

Histomorphometrische Untersuchung von Osteozyten
in strontium- und nichtstrontiumhaltigen
Knochenersatzmaterialien

Sebastian Schmidt

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Histomorphometrische Untersuchung von Osteozyten
in strontium- und nichtstrontiumhaltigen
Knochenersatzmaterialien**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin (Dr. med.)
des Fachbereiches Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Sebastian Schmidt

aus Naumburg/Saale, Deutschland

Gießen, 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus- Liebig- Universität Gießen

Labor für Experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfall-,
Hand- und Wiederherstellungschirurgie

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thaqif El Khassawna

Gutachter: Prof. Dr. Ralf Middendorff

Tag der Disputation: 07.02.2022

„Die Fragen sind es, aus denen das, was bleibt, entsteht.“

Gewidmet Rudolf Mader

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

1.1 Allgemeiner Knochenaufbau

1.2 Zelluläre Komponenten des Knochens

1.2.1 Osteoblasten

1.2.2 Osteozyten

1.2.3 Osteoklasten

1.3 Frakturheilung

1.3.1 Inflammatorische Phase

1.3.2 Reparative Phase

1.3.3 Remodelling Phase

1.4 Osteoporose

1.4.1 Therapie der Osteoporose

1.5 Strontium

1.5.1 Pharmakokinetik von Strontium

1.6 Zielsetzung und Fragestellung

2. Materialien und Methoden

2.1 Experimentieraufbau

2.2 Knochenersatzmaterialien

2.3 Tiermodell

2.4 Ablauf

2.4.1 Osteoporoseinduktion

2.4.2 Chirurgische Intervention

2.4.3 Postoperative Versorgung

2.4.4 Euthanasie und Probengewinnung

2.5 Probenaufarbeitung

2.5.1 Protokoll der Technovit® 9100 Einbettung

2.5.2 Herstellung der Knochenschnitte

2.6 Histologie

2.6.1 Standardfärbungen

2.6.1.1 MOVAT-Pentachrom Färbung

2.6.1.2 Silbernitratfärbung

2.6.2 Immunhistochemische Färbungen

2.6.2.1 Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)

2.6.2.2 Osteoprotegerin (OPG)

2.6.2.3 Receptor activator of nuclear factor kappa- B ligand (RANKL)

2.6.2.4 Dickkopf 1 (DKK1)

2.6.2.5 Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE)

2.6.2.6 Sklerostin (SOST)

2.7 Histomorphometrie

2.8 Statistik

3. Ergebnisse

3.1 Klinische Verlaufsbeobachtung

3.2 Histomorphometrie der Standardfärbungen

3.2.1 Implantatdegradation

3.2.2 Knochengewebe

3.2.3 Neugebildetes Bindegewebe

3.2.4 Osteozytenzählung

3.3 Histomorphometrie der immunhistochemischen Färbungen

3.3.1 Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE)

3.3.2 Sklerostin (SOST)

3.3.3 Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)

3.3.4 Dickkopf 1 (DKK1)

3.3.5 Receptor activator of nuclear factor kappa- B ligand (RANKL)

3.3.6 Osteoprotegerin (OPG)

3.3.7 RANKL- OPG- Quotient

4. Diskussion

4.1 Ratte als Kleintiermodell

4.2 Klinische Relevanz des gewählten Modells

4.3 Biomaterialdegradation

4.4 Knochen- und Gewebebildung

4.5 Freisetzung von Strontium

4.6 Osteozyten

4.7 Marker für Knochenformation

5. Schlussfolgerung und Ausblick

6. Zusammenfassung

7. Summary

8. Appendix

9. Abkürzungsverzeichnis

10. Abbildungsverzeichnis

11. Tabellenverzeichnis

12. Literaturverzeichnis

13. Erklärung zur Dissertation

14. Danksagung

1. Einleitung

„Wenn Knochen mürbe werden“- dieser Slogan beschreibt plakativ das Krankheitsbild der Osteoporose. Durch den demografischen Wandel steigt das Risiko für diese systemische Erkrankung des Skelettsystems bei älteren Patienten. In Deutschland leiden nach Schätzungen ungefähr 7,8 Millionen Menschen über 55 Jahren an einer Osteoporose [Häussler et al 2007], wodurch jede dritte Frau und jeder fünfte Mann in diesem Alter im Laufe seines weiteren Lebens eine Fraktur ohne adäquates Trauma entwickelt [Bäbgen et al 2012]. Die damit verbundene signifikante Steigerung von Morbidität und Mortalität [Ray et al 1997] ist nur eine Folge davon. Weitere Beispiele für die Folgen von Osteoporose sind der Verlust von Lebensqualität, Selbstachtung und die Zunahme von Depressionen [Bartl et al 2009]. Ein anderer Aspekt, den die Osteoporose darstellt, ist der ökonomische Schaden: 2003 lagen die direkten und indirekten Kosten in Deutschland, welche mit der Erkrankung in Verbindung stehen, bei 5,4 Milliarden Euro [Häussler et al 2007]. In den USA kam es im Jahr 2005 zu über 2 Millionen Osteoporose-assoziierten Frakturen und damit zu Gesamtkosten von 17 Milliarden USD [Burge et al 2007]. Damit wird die Osteoporose zu einer der häufigsten Erkrankungen der Weltbevölkerung und eine der 10 wichtigsten des 21. Jahrhunderts.

In den letzten Jahren ist die Osteoporose Gegenstand massiver medizinischer Forschung. Allein zwischen 2010 und 2020 sind knapp 40000 neue wissenschaftliche Artikel zu diesem Thema auf Pubmed gelistet worden. Dadurch hat sich ein zunehmendes Verständnis für die Epidemiologie und Pathogenese entwickelt. Zudem konnten vielversprechende Ansätze für die Diagnose, Therapie und Prävention abgeleitet werden.

Die systemische Anti-Osteoporose-Therapie konnte mittlerweile signifikante Erfolge in der Verminderung der Frakturnrate zeigen [Pavone et al 2017], wodurch sich jedoch nicht alle Frakturen vermeiden lassen. Eine Frakturversorgung mit Behandlung der direkten Frakturumgebung stellt die vielversprechendste Therapieoption dar. Dabei sollte das eingesetzte Material den entstandenen Defekt nahezu vollständig ausfüllen und die neue Knochenbildung unterstützen. Daraus ergibt sich, dass neue synthetische Knochenersatzmaterialien über eine sehr gute Biokompatibilität und Osteointegration sowie über das Potential zur Unterstützung der Knochenheilung verfügen müssen [Haugen et al 2019]. Bei der Untersuchung dieser Materialien muss nun auch zunehmender Fokus auf die Osteozyten gelegt werden, da ihre Rolle noch weitgehend unbekannt ist.

1.1 Allgemeiner Knochenaufbau

Beim Menschen entfallen lediglich 10% des Körpergewichts, also ungefähr 7 Kilogramm (kg) auf das Skelettsystem. Obwohl das Knochengewebe äußerlich sehr hart und widerstandsfähig erscheint, kommt es zu ständigen inneren Umbauprozessen, insbesondere bei veränderter Beanspruchung. Neben der Stützfunktion und der Schutzfunktion für innere Organe stellen die Knochen den wichtigsten Calciumspeicher des Menschen dar. Außerdem befindet sich in ihnen das blutbildende rote Knochenmark. Die Knochen des menschlichen Skeletts haben zwar meist unterschiedliche Formen, jedoch einen identischen Aufbau. Lange Röhrenknochen beispielsweise bestehen aus einem Schaft (Diaphyse) sowie an beiden Seiten verdickten Endstücken (Epiphyse), zwischen welchen sich ein trichterförmiger Übergangsbereich (Metaphyse) befindet. An knöchernen Vorsprüngen (Apophyse) setzen Muskeln und Sehnen an. Zwischen der Epi- und Metaphyse liegt die sogenannte Epiphysenfuge, welche für das Längenwachstum des Knochens sorgt [Schiebler 2007]. Makroskopisch sind am Knochen zwei unterschiedliche Bauformen zu erkennen, die Kompakta und die Spongiosa. Als Kompakta wird die homogen erscheinende Rindenschicht (Cortikalis) bezeichnet, welcher die Spongiosa im Inneren des Knochens, ein gitterwerkartiges Gewebe aus Platten und Bälkchen (Trabekel) entgegensteht. Die Trabekelstruktur passt sich dynamisch der Belastung an, ist dabei aber immer so ausgerichtet, dass sie nur auf Druck oder Zug beansprucht wird [Lüllmann-Rauch 2012].

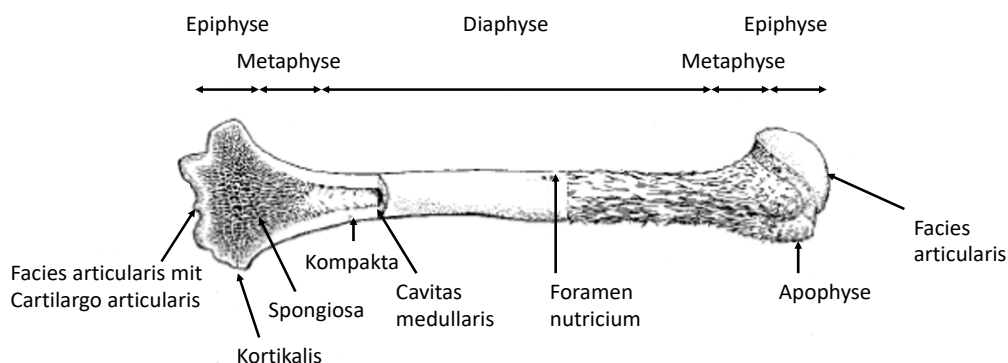


Abbildung 1: Aufbau eines langen Röhrenknochens

Der Röhrenknochen ist umhüllt von einer Knochenhaut (Periost), durch welche sich Gefäße zur Versorgung des Knochenmarks ziehen (Foramen nutricum). Die Diaphyse des Knochens besteht hauptsächlich aus Kompakta. In ihrem Inneren befindet sich die Cavitas medullaris (Markhöhle). Die trichterförmige Aufweitung der Diaphyse hin zur Epiphyse wird Metaphyse genannt. In diesem Bereich finden sich häufig auch die Ansatzpunkte für Sehnen und

Muskeln (Apophyse). Die Endstücke der Röhrenknochen werden Epiphysen genannt. Da sie in der Regel über Gelenke mit anderen Knochen verbunden sind, ist der gelenkbildende Anteil (Facies articularis) mit einer Knorpelschicht überzogen (Cartilago articularis). Die Epiphyse besteht ebenfalls nach außen aus hartem Knochen (Kortikalis) und besitzt im Inneren einen weichen trabekulären Knochen (Spongiosa) [Grafik aus Schiebeler 2007].

Die Hauptbestandteile des Knochens sind: anorganische Matrix (65%), welche hauptsächlich Hydroxylapatit enthält, sowie organische Matrix (35%). Analog zum Knorpelgewebe besteht die organische Matrix aus einer ungeformten Komponente (Proteoglykane und adhäsive Glykoproteine) und einer geformten Komponente (hauptsächlich Kollagen Typ I).

Nach der räumlichen Struktur der Extrazellulärmatrix werden die Knochen in Geflecht- und Lamellenknochen eingeteilt. Im Geflechtknochen liegen die Kollagenbündel unregelmäßig miteinander verflochten vor. Dieser tritt vor allem bei rascher Knochenbildung auf (bspw. in der embryonalen Entwicklung oder der Frakturheilung). Durch natürliche Umbauprozesse ersetzt der biomechanisch hochwertigere Lamellenknochen mit der Zeit den Geflechtknochen [Lüllmann-Rauch 2012].

Mikroskopisch betrachtet besteht der Lamellenknochen aus sich regelmäßig wiederholenden Bauelementen, den sogenannten Osteonen bzw. Havers-Systemen, mit einem zentralen Havers-Kanal, in dessen Inneren das Havers-Blutgefäß sowie begleitende Nervenfasern verlaufen. Der Havers-Kanal ist umgeben von vier - 20 konzentrisch angeordneten Lamellen, welche hauptsächlich aus Kollagen Typ I Fasern bestehen. Der Faserverlauf zweier benachbarter Lamellen ist dabei häufig gegenläufig und im rechten Winkel zueinander. Zwischen den Lamellen liegen Osteozyten mit ihren Fortsätzen. Der Abschluss des Osteons nach außen erfolgt über eine faserarme Kittlamelle (Linea cementalis). Vor allem im Bereich der Diaphyse wird die Kompakta stets von sogenannten Generallamellen umschlossen. Die vaskuläre Versorgung der Osteone erfolgt über die zentral verlaufenden Havers-Kanäle sowie die im rechten Winkel dazu verlaufenden Volkmann-Kanäle (Canales perforantes), welche vom Periost ausgehen [Aumüller et al 2010].

