Kosten von 17 Billionen Dollar ermittelt, wobei sogar ein Anstieg von 50% bis 2025 erwartet wird [83]. Diese Zahlen sollen verdeutlichen, dass nicht nur aus gesundheitlichen Aspekten, sondern auch aus wirtschaftlicher Sicht ein enormer Handlungsbedarf zur Prävention und Verbesserung der Therapie der Osteoporose besteht.

1.2.1.3. Therapieansätze der Osteoporose

Zur Therapie der Osteoporose gibt es mehrere Ansatzpunkte. Ein Wesentlicher, insbesondere bei Patienten mit Frakturereignis, ist die Beurteilung von Mobilität, Sturzgefahr und Refrakturrisiko. Es sollte stets eine psychosoziale Betreuung erfolgen, um Gefahrenquellen, die eine erneute Fraktur bewirken könnten zu beseitigen und Patienten die Angst vor erneuten Ereignissen zu nehmen und damit den Teufelskreis der weiteren Mobilitätseinschränkung zu durchbrechen [84]. Denn wie oben beschrieben stellt Immobilität ein Risiko für die Entstehung oder Verschlechterung einer Osteoporose dar. Daher ist das Animieren der Patienten zu körperlicher Aktivität ein wichtiger Therapiebestandteil. Es konnte gezeigt werden, dass physikalische Belastung auf den Knochen die Knochenqualität verbessert und das Frakturrisiko senkt [47, 85-90]. Hierbei sei erwähnt, dass stets Begleiterkrankungen berücksichtigt werden müssen und eine ausreichende Konzentration von Calcium und Vitamin D im Patientenserum vorliegt [85, 91]. Diese Therapieschritte bedürfen einer hohen Compliance und sind oft nicht ausreichend um die Knochendichte ausreichend zu steigern beziehungsweise das Frakturrisiko ausreichend zu senken. Deshalb kommt es zu Kombination mit einer Pharmakotherapie. Medikamente, die sich negativ auf die Knochenbilanz auswirken, sollten generell vermieden werden [84]. Des Weiteren wird Patienten mit Kalzium- oder Vitamin-D-Mangel eine Substitution empfohlen [84]. Diese sollte auch stets beim Verwenden einer antiresorptiven Therapie angewandt werden. Bei postmenopausalen Frauen mit Osteoporose konnte eine Reduktion des Frakturrisikos von 18% beobachtet werden [92]. Sexualhormonsubstitution bewirkt reichlich Nebenwirkungen und sollte, daher auch erst bei Unverträglichkeit oder unzureichender Wirkung anderer Medikamente eingesetzt werden [84]. Bisphosphonate stellen die Gruppe der gängigsten und wirksamsten Medikamente zur Osteoporosetherapie dar. Es werden Frakturrisikoreduktionen für Wirbelkörper von 30%-70% und von 25%-51% für alle anderen Knochen angegeben [92, 93]. Allerdings gibt es noch keine Daten zur

Langzeitbehandlung mit Bisphosphonaten und ein kontroverser Effekt wird auf Grund der mit Bisphosphonaten assoziierten Reduktion des Knochenumsatzes befürchtet, da schon jetzt eine Zunahme an atypischen Femurfrakturen und Kiefernekrosen unter der Therapie beobachtet werden konnte [92, 94, 95]. Ein neueres Medikament, das ebenfalls über die Hemmung der Resorption (Hemmung der Osteoklasten) wirkt ist das Denosumab. Ein monoklonaler Antikörper der eine gezielte Hemmung am RANK-Liganden bewirkt [14, 96]. Inwiefern sich das Nebenwirkungsprofil und die Wirksamkeit im Vergleich zu Bisphosphonaten verhält, ist aktueller Gegenstand der Forschung.

Ein anderer strategischer Angriffspunkt und der zurzeit Einzige, der die Knochenbildung fördert, ist die Therapie mittels Parathyroid Hormon (PTH). Dieses eigentlich aus dem Calciumstoffwechsel stammende Hormon sorgt für eine Zunahme der Osteoblastenzahl durch verstärkte Proliferation und Differenzierung und reduzierter Apoptose [97-99]. Dadurch konnte eine Frakturrisikoreduktion von 65% für Wirbelkörper bei Patienten mit ausgeprägter Osteoporose erzielt werden [92]. Aber auch hier fehlen noch Studien für die Langzeitwirksamkeit und es konnte bereits in Studien gezeigt werden, dass bei periodischer Anwendung aus der osteoanabolen Wirkung des PTHs eine osteoanabolen wird, welche das Krankheitsbild der Osteoporose noch verschlimmern kann [100, 101]. Außerdem kann es unter der Therapie mit PTH zu schweren Hypercalcämien kommen [102-104], die Darreichungsform ist mit täglichen subkutan Injektionen sehr aufwendig und setzt eine hohe Compliance voraus, bei einer Studie mit Ratten bewirkte es Osteosarkome und andere Knochentumore [105] und die Kosten der Therapie sind sehr hoch [106]

Zusammenfassend kann man sagen, dass seit Anerkennung der Osteoporose als eine schwerwiegende Volkserkrankung, insbesondere auch aus volkswirtschaftlichem Aspekt, die Notwendigkeit der Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten dringend geboten ist. Die bisher entwickelten Medikamente und Therapieansätze liefern nur unzureichende Verbesserung der Knochenqualität und gehen oft mit hohen Kosten und reichlich Nebenwirkungen einher. Seit der Entwicklung der Knochendichtemessung, kann bereits vor einem Frakturereignis die Osteoporose diagnostiziert werden. Jedoch ist die Entwicklung einer primären Prophylaxe das wissenschaftliche Ziel. Aus diesem Grund erforschen Arbeitsgruppen weltweit den Knochenstoffwechsel und entwickeln neue Therapiestrategien.

1.3. Sklerostin

Ein Ansatz, mit dem sich auch meine Arbeitsgruppe beschäftigt, ist die Wirkung von Sklerostin, ein Produkt des SOST-Genes. Es bietet einen neuen Ansatzpunkt, der eine positive Knochenbilanz bewirken soll, jedoch ohne eine unkontrollierte überschießende Knochenproduktion zu erzeugen.

1.3.1. Entdeckung

Sklerostin wurde bei der Untersuchung einer weiteren Knochenerkrankung entdeckt: der Sklerosteose. Diese sehr seltene Erkrankung geht mit einer Mutation des SOST-Genes einher, womit die Produktion von Sklerostin gestört ist [107, 108]. Bei einem Mangel an Sklerostin kommt es zu einer Zunahme der Knochenmasse bei Mensch und Maus [107, 109, 110]. Es gibt jedoch keine Langzeitergebnisse oder ist der Wirkmechanismus vollends verstanden. Bei der Sklerosteose kommt es zu Missbildungen des Kiefers und der Fingerglieder [111, 112]. Gigantismus und eine Hyperosteose des Schädels sind ebenfalls zu beobachten. Die Hyperosteose führt zur Einengungen von Nervendurchtrittspunkten und damit einhergehender Nervenschädigung (z.B. Fazialisparese, Surditas) [112]. Daher muss geklärt werden, ob eine Manipulation des Sklerostingleichgewichts auch ohne diese unerwünschten Effekte der Sklerosteose möglich ist. Hoffnung gibt hierbei die Van Buchem Krankheit, eine Erkrankung die einen ähnlichen Phänotyp wie die Sklerosteose bewirkt, aber, zumindest bei dominanter Vererbung, milder verläuft und weniger unerwünschte Symptome zeigt [113].

Diese Beobachtungen führten zu der Vermutung, dass das bei beiden Erkrankungen mutierte SOST-Gen relevant für den Knochenumbau ist. Das Gen kodiert für das Hormon Sklerostin, welches die Knochenbildung hemmt. Durch Funktionsverlust dieses Genes kommt es zum Phänotyp des stetig zunehmenden Knochens bei ausbleibender Hemmung durch besagtes Sklerostin [19, 114, 115]. Diese Vermutung erhärtet sich durch den gegensätzlichen Effekt, dass bei erhöhten Konzentrationen von Sklerostin ein Knochenverlust beobachtet werden konnte [116-118].

1.3.2. Wirkung

Durch Färbung verschiedener Zellen konnte nachgewiesen werden, dass Sklerostin von Osteozyten sezerniert wird nachdem sie in die mineralisierte Matrix eingebaut wurden und so die weitere Knochenbildung hemmen [119]. Daraufhin untersuchte man die Auswirkung von Belastung und stellte fest, dass die Expression von Sklerostin durch die Osteozyten vermindert wurde und die Knochenmasse anstieg [120, 121]. Durch die Beobachtung und Untersuchung von Sklerosteose-Patienten und den daraus gewonnenen Erkenntnissen kann man davon ausgehen, dass Sklerostin den Knochenaufbau, also die Osteoblasten, inhibiert, aber die Osteoklasten nicht beeinflusst. Sklerostin scheint auf der Knochenoberfläche von den Osteozyten sezerniert zu werden und sowohl zu den reifen als auch zu den unreifen Osteoblasten transportiert zu werden. Dort bewirkt es eine Inhibition der Osteoblastendifferenzierung als auch -funktion und induziert die Apoptose der Osteoblasten [115, 122, 123].

Doch wie wirkt Sklerostin an den Osteoblasten? Zuerst wurden angenommen, dass es sich um einen Antagonisten der Knochenmorphogenetischen Proteine (englisch: bone morphogenetic proteins, BMPs) handelt [115, 117], da die Wirkung auf Osteoblasten sehr ähnlich erschien und Bindungen von Sklerostin an bekannten BMPs beobachtet wurden. Jedoch konnte van Bezoijens Arbeitsgruppe 2004 zeigen, dass Sklerostin andere Effekte zeigte als die klassischen BMP-Antagonisten und zum Beispiel die typische Inhibition der Alkalischen Phosphatase Aktivität, welche von den BMPs reguliert werden kann, durch Sklerostin nur bedingt erreicht werden konnte [123]. Ergänzend wurde noch verdeutlicht, dass Sklerostin keine BMP-Antagonistisch typischen Eigenschaften besitzt, wie die Inhibition der Smad-Phosphorylierung, die Aktivierung eines BMP-responsiven Reportergenes und die direkte Transkriptionsaktivierung des MSX-2-Genes. Diese Beobachtungen widersprechen der Vorstellung Sklerostin als einen typischen BMP-Antagonisten einzustufen.

Im weiteren Verlauf konnte nachgewiesen werden, dass Sklerostin den kanonischen Wnt- β -Catenin Signalweg antagonisiert [124]. Dieser ist der am meisten erforschte und bisher am besten verstandene Signalweg der Wnt-Familie. Wnt steht für „wingless“ aus Beobachtungen mit der Taufliege *Drosophila melanogaster*, bei der durch eine Mutation des wingless-Genes ein flügelloser Phänotyp entstand, und Int-1, welches zu Tumovirus-induzierten Mamma-Karzinomen in Mäusen führte. [125, 126] Nachdem gezeigt werden konnte, dass es sich um Sequenzhomologe Gene handelt, wählte man den gemeinsamen Namen Wnt1 [127, 128]. Der Signalweg wurde in den letzten 25

Jahren erforscht und es konnten bereits 19 Wnt Gene im menschlichen Genom gefunden werden [129]. In Abwesenheit der Wnt-Proteine kommt es in den Zellen zur Phosphorylierung von β -Catenin durch einen Komplex, wodurch die Ubiquitinierung und der Abbau durch das Proteasom erfolgen können. Dadurch wird die Konzentration von β -Catenin gering gehalten [129, 130]. Kommt es zur Bindung des Wnt-Proteins an einen Zellmembranrezeptor Frizzled, bindet dieser Komplex an das Low-density lipoprotein receptor-related proteins 5 oder 6 (LRP5/6). Anschließend wird durch die Bindung eine Konformationsänderung bewirkt und somit Kinasen aktiviert. Es kommt zur Phosphorylierung der zytoplasmatisch gelegenen Strukturen der LRP5/6 und der Bindung des Axins, ein Bestandteil des β -Catenin Phosphorylierungskomplexes. Dadurch wird ein Funktionsverlust des Komplexes erzielt und die β -Catenin-Phosphorylierung bleibt aus. Folglich steigt die β -Catenin-Konzentration und es folgt intrazellulär eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren [129-131].

Es wurden viele Regulatoren dieses Signalweges entdeckt, einer ist das Sklerostin. Sklerostin bindet an LRP5/6 und verhindert die Bindung der Wnt-Proteine und folglich die Signalkaskade [124, 132, 133]. Diese Vermutung wird durch phänotypische Beobachtungen unterstützt. Kommt es zu einer Mutation des LRP5, kann kein Wnt-Protein binden und es führt phänotypisch zur Osteoporosis Pseudoglioma. Diese Erkrankung ist geprägt von angeborener Blindheit und seit der Kindheit bestehender schwerer Osteoporose [134, 135]. Entgegengesetzt zeigt sich der Phänotyp bei ausbleibenden Inhibitoren, wie bei Mutation des SOST-Genes oder des G171V-Genes, welches für einen weiteren Inhibitor Dickkopf 1 (DKK1) kodiert. Es kommt zu erhöhter Knochenmasse phänotypisch ähnlich den der Sklerosteosepatienten [117, 134, 136].

Diese Wirkungen des Sklerostins auf den Wnt- β -Catenin-Signalweg machen es zu einem wichtigen Regulator des Knochenstoffwechsels, insbesondere für die Knochenformation und -remodellierung und somit für die Knochenmasse. Ziel der Forschung ist es, den Wirkmechanismus von Sklerostin genau zu verstehen und als möglichen Ansatzpunkt für die Therapie der Osteoporose zu identifizieren.

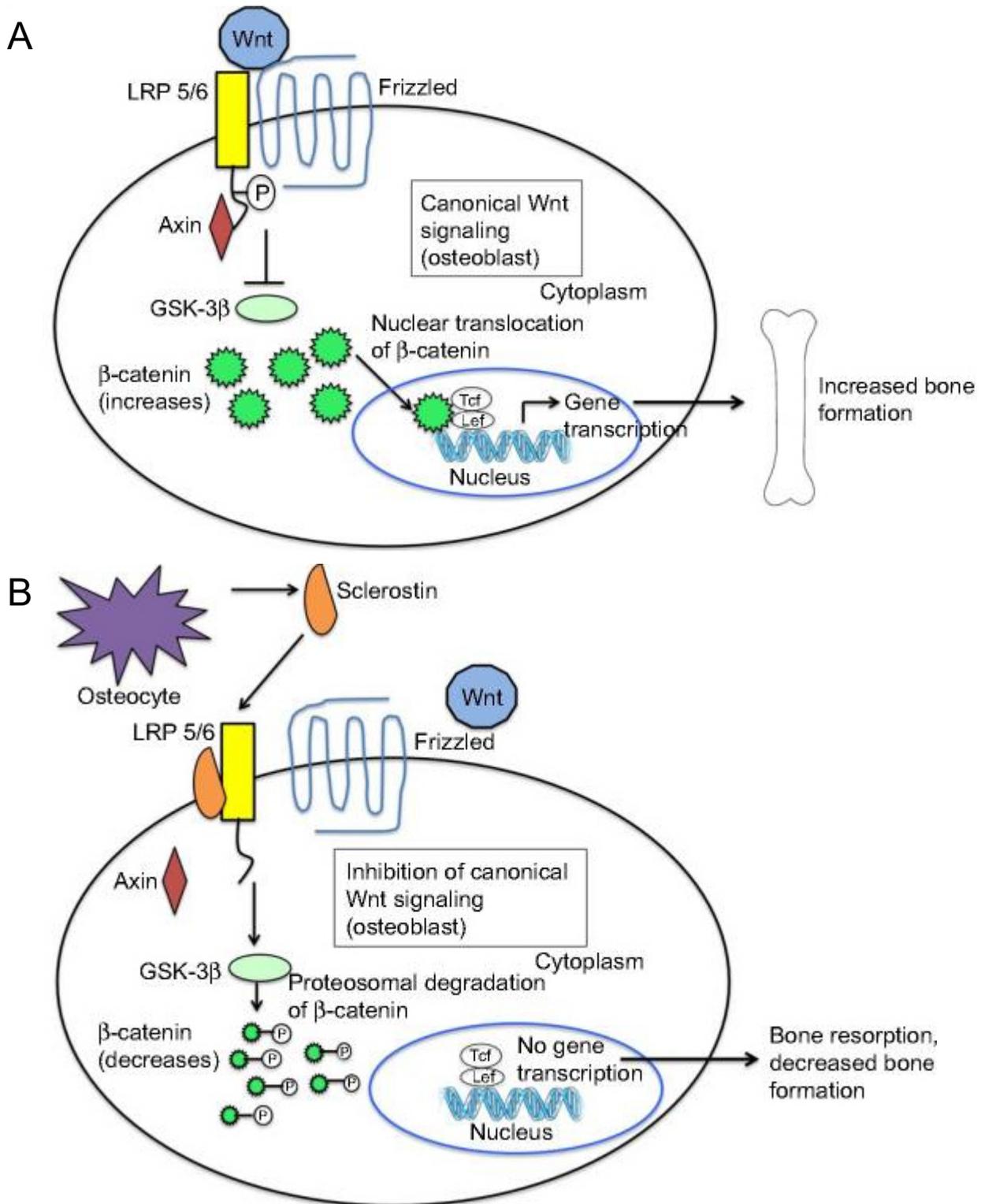


Abbildung 2 Wirkungsmechanismus von Sklerostin im Wnt-β-Catenin-Signalweg (A) zeigt den Wnt-β-Catenin-Signalweg im regulären Ablauf und (B) zeigt die Inhibitionsfunktion des Sklerostins auf den Wnt-β-Catenin-Signalweg.

1.3.3. Stand der aktuellen Forschung

Monoklonale Antikörper, wie Romosozumab und Blosozumab, die eine selektive Inhibition von Sklerostin ermöglichen, befinden sich bereits in klinischen Studien der Phase III [137, 138]. Doppelblinde randomisierte Studien der Phase I konnten zeigen, dass sowohl Romosozumab [139] als auch Blosozumab [138] eine gute Verträglichkeit aufweisen und keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auftreten. Vielmehr konnten bereits in Phase II Studien eine Erhöhung der Knochendichte bei Sklerostin-Antikörper Therapie nachgewiesen werden vor allem für Lendenwirbelkörper und Hüftknochen, sodass beide Studienleiter eine Fortsetzung der Erforschung dieser monoklonalen Antikörper empfehlen und diese als potenzielle Therapie der Osteoporose ansehen. Leider wurden diese Erkenntnisse für Romosozumab [137] und Blosozumab [140] nur bei postmenopausalen Frauen gewonnen, wodurch keine Aussage über den Therapieeffekt bei männlichen Probanden gefällt werden kann. Nur die Phase I Studie von Padhi in 2013 untersuchte die Verträglichkeit des Antikörpers Romosozumab auch bei Männern und lässt zumindest vermuten, dass sich die Verträglichkeit der Therapie nicht durch das Geschlecht des Patienten beeinflussen lässt [139]. Jedoch sind zur Bestätigung dieser Vermutung weitaus größere Fallzahlen zu untersuchen. Es bleibt Gegenstand der Forschung Wirkung, Verträglichkeit, Therapieeffekte und mögliche Interaktionen mit anderen Therapeutika geschlechterspezifisch zu untersuchen.

1.4. Geschlechterrelevanz

Wie die Zahlen bereits zeigten, ist die Osteoporose eine Erkrankung, die mehr Frauen als Männer betrifft. Wieso ist das so? Ist die Menopause, der einzige Grund für die höhere Prävalenz? Benötige ich überhaupt Therapien für Männer mit Osteoporose, wenn die Prävalenz viel geringer ist als bei Frauen?

1.4.1. Die Osteoporose, eine Erkrankung der postmenopausalen Frau?

Die Osteoporose betrifft vor allem ältere Menschen. Die National Osteoporosis Foundation (NOF) schätzte 2002 die Anzahl der Osteoporose Patienten über 50 Jahren in den USA auf 7,8 Millionen Frauen und 2,3 Millionen Männer. Dazu kommen die Patienten mit Osteopenie beziehungsweise niedriger Knochenmasse (21,8 Millionen Frauen und 11,8 Millionen Männern), welche ein hohes Risiko haben eine Osteoporose zu entwickeln. Bis zum Jahr 2020 wird ein Anstieg der Betroffenen vermutet und es könnten 10,5 Millionen Frauen und 3,3 Millionen Männer an Osteoporose erkranken. Dazu werden 2020 vermutlich 30,4 Millionen Frauen und 17,1 Millionen Männer eine Osteopenie aufweisen. Durch diesen Anstieg ist die Gesundheit von 44 Millionen US-Amerikaner über 50 Jahren 2020 gefährdet, wodurch 55% der über 50-jährigen betroffen wären [141]. Trotz der hier anschaulich erkennbaren höheren Prävalenz der Frauen ist auf Grund der hohen Patientenzahlen der Mann als Patient nicht zu vernachlässigen. Insbesondere, da die Aussagekraft der Daten für Männer im höheren Alter durch die abnehmende Fallzahl schwindet, sollten auch Männer als bedeutsame Patientengruppe erkannt werden [142]. Allein die finanziellen Kosten für die Behandlung der durch Osteoporose betroffenen Männer wurden 2005 auf 4,15 Milliarden Dollar von insgesamt 16,9 Milliarden Dollar Gesamtkosten geschätzt [83].

Das Risiko für vertebrale Frakturen ist doppelt so hoch für Frauen wie für Männer und für nicht vertebrale Frakturen sogar 2,5-fach erhöht [143, 144]. Es wird vermutet, dass der Unterschied im Frakturrisiko durch die unterschiedliche Knochendichte der Geschlechter bedingt ist, die unter anderem durch einen verstärkten Knochenmasseverlust bei Frauen zu erklären ist. Frauen weisen in einigen Studien generell geringere Knochendichteparameter auf als altersgleiche Männer [145-147]. Männer haben mit 20-30 Jahren eine höhere Peak-bone-mass (PBM) und gleichen altersbedingten Knochendichteverlust durch Knochenwachstum im Durchmesser aus. Dieses Phänomen konnte bei Frauen nicht beobachtet werden [39]. Ebenfalls konnte eine Tendenz

beobachtet werden, dass sich trabekulärer Knochen bei Frauen über 50 Jahren eher auflöst als bei gleichaltrigen Männern [39, 148].

Zusammenfassend scheinen Männer den stabileren Knochen zu besitzen und daher auch seltener an Osteoporose zu erkranken und folglich ein geringeres Frakturrisiko zu besitzen. Ursächlich für diese Unterschiede sind zum einen die Sexualhormone, denn auch Testosteronmangel, sowie Östrogenmangel bei Männern, führt zu reduzierter Knochenmasse [57, 149, 150]. Die Unterschiede in der Ausbildung des erwachsenen Skelettes, der Einfluss der Sexualhormone und die unterschiedliche Reaktion des Knochens in Bezug auf das Altern sind die aktuell zu verstehenden Mechanismen und Schwerpunkt der momentanen Knochenforschung. Diese Geschlechterdifferenzen aufzufindig zu machen helfen nicht nur den Knochenmetabolismus besser zu verstehen, sondern liefern auch potenzielle Therapiestrategien für die Osteoporose. Dadurch könnte das Frakturrisiko von Millionen von Frauen weltweit drastisch gesenkt werden.

Jedoch darf der Bedarf des Mannes bei der Erforschung zukünftiger Osteoporosetherapien nicht vernachlässigt werden. Denn obwohl Frauen eine erhöhte Frakturwahrscheinlichkeit aufweisen, besitzen Männer das schlechtere Outcome nach einer Fraktur [151-153]. Eine Meta-Analyse konnte zeigen, dass nach Hüftfrakturen die Mortalität bei Männern (80 Jahre) mit 18% für das erste Jahr nach Fraktur deutlich höher ist als bei Frauen (80 Jahre) mit 8% [151]. In einer amerikanischen Studie wird sogar von 30% für Männer zu 17% für Frauen gesprochen, wobei die Osteoporose-assoziierte Mortalität höher wäre als die des Mamma- oder Zervix-Karzinoms [154]. Weiterhin ist die Forschung beziehungsweise die klinische Testung von pharmakologischen Präparaten oft auf postmenopausale Frauen als Probandengruppe bezogen und die Wirkung und Verträglichkeit der Präparate nur unzureichend für beide Geschlechter getestet [155, 156]. Männer haben eine deutlich geringere Wahrscheinlichkeit nach einer Fraktur eine Knochendichtemessung oder eine Osteoporosetherapie zu erhalten [157, 158]. Selbst nach mehreren Frakturen in kurzer Zeit (innerhalb eines Jahres) werden 75,9% der Männer nicht behandelt [159]. In einzelnen Einrichtungen ist diese Diskrepanz bereits erkannt worden und es wurden Programme entwickelt, die ein besseres Screening und frühere Therapieoptionen ermöglichen. Eines dieser Disease-Management Programme wurde für einen Zeitraum von 6 Jahren getestet und evaluiert. Es wurden 263% mehr Knochendichtemessungen bei Frauen und sogar 914% mehr bei Männern durchgeführt. Dadurch wurden 153% mehr Osteoporosemedikationen verordnet und die Rate an Hüftfrakturen zwischen 2002 und 2007 war 38% geringer als erwartet [154, 160]. Diese

Zahlen lassen hoffen, dass die Osteoporose in Zukunft besser erkannt und früher therapiert werden kann. Jedoch zeigte eine Umfrage unter 171 Orthopäden in den USA, dass zwar 68% der Meinung sind, als Orthopäden für das Verschreiben von Osteoporosemedikamenten verantwortlich zu sein, aber 47% befürchten mögliche Nebenwirkungen und verschreiben deshalb Keine. 32% waren der Meinung, dass die Einleitung der Therapie die Aufgabe des Hausarztes sei [161].

Diese Zahlen bestätigen die Notwendigkeit der Weiterentwicklung des Osteoporose-Managements auch auf interdisziplinärer Ebene, aber auch die Erforschung und Entwicklung neuer nebenwirkungsarmer Medikamente für ein sorgenfreieres Rezeptieren.

1.4.2. Geschlechterrelevanz in der Knochenforschung

Wie mehrmals erwähnt ist die Forschung um den Knochenstoffwechsel vor Allem auf postmenopausale Frauen fokussiert. Es gibt nur wenige Studien mit Männern, insbesondere in der Forschung um Sklerostin. Auch die Tierversuche um Sklerostin werden meist im weiblichen Mausmodell durchgeführt. Dabei konnten Unterschiede in der Konzentration von Sklerostin bereits festgestellt werden [162]. Bei Männern waren deutlich höhere Sklerostinkonzentrationen im Serum festzustellen als bei gleich alten Frauen. Zwar konnte keine Signifikanz mehr festgestellt werden, nach Angleichen der Sklerostinkonzentration an Alter, Mineralgehalt des Knochens, Body-Mass-Index (BMI), physische Belastung und Nierenfunktion, jedoch gibt es erste Hinweise auf Geschlechterspezifische Unterschiede bezüglich Sklerostin. Diese Ergebnisse werden unterstützt von einer Studie aus dem Jahre 2014 [163], die ebenfalls erhöhte Sklerostinparameter bei Männern feststellte. Doch würden höhere Konzentrationen eigentlich eine geringere Knochenbildung bewirken und damit eine geringere Knochendichte, jedoch haben Männer generell stärkere Knochen als Frauen. Möglicherweise ist der Wirkmechanismus von Sklerostin geschlechterspezifisch oder Männer haben andere Mediatoren zur Signalübertragung wie zum Beispiel Dickkopf-1 (DKK-1), welches geringere Konzentrationen aufwies als bei Frauen [163]. Physische Aktivität ist ein protektiver Faktor der Osteoporose und wirkt auch auf die Sklerostinkonzentration. Angenommen wird, dass die Osteozyten die Mechanosensoren des Knochens darstellen und durch einen noch unbekanntem Mechanismus den Knochenmetabolismus in Abhängigkeit von Belastung regulieren können. Bei Belastung

kommt es unter anderem zu einer Reduktion der Sklerostinexpression durch Osteozyten [120, 164-167]. Folglich kommt es zur erhöhten Knochenbildung. Das Ergebnis, die Steigerung der Knochenmasse durch mechanische Belastung, konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden [49, 168-171]. Diese Studien zeigen auch, dass die Reaktion des Knochens auf physische Belastung mit dem Alter abnimmt. Leider wurde, wie so häufig in der aktuellen Knochenforschung, das weibliche Mausmodell verwendet und die Aussagekraft der Erkenntnisse für das Männliche bleibt aus. Trotz des reduzierten Ansprechens des Knochens auf physische Belastung im höheren Alter kann das Frakturrisiko durch diese reduziert werden [89, 90]. Auch bei dem Aspekt der physischen Belastung können geschlechterspezifische Unterschiede auftreten, die einer gründlicheren Erforschung bedürfen. Erste Hinweise diesbezüglich ergeben sich durch die Ergebnisse einer longitudinalen Studie in Amsterdam, bei der eine moderate physische Belastung mit der Knochenqualität bei Frauen assoziiert werden konnte, während Leistungsfähigkeit und Stärke des Handgriffes bei Männern mit der Knochenqualität vergesellschaftet waren [172]. Weitere Studien zum Detektieren von Geschlechterunterschieden sind von Nöten, um zum einen den Mann als Osteoporosepatienten optimal zu behandeln, aber auch um zum anderen den Knochenmetabolismus besser zu verstehen und gegebenenfalls die physiologischen Differenzen für die Therapieentwicklung zu nutzen.

1.4.3. Geschlechterrelevanz in Bezug auf den Wnt/ β -Catenin Signalweg

Es gibt Hinweise, dass das Geschlecht relevanten Einfluss auf den Wnt/ β -Catenin Signalweg und die belastungsbedingte Knochenadaptation hat. Es bleibt jedoch unklar, warum weibliche SOST-KO Mäuse eine größere Knochendichte (BMD; bone mineral density) besitzen als männliche [173]. Mehrere Studien zeigen, dass die Geschlechter in ihrer Reaktion auf das Ausschalten eines Teils des Wnt/ β -Catenin Signalweges signifikante Unterschiede aufweisen. So berichten Kramer et al. [174] von einer ca. 25% Reduktion des trabekulären Knochenvolumens bei weiblichen Mäusen, bei männlichen Mäusen wurde nur eine Reduktion von 10% beobachtet. Beide Geschlechtergruppen waren 8 Wochen alt und ein einziges β -Catenin-Allel in den Osteozyten wurde ausgeschaltet (Heterozygote Osteozyten-spezifisches β -Catenin cKO Mäuse; HET cKO Mäuse). In dieser Studie konnte ein schnellerer und meist auch stärkerer Knochenverlust bei weiblichen Versuchstieren im Vergleich Männlichen erkannt werden und gleichzeitig

konnte eine höhere Sensitivität auf die Modulation des Wnt/ β -Catenin Signalweges für das weibliche Mausmodell festgestellt werden.

Die damit deutlich gezeigte Notwendigkeit der Unterscheidung in der Betrachtung zwischen männlichen und weiblichen Mäusen ist den zitierten Autoren bewusst, jedoch wird nur auf die Relevanz von weiteren Studien zur Differenzierung hingewiesen. Zwei weitere Studien, die sich mit der Untersuchung von mechanischer *in vivo* Belastung im Zusammenhang mit dem Mangel eines mit dem Low-Density-Lipoprotein-Rezeptor verwandten Proteins 5 (Lrp5) im Mäusemodell beschäftigten, wiesen deutliche Geschlechterunterschiede in ihren Ergebnissen auf. Sklerostin bindet an transmembran Low-Density-Lipoprotein Rezeptor verwandtes Protein 5/6 (LRP5/6) und löst anschließend den Wnt-Signalweg aus [110]. Sawakami et al. [175] zeigten, dass eine größere Suppression des belastungsabhängigen Knochenbaus bei weiblichen Lrp5-defizienten Mäusen zu erkennen ist als bei den männlichen. Saxon et al. [176] berichteten, dass Lrp5^{HBM+} Mäuse ebenfalls geschlechtsspezifisch in der Knochenformation auf Belastung reagierten. Beide Autoren waren nicht in der Lage, den Geschlechterunterschied in ihren Beobachtungen zu erklären.

Für Sklerostin ist die Datenlage in Bezug auf Geschlechterspezifität mangelhaft, obwohl die eben erwähnten Studien vermuten lassen, dass auch in Bezug auf Sklerostin Differenzen bestehen können.

Es konnte in einer Studie beobachtet werden, dass kein additiver Effekt von Sklerostininhibition und mechanischer Belastung erreicht werden kann, da beide Mechanismen über die Inhibition von Sklerostin wirken [167]. Jedoch konnte Morse et. al. 2014 zeigen, dass es unabhängig von Sklerostin unter Belastung noch zu einer Zunahme der kortikalen Dicke kommen kann [177]. Leider haben beide Studien ihre Limitationen und es bedarf weiterer Untersuchungen diese Aussagen zu prüfen. Eine wichtige Limitation ist vor allem die Wahl des weiblichen Mausmodelles als einzige Probandengruppe. Damit ist es wiederum nicht möglich eine genaue Aussage zu männlichen Versuchstieren zu tätigen und der Bedarf an einer geschlechterspezifischen Untersuchung dieses Problems wird verdeutlicht. Zum anderen wurden nur junge (10 Wochen alte) SOST-KO Mäuse untersucht. Daher bleibt ungeklärt, wie ältere Versuchstiere reagieren und ob eine andere Reaktion im männlichen Mausmodell in Abhängigkeit vom Alter beobachtet werden kann.

All diese Studien zeigen deutlich die Notwendigkeit zur weiterführenden Erforschung der geschlechterabhängigen Unterschiede im Wnt/ β -Catenin Signalweg bei gleichzeitiger mechanischer *in vivo* Belastung.

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Sklerostin-Inhibition und physische Belastung sind zwei Methoden zur Erhöhung der Knochenmasse und damit der Reduktion von Osteoporose und mit ihr assoziierter Frakturen. Diese Arbeit möchte an Hand des Mausmodelles diese Effekte in Bezug auf kortikale und trabekuläre Knochenparameter untersuchen. Dabei dient die linke Tibia als zu untersuchender Knochen und intraindividuell die rechte Tibia als Kontrollknochen. Zum einen wird die mittlere Diaphyse zur Beurteilung des kortikalen Knochens, zum anderen die proximale Metaphyse zur Beurteilung des trabekulären Knochens untersucht. Ergänzend soll die knöchernen Reaktion im ausgewachsenen Skelett geprüft werden und die Reaktionen auf Sklerostin-Inhibition und Belastung zwischen jungen (10 Wochen) und erwachsenen (26 Wochen) Knochen verglichen werden. Außerdem wurde für diesen Versuch das männliche Mausmodell gewählt, um mögliche geschlechterspezifische Reaktionen zu evaluieren. Dafür werden die in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse mit den Beobachtungen eines identischen Experimentes im weiblichen Mausmodell verglichen.

Hypothesen dieser Arbeit:

- Chronische Sklerostin-Inhibition bewirkt eine Steigerung der Knochenmasse kortikal und trabekulär bei jungen und erwachsenen Mäusen.
- Belastungsinduzierte Knochenbildung und -resorption sind unabhängig von Sklerostin-Inhibition im männlichen Mausmodell
- Knochenbildung ist durch die Ausreifung des Skelettes mit zunehmendem Alter abgeschwächt, während die Knochenresorption zunimmt.
- Sklerostin-Inhibition bewirkt als Reaktion auf Belastung ein stärkeres Knochenwachstum im weiblichen Mausmodell als im Männlichen.

2. Methodik

Ein genehmigter Tierversuchsantrag mit der Kennung Reg 0168/13 liegt vor. Die Grundsätze der Charité-Universitätsmedizin Berlin zur Guten Wissenschaftlichen Praxis wurden zu jeder Zeit eingehalten.

Alle beschriebenen Experimente wurden nach den Tierschutzrechtlichen Ordnungen für das experimentelle Arbeiten mit Versuchstieren nach dem Institut für wissenschaftliches Arbeiten mit Versuchstieren des Landesamtes für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin durchgeführt und die Dokumentation erfolgte nach § 9 des Tierschutzgesetzes in Verbindung mit § 29 der Tierschutz-Versuchstierverordnung.

2.1. Tierzucht und Genotypisierung

Als Modell des Belastungsversuches wurde auf Grund der hohen Vergleichbarkeit das häufig verwendete Mausmodell der C57Bl/6 Maus gewählt. Zum Erhalt der erwünschten genetischen Grundlage einer SOST-KO Maus wurde uns das Sperma von zwei männlichen SOST^{-/-} Mäusen von Novartis zur Verfügung gestellt. Die Injektion des Spermas intrazytoplasmatisch in die Oozyten von weiblichen C57Bl/6 Mäuse erfolgte in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Universitätsklinik der Charité. Die gezüchtete heterozygote erste Generation wurde untereinander erneut gekreuzt und in der zweiten Generation wurden die homozygoten SOST-KO Mäuse und Kontrollmäuse (mit Sklerostinexpression) mittels Multiplex-PCR identifiziert. Die Gewinnung der Proben für die PCR erfolgte durch Schnitte am Schwanz der Maus und die Analyse erfolgte nach ein von Novartis bereitgestellten Protokoll.

Primer zur Identifikation des Genoms waren:

1. SOST-spezifisches Endogen 5' TCC ACA ACC AgTCggAgC TCA Agg 3'
2. SOST-spezifisches Endogen und Target 5'ACT CCA CAC ggTCggAAAgTTTg g 3'
3. Neo-Target 5'gggTgggAT Tag ATA AAT gCCTgC TCT 3'

Die Primer wurden von TIB MOLBIOL, Berlin, Deutschland bereitgestellt. Die SOST-KO Mäuse wurden mittels Primer 2 und 3 identifiziert und die Kontrollmäuse mittels Primer 1 und 2.

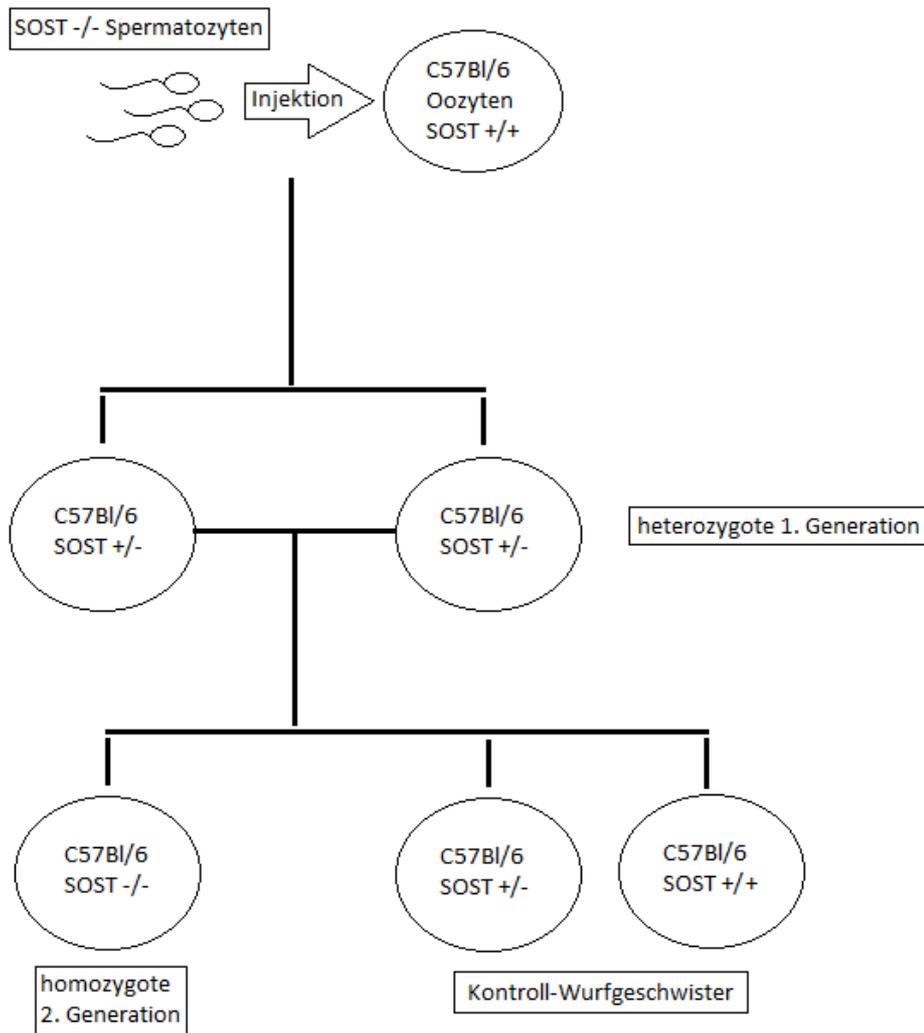


Abbildung 3 Stammbaum zur Gewinnung des SOST-KO Mausmodelles. Die Abbildung zeigt die Kreuzschritte zur Erzeugung einer SOST-KO Population der C57Bl/6 Maus. Spermatozyten mit dem Genom einer SOST-KO Maus wurden intrazellulär in C56Bl/6 Oozyten injiziert. Die daraus resultierende heterozygote 1. Generation wurde untereinander erneut gekreuzt. Die 2. Generation bestand aus homozygoten SOST -/- Mäusen, heterozygoten SOST +/- Mäusen und homozygoten +/+ Mäusen. Das Genom der Mäuse wurde mittels Multiplex-PCR ermittelt und die 2. Generation in die dementsprechenden Untergruppen aufgeteilt, wobei die SOST -/- Mäuse als Versuchsgruppe mit Sklerostin-Mangel genutzt wurde und die anderen zwei Gruppen als Kontrolltiere.

2.2. Belastungs- / Dehnungsanalyse

Um die Auswirkungen der Belastung auf die Tibia zu untersuchen, muss eine konstante Belastung erfolgen. Der Mechanismus zur Detektion von physischer Belastung durch die Osteozyten ist noch ungeklärt, jedoch ist bekannt, dass sie wichtige Regulatoren der Sklerostin Expression sind und mechanische Beanspruchung des Knochens Einfluss auf diese Regulationsmechanismen nimmt [120, 164]. Je nach Alter und Genotyp bringen die zu untersuchenden Mausmodellgruppen jedoch unterschiedliche Ausgangseigenschaften des Knochens mit. Der Knochen der SOST-KO Mäuse war generell fester und von größerer Steifigkeit. Um gleich Belastungsreize auf die unterschiedlichen Knochen auszuüben, bedarf es einem guten Verständnis des Belastungs- / Dehnungsverhältnisse der Tibia. De Souza beschrieb 2005 die knöcherne Belastung der Tibia von C57Bl/6 Mäusen beim Gehen von $<300 \mu\epsilon$ (micro epsilon compression/microstrain) und beim Springen von $<600 \mu\epsilon$ [178]. Deshalb wurden unsere Untersuchungsgruppen je nach Genotyp und Alter an Hand von je 7 Versuchstieren bezüglich der Belastungs-/Dehnungseigenschaften untersucht, um für jede Gruppe die spezifische axial zu applizierende Kraft zu ermitteln um identische Belastungen in der Tibia zu erzielen. Um eine axiale Druckbelastung zu ermitteln, die einer intensiven Belastung und damit einer hohen Reizintensität für die Osteozyten entspricht, legten wir eine Zieldehnung von $+900 \mu\epsilon$ fest, welche bei jeder Versuchsgruppe anvisiert wurde.

2.2.1. Präparation der Dehnungsmessstreifen

Material	Hersteller
Dehnungsmessstreifen	EA-06-015LA-120, Micro-measurements, Vishay
Kabel (38TDQ)	Phoenix Wire, Inc., Vermont, USA
Tesafilm	Tesa, Norderstedt, Deutschland
Skalpell	FEATHER, Osaka, Japan
Lichtmikroskop (Leica MZ6)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Lötzinn	Stannol, Wuppertal, Deutschland
Lötmittel	Vishay
Lötgerät	Weller, Besigheim, Deutschland
Ethylalkohol	Herbeta-Arzneimittel Berlin, Deutschland
Wattestäbchen	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
M-Bond Type-10	Vishay
Härtungsmittel	Vishay
M-Coat D	Vishay
M-Coat A	Vishay
Widerstandsmessgerät (FLUKE 77 Multimeter)	FLUKE, Singapur

Für die nachfolgend erläuterte *In vivo* Kalibrierung der Belastungs- / Dehnungsverhältnisse der Tibia wurden Dehnungsmessstreifen benötigt, um die Dehnung auf der Tibiaoberfläche zu detektieren. Die Messstreifen, Micro-Measurements® Precision Sensors, wurden von Vishay erworben. Bei der ursprünglichen Größe der Messstreifen wäre auf Grund der anatomischen Verhältnisse ein Auftragen auf die ventromediale Fläche der Tibia unmöglich gewesen. Deshalb wurde jeder Dehnungsmessstreifen modifiziert. Es wurde zuerst die Randexzision des nicht benötigten Plastikrahmens um die Messgitter und Kontakte mittels Skalpell unter 10-fach Vergrößerung am Lichtmikroskop durchgeführt. Anschließend wurde die Isolierung der Kupferdrähte an beiden Enden entfernt und an diese Schweißmittel aufgetragen. Darauf wurden die Enden in geschmolzenes Lötmedium getaucht. Schweißmittel wurde ebenfalls auf die Kontaktplatten des Dehnungsmessstreifens aufgetragen und anschließend jeweils ein kleiner Tropfen Lötmedium. Nun konnten unter Kontakt des Lötgerätes zwei Drähte an den Dehnungsmessstreifen auf je einer Kontaktfläche gelötet werden.

