

Aus dem Julius Wolff Institut
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Behandlung mit Sclerostin-neutralisierenden Antikörpern
fördert die Knochenbildung, kann jedoch eine mechanisch
bedingte Heilungsverzögerung nicht ausgleichen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Bettina Verena Kruck

aus Berlin

Datum der Promotion: 06.03.2020

Inhaltsverzeichnis

Abstract	3
Zusammenfassung	4
1. Einleitung	5
2. Methoden	6
2.1 Tierversuche	6
2.2 <i>In vivo</i> mikro-Computertomographie zur Untersuchung mineralisierte Gewebebildung und Gewebedichte	7
2.3 Histomorphometrie zur Gewebedifferenzierung	7
2.4 Immunhistochemie	7
2.5 Genexpression	8
2.6 Biomechanische Testung	8
2.7 Statistische Analysen	8
3. Ergebnisse	9
3.1 SclAb-Behandlung beschleunigt zwar die Knochenbildung, verbesserte jedoch nicht das Heilungsergebnis	9
3.2 Die Sost- und Sclerostin-Expression war in den Gruppen mit SclAb-Behandlung im Vergleich zur Placebo-Behandlung erhöht.	12
3.3 Die Frakturstabilisierung durch eine steife Fixierung führt zu einer besseren Heilung	15
4. Diskussion	16
5. Literaturverzeichnis	20
6. Abkürzungsverzeichnis	24
7. Eidesstattliche Erklärung	25
8. Auszug aus der Journal Summary List	26
9. Publikation	27
10. Lebenslauf	39
11. Publikationsliste	40
12. Danksagung	41

Abstract

During bone healing, tissue formation processes are governed by mechanical strain. *Sost*/sclerostin, a key Wnt signaling inhibitor and mechano-sensitive pathway, is downregulated in response to mechanical loading. Sclerostin neutralizing antibody (SclAb) increases bone formation. Nevertheless, it remains unclear whether sclerostin inhibition can rescue bone healing in situations of mechanical instability, which otherwise delay healing. We investigated SclAb's influence on tissue formation in a mouse femoral osteotomy, stabilized with Rigid or Semi-rigid external fixation. The different fixations allowed different magnitudes of interfragmentary movement during weight bearing, thereby influencing healing outcome. SclAb or vehicle (Veh) was administered and bone healing was assessed at multiple time points up to day 21 post-operatively by *in vivo* micro computed tomography, histomorphometry, biomechanical testing, immunohistochemistry and gene expression. Our results show that SclAb treatment caused a greater bone volume than veh. However, SclAb could not overcome the characteristic delayed healing of semi-rigid fixation. Indeed, semi-rigid fixation resulted in delayed healing with a prolonged endochondral ossification phase characterized by increased cartilage, lower bone volume fraction, and less bony bridging across the osteotomy gap than rigid fixation. In a control setting, SclAb negatively affected later stages of healing under rigid fixation, evidenced by the high degree of endosteal bridging at 21 days in the rigid-SclAb group compared to rigid-veh, indicating delayed fracture callus remodeling and bone marrow reconstitution. Under rigid fixation, *Sost* and sclerostin expression at the gene and protein level, respectively, were increased in SclAb compared to veh-treated bones, suggesting a negative feedback mechanism. Our results suggest that SclAb could be used to enhance overall bone mass but should be carefully considered in bone healing. SclAb may help to increase bone formation early in the healing process, but not during advanced stages of fracture callus remodeling and not to overcome delayed healing in semi-rigid fixation.

Zusammenfassung

Während der Knochenheilung werden die Prozesse der Gewebebildung durch mechanische Belastung reguliert. Das Protein Sclerostin ist ein zentraler Hemmstoff des Wnt-Signalwegs und hat dadurch direkten Einfluss auf die Knochenbildung. Durch mechanische Belastung wird die Expression des Sost-Gens, das für Sclerostin codiert, herabgesetzt. Sclerostin-neutralisierende Antikörper (SclAb) erhöhen damit die Knochenbildung. Es ist jedoch noch unklar, ob eine Sclerostin-Hemmung eine mechanische Instabilität während der Knochenheilung, die sonst eine verzögerte Heilung zur Folge hätte, ausgleichen kann.

Wir untersuchten den Einfluss von SclAb auf die Gewebebildung bei Mäusen nach Durchführung einer femoralen Osteotomie, die entweder durch einen steifen oder semi-steifen externen Fixateur stabilisiert wurde. Die unterschiedlichen Fixateursysteme erlauben verschiedene Ausmaße interfragmentärer Spannung während der Belastung mit Körpergewicht, und haben somit Einfluss auf die Heilungsergebnisse. Den Mäusen wurde der SclAb oder ein Placebo injiziert und die Knochenheilung wurde postoperativ über einen Zeitraum von 21 Tagen und zu verschiedenen Zeitpunkten mittels *in vivo* Mikrocomputertomographie, Histomorphometrie, biomechanischer Testung, Immunhistochemie und Genexpression erfasst. Unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Behandlung mit SclAb zu einem größeren Knochenvolumen führt als das Placebo. Jedoch konnten die Antikörper nicht die typische verzögerte Heilung unter semi-steifer Fixierung verhindern. Die Stabilisierung mittels semi-steifen Fixateuren führte im Vergleich zu den steifen Fixateuren zu einer verzögerten Heilung mit einer verlängerten endochondralen Ossifikationsphase. Diese äußert sich durch mehr Knorpelgewebe, einem niedrigeren Knochenvolumenanteil und weniger knöcherner Brückenbildung über den gesamten Frakturspalt. Des Weiteren hatten die SclAb in der Gruppe mit steifer Fixierung im Vergleich zur semi-steifen Fixierung eine negative Auswirkung auf fortgeschrittene Stadien der Knochenheilung. Dies zeigte sich durch ein hohes Maß an endostaler Brückenbildung nach 21 Tagen und deutet auf einen verzögerten Umbau des Frakturkallus sowie eine verzögerte Wiederherstellung des Knochenmarkraumes hin. Die erhöhte Sost- und Sclerostinexpression in der Gruppe mit steifer Fixierung und SclAb-Behandlung im Vergleich zur Placebo-Behandlung führen wir auf einen negativen Feedback-Mechanismus zurück.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass SclAb verwendet werden können um die Gesamtknochenmasse zu erhöhen, die Anwendung im Falle von Knochenheilung jedoch mit Zurückhaltung in Betracht gezogen werden sollte. SclAb können im frühen Stadium der Knochenheilung zu einer vermehrten Knochenbildung führen, beschleunigen die Heilung in fortgeschrittenen Stadien jedoch nicht, und sie können eine verzögerte Heilung, die durch eine semi-steifen Fixierung hervorgerufen wird, nicht verhindern.

1. Einleitung

In den vergangenen Jahren hat sich das Protein Sclerostin zu einem neuen Behandlungsansatz von Krankheiten wie Osteoporose und verzögerter Frakturheilung entwickelt (1,2). Das Sost-Gen codiert das Protein Sclerostin, das hauptsächlich in Osteozyten aber auch in hypertrophen Chondrozyten exprimiert wird (3,4). Mehrere Studien haben bisher gezeigt, dass die Sost-Expression durch mechanische Belastung vermindert und durch mechanische Entlastung verstärkt wird (5-7). Sclerostin ist dabei ein Inhibitor des kanonischen Wnt-Signalwegs (8,9), der eine zentrale Rolle bei der Erhaltung und der Reparatur von Knochengewebe spielt (10-12). Eine Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalwegs durch mechanische Stimulation steigert die Proliferationsrate und Differenzierung von Osteoblasten (6,13-15), während sie die Aktivität von Osteoklasten negativ beeinflusst und somit die Knochenbildung fördert (16-18). Des Weiteren fördert der Wnt/ β -Catenin-Signalweg die Differenzierung von Osteochondroprogenitor-Zellen zur Zelllinie der Osteoblasten (19), sowie die Hypertrophie von Chondrozyten und die endochondrale Ossifikation (20). Es wurden bereits positive Ergebnisse aus klinischen Studien der Phase II und III publiziert, die Sclerostin-neutralisierende Antikörper (SclAb) bei der Behandlung von postmenopausaler Osteoporose einsetzen (21-23). Es wurde auch eine klinische Studie der Phase II zur Sclerostin-Behandlung bei Frakturheilung durchgeführt (24). Diese Studie wurde jedoch abgebrochen und die erhobenen Studiendaten wurden nicht veröffentlicht (25). Trotzdem sind die Auswirkungen von SclAb auf die Frakturheilung weiterhin von großem Interesse. Verschiedene präklinische Studien zur Frakturheilung kamen bisher zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Auswirkung der SclAb (26-31). Somit bleibt es weiterhin unklar, ob die Antikörper die Knochenheilung nur fördern oder in mechanisch schwierigen Situationen sogar „retten“ können. Eine Behandlung mit SclAb führt im Vergleich zur Placebo-Behandlung zu einem höheren Knochenvolumen im Kallusgewebe (26, 28-34), und weniger Knorpelgewebe (27,28,3,34). Ähnliche Ergebnisse wurden in Studien ermittelt, die Sost-defiziente Mäuse untersuchten (35,36). Auch wenn bekannt ist, dass die Sclerostin-Expression durch mechanische Belastung reguliert wird, gibt es bisher keine Studien, die den Einfluss unterschiedlicher mechanischer Bedingungen auf die Wirksamkeit der SclAb untersucht haben. Es ist weithin anerkannt, dass mechanische Faktoren wie das Ausmaß an interfragmentärer Bewegung (IFB) eine wichtige Rolle in Zusammenhang mit Frakturheilung spielen (37-41). Aufgrund der Schwerkraft, der Anzahl an Belastungszyklen, der Muskelkraft und dem Grad der Fixationssteifheit, die zur Fixierung der Fraktur verwendet wird, wird die IFB durch das Gewicht, mit dem die frakturierte Extremität belastet wird, beeinflusst. Unter ähnlichen Belastungsbedingungen, besitzt der Grad der Fixationssteifheit die einflussreichste Wirkung auf die IFB (38). Bisher veröffentlichte Studien, die den Grad der Fixationssteifheit im Zusammenhang mit Knochenheilung untersucht haben, kamen zu dem Ergebnis, dass eine extrem steife Fixierung die Knochenbildung verhindern kann (39,42). Wohingegen eine zu lockere Fixierung hypertrophe Pseudoarthrosen hervorrufen kann (41,43). Darauf bezugnehmend ist bisher unklar inwiefern veränderte mechanische Bedingungen die Wirksamkeit einer Behandlung mit SclAb beeinflussen, und ob eine Antikörperbehandlung eine durch erhöhte IFB hervorgerufene verzögerte Heilung überwinden kann.

Ziel unserer Studie war es die Auswirkung verschiedener Grade an interfragmentärer Spannung auf die Frakturheilung von Mäusen zu untersuchen, die mit SclAb behandelt wurden. Wir stellten die Hypothese auf, dass SclAb die Knochenheilung fördern, selbst unter mechanisch instabilen Bedingungen, die sonst zu einer verzögerten Heilung führen würden. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde an erwachsenen weiblichen C57BL/6J Mäusen eine femorale Osteotomie durchgeführt, die entweder durch einen steifen oder halb-steifen Fixateur stabilisiert

wurde und über 21 Tage entweder mit SclAB oder einem Placebo behandelt wurden. Die Knochenheilung wurde mittels Histomorphometrie, *in vivo* mikro-Computertomographie (μ CT), Genexpression, Immunhistochemie und mechanische Testung untersucht.

2. Methoden

2.1 Tierversuche

Als Versuchstiere dienten ausgewachsene 26-Wochen-alte weibliche C57BL/6J Mäusen (Charles River Laboratories Germany/ Jackson Laboratory, Sulzfeld, Deutschland) Die Tiere wurden in den Räumen der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin der Charité, Campus Virchow-Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin, untergebracht. An ihrem linken Oberschenkelknochen wurde eine Osteotomie, mit einer Frakturlücke von 0,5mm, durchgeführt. Die Fraktur wurde entweder durch einen steifen oder semi-steifen externen Fixateur stabilisiert (Abb. 1A).

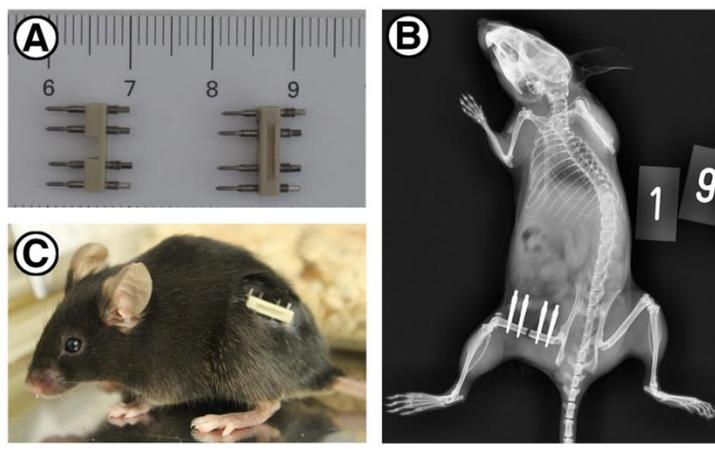


Abb. 1. (A) Die Auswirkung interfragmentärer Bewegung auf die Knochenheilung wurde durch die Verwendung zweier unterschiedlicher externer Fixateure untersucht; steifer Fixateur rechts, semi-steifer Fixateur links. (B) Das postoperative Röntgenbild zeigt die Positionierung des Frakturspalts in Relation zu den Titanpins. (C) Postoperatives Bild einer Maus mit steifem Fixateur

Durch *in vitro* mechanische Testung ist bekannt, dass zwischen den zwei verwendeten Fixateuren ein neunfacher Unterschied in Bezug auf die axiale Steifheit besteht (44,45). Anschließend erhielten die Mäuse eine subkutane Injektion, die entweder den Sclerostin-neutralisierenden Antikörper (Schlag) (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, USA, and UCB, Brüssel, Belgien; 25mg/kgKG) enthielt oder ein Placebo in Form von Kochsalzlösung. Die in unserer Studie verwendete Schlag-Dosierung basierte auf früheren Veröffentlichungen (46). Die Injektionen erfolgten zweimal pro Woche, am 1., 5., 8., 12., 15. und 19. postoperativen Tag. Die Gruppenzuteilung der Mäuse erfolgte randomisiert und nicht verblindet. Es entstanden 4 Gruppen. In zwei Gruppen, wurden die Frakturen mit einem steifen Fixateur versorgt und erhielten jeweils entweder den SclAb (steif-SclAb-Gruppe) oder ein Placebo (steif-Placebo-Gruppe). In den anderen zwei Gruppen wurden die Frakturen mit einem semi-steifen Fixateur versorgt und im Anschluss entweder mit SclAb (semi-steif-SclAb-Gruppe) oder mit einem Placebo (semi-steif-Placebo-Gruppe) behandelt. Wir verwendeten veröffentlichte Daten von Rontgen und Kollegen, um eine ausreichende Anzahl an Studientieren festzulegen (45). Bei einer Gruppe von 43 Mäusen wurden μ CT-Aufnahmen am 3., 7., 14. und 21. postoperativem

Tag (n= 10-12Mäuse/Gruppe) durchgeführt. Im Anschluss an die letzte Aufnahme (postoperativer Tag 21) erfolgten histologische (7-8 Mäuse/Gruppe) und immunhistochemische Untersuchungen (n=7-8 Mäuse/Gruppe). Für die histologischen Analysen wurden weitere 43 Mäuse (n=7-10 Mäuse/Gruppe) am 7. postoperativen Tag und 44 Mäuse am 14. postoperativen Tag (n=7-12 Mäuse/Gruppe) euthanasiert. An weiteren 47 Mäusen (n=9-13 Mäuse/Gruppe) wurde nach dem 21. postoperativen Tag eine biomechanische Testung sowohl an der operierten, als auch an der intakten Extremität durchgeführt. 48 Mäuse wurden an Tag 3, 7 und 14 euthanasiert um qPCR-Messungen durchzuführen (n=3-4 Mäuse/Gruppe/Zeitpunkt). Alle Mäuse wurden mit einer intrakardialen Injektion einer Kaliumchlorid-Lösung unter tiefer Vollnarkose euthanasiert. Aus jeder dieser Gruppen wurden 0 bis 5 Mäuse von der Studie ausgeschlossen. Gründe hierfür waren durch die Anästhesie verursachte Todesfälle während oder im Anschluss an die in vivo μ CT-Aufnahmen, Lockerung eines Fixateur-Pins, unkontrollierte Knochenfraktur, oder Nervenschädigung der operierten Extremität. Die Genehmigung des Tierversuchsvorhabens erteilte das Landesamt für Gesundheit und Soziales, Berlin (unter der Bearbeitungsnummer G0021/11).

2.2 *In vivo* mikro-Computertomographie zur Untersuchung mineralisierte Gewebekonstruktion und Gewebekonstrukte

Die Knochenheilung und das Ausmaß an knöcherner Brückenbildung wurden anhand von 3D in vivo μ CT-Aufnahmen erfasst (41). Unter Narkose wurden die operierten Mäuse in ein speziell angefertigtes Mäusebett gelegt, um Bewegungsartefakte zu begrenzen und eine reproduzierbare Lagerung zu ermöglichen. Die Aufnahmen erfolgten mit einer isotropischen Auflösung von 10,5 μ CT. Metallartefakte kamen in keiner der Aufnahmen vor. Sie wurden durch die Verwendung eines unilateralen Fixateurs verhindert, der aus einem externen Polyetherketongestell und Titanpins zusammengesetzt ist. Die inneren Pins stehen in einem Abstand von 4mm zueinander. Bei einem Frakturspalt von 0,5mm wurde der zu analysierende Bereich auf 1mm festgelegt. Zur Bestimmung der Knochenheilung gehörten Parameter wie das mineralisierte Kallusvolumen (mineralized callus volume, BV, in mm^3), das Gesamtkallusvolumen (total callus volume, TV, in mm^3), der Anteil des mineralisierten Kallusvolumen (BV/TV), die Mineraleichte des Kallusgewebes (bone mineral density, BMD, in $\text{mg Hydroxylapatit (HA)/cm}^3$), und der Mineralgehalt des Kallusgewebes (bone mineral content, BMC, mg), der definiert ist als das Produkt aus $\text{BV} \cdot \text{BMD}$. Um das BMD zu ermitteln wurden nur Voxel verwendet, die eine festgelegte Schwelle überschritten.

2.3 Histomorphometrie zur Gewebekonstruktion

Osteotomierte Oberschenkelknochen wurden entkalkt und in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden sie in 4 μ m-dicke Scheiben geschnitten und anschließend mit Movat Pentachrome gefärbt, um eine qualitative morphologische Untersuchung durchzuführen. Die Zusammensetzung des Kallusgewebes wurde durch qualitative Analysen von Knochen-, Knorpel- und fibrösem Bindegewebe, sowie der Knochenmarksbildung erfasst.

2.4 Immunhistochemie

Mithilfe eines Mikrotoms wurden longitudinale Schnitte der entkalkten, in Paraffin-eingebetteten operierten Oberschenkelknochen angefertigt. Um die Blutgefäßdichte zu quantifizieren wurde ein antihumaner Mausantikörper (1:100; Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark), der an glattmuskuläres α -Actin (α -sma) bindet, verwendet (47). Des Weiteren verwendeten wir

einen primären Antisclerostin-Antikörper (AF140, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA), um die Anzahl Sclerostin-positiver Osteozyten zu ermitteln.