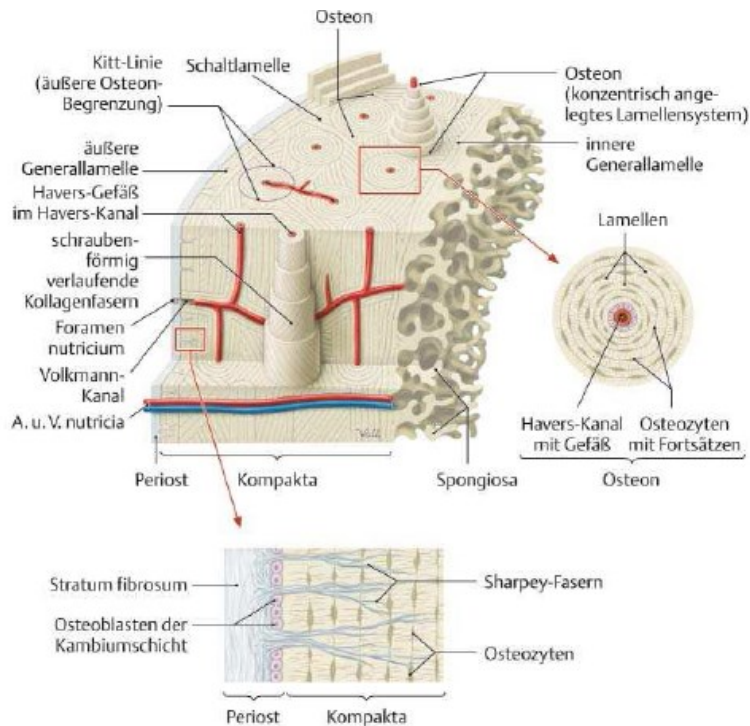


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Lamellenknochens am Beispiel der Kompakta eines Röhrenknochens

Die funktionellen Einheiten des Lamellenknochens (Osteone) verfügen über ein konzentrisch angeordnetes Lamellensystem mit einem zentralen Kanal. Zwischen den einzelnen Lamellen befinden sich Osteozyten, die mit ihren Fortsätzen untereinander in Kontakt stehen. Die Gefäßversorgung funktioniert über die vom Periost ausgehenden Volkmann-Kanäle in den Foramina nutriciae. Nach außen und innen befindet sich jeweils noch eine sogenannte Generallamelle, worauf das Periost (außen) und das Endost (innen) liegt. Das Stratum fibrosum aus kollagenem Bindegewebe ist über Sharpey-Fasern fest mit dem Knochen verbunden. Zwischen Knochen und Stratum fibrosum befindet sich das Stratum osteogenicum, welches chondrogene und osteogene Vorläuferzellen enthält. [Grafik aus Aumüller et al 2010]

1.2 Zelluläre Komponenten des Knochens

Um die unterschiedlichen Funktionen der Knochenformation und der Knochenresorption, der mineralischen Homöostase und der Knochenreparation zur gewährleisten, werden unterschiedlich spezialisierte Knochenzellen benötigt. Diese unterscheiden sich nicht nur in Morphologie, Funktion und charakteristischer Lokalisation, sondern auch in ihrer Herkunft [Buckwalter et al 1995, Rodan 1998]. Die drei Hauptzelltypen, welche für die Knochenhomöostase verantwortlich sind, sind Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten. Die zwei Zelllinien können in eine knochenaufbauende und eine knochenabbauende Funktion eingeteilt werden. Aus mesen-

chymalen Stammzellen und Vorläuferzellen (Osteoprogenitorzellen) reifen Osteoblasten, endostale Saumzellen und Osteozyten. Aus den hämatopoetischen Stammzellen reifen zirkulierende Monozyten, Preosteoklasten und Osteoklasten (Abbildung 3) [Lüllmann-Rauch 2012].

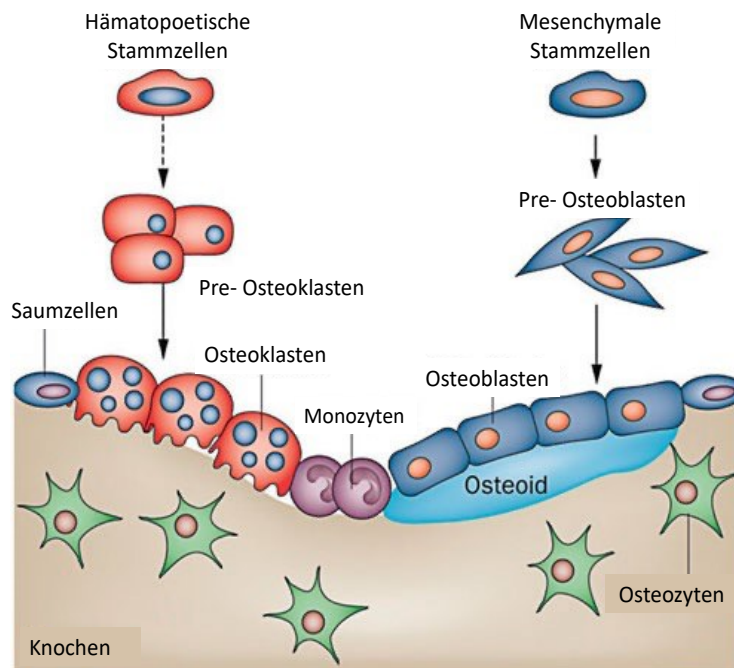


Abbildung 3: Klassifikation der Zellen des Knochens anhand ihrer Zelllinien

Aus den mesenchymalen Stammzellen entstehen über Osteoprogenitorzellen (Preosteoblasten) die Osteoblasten, endostale Saumzellen (Bone Lining Cells) und Osteozyten. Aus der hämatopoetischen Stammzelllinie entstehen über zirkulierende Monozyten und Preosteoklasten am Ende Osteoklasten [adaptiert nach Lian et al 2012].

Der sogenannte „bone remodelling Prozess“ beschreibt den kontinuierlichen Erhalt der strukturellen Integrität des Knochens durch die Entfernung von altem Knochen mit Hilfe der Osteoklasten sowie der Synthese von neuem Knochen durch Osteoblasten [Jilka 2003]. Das Bone-remodelling erfolgt über eine koordinierte Aktivierung von Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten und endostalen Saumzellen, welche eine sogenannte „basic multicellular unit“ (BMU) bilden [Eriksen 2010, Hauge et al 2001]. Wenn dieses System aus der Waage gerät, kann es zu verschiedenen Erkrankungen führen. Von Osteoporose spricht man, wenn die Knochenresorption die Knochenformation überwiegt. Im Gegensatz dazu kommt es zum Beschwerdebild der Osteopetrosis, wenn die Knochenformation die Knochenresorption überwiegt.

1.2.1 Osteoblasten

Osteoblasten sind einkernige, kubide, differenzierte Zellen, welche aus dem Knochenmark an die Knochenoberfläche migrieren, um dort organische Extrazellulärmatrix zu produzieren sowie zu mineralisieren. Diese Migration wird über verschiedene Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) reguliert [Mukherjee et al 2008]. Weiterhin haben sie eine regulatorische Funktion über die Osteoklastenaktivität [Caetano-Lopes et al 2007]. Die Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten funktioniert über „cross-talk“ und verschiedene Signalwege, wie beispielsweise Runx-related transcription factor 2 (Runx2) [Komori et al 1997]. Transforming growth factor – beta (TGF- β) fördert die Osteoblastendifferenzierung durch Extracellular signal-regulated kinases (ERK)-, Wnt- und BMP- Signalwege [Huang et al 2007]. Eine Fehlfunktion dieser Signalwege führt zu verschiedensten Erkrankungen wie Tumoren oder Osteoporose. Volldifferenzierte Osteoblasten sind durch die Expression von alkalischer Phosphatase (ALP) und Kollagen Typ I gekennzeichnet, welche von Bedeutung für den Knochenmatrixaufbau und die Mineralisation sind. Reife Osteoblasten produzieren außerdem eine ganze Reihe von Regulatoren für die Matrixmineralisation wie Osteocalcin, Osteopontin, Osteonectin oder Osteoprotegerin (OPG). Außerdem wird der Receptor activator of NF- κ B Ligand (RANKL) produziert, welcher für die Osteoklastendifferenzierung notwendig ist. Ebenfalls besitzen sie einen Parathormon- (PTH-) Rezeptor. Osteoblasten, welche nicht in Apoptose gehen, transformieren gegen Ende ihrer Lebensspanne entweder in Osteozyten, welche in die mineralisierte Matrix eingemauert werden oder sie werden zu endostalen Saumzellen, welche die komplette Knochenoberfläche bedecken [Eriksen 2010]. Endostale Saumzellen trennen die Oberfläche des Knochens von der direkten Umgebung und schützen dadurch den Knochen beispielsweise vor übermäßiger Resorption. Während die Zellen PTH ausgesetzt werden, beginnen sie als ersten Schritt des Knochenabbaus, die dünne Schicht noch nicht mineralisierte Matrix (Osteoid) abzubauen [Buckwalter et al 1995].

1.2.2 Osteozyten

Osteozyten sind der im Knochen vorwiegend auftretende Zelltypus. Im erwachsenen Skelett machen sie ungefähr 90% der Zellen aus [Buckwalter et al 1995]. Osteozyten stellen den Endpunkt der Osteoblastendifferenzierung dar, wobei der reife Osteoblast vollständig von Matrix umgeben ist. Lediglich 10-20% der Osteoblasten erreichen dieses Stadium [Aubin et al 1996]. Ihre Überlebensdauer beträgt dabei mehrere Jahre, im Vergleich dazu leben Osteoblasten oder Osteoklasten nur wenige Wochen bis Monate. Osteozyten zeigen eine einzigartige Morpholo-

gie mit einer sternförmigen Zellform und zahlreichen dendritischen Ausläufern, welche ein feines Netzwerk zwischen den einzelnen Lamellen des Knochens (Lakunen) formen (lakunär-kanalikunäres System). Über ihre Ausläufer stehen sie mit verschiedenen anderen Zelltypen, wie Osteoblasten, Osteoklasten oder Gefäßen in Verbindung [Turner et al 2002]. Die Dendriten sind in ihren Kanälen umgeben von Knochenflüssigkeit. Durch eine Art Cilien besitzen sie eine hohe Sensitivität für mechanische Signale. Die Sensitivität für solche mechanischen Signale (insbesondere Scherkräfte) übersteigt die von Osteoblasten [Klein-Nulend et al 2002]. Osteozyten sind zudem in der Lage, über die Ausschüttung von verschiedenen Molekülen wie Insulin-like Growth Factor (IGF), Osteocalcin, Sklerostin und NO darauf zu reagieren [Uzbekov et al 2012] und dementsprechend, entweder den Knochenaufbau oder -abbau, zu forcieren (Abbildung 4). Über die Phosphate-regulating neutral endopeptidase (PHEX) und Dentin matrix acidic phosphoprotein 1 (DMP1) wird der Fibroblast Growth Factor 23 (FGF23) reguliert, welcher wiederum Einfluss auf die Phosphathomöostase hat. Ein Fehler in der Bildung von PHEX oder DMP1 führt im Menschen daher zu einer Vitamin-D unabhängigen Rachitis [Zhang 2011, Liu 2007]. Ein weiteres, hauptsächlich von Osteozyten gebildetes Protein das Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) wirkt nicht direkt auf den FGF23, sondern inhibiert PHEX. Ein durch enzymatische Degradation erzeugtes Peptid aus MEPE sorgt außerdem für eine Inhibition der Matrixmineralisation [Boskey et al 2010]. FGF23 wirkt auf die Skelettmuskulatur und reguliert dort die ATP-Synthetase [Pesta et al 2016]. Das von Osteozyten ausgeschüttete, inflammatorische Zytokin Prostaglandin E2 (PGE2) stimuliert im Skelettmuskel Wachstums- und Reparaturmechanismen [Ho et al 2017]. Darüber hinaus verfügen Osteozyten, genau wie Osteoblasten, über einen Parathormonrezeptor. Unter Einfluss von PTH beginnen Osteozyten Cathepsin K und Tartrate Resistant Acid Phosphatase (TRAP) zu synthetisieren, welche normalerweise von Osteoklasten genutzt werden, um Knochen zu entfernen. Osteozyten beginnen damit ein Remodelling ihrer perlakunären/kanalikulären Matrix und regulieren darüber den Calciumhaushalt [Quing et al 2012].

Lange für passive Zellen gehalten, spielen Osteozyten eine zentrale Rolle in der Regulation des Knochen-Remodelling. Wie bereits oben beschrieben, besitzen Osteozyten die Möglichkeit, mechanische Signale in chemische umzuformen und weiterzuleiten. NO, PGE2 und ATP gehören dabei zu den am schnellsten freisetzbaren Antworten. NO wird über eine NO-Synthase hergestellt und inhibiert die Proliferation von frühen Osteoblasten, während es im Gegenzug die Osteoblastendifferenzierung vermittelt [Zaman et al 1999, Veziridis et al 2006]. PGE2 sorgt ebenfalls für eine Osteoblastendifferenzierung sowie für eine Induktion der Gesamtknochenbildung und Erhöhung der Gesamtknochenmasse [Raisz et al 1983, 1993, Nagata et al 1994].

Neben dieser schnellen Möglichkeit auf Reize zu reagieren, besitzen Osteozyten noch die Möglichkeit Wachstumsfaktoren auszuschütten. Die Bekanntesten sind dabei die Bone morphogenetic proteins (BMP). BMPs spielen eine zentrale Rolle bei der Osteogenese und dem Knochenumbau. Die Wirkungsweise erklärt sich über den TGF- β Signalweg [Harland 1994] sowie über den Hedgehog Signalweg [Yoshino et al 2016] und direkte Zytokin- Zytokin Interaktion [van der Kraan 2015].

Einer der wichtigsten Signalwege der von Osteozyten benutzt wird, ist der Wnt/ β -Catenin-Signalweg. Osteozyten exprimieren zahlreiche Modulatoren dieses Signalweges und regulieren die Osteoblastenaktivität über diesen Mechanismus. Die Aktivierung des kanonischen Wnt-Signalweges vermittelt Osteoblastendifferenzierung und Knochenformation [Gong et al 2001, Kato et al 2002]. Das Sklerostin ist ein spezifisches, von reifen Osteozyten produziertes Glykoprotein, welches durch das SOST-Gen kodiert wird [Winkler 2003]. Sklerostin ist ein negativer Regulator der Knochenformation und inhibiert den Wnt/ β -Catenin-Signalweg über Bindung an die Wnt – Corezeptoren low-density lipoprotein receptor- related proteins (LRP) 5 und 6. Normalerweise bindet der Wnt Ligand an den Rezeptor Frizzled, zusammen mit den Co-Rezeptoren LRP5/6, dadurch wird der Rezeptor phosphoryliert und das Protein Dishevelled aktiviert, welches im Gegenzug die Glykogen-synthase-kinase 3 (GSK3) inhibiert. Als Folge wird das Protein Axin aus seinem Komplex mit β -Catenin befreit. β -Catenin sammelt sich im Cytoplasma und im Zellkern an. Dort bindet es an Transkriptionsfaktoren und aktiviert die spezifischen Zielgene [Ott 2005]. Am Beispiel von Sklerostin wird β -Catenin durch die GSK3 phosphoryliert und über den Proteasomensignalweg abgebaut. Ein weiterer Inhibitor dieses Signalweges ist Dickkopf related Protein 1 (DKK1). DKK1 inhibiert die Wnt- Corezeptoren LRP5 und 6. Weiterhin besitzt DKK1 eine hohe Affinität für die Transmembranproteine Kremen1 und 2, welche ebenfalls den Wnt Signalweg modulieren [Niehrs 2006]. Das von Osteozyten exprimierte secreted- frizzled-related protein 1 (SFRP1) ist ein kompetitiver Antagonist zum Wnt-Liganden. Eine fehlende Funktion von SFRP1 führt zu erhöhter Knochenmasse und Mineralgehalt. Zusätzlich steigt die Osteoblastenproliferation und -differenzierung an [Bodine et al 2004].