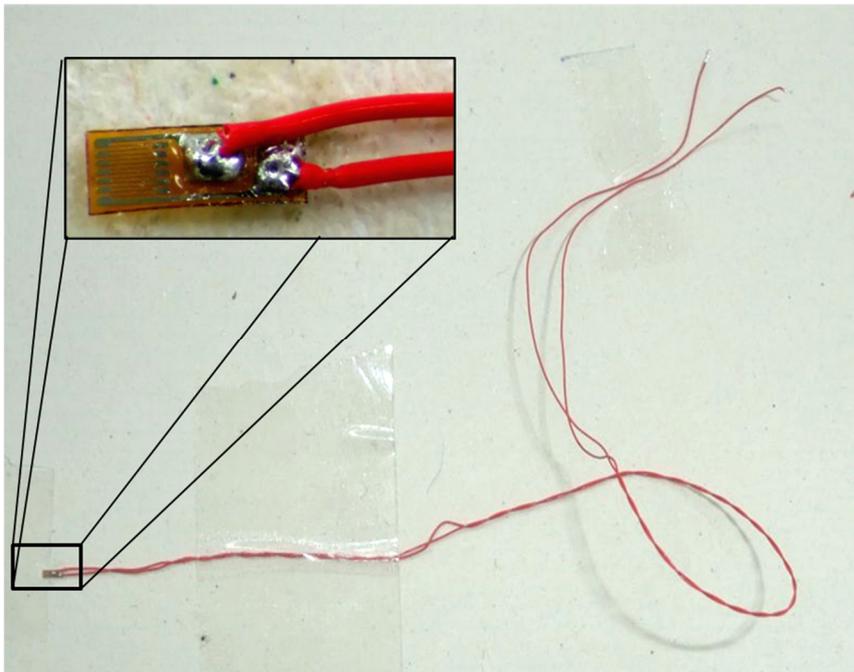


Abbildung 4 Dehnungsmessstreifen nach Lötung der Kabel an die Kontaktstellen. In der Abbildung sind die zwei Kabel zu erkennen, welche an den Dehnmesstreifen gelötet wurden. In der Vergrößerung ist die präzise Lötung der Kabelenden auf die Kontaktflächen unter Aussparung des Messgitters zu erkennen. (Vielen Dank an Tobias Thiele für das Bildmaterial)

Nach Kontrolle der Funktionalität des Dehnungsmessstreifens wurde dieser mit Alkohol und einem Wattestäbchen gereinigt um im Anschluss beschichtet und isoliert zu werden. Für die erste Beschichtung wurden 2 Tropfen M-Bond Type-10 und 1 Tropfen Härtemittel miteinander vermischt und auf die Lötstellen appliziert ohne die Widerstandsspule zu integrieren. Die Aushärtungszeit betrug 3 Stunden bei Zimmertemperatur. Nach der Aushärtung erfolgte die zweite Beschichtung zur Isolation von Körperflüssigkeiten mittels M-coat D über den gesamten Dehnungsmessstreifen mit einer Aushärtungszeit von 12 Stunden bei Zimmertemperatur. Überschüssiges Material wurde mittels Skalpell entfernt. Als letzte Schicht wurde M-coat A über den bereits isolierten Bereich als Endisolation aufgetragen und für 5 Tage bei Zimmertemperatur ausgehärtet. Nach erfolgter Aushärtung der Isolationsflüssigkeiten wurden die Dehnungsmessstreifen zum Abschluss durch Kontrolle des vom Hersteller angegebenen Widerstandes von $\sim 120 \pm 0,6$ Ohm auf Funktionalität geprüft.

2.2.2. *In vivo* Kalibrierung der Belastung/Dehnung

Material	Hersteller
Präzisionswaage (TE4100)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Ketamin	Actavis®, München, Deutschland
Medetomidin	Domitor®, Orion Pharma, Nydalen, Norwegen
Buprenorphin	Temgesic®, Reckitt Benckiser, Berkshire, England
1ml Spritzen	BRAUN, Melsungen AG, Deutschland
Kanülen (27G ¾)	BRAUN, Melsungen AG, Deutschland
Rasierapparat (Aesculap GT 386)	BRAUN, Melsungen AG, Deutschland
Skalpell oder Schere	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pinzette	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Wattestäbchen	neoLab Migge GmbH, Heidelberg, Deutschland
Entfetter	Vishay
Spatel	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Präparierter Dehnungsmessstreifen	EA-06-015LA-120, Micro-measurements, Vishay
Sekundenkleber	Duro Super Glue, USA
Abgeschrägter Holzspatel	Medline Industries
Hochtemperaturkauter	Bovie Medical Corp., USA
Widerstandsmessgerät (FLUKE 77 Multimeter)	FLUKE, Singapur
Belastungsmaschine	Electro Force Testbench LM1, Bose, Minnesota, USA
WinTest Software	Bose, Minnesota, USA

Zum Verständnis der Belastungs-/Dehnungseigenschaften wurde eine *in vivo* Kalibration an insgesamt 28 Mäusen (je 7 pro Versuchsgruppe) durchgeführt. Dabei wurden sowohl die linke als auch die rechte Tibia untersucht. Für das bessere Verständnis des Versuchsablaufes dient ein Zeitstrahl.

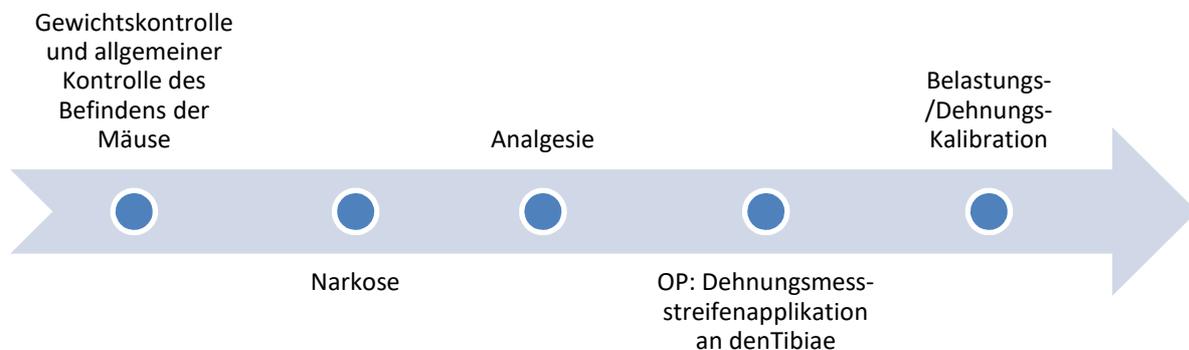


Abbildung 5 Zeitachse zum Versuchsablauf der Belastungs-/Dehnungs-Kalibration In der Abbildung ist eine Übersicht der Teilschritte für die Ermittlung der Belastungs-/Dehnungs-Kurve dargestellt. Einzelheiten zu den Teilschritten sind im Text beschrieben.

Die Versuchstiere wurden in die Untersuchungsräume gebracht und zuerst wurde das Gewicht jeder Maus mit einer Waage bestimmt und die Maus auf gesundheitliche Auffälligkeiten geprüft, die zum Ausschluss aus der Studie führen würden. Anschließend wurde die Maus in eine Narkose mittels intraperitoneal injizierten Ketamin 60mg/kg und Medetomidin 0,3mg/kg versetzt. Die anschließende Analgesie erfolgte durch subkutane Injektion von Temgesic (Buprenorphin) 0,1ml im Bereich der rechten Flanke. Nach Einleitung der Narkose und Analgesie konnte die Operation an der Tibia zur Applikation des Dehnungsmessstreifens vollführt werden. Dafür wurde das linke Bein von der Ferse bis zum Knie rasiert und der Mittelpunkt des Unterschenkels auf der ventralen Oberfläche durch eine Messzwinge ermittelt und mit einem Stift markiert.

Diese Stelle wurde als Zugang zur Anbringung des Dehnungsmessstreifens gewählt und es erfolgte der Schnitt axial mit der Schere oder dem Skalpell. Die Haut wurde vorsichtig zur Seite gezogen und die Muskulatur stumpf mit einem Spatel zur Seite präpariert. In diesem Bereich waren die mediale Seite und die Margo anterior der Tibia zu erkennen. Anhand der anatomischen Beschaffenheit der Tibia kontrollierten wir die exakte Auftragungsfläche des Dehnungsmessstreifens (siehe Abb. 6).

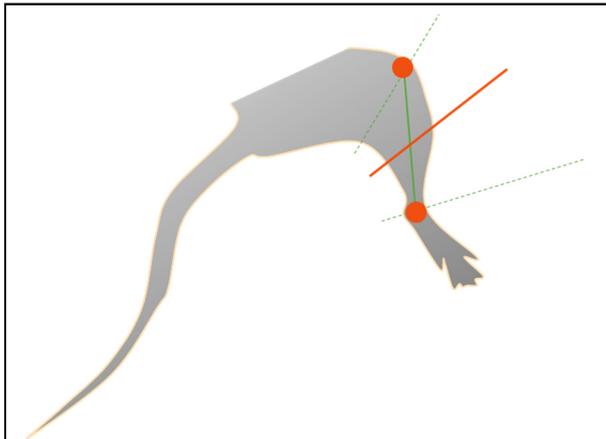


Abbildung 6 Ermittlung des Zugangs zur Anbringung des Dehnungsmessstreifens. Das Knie und die Ferse wurden als Landmarken verwendet (orange Punkte) und der Abstand dieser wurde mittels Messzwinge gemessen und der Mittelpunkt als Zugangsweg (orange Linie) mit einem Stift markiert.

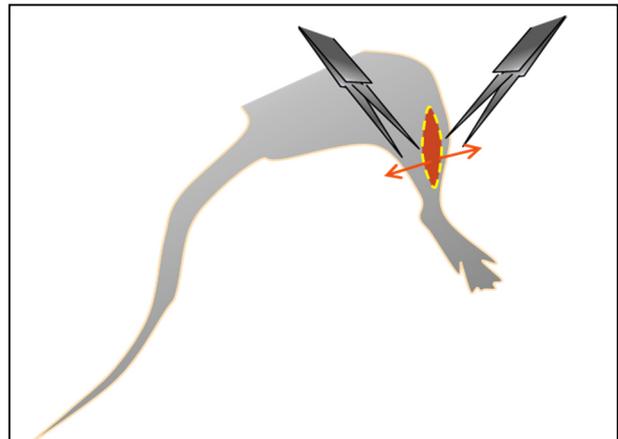


Abbildung 7 Zugang zur Anbringung des Dehnungsmessstreifens. Der Schnitt erfolgte axial der Tibia und die Wundränder wurden mit der Pinzette zur Seite geschoben.

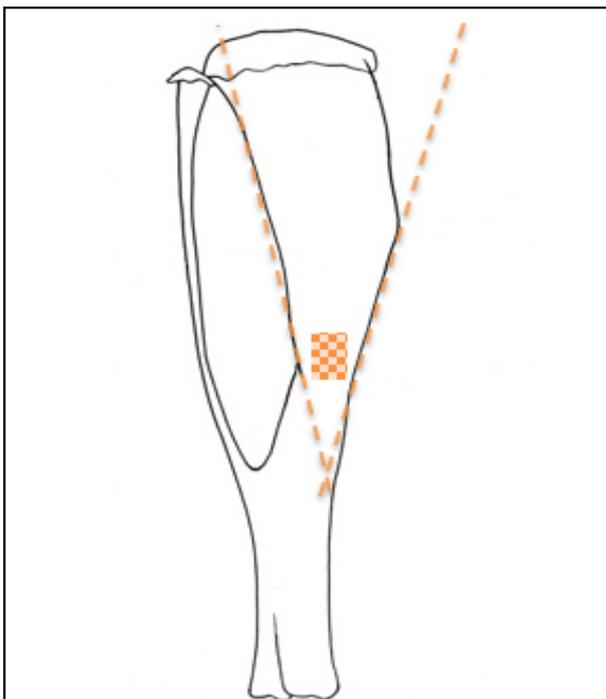


Abbildung 8 Anatomische Festlegung des Auftragsortes des Dehnungsmessstreifens. Die mediale Oberfläche der Tibia läuft von proximal nach distal spitz zusammen und bildet in der Verlängerung ein Dreieck (orange Linien) In der Spitze dieses Dreiecks legten wir die Auftragsstelle (orange-karierte Fläche) des Dehnungsmessstreifens fest.



Abbildung 9 Intraoperative Fotografie der Auftragsfläche. Ein Bild der offengelegten linken Tibia mit eingezeichneten Orientierungspunkten (gelbe Linien) und Auftragsfläche des Dehnungsmessstreifens (rotes Rechteck).

Das Periost an der lokalisierten Auftragsstelle des Dehnungsmessstreifens wurde mit dem Spatel angeraut und mit einem in Entfetter (CSM-2 Degreaser) getränkten Wattestäbchen abgewischt, um eine bessere Haftung zu gewährleisten. Daraufhin wurde der Dehnungsmessstreifen mittels eines Sekundenklebers (SuperGlue, USA) aufgetragen und für 45 Sekunden unter Kompression mit einem abgeschrägten Holzspatel und einer Pinzette bis zum Erhärten des Klebers fixiert. Gleichzeitig musste das Bein der Maus von einer zweiten Person gut fixiert werden, um ein Abrutschen zu verhindern. Abschließend erfolgte eine erneute Kontrolle der Funktionalität des Dehnungsmessstreifens durch Bestimmung des bekannten Widerstandes. Im Anschluss erfolgte die Operation am rechten Bein identisch zu der am linken. Es wurde während der Operation stets auf Blutungen geachtet, welche jedoch nur im geringen Maße auftraten und bei Bedarf mittels Kompression oder der Bipolar-Pinzette gestillt werden konnten. Bei den 28 Operationen für die Anbringung der Dehnungsmessstreifen kam es zu keinen Komplikationen. Es musste keine Blutstillung erfolgen, da es zu keiner größeren Gefäßverletzung kam.

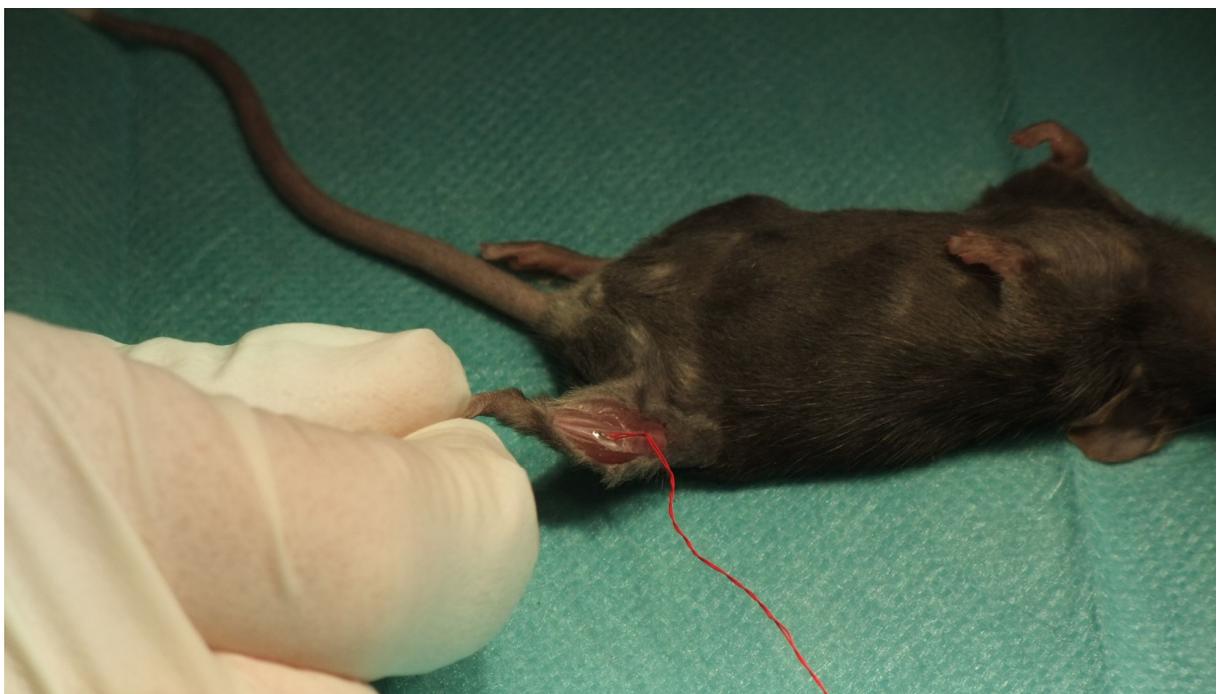


Abbildung 10 Intraoperative Fotografie nach Applikation des Dehnungsmessstreifens. Der Dehnungsmessstreifen wurde erfolgreich auf der medialen Tibiafläche befestigt. Zur Prüfung des Funktionserhalts wurde der Widerstand gemessen.

Anschließend wurde zuerst die linke Tibia in die *in vivo* Belastungsmaschine unter Flexion im Knie als auch im Sprunggelenk eingespannt. Der Dehnungsmessstreifen wurde an den Computer angeschlossen und das Analyseprogramm „WinTest“ gestartet. Die Belastung erfolgte axial als dynamische Kompressionskraft mit Belastungsspitzen von -2 bis -14 N in den Kontrolltiergruppen und -2 bis -20 N in den SOST-KO Gruppen unter Analyse der Dehnung über den Dehnungsmessstreifen mittels „WinTest“ Software. Abschließend erfolgte die statistische Ermittlung der benötigten durchschnittlichen Kompressionskraft für eine Dehnung von 900 $\mu\epsilon$.



Abbildung 11 Anschluss des Dehnungsmessstreifens und Einspannen der linken Maustibia in die Belastungsmaschine. Auf der Abbildung ist der Dehnungsmessstreifen auf der linken Tibia zu erkennen. Der rote Draht wurde über den grünen Kontakt mit dem Computer verbunden und das Analyseprogramm gestartet. Die Tibia wurde im Anschluss in die Belastungsmaschine gespannt, wobei die Ferse bereits richtig dargestellt justiert ist und das Knie in einer Kule des gegenüberliegenden goldenen Zylinders fixiert wurde.

2.3. In vivo Belastung der Tibia

Material	Hersteller
Präzisionswaage (TE4100)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Narkosegerät mit Sauerstoffanschluss	Groppler, Deggendorf, Deutschland
Plexiglaskiste	Groppler, Deggendorf, Deutschland
Inhalationsmaske	Eigenbau
Belastungsmaschine	Electro Force Testbench LM1, Bose, Framingham, USA
Rotlichtlampe	KERBL, Buchbach, Deutschland
1ml Spritzen	BRAUN, Melsungen AG, Deutschland
Kanülen (27G 3/4)	BRAUN, Melsungen AG, Deutschland
Calcein	Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland

Das *In vivo* Belastungs-Experiment dauerte für jede Versuchsgruppe 15 Tage. Zur vereinfachten Erläuterung des Versuchsaufbaus dient ein Zeitstrahl.

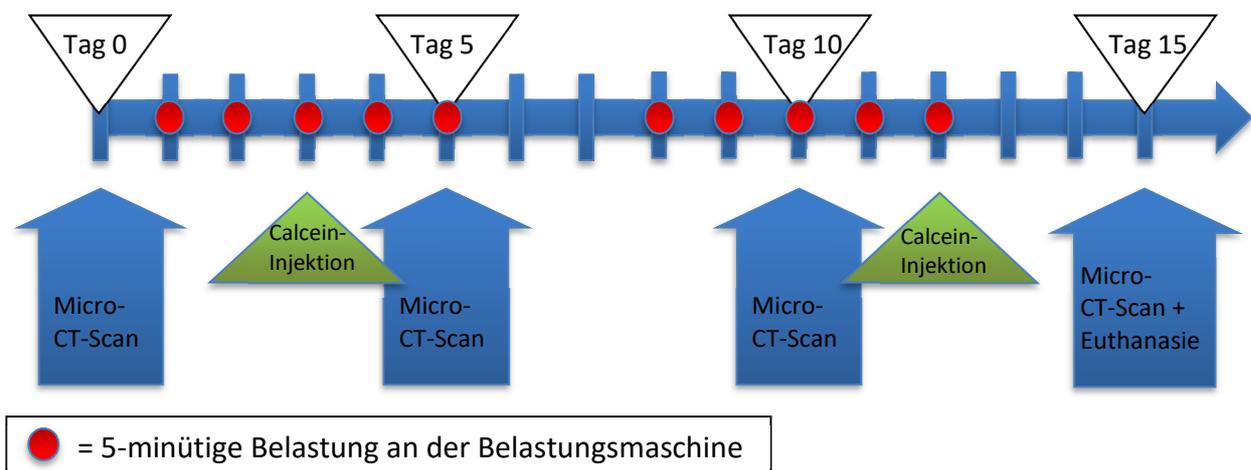


Abbildung 12 Zeitstrahl zum Ablauf des Belastungsversuches. An Tag 0 erfolgte der erste Micro-CT-Scan. Weitere Scans für die Entwicklungsaufzeichnung wurden an Tag 5, 10 und 15 durchgeführt (Blaue Pfeile). An den Tagen 1-5 wurde für je 5 Minuten die linke Tibia der Maus belastet (rote Punkte). Tag 6 und 7 waren Ruhetage. Tag 8-12 wurde erneut belastet und Tag 13 und 14 als Ruhephase genutzt. Tag 15 wurde das Experiment mit dem letzten Scan und der Euthanasie abgeschlossen. Für die Histomorphometrie wurde den Mäusen an Tag 3 und 12 Calcein intraperitoneal injiziert.

Der Versuchsaufbau galt für jede Versuchsgruppe. Die Belastung wurde möglichst zur gleichen Uhrzeit an jedem Belastungstag durchgeführt. Die Abfolge des Versuches an den Tagen war ebenfalls einheitlich und wird in Abbildung 11 erläutert.

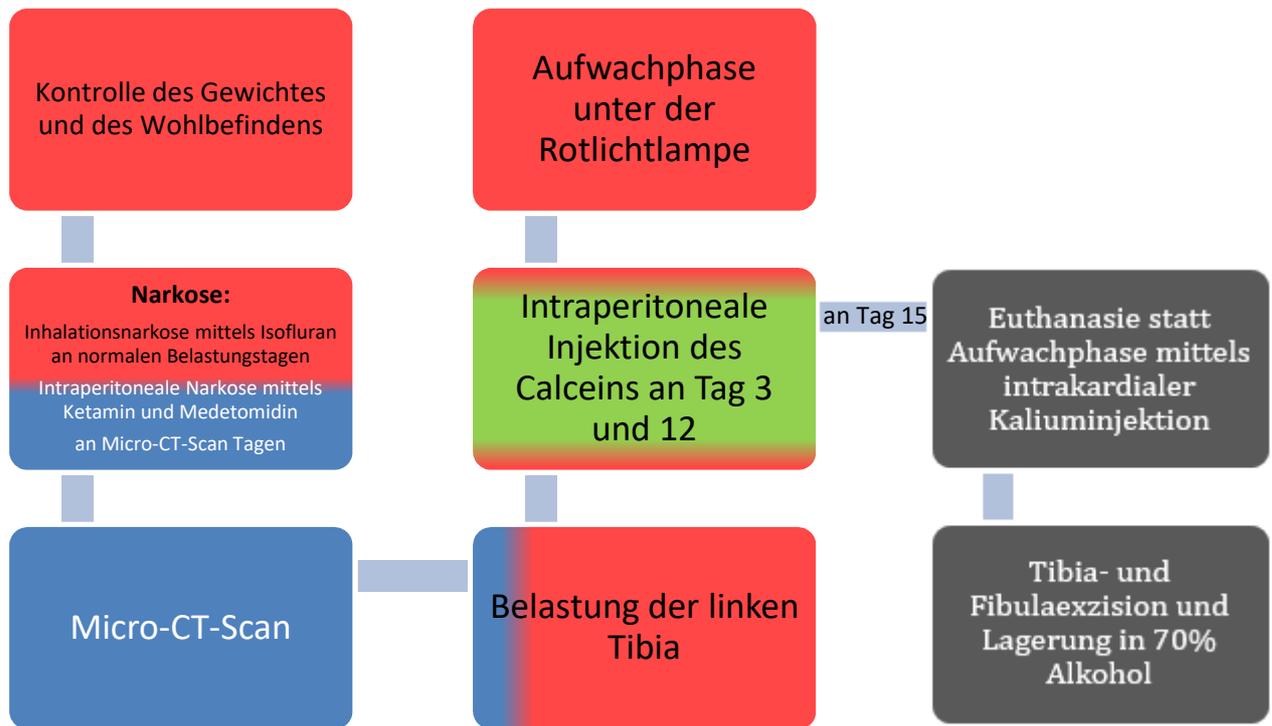


Abbildung 13 Versuchsablauf an Tagen des Belastungsexperimentes. Die Roten Felder zeigen im Flussdiagramm den regulären Ablauf an einem Belastungstag. Diese können je nach Tag durch Micro-CT-Scans (blaue Felder) oder Calcein-Injektionen (grünes Feld) ergänzt werden. An Tag 15 wurde statt der Aufwachphase die Euthanasie eingeleitet und im Anschluss die Tibia und Fibula beider Beine exzidiert (schwarze Felder).

Alle Versuchstiere wurden am Belastungstag aus der Tierhaltung in den Behandlungsraum gebracht. Anschließend wurde die erste Maus separiert und auf Auffälligkeiten geprüft, die einen Ausschluss aus der Studie erfordert hätten. Das Gewicht der Maus wurde mittels Tischwaage vor jeden weiteren Schritt notiert und mit dem Gewicht der Vortage verglichen. Sofern keine Auffälligkeiten zu erkennen waren wurde die Maus mit Isofluran in eine Inhalationsnarkose versetzt, indem sie in eine mit dem Gasgemisch gefüllte Plexiglaskiste gesetzt wurde. Nach Eintreten der Narkose wurde diese durch eine speziell angefertigte Narkosemaske aufrechterhalten. Unter fortgesetzter Narkose wurde die Mäusetibia in die Belastungsmaschine eingespannt. Die Belastung erfolgte stets an der linken Tibia. Die rechte diente der intraindividuellen Kontrolle. Dabei wurde die Tibia bei Flexion im Kniegelenk und im oberen Sprunggelenk eingespannt. Die auf die Tibia einwirkenden dynamischen Kompressionskräfte wurden in 216 Zyklen und einer Frequenz von 4 Hz ausgeübt. Die von WinTest simultan analysierte Kurvenform zeigte symmetrische Belastungen/Entlastungen für 0,15 Sekunden mit konstanten Dehnungsraten von 0,016 strain/Sekunde, sowohl bei der Belastung als auch

bei der Entlastung. Eine Rastphase von 0,1 Sekunde und einer Kompression von -1 N wurde in die Belastungskurve zwischen den Zyklen inkludiert. Nach jeweils 4 Zyklen wurde eine weitere Rastphase von 5 Sekunden Dauer eingefügt. Eine ausführlichere Herleitung dieses Belastungsregimes wird in der Publikation von Willie et. al. aus dem Jahr 2013 geschildert [179]. Nach Beendigung der Kompressionszyklen wurde die Mäusetibia aus der Maschine gelöst und die Maus in einem separaten Käfig atmungsunterstützend gebettet. Unter einer Rotlichtlampe konnte die Maus aus der Narkose aufwachen. Die Wärme der Rotlichtlampe unterstützte das Aufrechterhalten der Körpertemperatur, wobei darauf geachtet wurde, dass keine direkte Strahlung erfolgte, welche die Ohren oder Nase hätten verbrennen können. Die axiale dynamische Kompression erfolgte für 2 Wochen mit 5 Tagen Belastung/Woche und 2 Tagen Ruhe/Woche.

2.4. In vivo Micro-Computertomographie der kortikalen mittleren Diaphyse und der trabekulären proximalen Metaphyse

Material	Hersteller
Präzisionswaage (TE4100)	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Isofluran	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland
Narkosegerät mit Sauerstoffanschluss	Groppler, Deggendorf, Deutschland
Plexiglaskiste	Groppler, Deggendorf, Deutschland
Inhalationsmaske	Eigenbau
Belastungsmaschine	Electro Force Testbench LM1, Bose, Framingham, USA
Rotlichtlampe	KERBL, Buchbach, Deutschland
vivaCT 40	Scanco Medical, Brütisellen, Schweiz, Quellenstromstärke von 55kVp, Spannung von 145 microA, Integrationszeit von 300ms, kein Rahmendurchschnitt, Reichweite von 180°
Bepanthen Augen- und Nasencreme	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Mäuseschlitten	Charité Centrum Wissenschaftliche Werkstätten, Berlin, Deutschland
Pflasterband	3M™ Durapore™, Minneapolis, USA
1ml Spritzen	BRAUN, Melsungen AG, Deutschland
Kanülen (27G ¾)	BRAUN, Melsungen AG, Deutschland
Ketamin	Actavis®, München, Deutschland
Medetomidin	Domitor®, Orion Pharma, Nydalen, Norwegen
Atipamezolhydrochlorid	Antisedan®, Orion Pharma, Nydalen, Norwegen
Kaliumchlorid	BRAUN, Melsungen AG, Deutschland
Skalpell	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pinzette	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
70% Ethylalkohol	Herbeta-Arzneimittel Berlin, Deutschland
Eppendorfgefäße (beschriftet)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Während des Belastungsexperimentes wurden Mikrocomputertomographien an den Tagen 0, 5, 10 und 15 durchgeführt. Verwendet wurde das vivaCT mit einer voreingestellten Voxelgröße von 10,5 Mikrometer. An den Scan-Tagen wurden die Mäuse für die Analyse und die anschließende Belastung in Narkose versetzt. Auf Grund der längeren Scandauer nicht mittels Inhalationsnarkose, sondern durch eine intraperitoneale Injektion von Ketamin 60mg/kg und Medetomidin 0,3mg/kg. Wie auch an den Belastungstagen erfolgte initial eine Gewichtsbestimmung der Mäuse. Die Augen wurden mit Bepanthen eingecremt, um ein Vertrocknen bei ausbleibendem Lidschluss während der Untersuchung zu vermeiden. Anschließend wurden die Mäuse auf einen speziell angefertigten Kunststoff-Mäuseschlitten gelegt und mit Pflasterband fixiert, um Bewegungsartefakte während des Scans zu vermeiden.

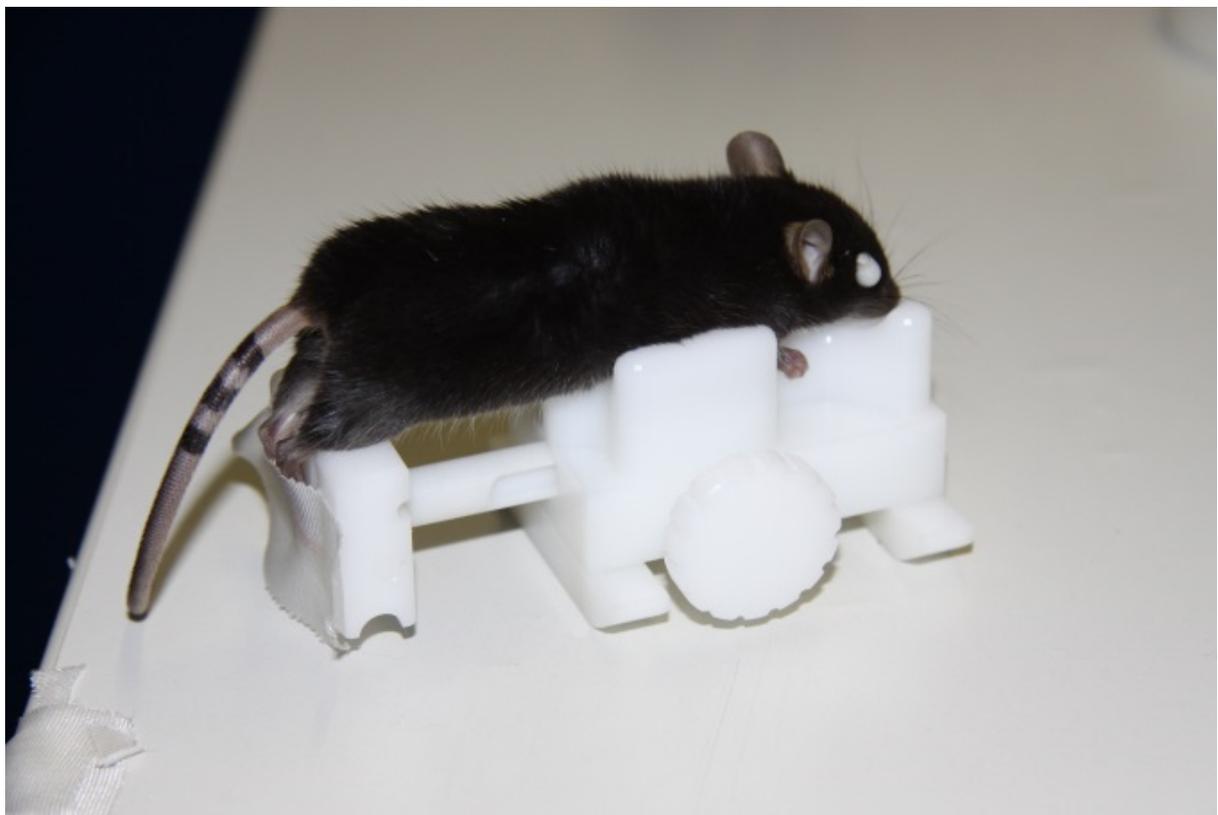


Abbildung 14 Maus auf Kunststoffschlitten vor Micro-CT-Scan. Die Maus wurde narkotisiert auf den speziell angefertigten Kunststoffschlitten gebettet und die Füße mit Pflasterband fixiert. Dadurch konnten die Beine in eine Streckstellung geführt werden und das Risiko auf Überlagerungen durch andere Knochen oder Bewegungsartefakte reduziert werden. Die Augen wurden vor Austrocknung bei ausbleibendem Lidschluss geschützt, indem sie mit Bepanthen-Creme eingeschmiert worden.

Zuerst erfolgt die Erstellung einer Übersichtsaufnahme, um Start- und Endpunkte festzulegen, sodass das Volume of Interest vollständig vom Scan-Bereich inkludiert wurde. Die Länge der Tibia wurde in der Übersichtsaufnahme ermittelt und der Mittelpunkt festgelegt. Von diesem Punkt aus wurden 105 Ebenen proximal und 105 Ebenen distal gescannt, sodass eine totale Scanebenenanzahl von 210 zur Untersuchung des medialen Tibiaschaftes zur Verfügung stand. In der gleichen Sitzung erfolgte ebenfalls ein Scan der proximalen Tibia zur Untersuchung des trabekulären Knochengerüsts durchgeführt. Für diesen Scan wurde der Startpunkt in der Übersichtsaufnahme auf Höhe des Gelenkspaltes festgelegt und insgesamt 416 Scanebenen nach distal abgebildet. Die hohe Anzahl an Scanebenen gewährleistet das Inkludieren des trabekulären Knochengerüsts distal der proximalen Epiphysenfuge, welches Hauptbestandteil unserer Untersuchungen darstellte. Die Gesamtscandauer betrug etwa 50 Minuten pro Maus. Nach dem erfolgten Scan wurde die Maus vom Schlitten gelöst und die nächste für den Scan vorbereitet.

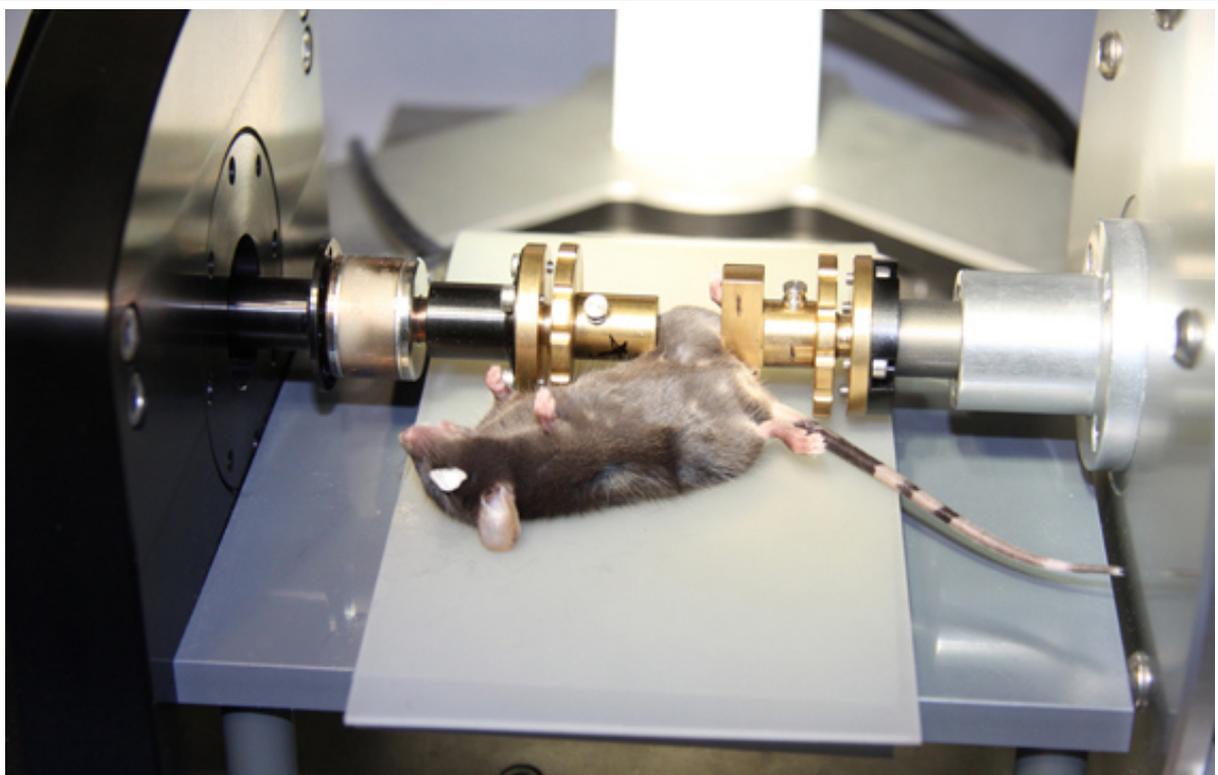


Abbildung 15 Maus mit eingespannter Tibia in Belastungsmaschine nach Micro-CT-Scan. Die Fotografie zeigt eine narkotisierte Maus kurz nach dem Mikro-CT-Scan mit eingespannter linker Tibia für den 5-minütigen Belastungszyklus. Die Augen sind zum Schutz vor Austrocknung mit Bepanthen-Creme bedeckt.

Parallel konnte die gescannte Maus an Belastungstagen unter anhaltender Narkose den 5-minütigen Belastungszyklus erfahren. Sofern die Narkose nicht auszureichen drohte, wurde unterstützend eine Inhalationsnarkose mit Isofluran durch die Maske verabreicht. Die Belastung erfolgte wie oben beschrieben.

Mittels subkutaner Injektion von Antisedan oder Revertor (Atipamezolhydrochlorid 5,0 mg/ml) in 2,5-facher Dosis des verwendeten Medetomidin konnten die Mäuse im Anschluss aus der Narkose geweckt werden. Unterstützend zum Erhalt der Körpertemperatur wurden die Mäuse sofort nach dem Micro-CT-Scan und der *in vivo* Belastung unter einer Rotlichtlampe positioniert und konnten aus der Narkose aufwachen. Sofern keine postnarkotischen Auffälligkeiten zu erkennen waren, kehrten die Mäuse in den Käfig zu den anderen Versuchstieren zurück.

Am 15. Tag, drei Tage nach dem letzten Belastungszyklus und am Tag des letzten Micro-CT-Scans, erfolgte die Euthanasie der Tiere unter Narkose mit Ketamin 60mg/kg und Medetomidin 0,3mg/kg mittels intrakardialer Injektion von hochdosiertem Kaliumchlorid. Anschließend erfolgte die Resektion von Tibia und Fibula beidseits möglichst weichteilarm. Die Knochen wurden in 70% Alkohol in beschrifteten Eppendorfgefäßen gelagert, der restliche Mäusekorpus bei -80°C eingefroren.

Die Scans wurden rekonstruiert und mittels standardmäßig gefilterter Rückprojektion durch die Micro-CT eigene Software analysiert. Wöchentlich erfolgte die Kalibrierung des Micro-CTs durch einen Scanabgleich mit einer Hydroxyapatitprobe zur Bestimmung der räumlichen Auflösung.

2.5. Auswertung der Mikro-Computertomographiedaten

Material	Hersteller
vivaCT 40 Software	Scanco Medical AG, Brüttisellen, Schweiz
Session Manager	Scanco Medical AG, Brüttisellen, Schweiz
μCT-Evaluation Programm	Scanco Medical AG, Brüttisellen, Schweiz

Zur Auswertung der Micro-CT-Scans von Tag 0 bis Tag 15 (Start bis Ende des Experimentes) wurde die Micro-CT eigene Software genutzt. Die Evaluation erfolgte in mehreren Teilschritten. Dazu gehörten die Ermittlung des Schwellenwertes zur Differenzierung von Knochen- und anderen Gewebearten, sowie die Ausrichtung der Tibia in den Scanebenen. Diese wurde automatisch geometrisch an Hand von manuell gesetzten Landmarken durchgeführt, um optimale Voraussetzungen für eine hohe Vergleichbarkeit der durch die Evaluationssoftware ermittelten Messwerte zu liefern. Im Anschluss erfolgte das Konturieren der Scanebenen mit Hilfe des Schwellenwertes. Bei der Auswertung wurde stets die von Bouxsein et. al. verfassten Richtlinien berücksichtigt [180].

2.5.1. Ermittlung des Schwellenwertes

Um eine genaue Aussage über dynamische Knochenprozesse treffen zu können, ist die Erkennung von Knochengewebe und die Differenzierung zu anderen Gewebearten von größter Relevanz. Daher war auch der erste notwendige Schritt für die Evaluation der Mikro-CT-Daten die Ermittlung des Schwellenwertes von Knochengewebe im Vergleich zu anderen Gewebearten. Hierfür wurde vorerst unsere Region of Interest bestimmt. Dabei diente die endostale Region der Margo anterior als Orientierungshilfe, welche von distal nach proximal seine Form verändert. Distal ist eine großwinklige Rundung zu erkennen, welche nach proximal sehr zügig in einen Spitzwinkel transformiert (Siehe Abbildung 14). Die zwei Scanebenen mit dem größten morphologischen Unterschied wurden markiert und 20 Ebenen distaler wurde der Beginn des Volume of Interest definiert. Die distale Grenze wurde als die Scanebene, die distal 10% der Tibialänge von der Startscanebene des Volume of Interest entfernt war definiert. In diesem Bereich wurden Kreise um den Tibiaquerschnitt konturiert. Eine Evaluationssoftware ermittelte Strahlendichte in den Pixeln jeder Scanebene und diese Daten konnten mit Hilfe von Matlab in einem Histogramm dargestellt werden. Statistisch wurde der durchschnittliche Schwellenwert ermittelt und mit dem Schwellenwert aus dem Experiment mit den

weiblichen Versuchstieren verglichen. Da diese nahezu identisch waren, wurde zur besseren Vergleichbarkeit ein gemeinsamer Schwellenwert von 4626 HU bestimmt.

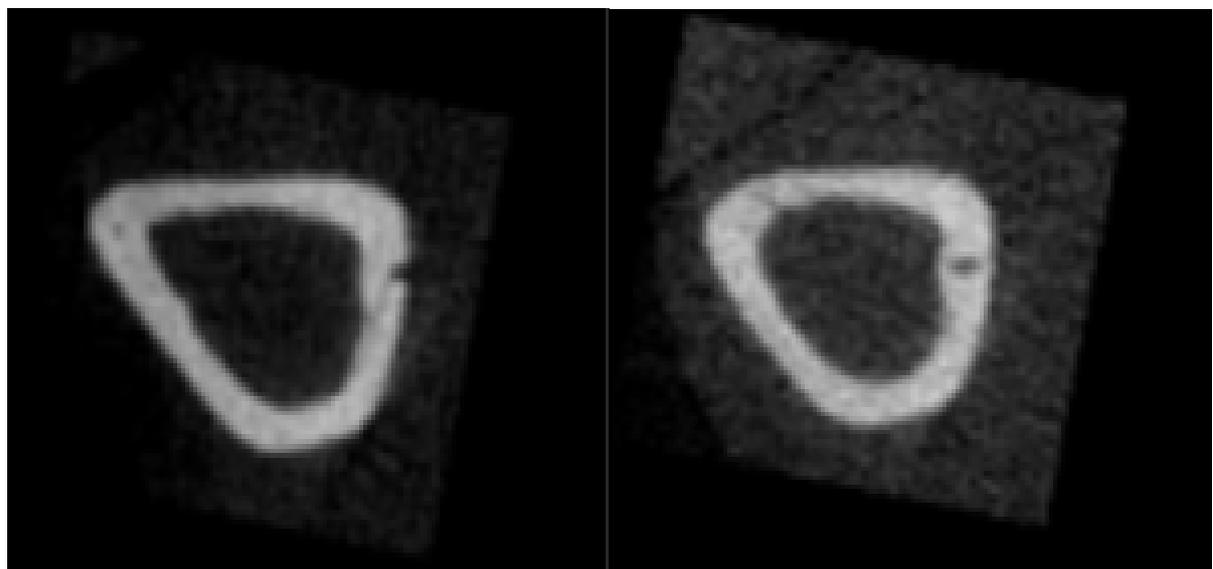


Abbildung 16 Querschnitt der Tibiadiaphyse im Micro-CT-Scan. Auf dem Bild links ist die proximal spitzwinklige Endostalfläche an der Margo anterior zu erkennen, welche sich in wenigen Scanebenen weiter distal deutlich abrundet (rechtes Bild). Diese anatomische Auffälligkeit diente der Orientierung zur Definierung der Region of Interest.

2.5.2. Ausrichtung der Tibia in den Scanebenen

Um präzise Aussagen zu lokalen Entwicklungen im Knochenaufbau oder -abbau der Tibia fällen zu können, ist eine hohe Vergleichbarkeit der Tibia-Scans von Nöten. Deshalb war nach Festlegung des Schwellenwertes die Ausrichtung der Tibia in den Scanebenen der nächste wichtige vorbereitende Schritt in der Evaluation der Micro-CT-Scans. Hierfür wurden drei Punkte in zwei Scanebenen festgelegt:

- Mittelpunkt des Horizontalschnitts der Tibiadiaphyse in Ebene 1
- Mittelpunkt des Horizontalschnitts der Fibula in Ebene 1
- Mittelpunkt des Horizontalschnitts der Tibiadiaphyse in Ebene 101

Anhand dieser drei Punkte richtet das Programm den Knochen in allen drei Ebenen aus. Als nächstes wurde das Volume of Interest (VOI) bestimmt und der zu analysierende Bereich konturiert. Die Orientierung zur Bestimmung des Volume of Interests erfolgte identisch zu der oben beschriebenen Schwellenwertermittlung an Hand des endostalen Winkels an der Margo anterior. Ebenfalls 20 Ebenen distal der Übergangszone wurde der Start des Volume of Interests definiert. Als Endbegrenzung des Volume of Interests wurde die Ebene festgelegt, die 10% der Tibialänge distal der Startebene vorzufinden war. Die Scanebenen, welche im Volume of Interest integriert waren, wurden konturiert.