2.5 Genexpression

RT-qPCR wurde an den operierten Oberschenkelknochen durchgeführt, um die Genexpression von Sost (Sclerostin), Wif1 (Wnt inhibitory factor1), Sfrp1 (sezerniertes frizzled related protein 1), Dkk1 (Dickkopf homolog 1), Lef1 (lymphoid enhancer binding factor 1), Axin2, Vegfa (vascular endothelial growth factor A), und vWF (Von Willebrand Faktor homolog) zu erfassen. Knochenmark wurde entnommen und die RNS wurde aus dem Kallusgewebe extrahiert, das sich zwischen den zwei inneren Pins des externen Fixateurs befand. Das Kallusgewebe bestand aus Knochen-, Knorpel- und fibrösem Bindegewebe.

2.6 Biomechanische Testung

Sowohl der operierte, als auch der intakte kontralaterale Oberschenkelknochen wurde in eine Maschine zur mechanischen Testung eingespannt (ElectroForce 3200 Test System, TA Instruments, New Castle, DE, USA) und bis zum Bruch mit einer Torsionsrate von 0,5°/s belastet, mit einer axialen Vorlast von 0,3N. Das maximale Drehmoment, die Torsionssteifheit und die Versagensenergie wurden anhand der Drehmoment-Rotations-Kurve berechnet.

2.7 Statistische Analysen

Alle Daten sind als Mittelwert \pm eine Standardabweichung aufgeführt. Für jeden Zeitpunkt wurden univariate Varianzanalysen (ANOVA) mit Hilfe von SAS 9,4 (Cary, NC, USA), für die beschriebenen abhängigen Variablen durchgeführt und die Haupt- und Interaktionseffekte für Behandlung und Fixateurbeschaffenheit geschätzt. Die statistische Signifikanz wurde auf einen p-Wert $<0,05$ festgelegt. Des Weiteren wurden für alle abhängigen Variablen der Genexpression und der immunhistochemischen Untersuchungen der Sclerostin-Expression paarweise posthoc Einzelvergleiche zwischen den vier Behandlungskombinationen mittels unabhängiger t-Tests durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 SclAb-Behandlung beschleunigt zwar die Knochenbildung, verbesserte jedoch nicht das Heilungsergebnis

In vivo μ CT-Aufnahmen zeigten, dass das mineralisierte Kallusvolumen (BV) und das Verhältnis von mineralisiertem Kallus zum Gesamtkallus (BV/TV) an Tag 14 und 21 signifikant größer in den SclAb-Gruppen als in den Placebo-Gruppen war (Abb.2).

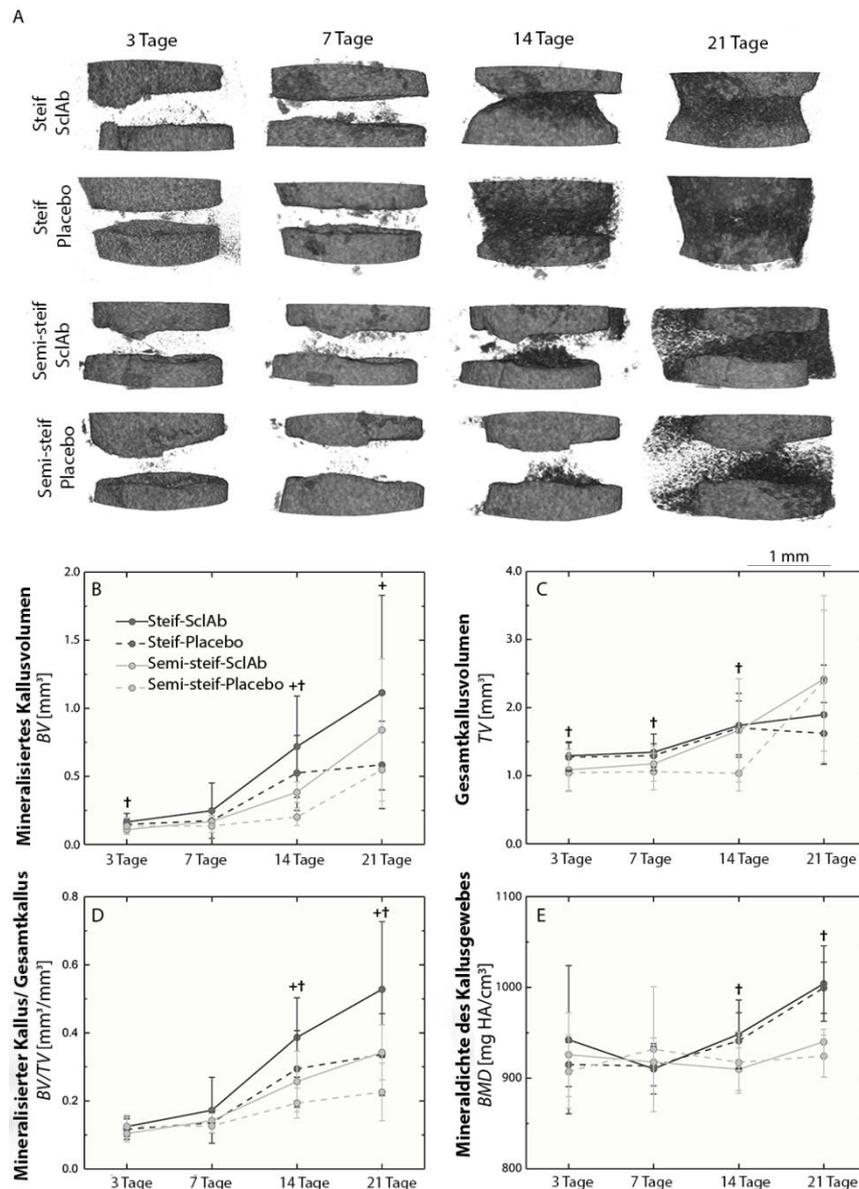


Abb. 2. *In vivo* μ CT-Aufnahmen der Frakturheilung. (A) *In vivo* μ CT-Aufnahmen des Frakturbereichs wurden am 3., 14. und 21. Postoperativen Tag durchgeführt. Die *in vivo* μ CT-Aufnahmen zeigen mineralisiertes Gewebe über den gesamten Fraktur-spalt an Tag 14 und 21 in den Gruppen mit steifem Fixateur. Die μ CT-Aufnahmen wurden dazu verwendet, um die Menge an mineralisiertem Gewebe innerhalb des Frakturkallus zu quantifizieren und folgende Parameter zu bestimmen:

(B) mineralisiertes Kallusvolumen (oder Knochen-volumen (bone volume), BV)(C) gesamtes Kallusvolumen (oder Gesamtvolumen (total volume), TV), (D) Anteil des mineralisierten Kallusvolumens am Gesamtvolumen (BV/TV), und (E) Mineraldichte des Kallusgewebes (callus tissue mineral density, BMD). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm SD angegeben. ANOVA: +Behandlung, †Fixierung, #Interaktion, $p < 0.05$.

Die Blutgefäßdichte war in den SclAb-Gruppen an Tag 14 signifikant größer als in den Placebogruppen (Abb. 3). Knöchernen Brückenbildung an der Frakturstelle, die auf einen fortgeschrittenen Umbauprozess hindeutet, wurde mithilfe von 3D- μ CT-Aufnahmen erfasst (Tabelle 1). Prozentual war der Anteil intrakortikaler und periostaler Brückenbildung in der steifen-SclAb-Gruppe an Tag 14 größer als in der Placebo-Gruppe. An Tag 21 hatten die steif-

ScIAb-Gruppe und die steif-Placebo-Gruppe einen ähnlichen Prozentsatz an kortikaler und/oder periostaler Brückenbildung (Tabelle 1).

Tabelle 1: Totale Kallusfläche, Knochenfläche, Knorpelfläche, Bindegewebsfläche, Knochenmarksfläche, Prozentsatz periostaler/intrakortikaler Brückenbildung und Prozentsatz endostaler Brückenbildung

Region/Parameter	Steif, ScIAb	Steif, Placebo	Semit-steif, ScIAb	Semit-steif, Placebo
<i>7d</i>	n=7	n=7	n=10	n=9
Gesamtkallusfläche (mm ²)+†	1,647 ± 0,160	1,383 ± 0,265	1,893 ± 0,307	1,571 ± 0,289
Knochenfläche (mm ²)	0,053 ± 0,034	0,041 ± 0,037	0,063 ± 0,040	0,051 ± 0,075
Knorpelfläche (mm ²)+†#	0,001 ± 0,004	0 ± 0	0,054 ± 0,042	0,006 ± 0,007
Bindegewebsfläche (mm ²)+†	1,457 ± 0,159	1,183 ± 0,227	1,760 ± 0,290	1,508 ± 0,323
Knochenmarksfläche (mm ²)†	0,136 ± 0,099	0,159 ± 0,107	0,016 ± 0,032	0,007 ± 0,011
Gesamte Brückenbildung in % (peri+intraortikal)	0%	0%	0%	0%
<i>14d</i>	n=8	n=7	n=10	n=12
Gesamtkallusfläche (mm ²)†	1,643 ± 0,123	1,483 ± 0,172	2,061 ± 0,316	2,086 ± 0,519
Knochenfläche (mm ²)†#	0,430 ± 0,118	0,271 ± 0,150	0,144 ± 0,083	0,208 ± 0,121
Knorpelfläche (mm ²)†	0,076 ± 0,109	0,054 ± 0,053	0,356 ± 0,372	0,282 ± 0,318
Bindegewebsfläche (mm ²)†	0,825 ± 0,182	0,850 ± 0,291	1,555 ± 0,269	1,592 ± 0,295
Knochenmarksfläche (mm ²)†	0,311 ± 0,243	0,307 ± 0,159	0,006 ± 0,013	0,004 ± 0,007
Gesamte Brückenbildung in % (peri+intraortikal)	63%	43%	3%	8%
Anzahl Brückenbildung†	2,5 ± 0,76	1,71 ± 1,50	0,1 ± 0,32	0,1 ± 0,32
Endostale Brückenbildung	75%	57%	10%	8%
<i>21d</i>	n=7	n=8	n=7	n=7
Gesamtkallusfläche (mm ²)†	1,656 ± 0,299	1,553 ± 0,188	1,866 ± 0,149	1,877 ± 0,135
Knochenfläche (mm ²)†	0,486 ± 0,217	0,245 ± 0,133	0,277 ± 0,120	0,217 ± 0,114
Knorpelfläche (mm ²)†	0,003 ± 0,008	0,010 ± 0,024	0,051 ± 0,086	0,214 ± 0,270
Bindegewebsfläche (mm ²)†	0,826 ± 0,294	0,933 ± 0,394	1,514 ± 0,182	0,1,394 ± 0,237
Knochenmarksfläche (mm ²)†	0,341 ± 0,180	0,365 ± 0,304	0,023 ± 0,022	0,051 ± 0,060
Gesamte Brückenbildung in % (peri+intraortikal)	46%	44%	4%	14%
Anzahl Brückenbildung†	1,86 ± 1,21	1,75 ± 1,58	0,14 ± 0,38	0,57 ± 0,53
Endostale Brückenbildung	71%	37%	0%	29%

Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SD angegeben.

+ Between-subject Behandlungseffekte, ANOVA, p= 0.05.

† Between-subject Fixierungseffekte, ANOVA, p= 0.05.

Interaktion zwischen Behandlung und Fixierung ANOVA, p= 0.05

Die histologischen Auswertungen bestätigten ein signifikant größeren Anteil an Knochengewebe in den ScIAb-Gruppen, im Vergleich zu den Placebo-Gruppen an Tag 21; dabei war die Knochenfläche in der steif-ScIAb-Gruppe um 98% größer als in der steif-Placebo-Gruppe. In der semi-steif-ScIAb-Gruppe war der Anteil um 27% größer als in der semi-steif-Placebo-Gruppe (Abb. 4, Tabelle 1). In späteren Heilungsstadien steht die endostale Brückenbildung nicht mehr für einen fortgeschrittenen Heilungsprozess. Dieser würde sich durch ein Fehlen endostaler Brückenbildung zeigen, und durch die Resorption des endostalen Kallus zusammen mit der Wiederausbildung des Knochenmarkraumes. Nach 14 Tagen trat bei

75% der steif-SclAb-Gruppe die endostale Brückenbildung auf, im Vergleich zu 57% in der steif-Placebo-Gruppe. Nach 21 Tagen war in der steif-SclAb-Gruppe die endostale Brückenbildung um 4% zurückgegangen, wohingegen sie in der steif-Placebo-Gruppe um 20% abgefallen war. Nach 21 Tagen war die Torsionssteifheit der osteotomierten Oberschenkelknochen in den Placebo-Gruppen größer als in den Gruppen, die mit SclAb behandelt wurden. Jedoch muss bei der Auswertung dieser Werte berücksichtigt werden, dass zum Zeitpunkt der Testung die operierte Extremität von einigen Mäusen nicht ausreichend geheilt war. Die mechanische Testung der intakten Oberschenkelknochen zeigte ein signifikant höheres maximales Drehmoment sowie höhere Steifheit und Versagensenergie in den mit SclAb-behandelten Gruppen als in den Placebo-Gruppen. In späteren Heilungsstadien steht die endostale Brückenbildung nicht mehr für einen fortgeschrittenen Heilungsprozess. Dieser würde sich durch ein Fehlen endostaler Brückenbildung zeigen, und durch die Resorption des endostalen Kallus zusammen mit der Wiederausbildung des Knochenmarkraumes. Nach 14 Tagen trat bei 75% der steif-SclAb-Gruppe die endostale Brückenbildung auf, im Vergleich zu 57% in der steif-Placebo-Gruppe. Nach 21 Tagen war in der steif-SclAb-Gruppe die endostale Brückenbildung um 4% zurückgegangen, wohingegen sie in der steif-Placebo-Gruppe um 20% abgefallen war. Nach 21 Tagen war die Torsionssteifheit der osteotomierten Oberschenkelknochen in den Placebo-Gruppen größer als in den Gruppen, die mit SclAb behandelt wurden. Jedoch muss bei der Auswertung dieser Werte berücksichtigt werden, dass zum Zeitpunkt der Testung die operierte Extremität von einigen Mäusen nicht ausreichend geheilt war. Die mechanische Testung der intakten Oberschenkelknochen zeigte ein signifikant höheres maximales Drehmoment sowie höhere Steifheit und Versagensenergie in den mit SclAb behandelten Gruppen als in den Placebo-Gruppen.

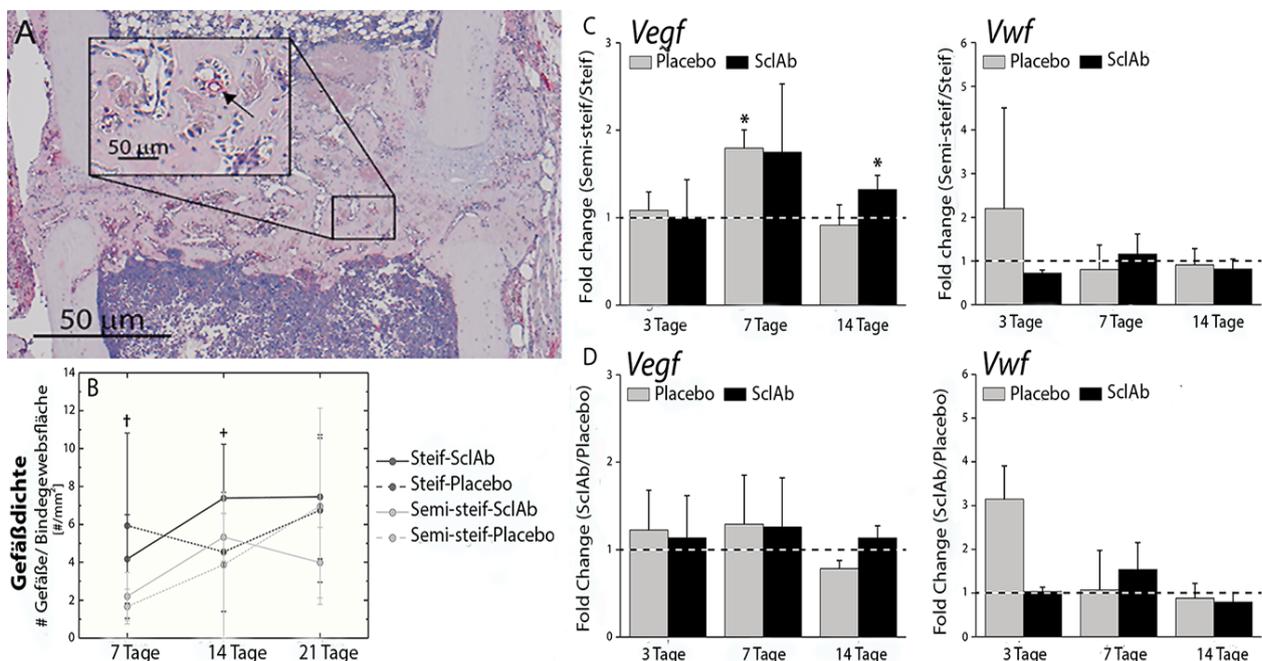


Abb. 3. Blutgefäßdichte und Genexpression. (A,B) Die Blutgefäßdichte innerhalb des Frakturkallus wurde am 7., 14. und 21. postoperativen Tag mithilfe immunhistochemischer Färbung von histologischen Schnitten gemessen (der Pfeil zeigt auf ein Blutgefäß). ANOVA: + Behandlung, † Fixierung, # Interaktion, $p < 0.05$. (C) Veränderte Genexpression vom semi-steifen Fixateur zum steifen Fixateur. Der Asteriskus steht für einen signifikanten Unterschied zwischen der semi-steifen und steifen Fixierung zum jeweiligen Zeitpunkt. (D). Veränderte Genexpression von der SclAb-Behandlung zur Placebo-Behandlung.