Um das Knochenremodelling zu kontrollieren, reicht es nicht aus, die Osteoblastogenese zu regulieren. Es muss zusätzlich Einfluss auf die Osteoklastenaktivität genommen werden. Osteoklasten-Vorläuferzellen exprimieren Receptor activator of NF- κ B (RANK) auf ihrer Zelloberfläche. Dieser Rezeptor bindet an RANKL, der ebenfalls von Osteozyten exprimiert wird. Diese Bindung sorgt für die Differenzierung von Osteoklasten- Vorläufern zu reifen Osteoklasten [Kartsogiannis et al 1999]. Obwohl RANKL ebenfalls von Osteoblasten exprimiert wird,

konnte Nakashima et al [2011] zeigen, dass von Osteozyten erzeugtes RANKL entscheidend für ein gesundes Knochen-Remodelling ist. Ein weiterer Faktor für die Osteoklastenaktivierung ist der Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF). Im Gegensatz dazu steht Osteoprotegerin (OPG), ein löslicher Zytokinrezeptor aus der tumor necrose factor (TNF) –Rezeptorfamilie. Er bildet eine Rezeptorattrappe für den RANKL und hemmt somit die Osteoklastogenese [Ikeda et al 2001]. Daneben stellt NO einen sehr potenten Inhibitor der Osteoklastenaktivität dar und kann die Zahl der Osteoklasten deutlich senken. [Brandi et al 1995].

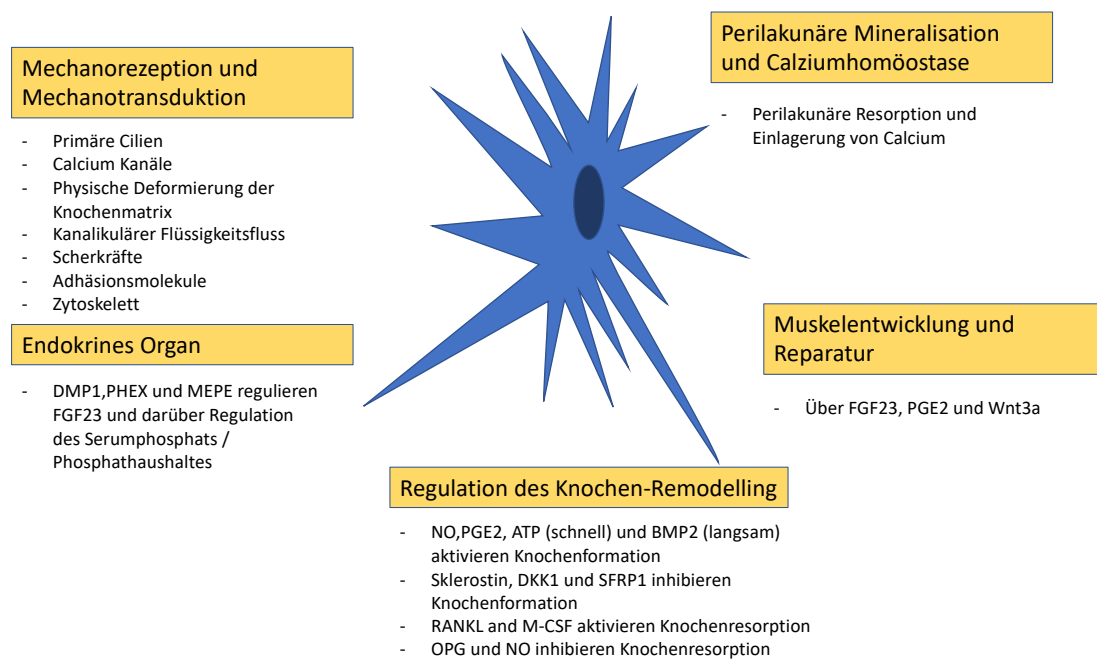


Abbildung 4: Funktionen des Osteozyten

Osteozyten haben zahlreiche Funktionen. Sie detektieren mechanische Signale (Mechanorezeption), wandeln diese in chemische Signale um (Mechanotransduktion) und leiten sie weiter. Als endokrines Organ nehmen sie Einfluss auf die Phosphathomöostase des Körpers über FGF23 und seine regulatorischen Proteine DMP1, PHEX und MEPE. Osteozyten dirigieren die Differenzierung und Aktivität von Osteoblasten über die Freisetzung von NO, PGE2, ATP und Wachstumsfaktoren wie BMP2. Über Sklerostin, DKK1 und SFRP1 haben sie hemmenden Einfluss auf die Knochenformation. Über RANKL und M-CSF haben sie außerdem die Möglichkeit die Aktivität und Reifung von Osteoklasten zu steuern und den Knochenabbau zu forcieren. Einen hemmenden Einfluss auf die Osteoklasten üben Osteozyten über OPG und NO aus. Der Tonus und die Proliferation von Skelettmuskelzellen wird über FGF23 sowie PGE2 und Wnt3a beeinflusst. Durch das Remodelling der perilakunären/kanalikulären Matrix von Osteozyten regulieren diese den Calciumhaushalt. [Grafik adaptiert von Rochefort 2014]

1.2.3 Osteoklasten

Bei Osteoklasten handelt es sich um mehrkernige Riesenzellen, welche auf den Abbau von mineralisierter Matrix spezialisiert sind und durch die Fusion von Progenitorzellen entstehen. Die Differenzierung und Aktivität wird durch den M-CSF sowie RANKL und OPG reguliert [Teitelbaum 2000]. Wie oben beschrieben, unterstützt RANKL die Osteoklastogenese, während OPG diese inhibiert. Die Balance zwischen RANKL und OPG ist deshalb ein Ausdruck für die Quantität des resorbierten Knochens [Hofbauer et al 1999]. Die Knochenresorption des aktiven Osteoklasten findet auf der Knochenmatrix-zugewandten Seite statt. Die Haftung des Osteoklasten erfolgt im Randbereich zur Matrix hin über Integrine. Dieser Bereich wird als Versiegelungszone bezeichnet und ist gegenüber der Umgebung abgeschlossen. An der Kontaktfläche bildet der Osteoklast einen dichten Faltenbesatz (ruffled border) aus. Durch Protonenpumpen in der Membran des Osteoklasten wird ein saures Milieu in der (Howship-) Lakune erzeugt. Ein sinkender pH-Wert in diesem Bereich sorgt für die Knochendemineralisation und -degeneration. Die einzelnen Fragmente werden dann durch die Osteoklasten aufgenommen und via Transzytose durch den Osteoklasten geschleust, um dann beispielsweise Reparaturvorgängen zur Verfügung gestellt zu werden [Lüllmann- Rauch 2012, Buckwalter 1995].

1.3 Frakturheilung

Der Vorgang der Frakturheilung ist ein komplexer, biologischer Prozess der die Rekrutierung von Zellen (Genexpression), die Synthese von verschiedenen Reparaturkomponenten, die Regenerierung des ursprünglichen Gewebes und die Wiederherstellung der mechanischen Integrität erfordert [Marsell 2011]. Unabhängig von der hohen Regenerationskapazität des Knochengewebes, schlägt dieser Prozess manchmal fehl. Dies kann zahlreiche Ursachen haben, wie beispielsweise eine unvorteilhafte anatomische Position der Fraktarenden zueinander. In diesem Falle kann es zu einer verzögerten Knochenbruchheilung kommen, oder schlimmer noch zu einer Pseudarthrosenbildung oder gänzlichen Nichtvereinigung der Knochenenden [Marsell 2010]. Die Frakturheilung stellt einen Prozess dar, in welchem die Aspekte der embryonalen Skelettentwicklung rekapituliert werden [Gerstenfeld et al 2003]. Dabei kann man die Frakturheilung in 3 verschiedene Phasen unterteilen:

1. Inflammatorische Phase
2. Reparative Phase
3. Remodelling Phase

1.3.1 Inflammatorische Phase

Initial durch das Trauma, kommt es zu einer Fraktur durch das Knochengewebe. Gleichzeitig kommt es zur Zerreißung von Blutgefäßen und des knochenumgebenden Weichgewebes. Dies führt zu einer meist starken Blutung und Ausbildung des Frakturhämatoms. Durch die unterbrochene Blutversorgung wird ein hypoxisches Milieu erzeugt. Diese Faktoren triggern die inflammatorische Antwort [Kolar et al 2010]:

Es werden Cytokine und eine Reihe von Wachstumsfaktoren wie tumor necrose factor α (TNF- α), platelet derived growth factor (PDGF) und BMP werden freigesetzt und locken T-Lymphozyten und Makrophagen/Monozyten an. Diese wiederum verstärken die Inflammation noch weiter, unter anderem über die Ausschüttung von Interleukin 1 (IL-1) und IL-6 [Andrew et al 1994]. Dadurch werden mesenchymale Stammzellen rekrutiert. Diese MSC wiederum werden durch Faktoren wie PDGF stimuliert, das von den degranulierten Thrombozyten im geronnenen Hämatom ausgeschüttet wird. Es kommt zur Differenzierung in Chondrozyten und Osteoblasten [Frost 1989, Bolander 1992].

1.3.2 Reparative Phase

Die reparative Phase überlappt die inflammatorische Phase und trägt damit zur Entwicklung von neuen Blutgefäßen bei. Die eingewanderten Chondrozyten bedecken zuerst die Frakturenden und beginnen aus Knorpelgewebe (Kollagen Typ II) einen weichen Kallus zu formen. Dieser gibt der Fraktur eine erste Grundstabilität. Nach 7 bis 10 Tagen erreicht die Bildung des weichen Kallus ihren Höhepunkt [Einhorn 1998]. Gleichzeitig kommt es zur Zellproliferation und intramembranösen Ossifikation im Bereich des Periosts, wodurch der externe, weiche Kallus gebildet wird [Marsell 2011]. Im Laufe der Zeit beginnen die Chondrozyten hypertroph zu werden und kalzifizieren die Extrazellulärmatrix. Der anfänglich weiche Kallus fängt an rigider zu werden. Der kalzifizierte Knorpel wird durch Geflechtknochen ersetzt und der harte Kallus beginnt sich auszubilden [Gerstenfeld et al 2006]. Die Frakturheilung erfolgt über einen direkten und einen indirekten Mechanismus, abhängig davon, ob es sich um eine stabile Umgebung (Gipsschiene, intramedulläre Nagelung, etc.) handelt oder nicht. Die direkte Frakturheilung, unter stabilen Umständen, erfolgt über intramembranöse Ossifikation. Die indirekte Frakturheilung erfolgt über enchondrale und intramembranöse Ossifikation [Marsell 2011, Gerstenfeld et al 2006].

Intramembranöse Ossifikation

Intramembranöse Ossifikation beschreibt den Prozess der Knochenentwicklung auf Grundlage von bindegewebigen Membranen. In der Embryonalentwicklung ist dieser Prozess vorherrschend in der Bildung der Schädelknochen oder des Kiefers [Zhang et al 2018]. In der Frakturheilung ist die intramembranöse Ossifikation durch die Differenzierung von MSC zu Osteoblasten gekennzeichnet. Lokalisiert ist diese Form der Ossifikation im Bereich des harten Kallus. Die neuen Osteoblasten beginnen parallel mit der Synthese von neuer Knochenmatrix und kalzifizieren diese im Anschluss [Thompson et al 2002].

Enchondrale Ossifikation

Enchondrale Ossifikation ist gekennzeichnet durch die Differenzierung von MSC in Chondrozyten, welche zuerst eine knorpelige Matrix synthetisieren, die kalzifiziert. Im Anschluss wird diese Matrix durch Knochen ersetzt. Dies erfolgt über die Einwanderung von Osteoprogenitorzellen über die Blutgefäße. Diese Zellen differenzieren und beginnen einen harten Kallus zu formen. Einströmende Osteoklastenprogenitorzellen und reife Osteoklasten beginnen gleichzeitig den kalzifizierten Knorpel zu resorbieren. Der nun weiter „reifende“, knöcherne Kallus unterliegt währenddessen Umbauvorgängen, um am Ende wieder die ursprüngliche Architektur und Funktion des Knochens zu erlangen [Wang et al 2017].

1.3.3. Remodelling Phase

Das Remodelling beginnt bereits in der Mitte der Reparationsphase und dauert noch lange nach wiederhergestellter Funktion an. Dabei wird der Geflechtknochen in Lamellenknochen umgebaut. Dieser Umbauprozess besteht aus einem engen Zusammenspiel von Osteoblasten und Osteoklasten. Ein Trupp Osteoklasten frisst einen Bohrkanal in der Breite eines Osteons in die Knochenmatrix, wobei potenziell im Weg liegende Osteozyten bei diesem Prozess durch Apoptose untergehen. Bindegewebe, Gefäße und Nervenfasern wachsen in den neuen Kanal ein. Die nachfolgenden Osteoblasten synthetisieren nacheinander die Osteoidlamellen, wobei einige der Osteoblasten zu Osteozyten differenzieren und zwischen den einzelnen Lamellen eingemauert werden [Lüllmann-Rauch 2012]. Dieser Prozess dauert über mehrere Jahre an, abhängig von Faktoren wie Alter, Allgemeinzustand und Beanspruchung [Brighton 1986].

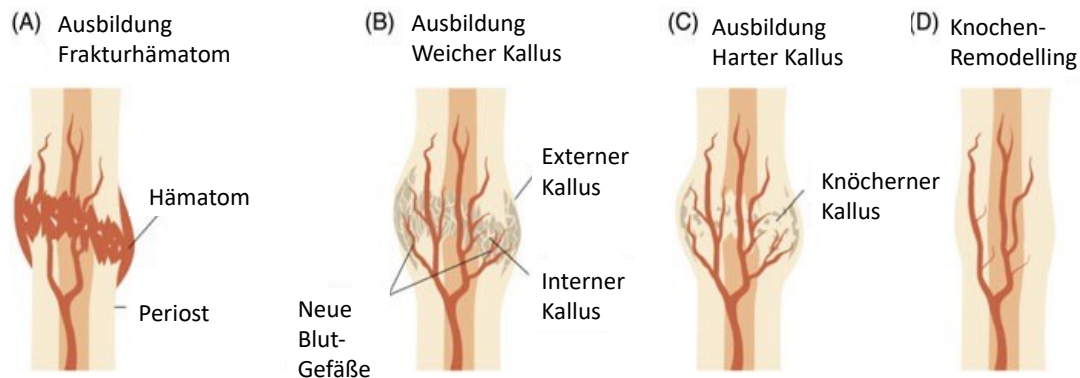


Abbildung 5: Schematische Knochenbruchheilung

Initial durch die Fraktur kommt es zur Zerstörung der Knochenmatrix und der Blutgefäße, dies führt zur Ausbildung eines Frakturhämatoms (A). Es kommt zur Einsprossung von Gefäßen, darüber wandern Fibroblasten und mesenchymale Stammzellen ein und bilden Granulationsgewebe über den Frakturrenden. Innerhalb der ersten Tage bis Wochen entsteht vom Periost ausgehend ein externer Kallus. Von eingewanderten Chondrozyten und Osteoblasten wird ein innerer Kallus gebildet, wobei das produzierte Typ II Kollagen (Knorpelgewebe) eine primäre Stabilität liefert (B). Über enchondrale Ossifikation bildet sich nun der harte, knöcherne Kallus aus Geflechtknochen (C). Das Remodelling beginnt bereits in der Mitte der Reparationsphase und dauert noch lange nach wiederhergestellter Funktion an. Es kommt zum funktions- und beanspruchungsadaptierten Umbau von Geflecht- in Lamellenknochen (D). [adaptiert nach Carano et Filvaroff 2003]

1.4. Osteoporose

Osteoporose ist eine systemische Erkrankung, die durch die Abnahme der Knochenmasse, der Minderung von Knochengewebe und der Störung der Knochenmikroarchitektur gekennzeichnet ist. Es kommt zu einer Verminderung der Knochenstärke und zu einem erhöhten Frakturrisiko [Consensus Development Conference 2000].