2.5.3. Konturierung und Evaluation der kortikalen Tibia-Scans

Die Konturierung der kortikalen Tibia-Scans vollzog sich in separaten Einzelschritten. Zum einen erfolgte eine reine Konturierung des Periostes mit Hilfe des Schwellenwertes zur Bestimmung der Gesamttibiafläche inklusive Markraum (Tt.Ar). In einem zweiten Evaluationsschritt wurde ebenfalls eine endostale Konturierung mittels Schwellenwert gesetzt zum Exkludieren des Markraumes und Bestimmen der reinen kortikalen Tibiafläche (Ct.Ar).

Um eine möglichst objektive Evaluation zu gewährleisten, wurden nur die proximalste und distalste Ebene des VOIs manuell und unter Schwellenwertkorrektur konturiert, sodass das Programm anschließend mit Hilfe des definierten Schwellenwertes die Ebenen dazwischen automatisch konturieren konnte. Alle Ebenen wurden augenscheinlich geprüft, um einen groben Erkennungsfehler auszuschließen. Die anschließende Evaluation des konturierten Bereiches erfolgte nach einem festgelegten Algorithmus mit determiniertem Schwellenwert.

Folgende Parameter wurden zur Evaluation des kortikalen Knochens durch das Programm ermittelt:

- Kortikale Knochenfläche (Ct.Ar)
- Kortikale Knochenfläche zur Gesamtknochenfläche (Ct.Ar/T.Ar)
- Kortikale Dicke (Ct.Th) – Hier ist der durchschnittliche Abstand von Periost zu Endost gemeint

Alle erhobenen Daten wurden als Text-Dateien gespeichert und im späteren Verlauf zur statistischen Auswertung in Excel konvertiert. Eine weitere Absicherung der Daten erfolgte durch Abspeichern als PDF-Dokument.

2.5.4. Dynamische 3D-Morphometrie-Analyse der kortikalen Tibia-Scans

Im Anschluss an die Konturierung und Evaluation der kortikalen Tibia-Scans der Tage 0, 5, 10 und 15 konnten die Aufnahmen zur Bestimmung und Markierung der Regionen genutzt werden, die im Rahmen des Experimentes eine Knochenresorption oder -formation aufwiesen, beziehungsweise bei denen keine Veränderungen zu beobachten waren. Darauf konnten die Bereiche, die eine Veränderung erfuhren quantifiziert werden und die dynamischen, volumetrischen Knochenparameter für Knochenformation und -resorption im Verhältnis zu den Ausgangswerten zu Beginn des Experimentes ermittelt werden. Für eine detaillierte methodische Beschreibung wird auf die Methodik von Birkhold et. al. verwiesen [169].

- Knochenformation wird als neu mineralisiertes Volumen zwischen Tag 0 und 15 geteilt durch das Knochenvolumen an Tag 0 dargestellt ($MV/BV_{\text{Tag 0-15}}$) und durch die neu mineralisierte Oberfläche zwischen Tag 0 und 15 geteilt durch die gesamte Knochenoberfläche an Tag 0 ($MS/BS_{\text{Tag 0-15}}$)
- Knochenresorption wird als resorbiertes Volumen zwischen Tag 0 und 15 geteilt durch das Knochenvolumen an Tag 0 dargestellt: ($EV/BV_{\text{Tag 0-15}}$) und durch die resorbierte Oberfläche zwischen Tag 0 und 15 geteilt durch die gesamte Knochenoberfläche an Tag 0 ($ES/ES_{\text{Tag 0-15}}$)

2.5.5. Konturierung und Evaluation der trabekulären Tibia-Scans

Zur Beurteilung des trabekulären Knochens dienten die 416 Scanebenen der proximalen Tibia. Zur Definierung des Volume of Interests in diesem Bereich wurde die Wachstumsfuge zur Hilfe genommen. Die Wachstumsfuge wurde in den Scanebenen lokalisiert und der Beginn des Volume of Interests wurde 10 Ebenen distaler als die distalste Scanebene mit sichtbarer Wachstumsfuge festgelegt. Das distale Ende des Volume of Interests wurde wieder mit 10% der Tibialänge ermittelt. Anschließend erfolgte das Konturieren an der endostalen Knochenfläche zum inkludieren aller Strukturen im Markraum. Auf Grund der Variabilität des trabekulären Knochens und der schlechten Abgrenzbarkeit zum kortikalen Knochen mittels Schwellenwert wurde auf ein vollständiges automatisches Konturieren verzichtet. Vielmehr wurde jeder dritte Scan manuell konturiert und nur die Scans dazwischen automatisch vom Programm unter Hilfenahme der manuell angefertigten Konturen generiert. Anschließend wurde jeder Scan augenscheinlich geprüft, um grobe Erkennungsfehler durch das automatische Konturieren auszuschließen. Die anschließende Evaluation des konturierten Volume of Interests erfolgte ebenfalls nach einem festgelegten Algorithmus mit determiniertem Schwellenwert.

Das Programm ermittelte für die Evaluation des trabekulären Knochens folgende Parameter:

- Trabekuläres Volumen zu Gesamtknochenmarkvolumen (Tb.BV/TV)
- Durchschnittliche Trabekelanzahl pro Millimeter (Tb.N)
- Durchschnittliche Trabekeldicke (Tb.Th)

Alle erhobenen Daten wurden als Text-Dateien gespeichert und im späteren Verlauf zur statistischen Auswertung in Excel konvertiert. Eine weitere Absicherung der Daten erfolgte durch Abspeichern als PDF-Dokument.

2.6. Dynamische Histomorphometrie der Tibia

Für die histomorphometrische Untersuchung wurden 20mg/kg Calcein intraperitoneal sowohl den Kontrollmäusen als auch den SOST-KO Mäusen beider Altersgruppen am 3. und am 12. Tag des Belastungsversuches injiziert. Anschließend mussten die Knochen weiterverarbeitet werden, um histologische Schnittbilder unter dem Mikroskop zur Evaluation zur Verfügung zu haben. Dafür waren mehrere Schritte von Nöten.

2.6.1. Vorbereitung und Einbettung der Knochen

Wie bereits beschrieben, wurden die Tibiae an Tag 15. exzidiert und in 70% Alkohol gelagert. Als nächster Schritt folgte die Entwässerung und Entfettung, gefolgt von einer Präinfiltration und Infiltration mit abschließender Einbettung. Vor der weiteren Bearbeitung wurde die Länge jeder Tibia mittels einer digitalen Mikrometerschraube ermittelt und der Mittelpunkt mit Bleistift zirkulär markiert.

2.6.1.1. Entwässerung und Entfettung

Material	Hersteller
Schraubgläser + Deckel	Bienenhoniggläser vom regionalen Imker
Kunststoffgitter (Tissue-Tek®)	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland
Ethylalkohol 70%, 80%, 96%, 100%	Herbeta-Arzneimittel Berlin, Deutschland
Xylol	J.T. Baker, Mallinckrodt Baker BV, Deventer, Holland

Zur Entwässerung der Knochenpräparate wurden diese für je 3 Tage in 70 prozentigem und anschließend in 80 prozentigem Ethylalkohol gelagert. Die Lagerung erfolgte in Schraubgläsern mit Deckel und die Knochen waren in Kunststoffgittern, welche beschriftet wurden, voneinander separiert. Nach den ersten zwei Konzentrationen für je drei Tage wurden die Proben für 6 Tage in 96 prozentigem Ethylalkohol gelagert, wobei der Alkohol nach drei Tagen gewechselt wurde. Abschließend wurden die Präparate für 9 Tage, mit einem Wechsel des Ethylalkohols an Tag 3 und 6, in 100 prozentigem Alkohol eingelegt. Dadurch wurde eine vollständige Entwässerung der Proben gewährleistet ohne die Gefahr der Verwässerung bestand. Im Anschluss erfolgte eine Entfettung der Proben mittels Xylol für mindestens einen Tag.

2.6.1.2. Präinfiltration und Infiltration

Material	Hersteller
Schraubgläser + Deckel	Bienenhoniggläser vom regionalen Imker
Kunststoffgitter (Tissue-Tek®)	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland
Polymerisationssystem Technovit 9100 NEU	Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Kulzer, Wehrheim, Deutschland
Schüttler	HS 501 digital, KIKA Labortechnik, Deutschland
Aluminiumoxid-Chromatographiesäule	SCHOTT AG, Mainz, Deutschland
Messzylinder 100ml und 250ml	SCHOTT AG, Mainz, Deutschland
Glasstab zum Rühren	SCHOTT AG, Mainz, Deutschland
Magnetrührer (IKA Combimag RET)	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland

Die weitere Verarbeitung erfolgte gemäß Herstellerschema des Polymerisationssystems Technovit 9100 NEU. Das Schema ist in Abbildung 17 erläutert. Die Basislösung wurde vor jeder Verarbeitung in einer Aluminiumoxid-Chromatographiesäule entstabilisiert. Das Einmischen der anderen Substanzen erfolgte, um eine komplette Durchmischung zu gewährleisten, mittels eines Magnetrührers. Die Lösungen wurden im Kühlschrank bei 4°C für maximal 1 Woche gelagert. Die Präparate wurden aus dem Xylol in die Präinfiltrationslösung gebracht. Die Lagerung erfolgte weiterhin in den Kunststoffgittern in den Schraubgläsern. Um eine vollständige Präparatdurchdringung der Lösungen zu gewährleisten wurden die Schraubgläser für die Lagerungszeit auf einem Schüttler positioniert. Die Präinfiltration erfolgte über Nacht und war somit abgeschlossen. Am Folgetag wurde die Präinfiltrationslösung entfernt und die vorher angefertigte Infiltrationslösung zugeführt. Die Infiltration wurde für 5 Tage durchgeführt.

	Basislösung	PMMA-Pulver	Härter 1	Härter 2	Regler
Präinfiltrationslösung	200 ml 190 g	/	1 g	/	/
Infiltrations-Lösung	ad 250 ml 237,5 g	20 g	1 g	/	/
Stammlösung A	ad 500 ml 475 g	80 g	3 g	/	/
Stammlösung B	ad 50 ml 47,5 g	/	/	4 ml 4,3 g	2 ml 1,7 g
Polymerisationsgemisch	9 Volumenteile Stammlösung A + 1 Volumenanteil Stammlösung B				

Abbildung 17 Technovit 9100 Neu Schema. Die Abbildung zeigt das Mischverhältnis für die einzelnen Lösungen zur Präinfiltration, Infiltration und Einbettung der Knochenproben laut Hersteller.

2.6.1.3. Einbettung

Material	Hersteller
Schraubgläser + Deckel	Bienenhoniggläser vom regionalen Imker
Kunststoffgitter (Tissue-Tek®)	Sakura Finetek Germany GmbH, Staufen, Deutschland
Polymerisationssystem Technovit 9100 NEU	Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Kulzer, Wehrheim, Deutschland
Schüttler	HS 501 digital, KIKA Labortechnik, Deutschland
Aluminiumoxid-Chromatographiesäule	SCHOTT AG, Mainz, Deutschland
Messzylinder 100ml und 250ml	SCHOTT AG, Mainz, Deutschland
Glasstab zum Rühren	SCHOTT AG, Mainz, Deutschland
Magnetrührer (IKA Combimag RET)	IKA®-Werke GmbH & CO. KG, Staufen, Deutschland
PE-Einbettformen	Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland
Schmierfett (Vaseline)	Vaseline®, Unilever, USA
Abdichtungsfolie	Parafilm®, Bemis®, Neenah, USA

Die Einbettung der Knochen erfolgte in PE-Einbettformen. Da eine einzelne Form keine ausreichende Länge aufwies, um die Tibia darin axial aufstellen zu können, wurden zwei zylindrisch aufgebauten PE-Formen übereinandergestellt und die Kontaktflächen mit Schmierfett eingestrichen. Eine Abdichtungsfolie wurde herumgewickelt um ein Austreten der Flüssigkeiten zu vermeiden. Anschließend wurde ein Deckel aufgesetzt, welcher als Boden des Einbettungsgefäßes diente. Damit die Tibia axial in den Zylindern aufgestellt und eingebettet werden konnte, musste ein stabiler Stand gewährleistet werden. Hierfür wurde an das distale Tibiaende etwas Wachs von gewöhnlichen Ohropax geklebt und so modelliert, dass ein Standfuß eine axiale Ausrichtung der Tibia im Zentrum des Zylinders ermöglichte. Daraufhin wurden Stammlösung A und B miteinander vermischt und bildeten die Polymethylmethacrylatlösung. Diese wurde vorsichtig in den Kunststoffbecher bis zum Oberrand gefüllt. Dabei wurde langsam gegossen um eine Blasenbildung zu vermeiden, die gegebenenfalls Artefakte verursachen könnte. Nach einer Stellungskontrolle der Tibia wurden die Deckel aufgesetzt und die abgeschlossenen Einbettungsbehältnisse vorsichtig zum Aushärten in einen Kühlschrank transportiert und dort über Nacht bei +4°C belassen. Am Folgetag konnten die in harten Polymethylmethacrylat gebetteten Knochen aus den Kunststoffbechern geklopft werden.

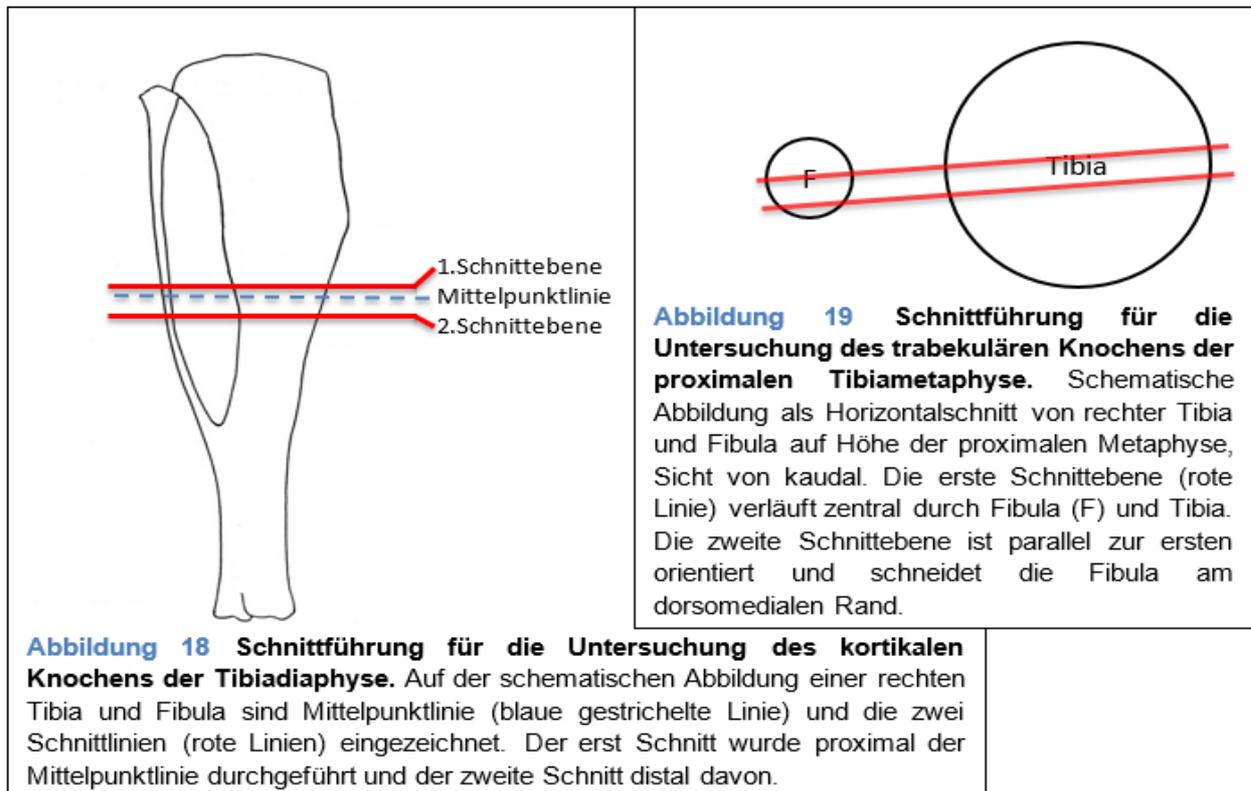
2.6.2. Sägen der eingebetteten Knochen

Material	Hersteller
Objektträger	Superfrost, Marienfelde, Deutschland
Doppelseitiges Klebeband	Tesa, Norderstedt, Deutschland
Bandsäge + Zubehör (Schlitten, Gewichte)	EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland
Vakuumpumpe	EXAKT Advanced Technologies GmbH, Norderstedt, Deutschland
Handschleifgerät (MetaServ™ 250)	Buehler, Esslingen am Neckar, Deutschland

Zur Herstellung von histologischen Schnitten erfolgte nach der Einbettung die Weiterverarbeitung der Proben. Zuerst mussten die zu untersuchenden Bereiche, proximale Tibia für den trabekulären Knochen in Sagital-/Koronarschnitt und Tibiadiaphyse für den kortikalen Knochen im Horizontalschnitt, voneinander separiert werden. Gleichzeitig sollten die Region of Interest in kleineren Kunststoff Proben enthalten sein, welche im Anschluss heruntergeschliffen werden konnten, um eine Untersuchung mittels Fluoreszenzmikroskopie zu ermöglichen.

Zuerst wurden alle Proben mit der distalen Tibiaseite auf Objektträger geklebt. Zur stabilen Befestigung diente doppelseitiges Klebeband. Der Objektträger war als Kontaktfläche für den Schlitten der Bandsäge notwendig und wurde durch einen von der Vakuumpumpe produzierten Unterdruck an diesen gehalten. Um die Stabilität durch den Unterdruck zu erhöhen, wurde der Objektträger vor dem Ansetzen an den Schlitten mit Wasser angefeuchtet. Der Schlitten läuft auf Schienen, welche parallel zur Schnittrichtung der Bandsäge angeordnet sind. Durch diese Konstruktion konnten die Knochenproben horizontal geschnitten werden. Der erste Schnitt erfolgte proximal der mittleren Tibiadiaphyse beziehungsweise des Mittelpunktes der Tibia. Eine genaue Erläuterung der Schnittführung ist in Abbildung 17 und 18 aufgeführt. Das Präparat wurde vorsichtig auf das laufende Sägeblatt der Bandsäge zubewegt und dann mit einem konstanten Zuggewicht von 100g an diesem gehalten. Das Gewicht wurde so gewählt, dass die Zugkraft auf das Sägeblatt einen sauberen Schnitt ermöglichte ohne größere Schnittartefakte zu erzeugen. Der Schnitt erfolgte unter langsam fließendem Wasser, um ebenfalls Reibungs-/Hitzeartefakte zu vermeiden und eine unsaubere Schnittfläche durch Ansammlung von Kunststoffspähnen zu verhindern. Nach Abschluss des ersten Schnittes wurden die Schienen des Schlittens etwa 2-3mm weiter an das Sägeblatt herangeführt, sodass ein weiterer horizontaler Schnitt distal der Tibiamittelpunktlinie

erfolgen konnte. Durch diese zwei Schnitte gewann man drei Knochenpräparate, einen proximalen Tibiaanteil, der für die Untersuchung des trabekulären Knochens weiterverwendet wurde, einen flachen Chip mit der mittleren Tibiadiaphyse für die Untersuchung des kortikalen Knochens und ein distales Tibiaende, welches nicht weiter genutzt wurde.



Das proximale Tibiaende wurde zur Untersuchung des trabekulären Knochens noch weiterbearbeitet. Zur Erstellung eines histologisch untersuchbaren Präparates im sagitalen/koronaren Schnitt musste der Kunststoffzylinder um 90° gedreht auf das Sägeblatt zugeführt werden. Da der Zylinder aber auf Grund der Rundung keine stabile Befestigung auf einem Objektträger erlaubte, wurde das proximale Stück vorerst manuell am Handschleifgerät angeschliffen, sodass eine gerade Auftragungsebene entstand. Hierbei wurde darauf geachtet, dass die neue Auftragungsebene dorsomedial des Unterschenkels, parallel zur Tibia-Fibula-Ebene geschliffen wurde. Der angeschliffene Kunststoffzylinder wurde erneut mittels doppelseitigen Klebebandes an einem Objektträger befestigt und es erfolgte ein Schnitt an der Bandsäge in identischer Technik zu den der Horizontalschnitte. Der erste Schnitt führte fast zentral durch Fibula und Tibia. Der zweite Schnitt durchzog den Rand der Fibula und parallel zum ersten Schnitt das Zentrum der Tibia, sodass ein Chip mit transversal erkennbarer Tibia und Fibula entstand, welcher reichlich trabekulären Knochen der proximalen Tibia enthält.

2.6.3. Weiterverarbeitung der Präparate und Fluoreszenzmikroskopie

Material	Hersteller
Objekträger	Superfrost, Marienfelde, Deutschland
Objekträgerpresse mit UV-Lampe	EXAKT Advanced Tech. GmbH, Norderstedt, Deutschland
UV-Kleber (Loctite)	Henkel AG & Co. KGaA, Düsseldorf, Deutschland
Schleifmaschine + Lasermesseinheit	EXAKT Advanced Tech. GmbH, Norderstedt, Deutschland
Schleifpapier	Hermes Schleifmittel GmbH, Hamburg, Deutschland
Messschraube	EXAKT Advanced Tech. GmbH, Norderstedt, Deutschland
Fluoreszenzmikroskopie (Leica DMRB)	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Digitalkamera (Zeiss AxioCam MRC)	Zeiss GmbH, Deutschland
Axio Vision Rel. 4.4	Carl Zeiss Vision GmbH, Aalen, Deutschland
ImageJ	by Wayne Rasband

Die Chips wurden nach digitaler Höhenmessung mit der Messschraube auf den Seiten der jeweils ersten Schnittebene mit feinem Schleifpapier bearbeitet. Nach erneuter Höhenmessung erfolgte das Aufkleben der Chips mit der bearbeiteten Seite auf einen Objekträger mittels Spezialkleber. Zum Aushärten des Klebstoffes wurden die Präparate in eine Objekträgerpresse gespannt und für 10 Minuten mit der UV-Lampe bestrahlt. Eine Probenhöhe von ca. 60 Mikrometern wurde zur mikroskopischen Untersuchung angestrebt. Um diesen Zielwert zu erreichen, wurden die Proben mit abnehmender Rauigkeit des Schleifpapiers mittels Rotationsschleifmaschine mit Lasermesseinheit auf den Zielwert heruntergeschliffen. Durch die Lasermesseinheit war ein genaues Herunterschleifen möglich, jedoch wurde die Höhe der Proben in Addition zur Dicke der Objekträger stets mittels der Messschraube manuell nachgeprüft. Durch die abnehmende Rauigkeit des Schleifpapiers und der ständigen Wasserzufuhr beim Schleifprozess konnten Artefakte, die die mikroskopische Untersuchung beeinträchtigt hätten, weitestgehend vermieden werden. Die histomorphometrische Untersuchung erfolgte an einem Mikroskop (KS400 3.0, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) mit Quecksilberlampe unter einer 200-fachen Vergrößerung zur Identifizierung der durch die Calcein-Injektion entstandenen Fluorochrombanden. Die mikroskopische Ansicht wurde durch die am Mikroskop befestigte Digitalkamera und den motorisierten Objekträgerkreuztisch festgehalten und mit der Bildanalysesoftware Zeiss KS 400 bearbeitet. Der horizontale Knochenschnitt wurde für die Untersuchung des kortikalen Knochens periostal und endostal auf eine Reaktion des Calceins untersucht. Zur Beurteilung des trabekulären Knochens wurden alle Banden an Trabekeln innerhalb des Markraumes untersucht. Einzelbanden und Doppelbanden wurden mittels ImageJ manuell markiert und ins Verhältnis zur Gesamtknochenoberfläche gesetzt (sLS/BS und

dLS/BS). Ergänzend wurde bei bestehenden Doppelbanden der Abstand zwischen den Banden gemessen. Dabei wurde auf eine Durchschnittsabstandsmessung durch zahlreiche Einzelmessungen zurückgegriffen. Die Nomenklatur beruht auf das 2013 publizierte Update des Histomorphometrie Nomenklatur Komitees [181].

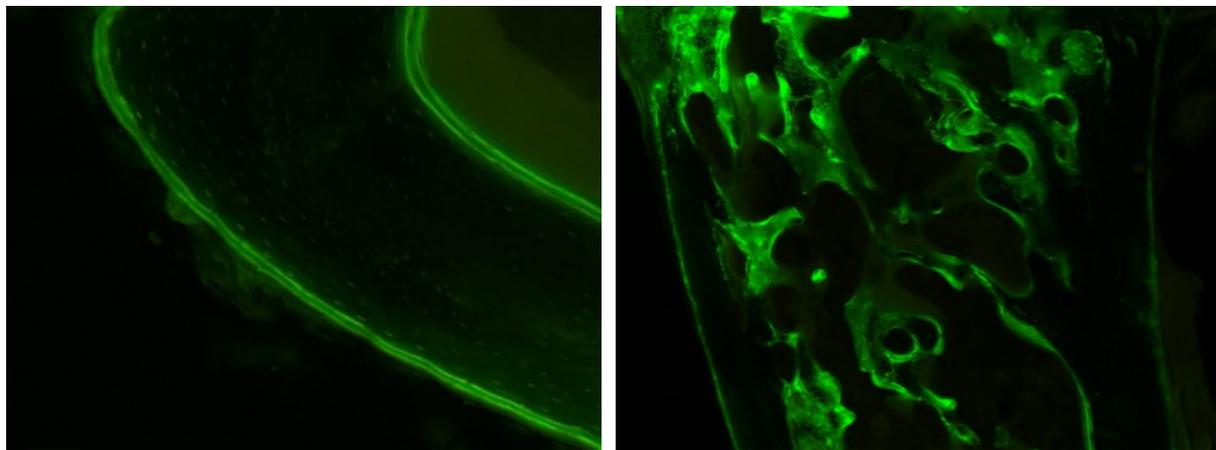


Abbildung 20 Fluoreszenzmikroskopie des kortikalen Horizontalschnittes (links) und des trabekulären Sagittal-/Koronarschnittes (rechts). Die Abbildung zeigt die Fluoreszenzreaktion beider untersuchten Knochenschnitte. Kortikal wurden die Doppelbanden endostal und periostal ermittelt und der durchschnittliche Abstand gemessen. Trabekulär wurden alle Trabekel in einer Ebene markiert und dann auf Fluoreszenzbanden untersucht und bei Doppelbanden ebenfalls der durchschnittliche Abstand ermittelt.

Durch diese Messungen konnte die mineralisierte Oberfläche (MS/BS), die Mineralisationsrate (MAR) und die Knochenbildungsrate (BFR/BS) wie folgt ermittelt werden:

1. $MS/BS = 0,5 \times sLS/BS + dLS/BS$

Sofern keine Doppelbanden zu identifizieren waren, erfolgte die Markierung der Probe mit „no data“.

2. $MAR = \emptyset \text{ Bandenabstand} / 9 \text{ (Tage)}$

Um die MAR möglichst genau zu analysieren wurde das komplette Periost als auch Endost untersucht und der Durchschnittswert durch die 9 Tage dividiert, um eine Mineralisationsrate in Mikrometer je Tag zu ermitteln.

3. $BFR/BS = (BFR = MAR \times MS/BS)$

Die Knochenbildungsrate wird somit als gebildete Knochenfläche in Quadratmikrometer je Mikrometer pro Tag ermittelt und dargestellt.

2.7. Statistische Analyse

Microsoft Excel 2010 und 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA
ANOVA	SAS 9.3, Cary, USA

Die intraindividuellen Auswirkungen auf die Belastung (belastete Tibia zu nicht belastete Kontrolle) und die interindividuellen Auswirkungen von Alter (10 Wochen und 26 Wochen) und Genotyp (SOST-KO und Kontrolle) wurden einzeln als auch kombiniert durch ANOVA analysiert und in absoluten Werten dargestellt. Die prozentuale Veränderung wird wie folgt präsentiert: $\% \Delta = ((\text{belastete Seite} - \text{Kontrollseite}) / \text{Kontrollseite}) \times 100$
Alle Gruppen wurden mittels unabhängigen oder gepaarten T-Tests zu einander verglichen. Sofern nicht anders beschrieben waren alle Resultate signifikant ($p < 0,05$) und werden als Durchschnitt \pm Standardabweichung präsentiert.

2.8. Geschlechtervergleich

Alle erhobenen Daten für den kortikalen Knochen wurden statistisch mit den Daten eines parallellaufenden Experimentes mit gleichem Versuchsaufbau bei weiblichen Versuchstieren verglichen und ins Verhältnis zueinander gesetzt. Dabei wurde sowohl der Status des Knochens zu Beginn des Experimentes miteinander verglichen (Micro-CT-Scan Tag 0) als auch die Knochenreaktion auf Belastung (Micro-CT-Scans und Histomorphometrie).

3. Ergebnisse

3.1. Tibia-Längen und Gewichte der Versuchstiere

Die Tibia-Längen der einzelnen Versuchsgruppen wurden mittels Messschraube ermittelt und ergaben folgende Werte: junge (10 Wochen) SOST-KO Mäuse $15,9 \pm 0,3$ mm, erwachsene (26 Wochen) SOST-KO Mäuse $16,5 \pm 0,4$ mm, junge (10 Wochen) Kontrollmäuse $17,5 \pm 0,3$ mm und erwachsene (26 Wochen) Kontrollmäuse $16,5 \pm 0,4$ mm.

Das Gewicht der Versuchstiere wurde während des gesamten Experimentes einmal täglich monitorisiert. Keine Maus wies im Rahmen der Versuchsdauer eine Gewichtsveränderung von über 10% des Gesamtkörpergewichtes auf, sodass alle Mäuse in die Studie inkludiert werden konnten. Das Gewicht der Versuchsgruppen war jedoch sowohl zum Startzeitpunkt, als auch zum Endzeitpunkt des Experimentes zwischen den Versuchsgruppen zum einen altersbedingt zum andern genotypisch verschieden. Die jungen (10 Wochen) SOST-KO Mäuse wogen $23,1 \pm 1,5$ g zum Start des Experimentes und $23,4 \pm 1,1$ g zum Ende des Experimentes. Die erwachsenen (26 Wochen) SOST-KO Mäuse wogen zu Beginn $33,0 \pm 1,3$ g und zum Ende $33,0 \pm 1,0$ g. Die jungen Kontrollgruppentiere (10 Wochen) hatten zu Beginn des Experimentes ein Gewicht von $22,5 \pm 1,8$ g und zum Ende von $24,0 \pm 1,9$ g. Die erwachsenen Kontrolltiere (26 Wochen) wiesen ein Startgewicht von $27,4 \pm 1,9$ auf und zum Ende ein Gewicht von $27,4 \pm 1,3$ g.

3.2. *In vivo* Kalibrierung für eine Dehnung von 900 microstrain ($\mu\epsilon$)

Um eine Dehnung der Tibia von 900 microstrain ($\mu\epsilon$) zu erreichen, wurden für die Versuchsgruppen unterschiedliche axiale Kompressionskräfte ermittelt, die im Durchschnitt die angestrebte Dehnung in der Tibia bewirken. Somit wurden folgende durchschnittliche axiale Kompressionskräfte ermittelt und für das Belastungsexperiment festgelegt:

- -10,5 N für die 10 Wochen alten SOST-KO Mäuse
- -14,8 N für die 26 Wochen alten SOST-KO Mäuse
- -7,5 N für die 10 Wochen alten WT Mäuse
- -9,0 N für die 26 Wochen alten WT Mäuse

3.3. Evaluation des kortikalen Knochens

Der kortikale Knochen konnte mittels der Micro-CT-Scans statisch beurteilt werden und durch die Differenzen zwischen den Scan-Tagen, der 3D-Morphometrie-Analyse und der Histomorphometrie dynamisch ausgewertet werden.

3.3.1. Evaluation der Micro-CT Untersuchung

Bis auf drei Scan-Untersuchungen waren alle Scans vollständig und konnten für die Auswertung verwendet werden. Die Scans von zwei 26 Wochen alten SOST-KO Mäusen waren an Tag 0 fehlerhaft und mussten aus der Studie ausgeschlossen werden, des Weiteren der Scan einer 10 Wochen alten SOST-KO Maus an Tag 5 auf Grund eines Scanfehlers.

Der kortikale Knochen wurde an Hand von drei Parametern untersucht:

- Kortikale Knochenfläche (Ct.Ar)
- Kortikale Knochenfläche zu Gesamtknochenfläche (Ct.Ar/T.Ar)
- Kortikale Dicke (Ct.Th)

Mit Hilfe dieser Parameter konnte der kortikale Knochen der Mäuse statisch zu Beginn des Versuches als auch dynamisch anhand der vier Micro-CT Untersuchungen über die 15 Tage Versuchsdauer ausgewertet werden.

Es wurden ebenfalls die Parameter maximales Trägheitsmoment (I_{max}), minimales Trägheitsmoment (I_{min}), Gesamtknochenfläche (T.Ar) und kortikale volumetrische Dichte (Ct.vTMD) ermittelt, sollen aber in dieser Arbeit keine weitere Berücksichtigung finden, da es über das Thema hinausgeht.

3.3.1.1. Einfluss von Alter & Genotyp auf den kortikalen Knochen an Tag 0

Zur Untersuchung des Einflusses der Sklerostininhibition wurden die Werte der Kontrolltiere zu Beginn des Experimentes als 100% festgelegt und die Parameter der SOST-KO Mäuse bezüglich prozentualer Zu- oder Abnahme untersucht. Es konnte bei allen Parametern ein signifikanter Einfluss der Sklerostininhibition auf den kortikalen Knochen festgestellt werden.

Die kortikale Knochenfläche (Ct.Ar) war bei Sklerostininhibition mit +63% bei den jungen Versuchstieren und +104% bei den erwachsenen Versuchstieren deutlich erhöht. Die kortikale Knochenfläche zur Gesamtfläche (Ct.Ar/T.Ar) zeigte eine Zunahme von +21%

(junge) und +34% (erwachsene) bei SOST-KO Genotyp. Bei der kortikalen Dicke (Ct.Th) konnte eine Zunahme von +44% (junge) und +75% (erwachsene) durch Sklerostinmangel beobachtet werden.

Hinsichtlich der zwei untersuchten Altersgruppen konnte anhand der selben Parameter ein signifikant kräftigerer kortikaler Knochen bei den erwachsenen Versuchstieren festgestellt werden im Vergleich zu den Jüngeren. Diese Beobachtung gilt für beide Genotypen. Die kortikale Knochenfläche (Ct.Ar) war prozentual bei den 26 Wochen alten Versuchstieren mit +31% (Kontrolle) und +65% (SOST-KO) erhöht. Ein erhöhter kortikaler Knochenanteil zur Gesamtfläche (Ct.Ar/T.Ar) mit +9% (Kontrolle) und +22% (SOST-KO) bei den erwachsenen Mäusen konnte ebenfalls beobachtet werden. Auch der letzte untersuchte Parameter, die kortikale Dicke (Ct.Th), verhielt sich mit +21% (Kontrolle) und +46% (SOST-KO) zu Gunsten der 26 Wochen alten Mäuse. Die totalen Werte sind in Abbildung 22 dargestellt.

Neben Alter und Genotyp, die bereits an Tag 0 einen signifikanten Einfluss auf den kortikalen Knochen aufwiesen, konnte ebenfalls der Faktor Belastung bereits zu Beginn des Experimentes fehlerhaft signifikante Ergebnisse für die Parameter Kortikale Fläche (Ct.Ar) und Gesamtfläche (T.Ar) bewirken.

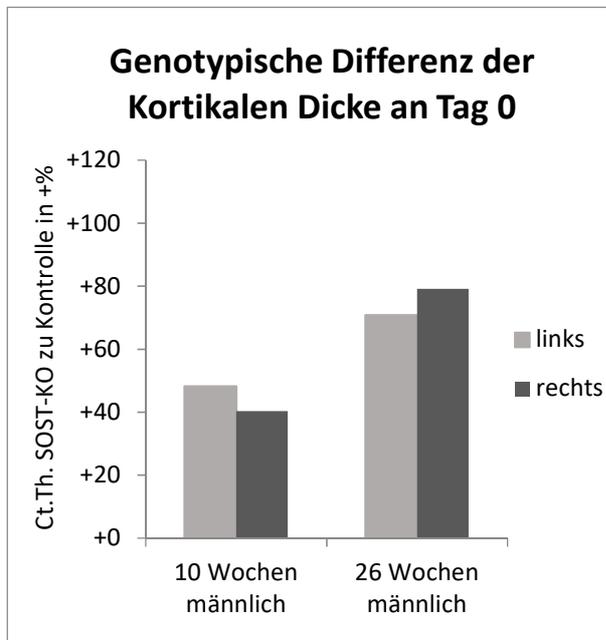
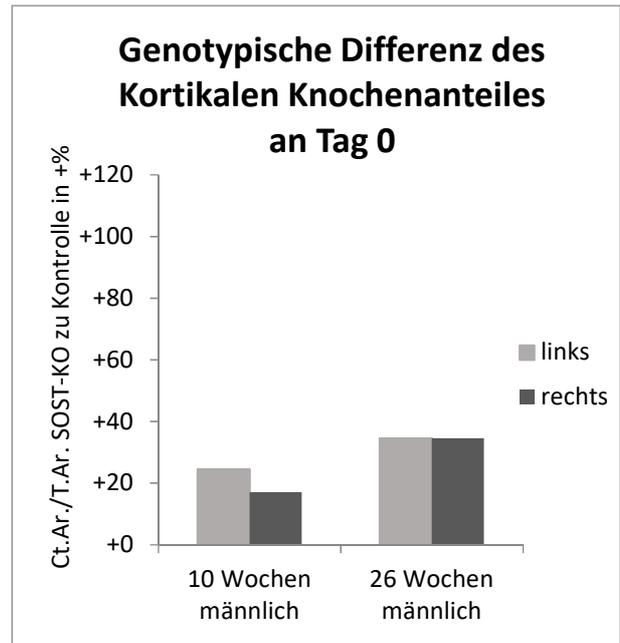
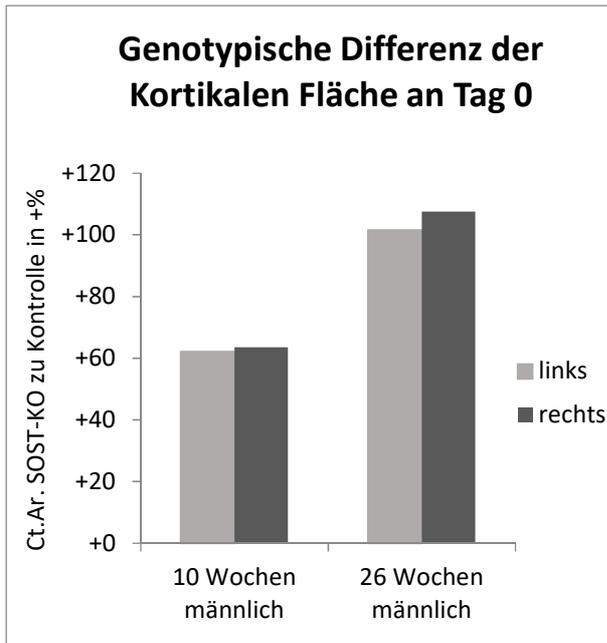


Abbildung 21 Genotypische Differenz der kortikalen Knochenparameter an Tag 0. Die Abbildungen zeigen die prozentuale Differenz der kortikalen Knochenparameter Kortikale Fläche (Ct.Ar.), Kortikaler Knochenanteil (Ct.Ar./T.Ar) und Kortikale Dicke (Ct.Th) zu Beginn des Experimentes für beide Altersgruppen in Abhängigkeit des Genotyps. Die Kontrollgruppen wurden als 100% festgelegt und die Zunahme durch Sklerostininhibition als +% angegeben. Es ist in allen Parametern ein stärkerer Einfluss des Genotyps mit zunehmendem Alter zu erkennen. Ebenfalls sieht man eine deutliche Differenz zwischen linker und rechter Tibia bereits an Tag 0.

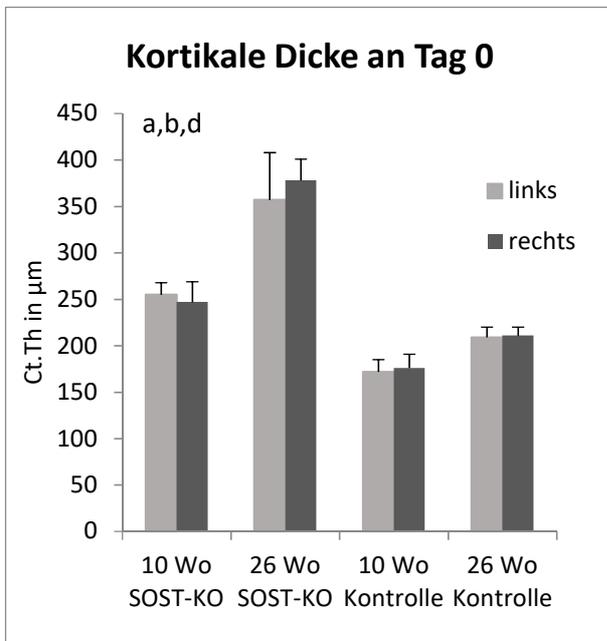
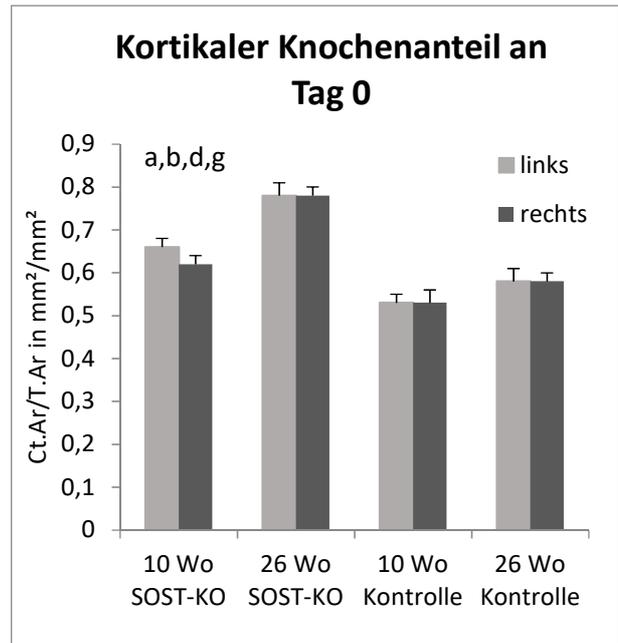
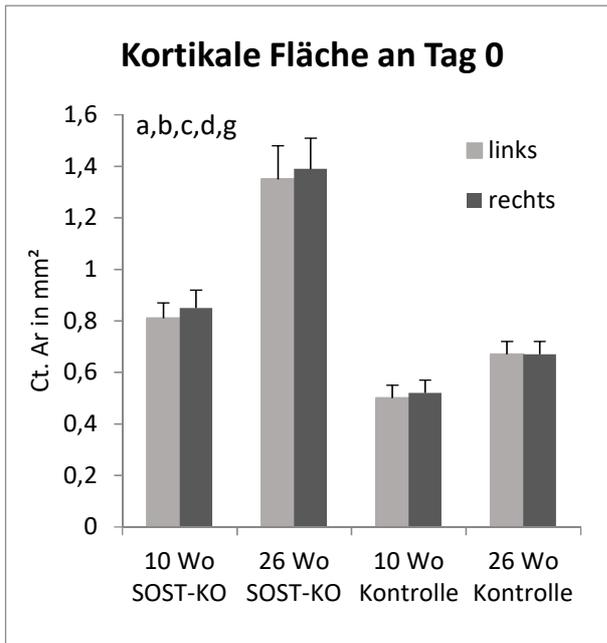


Abbildung 22 Diagramme der Ergebnisse der Micro-CT-Scans an Tag 0 zur Beurteilung des kortikalen Knochens. In den Diagrammen sind die drei untersuchten Parameter in totalen Werten abgebildet. Die Kortikale Knochenfläche, die Kortikale Knochenfläche zur Gesamtknochenfläche und die Kortikale Dicke werden für die vier Versuchsgruppen miteinander verglichen. Die Parameter sind für die linke und rechte Tibia an Tag 0 des Experimentes abgebildet. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

3.3.1.2. Kortikale Knochenreaktion von Tag 15 zu 0

Bei der Untersuchung der Reaktion des kortikalen Knochens auf Belastung im Rahmen des zweiwöchigen Versuchsaufbaues reagierte dieser sehr unterschiedlich, sodass hier die Parameter einzeln beschrieben werden müssen.

Betrachtet man die Reaktion der Kortikalen Knochenfläche, ist die stärkste Zunahme bei den jungen Kontroll-Mäusen zu beobachten mit einer Zunahme der Ct.Ar von +16,0% bei Belastung und von +15,4% ohne Belastung. Es ist jedoch kein relevanter Einfluss der Belastung zu identifizieren. Dieser ist bei der gleichalten SOST-KO Population jedoch gut zu erkennen, wobei die Belastung eine Zunahme +9,9% bewirkte, während die Kontrollseite nur um +4,7% zunahm. Bei den erwachsenen Versuchsgruppen war eine Zunahme bei den Mäusen mit Sklerostinmangel zu beobachten, wobei Belastung einen leichten unterstützenden Effekt aufwies und eine Zunahme von +3,0% bewirkte, während die Kontrollseite nur eine Zunahme von +2,2% erfuhr. Dieser unterstützende Effekt war bei der Kontrollgruppe jedoch nicht zu identifizieren. Im Gegenteil, die Zunahme der unbelasteten kortikalen Knochenfläche von +3,0%, wurde unter Belastung komplett supprimiert (0,0%).