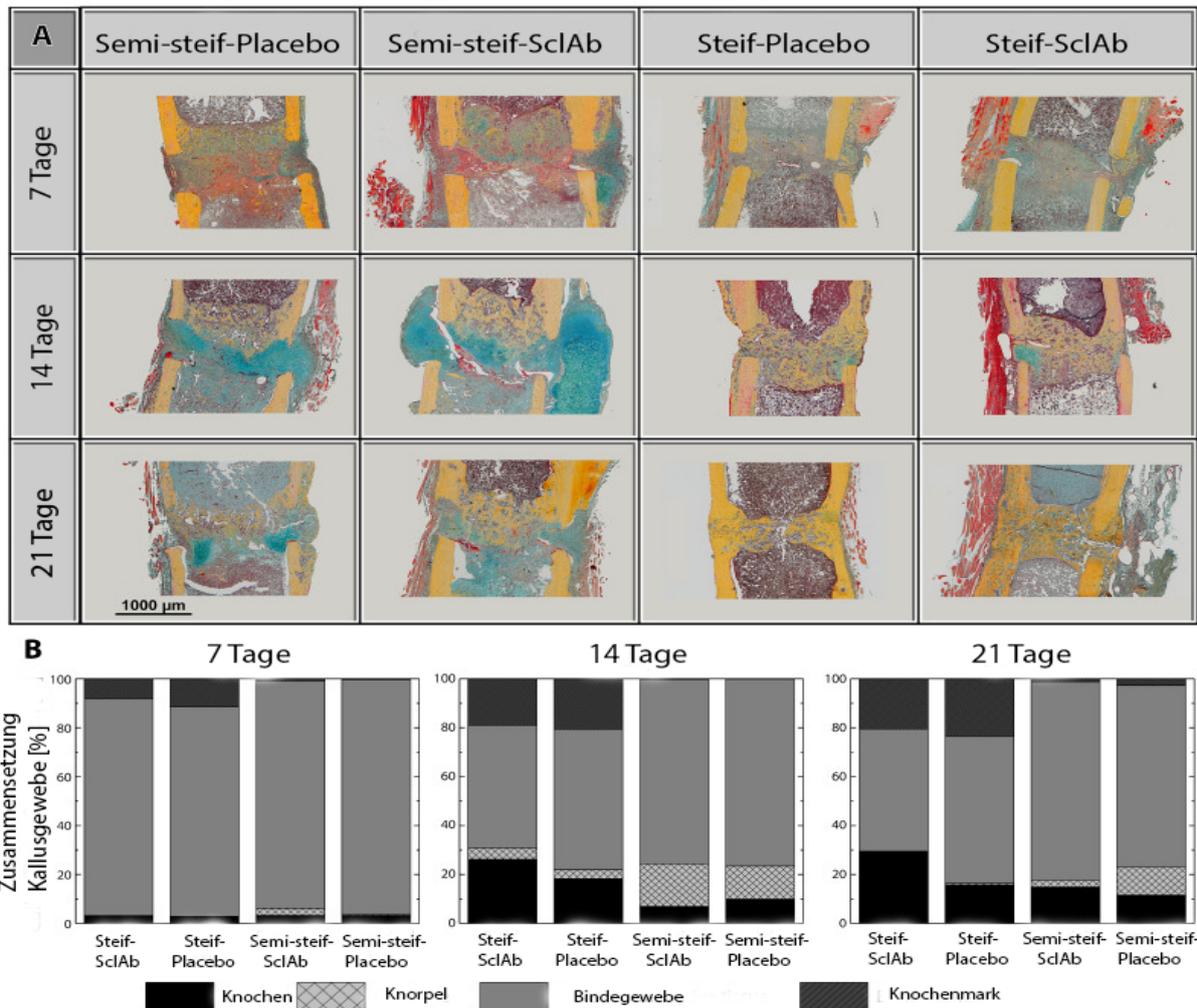


Abb. 4. Histologische Färbung zur Gewebedifferenzierung im Frakturkallus. (A) Histologische Schnittpräparate des Frakturkallus wurden mit Movat Pentachrom gefärbt, um Knochen (gelb), Knorpel (grün), Bindegewebe (grau-grün) und Knochenmark (violett) zu unterscheiden. (B) Der Flächenanteil von Knochen, Knorpel, Bindegewebe im Frakturkallus am 7., 14. und 21. postoperativen Tag, gemessen anhand der mit Movat Pentachrom gefärbten histologischen Schnitte.

3.2 Die Sost- und Sclerostin-Expression war in den Gruppen mit SclAb-Behandlung im Vergleich zur Placebo-Behandlung erhöht.

Die immunohistochemische Anti-Sclerostin-Antikörper-Färbung zeigte eine signifikante Wirkung der SclAb-Therapie nach 7 und 14 Tagen. In den steif-SclAb-Gruppen wurden im Vergleich zu der steif-Placebo-Gruppe an diesen Tagen mehr Sclerostin positive Osteozyten gezählt (Abb. 5A, B) Ähnliche Ergebnisse zeigten sich im Fall der Genexpression von Sost. Diese war nach 7 Tagen deutlich erhöht in der steif-SclAb-Gruppe im Vergleich zu der steif-Placebo-Gruppe (Abb. 5C). Im Vergleich der SclAb- und der Placebo-Behandlung wurden keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Genexpression der Wnt-Antagonisten (Wif1, Dkk1 und Sfrp1) oder der Wnt-Zielgene (Axin2 und Lef1) gefunden (Abb. 6).

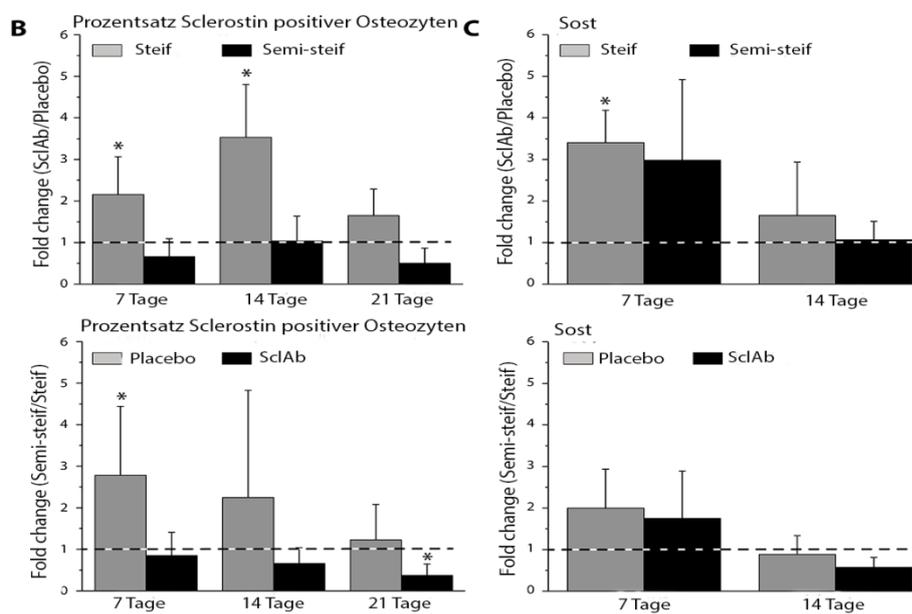
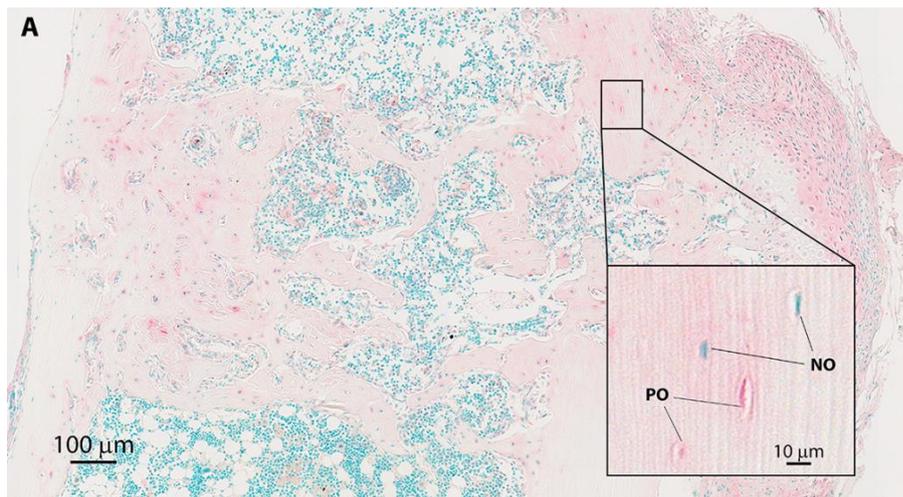


Abb.5. Sclerostinimmunohistochemie und Genexpression.

(A) Die Anzahl auf Sclerostin positiv gefärbter Osteozyten (PO) und negativ gefärbter Osteozyten (NO) wurde im Bereich des Frakturspalts quantifiziert.

(B) Veränderung des prozentualen Anteils Sclerostin positiver Osteozyten von SclAb Behandlung zur Placebo-Behandlung sowie von semi-steifem Fixateur zum steifen Fixateur. (C) Veränderte Sost-Expression von der SclAb- zur Placebo-Behandlung sowie vom semi-steifen Fixateur zum steifen Fixateur. Der Asteriskus steht für einen signifikanten Unterschied zwischen der semi-steifen und steifen Fixierung oder zwischen der SclAb- und der Placebo-Behandlung zum jeweiligen Zeitpunkt.

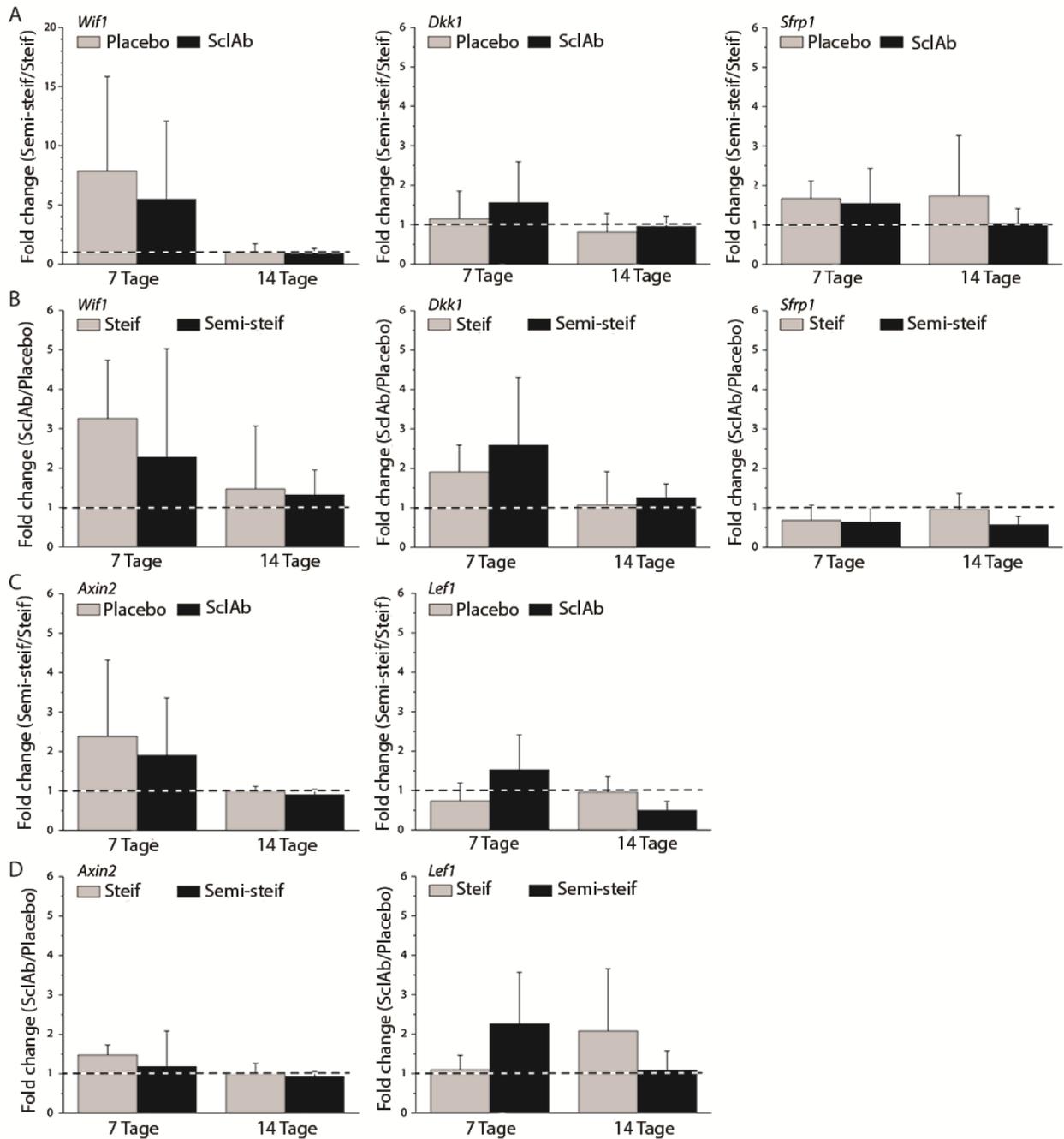


Abb. 6. Genexpression von Wnt-Inhibitoren und Zielgenen. Die Genexpression wurde im operierten Oberschenkelknochen am 7. und 14. postoperativen Tag gemessen. (A) Veränderte Genexpression von Wnt-Inhibitoren (*Wif1*, *Dkk1*, and *Sfrp1*) vom semi-steifen Fixateur zum steifen Fixateur. (B) Veränderte Genexpression von Wnt-Inhibitoren von der SclAb Behandlung zur Placebo-Behandlung. (C) Veränderte Genexpression von Zielgenen des Wnt-Signalwegs (*Axin2*, and *Lef1*) vom semi-steifen Fixateur zum steifen Fixateur. (D) Veränderte Genexpression von Zielgenen des Wnt-Signalwegs von der SclAb Behandlung zur Placebo-Behandlung. Es wurden keine signifikanten Unterschiede festgestellt.

3.3 Die Frakturstabilisierung durch eine steife Fixierung führt zu einer besseren Heilung

Unabhängig von einer Behandlung mit SclAb oder Placebo, zeigten die histologischen Untersuchungen, dass die Knochenfläche und die Knochenmarksfläche an Tag 14 und 21 in den Gruppen mit steifem Fixateur signifikant höher waren als in denen, die mit einem semi-steifen Fixateur versorgt worden waren. Von Tag 7 bis 14 nahmen die Knochenanteile im Kallus in den steif-Gruppen von 500% auf 700% zu und von 100% auf 300% in den semi-steif-Gruppen (Tabelle1, Abb.4) An Tag 21 war die Knochenfläche in der steif-SclAb-Gruppe um 75% größer als in der semi-steif-SclAb-Gruppe und in der steif-Placebo-Gruppe um 13% größer als in der semi-steif-Placebo-Gruppe. Aus den Daten der μ CT-Aufnahmen ging hervor, dass das Verhältnis von mineralisiertem Kallus zum Gesamtkallus (BV/TV) von Tag 3 bis Tag 21 in allen Gruppen zunahm. Das BV/TV, das in den steif-Gruppen an Tag 14 und 21 gemessen wurde, war dabei signifikant größer als das der semi-steif-Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten. Des Weiteren beobachteten wir in den Gruppen mit steifem Fixateur an Tag 14 und 21 eine signifikant höhere Mineraldichte des Kallusgewebes (BMD) als in den Gruppen mit einem semi-steifen Fixateur (Abb.2). An Tag 7 konnte keine intrakortikale oder periostale Brückenbildung beobachtet werden. An Tag 14 und 21, zeigten die steif-Gruppen im Vergleich zu den semi-steif-Gruppen jedoch einen höheren Prozentsatz an periostaler und/oder intrakortikaler Brückenbildung entlang der Fraktur. Die immunhistochemische Alpha-Sma-Färbung der Blutgefäße zeigte bei den Gruppen mit steifem Fixateur eine signifikant erhöhte Blutgefäßdichte an Tag 7 im Vergleich zu den semi-steifen Fixateuren und unabhängig der verabreichten Behandlung (Abb. 3). Die Genexpression von VEGF, die wichtig für die Bildung von Blutgefäßen ist, verhielt sich in den steif-Gruppen und den semi-steif-Gruppen an Tag 3 ähnlich, war aber in der semi-steif-Placebo-Gruppe an Tag 7 signifikant höher als in der steif-Placebo-Gruppe. Auch an Tag 14 war die Expression in der semi-steif-SclAb-Gruppe verglichen mit der steif-SclAb-Gruppe höher (Abb.3). In den mit Movat Pentachrome gefärbten Schnitten, zeigten die steif-Gruppen im Vergleich zu den semi-steif-Gruppen an Tag 14 und 21 eine signifikant kleinere Knorpelfläche und fibröses Gewebe (Tabelle 1, Abb.4). Alle Gruppen enthielten an Tag 7 einen geringen Anteil an Knorpelgewebe, der weniger als 4% der Kallusfläche ausmachte. In den semi-steif-Gruppen nahm dieser Anteil zwischen 13% und 17% zu, während der Anteil in den Gruppen mit steifem Fixateur unter 5% blieb. Die Gesamtkallusfläche war an Tag 7, 14 und 21 in den semi-steif-Gruppen aufgrund verstärkter Bildung von Knorpelgewebe und fibrösem Gewebe größer als in den steif-Gruppen.

4. Diskussion

Die Studienlage zur Verwendung von Sclerostin-neutralisierenden Antikörpern in der Frakturheilung ist widersprüchlich. Das Ziel unserer Studie war es die Wirkung von SclAb auf den Heilungsprozess genauer zu untersuchen. Unser Studienaufbau unterschied sich dabei von anderen, da es bisher keine Daten über die Zusammenwirkung von unterschiedlichen mechanischen Bedingungen der Frakturstabilisierung und einer Behandlung mit SclAb gibt. Hierzu untersuchten wir den Heilungsprozess einer Fraktur an ausgewachsenen weiblichen Mäusen. Um die Fraktur zu stabilisieren, verwendeten wir zwei Fixateursysteme mit unterschiedlicher axialer Steifheit.

Es interessierte uns besonders, ob eine verzögerte Heilung, die durch eine erhöhte IFB innerhalb des Frakturkallus hervorgerufen wurde, erfolgreich durch die Sclerostin-neutralisierenden Antikörper behandelt werden kann. Dazu untersuchten wir die Gewebebildung, Vaskularisierung, Genexpression und die mechanische Stärke zu unterschiedlichen Zeitpunkten (am 3., 7., 14. und 21. postoperativem Tag) während des Heilungsprozesses mithilfe von in vivo μ CT-Aufnahmen, Histomorphometrie, Immunhistochemie, RT-qPCR und Torsionstestung. Unsere Ergebnisse zeigen, dass SclAb zu einem erhöhten Knochenvolumen sowohl bei Versorgung mit einem steifen Fixateur als auch mit einem semi-steifen Fixateur führten. Jedoch konnte eine SclAb-Gabe eine verzögerte Heilung in den semi-steif-Gruppen nicht erfolgreich behandeln. In den steif-Gruppen verzögerte sie sogar den fortgeschrittenen Heilungsprozess. Präklinische Studien zur Frakturheilung berichteten von einer erhöhten Knochenbildung bei einer Behandlung mit SclAb im Vergleich zu einer Placebo-Behandlung oder bei Sost-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (26,28-34,48). Unsere Studienergebnisse bestätigen diese Daten. Nach der SclAb-Behandlung beobachteten wir sowohl bei Verwendung eines steifen als auch eines semi-steifen Fixateurs eine größere Knochenfläche und einen größeren Anteil des mineralisierten Kallusvolumens am Gesamtkallus (Tabelle 1, Abb.2). In der mechanischen Testung konnten wir die Wirksamkeit der SclAb-Behandlung, unabhängig der Frakturbedingungen, bestätigen. Die intakten Oberschenkelknochen besaßen ein signifikant höheres maximales Drehmoment, Torsionssteifheit und Energieversagen, wodurch man auch auf ein erhöhtes Knochenvolumen schließen kann (Tabelle 2).

Auch wenn die Behandlung mit SclAb die Knochenbildung fördert, bleibt dennoch die Frage, ob sie eine verzögerte Heilung, die charakteristisch für eine flexiblere Frakturfixierung ist, ausgleichen bzw. erfolgreich behandeln kann. Es ist bekannt, dass die IFB einen wichtigen Faktor bei der Knochenheilung darstellt. Dies zeigt sich dadurch, dass eine steifere Fixierung die endochondrale Ossifikationsphase verkürzt und sich damit positiv auf die Knochenheilung auswirkt (49). In unserer Studie beobachteten wir an Tag 14 und 21 eine größere Menge an Knorpelgewebe in den semi-steifen Gruppen (Tabelle 1, Abb. 4), wodurch wir auf eine verzögerte endochondrale Ossifikation schließen. Des Weiteren wurde bei den semi-steif-Gruppen an Tag 7,14 und 21 eine geringere Knochenmarksfläche festgestellt als bei den Gruppen mit steifem Fixateur. Eine Wiederherstellung der Markhöhle, wie wir sie in den steif-Gruppen beobachten konnten, spricht für einen fortgeschrittenen Heilungsprozess. Die semi-steif-Gruppen zeigten an Tag 14 und 21 sowohl eine kleinere Knochenfläche, als auch einen signifikant niedrigeren BV/TV und BMD (Abb.2). Daraus lässt sich schließen, dass im Vergleich zu den steif-Gruppen die Knochenbildung vermindert ist. Auch das Ausmaß der Brückenbildung entlang des Frakturkallus stellt einen positiven Indikator für den Heilungsfortschritt dar. Die Brückenbildung war im Falle des semi-steifen Fixateurs an Tag 14 und 21 weniger ausgeprägt als bei den steifen Fixateuren (Tabelle 1, Abb.2), und spricht auch dafür, dass der

Heilungsprozess in den semi-steif-Gruppen noch nicht soweit fortgeschritten war wie bei den steif-Gruppen.