Osteoporose ist die häufigste Knochenerkrankung des Menschen und damit ein gesundheitliches Hauptproblem der Gesellschaft. Die Erkrankung tritt häufiger bei Kaukasiern, Frauen und älteren Menschen auf. Problematisch an der Osteoporose ist die Tatsache, dass sie stumm verläuft bis eine Fraktur auftritt. Diese wiederum sorgt für einschneidende, sekundäre Gesundheitsprobleme und kann sogar für den Tod verantwortlich sein [Cosman et al 2015]. Es wird beispielsweise angenommen, dass es weltweit pro Jahr zu 2 Millionen osteoporose-assoziierten Hüftfrakturen kommt, Tendenz steigend, aufgrund des demografischen Wandels [Cooper et al

1992]. Zeitlebens unterliegt der Knochen dem Knochenremodelling. Die Menopause und fortschreitendes Alter führen zu einer Dysbalance zwischen Resorption und Neubildung von Knochengewebe (Abbildung 6). Dabei gibt es bestimmte Faktoren, welche die Resorption unterstützen und gleichzeitig die Neubildung hemmen. Diese Faktoren sind mit einem erhöhten Osteoporoserisiko verbunden und treten beispielsweise bei Alterungsprozessen oder bei der Unterversorgung mit weiblichen Sexualhormonen auf. Des Weiteren können aber auch spezielle Therapien, wie eine Dauertherapie mit Glucokortikoiden die Knochenneubildung herabsetzen. [Sözen et al 2017].

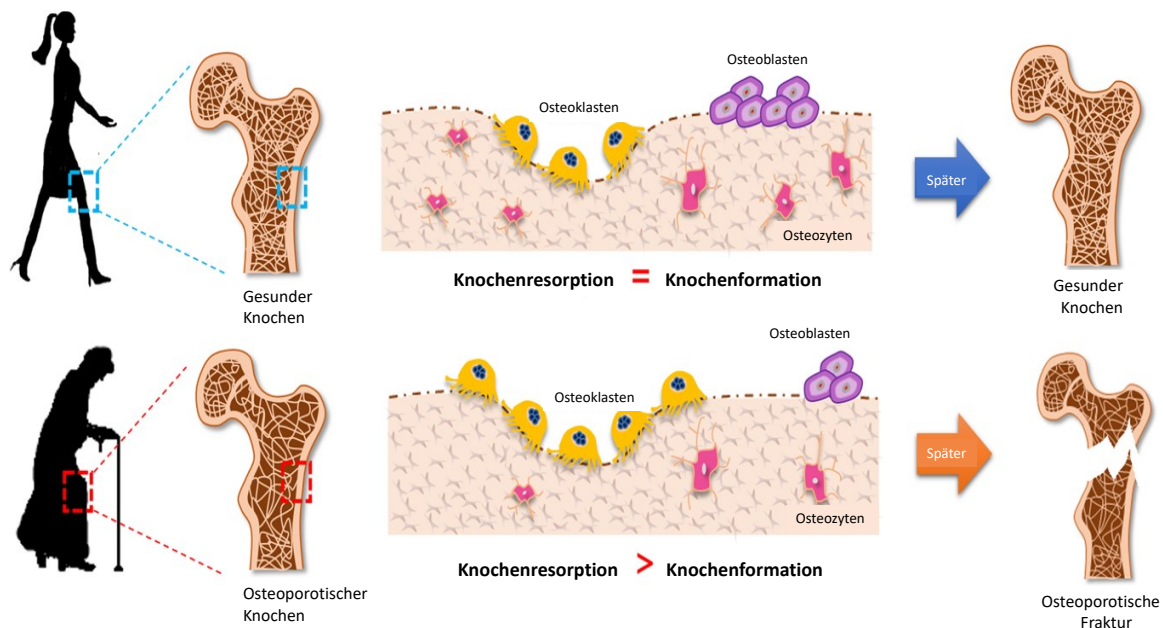


Abbildung 6: Schematischer Vergleich von gesundem und osteoporotischem Knochen

Im gesunden Knochen ist die dauerhaft stattfindende Knochenresorption und -neubildung ein ausgewogener Prozess. Dies hat zur Folge, dass bei einem inadäquaten Trauma der Knochen intakt bleibt und es zu keiner Verletzung kommt. Im osteoporotischen Knochen dagegen sind die Knochenmasse sowie das Knochengewebe vermindert. Ursache dafür ist ein Ungleichgewicht in der Knochenresorption und dem Aufbau (Resorption überwiegt den Aufbau). Dies führt mit Fortschreiten der Erkrankung zu Frakturen bei bereits kleineren, inadäquaten Traumata [adaptiert nach Chang et al 2019].

Aufgrund der unterschiedlichen grundlegenden Mechanismen unterteilt man die Osteoporose in 2 Hauptgruppen:

Primäre Osteoporose

Die primäre Osteoporose teilt sich in 2 Subtypen. Die Typ 1 Osteoporose wird auch als postmenopausale Osteoporose bezeichnet und wird durch einen Mangel an Östrogen verursacht. Von dieser Form sind mehr Frauen als Männer betroffen (Männer/Frauen-Ratio 4/5,7) [Cosman et al 2015]. Die Typ 2 primäre Osteoporose wird als senile Osteoporose bezeichnet und bezeichnet den Verlust von Knochenmasse aufgrund des Alterungsprozesses des Organismus [Hannan et al 2000].

Sekundäre Osteoporose

Die sekundäre Osteoporose entsteht durch den Einfluss von verschiedenen Erkrankungen, Medikationen und Lifestyle-Änderungen. Beispiele für Erkrankungen sind: Zystische Fibrose, Cushingsyndrom, Diabetes mellitus I & II und COPD. Medikamente wie Glucokortikoide (bei Einnahme > 3 Monate von mehr als 5mg Prednison), Tamoxifen und zahlreiche Chemotherapeutika führen ebenfalls zu einer Osteoporose. Lifestyle-Gewohnheiten wie Rauchen, übermäßiger Alkoholkonsum, Immobilität und Vitamin-D-Insuffizienz werden als Osteoporose-begünstigende Faktoren bezeichnet [Watts et al 2010].

In der klinischen Anwendung sind, bezogen auf den Patienten, eine gute Anamnese und körperliche Untersuchung entscheidend, um eine Osteoporose zu detektieren. Daneben stehen auch apparative Maßnahmen wie Knochendichtemessungen und Röntgen/CT- Diagnostik zum Ausschluss von bereits stattgefundenen Frakturen zur Verfügung. Eine Laboruntersuchung, um eine sekundäre Osteoporose herauszufiltern, sollte bei Verdacht durchgeführt werden. Von Bedeutung sind dabei Parameter wie das Thyroidea-stimulierende Hormon (TSH), der Vitamin D-Spiegel oder das PTH [Kanis et al 2008]. Bei entsprechendem Risiko sollte eine individuelle Einschätzung des Sturzrisikos erfolgen [Robertson et al 2002]. Osteoporose ist eine vermeidbare und therapierbare Erkrankung, aber aufgrund der Tatsache, dass sie stumm verläuft bis zum Erstereignis, werden viele Patienten nicht diagnostiziert oder erhalten keine effektive Therapie in der Frühphase der Erkrankung [Sözen et al 2017].

1.4.1 Therapie der Osteoporose

Zur Therapie der Osteoporose gibt es eine Reihe von verschiedenen Ansätzen. Fundamentale Bestandteile aller Therapien sind dabei allgemeine Maßnahmen wie Knochen- und Muskelkräftigungsübungen, Karenz von Alkohol und Tabakkonsum, sowie das Minimieren von Risi-

kofaktoren für Stürze. Um eine zusätzliche Resorption aufgrund von Calciummangel zu verhindern, wird eine tägliche Einnahme von 1-1,2g Calcium/ Tag für Patienten über 50 empfohlen [Moyer 2013]. Vitamin D ist notwendig für die Calciumaufnahme sowie für die Knochengesundheit und die Muskelperformance. Viele ältere Patienten leiden unter einem Vitamin D Mangel, daher kann nach Messung des Serum- Vitamin D eine Therapie mit Nahrungsergänzungsmitteln erwogen werden [Bischoff-Ferrari 2004]. Die medikamentöse Osteoporosetherapie kann in 3 unterschiedliche Wirkmechanismen unterteilt werden:

1. Anti-Katabole Osteoporosetherapie

Die bekanntesten Vertreter dieses Mechanismus sind die Bisphosphonate sowie der RANKL-Antikörper. Bisphosphonate sind eine weitverbreitete Therapie für osteoporotische Patienten [Larsson 2014]. Ihre Wirkung entfalten sie über die Verlangsamung der Knochenresorption durch die Inhibition der Osteoklastenaktivität [Saag et al 1998]. Das wiederum führt dazu, dass Bisphosphonate ebenfalls in der Therapie von Osteoporose-assoziierten Frakturen eingesetzt werden. Eine weitere anti-katabole Therapie ist der Einsatz von humanem, monoklonalem RANKL-Antikörper. Dieser verhindert die Differenzierung von Osteoklasten-Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten und vermindert dadurch die Knochenresorption [Cummings et al 2009].

2. Anabole Osteoporosetherapie

Anti-resorptive, beziehungsweise anti-katabole Medikamente stellen einen guten Therapieansatz dar. Trotzdem wurde viel Aufmerksamkeit in die Entwicklung von anabolen Medikamenten gesteckt. Ziel ist es dabei vor allem die Knochendichte zu erhöhen und die Mikroarchitektur des Knochens wiederherzustellen. Eines der Medikamente, welches über diesen Mechanismus wirkt, ist Parathormon (PTH) [Neer et al 2001]. Seine Wirkung beruht auf der Menge und der Wirkdauer. Wenn es dauerhaft eingenommen wird, kommt es zu einer gesteigerten Knochenresorption. Wird es jedoch intermittierend eingenommen lässt sich durch eine Aktivierung der Osteoblasten der Knochenaufbau erhöhen [Hock et al 1992]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass es zum gesteigerten Recruitment und zur Differenzierung von Chondrozyten kommt [Kakar et al 2007].

3. Kombination aus anti-katabolen und anabolen Effekten in der Osteoporosetherapie

Strontium-Ranelat ist ein Vertreter dieser Gruppe. In vielen europäischen Ländern hat das Medikament eine Zulassung in der Osteoporosetherapie. Seine Wirkungsweise funktioniert über die Kombination von anti-katabolen und anabolen Effekten [Cosman et al 2014]. Der anabole

Effekt besteht in der gesteigerten Differenzierungsrate von Pre-Osteoblasten zu Osteoblasten sowie durch Osteoblastenmodulation [Choudhary et al 2007]. Der anti-katabole Effekt entsteht durch die Inhibierung der Osteoklastenformation [Atkins et al 2009].

1.5 Strontium

Strontium ist ein chemisches Element. Es hat das Elementsymbol Sr und trägt die Ordnungszahl 38. Man ordnet es den Erdalkalimetallen zu. Da es sich um ein sehr weiches und reaktionsfreudiges Metall handelt, kommt es in der Natur nicht frei vor, sondern stets in Verbindungen. Der menschliche Körper nimmt Strontium wie Calcium auf. Strontium besitzt jedoch im menschlichen Körper keine bekannte Bedeutung. Durch seine Ähnlichkeit zu anderen chemischen Elementen ist es für den menschlichen Körper nicht schädlich [Cabrera et al 1999].

Das Interesse an den Effekten von Strontium auf den Knochen hat während des letzten Jahrzehnts massiv zugenommen. Ursächlich dafür ist die Entwicklung des vielversprechenden Medikaments Strontium-Ranelat. Die Neuerung bei Strontium-Ranelat ist die Wirkung auf den Knochen. Es kommt zu einer kombinierten Wirkung aus Steigerung der Knochenformation durch Osteoblasten und gleichzeitiger Inhibierung des Knochenabbaus durch Hemmung der Osteoklasten [Querido et al 2009]. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass es durch Therapie mit Strontium-Ranelat bei Frauen mit postmenopausaler Osteoporose zu signifikant weniger Frakturen führen kann. Ebenfalls zeigte sich eine signifikante Steigerung der Knochenmasse [Meunier et al 2004].