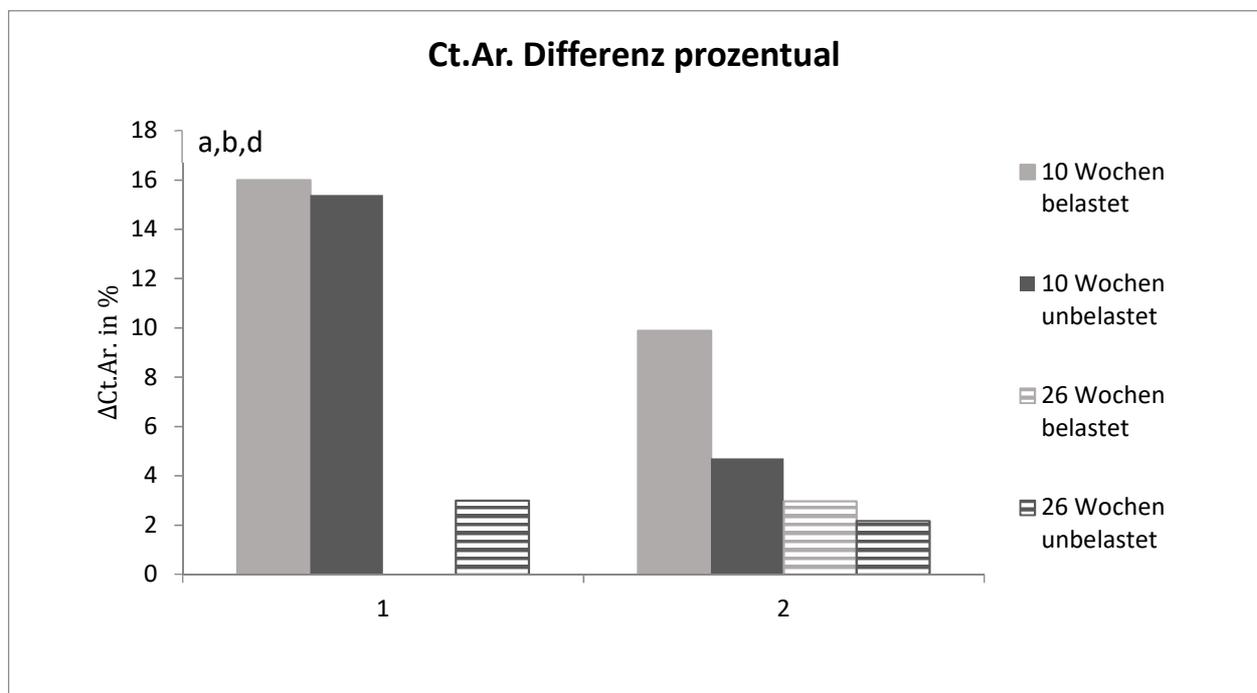


Abbildung 23 Differenz der Kortikalen Knochenfläche prozentual von Tag 15 zu Tag 0. Abgebildet ist die Entwicklung der Kortikalen Fläche im Rahmen des Experimentes für alle vier Versuchsgruppen, sowohl auf der belasteten als auch der unbelasteten Seite. Alle Angaben sind als prozentuale Differenz zu den Tag 0 Werten zu verstehen. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

Die Kortikale Knochenfläche im Verhältnis zur Gesamtfläche zeigte wiederum je nach Versuchsgruppe andere Reaktionen. Generell war eine Zunahme bei den jungen Mäusen und eine Abnahme bei den Erwachsenen (außer bei Belastung in der SOST-KO Population) zu beobachten. Den stärksten Anstieg wiesen erneut die jungen Kontrolltiere auf und diesmal war ebenfalls ein belastungsspezifischer Effekt zu erkennen. Unter Belastung war eine Zunahme von +5,7% zu ermitteln, während ohne Belastung nur ein Anstieg von +3,7% zu verzeichnen war. Eine ähnliche Zunahme des kortikalen Knochenanteiles war bei den jungen Mäusen mit Sklerostinmangel zu beobachten bei ausbleibender Belastung (+3,2%). Jedoch war der Effekt der Belastung entgegengesetzt zu dem der gleichalten Kontrolltiere und supprimierte den kontrollseitig beobachteten Anstieg auf +1,5%. Bei den erwachsenen Versuchstieren der Kontrollpopulation war kein Unterschied bei Belastung zu beobachten und beide Seiten zeigten eine Reduktion des Kortikalen Knochenanteiles von -1,7%. Ein positiver Einfluss war dafür bei den erwachsenen Mäusen mit Sklerostinmangel zu erkennen, da hier die Reduktion von -1,2% nicht nur komplett verhindert werden konnte, sondern bei Belastung sogar eine Zunahme von +1,3% festgestellt werden konnte.

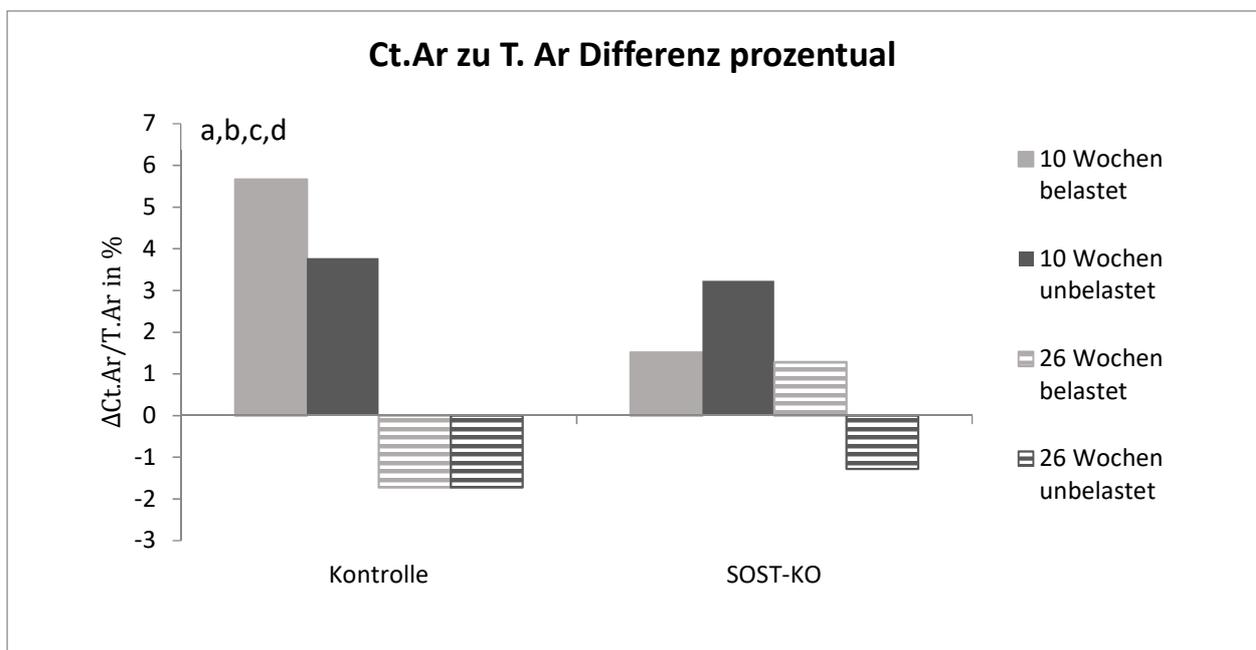


Abbildung 24 Differenz der Kortikalen Knochenfläche zur Gesamtfläche prozentual von Tag 15 zu Tag 0. Abgebildet ist die Entwicklung des Kortikalen Knochenanteiles im Rahmen des Experimentes für alle vier Versuchsgruppen, sowohl auf der belasteten als auch der unbelasteten Seite. Alle Angaben sind als prozentuale Differenz zu den Tag 0 Werten zu verstehen. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

Bei Betrachtung der Reaktion der Kortikalen Dicke fiel auf, dass bei den jungen Versuchstieren generell eine Zunahme zu erkennen war und bei den Erwachsenen eine Abnahme, außer erneut bei den SOST-KO Tieren bei Belastung. Damit verhielt sich die Kortikale Dicke vorerst ähnlich zum Kortikalen Knochenanteil. Auch bei der Kortikalen Dicke waren die jungen Kontrolltiere, die Versuchstiere mit dem höchsten Zuwachs, wobei Belastung erneut einen deutlich synergistischen Effekt aufwies durch eine Steigerung der Zunahme von +7,4% auf +11,6%. Der positive Effekt konnte bei den jungen Versuchstieren mit Sklerostinmangel nicht beobachtet werden, jedoch war in diesem Fall auch kein antagonistischer Effekt festzustellen. Die Zunahme war mit Belastung nur unwesentlich stärker mit +6,7% als die der Kontrollseite mit +6,5%. Bei den erwachsenen Versuchstieren war die Entwicklung der Kortikalen Dicke erneut ähnlich zu der, des Kortikalen Knochenanteiles. Generell war eine Abnahme zu beobachten, mit Ausnahme der SOST-KO Mäuse bei Belastung. Bei den Kontrolltieren war eine Abnahme von -3,3% kontrollseitig zu verzeichnen. Diese Abnahme war bei gleichzeitiger Belastung auf -4,3% verstärkt. Entgegengesetzt verhielt sich die Entwicklung der Kortikalen Dicke bei den erwachsenen Mäusen mit Sklerostinmangel. Bei denen wurde ohne Belastung eine Abnahme von -1,3% beobachtet, welche bei Belastung komplett verhindert wurde und erneut ein Anstieg von +5,0% zu verzeichnen war.

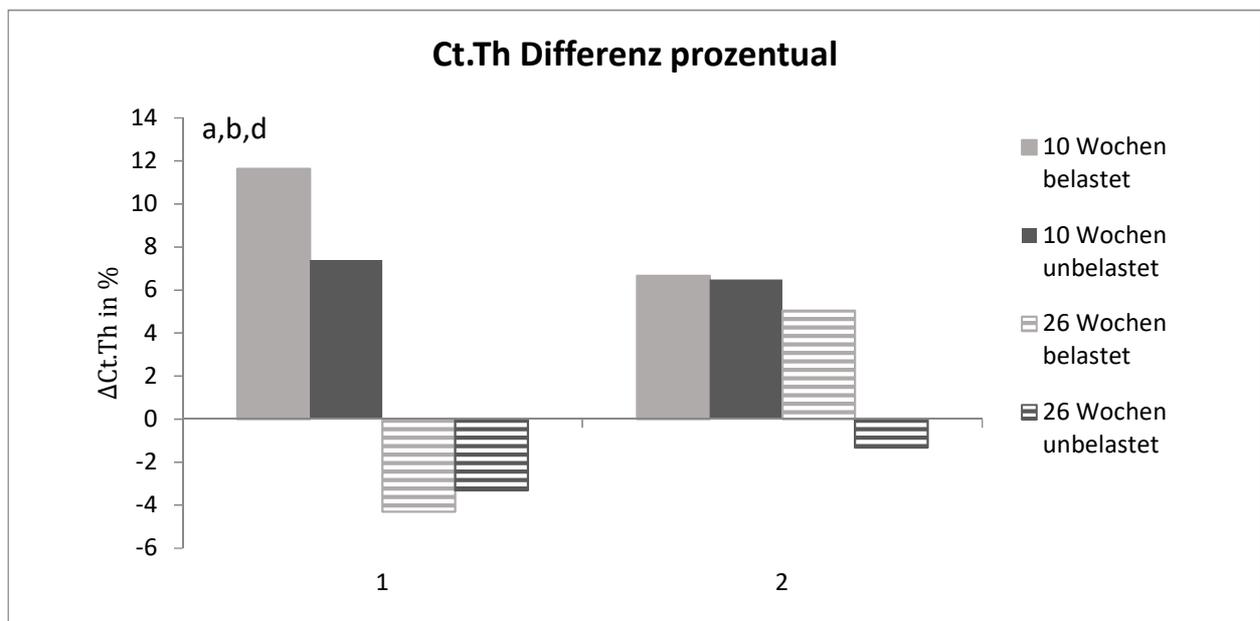


Abbildung 25 Differenz der Kortikalen Dicke prozentual von Tag 15 zu Tag 0. Abgebildet ist die Entwicklung der Kortikalen Dicke im Rahmen des Experimentes für alle vier Versuchsgruppen, sowohl auf der belasteten als auch der unbelasteten Seite. Alle Angaben sind als prozentuale Differenz zu Tag 0 Werten zu verstehen. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

Alle Angaben wurden zur Beurteilung des Verlaufes und des besseren Vergleiches prozentual aufgeführt. Die totalen Werte sind in der Tabelle 1 aufgeführt und bieten einen Überblick über die Größeneinordnung der untersuchten Parameter. Durch die unterschiedlichen totalen Ausgangswerte ist die Beurteilung der dynamischen Verlaufparameter in Prozent nur begrenzt geeignet zur Erklärung des Gesamtgeschehens. Dieser Aspekt ist dem Autor bewusst und wird in der Diskussion erneut thematisiert.

Tabelle 1 Kortikale Micro-CT Daten der Tibiadiaphyse von Tag 0, 5, 10 und 15. Alle Parameter werden als Durchschnittswert \pm Standardabweichung angegeben. Aufgelistete Parameter sind: Maximales Flächenträgheitsmoment, minimales Flächenträgheitsmoment, Kortikale Fläche, Gesamtknochenfläche, Kortikale Fläche zu Gesamtfläche, Kortikale Dicke und Kortikale Dichte. Für Tag 0 und 15 wurden ANOVAs durchgeführt: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

Kortikale Diaphyse	SOST-KO Mäuse				Kontroll Mäuse			
	10 Wochen		26 Wochen		10 Wochen		26 Wochen	
männlich	belastet	Kontrolle	belastet	Kontrolle	belastet	Kontrolle	belastet	Kontrolle
Parameter								
Tag 0	(n=7)	(n=7)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=7)	(n=7)
Imax (mm ⁴) a, b, c, d, e	0.12 \pm 0.02	0.13 \pm 0.02	0.25 \pm 0.05	0.27 \pm 0.05	0.06 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.1 \pm 0.02	0.11 \pm 0.01
Imin (mm ⁴) a, b, c, d	0.09 \pm 0.01	0.17 \pm 0.02	0.19 \pm 0.03	0.31 \pm 0.04	0.05 \pm 0.01	0.11 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.15 \pm 0.02
Ct.Ar (mm ²) a, b, c, d, g	0.81 \pm 0.06	0.85 \pm 0.07	1.35 \pm 0.13	1.39 \pm 0.12	0.5 \pm 0.05	0.52 \pm 0.05	0.67 \pm 0.05	0.67 \pm 0.05
T.Ar (mm ²) a, b, c, d	1.24 \pm 0.09	1.32 \pm 0.08	1.73 \pm 0.14	1.78 \pm 0.14	0.95 \pm 0.07	0.99 \pm 0.05	1.15 \pm 0.11	1.16 \pm 0.1
Ct.Ar/T.Ar (mm ² /mm ²) a, b, d, g	0.66 \pm 0.02	0.62 \pm 0.02	0.78 \pm 0.03	0.78 \pm 0.02	0.53 \pm 0.02	0.53 \pm 0.03	0.58 \pm 0.03	0.58 \pm 0.02
Ct.Th (μ m) a, b, d	255 \pm 13	247 \pm 22	357 \pm 51	378 \pm 23	172 \pm 13	176 \pm 15	209 \pm 11	211 \pm 9
Ct.vTMD (mg HA/cm ³) a, b, c, d, g	1263 \pm 29	1262 \pm 24	1349 \pm 43	1374 \pm 19	1235 \pm 11	1280 \pm 21	1319 \pm 20	1371 \pm 12
Tag 5	(n=6)	(n=6)	(n=8)	(n=8)	(n=6)	(n=6)	(n=7)	(n=7)
Imax (mm ⁴)	0.12 \pm 0.02	0.14 \pm 0.02	0.27 \pm 0.05	0.29 \pm 0.06	0.07 \pm 0.01	0.08 \pm 0.01	0.1 \pm 0.02	0.11 \pm 0.02
Imin (mm ⁴)	0.1 \pm 0.01	0.18 \pm 0.02	0.2 \pm 0.03	0.32 \pm 0.04	0.05 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.15 \pm 0.02
Ct.Ar (mm ²)	0.84 \pm 0.06	0.84 \pm 0.07	1.37 \pm 0.11	1.41 \pm 0.11	0.53 \pm 0.06	0.56 \pm 0.05	0.66 \pm 0.04	0.67 \pm 0.06
T.Ar (mm ²)	1.26 \pm 0.06	1.33 \pm 0.07	1.77 \pm 0.13	1.82 \pm 0.15	0.98 \pm 0.08	1.05 \pm 0.05	1.16 \pm 0.11	1.17 \pm 0.12
Ct.Ar/T.Ar (mm ² /mm ²)	0.66 \pm 0.02	0.63 \pm 0.03	0.77 \pm 0.03	0.77 \pm 0.03	0.54 \pm 0.02	0.53 \pm 0.02	0.58 \pm 0.03	0.58 \pm 0.03
Ct.Th (μ m)	262 \pm 17	255 \pm 19	364 \pm 31	373 \pm 27	176 \pm 13	179 \pm 14	209 \pm 8	210 \pm 10
Ct.vTMD (mg HA/cm ³)	1262 \pm 34	1260 \pm 26	1316 \pm 30	1371 \pm 16	1031 \pm 19	1275 \pm 11	1316 \pm 21	1336 \pm 31
Tag 10	(n=7)	(n=7)	(n=8)	(n=8)	(n=6)	(n=6)	(n=7)	(n=7)
Imax (mm ⁴)	0.13 \pm 0.02	0.14 \pm 0.02	0.26 \pm 0.05	0.29 \pm 0.04	0.07 \pm 0.01	0.08 \pm 0.02	0.1 \pm 0.01	0.11 \pm 0.02
Imin (mm ⁴)	0.1 \pm 0.01	0.19 \pm 0.02	0.2 \pm 0.03	0.32 \pm 0.03	0.05 \pm 0.01	0.12 \pm 0.01	0.07 \pm 0.01	0.15 \pm 0.02
Ct.Ar (mm ²)	0.86 \pm 0.06	0.87 \pm 0.06	1.37 \pm 0.11	1.4 \pm 0.1	0.56 \pm 0.06	0.57 \pm 0.07	0.67 \pm 0.03	0.68 \pm 0.05
T.Ar (mm ²)	1.31 \pm 0.1	1.36 \pm 0.07	1.74 \pm 0.15	1.83 \pm 0.12	1 \pm 0.09	1.05 \pm 0.05	1.17 \pm 0.11	1.19 \pm 0.12
Ct.Ar/T.Ar (mm ² /mm ²)	0.66 \pm 0.04	0.64 \pm 0.03	0.79 \pm 0.03	0.77 \pm 0.02	0.56 \pm 0.02	0.54 \pm 0.03	0.58 \pm 0.03	0.57 \pm 0.03
Ct.Th (μ m)	265 \pm 25	260 \pm 22	377 \pm 33	368 \pm 30	186 \pm 12	187 \pm 17	210 \pm 9	210 \pm 7
Ct.vTMD (mg HA/cm ³)	1263 \pm 21	1283 \pm 12	1348 \pm 24	1351 \pm 27	1243 \pm 29	1281 \pm 12	1315 \pm 25	1341 \pm 13
Tag 15	(n=7)	(n=7)	(n=8)	(n=8)	(n=6)	(n=6)	(n=7)	(n=7)
Imax (mm ⁴) a, b, c, d, e	0.14 \pm 0.01	0.15 \pm 0.02	0.26 \pm 0.04	0.29 \pm 0.04	0.08 \pm 0.2	0.09 \pm 0.01	0.11 \pm 0.03	0.12 \pm 0.03
Imin (mm ⁴) a, b, c, d, e, f	0.11 \pm 0.01	0.19 \pm 0.02	0.2 \pm 0.02	0.32 \pm 0.03	0.06 \pm 0.01	0.13 \pm 0.02	0.07 \pm 0.01	0.16 \pm 0.02
Ct.Ar (mm ²) a, b, d	0.89 \pm 0.06	0.89 \pm 0.08	1.39 \pm 0.1	1.42 \pm 0.11	0.58 \pm 0.07	0.6 \pm 0.07	0.67 \pm 0.05	0.69 \pm 0.06
T.Ar (mm ²) a, b, c, d	1.33 \pm 0.06	1.39 \pm 0.06	1.76 \pm 0.11	1.83 \pm 0.11	1.03 \pm 0.1	1.09 \pm 0.07	1.19 \pm 0.12	1.21 \pm 0.13
Ct.Ar/T.Ar (mm ² /mm ²) a, b, c, d	0.67 \pm 0.04	0.64 \pm 0.04	0.79 \pm 0.04	0.77 \pm 0.02	0.56 \pm 0.02	0.55 \pm 0.03	0.57 \pm 0.04	0.57 \pm 0.03
Ct.Th (μ m) a, b, d	272 \pm 23	263 \pm 26	375 \pm 31	373 \pm 29	192 \pm 13	189 \pm 20	200 \pm 19	204 \pm 13
Ct.vTMD (mg HA/cm ³) b, c, d, e	1262 \pm 17	1273 \pm 20	1346 \pm 18	1374 \pm 20	1253 \pm 27	1293 \pm 15	1296 \pm 45	1351 \pm 33

3.3.1.3. Evaluation der dynamischen 3D-Morphometrie-Analyse

Bei der genauen Analyse von Mineralisations- und Resorptionsarealen konnte eine durch Sklerostinmangel bedingte erhöhte Knochenbildung nachgewiesen werden. Die SOST-KO Mäuse wiesen in beiden Altersgruppen eine höhere Mineralisierte Oberfläche auf als ihre Vergleichstiere. Gleichzeitig konnte eine deutliche Differenz der Knochenbildung bei zunehmenden Alter beobachtet werden und die Mäuse der älteren Versuchsgruppen zeigten geringere Werte in Mineralisierter Oberfläche und auch Mineralisiertem Volumen im Vergleich zu den 10 Wochen alten Tieren. Das Mineralisierte Volumen war bei den Kontrolltieren um -76% reduziert und für die SOST-KO Mäuse um -70%. Die Mineralisierte Oberfläche reduzierte sich um -48% für die Kontrolltiere und -39% für die Mäuse mit Sklerostinmangel. Jedoch zeigt diese beobachtete Reduktion ebenfalls, dass der Einfluss des Alters auf die Knochenbildung durch Sklerostinmangel nicht beeinflusst werden kann. Das Alter bewirkte ebenfalls eine Veränderung der Resorptionsraten. In beiden Gruppen konnten höhere Werte für Resorbierte Oberfläche und Resorbiertes Volumen bei den 26 Wochen alten Mäusen festgestellt werden als bei den Jungtieren. Auch hier konnte kein Einfluss von Sklerostinmangel ausgemacht werden.

Bei beiden Genotypen konnte ein positiver Einfluss durch Belastung auf die Mineralisation des Knochens beobachtet werden. Bei den Kontrolltieren wurde ein Anstieg der Mineralisierten Oberfläche um +18% für die 10 Wochen alten und um +4% für die 26 Wochen alten Mäuse festgestellt. Das Mineralisierte Volumen erfuhr ebenfalls eine Zunahme von +38% für die 10 Wochen alten und +18% für die 26 Wochen Alten. Bei den Mäusen mit Sklerostinmangel war ebenso ein Anstieg beider Parameter zu erkennen mit +10% MS/BS und +26% MV/BV für die Jungtiere und +26% MS/BS und +76% MV/BV für die 26 Wochen alten Mäuse. Statistisch konnte kein Einfluss des Sklerostinmangels auf die Knochenreaktion von mechanischer Belastung festgestellt werden. Bei der Beurteilung der Wirkung von mechanischer Belastung auf die Resorption konnte kein Einfluss für 10 Wochen alte oder 26 Wochen alte Mäuse mit oder ohne Sklerostinmangel festgestellt werden.

Tabelle 2 3D-Morphometrie-Analyse Daten. Dargestellt sind die Ergebnisse in Durchschnittswert und Standardabweichung. Ermittelt wurde die Mineralisierte Oberfläche zur Gesamtknochenoberfläche (MS/BS), Resorbierte Oberfläche zur Gesamtknochenoberfläche (ES/BS), Mineralisiertes Volumen zum Gesamtknochenvolumen (MV/BV) und Resorbiertes Volumen zum Gesamtknochenvolumen (EV/BV). ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

Kortikale Diaphyse	SOST-KO Mäuse				Kontroll Mäuse			
	10 Wochen		26 Wochen		10 Wochen		26 Wochen	
Parameter	Belastet	Kontrolle	Belastet	Kontrolle	Belastet	Kontrolle	Belastet	Kontrolle
MS/BS (mm ² /mm ²) a, b, c	0.56 ± 0.06	0.51 ± 0.1	0.39 ± 0.1	0.31 ± 0.05	0.52 ± 0.08	0.44 ± 0.08	0.24 ± 0.07	0.23 ± 0.09
ES/BS (mm ² /mm ²) b	0.004 ± 0.005	0.0004 ± 0.0005	0.044 ± 0.051	0.019 ± 0.008	0.009 ± 0.015	0.009 ± 0.014	0.058 ± 0.058	0.073 ± 0.083
MV/BV (mm ³ /mm ³) b, c	0.072 ± 0.02	0.057 ± 0.027	0.03 ± 0.014	0.017 ± 0.006	0.099 ± 0.035	0.072 ± 0.032	0.02 ± 0.007	0.017 ± 0.008
EV/BV (mm ³ /mm ³) b	0.001 ± 0.001	0 ± 0	0.01 ± 0.011	0.005 ± 0.002	0.002 ± 0.004	0.002 ± 0.003	0.014 ± 0.016	0.02 ± 0.026

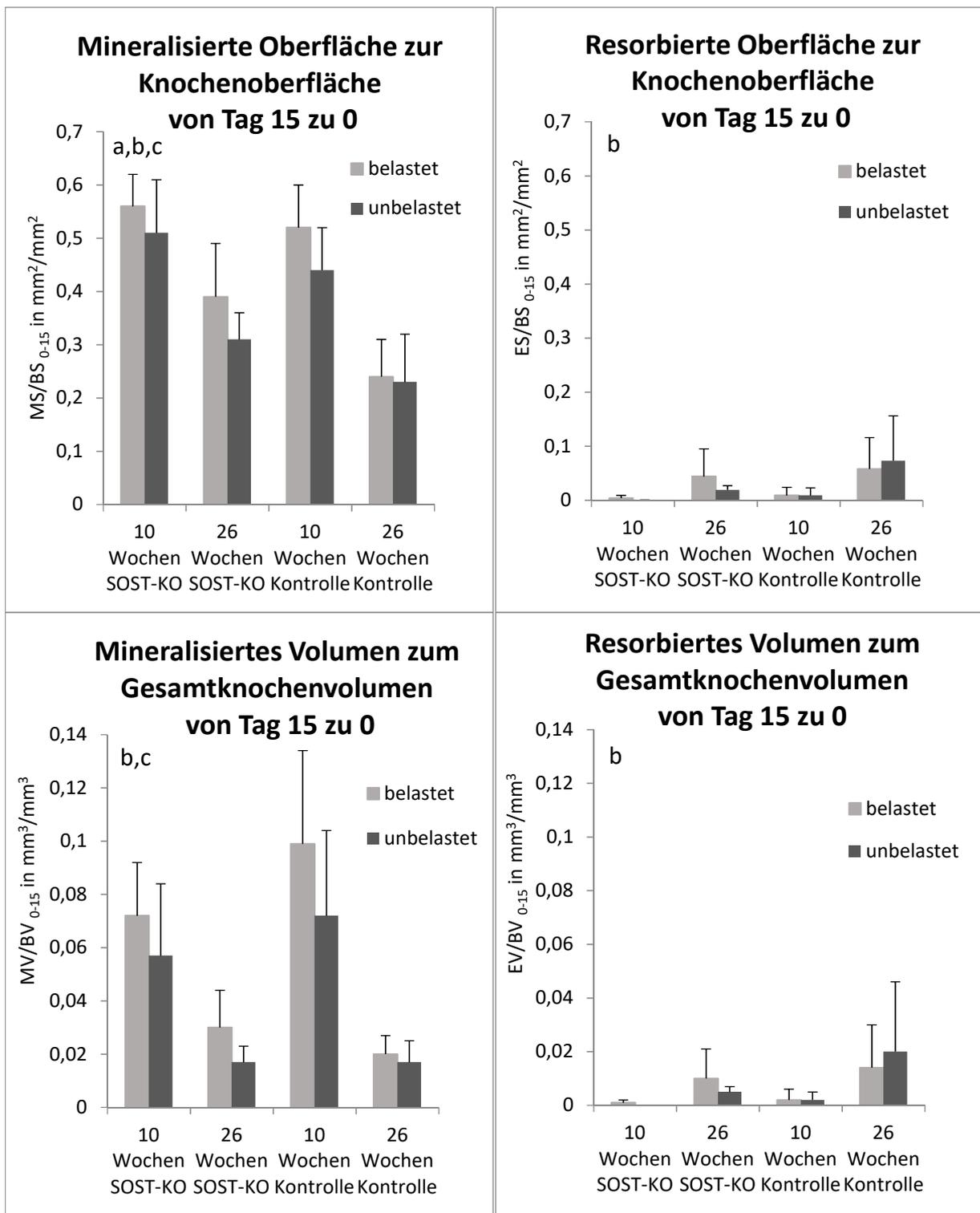


Abbildung 26 3D-Morphometrie-Analyse Diagramme. Abgebildet sind die Mineralisierte und Resorbierte Oberfläche im Verhältnis zur Gesamtknochenoberfläche und Mineralisiertes und Resorbiertes Volumen zum Gesamtknochenvolumen aller vier Versuchsgruppen für die belastete und unbelastete Seite. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

3.3.2. Dynamische Histomorphometrie

Bei der Histomorphometrie konnte der kortikale und trabekuläre Knochen anhand von drei Parametern untersucht und beurteilt werden. Zur Einschätzung der dynamischen Knochenstrukturänderungen wurden die mineralisierte Oberfläche („mineralized surface/ bone surface“, MS/BS), die Mineralisationsrate („mineralization rate“, MAR) und die Knochenbildungsrate („Bone formation rate“, BFR), die sich aus dem Produkt der beiden ersten ergibt, ermittelt. Der kortikale Knochen wurde sowohl periostal als auch endostal mittels oben beschriebener Technik untersucht und an Hand der eben erwähnten Parameter beurteilt.

3.3.2.1. Periostal

Zur Beurteilung des periostalen kortikalen Knochens wurden 56 Proben untersucht. Die Proben wurden auf Fluoreszenzreaktion geprüft und Doppelbanden identifiziert. Proben, die keine Doppelbanden aufwiesen wurden mit „no data“ markiert und aus der Untersuchung ausgeschlossen. 13 von 14 Proben der 10 Wochen alten SOST-KO Mäuse konnten zur Beurteilung der periostalen Reaktion verwendet werden. Bei den 26 Wochen alten SOST-KO Mäusen konnten 10 von 16 Proben genutzt werden. 11 der 12 Proben der jungen Kontrolltiere konnten in die Studie inkludiert werden und 14 von 14 Proben der erwachsenen Kontrolltiere wiesen Doppelbanden auf. An den 48 von 56 Proben wurden die oben beschriebenen Parameter ermittelt und die kortikale Knochenreaktion im Zeitraum des Experimentes beurteilt.

Die mineralisierte Oberfläche zeigte nur in Bezug auf Alter signifikante Unterschiede im periostalen Bereich. Bei den Jungtieren konnte ein erhöhter mineralisierter Oberflächenanteil im Vergleich zu den erwachsenen Versuchstieren beobachtet werden. Alle anderen Beobachtungen sind rein deskriptiv und nicht von signifikanter Aussagekraft.

Belastung steigerte den Anteil an mineralisierter Oberfläche in allen Gruppen periostal dezent außer bei den jungen Mäusen mit Sklerostinmangel. Diese wiesen einen Anteil an mineralisierter Oberfläche von 54% unbelastet auf und einen durch Belastung reduzierten Anteil von 50%. Bei den jungen Kontrolltieren konnte unbelastet ein Anteil von 51% beobachtet werden, jedoch stieg der Anteil unter Belastung auf 60% an. Dieser durch Belastung erhöhte Anteil an mineralisierter Oberfläche war auch bei den erwachsenen Versuchstieren zu erkennen. Bei den erwachsenen Kontrolltieren konnte ein unbelasteter Anteil von 42% und ein belasteter von 47% festgestellt werden und bei den erwachsenen Mäusen mit Sklerostinmangel von 49% unbelastet und 52% bei Belastung.

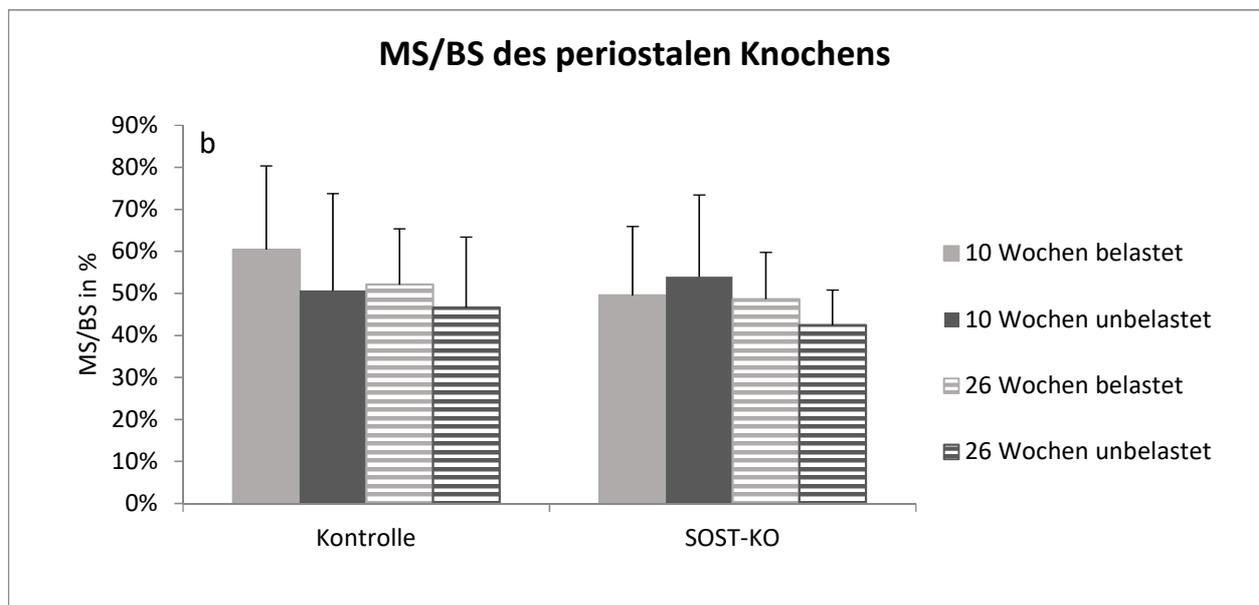


Abbildung 27 Anteil der Mineralisierten Oberfläche an der Gesamtoberfläche des periostalen Knochens. Dargestellt ist der Anteil der mineralisierten Oberfläche aller vier Versuchsgruppen für die belastete Seite und die Kontrollseite. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

Bei der Betrachtung der Mineralisationsrate am periostalen Knochen sind die gleichen Signifikanzen wie zuvor beim mineralisierten Oberflächenanteil zu erkennen. Jungtiere zeigen höhere Mineralisationsraten als Erwachsene, insbesondere in der Kontrollpopulation ist die Differenz gut zu erkennen.

Die höchste Mineralisationsrate konnte bei den jungen Kontrollmäusen beobachtet werden, wobei die Raten 1,65 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet und 1,60 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ bei Belastung betragen. Die niedrigste Rate hingegen konnten bei den erwachsenen Kontrolltieren eruiert werden. Die Rate der erwachsenen Kontrollmäuse betrug nur 0,67 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet und bei Belastung 0,70 $\mu\text{m}/\text{Tag}$. Die erwachsenen SOST-KO Mäuse zeigten ebenfalls keine relevante Steigerung der Raten bei Belastung mit Werten von 0,89 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet und 0,92 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ belastet. Bei den SOST-KO Jungtieren konnte unbelastet eine Mineralisationsrate von 0,94 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ festgestellt werden, während bei Belastung ein Wert von 1,20 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ ermittelt werden konnte.

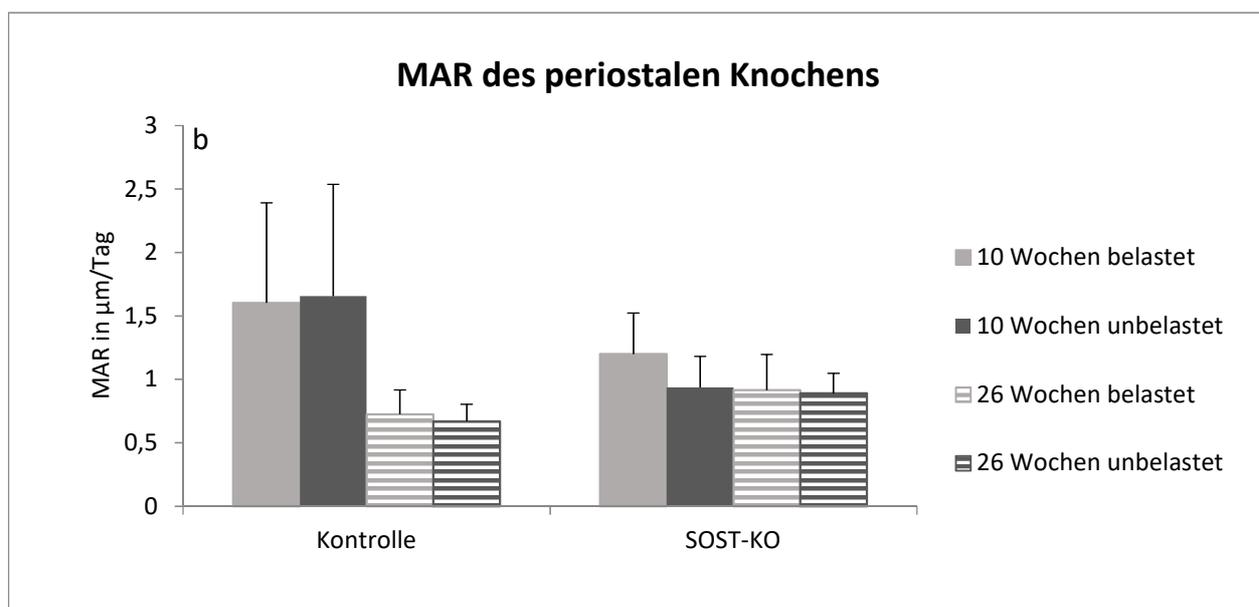


Abbildung 28 Mineralisationsrate des periostalen Knochens. Die Abbildung zeigt die Mineralisationsraten aller vier Versuchsgruppen, sowohl auf der belasteten Seite als auch der Kontrollseite. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

Beide eben aufgeführten Parameter werden als Produkt für die bessere Zusammenschau der Knochenreaktion als Knochenbildungsrate genutzt. Bei der Betrachtung dieser fällt auf, dass keine Signifikanzen in Bezug zu Genotyp, Alter, Belastung oder einer Kombination dieser feststellbar sind.

Die jungen Kontrollmäuse weisen die höchste Rate mit 1,04 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet und 1,09 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ bei Belastung auf, während bei den 26 Wochen alten Kontrolltieren die geringste Rate mit 0,31 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet und 0,38 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ belastet zu beobachten war. Die jungen SOST-KO Mäuse zeigten Knochenbildungsraten von 0,54 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet und 0,62 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ belastet und die erwachsenen von 0,39 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet und 0,47 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ belastet.

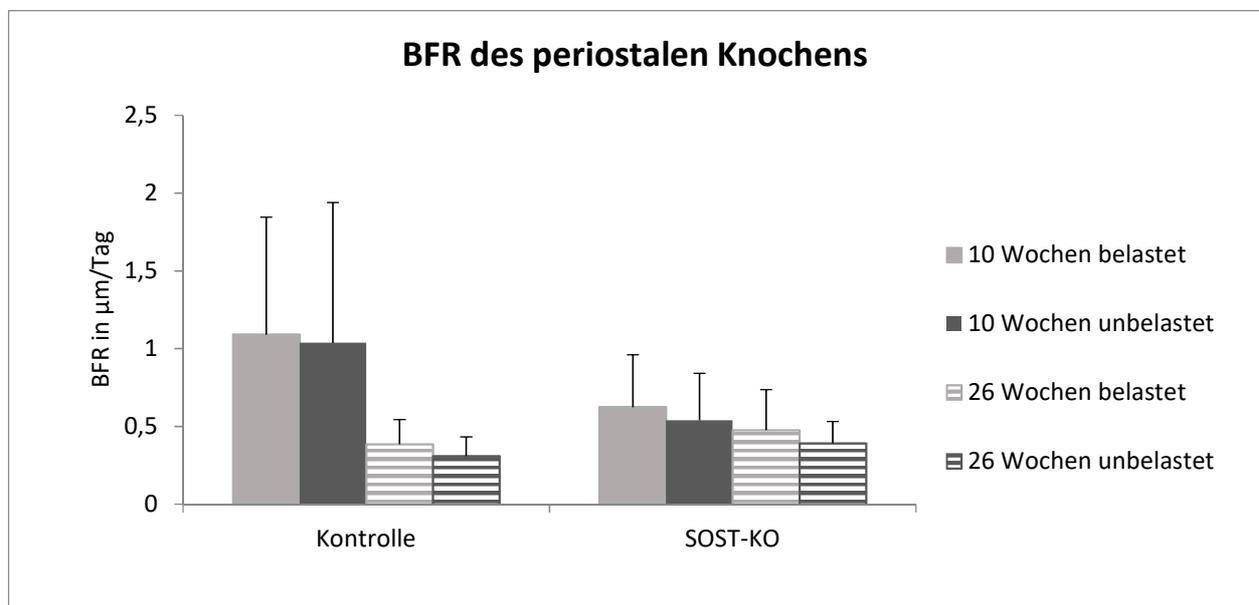


Abbildung 29 Knochenbildungsrate des periostalen Knochens. Dargestellt ist die Knochenbildungsrate aller vier Versuchsgruppen, sowohl für die belastete Seite als auch die Kontrollseite. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

3.3.2.2. Endostal

Zur Beurteilung des endostalen kortikalen Knochens fanden die selben Proben, wie bereits bei der Untersuchung des Periostes Verwendung. Zuerst wurden die Proben auf Doppelbanden im endostalen Knochenbereich untersucht und sofern keine vorzufinden waren, wurden diese mit „no data“ markiert und aus der Studie ausgeschlossen. 12 von 14 Proben der 10 Wochen alten SOST-KO Mäuse konnten zur Beurteilung der endostalen Reaktion verwendet werden. Bei den 26 Wochen alten SOST-KO Mäusen waren 15 von 16 Proben nutzbar. 11 der 12 Proben der jungen Kontrolltiere konnten in die Studie inkludiert werden und 12 von 14 Proben der erwachsenen Kontrolltiere wiesen Doppelbanden auf. An den 50 von 56 Proben wurden die gleichen Parameter wie zuvor bei der Untersuchung des Periostes ermittelt und die kortikale Knochenreaktion im Zeitraum des Experimentes beurteilt.

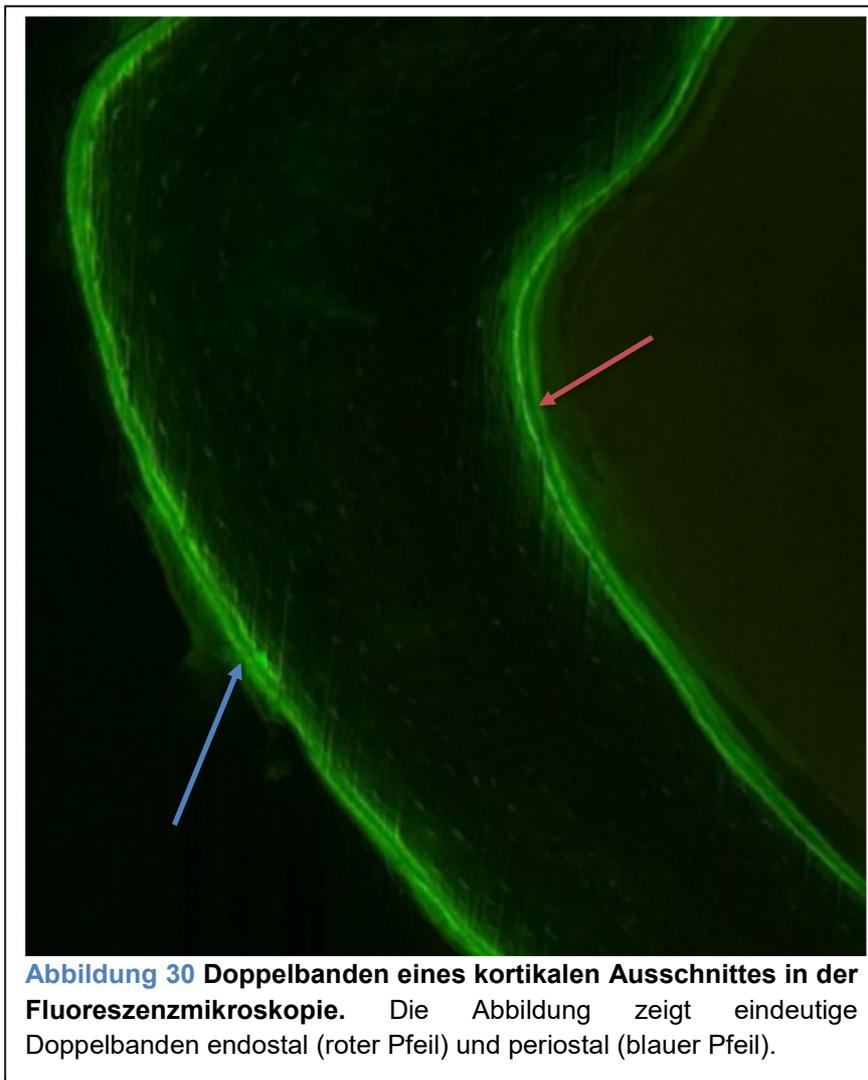


Abbildung 30 Doppelbanden eines kortikalen Ausschnittes in der Fluoreszenzmikroskopie. Die Abbildung zeigt eindeutige Doppelbanden endostal (roter Pfeil) und periostal (blauer Pfeil).

Der Mineralisierte Oberflächenanteil zeigte endostal einen signifikanten Bezug zu Alter und Genotyp. Die Jungtiere wiesen generell auch endostal höhere Werte als die Erwachsenen auf und Sklerostinmangel bewirkte ebenfalls eine Steigerung des mineralisierten Oberflächenanteiles in beiden Altersgruppen.