Tabelle 2: Torsionstestung des intakten und des operierten Oberschenkelknochens

Parameter/Gruppe	Steif, SclAb	Steif, Placebo	Semi-steif, SclAb	Semi-steif, Placebo
<i>Maximales Drehmoment (N-m)</i>	n = 6	n = 7	n = 8	n = 6
Operierter Oberschenkel	0,018 ± 0,010	0,015 ± 0,006	0,015 ± 0,012	0,013 ± 0,004
Intakter Oberschenkel +	0,040 ± 0,008	0,026 ± 0,004	0,043 ± 0,010	0,024 ± 0,006
<i>Torsionssteifheit (N-m⁰)</i>				
Operierter Oberschenkel	0,002 ± 0,001	0,003 ± 0,002	0,002 ± 0,002	0,003 ± 0,001
Intakter Oberschenkel +	0,006 ± 0,002	0,004 ± 0,002	0,006 ± 0,002	0,003 ± 0,001
<i>Versagensenergie (N-m⁰)</i>				
Operierter Oberschenkel	0,111 ± 0,067	0,067 ± 0,041	0,091 ± 0,082	0,070 ± 0,036
Intakter Oberschenkel +	0,227 ± 0,099	0,142 ± 0,041	0,206 ± 0,061	0,124 ± 0,062

Ergebnisse wurden als Mittelwert ± SD angegeben.

+ Between-subject Behandlungseffekte, ANOVA, p= 0,05.

† Between-subject Fixierungseffekte, ANOVA, p= 0,05.

Interaktion zwischen Behandlung und Fixierung, ANOVA, p= 0,05.

Wie bereits erwähnt, ist die Datenlage zur SclAb-Behandlung und Frakturheilung widersprüchlich. Während einige Studien von einer beschleunigten Heilung unter einer SclAb-Behandlung berichteten (28,33), konnten andere keine signifikante Verbesserung durch SclAb im Vergleich zum Placebo feststellen (29,31). Keine dieser Studien untersuchte jedoch bisher die Auswirkung der mechanischen Stabilität auf die Wirksamkeit des SclAb. Hinzu kommt, dass in den meisten Studien zur Stabilisierung der Osteotomie intramedulläre Nägel verwendet wurden, die eine endostale Gewebekonstruktion verhindern und keine Rotationsstabilität gewähren. Wir sind zu dem Ergebnis gekommen, dass bei Gabe von SclAb die verwendete Fixierung einen für den Heilungsprozess ausschlaggebenden Faktor darstellt. Auch wenn wir in den steif-SclAb-Gruppen nach 21 Tagen die größte Knochenfläche im Vergleich zu den anderen Gruppen feststellten, beobachteten wir jedoch einige charakteristische Zeichen einer verzögerten Knochenheilung. In der ersten Phase der Knochenheilung entsteht der Geflechtknochen, der eine poröse, unorganisierte Struktur hat. Später wird diese unorganisierte Knochenstruktur durch ein koordiniertes Zusammenspiel von Osteoklasten und Osteoblasten umgebaut. Dabei wird der endostale Kallus abgebaut und ein hochorganisierter, biomechanisch sehr stabiler Lammellenknochen gebildet. Die endostale Brückenbildung steht daher im Gegensatz zur periostalen und intrakortikalen Brückenbildung nicht für einen fortgeschrittenen Heilungsprozess (41). Im Fall der steif-Placebo-Gruppe nahm die Brückenbildung am endostalen Kallus zwischen Tag 14 und 21 ab, wohingegen sie in der steif-SclAb-Gruppe gleich blieb (Tabelle 1). Des Weiteren war die Knochenfläche und der Anteil des mineralisierten Kallus am Gesamtvolumen besonders an Tag 21 in der steif-SclAb-Gruppe signifikant höher als im Vergleich zu der steif-Placebo-Gruppe (Tabelle 1, Abb.2) Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass in der steif-Placebo-Gruppe der Umbauprozess zwischen dem 14. und 21. postoperativen Tag bereits begann, während in der steif-SclAb-Gruppe weiterhin Knochen neu gebildet wurde, anstatt ihn umzubauen und die Markhöhle wiederherzustellen. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits in der Vergangenheit veröffentlicht (30,36). Die Annahme, dass eine SclAb-Behandlung den Umbauprozess des Frakturkallus vermindert, wird durch Experimente

mit Zellkulturen unterstützt. Diese zeigen eine verringerte Osteoklastenaktivität, und somit eine geringer Resorptionsaktivität, in Anwesenheit von Sclerostin (51). Auch präklinische und klinische Studien berichten von Anzeichen einer reduzierten Knochenresorption nach der Gabe von SclAb (28, 35, 52, 53).

Auch in Bezug auf den Zusammenhang zwischen einer SclAb-Behandlung und Angiogenese liegen widersprüchliche Studienergebnisse vor. Untersuchungen an menschlichen Endothelzellen zeigten, dass Sclerostin die Angiogenese stimuliert (54). Wir konnten an Tag 14 in den Gruppen mit SclAb eine höhere Blutgefäßdichte messen als in den Placebo-Gruppen. (Abb.3). Im Gegensatz dazu konnten Liu et al. (55) nach einem Zeitraum von 8 Wochen keinen Einfluss von SclAb auf die Bildung von Blutgefäßen im Frakturkallus von ovariectomierten Ratten feststellen. Diese gegensätzlichen Ergebnisse könnten auf die unterschiedlichen mechanischen Bedingungen an der Frakturstelle zurückzuführen sein, die auch Auswirkungen auf die Angiogenese während des Heilungsprozesses hat.

Interessanterweise stellten wir bei den steif-Gruppen, mit mehr Knochen und höheren Osteozytenzahl, nach SclAb-Gabe eine erhöhte Sost- und Sclerostinexpression fest, die wir in den Gruppen mit semisteifem Fixateur nicht beobachten. Dies lässt sich vermutlich darauf zurückführen, dass der Heilungsprozess in den Gruppen mit steifem Fixateur weiter fortgeschritten war und der Frakturkallus einen größeren Knochenanteil und damit auch mehr Osteozyten hatte. Auch wenn innerhalb der steif-Gruppen die steif-SclAb-Gruppe ein signifikant größeres Knochenvolumen im Vergleich zum Placebo aufzeigte, wurden die immunhistochemischen Messungen der Sclerostinexpression auf die Osteozytenzahl normiert. Dies könnte darauf hindeuten, dass die erhöhte Sclerostinexpression nach SclAb-Gabe nicht auf die unterschiedliche Größe des Knochengewebes zurückzuführen war, sondern auf einen bisher unbekanntem negativen Feedbackmechanismus.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, beeinflusst der SclAb den Wnt-Signalweg, der zusätzlich zu seiner Rolle im Knochengewebe auch die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen und Chondroprogenitorzellen zu osteogenen Zellen fördert (25,56,57). Es bleibt jedoch die Frage, ob eine SclAb-Behandlung die endochondrale Ossifikation stimuliert, die wiederum zu einer vermehrten Knochenbildung führt. Untersuchungen an Sost^{-/-}-Mäusen haben im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen einen geringeren Knorpelgehalt (36) und eine signifikant größere Osteoblastenoberfläche, -anzahl, sowie einen aktiven β -Catenin-Signalweg am 14. postoperativen Tag ergeben (58). Eine Hemmung von Sclerostin könnte daher zu einem schnelleren Fortschreiten der endochondralen Ossifikation führen oder zu einer früheren Stabilisierung der Frakturstelle, sodass es weniger zur endochondralen Ossifikation kommt, sondern vermehrt zur intramembranösen Ossifikation (35). Studienmodelle, die einen intramedullären Nagel verwendeten, zeigen ähnliche Ergebnisse mit einem kleineren Knorpelgehalt im Frakturkallus bei einer Behandlung mit SclAb im Vergleich zur Placebo-Behandlung (28,33-35). Wir konnten Unterschiede in der Knorpelfläche am 7. postoperativen Tag in den Gruppen mit semisteifem Fixateur beobachten bei denen die Behandlung mit SclAb zu einem signifikant größeren Knorpelgehalt führte (Tabelle 1). Es ist daher möglich, dass die SclAb-Behandlung sich auf die endochondrale Ossifikation auswirkt jedoch die Wirkung der IFB auf die Knochenheilung schwerer wiegt als die SclAb-Wirkung. Dies sollte daher in zukünftigen Studien besonders berücksichtigt werden.

Aufgrund unserer Ergebnisse stellte sich die Frage, ob eine kontinuierliche SclAb-Gabe möglicherweise unnötig oder sogar kontraproduktiv für den Umbauprozess des Knochens ist. Einige wenige Studien haben die kontinuierliche Gabe mit einer verzögerten SclAb-Gabe verglichen, und berichteten von einem ähnlichen Heilungsfortschritt (30, 31). Unsere Daten deuten jedoch daraufhin, dass der SclAb, auch wenn er die Ossifikationsphase im

Heilungsprozess beschleunigt, zu einer exzessiven Knochenbildung in späteren Heilungsphasen führen kann. In zukünftigen Studien sollte ein Behandlungsschema umgesetzt werden, das eine Gabe der SclAb nur in der frühen Phase der Heilung ansetzt und die beendet wird bevor die Umbauphase beginnt. Des Weiteren sollte in zukünftigen Studien auch die Auswirkungen alternativer Dosierungen auf die Knochenheilung untersucht werden, um weitere therapeutische Optionen zu differenzieren.

Die Auswirkung der Frakturfixierung auf die Kallusbildung lässt sich im Prinzip vom Kleintiermodell auf den Menschen übertragen, auch wenn der Heilungsprozess im Kleintiermodell deutlich schneller abläuft. Es gibt keine Richtlinien, die eine Fixierung als steif oder flexibel einstufen. Auch kann die sich aus der Fixierung ergebende interfragmentäre Spannung für Mäuse nur geschätzt werden. Da das Risiko einer zu flexiblen Fixierung deutlich negativere Auswirkungen hat, als eine zu steife Fixierung (38), entschieden wir uns für zwei Fixateursysteme, die eine interfragmentäre Spannung von 2,8% für die steifen Fixateure und 26% für die semi-steifen Fixateure zuließen. Da die interfragmentäre Spannung sich direkt auf die Gewebedifferenzierung auswirkt, erwarteten wir im Vergleich der beiden Fixateursysteme einen unterschiedlichen Heilungsprozess. Claes und Heigele (60) veröffentlichten eine Hypothese zur Gewebedifferenzierung, die davon ausgeht, dass eine interfragmentäre Spannung kleiner als 5% die intramembranöse Ossifikation stimuliert wohingegen eine Spannungen über 15% die Bildung von Bindegewebe oder von Knorpelgewebe hervorruft. Jedoch basierte ihr Studienmodell, sowie viele andere, zum größten Teil auf experimentelle Arbeiten mit größeren Tieren und Ratten. Es sind weitere Studien notwendig, um den Zusammenhang zwischen der interfragmentären Belastung und Gewebedifferenzierung im Mausmodell genauer zu untersuchen und festzustellen inwiefern sich diese Daten auf klinische Bedingungen übertragen lässt.

In unserer Studie untersuchten wir die Wirkung der SclAb-Behandlung und der Frakturfixierung (steif vs. semi-steif) auf die Frakturheilung. Die Fixierung spielte dabei eine wichtigere Rolle im Heilungsprozess als die SclAb-Behandlung. Unsere wichtigsten Ergebnisse sind:

- SclAb förderten die Knochenbildung sowohl bei Verwendung von steifen und semi-steifen Fixateuren; jedoch konnte der SclAb eine verzögerte Heilung, die durch die semi-steife Fixierung hervorgerufen wurde, nicht ausgleichen bzw. überwinden.
- Die SclAb-Gabe führte unter steifer Fixierung zu einer vermehrten Bildung von Geflechtknochen im endostalen Kanal, der bis zum 21. postoperativen Tag bestehen blieb und den Umbauprozess und die Wiederherstellung des Knochenmarkraumes verzögerte.
- Die SclAb-Behandlung führte im Vergleich zur Placebo-Behandlung zu einer vermehrten Knorpelbildung an Tag 7 und einer größeren Blutgefäßdichte an Tag 14.
- Die Sost- und Sclerostinexpression war bei Mäusen, die mit dem SclAb behandelt wurden, signifikant höher als bei Mäusen, die das Placebo erhielten. Daraus schließen wir, dass es einen bisher unbekanntem negativen Feedbackmechanismus gibt.
- Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass Therapien, die eine Sost-Hemmung bewirken, rechtzeitig beendet werden sollten, um den Knochenumbau und die Wiederherstellung des Knochenmarkraumes zu ermöglichen.

5. Literaturverzeichnis

1. Baron R, Hesse E. Update on bone anabolics in osteoporosis treatment: Rationale, current status, and perspectives. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(2):311-25.
2. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: Mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(1):45-54.
3. van Bezooijen RL, Bronckers AL, Gortzak RA, Hogendoorn PCW, van der Wee-Pals L, Balemans W, Oostenbroek HJ, Van Hul W, Hamersma H, Dijkers FG, Hamdy NA, Papapoulos SE, Löwik CW. Sclerostin in mineralized matrices and van Buchem disease. *J Dent Res.* 2009;88(6):569-74.
4. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME, Latham JA. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J.* 2003;22(23):6267-76.
5. Lin C, Jiang X, Dai Z, Guo X, Weng T, Wang J, Li Y, Feng G, Gao X, He L. Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res.* 2009;24(10):1651-61.
6. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, Mantila SM, Gluhak-Heinrich J, Bellido TM, Harris SE, Turner CH. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem.* 2008;283(9):5866-75.
7. Pflanz D, Birkhold AI, Albiol L, Thiele T, Julien C, Seliger A, Thomson E, Kramer I, Kneissel M, Duda G, Kornak U, Checa S, Willie BM. Sost deficiency led to a greater cortical bone formation response to mechanical loading and altered gene expression. *Sci Rep.* Aug 25 2017;7(1):9435.
8. 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. *J Biol Chem.* 2005;280(20):19883-7.
9. Semenov M, Tamai K, He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem.* 2005;280(29):26770-5.
10. Chen Y, Whetstone HC, Lin AC, Nadesan P, Wei Q, Poon R, Alman BA. Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. *PLoS Med.* 2007;4(7):e249.
11. Secreto FJ, Hoepfner LH, Westendorf JJ. Wnt signaling during fracture repair. *Curr Osteoporos Rep.* 2009;7(2):64-9.
12. Galli C, Passeri G, Macaluso GM. Osteocytes and WNT: The mechanical control of bone formation. *J Dent Res.* 2010;89(4):331-43.
13. Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ, Cullen DM, Zhao W, Li C, Kharode Y, Sauter L, Babij P, Brown EL, Hill AA, Akther MP, Johnson ML, Recker RR, Komm BS, Bex FJ. Wnt/ β -Catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem.* 2006;281(42):31720-8.
14. Hens JR, Wilson KM, Dann P, Chen X, Horowitz MC, Wysolmerski JJ. TOPGAL mice show that the canonical Wnt signaling pathway is active during bone development and growth and is activated by mechanical loading in vitro. *J Bone Miner Res.* 2005;20(7):1103-13.
15. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone.* 2008;42(4):606-15.

16. Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A, Sigler RE, Faugere MC, Bouxsein ML, Deng L, Clemens TL, Williams BO. Essential role of beta-catenin in postnatal bone acquisition. *J Biol Chem.* 2005;280(22):21162-8.
17. Hartmann C. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol.* 2006;16(3):151-8.
18. Glass DA, 2nd, Bialek P, Ahn JD, Starbuck M, Patel MS, Clevers H, Taketo MM, Long F, McMahon AP, Lang RA, Karsenty G. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell.* 2005;8(5):751-64.
19. Hill TP, Später D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/ β -catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell.* 8(5):727-38.
20. Tamamura Y, Otani T, Kanatani N, Koyama E, Kitagaki J, Komori T, Yamada Y, Costantini F, Wakisaka S, Pacifici M, Iwamoto M, Enomoto-Iwamoto M. Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J Biol Chem.* 2005;280(19):19185-95.
21. McClung MR, Grauer A, Boonen S, Bolognese MA, Brown JP, Diez-Perez A, Langdahl BL, Reginster JY, Zanchetta JR, Wasserman SM, Katz L, Maddox J, Yang YC, Libanati C, Bone HG. Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med.* 2014;370(5):412-20.
22. Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, Binkley N, Czerwinski E, Ferrari S, Hofbauer LC, Lau E, Lewiecki EM, Miyauchi A, Zerbin CA, Milmont CE, Chen L, Maddox J, Meisner PD, Libanati C, Grauer A. Romosozumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2016;375(16):1532-43.
23. Recker RR, Benson CT, Matsumoto T, Bolognese MA, Robins DA, Alam J, Chiang AY, Hu L, Krege JH, Sowa H, Mitlak BH, Myers SL. 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):216-24.
24. Amgen. Study To Assess Fracture Healing With Sclerostin Antibody. U.S. National Institutes of Health; 2014.
25. McKee S. Amgen and UCB abandon fracture healing drug trials. *PharmaTimes.com*; February 2013.
26. Hamann C, Rauner M, Höhna Y, Bernhardt R, Mettelsiefen J, Goettsch C, Günther KP, Stolina M, Han CY, Asuncion FJ, Ominsky MS, Hofbauer LC. Sclerostin antibody treatment improves bone mass, bone strength, and bone defect regeneration in rats with type 2 diabetes mellitus. *J Bone Miner Res.* 2013;28(3):627-38.
27. Makhdom AM, Rauch F, Lauzier D, Hamdy RC. The effect of systemic administration of sclerostin antibody in a mouse model of distraction osteogenesis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2014;14(1):124-30.
28. Ominsky MS, Li C, Li X, Tan HL, Lee E, Barrero M, Asuncion FJ, Dwyer D, Han CY, Vlasseros F, Samadifam R, Jolette J, Smith SY, Stolina M, Lacey DL, Simonet WS, Paszty C, Li G, Ke HZ. Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody enhances bone healing and improves bone density and strength of nonfractured bones. *J Bone Miner Res.* 2011;26(5):1012-21.
29. Alaei F, Virk MS, Tang H, Sugiyama O, Adams DJ, Stolina M, Dwyer D, Ominsky MS, Ke HZ, Lieberman JR. Evaluation of the effects of systemic treatment with a sclerostin neutralizing antibody on bone repair in a rat femoral defect model. *J Orthop Res.* 2014;32(2):197-203.