1.5.1 Pharmakokinetik von Strontium

Strontium wird vom Menschen hauptsächlich über den Gastrointestinaltrakt aufgenommen. Der Aufnahmeweg ist dabei der Gleiche, über den Calcium in den Körper gelangt [Sips et al 1996]. Das aufgenommene Strontium wird nahezu komplett in neugeformter Knochenmatrix des Knochens eingelagert [Boivin et al 1996]. Der wichtigste Ausscheidungsweg läuft über das renale System. Ein weiterer Weg der Exkretion ist über den Intestinaltrakt [Leeuwenkamp et al 1990]. Bezüglich der Interpretation der Studienergebnisse von Knochenaufbau und Knochenabbau, in Kombination mit Strontium, muss man die Ergebnisse im Kontext mit der Tatsache beurteilen, dass die meisten Studien an Nagetieren durchgeführt wurden [Aerssens et al 1998]. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass bei einer täglichen Einnahme von 3g Strontiummalonat/kg Körpergewicht und Tag, der Strontiumgehalt im Knochen um 9mg/g Knochen ansteigt [Raffalt et al 2008]. Weiterhin konnte in Experimenten mit Primaten bewiesen werden, dass das durchschnittliche Sr/Ca- Verhältnis im Knochen bis auf 1/10 ansteigen kann, bei oraler

Strontiumranelat-Aufnahme. Nach Beendigung der Therapie wurde das Strontium wieder relativ schnell vom Körper ausgeschieden [Boivin et al 1996]. Wie bereits vielfach beschrieben, verfügt Strontium über einen Dual-Mechanismus. In Studien konnte gezeigt werden, dass Strontium beispielsweise den Calcium-sensing receptor (CaSR), welcher auf der Membranoberfläche von Osteoblasten und Osteoklasten lokalisiert ist, stimuliert [Fromigue et al 2009]. Durch die Aktivierung dieser Rezeptoren werden Signalkaskaden ausgelöst, welche zur Differenzierung und Aktivierung von Osteoblasten führen. Gleichzeitig sorgt die Stimulation von CaSR in Osteoklasten dafür, dass sich diese zurückziehen und die Knochenresorption inhibiert wird [Yamaguchi et al 2008]. Ein weiterer Mechanismus ist die Stimulation der OPG-Produktion durch Osteoblasten. Dies führt zu einer Verminderung der Osteoklastenaktivität und Osteoklastenreifung über das RANK-RANKL-System [Atkins et al 2009].

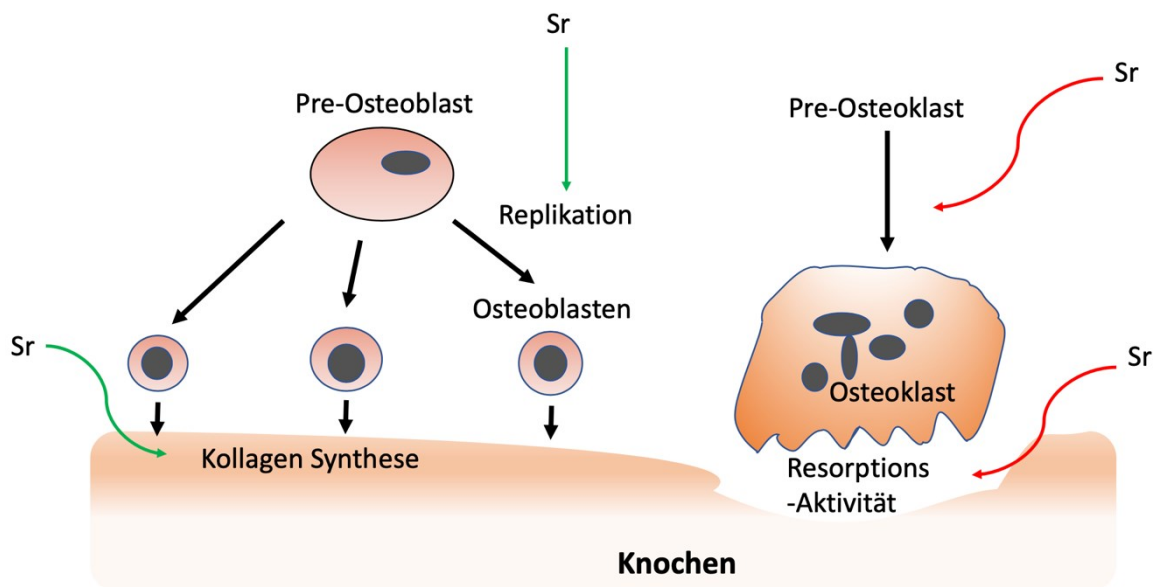


Abbildung 7: Mechanismen der Wirkung von Strontium auf Knochenzellen

Strontium stimuliert die Pre-Osteoblasten Replikation, was zu einer Erhöhung der Matrix Synthese führt (grüne Pfeile). Im Gegensatz dazu hemmt Strontium die Osteoklastendifferenzierung und -aktivität (rote Pfeile) [angelehnt an Marie et al 2006].

1.4 Ziel und Fragestellung

Ziel dieser Studie ist es, den osteoporotischen Knochenstatus des Menschen im Tiermodell mit Ratten standardisiert und reproduzierbar zu rekapitulieren. Im osteoporotischen Rattenmodell sollte ein critical-size Defekt im Bereich der distalen Metaphyse des Femurs erzeugt werden. Um eine verbesserte Knochenheilung zu Erreichen wird die metaphysäre Fraktur mit verschiedenen Knochenersatzmaterialien aufgefüllt. Besondere Beachtung galt dabei dem zugesetzten Strontium, welches für seine osteoinduktive und anti-osteoporotische Wirkung bekannt ist [Reginster et al 2007].

Zusammengefasst sollte folgende Fragestellung mit Hilfe dieser Studie untersucht werden:

Hat Strontium in der direkten Umgebung von Osteozyten Einfluss auf den Stoffwechsel und deren Rolle bei der Knochenbruchheilung von critical-size Defekten im osteoporotischen Knochen?

Folgende Subhypothesen sollen dabei zur Beantwortung bestätigt oder widerlegt werden:

1. Strontium hat einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl von Osteozyten in der direkten Umgebung des strontiumhaltigen Knochenersatzmaterials.
2. Strontium hat einen direkten Einfluss auf die Expression von Markern für die Knochenformation in Osteozyten, in der direkten Umgebung von strontiumhaltigen Knochenersatzmaterialien.

Diese experimentellen Untersuchungen stellen einen weiteren Schritt hin zur klinischen Anwendbarkeit von neuen Knochenersatzmaterialien dar. Diese sollen durch lokale osteoinduktive Prozesse die Knochenheilung von osteoporotischen Knochen fördern. Durch die standardisierte Nutzung von semi-automatischen Auswertungsmethoden der histologischen Färbungen konnte der subjektive Fehler minimiert werden.

2.Materialien und Methoden

2.1 Experimentieraufbau

75 weibliche Sprague Dawley Ratten wurden randomisiert in 5 verschiedene Versuchsgruppen unterteilt: (1) Calciumphosphat-Zement (CPC), (2) Strontiumhaltiger Calcium-Phosphat-Zement (SrCPC), (3) Kompaktes Xerogel (B30), (4) Xerogel mit makroporösem Gerüst (ScB30), (5) Strontiummodifiziertes Xerogel mit makroporösem Gerüst (ScB30Sr20). Die Ratten wurden einer bilateralen Ovariectomie unterzogen. Parallel dazu erhielten die Versuchstiere eine multidefizitäre Diät (vgl. 2.4.1) zur Induktion eines osteoporotischen Knochenstatus. Während eines erneuten chirurgischen Eingriffs wurde ein 4 mm keilförmiger Defekt im Bereich der Metaphyse des Femurs gesetzt (Abbildung 8). Dieser wurde mittels Plattenosteosynthese stabilisiert, analog zu einem von Alt et al. [2013] etablierten Modell. Im Anschluss wurde der Defekt mit dem jeweiligen Knochenersatzmaterial aufgefüllt. Die Probenentnahme und Euthanasie erfolgten 6 Wochen postoperativ. Nach der Einbettung wurden die Präparate analysiert. Ziel war dabei mittels Histomorphometrie und Immunhistochemie, die Osteozyten in der direkten Umgebung des Knochenersatzmaterials in der Defektregion zu untersuchen (vgl. Abbildung 9).



Abbildung 8: 3D-Modell des menschlichen Femurs mit Plattenosteosynthese. Ein keilförmiger Defekt () im Bereich der Metaphyse wurde mit Knochenersatzmaterial (**) aufgefüllt.*

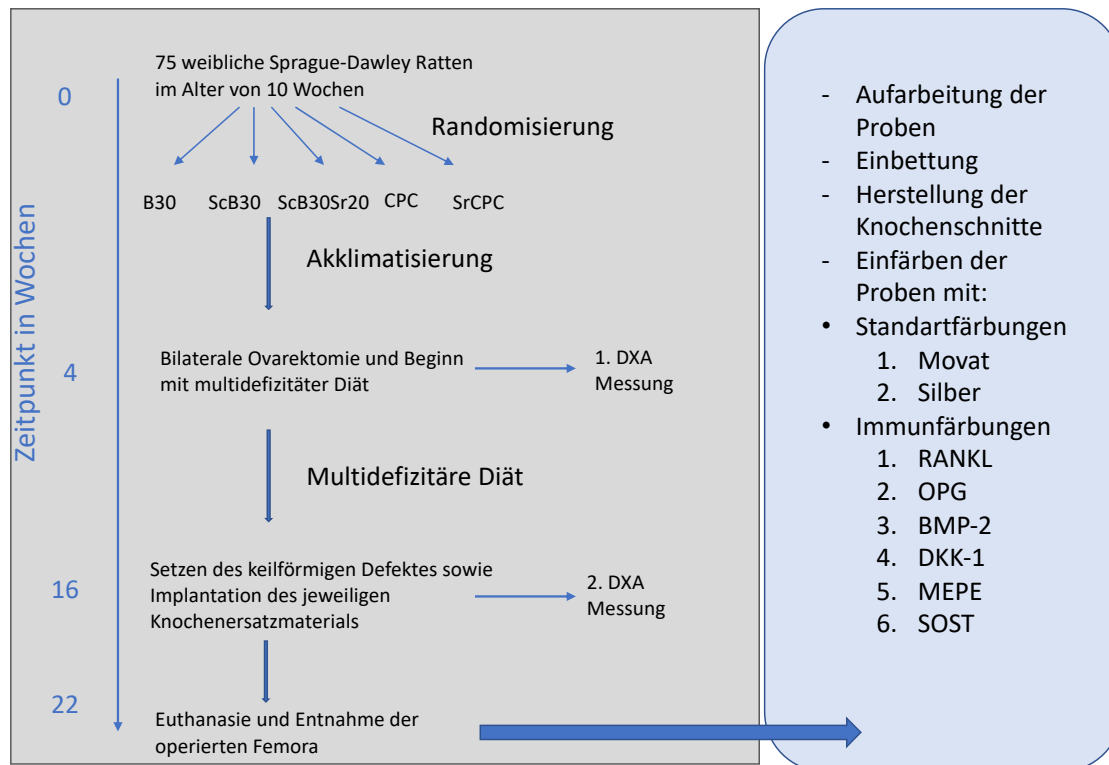


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Experimentieraufbaus

2.2 Knochenersatzmaterialien

Die nachfolgenden Knochenersatzmaterialien wurden im Rahmen des Sonderforschungsbereichs/Transregio 79 von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. rer. nat. Michael Gelinsky (Zentrum für Translationale Knochen-, Gelenk- und Weichgewebeforschung Universitätsklinikum Carl Gustav Carus und Medizinische Fakultät der Technischen Universität Dresden) entwickelt.

Calciumphosphat-Zement (CPC)

Beim CPC handelt es sich um einen erstmals von Driessens et al. [1997] beschriebenen Calciumphosphat-Zement. Grundlage bildete ein Zement (InnoTere, Dresden, Deutschland) mit 58% α -Tricalciumphosphat (α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), 24% Calciumhydrogenphosphat (CaHPO_4), 8,5% Calciumcarbonat (CaCO_3) sowie 8,5% Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Direkt vor der Implantation wurde das Pulver mit einem 4%-igen Phosphatpuffer (Na_2HPO_4) im Verhältnis von 0,4 ml/g von Hand vermischt.

Strontiumhaltiger Calcium-Phosphat-Zement (SrCPC)

Im Falle des SrCPC wurde, wie bereits von Schumacher et al. [2013] beschrieben, das Calciumcarbonat (CaCO_3) durch Strontiumcarbonat (SrCO_3 , 99,994%, Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland) ersetzt, sodass das Verhältnis Sr/Ca 0,123 betrug. Ebenfalls erfolgte die manuelle

Herstellung einer Paste, mithilfe eines 4%-igen Phosphatpuffers (Na_2HPO_4) direkt vor der Implantation. Dazu wurden Flüssigkeit und Pulver im Verhältnis von 0,35ml/g gemischt.

Kompaktes Xerogel (B30)

B30 setzt sich aus 70% Silikat und 30% Kollagen zusammen. Dabei wurde die kollagenöse Komponente des Materials durch Dialyse (MWCO 12-14kDa, Roth, Karlsruhe, Deutschland) von bovinem Tropokollagen Typ 1 (GfN, Wald-Michelbach, Deutschland) in deionisiertem Wasser gewonnen. Die Fibrillenausbildung erfolgte in 30 mM neutraler Natriumphosphat-Pufferlösung. Danach wurde das Material gefriergetrocknet (Christ Alpha 1-4 Labor-Gefrier-trockner, Christ, Osterode, Deutschland) und in Resuspension mit 0,1M TrisHCL pH7,4 (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gegeben bis eine homogene 30mg/ml Suspension entstand. Für die Silikatkomponente wurde Tetraethoxysilane (TEOS, 99%, Sigma, Steinheim, Deutschland; molares Verhältnis TEOS/Wasser = $\frac{1}{4}$) für eine Stunde in saurem Milieu (0,01M HCl) hydrolysiert und danach im Kühlschrank gekühlt. Durch kräftiges Rühren wurden kalkulierte Volumina der beiden Komponenten vermischt, bis das gewünschte Verhältnis von 70% Silikat zu 30% Kollagen erreicht wurde.

Xerogel mit makroporösem Gerüst (ScB30).

Für das ScB30 wurde B30- Partikel $<0,120\text{mm}$ verwendet. Diese wurden zu einer 30mg/ml Kollagensuspension im Verhältnis 1/1 gegeben. Danach wurde die Lösung in eine zuvor angefertigte Silikonform gegeben und mit 0,5K/min auf -20°C heruntergekühlt (Espec SH-221 climate chamber, Osaka, Japan). Im Anschluss erfolgte die Gefriertrocknung (Christ Alpha 1-4 Labor-Gefriertrockner, Christ, Osterode, Deutschland). Die Kollagengerüste wurden danach quervernetzt durch Eintauchen in 1%- N-(3-Dimethylaminopropyl) -N0-Ethylcarbodiimid (EDC)/N-Hydroxysuccinimid (NHS) (Sigma, Steinheim, Deutschland) und 40% Ethanol über 24h. Danach wurden die Scaffolds in deionisiertem Wasser gespült und erneut gefriergetrocknet.