Der größte Oberflächenanteil war bei den jungen Mäusen mit Sklerostinmangel zu beobachten. Wobei ein Anteil unbelastet mit 69% und bei Belastung mit 62% festgestellt wurde. Die jungen Kontrolltiere hatten unter Belastung einen Anteil an mineralisierter Knochenoberfläche von 54% und von 52% ohne Belastung. Bei den erwachsenen SOST-KO Mäusen wurde ein Oberflächenanteil von 43% bei Belastung und ein Anteil von 35% auf der Kontrollseite ermittelt. In der Kontrollgruppe waren Anteile von 23% (unbelastet) zu 20% zu verzeichnen.

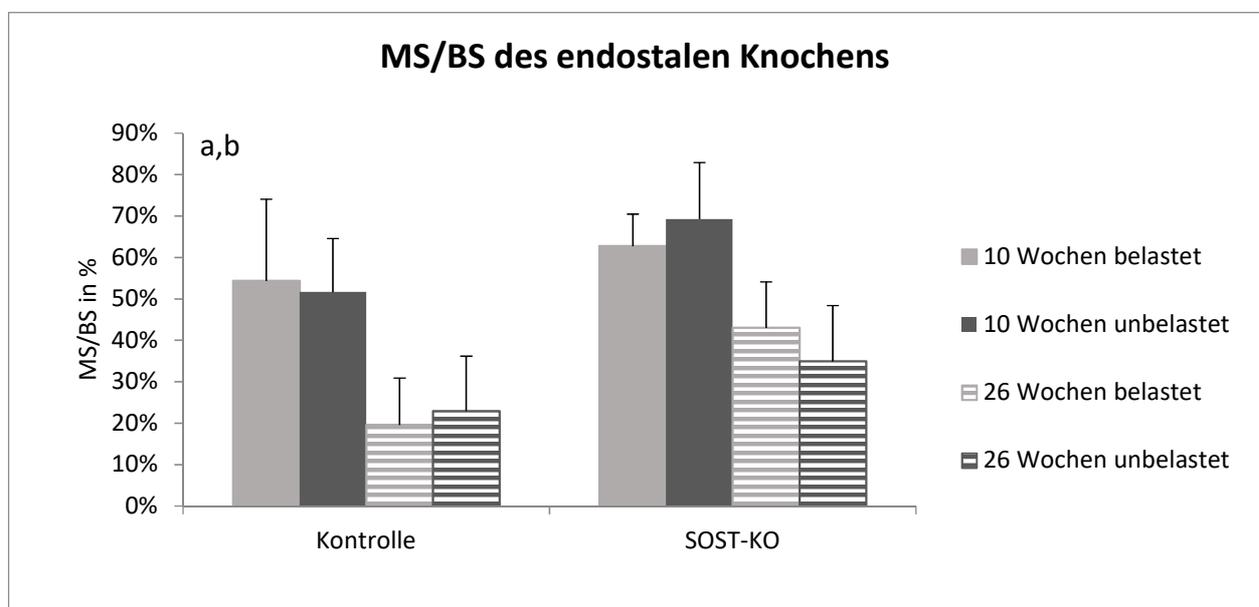


Abbildung 31 Anteil der Mineralisierten Oberfläche an der Gesamtoberfläche des endostalen Knochens. Dargestellt ist der Anteil der mineralisierten Oberfläche aller vier Versuchsgruppen für die belastete Seite und die Kontrollseite. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

Bei der Betrachtung der Mineralisationsrate fällt auf, dass das Alter eine signifikante Rolle spielt und dieser Einfluss vom Genotyp abhängt. Die Jungtiere weisen auch endostal höhere Raten auf als die erwachsenen Mäuse, jedoch ist die Altersdifferenz bei den Kontrolltieren stärker als bei Mäusen mit Sklerostinmangel.

Die 10 Wochen alten Kontrolltiere zeigten die größte Mineralisationsrate mit 1,37 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet und 1,46 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ bei Belastung. Die 26 Wochen alten Kontrolltiere wiesen die geringste Mineralisationsrate mit 0,76 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ für unbelastet und belastet auf. Bei den jungen SOST-KO Mäusen war eine Mineralisationsrate von 1,10 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet zu beobachten und eine Rate von 1,20 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ bei Belastung. Die Mineralisationsraten der erwachsenen Versuchstiere mit Sklerostinmangel waren mit 0,91 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet und 0,94 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ belastet zwar geringer, aber fielen bei weitem nicht so stark ab im Rahmen der Skelettausreifung, wie bei den Kontrolltieren.

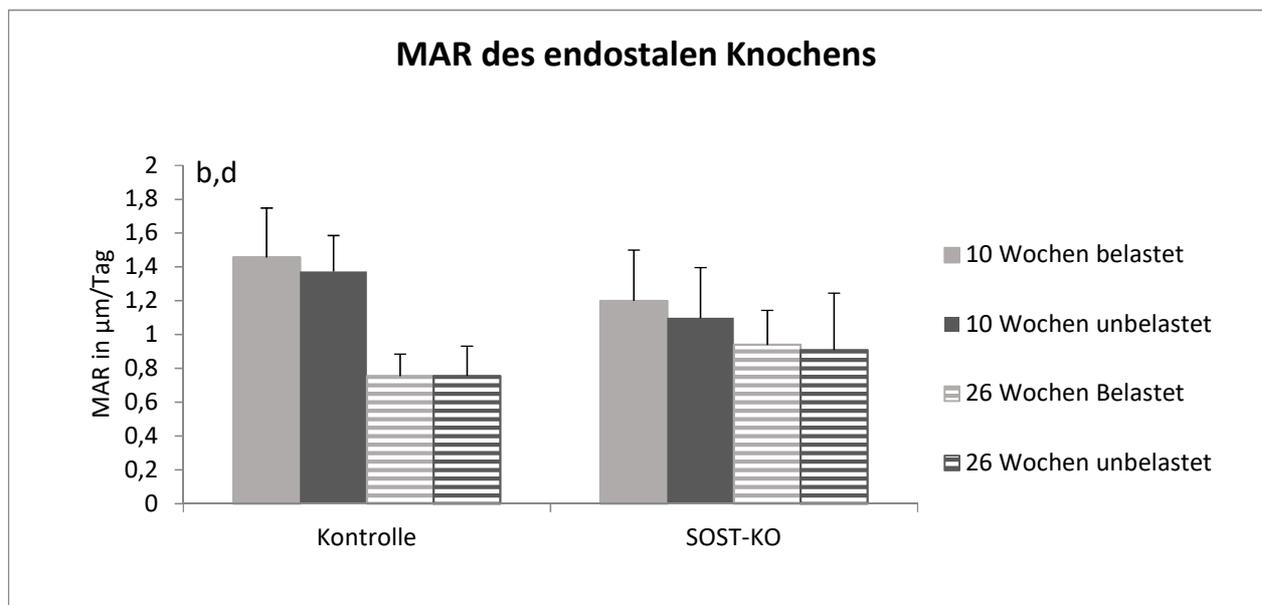


Abbildung 32 Mineralisationsrate des endostalen Knochens. Die Abbildung zeigt die Mineralisationsraten aller vier Versuchsgruppen, sowohl auf der belasteten Seite als auch der Kontrollseite. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

In der gemeinschaftlichen Betrachtung der eben beschriebenen Parameter als Knochenbildungsrate konnte nur das Alter als signifikanter Einflussfaktor festgestellt werden. Dabei ist zu erkennen, dass Jungtiere deutlich höhere Knochenbildungsraten aufweisen als erwachsene Vergleichstiere.

Bei den jungen Mäusen konnten Knochenbildungsraten von 0,74 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet und 0,82 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ belastet für die Kontrolltiere und 0,76 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet und 0,77 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ belastet für die SOST-KO Mäuse festgestellt werden. Bei den 26 Wochen alten Kontrolltieren wurden Knochenbildungsraten von 0,17 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet und 0,14 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ bei Belastung beobachtet. Die erwachsenen SOST-KO Mäusen zeigten Werte von 0,29 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet und 0,41 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ bei Belastung.

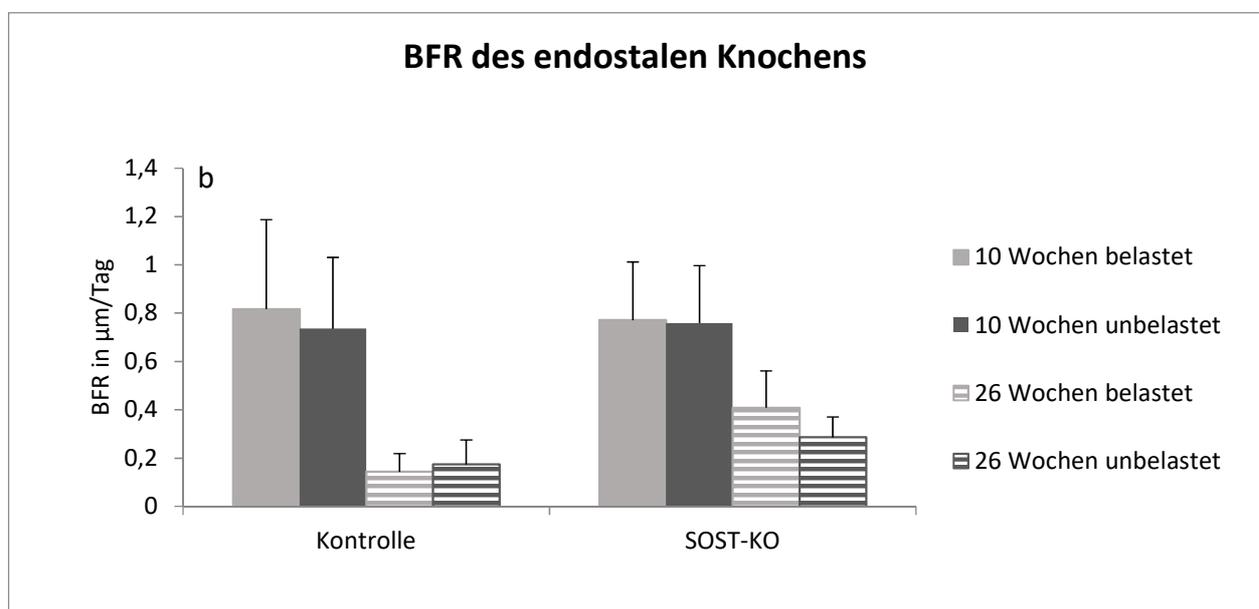


Abbildung 33 Knochenbildungsrate des endostalen Knochens. Dargestellt ist die Knochenbildungsrate aller vier Versuchsgruppen, sowohl für die belastete Seite als auch die Kontrollseite. Auch ist die Wirkung der Belastung im Alter unterschiedlich. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

Tabelle 3 Histomorphometrie Daten.

Alle Parameter werden als Durchschnittswert \pm Standardabweichung angegeben. Parameter aufgelistet sind: Einzelbandenoberfläche endokortikal zur Gesamtoberfläche (Ec.sLS/BS), Doppelbandenoberfläche endokortikal zur Gesamtoberfläche (Ec.dLS/BS), Mineralisierte Oberfläche endokortikal zur Gesamtoberfläche (Ec.MS/BS), Mineralisationsrate endokortikal (Ec.MAR), Knochenbildungsrate endokortikal (Ec.BFR/BS) und die gleichen Parameter für den periostalen Knochen mit Ps. zu Beginn. Für Tag 0 und 15 wurden ANOVAs durchgeführt: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

Histomorphometrie	SOST-KO Mäuse				Kontroll Mäuse			
	10 Wochen		26 Wochen		10 Wochen		26 Wochen	
männlich	Belastet (n=7)	Kontroll e (n=6)	Belastet (n=7)	Kontroll e (n=7)	Belastet (n=7)	Kontroll e (n=7)	Belastet (n=7)	Kontroll e (n=7)
Kortikaler Knochen								
Ec.sLS/BS (%)	59.44 \pm 25.82	53.87 \pm 22.24	41.82 \pm 12.19	41.4 \pm 20.68	28.09 \pm 15.4	37.55 \pm 15.4	21.62 \pm 16.23	22.92 \pm 18.95
Ec.dLS/BS (%)	37.07 \pm 14.57	42.31 \pm 25.51	22.1 \pm 11.45	14.21 \pm 7.46	40.28 \pm 18.17	32.85 \pm 18.17	8.76 \pm 6.48	11.48 \pm 5.94
Ec.MS/BS (%) a, b	62.73 \pm 8.65	69.25 \pm 14.73	43.01 \pm 11.81	34.91 \pm 14.53	54.33 \pm 21.63	51.63 \pm 21.63	19.57 \pm 12.38	22.94 \pm 14.48
Ec.MAR ($\mu\text{m}/\text{day}$) b, c	1.2 \pm 0.33	1.1 \pm 0.32	0.94 \pm 0.22	0.91 \pm 0.36	1.46 \pm 0.32	1.37 \pm 0.24	0.75 \pm 0.14	0.76 \pm 0.19
Ec.BFR/BS ($\mu\text{m}/\text{day}$) b	0.77 \pm 0.27	0.76 \pm 0.26	0.41 \pm 0.16	0.29 \pm 0.09	0.82 \pm 0.41	0.74 \pm 0.33	0.14 \pm 0.08	0.17 \pm 0.11
Ps.sLS/BS (%)	39.62 \pm 8.46	34.49 \pm 11.85	50.96 \pm 14.03	57.36 \pm 21.58	34.18 \pm 5.26	24.17 \pm 10.87	54.95 \pm 15.72	55.2 \pm 20.66
Ps.dLS/BS (%)	29.71 \pm 19.89	36.74 \pm 25.25	21.31 \pm 13.97	13.77 \pm 4.39	43.34 \pm 21.98	38.59 \pm 26.06	24.64 \pm 19.79	19.05 \pm 9.23
Ps.MS/BS (%)	49.52 \pm 17.93	53.98 \pm 21.03	48.63 \pm 12.22	33.96 \pm 20.74	60.43 \pm 21.79	50.68 \pm 25.77	52.11 \pm 14.33	46.65 \pm 18.08
Ps.MAR ($\mu\text{m}/\text{day}$) b	1.2 \pm 0.35	0.94 \pm 0.26	0.91 \pm 0.31	0.89 \pm 0.18	1.6 \pm 0.86	1.66 \pm 0.99	0.72 \pm 0.21	0.67 \pm 0.14
Ps.BFR/BS ($\mu\text{m}/\text{day}$)	0.62 \pm 0.37	0.54 \pm 0.33	0.47 \pm 0.29	0.39 \pm 0.16	1.09 \pm 0.83	1.04 \pm 1.01	0.38 \pm 0.17	0.31 \pm 0.13

3.4. Evaluation des trabekulären Knochens

Der trabekuläre Knochen konnte mittels der Micro-CT-Scans statisch beurteilt werden und durch die Differenzen zwischen den Scan-Tagen 0 bis 15 können auch Aussagen über die dynamische Entwicklung gefällt werden.

3.4.1. Evaluation der Micro-CT Untersuchung

Der trabekuläre Knochen wurde wie auch der kortikale Knochen an Hand von drei Parametern untersucht:

- Trabekuläres Volumen zu Gesamtknochenmarkvolumen (Tb.BV/TV)
- Durchschnittliche Trabekelanzahl pro Millimeter (Tb.N)
- Durchschnittliche Trabekeldicke (Tb.Th)

Ebenfalls wurden die Parameter durchschnittlicher Trabekelabstand (Tb.Sp) und trabekuläre volumetrische Dichte (Tb.vTMD) ermittelt, sollen aber in dieser Arbeit keine weitere Berücksichtigung finden, da es über das Thema hinausgeht. Außerdem ist der Trabekelabstand ein Parameter, der von der Trabekelanzahl und Trabekeldicke abgeleitet werden kann.

Wie bereits bei dem kortikalen Knochen beschrieben wurde auch der trabekuläre Knochen zum einen statisch zu Beginn des Experimentes und dynamisch im Verlauf der 15 Tage Versuchsdauer und der 4 Micro-CT-Scans in diesem Zeitraum untersucht.

3.4.1.1. Einfluss von Alter & Genotyp auf den trabekulären Knochen an Tag 0

Bei der Beurteilung des trabekulären Knochens zu Beginn des Experimentes fällt auf, dass der Genotyp für alle untersuchten Parameter von signifikanter Bedeutung ist. Die SOST-KO Mäuse weisen bereits zu Beginn des Experimentes Parameter auf, die für einen deutlich kräftigeren trabekulären Knochen als die der Kontrollpopulation sprechen. Ebenso war der trabekuläre Knochen der älteren Population in allen Parametern signifikant kräftiger ausgebildet als bei den jungen Mäusen.

Im Vergleich des Genotyps wurden die Werte der Kontrolltiere als 100% festgelegt und die Zu- oder Abnahme prozentual durch eine lebenslang bestehende Sklerostininhibition untersucht.

Am Auffälligsten war das Trabekuläre Volumen zum Gesamtknochenmarkvolumen in Bezug auf Einfluss des Genotyps. Durch Sklerostininhibition konnten immense Anstiege festgestellt werden, sodass bei den Jungtieren ein um +44% größerer Anteil beobachtet werden konnte und bei den 26 Wochen alten sogar von +165%. Aber auch die Trabekelanzahl wurde durch Sklerostininhibition gesteigert. Es konnte eine Zunahme von +18% bei den Jungtieren und +31% bei den Erwachsenen festgestellt werden. Ebenso verhielt sich die Trabekeldicke, bei der eine Zunahme von +25% für 10 Wochen alte Mäuse und sogar von +82% für 26 Wochen Alte beobachtet werden konnte.

Im Altersvergleich der zwei genotypisch differenten Gruppen, fällt auf, dass der Anteil des trabekulären Knochenvolumens am Gesamtvolumen bei den erwachsenen Mäusen der Kontrollgruppe im Durchschnitt +24% über dem der Jungtiere liegt, aber der, der erwachsenen SOST-KO Mäuse sogar mit +128% über dem der 10 Wochen alten mit Sklerostinmangel. Diese genotypische Differenz findet sich auch in der Trabekeldicke und der Trabekelanzahl wieder. Der Altersunterschied bewirkt einen +13% dickeren Trabekel bei den erwachsenen Kontrolltieren, während der Trabekel der erwachsenen Mäuse mit Sklerostinmangel sogar +64% dicker ist als bei den Jungtieren. Bei Betrachtung der Trabekelanzahl war der Unterschied in den Genotypen geringer und es wurden Anstiege von +9% für die erwachsenen Kontrolltiere zu +21% für die erwachsenen Mäuse mit SOST-KO Genotyp festgestellt.

Die totalen Werte im Vergleich der vier Versuchsgruppen werden in der Abbildung 35 dargestellt.

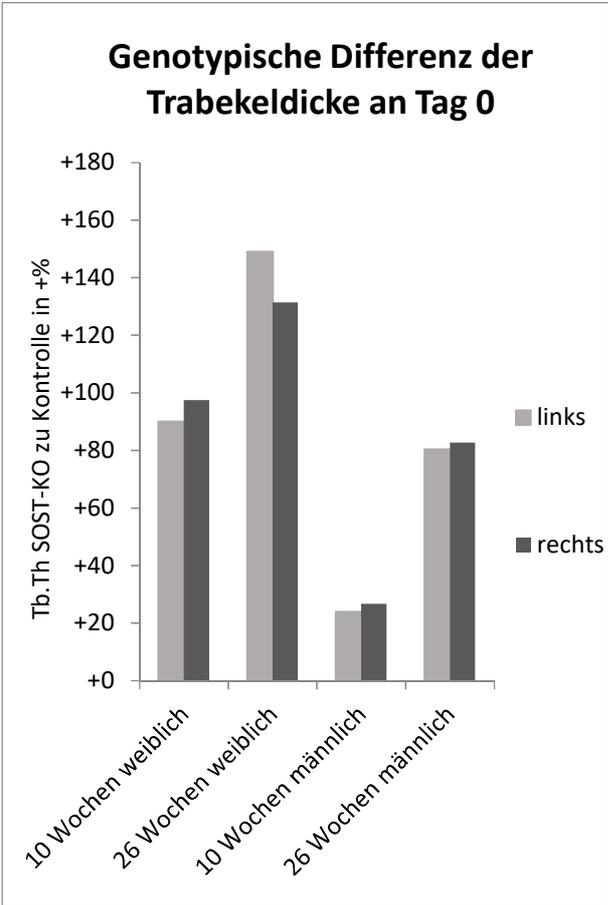
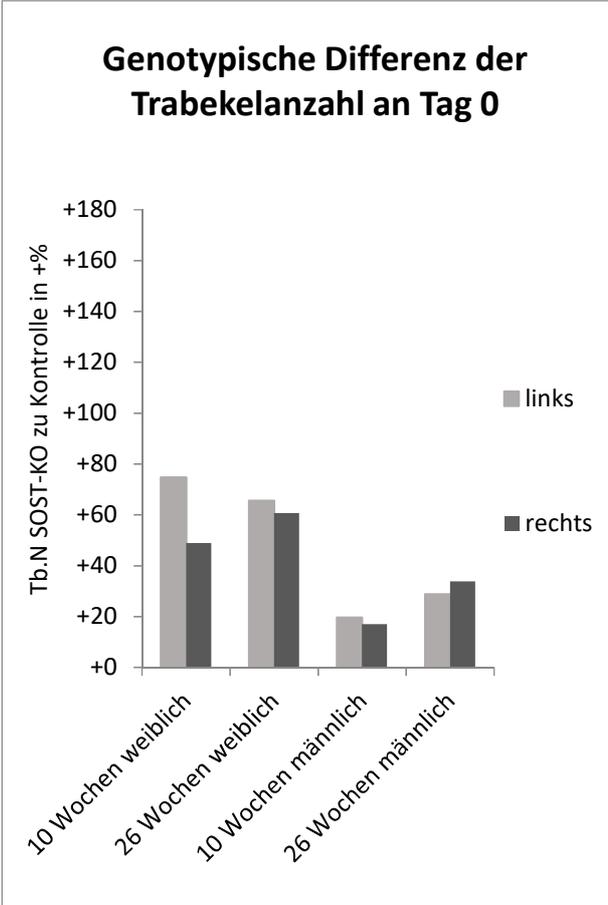
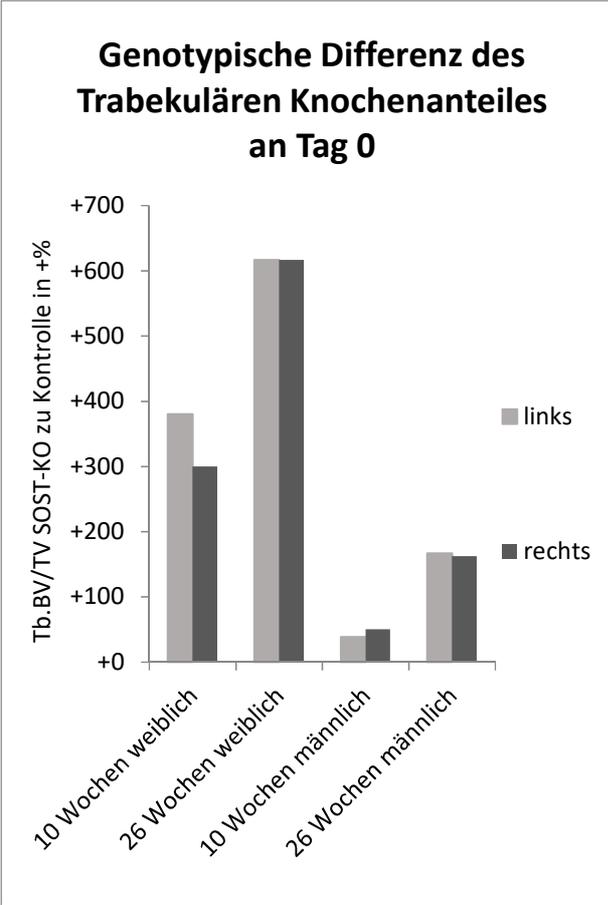


Abbildung 34 Genotypische Differenz der trabekulären Knochenparameter. Die Diagramme zeigen die prozentuale Differenz der drei trabekulären Knochenparameter, Trabekulärer Knochenanteil, Trabekelanzahl und Trabekeldicke an Tag 0 in Abhängigkeit vom Genotyp. Die Kontrollgruppen wurden als 100% festgelegt und die Zunahme durch Sklerostininhibition als +% angegeben.

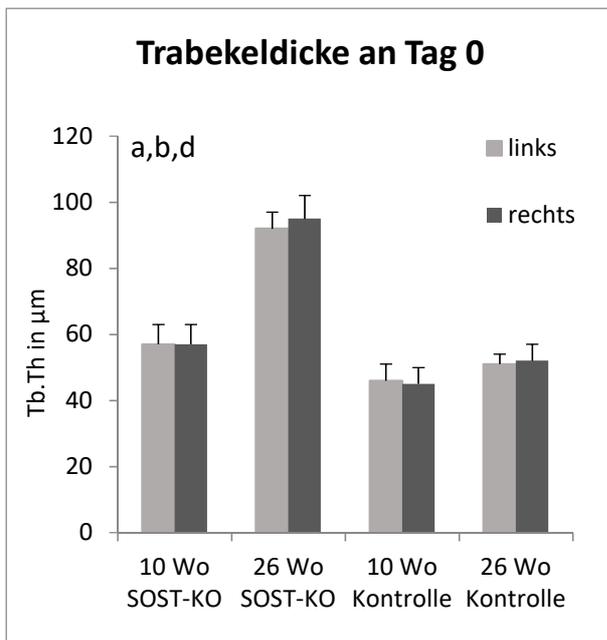
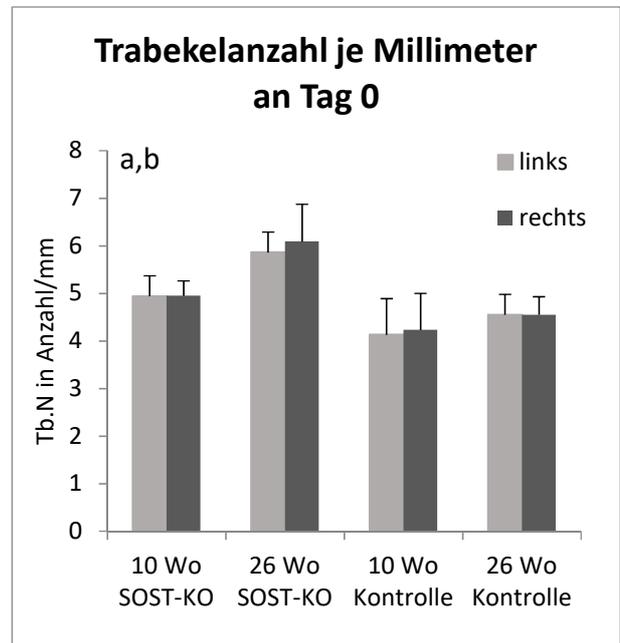
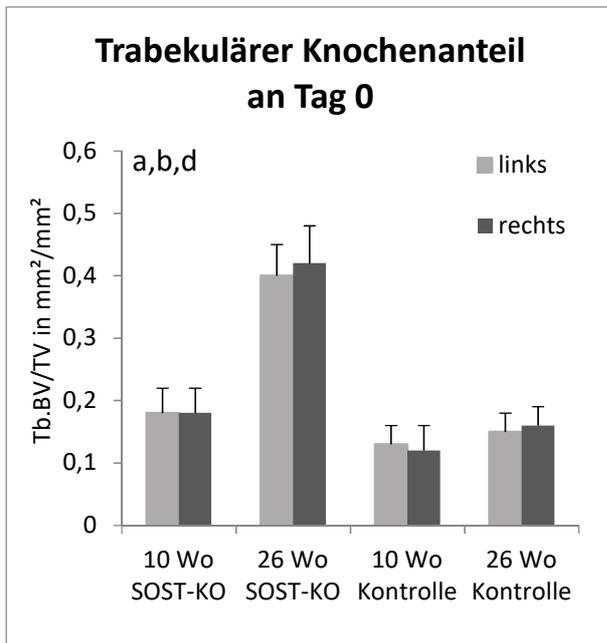


Abbildung 35 Diagramme der Ergebnisse der Micro-CT-Scans an Tag 0 zur Beurteilung des trabekulären Knochens. In den Diagrammen sind die drei untersuchten Parameter in totalen Werten abgebildet. Der Trabekuläre Knochenanteil, die Trabekelanzahl je Millimeter und die Trabekeldicke werden an Tag 0 für die linke und rechte Tibia präsentiert. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

3.4.1.2. Trabekuläre Knochenreaktion von Tag 15 zu 0

Bei der Auswertung der trabekulären Knochenparameter fiel auf, dass wie auch zuvor beim kortikalen Knochen sehr unterschiedliche Reaktionen beobachtet werden konnten. Deshalb werden auch hier die Parameter erneut einzeln beschrieben.

Generell wurde deutlich, dass die Entwicklung des trabekulären Volumenanteiles zum Gesamtknochenmarkvolumen bei den jungen Mäusen mit einer Zunahme und bei den älteren mit einer Abnahme vergesellschaftet ist. Jedoch ist Belastung alleine kein signifikanter Einfluss für den Trabekulären Volumenanteil. Nur in Kombination mit dem Genotyp konnten signifikante Differenzen beobachtet werden. Trotz fehlender Signifikanz sind jedoch unterschiedliche Reaktionen auf Belastung zu erkennen, die weiterer Erforschung bedürfen.

Bei den 10 Wochen alten Kontrollmäusen konnte eine größere Zunahme von +33% ohne Belastung beobachtet werden als auf der belasteten Seite, welche nur einen Anstieg von +8% verzeichnete. Die Belastung erzeugte bei den jungen SOST-KO Mäusen hingegen eine stärkere Zunahme als auf der Kontrollseite. Bei Belastung wurde eine Zunahme von +28% verzeichnet, während die Kontrollseite nur einen Anstieg von +11% aufwies.

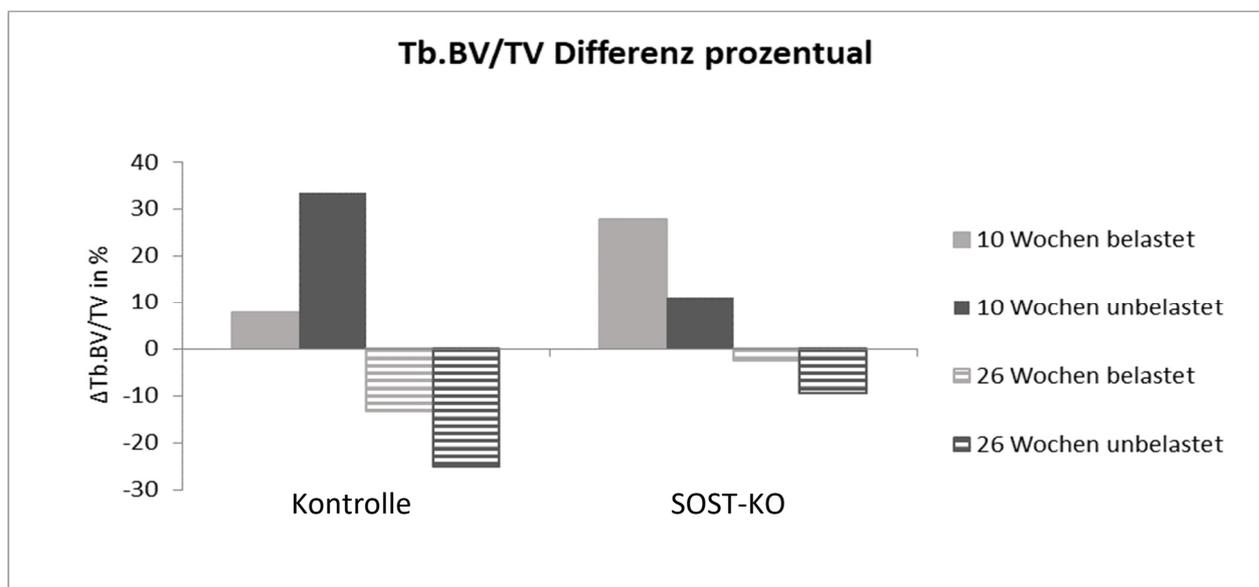


Abbildung 36 Differenz des trabekulären Knochenvolumen zu Gesamtknochenmarkvolumen prozentual von Tag 15 zu Tag 0. Dargestellt ist die Entwicklung des Trabekulären Volumenanteiles im Rahmen des Experimentes für die vier Versuchsgruppen mit jeweils belasteter und unbelasteter Seite.

Bei den älteren Populationen waren die Reaktionen weniger different und es konnte eine geringere Abnahme des trabekulären Knochenanteils bei den SOST-KO Mäusen beobachten werden als bei den Kontrolltieren. Ebenfalls wurde der Verlust durch Belastung gemindert. Bei den erwachsenen Kontrollmäusen konnte der Anteilsverlust an trabekulären Knochen von -25% auf der Kontrollseite durch Belastung auf -13% reduziert werden. Dieser Effekt der Belastung war bei den Mäusen mit Sklerostinmangel ebenfalls zu beobachten und die Abnahme konnte von -10% unbelastet auf -3% bei Belastung reduziert werden. Im Vergleich ist der Verlust des trabekulären Knochen volumens am Gesamtknochenmarkvolumen bei den SOST-KO Mäusen geringer als bei den Kontrolltieren.

Die Trabekelzahl zeigte ebenfalls keinen signifikanten Zusammenhang zur mechanischen Belastung. Doch auch hier konnten allgemeine Beobachtungen getätigt werden.

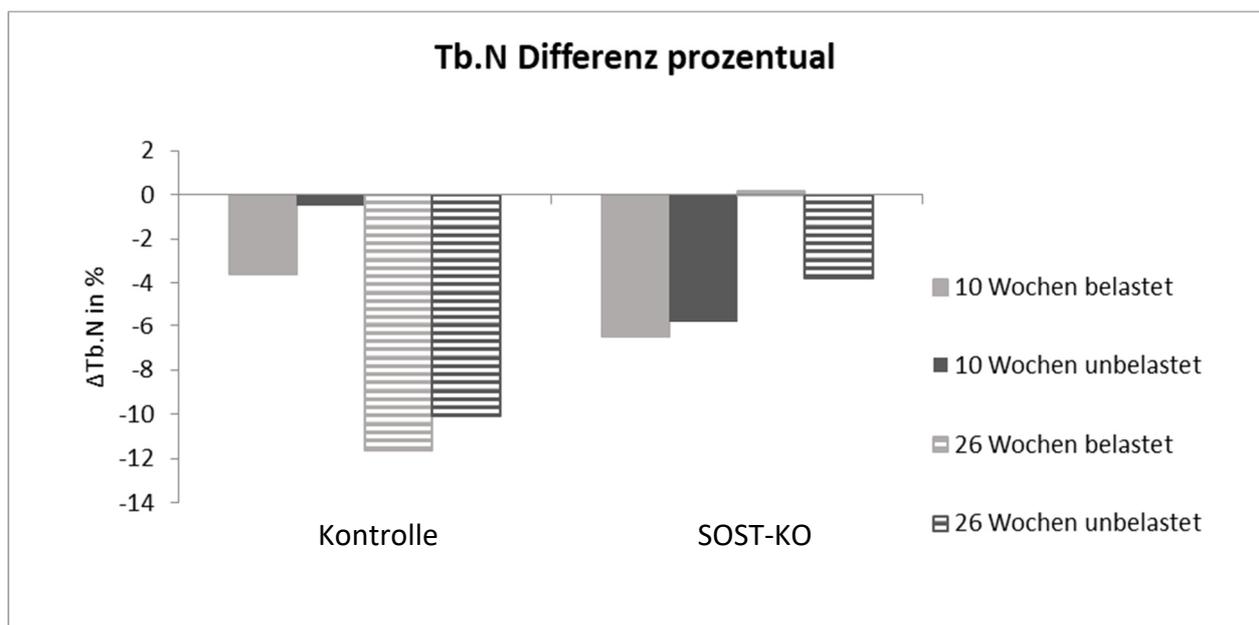


Abbildung 37 Differenz der Trabekelanzahl pro Millimeter prozentual von Tag 15 zu Tag 0. Dargestellt ist die Entwicklung der Trabekelanzahl im Rahmen des Experimentes für die vier Versuchsgruppen mit jeweils belasteter und unbelasteter Seite.

Es fiel auf, dass sowohl bei den Jungtieren als auch bei den Erwachsenen generell eine Abnahme zu verzeichnen war. Allerdings konnten erneut Genotyp-spezifische Reaktionsunterschiede beobachtet werden. Die größte Abnahme an durchschnittlicher Trabekelanzahl erfuhren die 26 Wochen alten Kontrollmäuse mit -10% ohne Belastung und -12% bei Belastung. Die altersentsprechende Versuchsgruppe mit Sklerostinmangel zeigte bei ausbleibender Belastung bereits eine geringere Abnahme von -4%. Bei Belastung konnte die Abnahme komplett verhindert werden und die Trabekelzahl blieb weitestgehend stabil (+0,17%). Die Trabekelanzahl bei den jungen Versuchstieren reduzierte sich hingegen am stärksten bei den SOST-KO Mäusen mit -6%. Belastung zeigte keine relevante Veränderung bezüglich der Reduktion der Trabekelanzahl mit -6,5%. Bei der 10 Wochen alten Kontrollgruppe konnte eine Reduktion von -0,5% der Trabekelzahl beobachtet werden (Kontrollseitig), welche bei Belastung auf bis zu -4% fiel.

Der dritte untersuchte Parameter, die Trabekeldicke, war der einzige trabekuläre Knochenparameter, der einen signifikanten Einfluss durch mechanische Belastung erfuhr. Zu beobachten war vor allem eine Zunahme bei den Jungtieren und eine Abnahme bei den älteren Versuchstieren. Genotypisch signifikante Unterschiede konnten bei diesem Parameter festgestellt werden. Bei den 10 Wochen alten

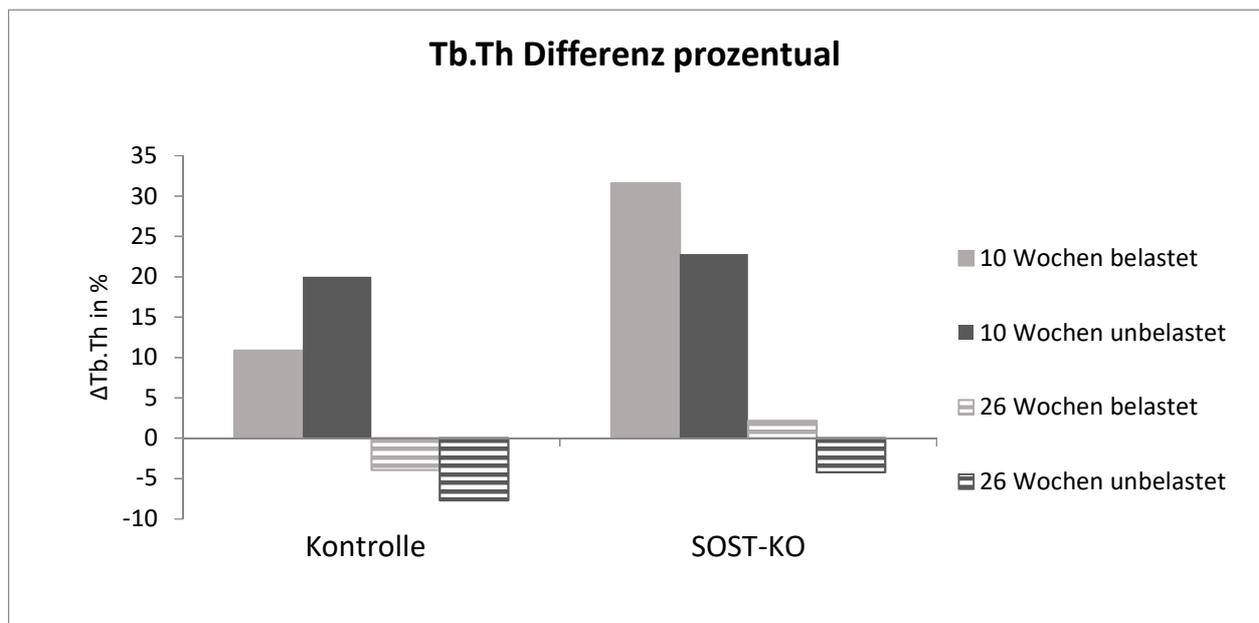


Abbildung 38 Differenz der trabekulären Dicke prozentual von Tag 15 zu Tag 0. Die Abbildung zeigt den Verlauf des Parameters der trabekulären Dicke im Rahmen des Experimentes für die vier Versuchsgruppen mit jeweils belasteter und unbelasteter Seite.

Kontrolltieren wurde ein Anstieg um +20% an trabekulärer Dicke beobachtet, welcher bei Belastung auf +11% abfiel. Dem entgegengesetzt wurde bei den SOST-KO Mäusen im gleichen Alter ein Anstieg von +23% auf der Kontrollseite festgestellt, welcher bei Belastung nicht abnahm, sondern auf +32% anstieg. Bei den älteren Versuchstieren waren hingegen ähnlich Reaktionen auf die Belastung unabhängig von Sklerostininhibition zu beobachten. Bei den älteren Kontrollmäusen konnte eine Abnahme von -8% kontrollseitig festgestellt werden, welche auf -4% durch Belastung reduziert werden konnte. Bei den erwachsenen Mäusen mit Sklerostinmangel konnte eine bereits ohne Belastung reduzierte Abnahme von -4% eruiert werden, welche bei Belastung sogar vollends verhindert wurde und sogar ein Anstieg von +2% zu beobachten war.

Alle Angaben wurden zur Beurteilung des Verlaufes und des besseren Vergleiches prozentual aufgeführt. Die totalen Werte sind in der Tabelle 3 aufgeführt und bieten einen Überblick über die Größeneinordnung der untersuchten Parameter. Durch die unterschiedlichen totalen Ausgangswerte ist die Beurteilung der dynamischen Verlaufparameter in Prozent nur begrenzt zur Erklärung des Gesamtgeschehens geeignet. Dieser Aspekt ist dem Autor bewusst und wird in der Diskussion erneut thematisiert.

Tabelle 4 Trabekuläre Micro-CT Daten der proximalen Tibiametaphyse von Tag 0, 5, 10 und 15.

Alle Parameter werden als Durchschnittswert \pm Standardabweichung angegeben. Parameter aufgelistet sind: Trabekulären Knochenvolumen zu Gesamtknochenmarkvolumen (Tb.BV/TV), Trabekelanzahl (Tb.N), Trabekeldicke (Tb.Th), Trabekelabstand (Tb.Sp) und Trabekelknochendichte (Tb.vTMD). Für Tag 0 und 15 wurden ANOVAs durchgeführt: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

Trabekuläre Metaphyse	SOST-KO Mäuse				Kontroll Mäuse			
	10 Wochen		26 Wochen		10 Wochen		26 Wochen	
männlich	belastet	Kontrolle	belastet	Kontrolle	belastet	Kontrolle	belastet	Kontrolle
Tag 0	(n=7)	(n=7)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=6)	(n=7)	(n=7)
Tb.BV/TV (mm ³ /mm ³) a, b, d	0.18 \pm 0.04	0.18 \pm 0.04	0.40 \pm 0.05	0.42 \pm 0.06	0.13 \pm 0.03	0.12 \pm 0.04	0.15 \pm 0.15	0.16 \pm 0.03
Tb.N (1/mm) a, b	4.94 \pm 0.43	4.95 \pm 0.31	5.86 \pm 0.43	6.09 \pm 0.78	4.13 \pm 0.76	4.23 \pm 0.77	4.55 \pm 0.43	4.55 \pm 0.38
Tb.Th (μ m) a, b, d	57 \pm 6	57 \pm 6	92 \pm 5	95 \pm 7	46 \pm 5	45 \pm 5	51 \pm 3	52 \pm 5
Tb.Sp (μ m) a, b	196 \pm 18	193 \pm 14	163 \pm 13	161 \pm 18	255 \pm 51	247 \pm 47	216 \pm 22	216 \pm 19
Tb.vTMD (mg HA/cm ³) a, b	919 \pm 5	922 \pm 11	985 \pm 13	978 \pm 21	888 \pm 19	889 \pm 16	935 \pm 20	938 \pm 22
Tag 5	(n=7)	(n=7)	(n=8)	(n=8)	(n=6)	(n=6)	(n=7)	(n=7)
Tb.BV/TV (mm ³ /mm ³)	0.20 \pm 0.04	0.19 \pm 0.04	0.41 \pm 0.05	0.41 \pm 0.04	0.16 \pm 0.04	0.16 \pm 0.04	0.16 \pm 0.04	0.16 \pm 0.03
Tb.N (1/mm)	4.86 \pm 0.26	4.93 \pm 0.26	5.80 \pm 0.43	45.90 \pm 0.52	4.45 \pm 0.61	4.41 \pm 0.64	4.53 \pm 0.56	4.50 \pm 0.41
Tb.Th (μ m)	61 \pm 7	60 \pm 6	94 \pm 5	93 \pm 5	50 \pm 5	51 \pm 5	52 \pm 3	53 \pm 6
Tb.Sp (μ m)	197 \pm 12	194 \pm 12	166 \pm 16	166 \pm 15	233 \pm 37	236 \pm 36	219 \pm 29	220 \pm 21
Tb.vTMD (mg HA/cm ³)	932 \pm 12	930 \pm 13	990 \pm 10	984 \pm 6	898 \pm 13	893 \pm 13	934 \pm 21	934 \pm 14
Tag 10	(n=7)	(n=7)	(n=8)	(n=8)	(n=6)	(n=6)	(n=7)	(n=7)
Tb.BV/TV (mm ³ /mm ³)	0.22 \pm 0.05	0.20 \pm 0.04	0.40 \pm 0.03	0.41 \pm 0.03	0.14 \pm 0.04	0.15 \pm 0.05	0.15 \pm 0.04	0.15 \pm 0.04
Tb.N (1/mm)	4.72 \pm 0.40	4.73 \pm 0.28	5.89 \pm 0.38	5.95 \pm 0.39	4.22 \pm 0.58	4.29 \pm 0.61	4.22 \pm 0.57	4.28 \pm 0.45
Tb.Th (μ m)	69 \pm 7	67 \pm 6	91 \pm 5	92 \pm 2	50 \pm 5	51 \pm 7	53 \pm 6	52 \pm 7
Tb.Sp (μ m)	204 \pm 21	203 \pm 13	165 \pm 7	165 \pm 11	244 \pm 35	242 \pm 38	238 \pm 37	233 \pm 24
Tb.vTMD (mg HA/cm ³)	952 \pm 10	950 \pm 9	979 \pm 28	972 \pm 17	907 \pm 26	899 \pm 23	937 \pm 28	936 \pm 22
Tag 15	(n=7)	(n=7)	(n=8)	(n=8)	(n=6)	(n=6)	(n=7)	(n=7)
Tb.BV/TV (mm ³ /mm ³) a, b, d, e, g	0.23 \pm 0.05	0.20 \pm 0.05	0.39 \pm 0.04	0.38 \pm 0.05	0.14 \pm 0.04	0.16 \pm 0.06	0.13 \pm 0.03	0.12 \pm 0.02
Tb.N (1/mm)a, b, d	4.62 \pm 0.27	4.66 \pm 0.24	5.87 \pm 0.66	5.86 \pm 0.78	3.98 \pm 0.40	4.21 \pm 0.55	4.02 \pm 0.68	4.09 \pm 0.37
Tb.Th (μ m) a, b, c, d, e, g	75 \pm 7	70 \pm 8	94 \pm 3	91 \pm 5	51 \pm 6	54 \pm 8	49 \pm 4	48 \pm 6
Tb.Sp (μ m) a, b	210 \pm 14	209 \pm 8	170 \pm 16	173 \pm 18	257 \pm 25	247 \pm 33	253 \pm 47	246 \pm 22
Tb.vTMD (mg HA/cm ³) a, c	967 \pm 18	951 \pm 18	979 \pm 9	968 \pm 18	915 \pm 22	899 \pm 30	931 \pm 24	915 \pm 35

3.4.2. Dynamische Histomorphometrie

Bei der Histomorphometrie wurde der trabekuläre Knochen anhand der selben drei Parameter untersucht und beurteilt wie der kortikale Knochen:

- Mineralisierte Oberfläche („mineralized surface/ bone surface“, MS/BS)
- die Mineralisationsrate („mineralization rate“, MAR)
- die Knochenbildungsrate („Bone formation rate“, BFR)

Für die Beurteilung wurden 56 Proben auf das Vorhandensein von Doppelbanden untersucht und beim Fehlen dieser mit „no data“ markiert und aus der Studie ausgeschlossen. Alle 14 Proben der 10 Wochen alten SOST-KO Mäuse konnten zur Beurteilung der endostalen Reaktion verwendet werden. Bei den 26 Wochen alten SOST-KO Mäusen konnten 15 von 16 Proben genutzt werden. 11 der 12 Proben der jungen Kontrolltiere wurden in die Studie inkludiert und 14 von 14 Proben der erwachsenen Kontrolltiere wiesen Doppelbanden auf. An den 54 von 56 Proben wurden die gleichen Parameter wie zuvor bei der Untersuchung des kortikalen Knochens ermittelt und die trabekuläre Knochenreaktion im Zeitraum des Experimentes beurteilt.