30. Morse A, McDonald MM, Schindeler A, Peacock L, Mikulec K, Cheng TL, Liu M, Ke HZ, Little DG. Sclerostin antibody increases callus size and strength but does not improve fracture union in a challenged open rat fracture model. *Calcif Tissue Int.* 2017;101(2):217-28.
31. Virk MS, Alaei F, Tang H, Ominsky MS, Ke HZ, Lieberman JR. Systemic administration of sclerostin antibody enhances bone repair in a critical-sized femoral defect in a rat model. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95(8):694-701.
32. 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. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2013;13(2):178-84.
33. Feng G, Chang-Qing Z, Yi-Min C, Xiao-Lin L. Systemic administration of sclerostin monoclonal antibody accelerates fracture healing in the femoral osteotomy model of young rats. *Int Immunopharmacol.* 2015;24(1):7-13.
34. 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. *J Orthop Res.* 2014;32(8):997-1005.
35. Li C, Ominsky MS, Tan HL, Barrero M, Niu QT, Asuncion FJ, Lee E, Liu M, Simonet WS, Paszty C, Ke HZ. Increased callus mass and enhanced strength during fracture healing in mice lacking the sclerostin gene. *Bone.* 2011;49(6):1178-85.
36. 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):2456-67.
37. Claes L, Blakytyn R, Gockelmann M, Schoen M, Ignatius A, Willie B. Early dynamization by reduced fixation stiffness does not improve fracture healing in a rat femoral osteotomy model. *J Orthop Res.* 2009;27(1):22-7.
38. Duda GN, Sollmann M, Sporrer S, Hoffmann JE, Kassi JP, Khodadadyan C, Raschke M. Interfragmentary motion in tibial osteotomies stabilized with ring fixators. *Clin Orthop Relat Res.* 2002(396):163-72.
39. Goodship AE, Watkins PE, Rigby HS, Kenwright J. The role of fixator frame stiffness in the control of fracture healing. An experimental study. *J Biomech.* 1993;26(9):1027-35.
40. Wu JJ, Shyr HS, Chao EY, Kelly PJ. Comparison of osteotomy healing under external fixation devices with different stiffness characteristics. *J Bone Joint Surg Am.* 1984;66(8):1258-64.
41. Willie BM, Blakytyn R, Glöckelmann M, Ignatius A, Claes L. Temporal variation in fixation stiffness affects healing by differential cartilage formation in a rat osteotomy model. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;469(11):3094.
42. Wolf S, Janousek A, Pfeil J, Veith W, Haas F, Duda G, Claes L. The effects of external mechanical stimulation on the healing of diaphyseal osteotomies fixed by flexible external fixation. *Clin Biomech.* 1998;13(4-5):359-64.
43. Schell H, Epari DR, Kassi JP, Bragulla H, Bail HJ, Duda GN. The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability. *J Orthop Res.* 2005;23(5):1022-8.
44. Willie B, Adkins K, Zheng X, Simon U, Claes L. Mechanical characterization of external fixator stiffness for a rat femoral fracture model. *J Orthop Res.* 2009;27(5):687-93.
45. Rontgen V, Blakytyn R, Matthys R, Landauer M, Wehner T, Gockelmann M, Jermendy P, Amling M, Schinke T, Claes L, Ignatius A. Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. *J Orthop Res.* 2010;28(11):1456-62.

46. Lienau J, Schell H, Duda GN, Seebeck P, Muchow S, Bail HJ. Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res.* 2005;23(3):639-45.
47. Morse A, Yu NY, Peacock L, Mikulec K, Kramer I, Kneissel M, McDonald MM, Little DG. Endochondral fracture healing with external fixation in the Sost knockout mouse results in earlier fibrocartilage callus removal and increased bone volume fraction and strength. *Bone.* 2015;71:155-63.
48. Epari DR, Schell H, Bail HJ, Duda GN. Instability prolongs the chondral phase during bone healing in sheep. *Bone.* 2005;38(6):864-70.
49. Hoerth RM, Seidt BM, Shah M, Schwarz C, Willie BM, Duda GN, Fratzl P, Wagermaier W. Mechanical and structural properties of bone in non-critical and critical healing in rat. *Acta Biomater.* 2014;10(9):4009-19.
50. Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PLOS ONE.* 2011;6(10):e25900.
51. McDonald MM, Morse A, Mikulec K, Peacock L, Yu N, Baldock PA, Birke O, Liu M, Ke HZ, Little DG. Inhibition of sclerostin by systemic treatment with sclerostin antibody enhances healing of proximal tibial defects in ovariectomized rats. *J Orthop Res.* 2012;30(10):1541-8.
52. Padhi D, Jang G, Stouch B, Fang L, Posvar E. Single-dose, placebo-controlled, randomized study of AMG 785, a sclerostin monoclonal antibody. *J Bone Miner Res.* 2011;26(1):19-26.
53. Oranger A, Brunetti G, Colaianni G, Tamma R, Carbone C, Lippo L, Mori G, Pignataro P, Cirulli N, Zerlotin R, Moretti B, Notarnicola A, Ribatti D, Grano M, Colucci S. Sclerostin stimulates angiogenesis in human endothelial cells. *Bone.* 2017;101:26-36.
54. Liu Y, Rui Y, Cheng TY, Huang S, Xu L, Meng F, Lee WY, Zhang T, Li N, Li C, Ke H, Li G. Effects of sclerostin antibody on the healing of femoral fractures in ovariectomised rats. *Calcif Tissue Int.* 2016;98(3):263-74.
55. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, Suva LJ, Lane TF, Hankenson KD, MacDougald OA. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Nat Acad Sci USA.* 2005;102(9):3324-9.
56. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: Cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(2):236-53.
57. McGee-Lawrence ME, Ryan ZC, Carpio LR, Kakar S, Westendorf JJ, Kumar R. Sclerostin deficient mice rapidly heal bone defects by activating beta-catenin and increasing intramembranous ossification. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;441(4):886-90.
58. 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):335-46.
59. Claes LE, Heigele CA. Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing. *J Biomech.* 32(3):255-66.
60. Borgiani E, Duda G, Willie BM, Checa S. Bone healing in mice: Does it follow generic mechano-regulation rules? *Facta Univ Ser Mech Eng.* 2015;13(3):217-27.

6. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BMC	Bone Mineral Content
BMD	Bone Mineral Density
BV	Bone Volume
TV	Total Volume
DKK1	Dickkopf 1
HA	Hydroxylapatit
IFB	Interfragmentäre Bewegung
Lef1	Lymphoid enhancer binding factor 1
n	number
NO	Sclerostin negativ gefärbte Osteozyten
PO	Sclerostin positiv gefärbte Osteozyten
RNS	Ribonukleinsäure
RT-qPCR	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
SD	Standard Deviation
Sfrp1	Secreted frizzled related protein 1
sma	smooth muscle actin
Sost ^{-/-}	Sost-defizient
Wif1	Wnt inhibitory factor 1
Wnt	„W“ für Wingless und „nt“ für Int 1
Vegfa	Vascular endothelial growth factor A
veh	vehicle
vs.	versus
vWF	von Willebrandfaktor
μCT	Micro Computed Tomography

7. Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Bettina Verena Kruck, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Behandlung mit Sclerostin-neutralisierenden Antikörpern fördert die Knochenbildung, kann jedoch eine mechanisch bedingte Heilungsverzögerung nicht ausgleichen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

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

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation 1: Bettina Kruck, Elizabeth A Zimmermann, Sophie Damerow, Christine Figge, Catherine Julien, Dag Wulsten, Tobias Thiele, Madge Martin, Reggie Hamdy, Marie K Reumann, Georg N Duda, Sara Checa, Bettina M Willie, Sclerostin Neutralizing Antibody Treatment Enhances Bone Formation but Does Not Rescue Mechanically Induced Delayed Healing, Journal of Bone and Mineral Research, April 2018

- Beteiligung an der Erstellung des Studienmodells
- Antragstellung beim Landesamt für Gesundheit und Soziales in Berlin zur Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens
- Durchführung der operativen Eingriffe (exklusive der Osteotomien zur Erhebung der qPCR-Messungen)
- Durchführung der μ CT-Aufnahmen und deren Datenauswertung aus der die Abbildung 2 in der Publikation entstanden ist
- Durchführung der Torsionstestungen und deren Datenauswertung aus der die Tabelle 2 in der Publikation entstanden ist

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

8. Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE,SSCI Selected Categories: **“ENDOCRINOLOGY and METABOLISM”**

Selected Category Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 143 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	Cell Metabolism	29,834	20.565	0.101740
2	Nature Reviews Endocrinology	7,377	20.265	0.025190
3	Lancet Diabetes & Endocrinology	5,549	19.313	0.029810
4	ENDOCRINE REVIEWS	12,975	15.545	0.009920
5	DIABETES CARE	67,278	13.397	0.110140
6	JOURNAL OF PINEAL RESEARCH	9,079	11.613	0.008600
7	TRENDS IN ENDOCRINOLOGY AND METABOLISM	8,362	10.769	0.019900
8	Obesity Reviews	10,241	8.483	0.023840
9	THYROID	11,570	7.557	0.020730
10	DIABETES	53,645	7.273	0.074690
11	FRONTIERS IN NEUROENDOCRINOLOGY	3,924	6.875	0.006040
12	ANTIOXIDANTS & REDOX SIGNALING	19,324	6.530	0.032120
13	JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH	26,804	6.314	0.036920
14	Molecular Metabolism	2,403	6.291	0.012250
15	JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND METABOLISM	19,450	6.045	0.028280
16	DIABETOLOGIA	28,810	6.023	0.048370
17	FREE RADICAL BIOLOGY AND MEDICINE	40,089	6.020	0.043060
18	DIABETES OBESITY & METABOLISM	8,680	5.980	0.022060
19	METABOLISM-CLINICAL AND EXPERIMENTAL	13,117	5.963	0.016570
20	JOURNAL OF CLINICAL ENDOCRINOLOGY & METABOLISM	78,047	5.789	0.104690
21	ENDOCRINE-RELATED CANCER	7,114	5.331	0.012410
22	Cardiovascular Diabetology	4,796	5.235	0.011190
23	INTERNATIONAL JOURNAL OF OBESITY	22,185	5.151	0.032040
24	NEUROENDOCRINOLOGY	4,670	5.024	0.005340
25	REVIEWS IN ENDOCRINE & METABOLIC DISORDERS	2,004	4.963	0.003780

9. Publikation

durch den Verlag John Wiley & Sons

ORIGINAL ARTICLE

JBMR®

Sclerostin Neutralizing Antibody Treatment Enhances Bone Formation but Does Not Rescue Mechanically Induced Delayed Healing

Bettina Kruck,¹ Elizabeth A Zimmermann,² Sophie Damerow,¹ Christine Figge,¹ Catherine Julien,² Dag Wulsten,¹ Tobias Thiele,¹ Madge Martin,^{1,3} Reggie Hamdy,² Marie K Reumann,⁴ Georg N Duda,¹ Sara Checa,¹ and Bettina M Willie^{1,2}

¹Julius Wolff Institute, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

²Research Centre, Shriners Hospital for Children-Canada, Department of Pediatric Surgery, McGill University, Montreal, Canada

³Laboratoire Modélisation et Simulation Multi-Echelle, Université Paris-Est Créteil, Paris, France

⁴Siegfried Weller Institut für Unfallmedizinische Forschung, Berufsgenossenschaftliche Unfallklinik, Eberhard Karls Universität, Tuebingen, Germany

ABSTRACT

During bone healing, tissue formation processes are governed by mechanical strain. *Sost*/sclerostin, a key Wnt signaling inhibitor and mechano-sensitive pathway, is downregulated in response to mechanical loading. Sclerostin neutralizing antibody (SclAb) increases bone formation. Nevertheless, it remains unclear whether sclerostin inhibition can rescue bone healing in situations of mechanical instability, which otherwise delay healing. We investigated SclAb's influence on tissue formation in a mouse femoral osteotomy, stabilized with rigid or semirigid external fixation. The different fixations allowed different magnitudes of interfragmentary movement during weight bearing, thereby influencing healing outcome. SclAb or vehicle (veh) was administered and bone healing was assessed at multiple time points up to day 21 postoperatively by in vivo micro-computed tomography, histomorphometry, biomechanical testing, immunohistochemistry, and gene expression. Our results show that SclAb treatment caused a greater bone volume than veh. However, SclAb could not overcome the characteristic delayed healing of semirigid fixation. Indeed, semirigid fixation resulted in delayed healing with a prolonged endochondral ossification phase characterized by increased cartilage, lower bone volume fraction, and less bony bridging across the osteotomy gap than rigid fixation. In a control setting, SclAb negatively affected later stages of healing under rigid fixation, evidenced by the high degree of endosteal bridging at 21 days in the rigid-SclAb group compared with rigid-veh, indicating delayed fracture callus remodeling and bone marrow reconstitution. Under rigid fixation, *Sost* and sclerostin expression at the gene and protein level, respectively, were increased in SclAb compared with veh-treated bones, suggesting a negative feedback mechanism. Our results suggest that SclAb could be used to enhance overall bone mass but should be carefully considered in bone healing. SclAb may help to increase bone formation early in the healing process but not during advanced stages of fracture callus remodeling and not to overcome delayed healing in semirigid fixation. © 2018 American Society for Bone and Mineral Research.

KEY WORDS: BONE HEALING; FRACTURE CALLUS; SOST; SCLEROSTIN; FIXATION STIFFNESS; IN VIVO MICRO-COMPUTED TOMOGRAPHY

Introduction

In recent years, sclerostin has become the target of a new approach to treat disorders, such as osteoporosis and delayed bone healing.^(1,2) Positive clinical phase 2 and 3 trials results have been reported using sclerostin neutralizing antibody (SclAb) for postmenopausal osteoporosis.^(3–5) A clinical phase 2 study was also conducted for SclAb treatment in fracture healing.⁽⁶⁾ Although the study was discontinued and data from the trial have not been published,⁽⁷⁾ a better understanding of the effects of SclAb in the context of fracture healing is sought.

The *Sost* gene encodes for the protein sclerostin, which is mainly expressed in osteocytes but also in hypertrophic chondrocytes.^(8,9) Several studies have shown that *Sost* expression is downregulated by mechanical loading and upregulated by mechanical unloading.^(10–12) Sclerostin is an inhibitor of the canonical Wnt signaling pathway,^(13,14) which is known to play a major role in bone maintenance and repair.^(15–17) Activation of canonical Wnt signaling through mechanical stimulation increases osteoblast proliferation and differentiation,^(11,18–20) while negatively regulating osteoclast activity to enhance bone formation.^(21–23) Furthermore, Wnt/ β -catenin signaling promotes osteo-chondroprogenitor differentiation to the

Received in original form February 7, 2018; revised form April 5, 2018; accepted April 16, 2018. Accepted manuscript online April 25, 2018.

Address correspondence to: Bettina M Willie, PhD, Shriners Hospitals for Children-Canada, 1003 Decarie Boulevard, Montreal, H4A 0A9, Canada.

E-mail: bwillie@shriners.mcgill.ca

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Journal of Bone and Mineral Research, Vol. 33, No. 9, September 2018, pp 1686–1697

DOI: 10.1002/jbmr.3454

© 2018 American Society for Bone and Mineral Research

osteoblast lineage⁽²⁴⁾ and has also been shown to promote chondrocyte hypertrophy and ossification in mature cells during endochondral ossification processes.⁽²⁵⁾

SclAb has been investigated in preclinical fracture healing studies, with mixed results^(26–31) and thus it remains unclear whether it could enhance and rescue bone healing, specifically in mechanically demanding situations. SclAb treatment generally produces higher bone volume in the callus^(26,28–34) and less cartilage^(27,28,33,34) in comparison to vehicle treatments. Similar results were reported in *Sost*-deficient mice.^(35,36) Although it is clear that endogenous sclerostin expression is regulated by mechanical loading, no studies have evaluated the influence of altered mechanical conditions during healing on SclAb efficacy. It is well known that mechanical factors such as the amount of interfragmentary movement (IFM) play an important role in bone healing.^(37–41) IFM is influenced by the load on the operated limb due to gravity, the number of load cycles, muscle forces, and the fixation stiffness used to stabilize the fracture. For similar loading conditions, the fixation stiffness is the dominating factor influencing IFM.⁽³⁸⁾ Studies investigating the effects of fixation stiffness on fracture healing have found that extremely rigid fixation can suppress bone formation,^(39,42) whereas too flexible fixation can result in hypertrophic nonunions.^(41,43) In this context, it remains unclear how an altered mechanical environment influences the efficacy of SclAb treatment and whether the SclAb treatment can overcome the delayed healing caused by greater IFM.

We aimed to examine how different magnitudes of IFM altered the healing response with SclAb treatment in mice. We hypothesized that SclAb enhances bone healing, even in situations of mechanical instability, which would otherwise lead to delayed healing. To test this hypothesis, adult female C57BL/6J mice were subjected to a femoral osteotomy stabilized with either rigid or semirigid fixation and treated with either SclAb or vehicle (veh) treatment over 21 days. Bone healing was assessed with histomorphometry, in vivo micro-computed tomography (μ CT), gene expression, immunohistochemistry, and mechanical testing.

Materials and Methods

Mouse femoral osteotomy model

A 0.5-mm osteotomy was performed on the left femur of adult, 26-week-old female C57BL/6J mice (Jackson Laboratory, Sulzfeld, Germany). The osteotomy was stabilized with either a rigid or semirigid unilateral external fixator (Fig. 1A), which allowed a ninefold difference in axial stiffness, determined by in vitro mechanical testing (see Supplemental Methods).^(44,45) Mice were then treated via subcutaneous injection with either sclerostin neutralizing antibody (SclAb) (Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, USA, and UCB, Brussels, Belgium; 25mg/kg) or saline solution (veh) twice per week (1, 5, 8, 12, 15, and 19 days post-osteotomy).⁽⁴⁶⁾ Mice were randomly assigned to fixation and treatment groups. Investigators were not blinded to group assignment.

The number of mice for in vivo μ CT was based on a power analysis with the primary outcome being bone volume fraction. The assumptions for estimating number of animals including standard deviation and mean difference came from preliminary results and published data from Rontgen and colleagues.⁽⁴⁵⁾ Forty-three mice underwent in vivo μ CT measurements performed on days 3, 7, 14, and 21 post-osteotomy

($n=10–12$ mice/group), followed by histological ($n=7–8$ mice/group) and immunohistochemical analysis ($n=7–8$ mice/group) (21-day time point). For histological analysis, a further 43 mice ($n=7–10$ mice/group) were euthanized at 7 days post-osteotomy and 44 mice at 14 days post-osteotomy ($n=7–12$ mice/group). An additional 47 mice ($n=9–13$ mice/group) were euthanized at 21 days post-osteotomy to undergo biomechanical testing on the osteotomized and intact limbs. A further 48 mice were euthanized on days 3, 7, and 14 for qPCR measurements ($n=3–4$ mice/group/time point). All mice were euthanized via an intracardial potassium-chloride injection in deep anesthesia. In all groups, 0 to 5 mice per group were excluded because of anesthesia-related death during or following in vivo μ CT, pin loosening, lameness, or bone fracture. The study was approved by the local Animal Care and Use Committee (LaGeSo, Berlin, Germany; G0021/11).

In vivo micro-computed tomography for mineralized tissue formation and density

Bone healing and the degree of bony bridging were assessed by 3D in vivo μ CT.⁽⁴¹⁾ Anesthetized mice with the external fixator in place were positioned in the in vivo μ CT using a custom-made bed that limited motion artifact and repositioning error. Metal artifact was not visible in any scans and was abated by using a unilateral fixator consisting of a polyether ether ketone crossbar and titanium pins, with the inner pins separated by a distance of 4 mm. A volume of interest of 1 mm was analyzed from images acquired at an isotropic resolution of 10.5 μ m. Bone healing parameters included mineralized callus volume (BV, mm^3), total callus volume (TV, mm^3), mineralized callus volume fraction (BV/TV), callus tissue mineral density (BMD, mg HA/cm^3), and callus tissue mineral content (BMC, mg), defined as $\text{BV} \times \text{BMD}$, with BMD measured using only voxels whose intensity exceeded the threshold.

Histomorphometry of tissue differentiation

Decalcified, paraffin-embedded osteotomized femurs were cut to a 4- μ m thickness and stained with Movat Pentachrome for qualitative morphologic examination. Callus tissue composition was characterized by quantitative analysis of bone, cartilage, fibrous tissue, and bone marrow formation.

Immunohistochemistry

Longitudinal sections of the decalcified, paraffin-embedded osteotomized femurs were prepared with a microtome. Immunohistochemistry was performed with a monoclonal anti-human antibody to alpha-smooth muscle actin (Alpha-sma) from mouse (1:100; Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) to quantify blood vessel density⁽⁴⁷⁾ as well as with antisclerostin primary antibody (AF140, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) to measure the number of sclerostin-positive osteocytes.