Strontiummodifiziertes Xerogel mit makroporösem Gerüst (ScB30Sr20)

Die Herstellung des ScB30Sr20 erfolgte analog zur Herstellung von ScB30 jedoch wurde das Xerogel in einer anderen Zusammensetzung hergestellt. Statt 70% Silikat enthält es nur 50% Silikat und die unveränderten 30% Kollagen. Hinzugekommen sind 20% Strontiumcarbonat (SrCO_3 , 99.994%, Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland).

Im Anschluss an die Herstellung wurden alle Knochenersatzmaterialien vor der Implantation gamma-sterilisiert mit 25kGy.

In der weiteren Auswertung werden CPC und SrCPC auch als (Knochen-)Zemente und B30, ScB30 und ScB30Sr20 als Bioglas oder Xerogele bezeichnet.

2.3 Tiermodell

Für die Studie wurden weibliche zehn Wochen alte Sprague Dawley [CrI:CD(SD)] Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Bei der weiblichen Ratte ist es möglich mithilfe einer beidseitigen Ovariectomie sowie einer speziellen defizitären Diät verlässlich eine Osteoporose zu erzeugen, die mit der humanen postmenopausalen Osteoporose vergleichbar ist [Heiss et al 2012]. Das Versuchsvorhaben wurde beim zuständigen Regierungspräsidium Gießen vorgelegt und nach §8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes in der aktuellen Fassung (Juli 2011) genehmigt (Referenznummer: V 54 – 19 c 20-15 (1) GI 20/28 Nr. 108/2011).

2.4 Ablauf

2.4.1 Osteoporoseinduktion

Da die Hauptursachen für Osteoporose beim Menschen die Menopause sowie eine calciumarme Ernährung darstellen [Bartl 2011], wurde bei den Versuchstieren eine bilaterale Ovariectomie durchgeführt. Die Ratten erhielten eine intraperitoneale Injektion von Ketamin (62.5 mg/kg Körpergewicht, Hostaket®, Hoechst, Wiesbaden, Deutschland) und Xylazin (7.5 mg/kg Körpergewicht, Rompun®, Bayer, Leverkusen, Deutschland). Danach wurden über eine tiefe mediane Laparotomie die Ovarien präpariert und entfernt. Es wurde auf eine doppelte Ligatur der ovariellen Gefäße geachtet. Postoperative Schmerzen wurden gegebenenfalls durch Medikamente gestillt. Postoperativ wurde eine Knochendichtemessung mittels DXA (Lunar prodigy, GE Healthcare, Solingen, Deutschland) durchgeführt. Hierbei wurden die Femora sowie die Wirbelsäule untersucht. Im Anschluss erhielten die Versuchstiere eine Calciumphosphat-, Vitamin D3-, Soja- und phytoöstrogenfreie Diät (10mm pellets, Altromin-C1034, Altromin Spezialfutter GmbH, Lage, Deutschland). Nach 12 Wochen wurde eine erneute Knochendichtemessung durchgeführt um den osteoporotischen Knochenstatus zu bestätigen.

2.4.2 Chirurgische Intervention

Vorbereitend für die Operation wurden alle Tiere gewogen und in einer Narkosebox mit Sauerstoff (0,5l/min; CONOXIA GO2X, Linde Healthcare, Unterschleißheim, Deutschland) und Isofluran (4 vol. % zur Einleitung und 0.8-1 vol. % zur Erhaltung der Narkose; Isofluran -Baxter, Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) vollnarkotisiert. Zur Schmerzstillung erhielten die Versuchstiere zusätzlich Piritramid (37 µg/kg/h; Dipidolor®, Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgien) als intraperitoneale Injektion. Im Anschluss wurde das linke Hinterbein rasiert, ausgiebig mit Braunol® (Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert und auf einer 37°C warmen Heizplatte positioniert. Danach wurden die Tiere steril abgedeckt, wobei das linke Hinterbein frei blieb. Lateralseitig des Oberschenkels wurde eine circa 4cm lange Hautinzision durchgeführt (Abb. 10A). Es erfolgte die Freipräparation des Femurs zwischen Vastus lateralis und Biceps femoris (Abb. 10B). Eine T-förmige Miniplatte (Leibinger® XS-miniplate, Stryker®, Schönkirchen, Deutschland) mit 7 Löchern wurde manuell leicht gebogen und damit der Form des Femurs angepasst (Abb. 10C). Die Fixation der Platte an das Femur erfolgte mithilfe von drei 8mm langen Schrauben (Typ XS, Stryker, Freiburg, Deutschland) im distalen Bereich der Femurkondylen sowie von vier 6mm langen Schrauben im proximalen Bereich des Schaftes (Abb. 10D,E). Mit Hilfe einer oszillierenden Ultraschall-Knochensäge Piezosurgery 3®, Sägeblatt T7S-3, Mectron, Köln, Deutschland) wurde ein keilförmiger Defekt mit einer lateralen Länge von 4mm und einer medialen Länge von 0,35mm gesetzt (Abb. 10F). Das Knochensegment wurde entfernt und die verschiedenen Knochenersatzmaterialien (CPC, SrCPC, B30, ScB30, ScB30Sr20) eingebracht (Abb. 10H). Die Muskelfaszie wurde im Anschluss mit resorbierbarem Nahtmaterial geschlossen. Die Haut wurde ebenfalls mit resorbierbarem Nahtmaterial sowie Klammernaht verschlossen (Abb. 10I).

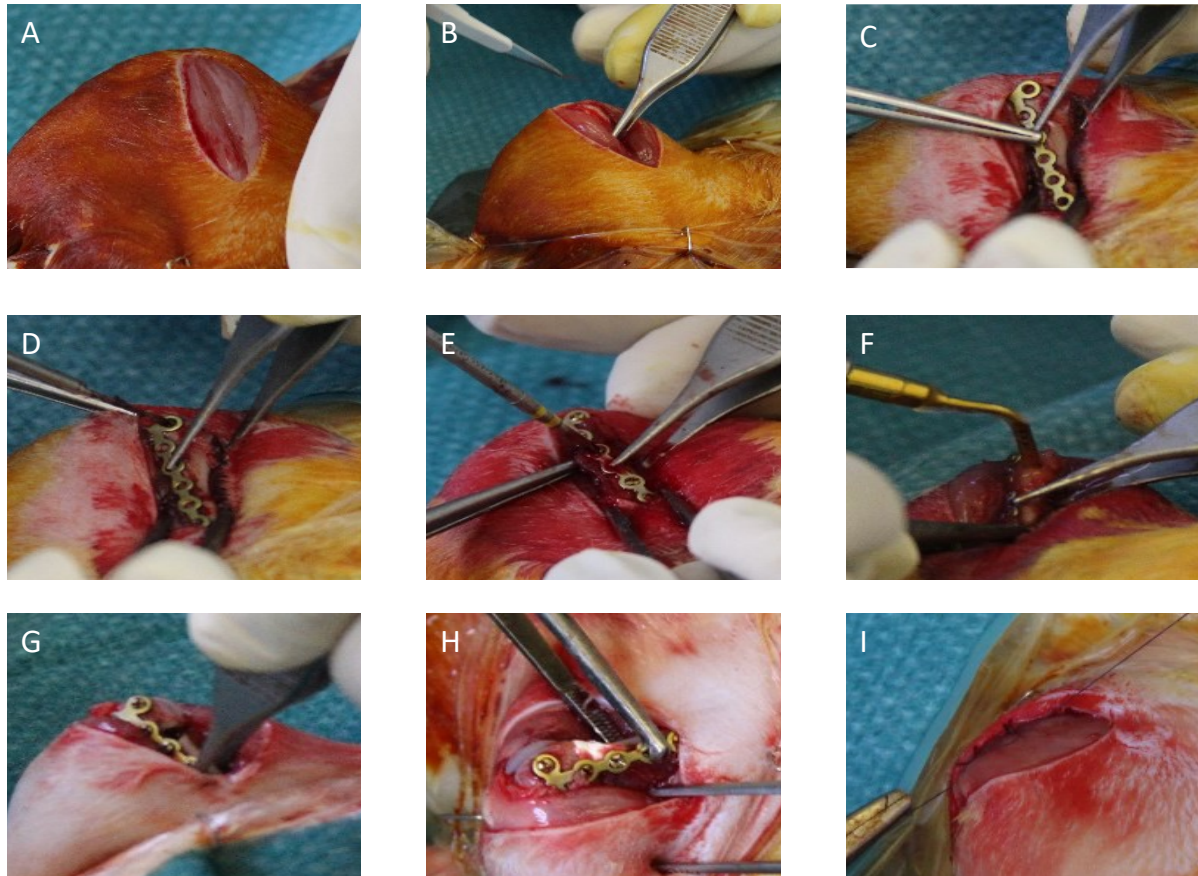


Abbildung 10: Chirurgische Intervention zur Herstellung einer metaphysären Osteotomie des linken Femur. In Vollnarkose wurde eine mediale Inzision am linken Oberschenkel durchgeführt und das Femur präpariert (A-C). Die T-förmige Platte wurde mittels Schrauben fixiert (D, E). Danach setzen eines keilförmigen Defektes mit 4mm Länge und 0,35mm Breite an der medialen Seite des Femurs mittels oszillierender Säge (F, G). Einbringen des Knochenersatzmaterials und anschließender Verschluss der Wunde durch Subkutannaht und Klammernaht (H,I).

2.4.3 Postoperative Versorgung

Direkt postoperativ erhielten die Versuchstiere die zweite Knochendichtemessung mittels DXA (Lunar prodigy, GE Healthcare, Solingen, Deutschland) um die Osteoporose festzustellen. In der Knochendichtemessung wurden das linke Femur mit Defekt, das rechte Femur sowie die Wirbelsäule analysiert. Die Analyse wurde mithilfe des Kleintier-Modus der enCORE Software (GE Healthcare, v.13.40) durchgeführt. Die Durchführung der DXA Messungen erfolgte unter Beachtung der Qualitätskontrolle und Kalibrierung im Protokoll des Herstellers.

Nach der Operation wurden die Tiere in einer warmen und gut kontrollierbaren Umgebung gehalten bis sie wieder bei vollem Bewusstsein waren. Zur Sicherstellung, dass sich die Versuchstiere nicht gegenseitig verletzen, wurden sie für 7 Tage in Einzelhaltung untergebracht. Zur Schmerzlinderung erhielten die Tiere in diesem Zeitraum Temgesic® (0,02mg/KG

/KGW) s.c. alle 12h. Danach erfolgte das Entfernen der Klammern und die Ratten wurden in ihre ursprünglichen Gruppen in Typ IV Käfigen mit erhöhtem Deckel umgesiedelt. Täglich fanden Kontrollen des Verhaltens und Allgemeinbefindens der Tiere statt. Diese wurden von Tierärzten und Tierpflegern dokumentiert und beurteilt. Ebenfalls fand eine Kontrolle der Operationswunden sowie Bewegungsaktivität und Körpergewicht statt. Im Vordergrund stand dabei die Belastung der operierten Extremität um Komplikationen, wie beispielsweise Dislokationen zu erkennen.

2.4.4 Euthanasie und Probengewinnung

6 Wochen nach Einbringung des Knochenersatzmaterials in das Femur der osteoporotischen Versuchstiere, wurden die Ratten mittels schmerzfreier, schonender CO₂-Narkose euthanasiert. Im Anschluss erfolgten die Präparation und Entfernung der Femora. Den Knochen umgebendes Weichgewebe wurde abpräpariert, ohne dabei das neu gebildete Knochengewebe zu beschädigen. Danach wurde die Platte samt Schrauben entfernt und die Verbindung des distalen mit dem proximalen Fragment überprüft. Der Knochen wurde als stabil eingestuft, wenn keine Dislokation stattfand. Die Femora wurden zur weiteren Verarbeitung in 4% neutral gepuffertem Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland) fixiert.

2.5 Probenaufarbeitung

Die Aufarbeitung der Proben, Einbettung in Technovit®, das Herstellen der 5µm dicken Knochenschnitte sowie die enzym- und immunhistochemischen Färbungen der Proben, erfolgten im Labor für experimentelle Unfallchirurgie an der Justus- Liebig- Universität Gießen.

2.5.1 Protokoll der Technovit® 9100 Einbettung

Im Anschluss an die Fixation der Proben mittels 4% neutral gepuffertem Paraformaldehyd über 12 bis 48 Stunden wurden die gewonnenen Präparate in 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer mit einem pH- Wert von 7,2 bis 7,4 mehrfach gespült. Vor der Weiterverarbeitung erfolgte die Abtrennung des proximalen Femurs auf Höhe der distalen Metaphyse. Der distale Anteil des Femurs wurde danach komplett in Technovit® eingebettet. Die Anpassung der Zeit zur Entwässerung und Infiltration erfolgte individuell nach Probengröße. Die Einbettung erfolgte in verschiedenen Schritten gemäß Protokoll (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Technovit® 9100 Einbettung: Zeitplan zur Dehydration und Infiltration

Schritt	Lösung	Temperatur	Dauer /Rüt- teln
1	70% Ethanol	Raumtemperatur	2 Tage
2	80% Ethanol	Raumtemperatur	3 Tage
3	96% Ethanol	Raumtemperatur	2 Tage
4	100% Ethanol (1)	Raumtemperatur	3 Tage
5	100% Ethanol (2)	Raumtemperatur	3 Tage
6	100% Ethanol (3)	Raumtemperatur	2 Tage
7	100% Ethanol (4)	Raumtemperatur	3 Tage
8	100% p.A. Ethanol	Raumtemperatur	3 Tage
9	Xylol (1)	Raumtemperatur	12 Stunden
10	Xylol (2)	Raumtemperatur	12 Stunden
11	Präinfiltration 1	Raumtemperatur	3 Tage
12	Präinfiltration 2	Raumtemperatur	2 Tage
13	Präinfiltration 3	+ 4°C	3 Tage
14	Infiltration	+ 4°C	6 Tage
15	Polymerisation	- 4°C	2 Tage
16	Polymerisation	+ 4°C	1 Tag

Anfertigen der funktionsfähigen Komponenten:

1. Destabilisieren der Basislösung

Die Chromatographiesäule wird 25-30g Al_2O_3 befüllt und langsam wird Technovit® 9100NEU Basislösung (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) durchlaufen gelassen. Eine Säulenfüllung reicht zur suffizienten Destabilisierung von 3-5l Basislösung. Die Lagerung für die laufende Verarbeitung sollte bei +4°C erfolgen. Für längere Zeitspannen sollte die Lösung zwischen -15°C und -20°C gelagert werden.