Es konnten keine signifikanten Differenzen durch den Genotyp, das Alter oder den Einfluss der Belastung ausgemacht werden. Deskriptiv kann man die Ergebnisse wie folgt zusammenfassen. Bei den jungen Kontrolltieren waren Anteile der Mineralisierten Oberfläche von 23% zu beobachten, während bei Belastung dieser auf 32% anstieg. Bei den jungen SOST-KO Mäusen war dieser Anstieg weitaus geringer mit 25% unbelastet und 27% bei Belastung. Die 26 Wochen alten Mäuse mit Sklerostinmangel zeigten einen Anstieg von 26% unbelastet auf 34% unter Belastung. Die erwachsenen Kontrolltiere hingegen wiesen unbelastet mit 36% einen höheren Mineralisierten Oberflächenanteil auf als mit Belastung (31%).

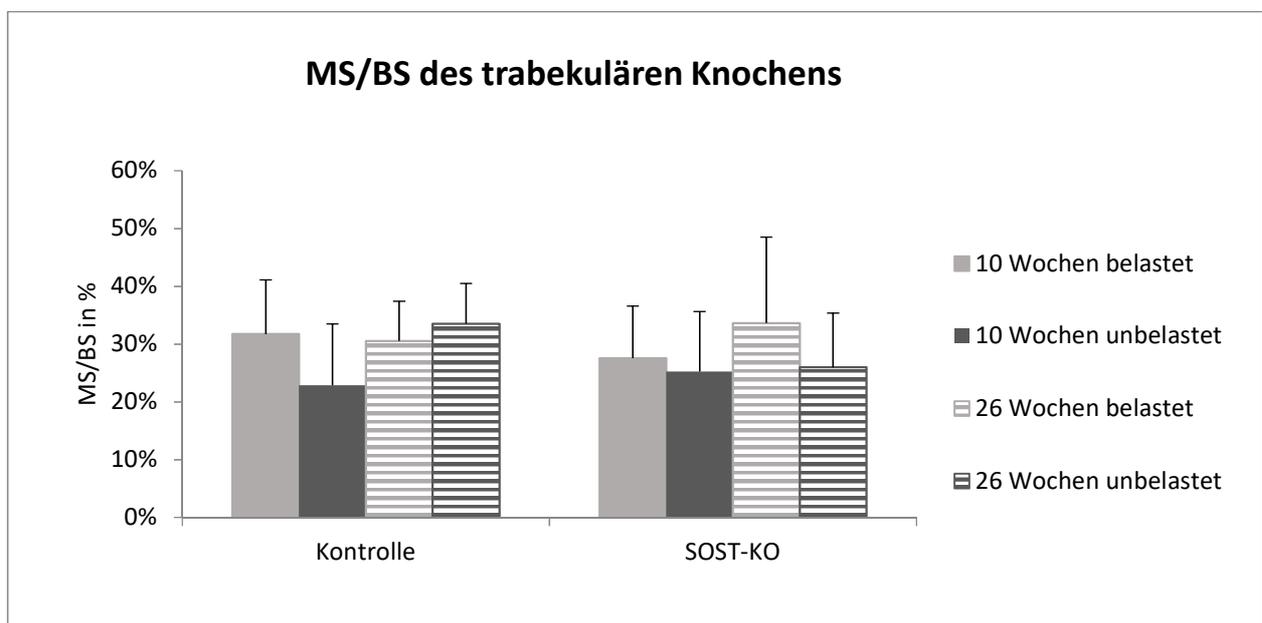


Abbildung 39 Anteil der Mineralisierten Oberfläche an der Gesamtoberfläche des trabekulären Knochens. Dargestellt ist der Anteil der mineralisierten Oberfläche aller vier Versuchsgruppen für die belastete Seite und die Kontrollseite. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

Bei der Beurteilung der Mineralisationsrate konnten das Alter und der Genotyp als signifikante Einflussfaktoren ermittelt werden. Jungtiere zeigten generell höhere Mineralisationsraten und Sklerostinmangel steigerte die Raten.

Somit war die höchste Rate bei den 10 Wochen alten SOST-KO Mäusen zu beobachten mit 1,70 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet und 1,79 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unter Belastung. Bei den jungen Kontrolltieren konnten Mineralisationsraten von 1,21 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet und 1,46 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ bei Belastung festgestellt werden. Die erwachsenen SOST-KO Mäusen wiesen Raten von 1,36 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet und 1,37 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unter Belastung auf und bei den erwachsenen Kontrolltieren waren die Mineralisationsraten mit 1,13 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet und 1,01 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ bei Belastung im Altersvergleich ebenfalls geringer.

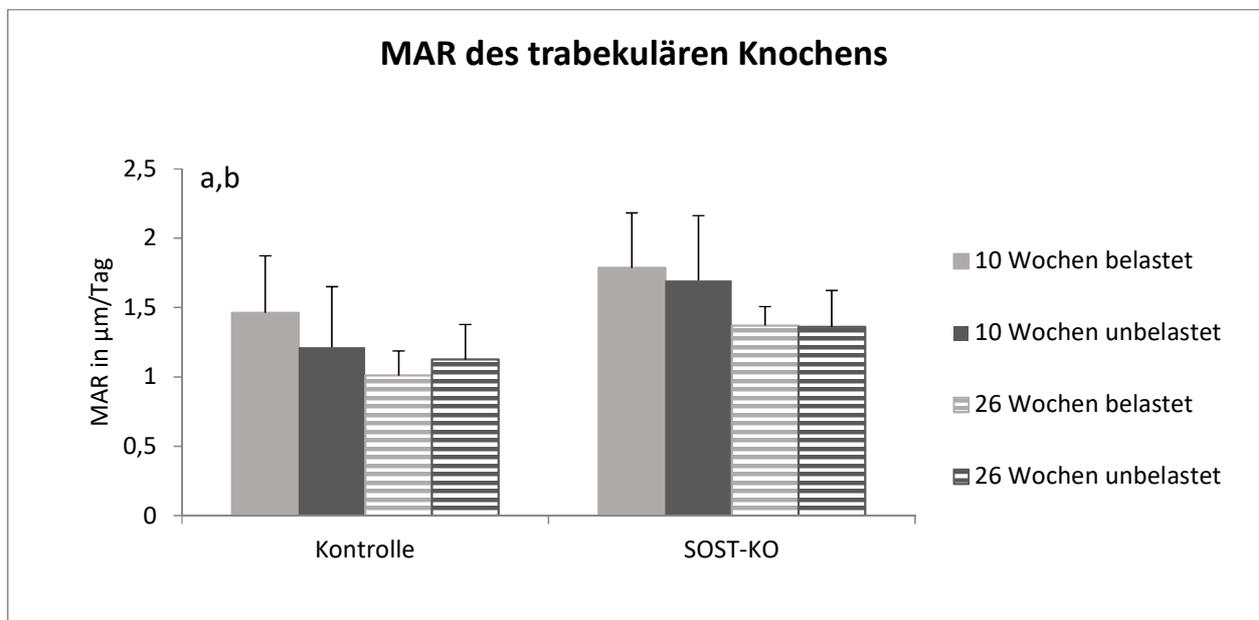


Abbildung 40 Mineralisationsrate des trabekulären Knochens. Die Abbildung zeigt die Mineralisationsraten aller vier Versuchsgruppen, sowohl auf der belasteten Seite als auch der Kontrollseite. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

Bei der Beurteilung der Knochenbildungsrate, dem Produkt der eben beschriebenen Parameter, war kein signifikanter Einfluss durch Alter, Genotyp, Belastung oder einer Kombination dieser zu erkennen. Deskriptiv lässt sich die Knochenbildungsrate wie folgt schildern.

Bei den jungen Kontrolltieren konnten Raten von 0,29 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet auf 0,47 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ bei Belastung beobachtet werden. Bei den jungen SOST-KO Mäusen war die Knochenbildungsrate unbelastet bei 0,43 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ und unter Belastung bei 0,52 $\mu\text{m}/\text{Tag}$. Die Raten bei den erwachsenen Versuchstieren waren minimal geringer. Bei den SOST-KO Mäusen war eine Knochenbildungsrate von 0,35 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unbelastet und von 0,47 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unter Belastung zu beobachten. Bei den erwachsenen Kontrolltieren wurden Raten von 0,37 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ unter Belastung und 0,31 $\mu\text{m}/\text{Tag}$ ohne Belastung verzeichnet.

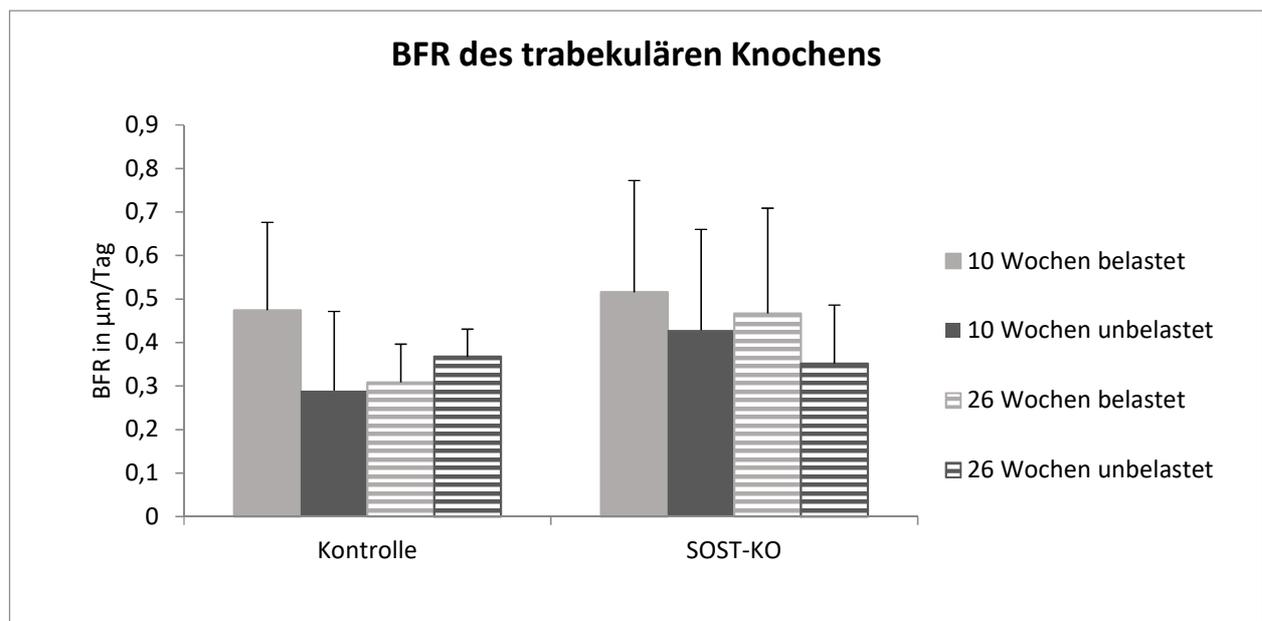


Abbildung 41 Knochenbildungsrate des trabekulären Knochens. Dargestellt ist die Knochenbildungsrate aller vier Versuchsgruppen, sowohl für die belastete Seite als auch die Kontrollseite. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

3.5. Vergleich zu weiblichen Versuchstieren

Um die Frage zu beantworten, ob es einen geschlechterspezifischen Unterschied in Bezug auf die Knochenreife, Knochenreaktion auf Belastung oder Knochenentwicklung durch Sklerostinmangel gibt, wurden die oben beschriebenen Parameter mit den Daten eines identischen Experimentes, welches mit weiblichen Versuchstieren durchgeführt wurde, verglichen.

3.5.1. Geschlechtervergleich des kortikalen Knochens an Tag 0

Generell wurden zu Beginn des Experimentes sehr ähnliche Werte für die drei untersuchten Parameter des kortikalen Knochens zwischen weiblichen und männlichen Versuchstieren beobachtet. Tendenziell konnten dezent höhere Werte für die männlichen Mäuse in allen drei ermittelten Parametern (Ct.Ar, Ct.Ar/T.Ar und Ct.Th) festgestellt werden. Diese Beobachtung ist in den Abbildungen 42-44 gut zu erkennen.

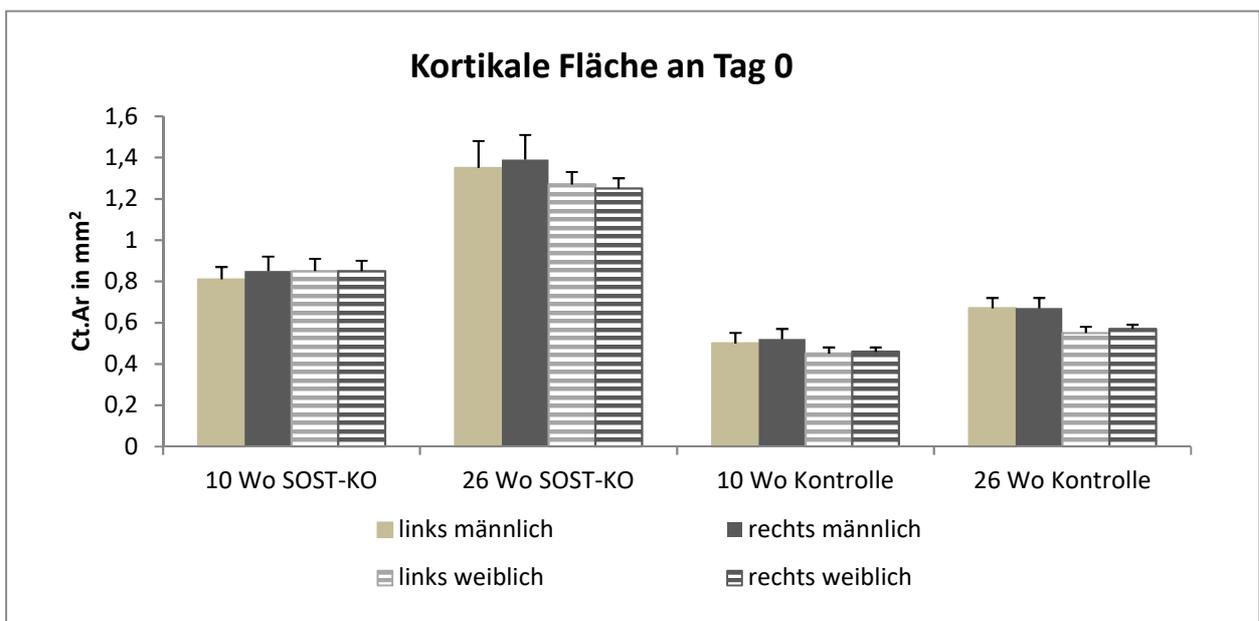


Abbildung 42 Geschlechtervergleich der Kortikalen Fläche an Tag 0. Im Diagramm ist die kortikale Knochenfläche der vier Versuchsgruppen abgebildet. Generell erkennt man die Ähnlichkeit der Werte im Vergleich der Geschlechter. Die Männchen weisen nur dezent höhere Werte in fast allen Gruppen auf.

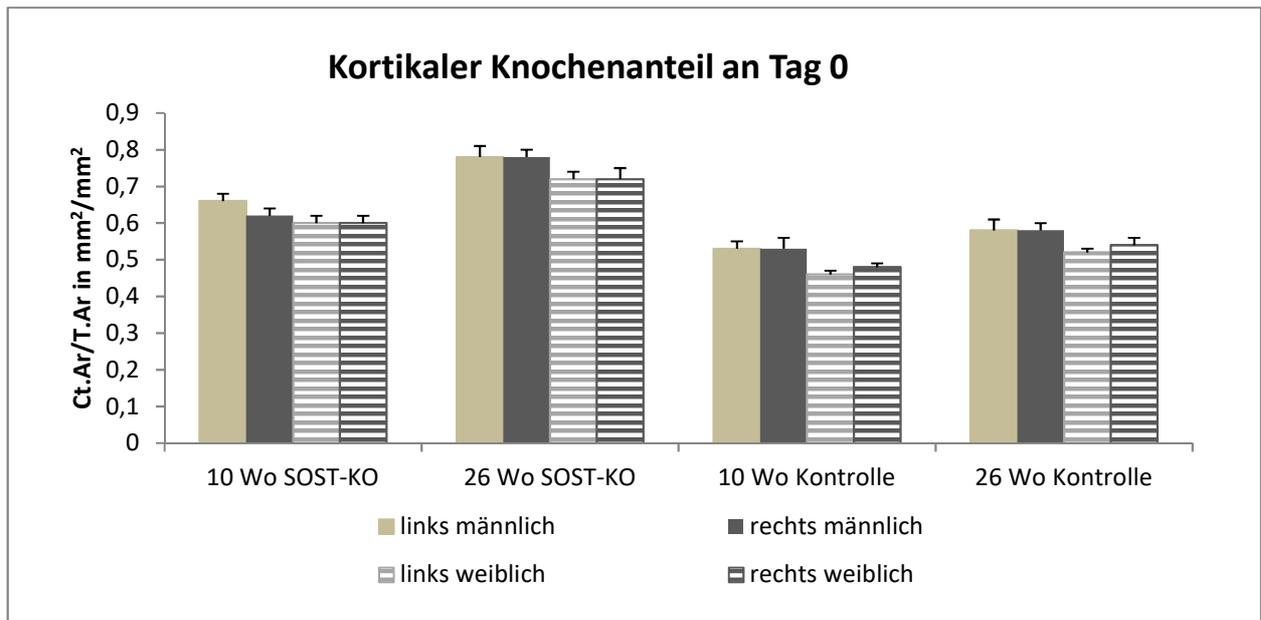


Abbildung 43 Geschlechtervergleich des kortikalen Knochenanteiles an Tag 0. Im Diagramm ist der Kortikale Knochenanteil, der vier Versuchsgruppen abgebildet. Generell erkennt man die Ähnlichkeit der Werte im Vergleich der Geschlechter. Die Männchen weisen nur dezent höhere Werte in allen Gruppen auf.

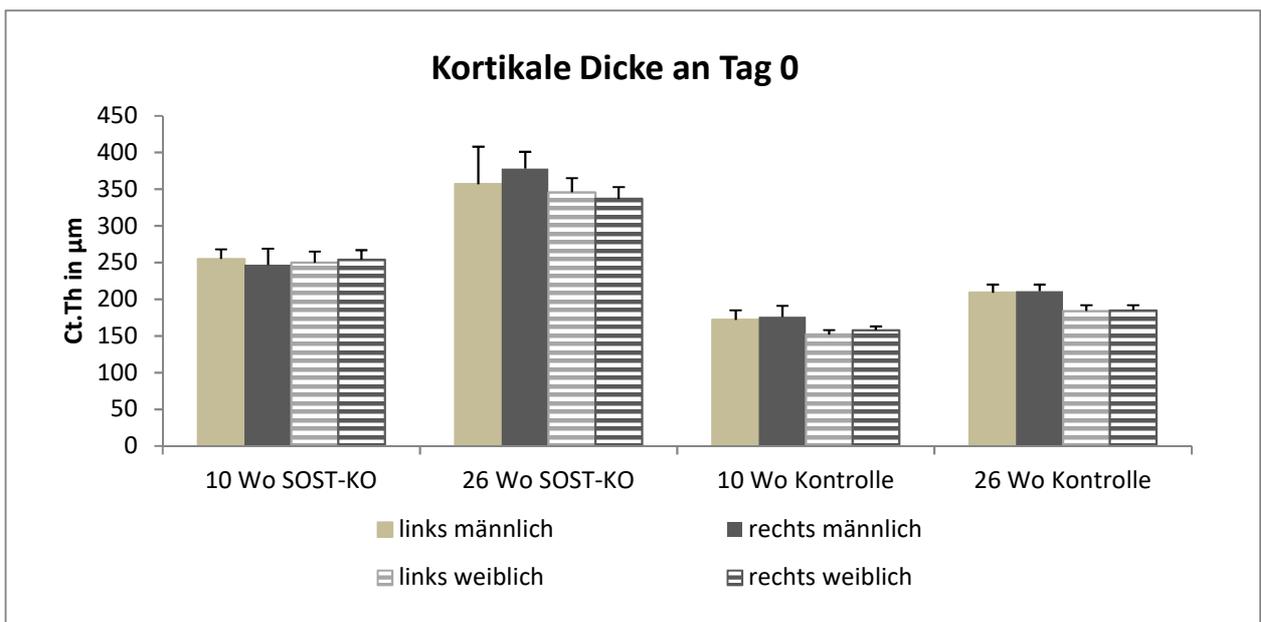


Abbildung 44 Geschlechtervergleich der Kortikalen Dicke an Tag 0. Im Diagramm ist die Kortikale Dicke, der vier Versuchsgruppen abgebildet. Generell erkennt man die Ähnlichkeit der Werte im Vergleich der Geschlechter. Die Männchen weisen nur dezent höhere Werte in fast allen Gruppen auf.

Beim Vergleich von Einfluss der Sklerostininhibition auf den kortikalen Knochen konnte gezeigt werden, dass dieser sich bei männlichen und weiblichen Versuchstieren ebenfalls

sehr ähnelt. Bei den weiblichen Versuchstieren wurde eine Zunahme der Kortikalen Fläche durch Sklerostininhibition von +87% bei den 10 Wochen alten und +125% bei den 26 Wochen alten beobachtet. Auch der kortikale Knochenanteil erfuhr eine SOST bedingte Steigerung von +28% bei den jungen und +36% bei den erwachsenen Weibchen. Die Kortikale Dicke stieg um +63% (10 Wochen) und +85% (26 Wochen). Diese Anstiege sind vergleichbar mit denen der männlichen Versuchstiere, welche in 4.3.1.1 aufgeführt und für den Vergleich in Abbildung 45 neben den Weiblichen dargestellt sind.

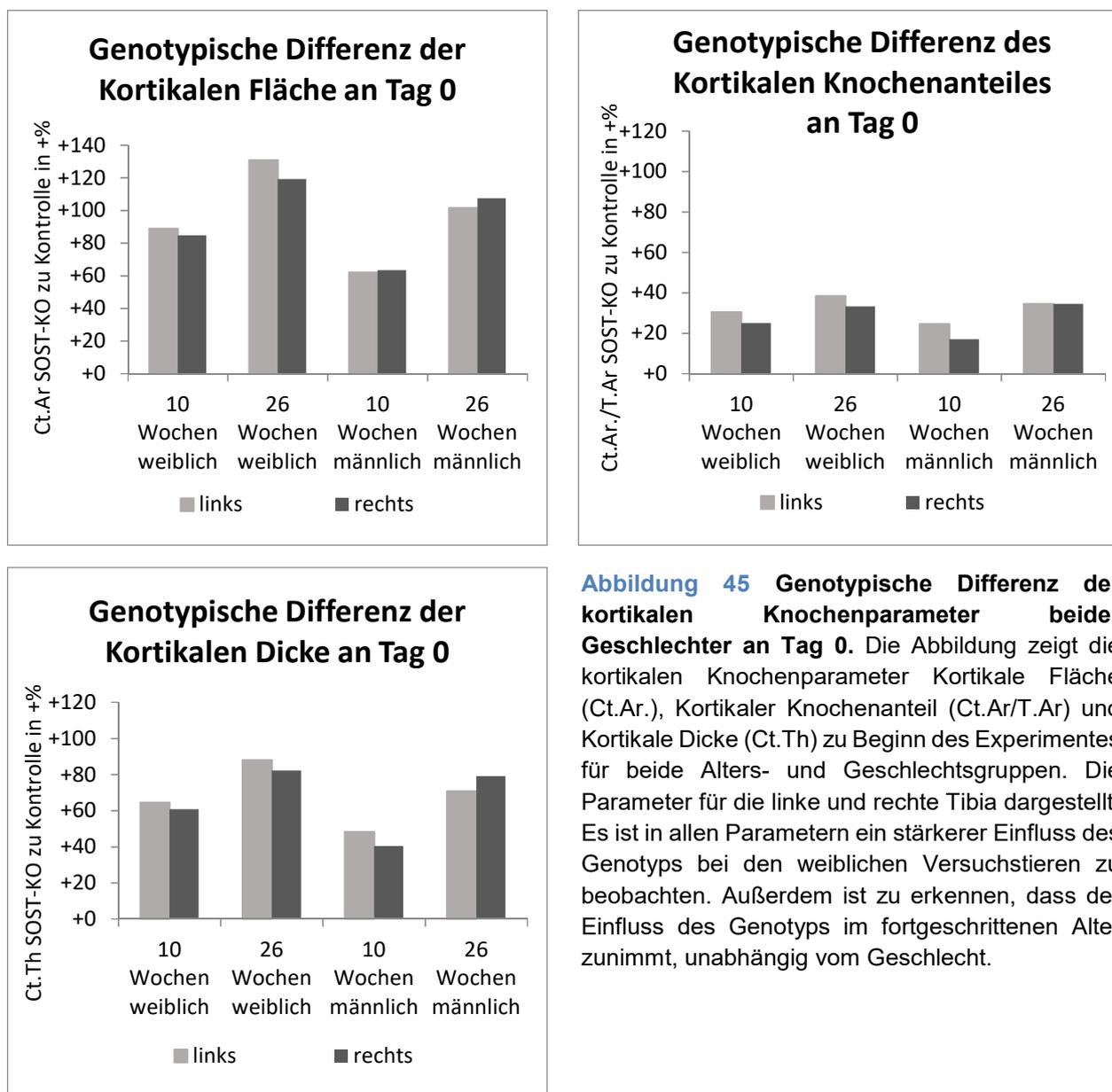


Abbildung 45 Genotypische Differenz der kortikalen Knochenparameter beider Geschlechter an Tag 0. Die Abbildung zeigt die kortikalen Knochenparameter Kortikale Fläche (Ct.Ar.), Kortikaler Knochenanteil (Ct.Ar/T.Ar) und Kortikale Dicke (Ct.Th) zu Beginn des Experimentes für beide Alters- und Geschlechtsgruppen. Die Parameter für die linke und rechte Tibia dargestellt. Es ist in allen Parametern ein stärkerer Einfluss des Genotyps bei den weiblichen Versuchstieren zu beobachten. Außerdem ist zu erkennen, dass der Einfluss des Genotyps im fortgeschrittenen Alter zunimmt, unabhängig vom Geschlecht.

3.5.2. Vergleich der Kortikalen Knochenreaktion von Tag 15 zu 0

In Auswertung der Ergebnisse aus dem Belastungsversuch mit den männlichen Versuchstieren konnte erkannt werden, dass für die drei untersuchten Parameter jeweils signifikante Einflüsse durch Genotyp, Alter und der Kombination aus Genotyp und Alter bestehen. Gleiches konnte bei den weiblichen Mäusen beobachtet werden. Unterschiede sind jedoch beim Einfluss der Belastung festzustellen. Bei den weiblichen Mäusen konnte eine eindeutige Signifikanz für alle drei Parameter in Bezug auf Belastung ermittelt werden, während bei den männlichen Mäusen nur die Kortikale Fläche im Verhältnis zur Gesamtknochenfläche durch mechanische Belastung signifikant beeinflusst werden konnte. Da sowohl Kortikale Fläche als auch Dicke keine signifikante Reaktion auf Belastung zeigten, untersuchten wir ebenfalls die Gesamtknochenfläche der männlichen Mäuse, welche einen signifikanten Einfluss aufwies und die Signifikanz des Kortikalen Knochenanteiles erklärt. Bei den weiblichen Versuchstieren war gerade die Gesamtknochenfläche der Parameter, der keinen signifikanten Einfluss durch mechanische Belastung erfuhr.

3.5.3. Vergleich der 3D-Morphometrie-Analyse

In der Beurteilung der regionalen Knochenreaktionen im Verlauf des Belastungsversuches konnten ebenfalls geschlechterspezifische Differenzen beobachtet werden. Weibliche Mäuse zeigten in Bezug auf Knochenformation in Form von Mineralisierter Oberfläche und Mineralisiertem Knochenvolumen eine stärkere Reaktion durch Belastung als Männliche. Die weiblichen Versuchstiere erreichten eine Steigerung der Mineralisierten Oberfläche von +50% (10 Wochen alte) und +25% (26 Wochen alte) bei den Kontrolltieren, während die Männlichen nur eine Zunahme von +18% (10 Wochen alte) und +4% (26 Wochen alte) aufwiesen. Auch bei Sklerostininhibition war der Belastungseinfluss auf die Mineralisierte Oberfläche bei den weiblichen Mäusen mit +69% bei den Jungtieren und +48% bei den Erwachsenen sehr kräftig ausgeprägt. Dagegen konnte bei den männlichen Versuchstieren nur Steigerungen von +10% bei den jungen Mäusen und +26% bei den erwachsenen beobachtet werden. Ebenfalls sehr deutlich war der Unterschied beim Einfluss auf das Mineralisierte Volumen zu erkennen. Die weiblichen Kontrolltiere erfuhren Anstiege von +143% für die 10 Wochen alten und +39% für die 26 Wochen alten, während bei den männlichen nur Anstiege +38% und +18% festzustellen waren. Bei Sklerostininhibition war bei den erwachsenen Mäusen die

Differenz nur sehr gering bezüglich Einfluss auf das Mineralisierte Volumen mit +76% bei den Männchen und +88% bei den Weibchen; jedoch bei den Jungtieren mit +26% bei den männlichen und +208% bei den weiblichen Mäusen umso stärker ausgeprägt.

Bezüglich des Einflusses der Belastung auf die Resorption des kortikalen Knochens konnte bei den Weibchen eine Reduktion in allen Gruppen für Resorbierte Oberfläche und Resorbiertes Volumen festgestellt werden. Im Gegensatz dazu konnte bei den männlichen Mäusen kein Einfluss oder sogar eine Zunahme der Resorptionsparameter unter Belastung beobachtet werden, insbesondere bei Sklerostininhibition.

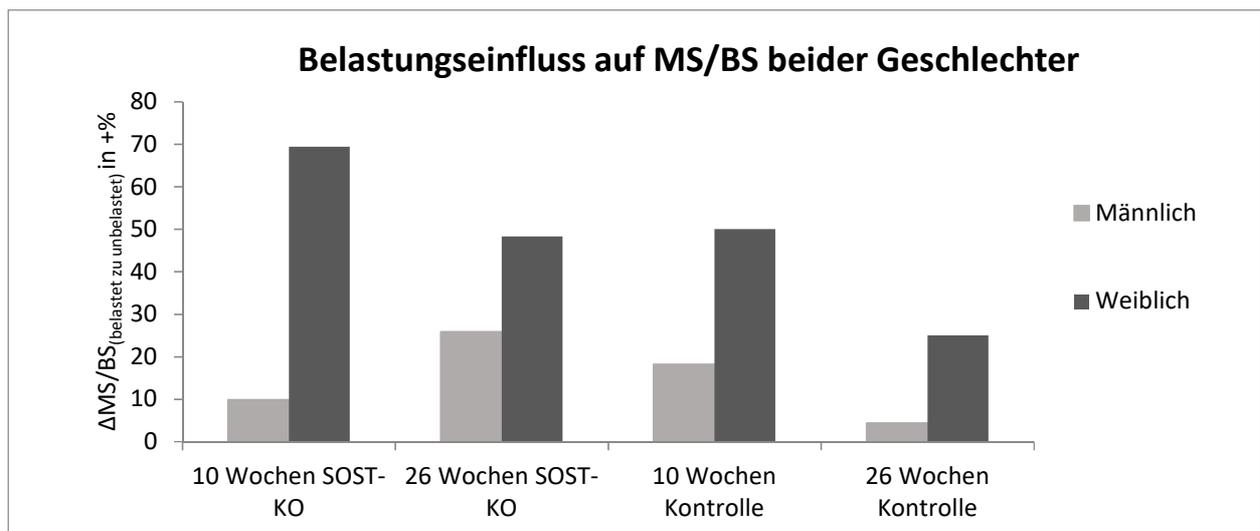


Abbildung 46 Einfluss der Belastung auf die Mineralisierte Oberfläche zur Gesamtknochenoberfläche für beide Geschlechter. Dargestellt ist der Vergleich der Zunahmen in +% durch Belastung in Bezug zur Kontrollseite von weiblichen und männlichen Versuchstieren.

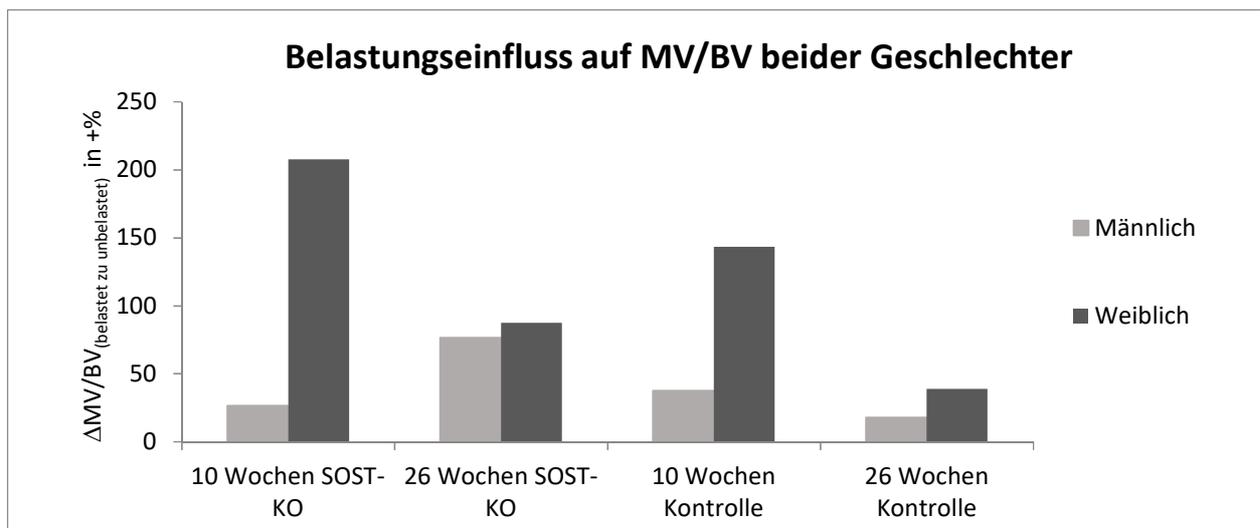


Abbildung 47 Einfluss der Belastung auf das Mineralisierte Volumen zum Gesamtknochenvolumen für beide Geschlechter. Dargestellt ist der Vergleich der Zunahmen in +% durch Belastung in Bezug zur Kontrollseite von weiblichen und männlichen Versuchstieren.

3.5.4. Vergleich der dynamischen Histomorphometrie

Zur Beurteilung der dynamischen Veränderungen und den Differenzen der Geschlechter wurden auch die Histomorphometrieergebnisse miteinander verglichen. Der Vergleich wurde in die drei untersuchten Knochenbereiche aufgebrochen: Endostal, Periostal und Trabekulär

3.5.4.1. Vergleich der endostalen Reaktion beider Geschlechter

Beim Vergleich der Geschlechter in Bezug auf die Reaktion des endostalen kortikalen Knochens fiel auf, dass bei den Weibchen ein signifikanter Einfluss aller drei Parameter (MS/BS, MAR, BFR) durch Genotyp, Alter und Belastung zu beobachten war. Im Gegensatz dazu konnte bei den männlichen Mäusen endostal nur ein signifikanter Bezug zum Alter für alle drei Parameter festgestellt werden. Belastung hatte keine erkennbare Wirkung auf den endostalen kortikalen Knochen. Dieser Vergleich ist in den Abbildungen 48 bis 50 dargestellt.

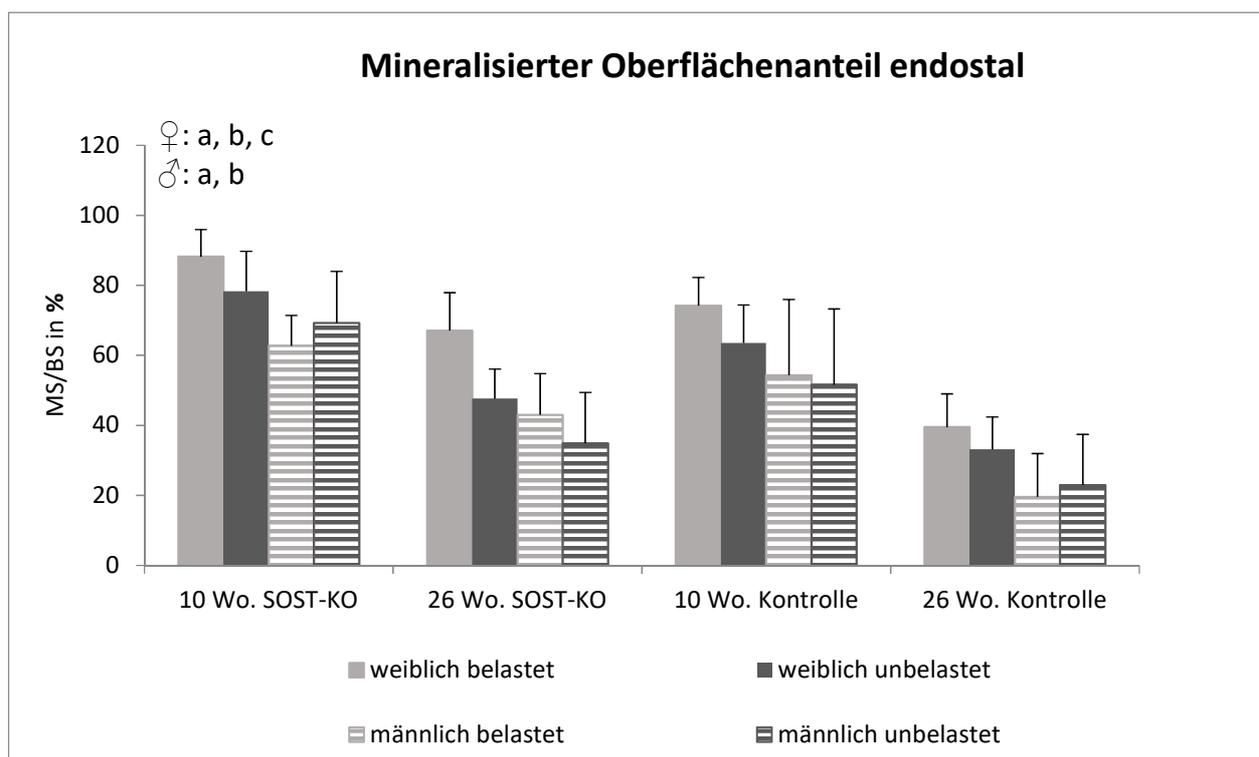


Abbildung 48 Endostaler Mineralisierter Oberflächenanteil im Geschlechtervergleich. Abgebildet ist der Mineralisierte Oberflächenanteil aller vier Versuchsgruppen für den Vergleich beider Geschlechter in Abhängigkeit von Belastung. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

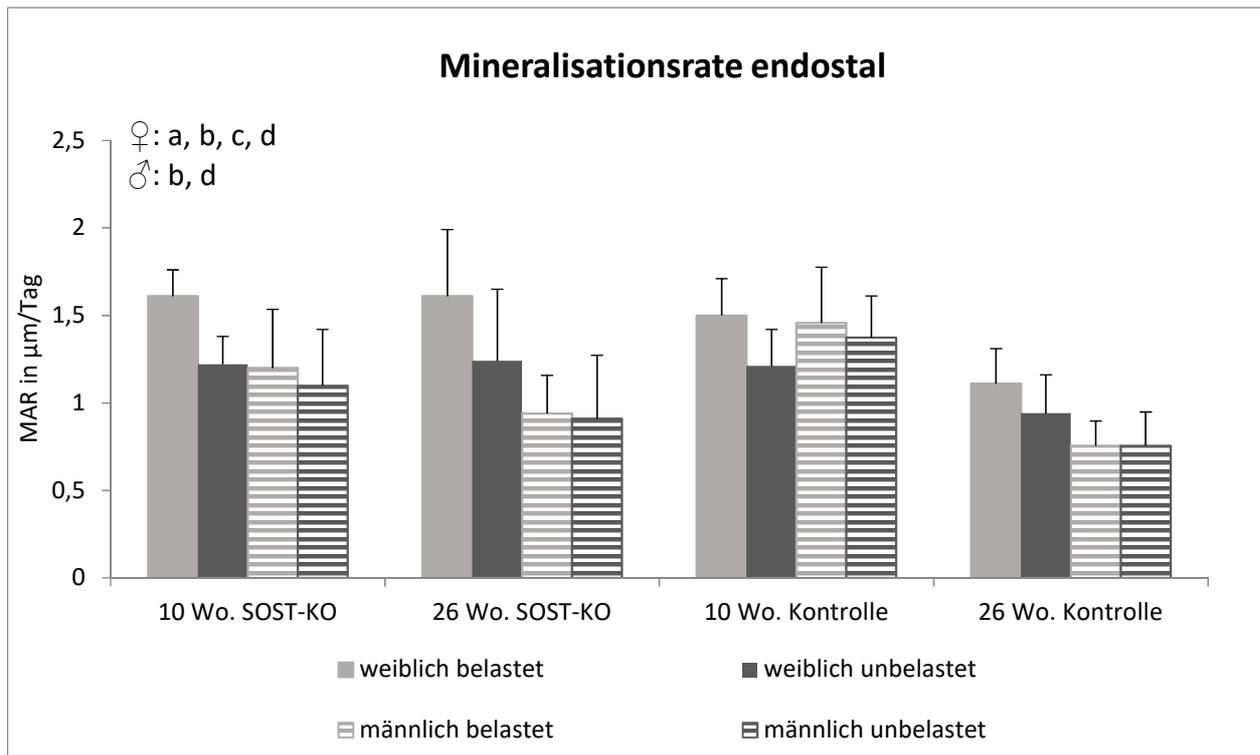


Abbildung 49 Endostale Mineralisationsrate im Geschlechtervergleich. Abgebildet ist die Mineralisationsrate aller vier Versuchsgruppen für den Vergleich beider Geschlechter in Abhängigkeit von Belastung. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

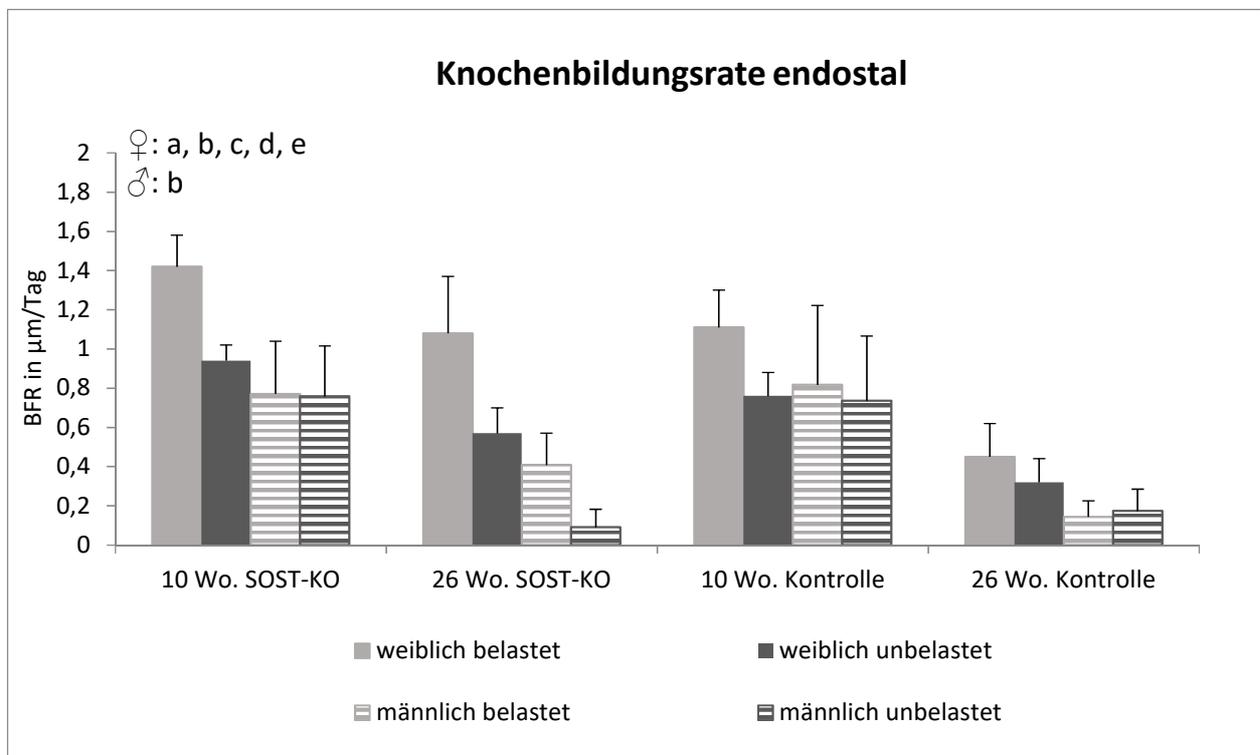


Abbildung 50 Endostale Knochenbildungsrate im Geschlechtervergleich. Abgebildet ist die Knochenbildungsrate aller vier Versuchsgruppen für den Vergleich beider Geschlechter in Abhängigkeit von Belastung. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

3.5.4.2. Vergleich der periostalen Reaktion beider Geschlechter

Periostal konnte ebenfalls bei den weiblichen Versuchstieren ein signifikanter Einfluss auf alle drei Parameter (MS/BS, MAR, BFR) durch Alter, Genotyp und vor allem Belastung festgestellt werden. Anders als am endostalen Bereich konnte hier auch ein signifikanter Unterschied in der periostalen Reaktion auf Belastung in Bezug auf Genotyp für alle drei Parameter nachgewiesen werden, wobei endostal nur die Knochenbildungsrate einen solchen Einfluss erkennen ließ. Bei den Männchen hingegen wurde nur ein signifikanter Einfluss des Alters auf die Mineralisationsrate beobachtet. Ansonsten konnten keine weiteren Signifikanzen eruiert werden. In der Abbildung 51 bis 53 sind die Einflussfaktoren, Alter, Genotyp und Belastung bei den weiblichen Mäusen gut zu erkennen, während bei der Reaktion des periostalen Knochens der Männchen kein Trend erkennbar ist.