Gene expression

RT-qPCR was performed on the osteotomized femur to test for gene expression of *Sost* (Sclerostin), *Wif1* (Wnt inhibitory factor 1), *Sfrp1* (secreted frizzled related protein 1), *Dkk1* (Dickkopf homolog 1), *Lef1* (lymphoid enhancer binding factor 1), *Axin2*, *Vegfa* (vascular endothelial growth factor A), and *Vwf* (Von Willebrand factor homolog). Bone marrow was removed and RNA was extracted from callus tissue located within the two inner pins of the fixator stabilizing the osteotomy. This callus

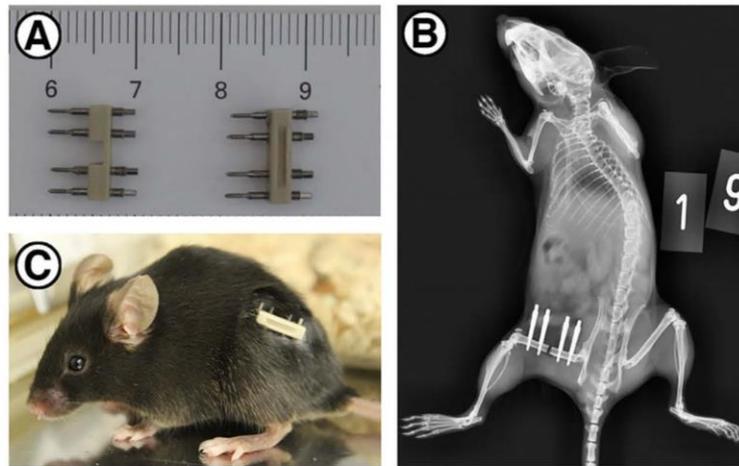


Fig. 1. Fixators for bone healing experiments. (A) The effect of interfragmentary motion on the bone healing response was investigated by using semirigid (left) and rigid (right) external fixators. (B) Radiograph acquired after surgery shows the osteotomy's placement in relation to the fixator. (C) Post-surgery, the fixator is observable on the mouse.

tissue was made up of various amounts of bone, cartilage, and fibrous connective tissue.

Biomechanical testing

Femora were mounted in a mechanical testing machine (ElectroForce 3200 test system, TA Instruments, New Castle, DE, USA) and loaded to failure in torsion at a rate of 0.5°/s with an axial preload of 0.3 N. The ultimate torque, torsional stiffness, and energy to failure were calculated from torque-rotation curves.

Statistical analysis

All values are presented as mean \pm standard deviation. At each time point, the between-subject effects of treatment, fixation stiffness, and the interaction between these terms were assessed using ANOVA (SAS 9.4, Cary, NC, USA). Statistical significance was set at $p < 0.05$. Furthermore, for gene expression and immunohistochemistry analysis of sclerostin expression, sub-analyses were performed on relative values of all outcome measures using unpaired *t* tests.

Results

SclAb treatment accelerated bone formation but did not improve healing outcome

In vivo μ CT showed the mineralized callus volume (BV) and the ratio of mineralized callus to total callus (BV/TV) were significantly greater in SclAb compared with veh-treated groups at days 14 and 21 (Fig. 2). Blood vessel density was significantly greater at day 14 in SclAb than veh-treated groups (Fig. 3). Bony bridging of the osteotomy, which indicates advanced remodeling, was assessed in the 3D μ CT images (Table 1). The percentage of bridged intracortical and periosteal cortices was greater in the rigid-SclAb group at day 14; however, at day 21, the rigid-SclAb and rigid-veh groups had a similar percentage of periosteal and/or intracortical bridging (Table 1). Histological analysis confirmed significantly greater bone area in SclAb versus vehicle groups at day 21; 98% greater in rigid-SclAb

than rigid-veh, and 27% greater in the semirigid-SclAb than semirigid-veh (Fig. 4, Table 1).

The percentage of endosteal bridging was also assessed using in vivo μ CT images (Table 1). In the later stages of healing, endosteal bridging does not reflect advanced healing, but rather the lack of endosteal bridging and resorption of the endosteal callus with its reconstitution by bone marrow are signs of more advanced healing. After 14 days, 75% of mice in the rigid-SclAb group had endosteal bridging versus 57% in the rigid-veh group. At 21 days, the percentage of mice with endosteal bridging decreased by 4% in the rigid-SclAb group, whereas the rigid-veh group showed a decrease of 20%.

At 21 days, the torsional stiffness of osteotomized femora, as a percent of the intact limb, was greater in the vehicle than SclAb-treated groups (Table 2). However, this data must be interpreted with caution because the osteotomized limb from several mice per group was not sufficiently healed to perform testing. Mechanical testing of the intact femora indicated a significantly greater ultimate torque, stiffness, and energy to failure in SclAb-treated than veh-treated groups.

Sost and sclerostin expression were upregulated in osteotomized femora treated with sclerostin neutralizing antibody compared with vehicle

Immunohistochemical antisclerostin antibody staining showed significant effects of treatment at days 7 and 14, where the rigid-SclAb group had a greater number of sclerostin-positive osteocytes than the rigid-veh group (Fig. 5A, B). Similarly, gene expression of *Sost* was significantly upregulated in the rigid-SclAb group compared with the rigid-veh group at day 7 (Fig. 5C). No significant differences in gene expression between treatments were measured for Wnt antagonists (*Wif1*, *Dkk1*, and *Sfrp1*) or Wnt target genes (*Axin2* and *Lef1*) (Fig. 6).

Stabilization by fixators with greater rigidity led to improved healing

Independent of SclAb or veh treatment, histological analysis showed bone and bone marrow area were significantly greater in rigid than semirigid groups at days 14 and 21.

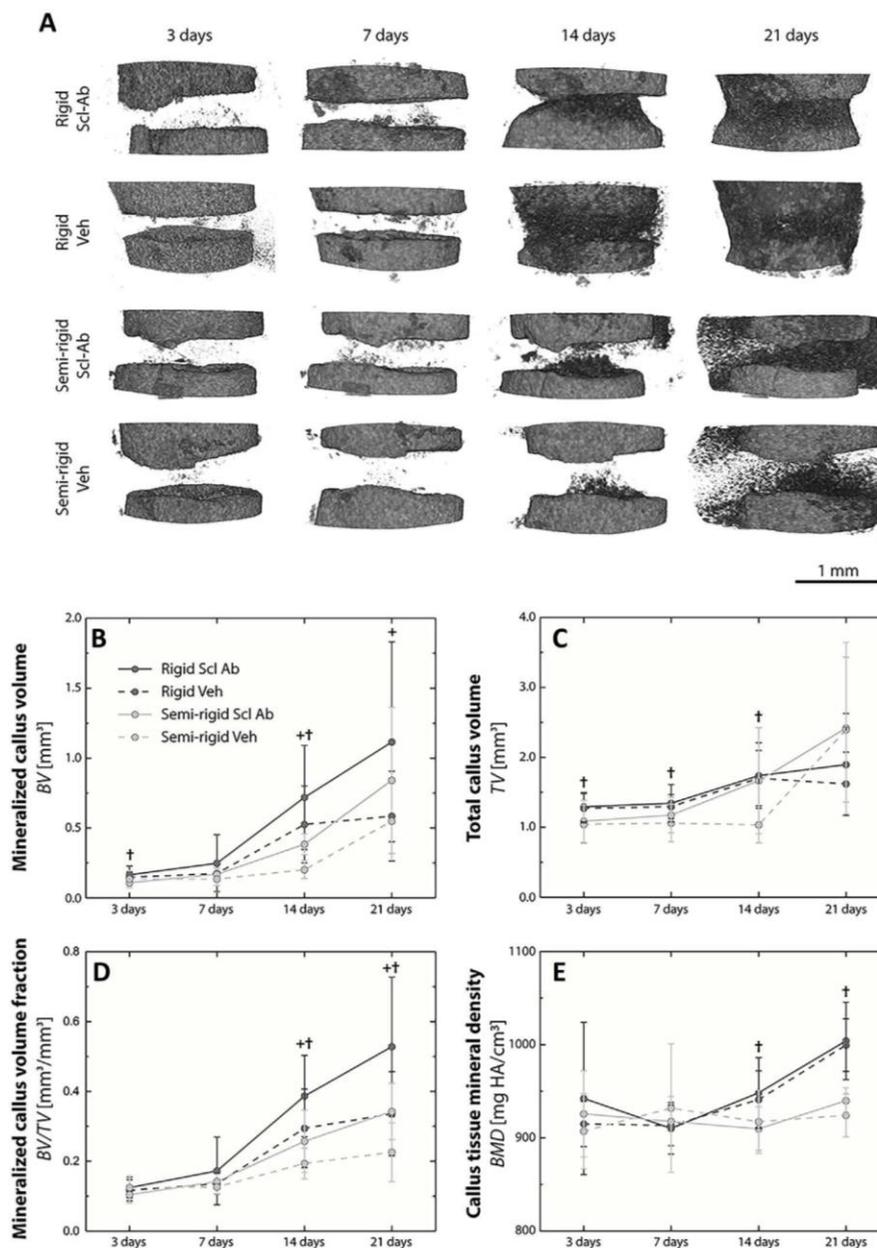


Fig. 2. In vivo μ CT imaging of fracture healing. (A) In vivo μ CT imaging of the osteotomy region was performed at 3, 7, 14, and 21 days post-surgery. The representative in vivo μ CT images show mineralized tissue spanning the osteotomy region in the rigid fixator groups at days 14 and 21. Although less mineralized tissue was observed in the semirigid groups than rigid at day 21, the SclAb treatment did improve the amount of mineralized tissue in the semirigid group. μ CT images were used to quantify the amount of mineralized tissue within the callus (excluding the cortices) in terms of (B) mineralized callus volume (or bone volume, BV), (C) total callus volume (or total volume, TV), (D) mineralized callus volume fraction (BV/TV), and (E) callus tissue mineral density (BMD). Values reported as mean \pm SD. ANOVA: +treatment, †fixation stiffness, #interaction effects, $p < 0.05$.

From days 7 to 14, the amount of bone area in the callus increased by 500% to 700% in the rigid group and by 100% to 300% in the semirigid groups (Table 1, Fig. 4). At day 21, the bone area was 75% greater in the rigid-SclAb than the semirigid-SclAb and 13% greater in the rigid-veh than the semirigid-veh. Using in vivo μ CT, the ratio of mineralized

callus to total callus (BV/TV) increased from days 3 to 21 in all groups (Fig. 2), with significantly greater BV/TV measured in rigid than semirigid groups at days 14 and 21. Furthermore, the rigid fixation groups had a significantly higher callus tissue mineral density (BMD) on days 14 and 21 than the semirigid fixation groups (Fig. 2). No intracortical or

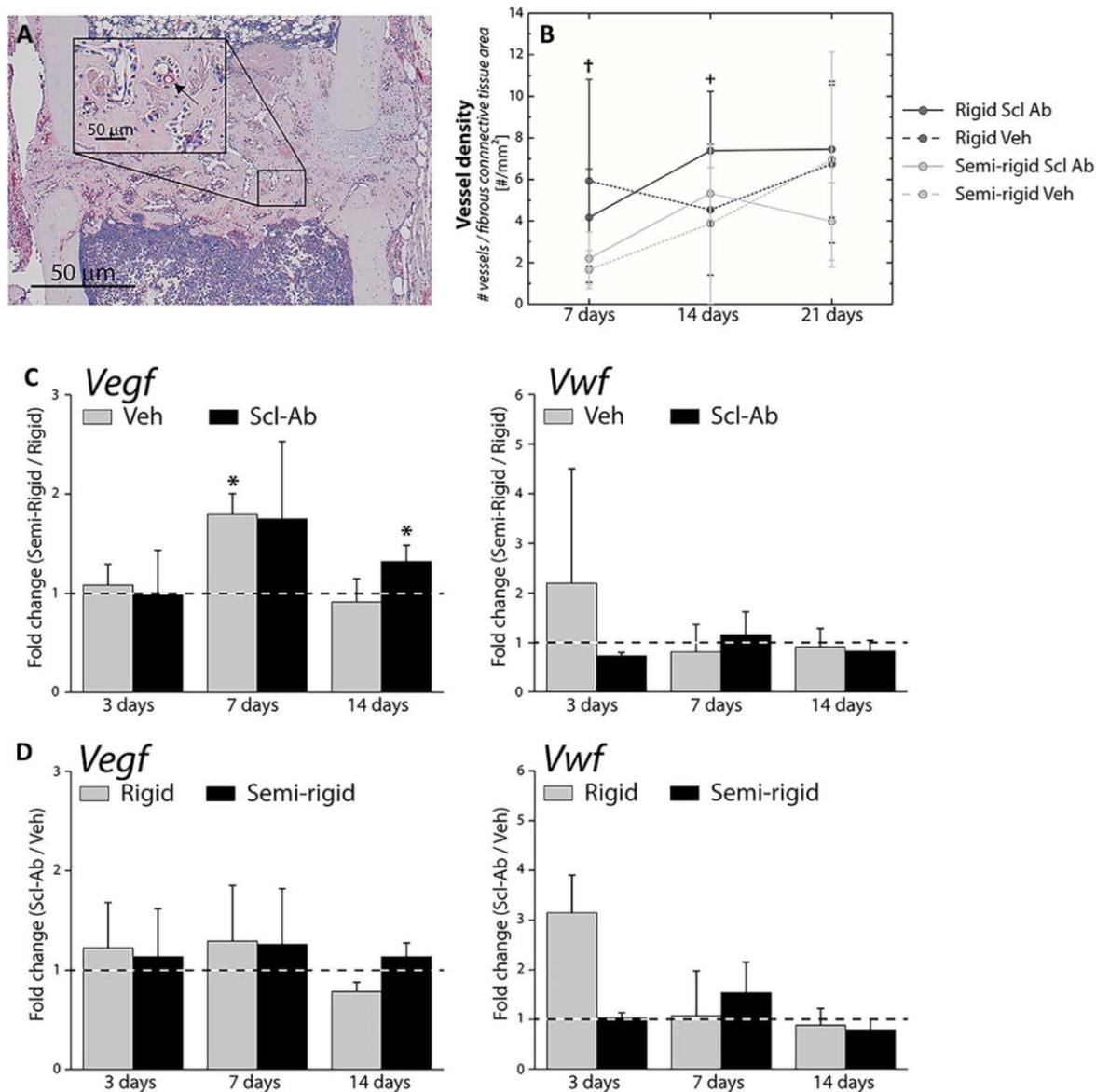


Fig. 3. Blood vessel density and gene expression. (A, B) The density of blood vessels inside the fracture callus was measured at days 7, 14, and 21 with immunohistochemistry staining of histological sections (arrow points to blood vessel). ANOVA: +treatment, †fixation stiffness, #interaction effects, $p < 0.05$. (C) Fold changes in gene expression in the osteotomized limb for the semirigid fixator normalized by the rigid fixator. Asterisk indicates significant difference between semirigid and rigid fixation for each time point. (D) Fold changes in gene expression in the osteotomized limb for the SclAb treatment normalized by the veh treatment.

periosteal bony bridging was present at day 7, but by days 14 and 21, the rigid fixation groups contained a higher percentage of periosteal and/or intracortical bridges across the osteotomy than the semirigid fixation groups.

Immunohistochemical Alpha-sma staining of blood vessels showed significantly increased blood vessel density at day 7 in rigid than semirigid fixation groups independent of treatment (Fig. 3). Gene expression of *Vegf*, associated with blood vessel formation, was similar between rigid and semirigid groups at day 3 but was significantly upregulated at day 7 in the semirigid-veh group compared with the rigid-veh group as well as at

14 days in the semirigid-SclAb group compared with the rigid-SclAb group (Fig. 3).

At days 21 and 14, histological sections stained with Movat Pentachrome demonstrated significantly less cartilage and fibrous tissue area in the rigid groups compared with semirigid fixation (Table 1, Fig. 4). All groups contained low amounts of cartilage at day 7, consisting of less than 4% of the fracture callus area, which increased between 13% and 17% of the callus area in the semirigid fixation groups, while remaining below 5% in the rigid fixation groups by day 14. Total callus area was greater in the semirigid fixation groups than the rigid fixation groups at

Table 1. Total Callus Area, Bone Area, Cartilage Area, Fibrous Connective Tissue, Bone Marrow, Percentage of Periosteal/Intracortical Bridging, and Percentage of Endosteal Bridging

Region/parameter	Rigid Scl Ab	Rigid vehicle	Semirigid Scl Ab	Semirigid vehicle
7d	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 9
Total callus area (mm ²) ^{a,b}	1.647 ± 0.160	1.383 ± 0.265	1.893 ± 0.307	1.571 ± 0.289
Bone area (mm ²)	0.053 ± 0.034	0.041 ± 0.037	0.063 ± 0.040	0.051 ± 0.075
Cartilage area (mm ²) ^{a,b,c}	0.001 ± 0.004	0 ± 0	0.054 ± 0.042	0.006 ± 0.007
Fibrous connective tissue area (mm ²) ^{a,b}	1.457 ± 0.159	1.183 ± 0.227	1.760 ± 0.290	1.508 ± 0.323
Bone marrow area (mm ²) ^b	0.136 ± 0.099	0.159 ± 0.107	0.016 ± 0.032	0.007 ± 0.011
Total % bridging (peri+intracortical)	0%	0%	0%	0%
14d	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 10	<i>n</i> = 12
Total callus area (mm ²) ^b	1.643 ± 0.123	1.483 ± 0.172	2.061 ± 0.316	2.086 ± 0.519
Bone area (mm ²) ^{b,c}	0.430 ± 0.118	0.271 ± 0.150	0.144 ± 0.083	0.208 ± 0.121
Cartilage area (mm ²) ^b	0.076 ± 0.109	0.054 ± 0.053	0.356 ± 0.372	0.282 ± 0.318
Fibrous connective tissue area (mm ²) ^b	0.825 ± 0.182	0.850 ± 0.291	1.555 ± 0.269	1.592 ± 0.295
Bone marrow area (mm ²) ^b	0.311 ± 0.243	0.307 ± 0.159	0.006 ± 0.013	0.004 ± 0.007
Total % bridging (peri+intracortical)	63%	43%	3%	8%
Bridging score ^b	2.5 ± 0.76	1.71 ± 1.50	0.1 ± 0.32	0.1 ± 0.32
Endosteal callus bridging	75%	57%	10%	8%
21d	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 7
Total callus area (mm ²) ^b	1.656 ± 0.299	1.553 ± 0.188	1.866 ± 0.149	1.877 ± 0.135
Bone area (mm ²) ^{a,b}	0.486 ± 0.217	0.245 ± 0.133	0.277 ± 0.120	0.217 ± 0.114
Cartilage area (mm ²) ^b	0.003 ± 0.008	0.010 ± 0.024	0.051 ± 0.086	0.214 ± 0.270
Fibrous connective tissue area (mm ²) ^b	0.826 ± 0.294	0.933 ± 0.394	1.514 ± 0.182	0.1394 ± 0.237
Bone marrow area (mm ²) ^b	0.341 ± 0.180	0.365 ± 0.304	0.023 ± 0.022	0.051 ± 0.060
Total % bridging (peri+intracortical)	46%	44%	4%	14%
Bridging score ^b	1.86 ± 1.21	1.75 ± 1.58	0.14 ± 0.38	0.57 ± 0.53
Endosteal callus bridging	71%	37%	0%	29%

Values reported as mean ± SD.

^aBetween-subject effects of treatment, ANOVA, *p* < 0.05.

^bBetween-subject effects of fixation stiffness, ANOVA, *p* < 0.05.