2. Herstellung der Gebrauchslösungen

Präinfiltration 1: stabilisierte Basislösung und Xylol im Verhältnis 1:1 mischen

Präinfiltration 2: 500ml stabilisierte Basislösung und 2,5g Härter 1 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) mischen

Präinfiltration 3: 500ml destabilisierte Basislösung und 2,5g Härter 1 mischen

Infiltration: 500ml destabilisierte Basislösung mit 40g PMMA (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) und 1g Härter 1 unter Verwendung eines Magnetrührers mischen

Polymerisation: 9 Volumenanteile Stammlösung A und 1 Volumenanteil Stammlösung B

Stammlösung A: 500ml destabilisierte Basislösung mit 80g PMMA und 3g Härter 1 unter Verwendung eines Magnetrührers mischen

Stammlösung B: 44ml destabilisierte Basislösung mit 4ml Härter 2 (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) und 2ml Polymerisationsregler (Heraeus Kulzer GmbH, Wehrheim, Deutschland) mischen

2.5.2 Herstellung der Knochenschnitte

Nach erfolgreicher Einbettung wurden die Technovit-Blöcke zur Weiterverarbeitung in passende Größen gesägt. Danach wurden mithilfe eines Rotationsmikrotoms (Leica RM2155, Deutschland) Sagittalschnitte des Defektbereiches mit einer Schnittdicke von 5µm gewonnen. Um einen Verlust des Knochenersatzmaterials, oder eine Distorsion beim Schneidevorgang zu verhindern, wurde vor jedem Schnitt eine Kawamoto-Folie (Cryofilm type II C(9), Section lab Co. Ltd. Japan) auf den eingespannten Schnittblock geklebt. Im Anschluss wurde

die Folie samt aufliegendem Schnitt auf einen Glasobjektträger überführt und mittels doppel-seitigem Klebeband (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) fixiert.

2.6 Histologie

2.6.1 Standardfärbungen

2.6.1.1 MOVAT Pentachrom Färbung

Die Movat- Pentachrom Färbung ist eine histochemische Färbung, bei der mehrere Farbstoffe die gleichzeitige Darstellung verschiedener extrazellulärer und intrazellulärer Gewebekomponenten erlaubt [Torzewski 2015]. Diese Pentachrom Färbung wurde erstmals 1955 von Henry Zoltan Movat beschrieben [Movat 1955]. In den darauffolgenden Jahren wurde sie vielfach von Anwendern weiterentwickelt. Sie ermöglicht die kontrastreiche Unterscheidung von verschiedenen Hart- und Weichgewebekomponenten. Zellkerne werden schwarz bis gräulich gefärbt, Zytoplasma erscheint rot, Kollagen färbt sich hellgelb, kalzifizierter Knorpel ist grün, Osteoid rötlich und entsprechend mineralisierter Knochen dunkelgelb- orange. Dieser Fakt macht die Färbung für die Studie überaus nützlich, da hierdurch eine Darstellung des Materials, der Inflammationszone und des neu gebildeten oder umgebauten Gewebes möglich wird.

Tabelle 2: Materialien für die Movat Pentachrom Färbung

Materialien	
Alcianblau	Lösen von 1g 8GS (Chroma, Münster, Deutschland) in 99ml destilliertem H ₂ O unter Zugabe von 1ml Eisessigsäure
Weigert's Eisenhämatoxylin	Mischen von Lösung A und Lösung B (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) im Verhältnis 1:1
Brilliant Crocein-Fuchsin	Mischen von Lösung A und Lösung B im Verhältnis 5:1 Lösung A: 0,1g Brilliant Crocein R (Chroma, Münster, Deutschland) in 99,5ml destilliertem H ₂ O unter Zugabe von 0,5 ml Eisessigsäure

	Lösung B: 0,1g Fuchsin (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 99,5ml destilliertem H ₂ O unter Zugabe von 0,5 ml Eisessigsäure
PWS	5% Phosphorwolframsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) in destilliertem H ₂ O
Alkalisches Ethanol	90ml 95% Ethanol und 10ml NH ₄ OH
Saffron du Gâtinais	Lösen von 6g Saffron du Gâtinais (Chroma, Münster, Deutschland) in 100ml 100% Ethanol und inkubieren bei 50°C für 48h
0,5% Essigsäure	Destilliertes H ₂ O mit Eisessigsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) mischen
Ethanol	Ethanol 522 mit 1% Petroläther (Stockmeier Chemie, Bielefeld, Deutschland)
Xylol	(Roth, Münster, Deutschland)
Eukitt	(Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
MEA (2- Methoxyethyl-acetat)	(Merck, Darmstadt, Deutschland)

Protokoll

1. Entplastinieren der Schnitte mittel MEA für 3x 5 Minuten und anschließende Dehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 5 Minuten
2. Rehydrieren mit destilliertem Wasser für 2 x 5 Minuten
3. Färben in Alcianblau-Lösung für 30 Minuten
4. Waschen der Präparate unter laufendem Wasser für 5 Minuten
5. Färben mit alkalischem Ethanol für 60 Minuten
6. Waschen der Schnitte unter laufendem Wasser für 5 Minuten
7. Spülen mit destilliertem Wasser
8. Färben der Präparate in Weigert's Eisenhämatoxylin-Färbung für 14 Minuten
9. Spülen mit destilliertem Wasser

10. Waschen der Schnitte unter laufendem Wasser für 6 Minuten
11. Färben mit Brilliant Crocein-Fuchsin Lösung für 6 Minuten
12. Einlegen der Präparate in 0,5% Essigsäure für 1 Minute
13. Entfärben des Kollagens mittels 5% PWS für 9 Minuten
14. Spülung mit 0,5% Essigsäure für 2 Minuten
15. Einlegen der Schnitte in 100% Ethanol für 3x 2 Minuten
16. Färben der Präparate mit Saffron du Gâtinais- Farbstoff
17. Dehydrierung in 100% Ethanol für 2 Minuten
18. Einlegen in Xylol für 2x 5 Minuten
19. Eindeckeln mit Eukitt und Deckglas

2.6.1.2 Silbernitratfärbung

Die Silbernitratfärbung wurde 1873 erstmals von Golgi beschrieben [Gosh 2020]. Diente sie anfangs nur zum Anfärben von neuronalen Geweben, so wurde die Anwendung der Färbung vielfach weiterentwickelt, so dass sie heute zum Anfärben von Osteozyten und deren Canaliculi genutzt werden kann. Dabei werden die sauren Proteine der Knochenmatrix angefärbt [El Khassawna et al 2017]. Im Anschluss kann zwischen spindelförmigen, sphärischen Osteozyten oder leeren Lakunen (im Verlauf auch Zellen mit leerer Lakuna genannt) unterschieden werden.

Tabelle 3: Materialien für die Silbernitratfärbung

Materialien	
Lösung A	Lösen von 0,5g low Bloom Gelatine (Sigma- Aldrich, St. Louis, MA,USA) in 24,75ml bidestilliertem H ₂ O und 250µl Ameisensäure (Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) und dabei Erwärmen auf 37°C
Lösung B	Herstellen einer 50% Silbernitratlösung durch Mischung von destilliertem H ₂ O mit Silbernitrat (Sigma- Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)- Lösung	Herstellen einer 20% EDTA Lösung durch Mischen von Na-EDTA (Roth, Münster, Deutschland) mit destilliertem H ₂ O unter Zugabe von Natronlauge bis ein pH von 7.4 erreicht ist
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	Mischen von 8g NaCl (Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland) mit 0,2g KCl (Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland) und 1,42g Na ₂ HPO ₄ (Merck, Darmstadt, Deutschland) bis pH von 7,4 erreicht ist und Auffüllen mit destilliertem H ₂ O zu 1000ml
Ethanol	Ethanol 522 mit 1% Petroläther (Stockmeier Chemie, Bielefeld, Deutschland)
Natriumthiosulfat	(Roth, Münster, Deutschland)
Xylol	(Roth, Münster, Deutschland)
Eukitt	(Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland)
MEA (2- Methoxyethylacetat)	(Merck, Darmstadt, Deutschland)

Protokoll

1. Entplastinieren der Schnitte mittel MEA für 3x 5 Minuten
2. Entkalken in EDTA Lösung für einen Tag
3. Waschen in PBS
4. Dehydrierung in einer absteigenden Alkoholreihe für jeweils 5 Minuten
5. Rehydrieren mit destilliertem Wasser für 2 x 5 Minuten
6. Lösung A und Lösung B im Verhältnis 1:2 mischen, auf die Präparate geben und 45Minuten einwirken lassen
7. Spülen mit destilliertem Wasser für 5 Minuten
8. Einlegen der Schnitte in 5% Natriumthiosulfat für 10 Minuten
9. Spülen mit destilliertem Wasser für 5 Minuten
10. Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe für jeweils 5 Minuten
11. Einlegen in Xylol für 2x 5 Minuten

12. Eindeckeln mit Eukitt (Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und Deckglas

2.6.2. Immunhistochemische Färbungen

Bei den immunhistochemischen (IHC) Färbungen erfolgt die histologische Lokalisierung und Identifizierung eines Stoffes durch Antigen-Antikörper- Reaktion. An den Antikörper ist ein Farbstoff gekoppelt, welcher eine Farbreaktion hervorruft und damit die Antigene sichtbar macht. Man unterscheidet dabei die direkte und indirekte Färbemethode. Bei der direkten Färbemethode ist der Farbstoff an den Primär- Antikörper gekoppelt. Bei der indirekten Färbemethode bindet der Primär- Antikörper an das nachzuweisende Antigen. Im Anschluss daran wird ein markierter Sekundär-Antikörper hinzugegeben, der an den Immunglobulinteil des Primär-Antikörpers bindet. Hierdurch lässt sich die Sensitivität steigern [Lüllmann- Rauch 2012].

Für diese Studie wurde das Avidin-biotin-peroxidase complex (ABC)- System (Vectastain Elite ABC KIT, Vector Laboratories, Burlingame, CA) als Vertreter der indirekten IHC-Färbung verwendet. Der Sekundärantikörper wird biotinyliert und bindet mithilfe eines Biotin-Avidin-Enzymkomplexes an den Primärantikörper. Dabei bildet sich ein stabiles Gittergeflecht aus, welches mithilfe eines Substrates zu Färbung sichtbar gemacht werden kann [Hsu et al 1981]. Um zu verhindern, dass die Komplexe unspezifische Bindungen mit dem Gewebe eingehen, wurden diese vorher blockiert. Im Anschluss erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Ein Teil der immunhistochemischen Färbungen ist nicht osteozytenspezifisch bzw. exprimieren auch andere Zellen diese Marker. Dies sind zum Beispiel Osteoblasten. Um Sicherzustellen, dass lediglich positiv markierte Osteozyten in der histomorphometrischen Auswertung berücksichtigt werden, wurde die Lage bei darauffolgenden Silbernitrat-gefärbten Schnitten bestätigt.

Tabelle 4: Materialien für die immunhistochemische ABC- Färbung

Materialien	
TBS	Mischen von 60,57g TRIS PUFFERAN (Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit 87,66g NaCl (Sigma- Aldrich, Steinheim, Deutschland) unter Zugabe von 25% HCl (Merck, Darmstadt, Deutschland) bis pH von 7,4 erreicht ist und Auffüllen mit destilliertem H ₂ O zu 1000ml

Triton X-100	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Tris- Waschpuffer	Mischen von 100ml TBS und 0.025g Triton X-100 unter Zugabe von 900ml destilliertem H ₂ O
MEA	(Merck, Darmstadt, Deutschland)
Ethanol	Ethanol 522 mit 1% Petroläther (Stockmeier Chemie, Bielefeld, Deutschland)
PAP-Stift	(Science Services GmbH, München, Deutschland)
Vectastain ELITE ABC	(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
Xylol	(Roth, Münster, Deutschland)
DePex	(Serva, Heidelberg, Deutschland)
Nova Red	Substratkit für Peroxidase, (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)
Biotinylierter Sekundärantikörper	Ziege Anti Kaninchen, 1:500 (DAKO, Glostrup, Dänemark)
Verdünnungspuffer	(Dako Antibody Diluent with Background Reducing Components, Glostrup, Dänemark)
Primärantikörper	Vgl. Kapitel 2.6.2.1- 2.6.2.6

Protokoll:

1. Entplastinieren der Schnitte in MEA für 3x 5 Minuten
2. Rehydrieren in absteigender Ethanol-Reihe für jeweils 5 Minuten
3. Spülen mit Waschpuffer für 3x 5 Minuten
4. Trocknen der Präparate und Umranden der Schnitte mit PAP- Stift
5. Hinzugeben der Primärantikörper im getesteten Verdünnungsverhältnis mit Verdünnungspuffer für 12 Stunden in einer 4°C Feuchtkammer
6. Vorsichtiges Entfernen der Antikörperlösung mittels Pipette und Abspülen mit Waschpuffer
7. Spülen mit Waschpuffer für 3x 5 Minuten
8. Inkubieren mit biotinyliertem Sekundärantikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur

9. Spülen mit Waschpuffer für 2x 5 Minuten
10. Inkubieren mit Vectastain ELITE ABC für 30 Minuten in Feuchtkammer
11. 2x Spülen mit Waschpuffer
12. Spülen in destilliertem H₂O für 5 Minuten
13. Färben mit Nova Red für 5 Minuten bei Raumtemperatur
14. Spülen in bidestilliertem H₂O für 5 Minuten gefolgt von Spülen in destilliertem H₂O für 2x 5 Minuten
15. Gegenfärbung mit Hämatoxylin für 5 Sekunden bei Raumtemperatur
16. Spülen unter fließendem Wasser für 10 Minuten
17. Dehydrieren in aufsteigender Alkoholreihe für jeweils 5 Minuten
18. Einlegen in Xylol für 2x 5 Minuten
19. Eindeckeln mit DePex und Deckglas

2.6.2.1 Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)

Bone morphogenetic protein wurde 1965 zum ersten Mal nachgewiesen als Protein, welches Knochenbildung induziert [Urist et al 1965]. BMP-2 gehört neben circa 20 weiteren BMPs zur Superfamilie der Transforming growth factor- beta (TGF-beta) Wachstumsfaktoren [Wozney et al 1992]. BMPs spielen eine zentrale Rolle bei der Osteogenese und dem Knochenumbau. Die Wirkungsweise erklärt sich über den TGF- β Signalweg [Harland 1994] sowie über den Hedgehog Signalweg [Yoshino et al 2016] und direkte Zytokin- Zytokin Interaktion [van der Kraan et al 2015]. Cheng et al konnten 2003 nachweisen, dass BMP-2 zu einem der potentesten Vertreter der Familie der BMPs gehört. Aus diesem Grund wurde dieser Marker für diese Studie ausgewählt, um Osteoinduktivität zu erfassen. Die Schnitte wurden mit BMP-2 Primärantikörper (Acris AP20597PU-N, Herford, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:200 mit Antikörper-Verdünnungspuffer versetzt.