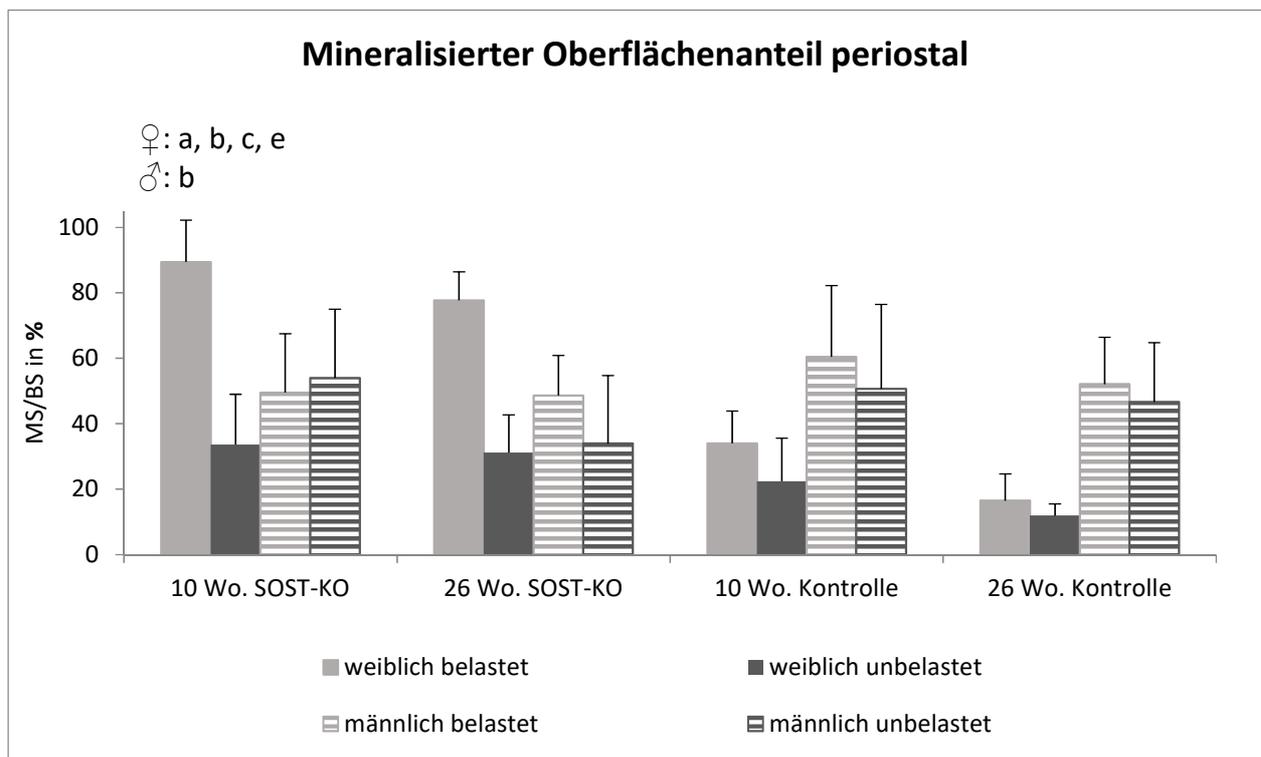


Abbildung 51 Periostaler Mineralisierter Oberflächenanteil im Geschlechtervergleich. Abgebildet ist der Mineralisierte Oberflächenanteil aller vier Versuchsgruppen für den Vergleich beider Geschlechter in Abhängigkeit von Belastung. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

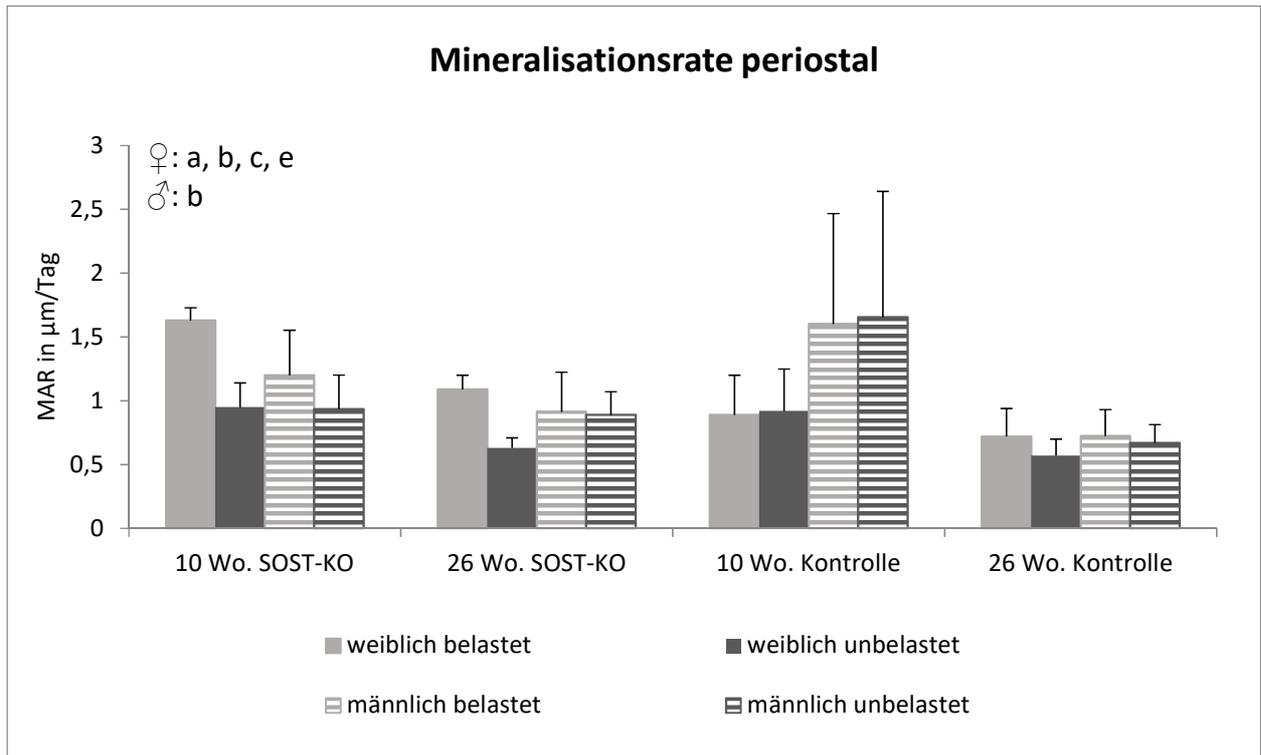


Abbildung 52 Periostale Mineralisationsrate im Geschlechtervergleich. Abgebildet ist die Mineralisationsrate aller vier Versuchsgruppen für den Vergleich beider Geschlechter in Abhängigkeit von Belastung. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

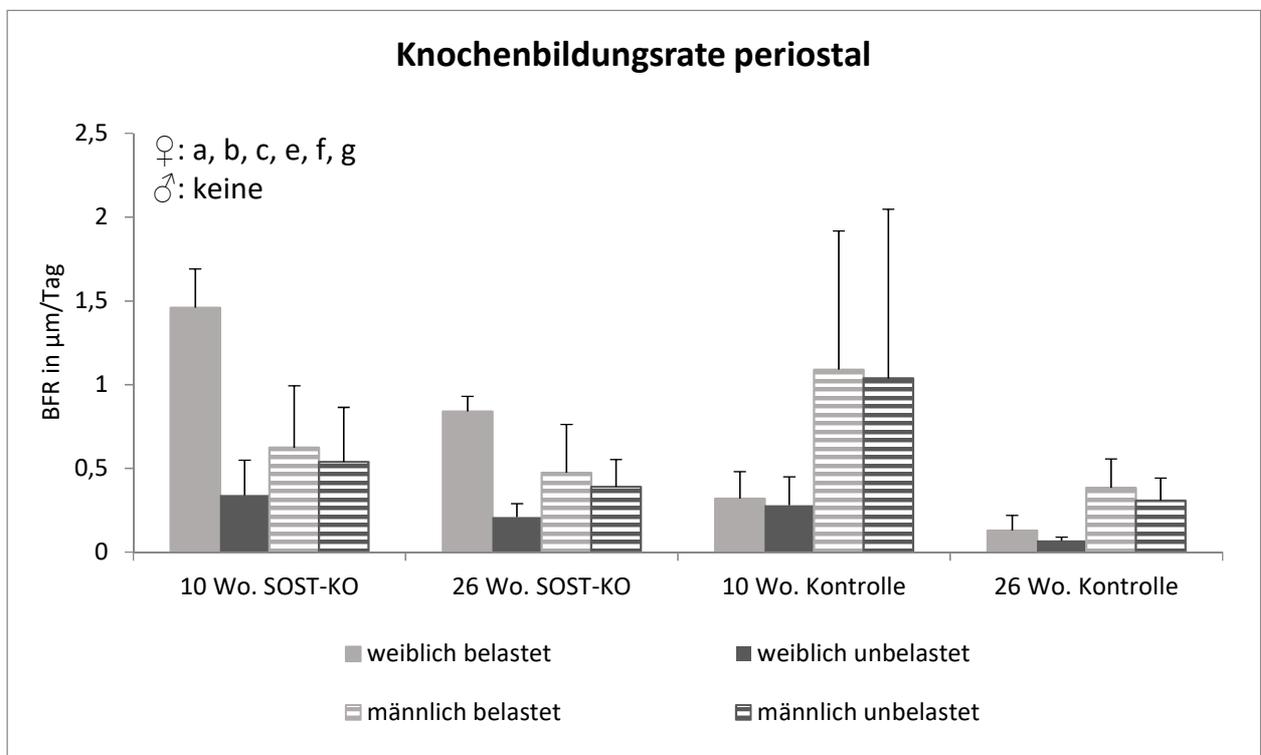


Abbildung 53 Periostale Knochenbildungsrate im Geschlechtervergleich. Abgebildet ist die Knochenbildungsrate aller vier Versuchsgruppen für den Vergleich beider Geschlechter in Abhängigkeit von Belastung. ANOVA: (a) Genotyp, (b) Alter, (c) Belastung, (d) Genotyp*Alter, (e) Genotyp*Belastung, (f) Alter*Belastung, (g) Genotyp*Alter*Belastung.

4. Diskussion

Durch den in dieser Arbeit beschriebenen Versuch im männlichen Mausmodell und den Vergleich zu weiblichen Versuchstieren wurde der Einfluss von Sklerostininhibition in Bezug auf Belastung, Alter und Geschlecht sowohl auf den kortikalen als auch auf den trabekulären Knochen untersucht. Dabei wurde unterschieden zwischen der Auswirkung des Genotyps und des Alters zu Beginn des Experimentes und der Entwicklung der Knochenparameter im Rahmen des 15-tägigen Experimentes. Es erfolgte die Beurteilung in Bezug auf Genotyp, Alter und vor allem Belastung. Anschließend wurden die Resultate des kortikalen Knochens mit den Daten eines identisch durchgeführten Experimentes mit weiblichen Mäusen verglichen, um den Einfluss des Geschlechtes zu beurteilen.

4.1. Zusammenfassung der Resultate

Sklerostin ist ein wichtiger Mediator des Knochenstoffwechsels [116, 117, 119, 120, 134] und wird als Ansatzpunkt zur Behandlung und Beeinflussung des Knochenmetabolismus untersucht. Ob und in wie fern Sklerostin insbesondere in Bezug auf Be- und Entlastung wirkt, ist aktuell Gegenstand der Forschung und wurde auch in dieser Arbeit näher untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss der Sklerostininhibition vor Beginn des Experimentes bewertet.

Zur Beurteilung unserer Testergebnisse stellten wir folgende Hypothesen auf:

- Chronische Sklerostin-Inhibition bewirkt eine Steigerung der Knochenmasse kortikal und trabekulär bei jungen und erwachsenen Mäusen.
- Belastungsinduzierte Knochenbildung und -resorption sind unabhängig von Sklerostin-Inhibition im männlichen Mausmodell
- Knochenbildung ist durch die Ausreifung des Skelettes mit zunehmendem Alter abgeschwächt, während die Knochenresorption zunimmt.
- Sklerostin-Inhibition bewirkt als Reaktion auf Belastung ein stärkeres Knochenwachstum im weiblichen Mausmodell als im Männlichen.

Diese 4 Thesen werden mit den vorliegenden Ergebnissen einzeln geprüft und für belegt oder widerlegt befunden.

4.1.1. Hypothese 1

Zur Bestätigung der ersten These wurde zu Beginn des Experimentes der Einfluss einer lebenslangen Sklerostin-Inhibition in Bezug auf Alter im männlichen Mausmodell untersucht.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass diese These durch die Steigerung der kortikalen Micro-CT-Parameter, Ct.Ar, Ct.Ar/T.Ar und Ct.Th, und der trabekulären, Tb.TV/BV, Tb.N und Tb.Th, eindeutig bewiesen werden konnte. Alle Mäuse mit lebenslanger Sklerostininhibition besaßen signifikant kräftigere Knochen sowohl kortikal als auch trabekulär im Vergleich zu ihren Kontrolltieren mit bestehender Sklerostinexpression.

Weiterführend konnte durch die 3D-Morphometrie-Analyse gezeigt werden, dass diese Knochenzunahme durch Sklerostininhibition vermutlich durch eine Steigerung der Knochenbildung bedingt ist. Ein signifikanter Einfluss wurde sowohl in der Mineralisierten Oberfläche der 3D-Morphometrie nachgewiesen als auch in der 2D-Morphometrie der histologischen Präparate für Anteil an Mineralisierter Oberfläche am endostalen kortikalen Knochen. Damit konnte bewiesen werden, dass chronische Sklerostin-Inhibition eine Steigerung der Knochenmasse kortikal und trabekulär bei jungen und erwachsen Mäusen bewirkt.

4.1.2. Hypothese 2

Der Versuch diente ebenfalls der Beurteilung der Knochenreaktion auf Belastung in Bezug auf Genotyp und Alter. Dabei sollte vor allem geprüft werden, ob Sklerostininhibition eine Auswirkung auf das belastungsinduzierte Knochenwachstum hat. Eine signifikante Reaktion auf mechanische Belastung zeigte der kortikale Knochen bei Kontrolltieren und SOST-KO Mäusen. In den *in vivo* Micro-CT Aufnahmen konnte eine signifikante Veränderung des kortikalen Knochenanteiles durch Belastung erkannt werden. Die Belastungsseite wies bei beiden Genotypen ebenfalls erhöhte Werte für Mineralisierte Oberfläche und Mineralisiertes Volumen auf. Diese Beobachtung konnte bei den jungen als auch den erwachsenen Mäusen dokumentiert werden. Signifikante Differenzen zwischen Mäusen mit Sklerostinexpression und Mäusen ohne konnte zu

keinem Zeitpunkt festgestellt werden. Mechanische Belastung nahm keinen Einfluss auf die Resorptionsparameter von SOST-KO und Kontroll-Mäusen im Alter von 10 und 26 Wochen.

Der trabekuläre Knochen zeigte nur in Bezug auf Trabekeldicke einen signifikanten Einfluss durch mechanische Belastung, jedoch konnte hier auch eine zusätzliche signifikante Komponente für den Genotyp festgestellt werden, der vermuten lässt, dass eine Sklerostininhibition Auswirkungen auf die trabekuläre Knochenreaktion bei mechanischer Belastung hat. Damit konnte gezeigt werden, dass belastungsinduzierte Knochenbildung unabhängig von Sklerostin-Inhibition ist, sofern nur der kortikale Knochen beurteilt wird. Zur Knochenresorption und der Reaktion des trabekulären Knochens können keine eindeutigen Aussagen getroffen werden.

4.1.3. Hypothese 3

Um eine gegebenenfalls differente Reaktion des Knochens auf mechanische Belastung in unterschiedlichen Altersgruppen zu erkennen, wurden in diesem Versuch Mäuse aus zwei Altersgruppen untersucht (10 Wochen und 26 Wochen).

Generell konnte gezeigt werden, dass erwachsene Mäuse durch Skelettreifung bedingt kräftigere Knochenparameter aufweisen als die Jungtiere, sowohl für kortikalen als auch trabekulären Knochen. Alle untersuchten Knochenparameter zeigten durch das Alter bedingte signifikante Unterschiede an Tag 0 des Experimentes.

Die Knochenbildung im Rahmen des 15 tägigen Experimentes zeigte ebenfalls altersabhängige Unterschiede. Die Ausreifung des Skelettes bewirkte eine Reduktion der kortikalen Knochenparameter für Mineralisierte Oberfläche und Mineralisiertes Volumen bei den 26 Wochen alten Mäusen im Vergleich zu den 10 Wochen alten. Diese Beobachtung konnte bei den SOST-KO Mäusen als auch bei den Kontrollmäusen getätigt werden. Die Mineralisierte Oberfläche reduzierte sich um -39% bei den SOST-KO Mäusen und um -48% bei den Kontrolltieren. Auch war das Mineralisierte Volumen bei den SOST-KO Tieren um -70% reduziert und bei den Kontrollmäusen um -76%. Zusätzlich konnten reduzierte Knochenbildungsparameter in der Histomorphometrie erkannt werden (Siehe Tabelle 3).

Ebenso ging mit der Ausreifung des Skelettsystems und dem zunehmendem Alter der Versuchstiere eine signifikante Zunahme der Resorptionsparameter einher. Sowohl das Resorbierte Volumen als auch die Resorbierte Oberfläche vervielfältigten sich im

Zeitraum von 10 zu 26 Wochen enorm. Auch dieser Vorgang ging unabhängig von Sklerostininhibition von statten.

Damit konnte gezeigt werden, dass mit zunehmendem Alter und der damit einhergehenden Ausreifung des Skelettsystems die Knochenbildung unabhängig von Sklerostininhibition gehemmt ist und es zu einer Steigerung der Knochenresorption kommt. Die Anfangshypothese, dass die Knochenbildung durch die Ausreifung des Skelettes mit zunehmendem Alter abgeschwächt wird, während die Knochenresorption zunimmt, konnte bestätigt werden.

4.1.4. Hypothese 4

Durch den Vergleich der erhobenen Daten zur Reaktion des kortikalen Knochens auf Belastung bei Sklerostininhibition im männlichen Mausmodell unterschiedlicher Altersgruppen zu den Daten eines identisch durchgeführten Versuches bei weiblichen Versuchstieren konnte gezeigt werden, dass die Sklerostininhibition bei beiden Geschlechtern in beiden Altersgruppen eine ähnliche Zunahme der kortikalen Knochenmasse bewirkt. Bei den weiblichen Mäusen im Alter von 10 Wochen wurden Zunahmen von +85% und +61% für Kortikale Fläche und Kortikale Dicke bei Sklerostininhibition ermittelt. Bei den 26 Wochen alten SOST-KO Mäusen waren Anstiege von +119% und +82% festzustellen. Diese Ergebnisse sind denen der männlichen Versuchstiere sehr ähnlich, wie in den Abbildungen 21 und 22 zu erkennen ist.

Jedoch ist die Reaktion des kortikalen Knochens der weiblichen Mäuse auf mechanische Belastung deutlich stärker ausgeprägt als bei den männlichen. Insbesondere bei der Betrachtung des Mineralisierten Volumens erkennt man einen wesentlich stärkeren Einfluss der Belastung mit Zunahmen von +143% (Kontrolltiere) und +208% (SOST-KO) für die weiblichen Mäuse, während bei den männlichen nur Anstiege von +38% (Kontrolltiere) und +26% (SOST-KO) zu beobachten waren. Ebenso konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen Genotyp und Belastung bei den weiblichen Mäusen in Bezug auf Knochenbildung festgestellt werden, der bei männlichen Mäusen nicht auftrat. Damit konnte bewiesen werden, dass Sklerostin-Inhibition als Reaktion auf Belastung ein stärkeres Knochenwachstum im weiblichen Mausmodell als im Männlichen bewirkt.

4.2. Vergleich mit anderen Studienarbeiten

Die vielfältige Erforschung der Sklerostinwirkung und des Zusammenhanges von Sklerostininhibition und mechanischer Belastung erbrachte bis heute viele interessante Erkenntnisse. Eine bedeutende Studie, die dem Aufbau dieses Versuches sehr ähnelt, ist der Versuch durch Morse et. al. aus dem Jahre 2014. In dieser Studie wurde zum einen der Einfluss von ausbleibender Belastung durch Botulinumtoxin-Injektionen unter Sklerostin-Inhibition und zum anderen die Auswirkung von täglichem Belastungstraining auf die Tibia unter Sklerostinmangel untersucht. Für den Versuchsaufbau verwendeten Morse et. al. 10 Wochen alte weibliche Mäuse. Als Zieldehnung für die Tibia wurden +1200 $\mu\epsilon$ festgelegt, ein so hoher Wert, den wir auf Grund von Gelenkschwellungen und Schonhinken bei den Mäusen nicht reproduzieren konnten und wir die Belastung deshalb auf +900 $\mu\epsilon$ reduzierten. Morse vermutete eine abgeschwächte Knochenreaktion bei Be- und Entlastung der Tibia bei gleichzeitiger Sklerostininhibition und musste aber feststellen, dass diese Hypothese zu widerlegen war. Belastung zeigte eine signifikante Steigerung des Knochenvolumens sowohl bei SOST-KO Mäusen als auch bei Kontrollmäusen. Damit ist zu vermuten, dass Belastung das Knochenwachstum sklerostinunabhängig induziert und es zur Behandlung der Osteoporose gut als Kombinationstherapie eingesetzt werden könnte. Die Daten meiner Arbeit unterstützen diese Aussage und hinterfragen die Ergebnisse von Tu et. al. aus dem Jahre 2012, dass die Sklerostinkonzentrationssenkung ein notwendiger Schritt der Mechanoreaktion des Knochens sei.

In der Histomorphometrie von Morse konnten verstärkte Reaktionen auf Belastung bei den SOST-KO Mäusen ausgemacht werden. Diese Ergebnisse ließen sich in diesem Versuch nicht reproduzieren, was unter anderem an der reduzierten Dehnung der Tibia von nur +900 $\mu\epsilon$ geschuldet sein kann. Gegebenenfalls ist eine Dehnung von +1200 $\mu\epsilon$ notwendig, um eine relevante histomorphometrische Reaktion beobachten zu können.

Eine weitere Annahme ist der Einfluss des Geschlechtes, da in der Studie mit weiblichen Versuchstieren in unserer Arbeitsgruppe ebenfalls eine signifikante Verbindung zwischen Sklerostininhibition und der kortikalen Knochenreaktion auf mechanische Belastung festgestellt werden konnte. Daher ist zu vermuten, dass männliche Probanden sich bezüglich der Knochenreaktion auf Belastung sehr von weiblichen Probanden unterscheiden können. Dies zeigt die Notwendigkeit der geschlechterspezifischen Forschung und Therapieentwicklung.

Morse et. al. konnte zusätzlich durch die Untersuchung der Knochenreaktion bei Entlastung einen signifikanten Einfluss der Sklerostininhibition auf die Knochenresorption feststellen, wobei durch Sklerostininhibition eine Reduktion der entlastungsinduzierten Knochenresorption zu beobachten war. Diese Feststellung war bei alltäglicher Belastung im Vergleich zu regelmäßiger mechanischer Belastung bei männlichen Mäusen nicht zu rekapitulieren. In meiner Arbeit konnte kein Einfluss von Belastung oder Sklerostininhibition auf die Knochenresorptionsparameter ausgemacht werden. Auch hier ist zu vermuten, dass der Effekt durch Ausbleiben einer Entlastung nicht dargestellt werden konnte, jedoch wurde im Versuch mit weiblichen Mäusen zumindest eine Reduktion des altersbedingten Anstieges der Resorptionsparameter beschrieben. Damit kann wiederum vermutet werden, dass auch hier die Ergebnisunterschiede durch das Geschlecht des Mausmodelles zu erklären ist.

All diese Ergebnisse sind von klinischer Bedeutung. Es kann angenommen werden, dass körperliche Belastung zusätzlich zu einer Sklerostininhibition in der Behandlung von Osteoporose eingesetzt werden kann. Jedoch müssen vorerst klinische Studien zu diesem Thema durchgeführt werden. Vor allem müssen die Geschlechterdifferenzen genauer untersucht und verstanden werden, um einen optimalen Therapieerfolg zu gewährleisten.

Bis heute ist das Wissen der molekularen Mechanismen für die Knochenneubildung, den Knochenabbau und den Knochenumbau nicht vollständig. Sowohl Morse et. al. als auch diese Arbeit zeigen, dass Belastung einen sklerostinunabhängigen Einfluss auf das Knochenvolumen nehmen kann und folglich weitere, noch zu erforschende, Mediatoren in der Mechanotransduktion eine wichtige Rolle spielen. Zu diesen vermuteten Mediatoren gehören das Parathormon (PTH), der Insulinartige Wachstumsfaktor 1 (IGF-1), Leptin, Prostaglandin E₂ (PGE₂), Connexin 43, Interleukin 11 und die Knochenmorphogenetischen Proteine (BMPs) [164, 177, 182, 183]. Doch gerade in Bezug auf die Relevanz des Geschlechtes für die Mechanotransduktion des Knochens kann man vermuten, dass gerade die Sexualhormone eine wichtige Rolle als Mediator des Knochenstoffwechsels einnehmen. Daher bedarf es der Klärung des Einflusses von vor allem dem Östrogenrezeptor α (ER α) auf den Knochenstoffwechsel und die Wechselwirkungen mit Sklerostin. Aber auch geschlechterspezifische Unterschiede in der Expression der anderen eben erwähnten Mediatoren sollten in der zukünftigen Forschung berücksichtigt werden.

Ein Vergleich zu der Studie von Morse et. al. ist nur begrenzt möglich, da wie bereits erwähnt Differenzen in der Zieldehnung für den Belastungsversuch vorlagen. Ebenso sind die Daten im Detail nur schwer zu vergleichen, da Morse et. al. nur selten über die Ergebnisse für die mittlere Diaphyse berichtete und als Zielparameter das Kortikale Knochenvolumen als einzigen Parameter erwähnte. Im Versuch von Morse et. al. Wildtyp-Mäuse als Kontrolltiere verwendet, während in dieser Arbeit Wurfgeschwister der Kontrolle dienten. Außerdem ist das Geschlecht des Mausmodelles ebenfalls eine Limitation der Vergleichbarkeit der Daten, da, wie diese Arbeit zeigen konnte, die kortikale Knochenreaktion auf mechanische Belastung alters- und geschlechtsabhängig ist.

In der Knochenforschung ist es geläufig, das weibliche Mausmodell zu verwenden. Man findet nur wenige Studien, die sich mit männlichen Probanden beschäftigen. Ursächlich dafür ist die Annahme, dass generell keine Differenzen zwischen den Geschlechtern in Bezug auf den Knochenmetabolismus bestehen. 2002 zeigten J.R. Mosley und L.E. Lanyon, dass Differenzen in der kortikalen Knochenreaktion auf mechanische Belastung nicht geschlechtsbedingt sind, sondern in Zusammenhang mit der Wachstumsrate steht [184]. Leider ist auch hier die Vergleichbarkeit gering, da für den Versuch junge Ratten verwendet wurden, die Belastung an der Ulna stattfand und die Belastungsregime unterschiedlich waren. Jedoch widersprechen die Daten meiner Arbeit der Kernaussage von Mosley und Lanyon und zeigen die Dringlichkeit der weiterführenden geschlechterspezifischen Forschung auf.

Bezüglich des trabekulären Knochens konnte eine signifikante Reaktion auf Belastung für die Trabekeldicke festgestellt werden. Ebenso wurden signifikante Unterschiede für Trabekeldicke und Trabekulärer Volumenanteil in Bezug auf Belastung und Genotyp beobachtet. Diese Daten wurden sowohl bei männlichen als auch weiblichen Versuchstieren ermittelt und unterstützen die Ergebnisse aus der bisherigen Literatur [185]. Jedoch konnte bei der Betrachtung des Einflusses der Sklerostininhibition zu Beginn des Experimentes festgestellt werden, dass weibliche Mäuse durch Sklerostininhibition eine stärkere Steigerung der trabekulären Knochenparameter erfahren als männliche Mäuse altersunabhängig, sowohl im Alter von 10 als auch 26 Wochen. Diese Beobachtung könnte den erhöhten Ausgangswerten männlicher Mäuse im Vergleich zu weiblichen geschuldet sein, lässt aber auch vermuten, dass Sklerostininhibition die Häufung des trabekulären Knochenverlustes bei Frauen verhindern und die Inzidenz an die von Männern angleichen kann. Somit könnte der

Sklerostininhibition eine protektive Wirkung für trabekulären Knochenverlust zugesprochen werden. Die ausführlichen Daten zum Geschlechtervergleich sind in dieser Arbeit nicht aufgeführt, da dies über das Thema dieser Arbeit hinausgeht und wird deshalb in einer separaten Publikation erläutert.

4.3. Studienlimitation

Mit dieser Arbeit konnten viele neue Erkenntnisse gewonnen werden, aber auch reichlich neue Fragen wurden aufgeworfen, die einer Klärung bedürfen. In der Studie wurden ausschließlich etablierte Verfahren verwendet und es konnte auf einen aus vorherigen Versuchen gewonnen Erfahrungsschatz bei der Durchführung und Auswertung zurückgegriffen werden. Dennoch konnten wir auch in dieser Arbeit Limitationen für die Aussagekraft der Ergebnisse feststellen.

Ein Schwachpunkt dieser Studie ist die Limitierung auf nur zwei Altersgruppen und, dass die Knochenreaktionen im vor Allem fortgeschrittenem Alter nicht genauer betrachtet werden konnten. Da die Osteoporose eine Erkrankung des zunehmenden Alters ist, wären gerade die Daten von älteren Versuchstieren (zum Beispiel 52 Wochen Alte) von großem Interesse. Jedoch erhöhte sich bei der Bestimmung der nötigen axialen Kraft für eine Dehnung von $+900 \mu\epsilon$ die Häufigkeit für Begleiterscheinungen, wie Gelenkschwellung oder schmerzbedingtes Schonhinken bei 52 Wochen alten Mäusen. Außerdem wurde bei der Zucht so alter SOST-KO Mäuse eine erhöhte Mortalität festgestellt, sodass eine nicht rechtfertigbare Anzahl an Versuchstieren von Nöten gewesen wäre, um eine repräsentative Aussage der Daten zu gewährleisten. Da gezeigt wurde, dass die Abnahme der Mechanosensitivität bereits nach der Ausreifung des Skelettsystems beginnt [49, 168, 186, 187], ist allerdings davon auszugehen, dass auch mit nur zwei Altersgruppen ein großer Informationsgewinn erfolgte.

Als weitere Limitation ist das gewählte Mausmodell zu nennen. Der Unterschied zwischen den weiblichen und männlichen Mäusen ist unter anderem die Gesellschaftsfähigkeit der Tiere. Während bei den weiblichen Versuchstieren keine Auffälligkeiten beobachtet werden konnten, mussten wir bei den Männlichen oft Kämpfe beziehungsweise dessen Folgen feststellen. Die Verletzungen einzelner Mäuse führten teilweise noch vor Beginn des Versuches zum Ausschluss und es mussten Ersatztiere verwendet werden (Bei einem Versuchstier führten während des Experimentes auftretende Verletzungen zum Tod). Anschließend wurden die Mäuse teilweise in kleineren Gruppen oder einzeln über

den Zeitraum des Experimentes aufbewahrt. Durch die ständigen Auseinandersetzungen könnte die belastungsinduzierte Knochenreaktion der Tibia beeinflusst sein und von anderen Studien, vor allem von denen der Weiblichen abweichen und die Ergebnisse verfälschen. Diese Beobachtung wurde bereits von Meakin et. al. 2013 beschrieben. Es wurde erkannt, dass männliche Mäuse etwa 1,3 Mal pro Stunde in Kämpfe verwickelt sind, während weibliche in Rahmen des Versuches gar nicht kämpften [188]. Bei der Untersuchung der Tibia auf mechanische Belastung konnte ebenfalls ein geschlechterspezifischer Unterschied festgestellt werden, bei dem ein erwarteter Knochenparameteranstieg bei den Weibchen auftrat, jedoch keiner bei den Männchen. Im Anschluss wurden die Männchen individuell gehalten und zeigten eine ähnliche belastungsinduzierte Knochenreaktion kortikal und trabekulär wie die weiblichen Mäuse. Es ist zu vermuten, dass das Umfeld, in diesem Fall vor allem das Auftreten von häufigen Auseinandersetzungen, relevanten Einfluss auf die Mechanoreaktion des Knochens ausübt und, dass auf Grund der hohen alltäglichen Belastung des Knochens bei männlichen Mäusen durch die Kämpfe keine weitere Stimulation durch extern zugeführte mechanische Belastung erreicht werden kann. Diese Annahme könnte die ohne Sklerostininhibition höheren Knochenparameter sowohl kortikal, aber vor allem trabekulär erklären. Um diese Vermutung zu Be- oder Widerlegen bedarf es weiterer Untersuchungen. Diese sollten auch den Einfluss von Individualhaltung auf die Knochenreaktion beleuchten.

Allgemein ist das Verwenden der kontralateralen Tibia als intraindividuelle Kontrolle bei *in vivo* Belastungskonzepten akzeptiert [189], jedoch zum Belegen dieser Aussage, wäre eine Kontrolle der Daten an nur scheinbelasteten Tieren empfehlenswert. Denn diese Arbeit konnte zeigen, dass Belastung bereits falsch signifikante Werte zu Beginn, also vor dem ersten Belastungsintervall, bewirken kann. Der Kortikale Knochen wies an Tag 0 bereits einen signifikanten Einfluss der Belastung für Kortikale Fläche und Gesamtknochenfläche auf und auch der Kortikale Knochenanteil war mit $p = 0,0878$ grenzwertig aussagekräftig. Deshalb sollte die Validität der Verwendung der kontralateralen Tibia als Kontrolle in Belastungsversuchen geprüft werden und gegebenenfalls von der Verwendung abgesehen werden. Diese Beobachtung stellt somit ebenfalls eine Limitation der Aussagekraft der in diesem Versuch erhobenen Daten dar. Da bei der Nutzung von scheinbelasteten Tieren als Kontrolle jedoch eine doppelt so hohe Anzahl an Mäusen für diese Studie notwendig gewesen wäre, ist die Verwendung der

kontralateralen unbelasteten Tibia als Kontrollknochen bis zur Klärung der Validität die ethisch und wissenschaftlich sinnvollere Variante.

Als limitierend für die Aussagekraft unserer Befunde kann ebenfalls die Subjektivität der Beurteilung von Fluorochrombanden in der Evaluation der Histomorphometriepräparate angesehen werden. Insbesondere beim trabekulären Knochen können Auswerterspezifische Unterschiede auftreten, je nachdem welche Trabekel in ein und dieselbe Ebene einbezogen werden. Auch bei einer Probendicke von nur 60µm sind immer noch teilweise mehrere Ebenen zu erkennen und schwer zu differenzieren. Auch beim kortikalen Knochen konnten durch das Vorhandensein von mehreren Ebenen Doppelbanden erscheinen, die keine waren. Diese genau zu differenzieren, bedarf Übung und Erfahrung und kann trotzdem, insbesondere bei unterschiedlichen Untersuchern, gewisse Abweichungen verursachen. Alle Proben wurden daher von nur einem Untersucher ausgewertet, um eine Beeinflussung der Werte zwischen den Versuchsgruppen durch mehrere Personen zu vermeiden. Die Aussagekraft der trabekulären Histomorphometrie ist auch noch durch die zufällige Anzahl an Trabekeln, die im Sagital-Koronarschnitt zu finden sind, limitiert. Bei einigen Proben waren viele Trabekel zu erkennen, die eine gute Beurteilung erlaubten, bei anderen wenigen waren leider nur vereinzelt Trabekel zu identifizieren, womit die Aussagekraft gegebenenfalls reduziert ist. Jedoch ist die dynamische Histomorphometrie ein etabliertes Verfahren zur Beurteilung der belastungsinduzierten trabekulären Knochenreaktion und spielt auch zu Zeiten des Mikro-CTs eine wichtige Rolle für die Aussagekraft und das Erkennen von trabekulären Geschehen [190]. Daher wurde es auch in dieser Arbeit zur Komplettierung der Beurteilbarkeit von mechanisch induzierten Knochenreaktionen angewandt.

Grundsätzlich bedarf es einer weiteren gründlicheren Erforschung der Wechselwirkungen des Knochenstoffwechsels insbesondere in Bezug auf das Sklerostin und den Wnt/β-Catenin Signalweges. Da die Rolle des Sklerostins in der Mechanotransduktion des Knochens noch nicht vollends verstanden ist und auch sehr differente Beobachtungen getätigt werden konnten, ist zu vermuten, dass es neben dem Sklerostin weitere Mechanismen gibt, die den Knochenstoffwechsel in Reaktion auf Belastung oder Entlastung beeinflussen.

Diese Mechanismen oder Einflussfaktoren könnten ursächlich für die differente Datenlage sein. Ein möglicher relevanter Einflussfaktor ist zum Beispiel das Periostin, ein extrazelluläres Matrix-Protein, das vor allem mit Zellrekrutierung und -bindung vergesellschaftet ist [191]. Es konnte gezeigt werden, dass in der Abwesenheit von

Periostin eine Sklerostininhibition in Folge einer mechanischen Stimulation ausbleibt. Diese hatte zur Folge, dass die Knochendichte bei den Mäusen ohne Periostin signifikant geringer unter Belastung zunahm. Interessanterweise konnte dieser Effekt durch die Gabe von Sklerostin-Antikörpern komplett behoben werden. Ein anderer vermuteter Einflussfaktor ist der RANK-Ligand [192]. Bei geringen Konzentrationen von RANKL blieb ein zu erwartender Knochenverlust bei forcierter Entlastung von Mäusebeinen aus. Neben den eben erwähnten Faktoren gibt es noch weitere vermutete Mediatoren, die an dieser Stelle nicht weiter aufgeführt werden sollen. Es ist zu vermuten, dass es noch eine ganze Palette weiterer Mediatoren gibt, die noch nicht entdeckt beziehungsweise mit der Mechanotransduktion und den Knochenstoffwechsel bis heute nicht in Verbindung gebracht wurden. Damit wird deutlich, dass auch wenn Sklerostin-Antikörper sich bereits in Phase III Studien befinden, die Notwendigkeit besteht, Grundlagenforschung auszuweiten und zu intensivieren.

4.4. Potenzielle Verwendung von Sklerostin-Antikörpern

Neben der Grundlagenforschung ist die Fortsetzung der klinischen Testung von Sklerostin-Antikörpern von großer Bedeutung, da sie einen bisher nebenwirkungsarmen anabolen Effekt auf den Knochenstoffwechsel haben. Die Wirksamkeit konnte in einer Studie von Li et. al. dargestellt werden, in der im ovariektomierten Rattenmodell eine postmenopausale Hormonsituation für ein Jahr (von 6 Lebensmonaten zu 18) simuliert wurde und der damit einhergehende Knochenverlust provoziert wurde [193]. Anschließend wurden die Ratten für 5 Wochen mit Sklerostin-Antikörpern behandelt. Die behandelten Tiere konnten den östrogendefizienten Knochenverlust nicht nur vollständig wieder ausgleichen, sondern zeigten im Altersvergleich sogar eine höhere Knochenmasse und -stärke als nicht-ovariektomierte Kontrollratten.

Neben der Relevanz von Sklerostin-Antikörpern zur Behandlung von Knochenverlustserkrankungen werden bereits weitere klinische Einsatzmöglichkeiten vermutet und untersucht. Ein wesentliches Einsatzgebiet ist die Verwendung bei der Frakturheilung. Es konnte in Studien gezeigt werden, dass unter Sklerostininhibition durch spezielle Antikörper ein schnellerer Verschluss des Frakturspaltens und eine höhere Belastbarkeit des geheilten Knochens bewirkt werden kann [194]. Diese Beobachtungen sind vermutlich durch eine Vergrößerung des Kallus unter Sklerostin-Antikörper-Behandlung zu erklären. Aber auch durch das vermehrte Vorkommen von knöchernem Gewebe im Verhältnis zu Knorpeligem im Heilungsgebiet und einer verstärkten Neovaskularisation ist eine verbesserte Frakturheilung zu beobachten [195]. Ebenfalls konnte erkannt werden, dass im Prozess der Frakturheilung die Sklerostinkonzentration in den Anfangsstadien deutlich ansteigt [196]. Diese Erkenntnisse verdeutlichen die Komplexität des Einsatzes von Sklerostin-Antikörpern. Sie lassen vermuten, dass diese Antikörper zur Verbesserung der Frakturheilung und der Senkung des Rezidivrisikos positiv beitragen.

Eine weitere Einsatzmöglichkeit der Antikörper besteht in der Endoprothetik beziehungsweise allgemein in der Implantatchirurgie. Da osteoporotische Knochen oft der Grund für Folgeoperationen in der Endoprothetik sind, bedarf es einer therapeutischen Intervention, die die Implantatversagensrate spürbar senken kann. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass unter Sklerostin-Antikörper-Therapie periprothetische Osteolysen und aseptische Materiallockerungen deutlich seltener auftraten als in einer Kontrollgruppe (Ratten) [197]. Diese Beobachtung konnten sogar in einem Rattenmodell mit stark reduzierter Knochenqualität, bedingt durch

Östrogendefizienz nach Ovariectomie, reproduziert werden und es zeigte sich eine Verdopplung der Implantatfixationsstärke und eine periimplantäre Zunahme an trabekulären Knochen [198]. Die Induktion der Knochenformation und Reduktion der Knochenresorption werden hier ursächlich für die besseren Implantationserfolge gesehen. Leider wurde in beiden Gruppen nur ein Geschlecht beleuchtet, weshalb der Gendereinfluss nicht gänzlich beurteilt werden kann, jedoch wurden in der einen Studie männliche und in der anderen Studie weibliche Ratten verwendet und die Resultate lassen eine ähnliche Wirkung bei beiden vermuten.

Der Einsatz von Sklerostin-Antikörpern wird ebenfalls für die Behandlung von anderen Erkrankungen diskutiert. Für Osteogenesis Imperfecta oder auch der Behandlung der Rheumatischen Arthritis ist die Literatur sich jedoch nicht einig und es wurden viele verschiedene Beobachtungen beschrieben [199-202]. Diese an dieser Stelle zu beschreiben würde den Rahmen dieser Arbeit übersteigen. So werden sie an dieser Stelle nur erwähnt um die Vielseitigkeit des Einsatzes von Sklerostin-Antikörper zu veranschaulichen. Eindeutiger sind die Beobachtungen beim Einsatz der Sklerostin-Antikörper in der Behandlung der Parodontitis. Durch den Einsatz kann die Höhe des Alveolarkammes verbessert und die Knochenmasse gesteigert werden [203, 204].

Der Einsatz von Sklerostin-Antikörpern wird also in vieler Hinsicht untersucht und zeigte bisher vielversprechende Ergebnisse, weshalb die Fortsetzung der Forschung weltweit gefördert wird und die Ergebnisse von Phase III Studien dringend erwartet werden. Jedoch sollte die Grundlagenforschung zum Verstehen der Wirksamkeit nicht vernachlässigt werden, damit zum einen unerwünschte Nebenwirkungen verhindert zum anderen aber auch das volle Potenzial von Sklerostin-Antikörpern ausgeschöpft werden kann. Insbesondere in Bezug auf Belastung, Alter und Geschlecht muss die klinische Testung der Medikamente erweitert werden.

4.5. Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend konnte diese Arbeit zeigen, dass Sklerostininhibition eine Steigerung der Knochenmasse kortikal und trabekulär bewirkt, dass die Knochenbildung und -resorption, die durch Belastung induziert wird, von einer Sklerostininhibition unabhängig ist und dass die Knochenbildung mit zunehmendem Alter abnimmt und die Knochenresorption steigt. Diese Erkenntnisse decken sich mit der Literatur.