^cInteractions between treatment and fixation stiffness, ANOVA, *p* < 0.05.

days 7, 14, and 21 post-osteotomy, due to increased cartilage and fibrous tissue area.

Discussion

The aim of this study was to investigate the efficacy of SclAb treatment with varying levels of mechanical stability to determine if treatment could overcome the delayed healing that occurs with greater IFM in the fracture callus. We analyzed osteotomy healing in skeletally mature female mice, stabilized using two different external fixator configurations, which differed in ex vivo axial stiffness by ninefold. Tissue formation, vascularization, gene expression, and mechanical strength were measured at multiple time points (at 3, 7, 14, and 21 days post-osteotomy) during the healing process using in vivo μ CT, histomorphometry, immunohistochemistry, RT-qPCR, and torsional testing. Our results show that SclAb increased bone volume fraction compared with vehicle treatment in rigid and semirigid fixation; however, SclAb did not overcome the delayed healing associated with greater IFM in the semirigid fixation case and delayed advanced healing in rigid fixation.

Preclinical fracture healing studies have reported increased bone formation in SclAb treatment versus veh treatment and in *Sost*^{-/-} versus wild-type mice.^(26,28–34,48) Our data additionally support the notion that SclAb treatment increases bone formation, as our results show greater bone area and bone volume fraction after SclAb treatment in both rigid and

semirigid fixation (Table 1, Fig. 2). Furthermore, SclAb had systemic effects observed in the mechanical testing, where the intact limbs of SclAb-treated mice had significantly higher ultimate torque, torsional stiffness, and energy to failure presumably because of greater bone volume (Table 2).

Although SclAb treatment did improve bone formation, it is of interest whether SclAb can overcome the delayed healing that is characteristic of more flexible fixation. IFM is known to be an important factor in bone healing, where fixation with a relatively greater rigidity has better healing because of a shorter endochondral ossification phase.⁽⁴⁹⁾ Here, the greater amounts of cartilage present at days 14 and 21 in the semirigid groups (Table 1, Fig. 4) indicate a prolonged endochondral ossification phase in comparison to the rigid groups. Furthermore, the semirigid groups have significantly less bone marrow at 7, 14 and 21 days post-osteotomy than the rigid groups; thus, a reconstitution of bone marrow, as it occurs during the process of advanced healing, was underway in the rigid groups. The semirigid group also had a significantly lower bone area at days 14 and 21, as well as a significantly lower BV/TV and BMD (Fig. 2) than with the rigid fixator, suggesting lower levels of bone formation. Furthermore, the degree of bridging across the fracture callus, which is an indicator of the extent of fracture healing, was less pronounced in the semirigid cases than the rigid cases at days 14 and 21 (Fig. 2, Table 1). Past studies have reported inconsistent fracture healing results, with some studies finding enhanced healing^(28,33) and others

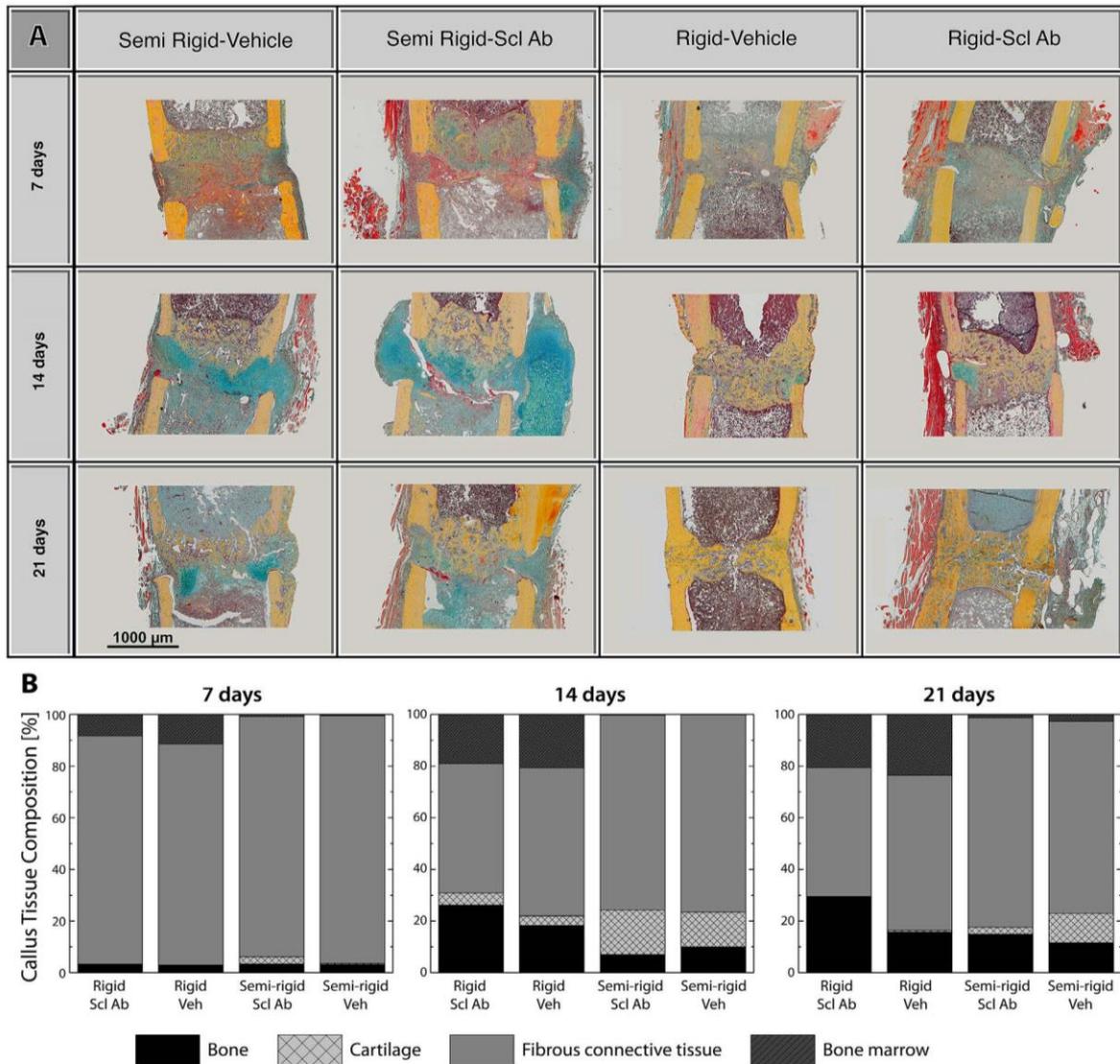


Fig. 4. Histological staining for callus tissue composition. (A) Representative histological sections of the fracture callus stained with Movat Pentachrome to distinguish bone (yellow), cartilage (green), fibrous connective tissue (grayish green), and bone marrow (purple). (B) The area fraction of bone, cartilage, fibrous connective tissue, and bone marrow present in the fracture callus at 7, 14, and 21 days post-osteotomy measured from the Movat Pentachrome-stained histological sections.

observing no significant improvements in healing with SclAb treatment in comparison to veh treatment.^(29–31) However, none of these studies examined the interaction of the mechanical stability on SclAb efficacy, and most used intramedullary nails to stabilize the fracture/osteotomy, which inhibits endosteal tissue formation and does not provide rotational stability. We have observed that with the inclusion of SclAb treatment, the fixation stiffness was a significant determinant of healing.

Although the rigid-SclAb group exhibited the greatest amount of bone at day 21, it also had numerous characteristics indicating delays in bone healing, specific to the ossification and remodeling phase. The initial bone material deposited in the

fracture callus is woven bone consisting of a porous, disorganized structure.⁽⁵⁰⁾ Later, this disorganized bone is remodeled by coordinated action of osteoclasts and osteoblasts followed by deposition of highly organized lamellar bone and removal of the endosteal callus. Here, endosteal callus bridging decreased from days 14 to 21 in the rigid-veh group, while remaining stable in the rigid-SclAb group (Table 1). Although bony bridging in the periosteal and intracortical regions is an indicator of progressive healing, endosteal bridging is not.⁽⁴¹⁾ These observations indicate that remodeling in the rigid-veh group commenced between days 14 and 21, while the rigid-SclAb group experienced ongoing bone formation instead of remodeling and reconstitution of the bone marrow in the medullary canal.

Table 2. Torsional Testing of Intact and Osteotomized Femurs

Parameter/group	Rigid Scl Ab <i>n</i> = 6	Rigid vehicle <i>n</i> = 7	Semirigid Scl Ab <i>n</i> = 8	Semirigid vehicle <i>n</i> = 6
Ultimate torque (N-m)				
Operated femur	0.018 ± 0.010	0.015 ± 0.006	0.015 ± 0.012	0.013 ± 0.004
Intact femur ^a	0.040 ± 0.008	0.026 ± 0.004	0.043 ± 0.010	0.024 ± 0.006
Percent of intact contralateral side	48 ± 34	61 ± 25	35 ± 25	57 ± 11
Torsional stiffness (N-m/°)				
Operated femur	0.002 ± 0.001	0.003 ± 0.002	0.002 ± 0.002	0.003 ± 0.001
Intact femur ^a	0.006 ± 0.002	0.004 ± 0.002	0.006 ± 0.002	0.003 ± 0.001
Percent of intact contralateral side ^a	36 ± 16	79 ± 32	38 ± 32	102 ± 53
Energy to failure (N-m/°)				
Operated femur	0.111 ± 0.067	0.067 ± 0.041	0.091 ± 0.082	0.070 ± 0.036
Intact femur ^a	0.227 ± 0.099	0.142 ± 0.041	0.206 ± 0.061	0.124 ± 0.062
Percent of intact contralateral side	68 ± 69	51 ± 34	46 ± 40	62 ± 28

Values reported as mean ± SD.

^aBetween-subject effects of treatment, ANOVA, *p* < 0.05.

^bBetween-subject effects of fixation stiffness, ANOVA, *p* < 0.05.

^cInteractions between treatment and fixation stiffness, ANOVA, *p* < 0.05.

Furthermore, the bone area and bone volume fraction were significantly higher, particularly at day 21 in the rigid-SclAb group compared with the rigid-veh group (Table 1, Fig. 2). Past studies have also reported higher levels of bone volume fraction and fracture load in combination with no improvement in healing with SclAb treatment compared with veh and *Sost*^{-/-} mice compared with wild type.^(30,36) Reduced reconstitution of the fracture callus after SclAb treatment group is supported by cell culture experiments showing reduced osteoclast resorption in the presence of sclerostin,⁽⁵¹⁾ as well as preclinical and clinical studies reporting reduced bone resorption indices after SclAb therapy.^(28,35,52,53)

A recent study showed sclerostin stimulates angiogenesis in human endothelial cells, suggesting that it may play a role in angiogenesis.⁽⁵⁴⁾ We measured a greater blood vessel density at day 14 in SclAb- than veh-treated groups (Fig. 3). In contrast, Liu and colleagues⁽⁵⁵⁾ did not observe an effect of SclAb treatment on vessel formation in the fracture callus of ovariectomized rats after 8 weeks of healing. These contrasting results may have been due to differences in the local mechanical conditions at the osteotomy site, which is known also to enhance angiogenesis during healing.

Interestingly, under rigid fixation with more bone and hence osteocytes present, we observed upregulated *Sost* and sclerostin expression at both the gene and protein level, respectively, after sclerostin neutralizing antibody administration. This was not observed in the semirigid groups, which is likely because the rigid groups were further along in the healing process with calluses consisting of more bone and hence osteocytes. Although within the rigid fixation groups the SclAb treated group had significantly more bone volume compared with the vehicle-treated group, the immunohistochemistry analysis of sclerostin expression was normalized to the number of osteocytes. Thus, this indicates that the increased sclerostin expression observed after SclAb administration was not due to differing amounts of bone but more likely due to a yet unknown negative feedback mechanism. Further studies are warranted to elucidate this mechanism of counteraction.

SclAb affects the Wnt signaling pathway, which in addition to its role in bone, also promotes differentiation of mesenchymal

stem cells and chondroprogenitors to osteogenic cells.^(25,56,57) The question remains as to whether SclAb treatment enhances endochondral ossification leading to increased bone formation. Past fracture healing studies on *Sost*^{-/-} mice have observed less cartilage content⁽³⁶⁾ as well as significantly higher osteoblast surface, osteoblast number, and active β-catenin signaling at 14 days post-fracture than wild type.⁽⁵⁸⁾ Thus, sclerostin inhibition may lead to earlier progression of endochondral ossification or, alternatively, earlier stabilization of the fracture site resulting in less endochondral ossification and more intramembraneous ossification.⁽³⁵⁾ Similarly, fracture healing studies mainly using an intramedullary nail have observed less cartilage content in the fracture callus using SclAb treatment than veh treatment.^(28,33–35) Our results show that differences in cartilage area due to treatment were observed in SclAb at day 7, where the semirigid-SclAb group had a significantly higher cartilage area than the semirigid-veh (Table 1). Therefore, SclAb treatment could be having an effect on endochondral ossification during bone healing; however, the effects of IFM on bone healing outweigh the treatment effects and should be carefully considered in future studies investigating SclAb during fracture healing.

Continuous administration of SclAb may not be necessary and even counterproductive to the remodeling process. A few studies have investigated continuous and delayed SclAb treatment and found similar healing in each case.^(30,31) However, the results of our study suggest that SclAb, though crucial to accelerating the ossification stage of healing, can result in excessive bone formation at later stages. Future studies should implement a treatment regime, where SclAb treatment is administered early in the healing process and then discontinued before the remodeling phase.

This study has limitations. Fracture calluses were not all sufficiently healed by 21 days to perform mechanical testing (Table 2). The effect of the fixator pin holes in the osteotomized limbs on the torsional material properties has been estimated with finite element analysis (Supplemental Fig. S1). High anesthesia-related deaths occurred at days 3 and 7 post-osteotomy during in vivo μCT imaging, which

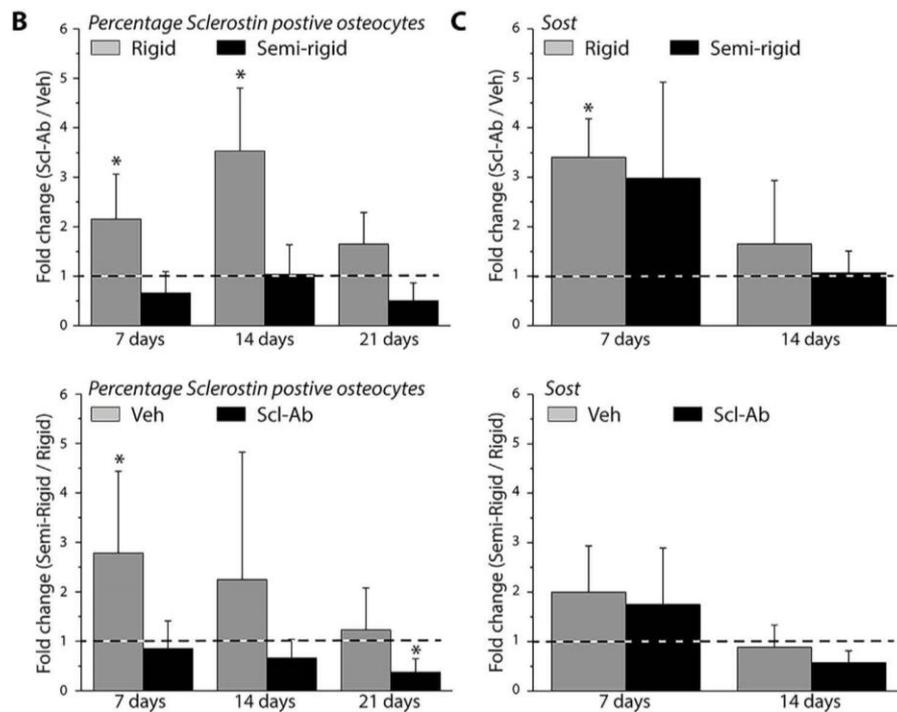
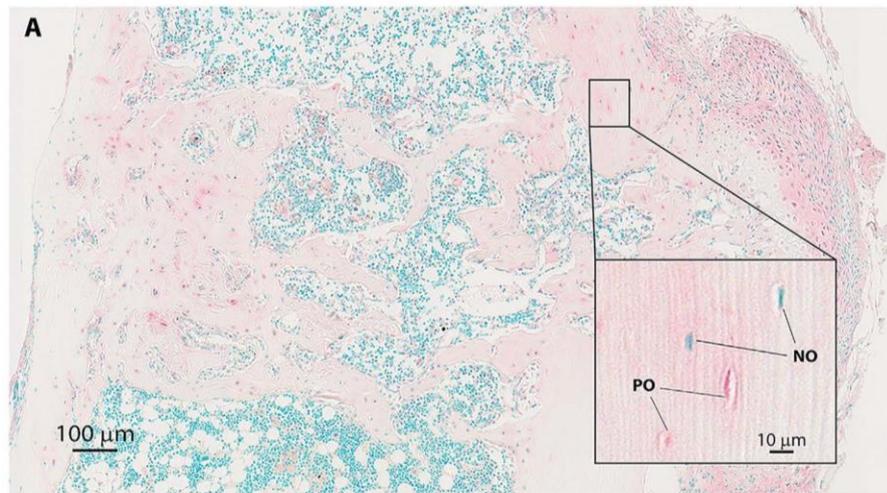


Fig. 5. Sclerostin immunohistochemistry and gene expression. (A) The number of osteocytes stained positive (PO) and negative (NO) for sclerostin protein were quantified in the osteotomy region. (B) Fold changes in percentage of sclerostin-positive osteocytes in the osteotomized limb for SclAb treatment normalized by veh treatment as well as fold changes in the semirigid fixator normalized by the rigid fixator. (C) Fold changes in gene expression of *Sost* for SclAb treatment normalized by the veh treatment as well as fold changes in the semirigid fixator normalized by the rigid fixator. Asterisks indicate a significant difference between veh and SclAb treatment or between rigid and semirigid fixation for each time point.

might have been minimized had we used isoflurane. Although the current study was performed in adult mice, we and others have reported that repeated radiation exposure can alter bone formation in young growing mice.⁽⁵⁹⁾ The SclAb dose used in the study was based on previous reports,⁽⁴⁶⁾ but further studies are required to assess the effect of alternative doses on healing outcomes. In principle, the effect of fracture fixation on callus formation is

the same in small animal models as in the human situation, although the time course of healing is much faster in the small-animal model.