Es konnte gezeigt werden, dass Belastung zu einer anabolen Knochenreaktion sowohl bei SOST-KO Mäusen als auch Kontrolltieren führt, jedoch konnte im männlichen Mausmodell keine stärkere Zunahme bei den SOST-KO Mäusen festgestellt werden. Bei weiblichen Mäusen hingegen, war diese Verstärkung zu beobachten. Ebenso konnte bei den Weibchen eine Reduktion der Knochenbildung als Reaktion auf Belastung mit zunehmendem Alter dokumentiert werden, während bei männlichen Mäusen mit Sklerostininhibition keine Abnahme festzustellen war. Auch wurden die Resorptionsparameter von weiblichen erwachsenen Mäusen durch Belastung reduziert, wobei bei männlichen Mäusen kein Einfluss zu beobachten war. In Summe wird deutlich, dass das Geschlecht einen signifikanten Einfluss auf den Knochenmetabolismus und die Mechanotransduktion hat. Die Notwendigkeit, den Knochenstoffwechsel geschlechterspezifisch zu erforschen und mögliche Differenzen zu ermitteln, wurde durch diese Arbeit verdeutlicht. Da es den Anschein hat, dass mechanisch induzierte Knochenbildung und -resorption unter Sklerostininhibition alter- und geschlechtsabhängig ist, sollten in zukünftigen klinischen Studien, die eine Antikörpertherapie zur Blockierung von Sklerostin thematisieren, sowohl Alter als auch Geschlecht als Einflussgröße für Wirkung und Nebenwirkung berücksichtigt werden.

Literaturverzeichnis

1. Olsen BR, Reginato AM, Wang W: Bone development. *Annual review of cell and developmental biology* 2000, 16:191-220.
2. Green J: The physicochemical structure of bone: cellular and noncellular elements. *Mineral and electrolyte metabolism* 1994, 20(1-2):7-15.
3. Caetano-Lopes J, Canhao H, Fonseca JE: Osteoblasts and bone formation. *Acta reumatologica portuguesa* 2007, 32(2):103-110.
4. Blair HC, Larrouture QC, Li Y, Lin H, Beer-Stoltz D, Liu L, Tuan RS, Robinson LJ, Schlesinger PH, Nelson DJ: Osteoblast Differentiation and Bone Matrix Formation In Vivo and In Vitro. *Tissue Eng Part B Rev* 2016.
5. Lüllmann-Rauch R: Taschenlehrbuch Histologie, vol. 3. Stuttgart/New York: Thieme; 2009.
6. Bonewald LF: Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007, 1116:281-290.
7. Sims NA, Vrahnas C: Regulation of cortical and trabecular bone mass by communication between osteoblasts, osteocytes and osteoclasts. *Archives of biochemistry and biophysics* 2014, 561:22-28.
8. Xiong J, Piemontese M, Onal M, Campbell J, Goellner JJ, Dusevich V, Bonewald L, Manolagas SC, O'Brien CA: Osteocytes, not Osteoblasts or Lining Cells, are the Main Source of the RANKL Required for Osteoclast Formation in Remodeling Bone. *PloS one* 2015, 10(9):e0138189.
9. Manolagas SC, Parfitt AM: What old means to bone. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 2010, 21(6):369-374.
10. Berendsen AD, Olsen BR: Bone development. *Bone* 2015, 80:14-18.
11. Ortega N, Behonick DJ, Werb Z: Matrix remodeling during endochondral ossification. *Trends in cell biology* 2004, 14(2):86-93.
12. Shim KS: Pubertal growth and epiphyseal fusion. *Annals of pediatric endocrinology & metabolism* 2015, 20(1):8-12.
13. Denburg MR, Tsampalieros AK, de Boer IH, Shults J, Kalkwarf HJ, Zemel BS, Foerster D, Stokes D, Leonard MB: Mineral metabolism and cortical volumetric bone mineral density in childhood chronic kidney disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2013, 98(5):1930-1938.

14. Wada Y, Iyoda M, Iseri K, Arai-Nunota N, Saito T, Hamada T, Tachibana S, Ikeda M, Shibata T: Combination Therapy of Denosumab and Calcitriol for a Renal Transplant Recipient with Severe Bone Loss due to Therapy-Resistant Hyperparathyroidism. *The Tohoku journal of experimental medicine* 2016, 238(3):205-212.
15. Tsampalieros A, Kalkwarf HJ, Wetzsteon RJ, Shults J, Zemel BS, Foster BJ, Foerster DL, Leonard MB: Changes in bone structure and the muscle-bone unit in children with chronic kidney disease. *Kidney international* 2013, 83(3):495-502.
16. Benninghoff, Drenckhahn: Anatomie Band 1, vol. 17. München: Elsevier, Urban&Fischer Verlag; 2008.
17. Miller MA, Chin J, Miller SC, Fox J: Disparate effects of mild, moderate, and severe secondary hyperparathyroidism on cancellous and cortical bone in rats with chronic renal insufficiency. *Bone* 1998, 23(3):257-266.
18. Agholme F, Aspenberg P: Wnt signaling and orthopedics, an overview. *Acta orthopaedica* 2011, 82(2):125-130.
19. Kim JH, Liu X, Wang J, Chen X, Zhang H, Kim SH, Cui J, Li R, Zhang W, Kong Y *et al*: Wnt signaling in bone formation and its therapeutic potential for bone diseases. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease* 2013, 5(1):13-31.
20. Teitelbaum SL, Ross FP: Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 2003, 4(8):638-649.
21. Balemans W, Van Wesenbeeck L, Van Hul W: A clinical and molecular overview of the human osteopetroses. *Calcified tissue international* 2005, 77(5):263-274.
22. Seeman E: Reduced bone formation and increased bone resorption: rational targets for the treatment of osteoporosis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2003, 14 Suppl 3:S2-8.
23. Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC: Osteoporosis: now and the future. *Lancet (London, England)* 2011, 377(9773):1276-1287.
24. Satpathy S, Patra A, Ahirwar B: Experimental techniques for screening of antiosteoporotic activity in postmenopausal osteoporosis. *Journal of complementary & integrative medicine* 2015, 12(4):251-266.

25. Kanis JA, McCloskey EV, Johansson H, Cooper C, Rizzoli R, Reginster J: European guidance for the diagnosis and management of osteoporosis in postmenopausal women. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2013, 24(1):23-57.
26. Poole KES, Compston JE: Osteoporosis and its management. *BMJ : British Medical Journal* 2006, 333(7581):1251-1256.
27. *Knochenstruktur - was geschieht im Inneren der Knochen?*. OSD Osteoporose Selbsthilfegruppen Dachverband e.V. (Accessed August 15, 2017, at <http://www.osd-ev.org/osteoporose/>)
28. Bonjour JP, Burckhardt P, Dambacher M, Kraenzlin ME, Wimpfheimer C: [Epidemiology of osteoporosis]. *Schweizerische medizinische Wochenschrift* 1997, 127(16):659-667.
29. Farr JN, Khosla S: Skeletal changes through the lifespan--from growth to senescence. *Nature reviews Endocrinology* 2015, 11(9):513-521.
30. Lee DH, Jung KY, Hong AR, Kim JH, Kim KM, Shin CS, Kim SY, Kim SW: Femoral geometry, bone mineral density, and the risk of hip fracture in premenopausal women: a case control study. *BMC musculoskeletal disorders* 2016, 17:42.
31. Unnanuntana A, Gladnick BP, Donnelly E, Lane JM: The assessment of fracture risk. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 2010, 92(3):743-753.
32. Gadam RK, Schlauch K, Izuora KE: Frax prediction without BMD for assessment of osteoporotic fracture risk. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* 2013, 19(5):780-784.
33. Kharroubi A, Saba E, Ghannam I, Darwish H: Evaluation of the validity of osteoporosis and fracture risk assessment tools (IOF One Minute Test, SCORE, and FRAX) in postmenopausal Palestinian women. *Arch Osteoporos* 2017, 12(1):6.
34. Bastos-Silva Y, Aguiar LB, Pinto-Neto AM, Baccaro LF, Costa-Paiva L: Correlation between osteoporotic fracture risk in Brazilian postmenopausal women calculated using the FRAX with and without the inclusion of bone densitometry data. *Arch Osteoporos* 2016, 11:16.

35. Tremollieres FA, Pouilles JM, Drewniak N, Laparra J, Ribot CA, Dargent-Molina P: Fracture risk prediction using BMD and clinical risk factors in early postmenopausal women: sensitivity of the WHO FRAX tool. *J Bone Miner Res* 2010, 25(5):1002-1009.
36. Lorentzon M, Mellstrom D, Ohlsson C: Age of attainment of peak bone mass is site specific in Swedish men--The GOOD study. *J Bone Miner Res* 2005, 20(7):1223-1227.
37. Berger C, Goltzman D, Langsetmo L, Joseph L, Jackson S, Kreiger N, Tenenhouse A, Davison KS, Josse RG, Prior JC *et al*: Peak bone mass from longitudinal data: implications for the prevalence, pathophysiology, and diagnosis of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2010, 25(9):1948-1957.
38. Bonjour JP, Chevalley T, Ferrari S, Rizzoli R: The importance and relevance of peak bone mass in the prevalence of osteoporosis. *Salud publica de Mexico* 2009, 51 Suppl 1:S5-17.
39. Mosekilde L: Age-related changes in bone mass, structure, and strength--effects of loading. *Zeitschrift fur Rheumatologie* 2000, 59 Suppl 1:1-9.
40. Estrada K, Stykarsdottir U, Evangelou E, Hsu YH, Duncan EL, Ntzani EE, Oei L, Albagha OM, Amin N, Kemp JP *et al*: Genome-wide meta-analysis identifies 56 bone mineral density loci and reveals 14 loci associated with risk of fracture. *Nature genetics* 2012, 44(5):491-501.
41. Mori S: [Genome-wide association study for Osteoporosis]. *Clinical calcium* 2016, 26(4):537-543.
42. Mo D, Hsieh P, Yu H, Zhou L, Gong J, Xu L, Liu P, Chen G, Chen Z, Deng Q: The relationship between osteoporosis and body composition in pre- and postmenopausal women from different ethnic groups in China. *Ethnicity & health* 2016:1-16.
43. Leslie WD: Clinical review: Ethnic differences in bone mass--clinical implications. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2012, 97(12):4329-4340.
44. Barrett-Connor E, Siris ES, Wehren LE, Miller PD, Abbott TA, Berger ML, Santora AC, Sherwood LM: Osteoporosis and fracture risk in women of different ethnic groups. *J Bone Miner Res* 2005, 20(2):185-194.
45. Strobe MA, Nigh P, Carter MI, Lin N, Jiang J, Hinton PS: Physical Activity-Associated Bone Loading During Adolescence and Young Adulthood Is

- Positively Associated With Adult Bone Mineral Density in Men. *American journal of men's health* 2015, 9(6):442-450.
46. Bolam KA, van Uffelen JG, Taaffe DR: The effect of physical exercise on bone density in middle-aged and older men: a systematic review. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2013, 24(11):2749-2762.
 47. Hagberg JM, Zmuda JM, McCole SD, Rodgers KS, Ferrell RE, Wilund KR, Moore GE: Moderate physical activity is associated with higher bone mineral density in postmenopausal women. *Journal of the American Geriatrics Society* 2001, 49(11):1411-1417.
 48. Kontulainen S, Sievanen H, Kannus P, Pasanen M, Vuori I: Effect of long-term impact-loading on mass, size, and estimated strength of humerus and radius of female racquet-sports players: a peripheral quantitative computed tomography study between young and old starters and controls. *J Bone Miner Res* 2003, 18(2):352-359.
 49. Razi H, Birkhold AI, Weinkamer R, Duda GN, Willie BM, Checa S: Aging Leads to a Dysregulation in Mechanically Driven Bone Formation and Resorption. *J Bone Miner Res* 2015, 30(10):1864-1873.
 50. Seeman E: Structural basis of growth-related gain and age-related loss of bone strength. *Rheumatology (Oxford, England)* 2008, 47 Suppl 4:iv2-8.
 51. Manolagas SC: From estrogen-centric to aging and oxidative stress: a revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis. *Endocr Rev* 2010, 31(3):266-300.
 52. Kassem M, Marie PJ: Senescence-associated intrinsic mechanisms of osteoblast dysfunctions. *Aging cell* 2011, 10(2):191-197.
 53. Knochen-Stoffwechsel (Accessed August 15, 2017, at [\[http://www.helmberg.at/knochen-stoffwechsel.htm\]](http://www.helmberg.at/knochen-stoffwechsel.htm))
 54. Chew FS: Radiologic manifestations in the musculoskeletal system of miscellaneous endocrine disorders. *Radiologic clinics of North America* 1991, 29(1):135-147.
 55. Khosla S: Pathogenesis of age-related bone loss in humans. *The journals of gerontology Series A, Biological sciences and medical sciences* 2013, 68(10):1226-1235.

56. Khosla S, Melton LJ, 3rd, Riggs BL: The unitary model for estrogen deficiency and the pathogenesis of osteoporosis: is a revision needed? *J Bone Miner Res* 2011, 26(3):441-451.
57. Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, 3rd: A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 1998, 13(5):763-773.
58. Tuck SP, Scane AC, Fraser WD, Diver MJ, Eastell R, Francis RM: Sex steroids and bone turnover markers in men with symptomatic vertebral fractures. *Bone* 2008, 43(6):999-1005.
59. Kenanidis E, Potoupnis ME, Kakoulidis P, Leonidou A, Sakellariou GT, Sayegh FE, Tsiridis E: Management of glucocorticoid-induced osteoporosis: clinical data in relation to disease demographics, bone mineral density and fracture risk. *Expert opinion on drug safety* 2015, 14(7):1035-1053.
60. Buehring B, Viswanathan R, Binkley N, Busse W: Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update on effects and management. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2013, 132(5):1019-1030.
61. Briot K, Roux C: [Corticosteroid-induced osteoporosis]. *La Revue de medecine interne* 2013, 34(5):315-323.
62. Gasser RW: GLUKOKORTIKOID-INDUZIERTE OSTEOPOROSE. *Journal für Mineralstoffwechsel & Muskuloskelettale Erkrankungen* 2001, 8 (4):13-16.
63. Weinstein RS, Jilka RL, Parfitt AM, Manolagas SC: Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids. Potential mechanisms of their deleterious effects on bone. *The Journal of clinical investigation* 1998, 102(2):274-282.
64. Manolagas SC: Steroids and osteoporosis: the quest for mechanisms. *The Journal of clinical investigation* 2013, 123(5):1919-1921.
65. Huybers S, Naber TH, Bindels RJ, Hoenderop JG: Prednisolone-induced Ca²⁺ malabsorption is caused by diminished expression of the epithelial Ca²⁺ channel TRPV6. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology* 2007, 292(1):G92-97.
66. Reid IR: Glucocorticoid osteoporosis--mechanisms and management. *European journal of endocrinology* 1997, 137(3):209-217.

67. Reid IR: Preventing glucocorticoid-induced osteoporosis. *Zeitschrift fur Rheumatologie* 2000, 59 Suppl 2:li/97-102.
68. Villa P, Moruzzi MC, Lassandro AP, Leoni F, Di Nardo F, De Waure C, Scambia G: Glucocorticoid therapy as a significant risk factor for osteoporosis and fractures in an Italian postmenopausal population. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 2013, 29(7):678-682.
69. Amiche MA, Albaum JM, Tadrous M, Pechlivanoglou P, Levesque LE, Adachi JD, Cadarette SM: Fracture risk in oral glucocorticoid users: a Bayesian meta-regression leveraging control arms of osteoporosis clinical trials. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2016, 27(5):1709-1718.
70. Majumdar SR, Morin SN, Lix LM, Leslie WD: Influence of recency and duration of glucocorticoid use on bone mineral density and risk of fractures: population-based cohort study. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2013, 24(9):2493-2498.
71. Parhami F: Possible role of oxidized lipids in osteoporosis: could hyperlipidemia be a risk factor? *Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids* 2003, 68(6):373-378.
72. Parhami F, Garfinkel A, Demer LL: Role of lipids in osteoporosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 2000, 20(11):2346-2348.
73. Eren E, Ellidag HY, Aydin O, Yilmaz N: HDL-Associated Paraoxonase 1 as a Bridge between Postmenopausal Osteoporosis and Cardiovascular Disease. *Chonnam medical journal* 2014, 50(3):75-81.
74. Graham LS, Parhami F, Tintut Y, Kitchen CM, Demer LL, Effros RB: Oxidized lipids enhance RANKL production by T lymphocytes: implications for lipid-induced bone loss. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 2009, 133(2):265-275.
75. Parhami F, Morrow AD, Balucan J, Leitinger N, Watson AD, Tintut Y, Berliner JA, Demer LL: Lipid oxidation products have opposite effects on calcifying vascular cell and bone cell differentiation. A possible explanation for the paradox of arterial calcification in osteoporotic patients. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 1997, 17(4):680-687.

76. Tintut Y, Parhami F, Tsingotjidou A, Tetradis S, Territo M, Demer LL: 8-Isoprostaglandin E2 enhances receptor-activated NFkappa B ligand (RANKL)-dependent osteoclastic potential of marrow hematopoietic precursors via the cAMP pathway. *The Journal of biological chemistry* 2002, 277(16):14221-14226.
77. Teng ZY, Pei LC, Zhang Y, Li Y, Wang RT: Whole blood viscosity is negatively associated with bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *Bone* 2013, 56(2):343-346.
78. Li XS, Zhang JR, Meng SY, Li Y, Wang RT: Mean platelet volume is negatively associated with bone mineral density in postmenopausal women. *Journal of bone and mineral metabolism* 2012, 30(6):660-665.
79. Svedbom A, Hernlund E, Ivergård M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jönsson B, Kanis JA: Osteoporosis in the European Union: a compendium of country-specific reports. *Arch Osteoporos* 2013, 8(1-2).
80. Piscitelli P, Brandi M, Cawston H, Gauthier A, Kanis JA, Compston J, Borgstrom F, Cooper C, McCloskey E: Epidemiological burden of postmenopausal osteoporosis in Italy from 2010 to 2020: estimations from a disease model. *Calcified tissue international* 2014, 95(5):419-427.
81. Cawston H, Maravic M, Fardellone P, Gauthier A, Kanis JA, Compston J, Borgstrom F, Cooper C, McCloskey E: Epidemiological burden of postmenopausal osteoporosis in France from 2010 to 2020: estimations from a disease model. *Arch Osteoporos* 2012, 7:237-246.
82. Hadji P, Klein S, Gothe H, Häussler B, Kless T, Schmidt T, Steinle T, Verheyen F, Linder R: The epidemiology of osteoporosis--Bone Evaluation Study (BEST): an analysis of routine health insurance data. *Dtsch Arztebl Int* 2013, 110(4):52-57.
83. Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A: Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res* 2007, 22(3):465-475.
84. DVO Leitlinie Osteoporose. In. Edited by Osteologie Df; 2014: 175-176.
85. Borer KT: Physical activity in the prevention and amelioration of osteoporosis in women : interaction of mechanical, hormonal and dietary factors. *Sports medicine (Auckland, NZ)* 2005, 35(9):779-830.
86. American College of Sports Medicine position stand. Osteoporosis and exercise. *Medicine and science in sports and exercise* 1995, 27(4):i-vii.

87. Anderson JJ, Rondano P, Holmes A: Roles of diet and physical activity in the prevention of osteoporosis. *Scandinavian journal of rheumatology Supplement* 1996, 103:65-74.
88. Moreira LD, Oliveira ML, Lirani-Galvao AP, Marin-Mio RV, Santos RN, Lazaretti-Castro M: Physical exercise and osteoporosis: effects of different types of exercises on bone and physical function of postmenopausal women. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia* 2014, 58(5):514-522.
89. Qu X, Zhang X, Zhai Z, Li H, Liu X, Li H, Liu G, Zhu Z, Hao Y, Dai K: Association between physical activity and risk of fracture. *J Bone Miner Res* 2014, 29(1):202-211.
90. Rong K, Liu XY, Wu XH, Li XL, Xia QQ, Chen J, Yin XF: Increasing Level of Leisure Physical Activity Could Reduce the Risk of Hip Fracture in Older Women: A Dose-Response Meta-analysis of Prospective Cohort Studies. *Medicine* 2016, 95(11):e2984.
91. Rizzoli R, Stevenson JC, Bauer JM, van Loon LJ, Walrand S, Kanis JA, Cooper C, Brandi ML, Diez-Perez A, Reginster JY: The role of dietary protein and vitamin D in maintaining musculoskeletal health in postmenopausal women: a consensus statement from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Maturitas* 2014, 79(1):122-132.
92. Body JJ: How to manage postmenopausal osteoporosis? *Acta clinica Belgica* 2011, 66(6):443-447.
93. Reginster JY: Antifracture efficacy of currently available therapies for postmenopausal osteoporosis. *Drugs* 2011, 71(1):65-78.
94. Badel T, Pavicin IS, Carek AJ, Rosin-Grget K, Grbesa D: Pathophysiology of osteonecrosis of the jaw in patients treated with bisphosphonate. *Collegium antropologicum* 2013, 37(2):645-651.
95. Siddiqi A, Payne AG, Zafar S: Bisphosphonate-induced osteonecrosis of the jaw: a medical enigma? *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2009, 108(3):e1-8.
96. Capozzi A, Lello S, Pontecorvi A: The inhibition of RANK-ligand in the management of postmenopausal osteoporosis and related fractures: the role of denosumab. *Gynecological endocrinology : the official journal of the International Society of Gynecological Endocrinology* 2014, 30(6):403-408.

97. Jilka RL, Weinstein RS, Bellido T, Roberson P, Parfitt AM, Manolagas SC: Increased bone formation by prevention of osteoblast apoptosis with parathyroid hormone. *The Journal of clinical investigation* 1999, 104(4):439-446.
98. MacDonald BR, Gallagher JA, Russell RG: Parathyroid hormone stimulates the proliferation of cells derived from human bone. *Endocrinology* 1986, 118(6):2445-2449.
99. Weinstein RS, Jilka RL, Almeida M, Roberson PK, Manolagas SC: Intermittent parathyroid hormone administration counteracts the adverse effects of glucocorticoids on osteoblast and osteocyte viability, bone formation, and strength in mice. *Endocrinology* 2010, 151(6):2641-2649.
100. Poole KE, Reeve J: Parathyroid hormone - a bone anabolic and catabolic agent. *Curr Opin Pharmacol* 2005, 5(6):612-617.
101. Aslan D, Andersen MD, Gede LB, de Franca TK, Jorgensen SR, Schwarz P, Jorgensen NR: Mechanisms for the bone anabolic effect of parathyroid hormone treatment in humans. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 2012, 72(1):14-22.
102. Kostenuik PJ, Ferrari S, Pierroz D, Boussein M, Morony S, Warmington KS, Adamu S, Geng Z, Grisanti M, Shalhoub V *et al*: Infrequent delivery of a long-acting PTH-Fc fusion protein has potent anabolic effects on cortical and cancellous bone. *J Bone Miner Res* 2007, 22(10):1534-1547.
103. Karatoprak C, Kayatas K, Kilicaslan H, Yolbas S, Yazimci NA, Gumuskemer T, Demirtunc R: Severe hypercalcemia due to teriparatide. *Indian journal of pharmacology* 2012, 44(2):270-271.
104. Satterwhite J, Heathman M, Miller PD, Marin F, Glass EV, Dobnig H: Pharmacokinetics of teriparatide (rhPTH[1-34]) and calcium pharmacodynamics in postmenopausal women with osteoporosis. *Calcified tissue international* 2010, 87(6):485-492.
105. Fox J: Developments in parathyroid hormone and related peptides as bone-formation agents. *Curr Opin Pharmacol* 2002, 2(3):338-344.
106. VORSICHT - BEDENKLICHES ARZNEIMITTEL:
TERIPARATID (FORSTEO) BEI OSTEOPOROSE (Accessed August 15, 2017, at [http://www.arznei-telegramm.de/html/2003_12/0312109_01.html])
107. Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paeper BW, Kovacevich BR, Proll S, Skonier JE, Zhao L, Sabo PJ, Fu Y *et al*: Bone dysplasia sclerosteosis results

- from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet* 2001, 68(3):577-589.
108. Balemans W, Van Hul W: Identification of the disease-causing gene in sclerosteosis--discovery of a novel bone anabolic target? *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 2004, 4(2):139-142.
 109. Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, Kurahara C, Gao Y, Cao J, Gong J *et al*: Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res* 2008, 23(6):860-869.
 110. Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, Lacza C, Wuyts W, Van Den Ende J, Willems P *et al*: Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet* 2001, 10(5):537-543.
 111. Beighton P, Durr L, Hamersma H: The clinical features of sclerosteosis. A review of the manifestations in twenty-five affected individuals. *Annals of internal medicine* 1976, 84(4):393-397.
 112. Hamersma H, Gardner J, Beighton P: The natural history of sclerosteosis. *Clinical genetics* 2003, 63(3):192-197.
 113. Jacobs P: Van Buchem disease. *Postgraduate medical journal* 1977, 53(622):497-506.
 114. Vanhoenacker FM, Balemans W, Tan GJ, Dijkers FG, De Schepper AM, Mathysen DG, Bernaerts A, Hul WV: Van Buchem disease: lifetime evolution of radioclinical features. *Skeletal radiology* 2003, 32(12):708-718.
 115. Kusu N, Laurikkala J, Imanishi M, Usui H, Konishi M, Miyake A, Thesleff I, Itoh N: Sclerostin is a novel secreted osteoclast-derived bone morphogenetic protein antagonist with unique ligand specificity. *The Journal of biological chemistry* 2003, 278(26):24113-24117.
 116. Zhang D, Park BM, Kang M, Nam H, Kim EJ, Bae C, Lim SK: The systemic effects of sclerostin overexpression using PhiC31 integrase in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2016, 472(3):471-476.
 117. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K *et al*: Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *The EMBO Journal* 2003, 22(23):6267-6276.

118. Yorgan TA, Peters S, Jeschke A, Benisch P, Jakob F, Amling M, Schinke T: The Anti-Osteoanabolic Function of Sclerostin Is Blunted in Mice Carrying a High Bone Mass Mutation of Lrp5. *J Bone Miner Res* 2015, 30(7):1175-1183.
119. Poole KE, van Bezooijen RL, Loveridge N, Hamersma H, Papapoulos SE, Lowik CW, Reeve J: Sclerostin is a delayed secreted product of osteocytes that inhibits bone formation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2005, 19(13):1842-1844.
120. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, Mantila SM, Gluhak-Heinrich J, Bellido TM, Harris SE *et al*: Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *The Journal of biological chemistry* 2008, 283(9):5866-5875.
121. Papanicolaou SE, Phipps RJ, Fyhrie DP, Genetos DC: Modulation of sclerostin expression by mechanical loading and bone morphogenetic proteins in osteogenic cells. *Biorheology* 2009, 46(5):389-399.
122. Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Turcott E, Skonier JE, Winkler DG, Latham JA: Sclerostin promotes the apoptosis of human osteoblastic cells: a novel regulation of bone formation. *Bone* 2004, 35(4):828-835.
123. van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, ten Dijke P, Lowik CW: Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *The Journal of experimental medicine* 2004, 199(6):805-814.
124. Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE, Wu D: Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *The Journal of biological chemistry* 2005, 280(20):19883-19887.
125. Nusse R, Varmus HE: Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 1982, 31(1):99-109.
126. Nusslein-Volhard C, Wieschaus E: Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 1980, 287(5785):795-801.
127. Cabrera CV, Alonso MC, Johnston P, Phillips RG, Lawrence PA: Phenocopies induced with antisense RNA identify the wingless gene. *Cell* 1987, 50(4):659-663.

128. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R: The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell* 1987, 50(4):649-657.
129. Clevers H, Nusse R: Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 2012, 149(6):1192-1205.
130. Logan CY, Nusse R: The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 2004, 20:781-810.
131. the Wnt homepage (Accessed August 15, 2017, at <http://web.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>)
132. Semenov M, Tamai K, He X: SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *The Journal of biological chemistry* 2005, 280(29):26770-26775.
133. Yavropoulou MP, Yovos JG: The role of the Wnt signaling pathway in osteoblast commitment and differentiation. *Hormones (Athens, Greece)* 2007, 6(4):279-294.
134. Levasseur R, Lacombe D, de Vernejoul MC: LRP5 mutations in osteoporosis-pseudoglioma syndrome and high-bone-mass disorders. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme* 2005, 72(3):207-214.
135. Alonso N, Soares DC, E VM, Summers GD, Ralston SH, Gregson CL: Atypical femoral fracture in osteoporosis pseudoglioma syndrome associated with two novel compound heterozygous mutations in LRP5. *J Bone Miner Res* 2015, 30(4):615-620.
136. Zhang Y, Wang Y, Li X, Zhang J, Mao J, Li Z, Zheng J, Li L, Harris S, Wu D: The LRP5 high-bone-mass G171V mutation disrupts LRP5 interaction with *Mesd*. *Molecular and cellular biology* 2004, 24(11):4677-4684.
137. McClung MR, Grauer A, Boonen S, Bolognese MA, Brown JP, Diez-Perez A, Langdahl BL, Reginster JY, Zanchetta JR, Wasserman SM *et al*: Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med* 2014, 370(5):412-420.
138. McColm J, Hu L, Womack T, Tang CC, Chiang AY: Single- and multiple-dose randomized studies of blosozumab, a monoclonal antibody against sclerostin, in healthy postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2014, 29(4):935-943.
139. Padhi D, Allison M, Kivitz AJ, Gutierrez MJ, Stouch B, Wang C, Jang G: 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* 2014, 54(2):168-178.
140. Recker RR, Benson CT, Matsumoto T, Bolognese MA, Robins DA, Alam J, Chiang AY, Hu L, Krege JH, Sowa H *et al*: A randomized, double-blind phase 2 clinical trial of blosozumab, a sclerostin antibody, in postmenopausal women with low bone mineral density. *J Bone Miner Res* 2015, 30(2):216-224.
 141. America's Bone Health (Accessed August 15, 2017, at [\[http://www.docpaul.com/site_index/ehealth_library/about_ehealth_library/american_bone_health.html\]](http://www.docpaul.com/site_index/ehealth_library/about_ehealth_library/american_bone_health.html))
 142. Wright NC, Looker AC, Saag KG, Curtis JR, Delzell ES, Randall S, Dawson-Hughes B: The Recent Prevalence of Osteoporosis and Low Bone Mass in the United States Based on Bone Mineral Density at the Femoral Neck or Lumbar Spine(). *J Bone Miner Res* 2014, 29(11):2520-2526.
 143. Felsenberg D, Silman AJ, Lunt M, Armbrecht G, Ismail AA, Finn JD, Cockerill WC, Banzer D, Benevolenskaya LI, Bhalla A *et al*: Incidence of vertebral fracture in europe: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). *J Bone Miner Res* 2002, 17(4):716-724.
 144. Ismail AA, Pye SR, Cockerill WC, Lunt M, Silman AJ, Reeve J, Banzer D, Benevolenskaya LI, Bhalla A, Bruges Armas J *et al*: Incidence of limb fracture across Europe: results from the European Prospective Osteoporosis Study (EPOS). *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2002, 13(7):565-571.
 145. Looker AC, Melton LJ, 3rd, Harris T, Borrud L, Shepherd J, McGowan J: Age, gender, and race/ethnic differences in total body and subregional bone density. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2009, 20(7):1141-1149.
 146. Blunt BA, Klauber MR, Barrett-Connor EL, Edelstein SL: Sex differences in bone mineral density in 1653 men and women in the sixth through tenth decades of life: the Rancho Bernardo Study. *J Bone Miner Res* 1994, 9(9):1333-1338.
 147. Wu XP, Yang YH, Zhang H, Yuan LQ, Luo XH, Cao XZ, Liao EY: Gender differences in bone density at different skeletal sites of acquisition with age in

- Chinese children and adolescents. *Journal of bone and mineral metabolism* 2005, 23(3):253-260.
148. Thomas CD, Mayhew PM, Power J, Poole KE, Loveridge N, Clement JG, Burgoyne CJ, Reeve J: Femoral neck trabecular bone: loss with aging and role in preventing fracture. *J Bone Miner Res* 2009, 24(11):1808-1818.
 149. Cauley JA: Estrogen and bone health in men and women. *Steroids* 2015, 99(Pt A):11-15.
 150. Khosla S, Melton LJ, 3rd, Riggs BL: Osteoporosis: gender differences and similarities. *Lupus* 1999, 8(5):393-396.
 151. Haentjens P, Magaziner J, Colon-Emeric CS, Vanderschueren D, Milisen K, Velkeniers B, Boonen S: Meta-analysis: excess mortality after hip fracture among older women and men. *Annals of internal medicine* 2010, 152(6):380-390.
 152. Kannegaard PN, van der Mark S, Eiken P, Abrahamsen B: Excess mortality in men compared with women following a hip fracture. National analysis of comedications, comorbidity and survival. *Age and ageing* 2010, 39(2):203-209.
 153. Forsen L, Sogaard AJ, Meyer HE, Edna T, Kopjar B: Survival after hip fracture: short- and long-term excess mortality according to age and gender. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 1999, 10(1):73-78.
 154. Dell RM, Greene D, Anderson D, Williams K: Osteoporosis disease management: What every orthopaedic surgeon should know. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 2009, 91 Suppl 6:79-86.
 155. Cawthon PM: Gender Differences in Osteoporosis and Fractures. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2011, 469(7):1900-1905.
 156. Dy CJ, Lamont LE, Ton QV, Lane JM: Sex and gender considerations in male patients with osteoporosis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 2011, 469(7):1906-1912.
 157. Kiebzak GM, Beinart GA, Perser K, Ambrose CG, Siff SJ, Heggeness MH: Undertreatment of osteoporosis in men with hip fracture. *Archives of internal medicine* 2002, 162(19):2217-2222.
 158. Alswat K, Adler SM: Gender differences in osteoporosis screening: retrospective analysis. *Arch Osteoporos* 2012, 7:311-313.

159. Otmar R, Henry MJ, Kotowicz MA, Nicholson GC, Korn S, Pasco JA: Patterns of treatment in Australian men following fracture. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2011, 22(1):249-254.
160. Greene D, Dell RM: Outcomes of an osteoporosis disease-management program managed by nurse practitioners. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners* 2010, 22(6):326-329.
161. Skedros JG, Holyoak JD, Pitts TC: Knowledge and opinions of orthopaedic surgeons concerning medical evaluation and treatment of patients with osteoporotic fracture. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 2006, 88(1):18-24.
162. Amrein K, Amrein S, Drexler C, Dimai HP, Dobnig H, Pfeifer K, Tomaschitz A, Pieber TR, Fahrleitner-Pammer A: Sclerostin and its association with physical activity, age, gender, body composition, and bone mineral content in healthy adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2012, 97(1):148-154.
163. Dovjak P, Dorfer S, Fogger-Samwald U, Kudlacek S, Marculescu R, Pietschmann P: Serum levels of sclerostin and dickkopf-1: effects of age, gender and fracture status. *Gerontology* 2014, 60(6):493-501.
164. Bonewald LF, Johnson ML: Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone* 2008, 42(4):606-615.
165. Moustafa A, Sugiyama T, Prasad J, Zaman G, Gross TS, Lanyon LE, Price JS: Mechanical loading-related changes in osteocyte sclerostin expression in mice are more closely associated with the subsequent osteogenic response than the peak strains engendered. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2012, 23(4):1225-1234.
166. Sapir-Koren R, Livshits G: Osteocyte control of bone remodeling: is sclerostin a key molecular coordinator of the balanced bone resorption-formation cycles? *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2014, 25(12):2685-2700.

167. Tu X, Rhee Y, Condon KW, Bivi N, Allen MR, Dwyer D, Stolina M, Turner CH, Robling AG, Plotkin LI *et al*: Sost downregulation and local Wnt signaling are required for the osteogenic response to mechanical loading. *Bone* 2012, 50(1):209-217.
168. Aido M, Kerschitzki M, Hoerth R, Checa S, Spevak L, Boskey AL, Fratzl P, Duda GN, Wagermaier W, Willie BM: Effect of in vivo loading on bone composition varies with animal age. *Experimental gerontology* 2015, 63:48-58.
169. Birkhold AI, Razi H, Duda GN, Weinkamer R, Checa S, Willie BM: Mineralizing surface is the main target of mechanical stimulation independent of age: 3D dynamic in vivo morphometry. *Bone* 2014, 66:15-25.
170. Holguin N, Brodt MD, Sanchez ME, Silva MJ: Aging diminishes lamellar and woven bone formation induced by tibial compression in adult C57BL/6. *Bone* 2014, 65:83-91.
171. Lynch ME, Main RP, Xu Q, Schmicker TL, Schaffler MB, Wright TM, van der Meulen MC: Tibial compression is anabolic in the adult mouse skeleton despite reduced responsiveness with aging. *Bone* 2011, 49(3):439-446.
172. Furrer R, van Schoor NM, de Haan A, Lips P, de Jongh RT: Gender-specific associations between physical functioning, bone quality, and fracture risk in older people. *Calcified tissue international* 2014, 94(5):522-530.
173. van Bezooijen R PS, Hamdy N, Löwik C. : SOST/Sclerostin: An osteocyte-derived inhibitor of bone formation that antagonizes Wnt Signaling. In: Bilezikian J, Raisz L, Martin T, editors. *Principles of Bone Biology*. New York: Elsevier; 2008, p. 139-152.
174. Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB, Feng JQ, Bonewald LF, Kneissel M: Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Molecular and cellular biology* 2010, 30(12):3071-3085.
175. Sawakami K, Robling AG, Ai M, Pitner ND, Liu D, Warden SJ, Li J, Maye P, Rowe DW, Duncan RL *et al*: 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* 2006, 281(33):23698-23711.
176. Saxon LK, Jackson BF, Sugiyama T, Lanyon LE, Price JS: Analysis of multiple bone responses to graded strains above functional levels, and to disuse, in mice

- in vivo show that the human Lrp5 G171V High Bone Mass mutation increases the osteogenic response to loading but that lack of Lrp5 activity reduces it. *Bone* 2011, 49(2):184-193.
177. Morse A, McDonald MM, Kelly NH, Melville KM, Schindeler A, Kramer I, Kneissel M, van der Meulen MC, Little DG: Mechanical load increases in bone formation via a sclerostin-independent pathway. *J Bone Miner Res* 2014, 29(11):2456-2467.
 178. De Souza RL, Matsuura M, Eckstein F, Rawlinson SC, Lanyon LE, Pitsillides AA: Non-invasive axial loading of mouse tibiae increases cortical bone formation and modifies trabecular organization: a new model to study cortical and cancellous compartments in a single loaded element. *Bone* 2005, 37(6):810-818.
 179. Willie BM, Birkhold AI, Razi H, Thiele T, Aido M, Kruck B, Schill A, Checa S, Main RP, Duda GN: Diminished response to in vivo mechanical loading in trabecular and not cortical bone in adulthood of female C57Bl/6 mice coincides with a reduction in deformation to load. *Bone* 2013, 55(2):335-346.
 180. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Müller R: Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *J Bone Miner Res* 2010, 25(7):1468-1486.
 181. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM: Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 2013, 28(1):2-17.
 182. Price JS, Sugiyama T, Galea GL, Meakin LB, Sunter A, Lanyon LE: Role of endocrine and paracrine factors in the adaptation of bone to mechanical loading. *Current osteoporosis reports* 2011, 9(2):76-82.
 183. Zaman G, Saxon LK, Sunter A, Hilton H, Underhill P, Williams D, Price JS, Lanyon LE: Loading-related regulation of gene expression in bone in the contexts of estrogen deficiency, lack of estrogen receptor alpha and disuse. *Bone* 2010, 46(3):628-642.
 184. Mosley JR, Lanyon LE: Growth rate rather than gender determines the size of the adaptive response of the growing skeleton to mechanical strain. *Bone* 2002, 30(1):314-319.

185. Lynch ME, Main RP, Xu Q, Walsh DJ, Schaffler MB, Wright TM, van der Meulen MC: Cancellous bone adaptation to tibial compression is not sex dependent in growing mice. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)* 2010, 109(3):685-691.
186. Razi H, Birkhold AI, Zaslansky P, Weinkamer R, Duda GN, Willie BM, Checa S: Skeletal maturity leads to a reduction in the strain magnitudes induced within the bone: a murine tibia study. *Acta biomaterialia* 2015, 13:301-310.
187. Birkhold AI, Razi H, Duda GN, Weinkamer R, Checa S, Willie BM: The influence of age on adaptive bone formation and bone resorption. *Biomaterials* 2014, 35(34):9290-9301.
188. Meakin LB, Sugiyama T, Galea GL, Browne WJ, Lanyon LE, Price JS: Male mice housed in groups engage in frequent fighting and show a lower response to additional bone loading than females or individually housed males that do not fight. *Bone* 2013, 54(1):113-117.
189. Melville KM, Robling AG, van der Meulen MC: In vivo axial loading of the mouse tibia. *Methods Mol Biol* 2015, 1226:99-115.
190. Tamminen IS, Isaksson H, Aula AS, Honkanen E, Jurvelin JS, Kroger H: Reproducibility and agreement of micro-CT and histomorphometry in human trabecular bone with different metabolic status. *Journal of bone and mineral metabolism* 2011, 29(4):442-448.
191. Bonnet N, Standley KN, Bianchi EN, Stadelmann V, Foti M, Conway SJ, Ferrari SL: The Matricellular Protein Periostin Is Required for Sost Inhibition and the Anabolic Response to Mechanical Loading and Physical Activity. *The Journal of biological chemistry* 2009, 284(51):35939-35950.
192. Spatz JM, Ellman R, Cloutier AM, Louis L, van Vliet M, Suva LJ, Dwyer D, Stolina M, Ke HZ, Bouxsein ML: Sclerostin Antibody Inhibits Skeletal Deterioration Due to Reduced Mechanical Loading. *J Bone Miner Res* 2013, 28(4):865-874.
193. Li X, Ominsky MS, Warmington KS, Morony S, Gong J, Cao J, Gao Y, Shalhoub V, Tipton B, Haldankar R *et al*: Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res* 2009, 24(4):578-588.

194. Cui L, Cheng H, Song C, Li C, Simonet WS, Ke HZ, Li G: Time-dependent effects of sclerostin antibody on a mouse fracture healing model. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* 2013, 13(2):178-184.
195. Suen PK, He YX, Chow DH, Huang L, Li C, Ke HZ, Ominsky MS, Qin L: Sclerostin monoclonal antibody enhanced bone fracture healing in an open osteotomy model in rats. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2014, 32(8):997-1005.
196. Sarahrudi K, Thomas A, Albrecht C, Aharinejad S: Strongly enhanced levels of sclerostin during human fracture healing. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2012, 30(10):1549-1555.
197. Liu S, Viridi AS, Sena K, Sumner DR: Sclerostin antibody prevents particle-induced implant loosening by stimulating bone formation and inhibiting bone resorption in a rat model. *Arthritis and rheumatism* 2012, 64(12):4012-4020.
198. Viridi AS, Irish J, Sena K, Liu M, Ke HZ, McNulty MA, Sumner DR: Sclerostin antibody treatment improves implant fixation in a model of severe osteoporosis. *The Journal of bone and joint surgery American volume* 2015, 97(2):133-140.
199. Roschger A, Roschger P, Keplingter P, Klaushofer K, Abdullah S, Kneissel M, Rauch F: Effect of sclerostin antibody treatment in a mouse model of severe osteogenesis imperfecta. *Bone* 2014, 66:182-188.
200. Sinder BP, Eddy MM, Ominsky MS, Caird MS, Marini JC, Kozloff KM: Sclerostin antibody improves skeletal parameters in a *Brtl/+* mouse model of osteogenesis imperfecta. *J Bone Miner Res* 2013, 28(1):73-80.
201. Chen XX, Baum W, Dwyer D, Stock M, Schwabe K, Ke HZ, Stolina M, Schett G, Bozec A: Sclerostin inhibition reverses systemic, periarticular and local bone loss in arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* 2013, 72(10):1732-1736.
202. Roudier M, Li X, Niu QT, Pacheco E, Pretorius JK, Graham K, Yoon BR, Gong J, Warmington K, Ke HZ *et al*: Sclerostin is expressed in articular cartilage but loss or inhibition does not affect cartilage remodeling during aging or following mechanical injury. *Arthritis and rheumatism* 2013, 65(3):721-731.
203. Chen H, Xu X, Liu M, Zhang W, Ke HZ, Qin A, Tang T, Lu E: Sclerostin antibody treatment causes greater alveolar crest height and bone mass in an ovariectomized rat model of localized periodontitis. *Bone* 2015, 76:141-148.

204. Taut AD, Jin Q, Chung JH, Galindo-Moreno P, Yi ES, Sugai JV, Ke HZ, Liu M, Giannobile WV: Sclerostin antibody stimulates bone regeneration after experimental periodontitis. *J Bone Miner Res* 2013, 28(11):2347-2356.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Alexander Büttner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Alters- und geschlechterspezifische Effekte von mechanischer Belastung auf den durch das SOST-Gen regulierten Knochenumbau selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Alexander Büttner hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Yang H, Büttner A, Pflanz D, Albiol L, Birkhold A, Thiele T, Kramer I, Kneissel M, Duda GN, Kornak U, Checa S, Willie BM, Bone (re)modeling Response To Mechanical Loading In Sost Deficient Mice Is Age And Gender Dependent, Transactions of the 63rd Annual Meeting of the Orthopedic Research Society, Poster presentation, San Diego, CA, 2017.

Durchführung des Tierexperimentes am männlichen Mausmodell, initiale Auswertung der erhobenen Micro-CT-Daten und Korrekturlesung des Posters.

Lebenslauf

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

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

Publikationsliste

1. Yang H, Büttner A, Pflanz D, Albiol L, Birkhold A, Thiele T, Kramer I, Kneissel M, Duda GN, Kornak U, Checa S, Willie BM, Bone (re)modeling Response To Mechanical Loading In Sost Deficient Mice Is Age And Gender Dependent, Transactions of the 63rd Annual Meeting of the Orthopedic Research Society, Poster presentation, San Diego, CA, 2017.

Danksagung

Mein Dank gilt all den Personen, die mich während der Bearbeitung meiner Dissertation unterstützt haben. Zum einen den Menschen, die mich wissenschaftlich betreut und mir stets mit Rat und Tat beistanden. Besonderer Dank gilt diesbezüglich Bettina Willie und Tobias Thiele, aber auch dem ganzen Team des Julius-Wolff-Institutes. Gleichzeitig möchte ich aber auch meiner Familie und meinen Freunden danken, die mich auf dem langen Weg meiner Dissertation sowohl moralisch als auch fachlich unterstützten und die Vollendung dieser Arbeit überhaupt ermöglichten.