There are no guidelines for deciding whether fixation is rigid or flexible and the resulting interfragmentary strain that guides tissue differentiation can only be estimated in mice. Because the risk of a too flexible fixation generally outweighs the risk of a too stiff fixation,⁽³⁸⁾ we chose two fixator

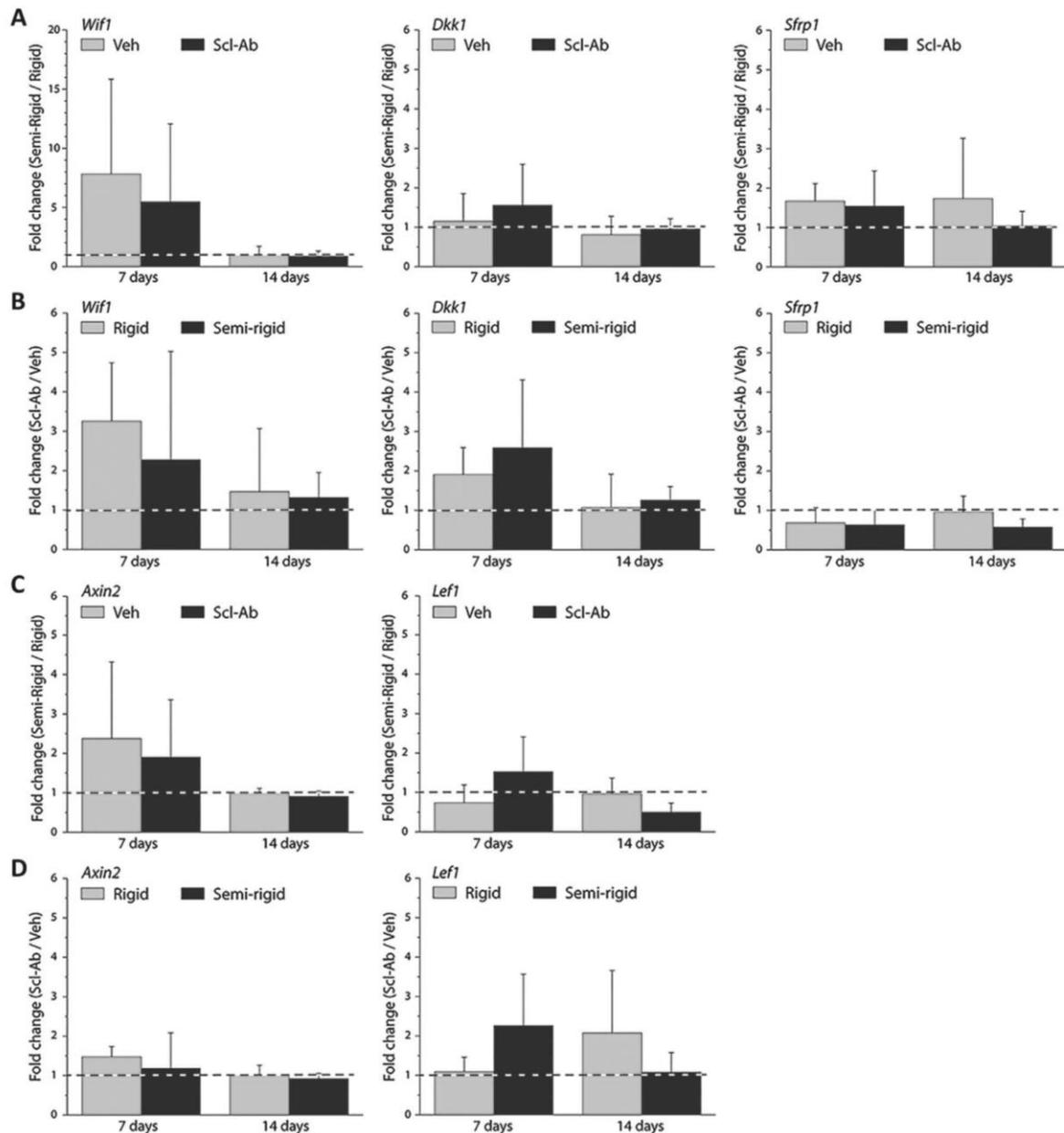


Fig. 6. Gene expression of Wnt inhibitors and target genes. Gene expression was measured in the osteotomized limb at 7 and 14 days post-osteotomy. (A) Fold changes in gene expression of Wnt inhibitors (*Wif1*, *Dkk1*, and *Sfrp1*) for the semirigid fixator normalized by the rigid fixator. (B) Fold changes in gene expression of Wnt inhibitors for SclAb treatment normalized by veh treatment. (C) Fold changes in gene expression of Wnt target genes (*Axin2* and *Lef1*) for the semirigid fixator normalized by the rigid fixator. (D) Fold changes in gene expression of Wnt target genes for SclAb treatment normalized by veh treatment. No significant differences were observed.

constructs that resulted in 2.8% ex vivo interfragmentary strain (IFS) for the rigid fixator and 26% IFS for the flexible fixator per mouse body weight. IFS drives tissue differentiation and thus we expected to observe a difference in healing between the fixator constructs. A tissue differentiation hypothesis reported by Claes and Heigele⁽⁶⁰⁾ suggested that IFS less than 5% drive intramembranous ossification, whereas strains over 15% elicit

fibro-cartilage or connective tissue formation. However, this and other models are largely based on experimental work in larger animals and rat. Using a mechano-biological computer model that included finite element modeling of the mechanical conditions within the healing region, we showed that generic mechano-regulation rules are able to explain bone healing progression in the rat but not in the mouse.⁽⁶¹⁾ In mice,

bone does not require as much stability as is required in rats to reach timely healing. Further studies are required to better understand the relationship between IFS and tissue differentiation in mice and determine how transferable these findings are to the clinical situation.

In summary, this study investigated the effects of SclAb treatment and fixation stiffness (rigid versus semirigid) on fracture healing. Fixation stiffness has a greater impact on bone healing than SclAb treatment. Our key findings are as follows:

- SclAb enhanced bone formation for both rigid and semirigid fixation; however, SclAb could not overcome the delays in healing caused by semirigid fixation stiffness, which led to lower bone volume fraction, greater cartilage area, and less bony bridges across the osteotomy gap than rigid fixation.

- Under rigid fixation, SclAb increased woven bone formation in the endosteal canal that persisted at day 21, leading to delayed remodeling and reconstitution of the bone marrow compared with vehicle-treated mice.

- SclAb treatment led to increased cartilage at day 7 and blood vessel density at day 14 compared with vehicle-treated mice.

- *Sost* and sclerostin expression were significantly greater in SclAb compared with vehicle-treated mice, suggesting the presence of a negative feedback mechanism.

Our findings suggest that treatment strategies, which include *SOST* inhibition, should be discontinued at later stages of healing to allow bone remodeling and reconstitution of the bone marrow.

Disclosures

All authors state that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors thank Edoardo Borgiani, Marta Aido, Mario Thiele, and Gabriela Korus for experimental assistance and Mark Lepik for assistance with figures. This study was partially supported by the Elisabeth Bonhoff Foundation, the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF: TP5/DIMEOs), Shriners Hospitals for Children, and the Réseau de Recherche en Santé Buccodentaire et Osseuse Recruitment Aid Program. We also thank Amgen Inc. (Thousand Oaks, CA, USA) and UCB (Brussels, Belgium) for providing the sclerostin neutralizing antibody.

Authors' roles: Study design: BK, SC, GD, and BMW. Data acquisition: BK, SD, CF, CJ, DW, TT, MM, and BMW. Data analysis: BK, EAZ, SD, CF, CJ, and BMW. Data interpretation: all authors. Drafting manuscript: BK and EAZ. Revising manuscript content: all authors. Approving final version of manuscript: all authors. BMW takes responsibility for the integrity of the data.

References

1. Baron R, Hesse E. Update on bone anabolics in osteoporosis treatment: rationale, current status, and perspectives. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(2):311–25.
2. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11(1):45–54.
3. McClung MR, Grauer A, Boonen S, et al. Romosozumab in postmenopausal women with low bone mineral density. *N Engl J Med.* 2014;370(5):412–20.
4. Cosman F, Crittenden DB, Adachi JD, et al. Romosozumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis. *N Engl J Med.* 2016;375(16):1532–43.
5. Recker RR, Benson CT, Matsumoto T, et al. A randomized, double-blind phase 2 clinical trial of Blososumab, a sclerostin antibody, in postmenopausal women with low bone mineral density. *J Bone Miner Res.* 2015;30(2):216–24.
6. Amgen. Study to assess fracture healing with sclerostin antibody. U.S. National Institutes of Health; 2014.
7. McKee S. Amgen and UCB abandon fracture healing drug trials. *PharmaTimes.com*; February 2013.
8. van Bezooijen RL, Bronckers AL, Gortzak RA, et al. Sclerostin in mineralized matrices and van Buchem disease. *J Dent Res.* 2009;88(6):569–74.
9. Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, et al. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J.* 2003;22(23):6267–76.
10. Lin C, Jiang X, Dai Z, et al. Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res.* 2009;24(10):1651–61.
11. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, et al. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of *Sost/sclerostin*. *J Biol Chem.* 2008;283(9):5866–75.
12. Pflanz D, Birkhold AI, Albiol L, et al. *Sost* deficiency led to a greater cortical bone formation response to mechanical loading and altered gene expression. *Sci Rep.* 2017;7(1):9435.
13. Li X, Zhang Y, Kang H, et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem.* 2005;280(20):19883–7.
14. Semenov M, Tamai K, He X. *SOST* is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem.* 2005;280(29):26770–5.
15. Chen Y, Whetstone HC, Lin AC, et al. Beta-catenin signaling plays a disparate role in different phases of fracture repair: implications for therapy to improve bone healing. *PLoS Med.* 2007;4(7): e249.
16. Secreto FJ, Hoepfner LH, Westendorf JJ. Wnt signaling during fracture repair. *Curr Osteoporos Rep.* 2009;7(2):64–9.
17. Galli C, Passeri G, Macaluso GM. Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation. *J Dent Res.* 2010;89(4):331–43.
18. Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ, et al. Wnt/ β -catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem.* 2006;281(42):31720–8.
19. Hens JR, Wilson KM, Dann P, Chen X, Horowitz MC, Wysolmerski JJ. TOPGAL mice show that the canonical Wnt signaling pathway is active during bone development and growth and is activated by mechanical loading in vitro. *J Bone Miner Res.* 2005;20(7): 1103–13.
20. Bonewald LF, Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone.* 2008;42(4):606–15.
21. Holmen SL, Zylstra CR, Mukherjee A, et al. Essential role of beta-catenin in postnatal bone acquisition. *J Biol Chem.* 2005;280(22):21162–8.
22. Hartmann C. A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends Cell Biol.* 2006;16(3):151–8.
23. Glass DA 2nd, Bialek P, Ahn JD, et al. Canonical Wnt signaling in differentiated osteoblasts controls osteoclast differentiation. *Dev Cell.* 2005;8(5):751–64.
24. Hill TP, Später D, Taketo MM, Birchmeier W, Hartmann C. Canonical Wnt/ β -catenin signaling prevents osteoblasts from differentiating into chondrocytes. *Dev Cell.* 2005;8(5):727–38.
25. Tamamura Y, Otani T, Kanatani N, et al. Developmental regulation of Wnt/beta-catenin signals is required for growth plate assembly, cartilage integrity, and endochondral ossification. *J Biol Chem.* 2005;280(19):19185–95.
26. Hamann C, Rauner M, Höhna Y, et al. Sclerostin antibody treatment improves bone mass, bone strength, and bone defect regeneration in rats with type 2 diabetes mellitus. *J Bone Miner Res.* 2013; 28(3):627–38.
27. Makhdom AM, Rauch F, Lauzier D, Hamdy RC. The effect of systemic administration of sclerostin antibody in a mouse model of distraction osteogenesis. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2014;14(1):124–30.
28. Ominsky MS, Li C, Li X, et al. Inhibition of sclerostin by monoclonal antibody enhances bone healing and improves bone density and

- strength of nonfractured bones. *J Bone Miner Res.* 2011;26(5):1012–21.
29. Alaei F, Virk MS, Tang H, et al. Evaluation of the effects of systemic treatment with a sclerostin neutralizing antibody on bone repair in a rat femoral defect model. *J Orthop Res.* 2014;32(2):197–203.
 30. Morse A, McDonald MM, Schindeler A, et al. Sclerostin antibody increases callus size and strength but does not improve fracture union in a challenged open rat fracture model. *Calcif Tissue Int.* 2017;101(2):217–28.
 31. Virk MS, Alaei F, Tang H, Ominsky MS, Ke HZ, Lieberman JR. Systemic administration of sclerostin antibody enhances bone repair in a critical-sized femoral defect in a rat model. *J Bone Joint Surg Am.* 2013;95(8):694–701.
 32. Cui L, Cheng H, Song C, et al. Time-dependent effects of sclerostin antibody on a mouse fracture healing model. *J Musculoskelet Neuronal Interact.* 2013;13(2):178–84.
 33. Feng G, Chang-Qing Z, Yi-Min C, Xiao-Lin L. Systemic administration of sclerostin monoclonal antibody accelerates fracture healing in the femoral osteotomy model of young rats. *Int Immunopharmacol.* 2015;24(1):7–13.
 34. Suen PK, He YX, Chow DH, et al. Sclerostin monoclonal antibody enhanced bone fracture healing in an open osteotomy model in rats. *J Orthop Res.* 2014;32(8):997–1005.
 35. Li C, Ominsky MS, Tan HL, et al. Increased callus mass and enhanced strength during fracture healing in mice lacking the sclerostin gene. *Bone.* 2011;49(6):1178–85.
 36. Morse A, McDonald MM, Kelly NH, et al. Mechanical load increases in bone formation via a sclerostin-independent pathway. *J Bone Miner Res.* 2014;29(11):2456–67.
 37. Claes L, Blakytyn R, Gockelmann M, Schoen M, Ignatius A, Willie B. Early dynamization by reduced fixation stiffness does not improve fracture healing in a rat femoral osteotomy model. *J Orthop Res.* 2009;27(1):22–7.
 38. Duda GN, Sollmann M, Sporrer S, et al. Interfragmentary motion in tibial osteotomies stabilized with ring fixators. *Clin Orthop Relat Res.* 2002; (396): 163–72.
 39. Goodship AE, Watkins PE, Rigby HS, Kenwright J. The role of fixator frame stiffness in the control of fracture healing. An experimental study. *J Biomech.* 1993;26(9):1027–35.
 40. Wu JJ, Shyr HS, Chao EY, Kelly PJ. Comparison of osteotomy healing under external fixation devices with different stiffness characteristics. *J Bone Joint Surg Am.* 1984;66(8):1258–64.
 41. Willie BM, Blakytyn R, Glöckelmann M, Ignatius A, Claes L. Temporal variation in fixation stiffness affects healing by differential cartilage formation in a rat osteotomy model. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;469(11):3094.
 42. Wolf S, Janousek A, Pfeil J, et al. The effects of external mechanical stimulation on the healing of diaphyseal osteotomies fixed by flexible external fixation. *Clin Biomech.* 1998; 13(4–5): 359–64.
 43. Schell H, Epari DR, Kassl JP, Bragulla H, Bail HJ, Duda GN. The course of bone healing is influenced by the initial shear fixation stability. *J Orthop Res.* 2005;23(5):1022–8.
 44. Willie B, Adkins K, Zheng X, Simon U, Claes L. Mechanical characterization of external fixator stiffness for a rat femoral fracture model. *J Orthop Res.* 2009;27(5):687–93.
 45. Rontgen V, Blakytyn R, Matthys R, et al. Fracture healing in mice under controlled rigid and flexible conditions using an adjustable external fixator. *J Orthop Res.* 2010;28(11):1456–62.
 46. Li X, Ominsky MS, Warmington KS, et al. Sclerostin antibody treatment increases bone formation, bone mass, and bone strength in a rat model of postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res.* 2008;24(4):578–88.
 47. Lienau J, Schell H, Duda GN, Seebeck P, Muchow S, Bail HJ. Initial vascularization and tissue differentiation are influenced by fixation stability. *J Orthop Res.* 2005;23(3):639–45.
 48. Morse A, Yu NY, Peacock L, et al. Endochondral fracture healing with external fixation in the Sost knockout mouse results in earlier fibrocartilage callus removal and increased bone volume fraction and strength. *Bone.* 2015;71:155–63.
 49. Epari DR, Schell H, Bail HJ, Duda GN. Instability prolongs the chondral phase during bone healing in sheep. *Bone.* 2005;38(6):864–70.
 50. Hoerth RM, Seidt BM, Shah M, et al. Mechanical and structural properties of bone in non-critical and critical healing in rat. *Acta Biomater.* 2014;10(9):4009–19.
 51. Wijenayaka AR, Kogawa M, Lim HP, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Sclerostin stimulates osteocyte support of osteoclast activity by a RANKL-dependent pathway. *PLoS One.* 2011;6(10): e25900.
 52. McDonald MM, Morse A, Mikulec K, et al. Inhibition of sclerostin by systemic treatment with sclerostin antibody enhances healing of proximal tibial defects in ovariectomized rats. *J Orthop Res.* 2012;30(10):1541–8.
 53. Padhi D, Jang G, Stouch B, Fang L, Posvar E. Single-dose, placebo-controlled, randomized study of AMG 785, a sclerostin monoclonal antibody. *J Bone Miner Res.* 2011;26(1):19–26.
 54. Oranger A, Brunetti G, Colaizzi G, et al. Sclerostin stimulates angiogenesis in human endothelial cells. *Bone.* 2017;101:26–36.
 55. Liu Y, Rui Y, Cheng TY, et al. Effects of sclerostin antibody on the healing of femoral fractures in ovariectomized rats. *Calcif Tissue Int.* 2016;98(3):263–74.
 56. Bennett CN, Longo KA, Wright WS, et al. Regulation of osteoblastogenesis and bone mass by Wnt10b. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(9):3324–9.
 57. Muruganandan S, Roman AA, Sinal CJ. Adipocyte differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells: cross talk with the osteoblastogenic program. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66(2): 236–53.
 58. McGee-Lawrence ME, Ryan ZC, Carpio LR, Kakar S, Westendorf JJ, Kumar R. Sclerostin deficient mice rapidly heal bone defects by activating beta-catenin and increasing intramembranous ossification. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;441(4):886–90.
 59. Willie BM, Birkhold AI, Razi H, et al. 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):335–46.
 60. Claes LE, Heigele CA. Magnitudes of local stress and strain along bony surfaces predict the course and type of fracture healing. *J Biomech.* 1999;32(3):255–66.
 61. Borgiani E, Duda G, Willie BM, Checa S. Bone healing in mice: does it follow generic mechano-regulation rules? *Facta Univ Ser Mech Eng.* 2015;13(3):217–27.

10. Lebenslauf

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

11. Publikationsliste

Sclerostin Neutralizing Antibody Treatment Enhances Bone Formation but Does Not Rescue Mechanically Induced Delayed Healing

Bettina Kruck, Elizabeth A Zimmermann, Sophie Damerow, Christine Figge, Catherine Julien, Dag Wulsten, Tobias Thiele, Madge Martin, Reggie Hamdy, Marie K Reumann, Georg N Duda, Sara Checa, Bettina M Willie

First published in the Journal of Bone and Mineral Research, 25 April 2018

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

Bettina M. Willie, Annette I. Birkhold, Hajar Razi, Tobias Thiele, Marta Aido, Bettina Kruck, Alexander Schill, Sara Checa, Russell P. Main, Georg N. Duda
Bone August 2013(Vol. 55, Issue 2, Pages 335-346)

Posterpräsentation auf der jährlichen Versammlung der American Society for Bone and Mineral Research in Baltimore, 2013

Fixation stiffness modulates the efficacy of sclerostin-neutralizing antibody treatment during bone healing

Bettina Kruck, Georg N. Duda, Sophie Damerow, Florian Wichlas, Serafim Tsitsilonis, Bettina M. Willie

Zur Zeit im Review-Verfahren des Journal of Bone and Mineral Research

Age-related changes in the mechanical regulation of bone healing are explained by altered cellular mechanoreponse

Borgiani E, Figge C, Kruck B, Willie BM, Duda GN, Checa S

12. Danksagung

Einen besonderen Dank möchte ich Frau Prof. Willie für die Überlassung des Themas aussprechen, sowie für ihre wissenschaftliche und persönliche Betreuung.

Herrn Prof. Duda danke ich dafür, dass ich die Arbeit an seinem Institut durchführen konnte.

Nicht zu vergessen gilt ein herzlicher Dank der Arbeitsgruppe Bone, besonders Sophie Damerow und Tobias Thiele, und den Mitarbeitern des Julius Wolff Instituts, die mir immer hilfsbereit zur Seite gestanden sind, und durch das nette Miteinander die verbrachte Zeit sehr angenehm gestaltet haben.

Nicht zuletzt möchte ich auch meiner Familie danken. Sebastian und Ina für Korrektur- und Formatierungshilfen, meinen Eltern dafür nicht lockerzulassen und Mario für die richtigen Worte zur richtigen Zeit.