2.6.2.2 Osteoprotegerin (OPG)

Osteoprotegerin (OPG) oder auch Osteoklastogenese inhibierender Faktor (OCIF) ist ein Zytokinrezeptor aus der TNF –Rezeptorfamilie. OPG ist eine lösliche Rezeptorattrappe für RANKL, den aktivierenden Liganden des RANK. Damit spielt es eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel, da OPG die Reifung von Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten inhibieren kann [Clem et al. 2008]. Für diese Studie wurde OPG im Verhältnis zu RANKL untersucht,

um festzustellen, ob knochenaufbauende/nicht-knochenabbauende Prozesse die knochenabbauenden überwiegen. Dazu wurde ein OPG-Primärantikörper (Kaninchen Anti-OPG Polyklonaler Antikörper, Abbiotec, San Diego, CA, USA) in einer 1:300 Verdünnung mit Verdünnungspuffer inkubiert.

2.6.2.3 Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)

Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL) oder auch Osteoklasten differenzierender Faktor (ODF) ist ein Membranprotein der TNF-Rezeptorfamilie. RANKL beeinflusst das Immunsystem und kontrolliert die Knochenregeneration und den Knochenabbau. Dabei hat er Einfluss auf die Regulation der Apoptose von Zellen [Hanada 2011]. Das von hauptsächlich Osteoblasten gebildete Protein aktiviert den Receptor activator of nuclear factor kappa-B (RANK), welcher membranständig an Osteoklasten gebunden ist. Dadurch kommt es zur Steigerung der Osteoklastenaktivität und des Knochenabbaus. In dieser Studie sollte das Verhältnis von OPG zu RANKL untersucht werden. Hierfür wurden die Schnitte mit 0,6 µg/ml RANKL-Primärantikörper (Polyklonaler Antikörper CD254/RANKL-Aff-Purified, Acris, Herford, Deutschland) versetzt.

2.6.2.4 Dickkopf related protein 1 (DKK1)

Das Dickkopf related protein 1 (DKK1) ist ein Glykoprotein, welches eine antagonistische Funktion auf den Wnt/ β -catenin Signalweg im Knochen hat. Im Knochenstoffwechsel wird DKK1 von Osteoblasten und hauptsächlich von Osteozyten sezerniert [Paic et al. 2009]. DKK1 inhibiert die Wnt- Corezeptoren LRP 5 und 6. Weiterhin hat DKK1 eine hohe Affinität für die Transmembranproteine Kremen1 und 2, welche ebenfalls den Wnt Signalweg modulieren [Niehrs 2006]. Der Wnt-Signalweg nimmt Einfluss auf die Osteoblastenmaturation sowie auf das Überleben von Osteoblasten und Osteozyten, während gleichzeitig die Osteoklastogenese unterdrückt wird [Plotkin et al. 2016]. Die Präparate wurden mit 0,5 µg/ml DKK1-Primärantikörper (Schaf Anti DKK1 Polyklonaler Antikörper, Abcam, Cambridge, England) inkubiert.

2.6.2.5 Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE)

Matrix extracellular phosphoglycoprotein oder Osteoblasten/Osteozyten Faktor 45 ist ein Protein, welches durch das MEPE- Gen kodiert wird [Rowe et al. 2000]. MEPE wird hauptsächlich von Osteozyten exprimiert [Agiro et al 2001]. Eine enzymatische Degradation von MEPE erzeugt ein acidic serine aspartate-rich MEPE(ASARM)- assoziiertes Peptid, welches die Kno-

chenmineralisation inhibiert [Rowe et al 2012]. Als Marker für inhibierte Knochenmineralisation wurde MEPE für diese Studie ausgewählt. Die Färbung der Schnitte erfolgte mit MEPE Primärantikörper (Sigma- Aldrich, St. Louis, MA, USA) in einer Verdünnung von 1:150 mit Antikörper-Verdünnungspuffer.

2.6.2.6 Sklerostin (SOST)

Sklerostin ist ein sekretorisches Glykoprotein, welches durch das SOST- Gen kodiert wird. Es wird hauptsächlich von reifen Osteozyten gebildet. Sklerostin bindet an die LRP 5/6 Rezeptoren des Wnt-Signalwegs und antagonisiert diesen dadurch. Weiterhin bindet Sklerostin an LRP4, welches für die inhibitorische Wirkung am Wnt/ β -catenin Signalweg sorgt. Mangelnde SOST-Expression oder Sekretion von Sklerostin sorgt beim Menschen für Sklerosteose, einer Hyperplasie der Röhrenknochen und des Schädels, welche mit erhöhter Knochenmasse einhergeht. Eine Überexpression von Sklerostin führt hingegen zu einer verminderten Knochenmasse [Plotkin et al. 2016]. Daher ist die Sklerostinaktivität ein Marker für Knochenumbau. Die Präparate wurden mit Sklerostin-Primärantikörper (Kaninchen Anti-Sklerostin Polyklonaler Antikörper, Abcam, Cambridge, England) in einer 1:1000 Verdünnung mit Verdünnungspuffer inkubiert.

2.7 Histomorphometrie

Nach dem Färben erfolgte die Dokumentation der Ergebnisse mittels Leica Mikroskop (Leica DM5500 Fotomikroskop, ausgestattet mit einer DFC7000 Kamera, LASX Software Version 3.0; Leica Microsystem Ltd., Wetzlar, Deutschland). Die Färbungen wurden in Übersichtsaufnahmen in 5x Vergrößerung fotografiert. Für die exemplarische Dokumentation von Ausschnitten wurden Bilder mit 100x Vergrößerung in Ölimmersion gemacht. Zur Auszählung der Osteozyten sowie der immunhistochemisch markierten Osteozyten wurden standardisiert Bilder mit 20x Vergrößerung aufgenommen. Danach erfolgte die histomorphometrische Auswertung der Präparate durch Auszählen von positiv angefärbten Zellen der jeweiligen Färbung im Bereich des ROI. Zellen die durch das Einbetten, Schneiden oder Färben zerstört wurden, wurden nicht berücksichtigt.

Für die Movat –Pentachrom Färbung erfolgte eine semi-automatische Auswertung mithilfe der Bildbearbeitungssoftware ImageJ (ImageJ 1.45s, Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), wobei das dunkelgelb- bis orangegefärbte Gewebe den

ossifizierten Knochen repräsentiert. Das grün gefärbte Gewebe dagegen wurde als entmineralisiertes Gewebe gewertet. Die detaillierte Auflistung der Arbeitsschritte findet sich in Appendix 1.

Region of interest (ROI)

Die Region of interest der Färbungen wurde so adaptiert, dass der Bereich vom Implantat-/Gewebeinterface abgebildet wird. Dazu zählt das eingebrachte Material sowie die initial zugefügte keilförmige Defektregion (4mm lateralseitig und 0,35mm mediallyseitig des linken distalen Femurs) um dort die Knochenneubildung und den Knochenumbau zu untersuchen.

Für die Movat- Pentachrom Färbung war der direkte Implantat-/Gewebeübergang von besonderem Interesse, daher wurde die Region of Interest bei 250 Pixeln (100µm) rund um das eingebrachte Material festgelegt.

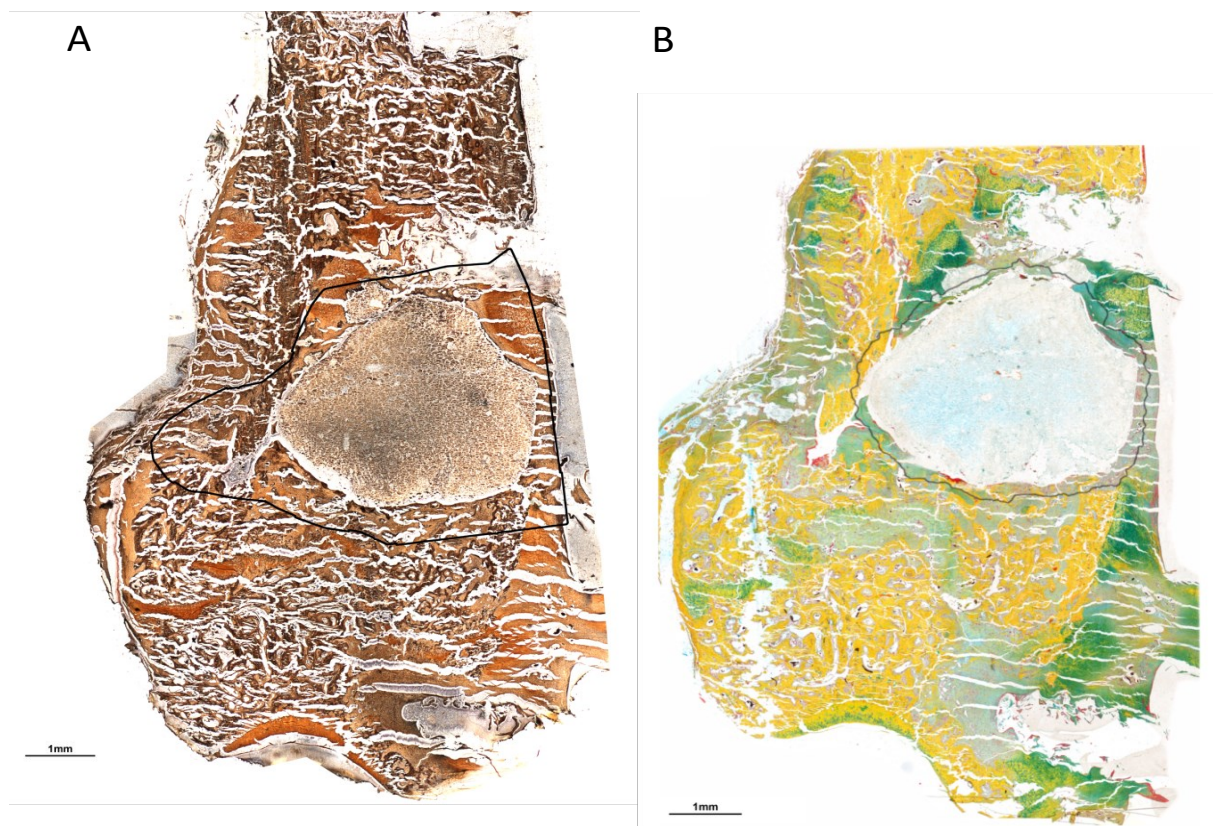


Abbildung 11: Festlegen des ROI entsprechend der chirurgisch zugefügten keilförmigen Defektregion (Maßstabsleiste = 1mm). Bei der Movat-Pentachrom Färbung wurde das ROI bei 100µm rund um das eingebrachte Material festgelegt (Maßstabsleiste = 1mm).

2.8 Statistik

Für die Analyse der aus den verschiedenen Färbungen gewonnenen Daten wurde in Kooperation mit dem Institut für medizinische Informatik Gießen die Statistiksoftware SPSS (IBM SPSS Statistics 26, IBM, Ehningen, Deutschland) verwendet. Im Histogramm zeigte sich eine Verschiebung der Werte, sodass um eine Normalverteilung zu erreichen, die gewonnenen Daten vor der statistischen Auswertung logarithmiert wurden. Danach zeigten sie sich im Histogramm sowie im QQ-Plot normalverteilt.

Aufgrund der Datenerhebung erfolgte die Auswertung mit Hilfe eines gemischten Modells (Mixed Model Analysis), bei der feste und zufällige Effekte modelliert werden. Dies ist notwendig, da im Datensatz wiederholte Messungen vorliegen. Hintergrund ist, dass durch die Zählung von verschiedenen Items für das gleiche Individuum die Messungen nicht unabhängig sind. Diese Beziehung der Werte untereinander wird durch die Angabe entsprechender Kovarianzmatrix (AR1) berücksichtigt.

Für die Beurteilung der statistischen Ergebnisse wurde ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ festgelegt. Die Angabe der berechneten Werte erfolgt nach dem Schema [Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; Minimum: Maximum].

3. Ergebnisse

3.1 Klinische Verlaufsbeobachtung

Die Anzahl der überlebenden Tiere für den kompletten Beobachtungszeitraum betrug für die CPC-Gruppe 13 Tiere (86,6%), für die SrCPC-Gruppe 15 Tiere (100%), für die B30-Gruppe 14 Tiere (93,3%), für die ScB30-Gruppe 12 Tiere (80%) und für die ScB30Sr20-Gruppe 13 Tiere (86,6%). Drei Tiere sind durch die Narkose verstorben. Zwei Versuchstiere starben direkt oder kurz nach der Ovariectomie und drei Tiere starben direkt oder kurz nach der Femurosteotomie mit Plattenosteosynthese. Insgesamt überlebten 67 von 75 Versuchstieren im kompletten Beobachtungszeitraum (Abb. 12A).

Postmortal zeigten sich nach Entfernung des Weichgewebes stabile Verhältnisse bei 74,6% der Plattenosteosynthesen. Plattenbrüche konnten in fast allen Subgruppen beobachtet werden. In der CPC-Gruppe waren sieben von 13 Platten gebrochen (53,8%). In der SrCPC- Gruppe hatten vier von 15 Tieren einen Plattenbruch (26,7%). Ebenfalls fünf von 14 Platten waren in der B30-Gruppe gebrochen (35,7%). In der ScB30-Gruppe zeigte sich lediglich eine von 12 Platten gebrochen (8,3%) und in der ScB30Sr20-Gruppe waren alle 13 Platten intakt (0%) (Abb.12B). Für die weitere Bearbeitung wurden lediglich Femora mit stabilen Verhältnissen genutzt. Makroskopisch waren die Implantationsstelle und der Defektbereich noch erkennbar. Die Implantate selbst waren jedoch nur noch teilweise erkennbar (Abb. 13). In den Gruppen mit CPC und SrCPC als Knochenersatzmaterial war das Implantatmaterial noch vorhanden. Dieser Umstand wurde für die Analyse der Materialdegradation (vgl. Kap. 3.2.1) genutzt. Bei den Gruppen B30, ScB30 sowie ScB30Sr20 kam es zu einem fast vollständigen Abbau des Materials, so dass makroskopisch kaum Rückstände gefunden werden konnten.

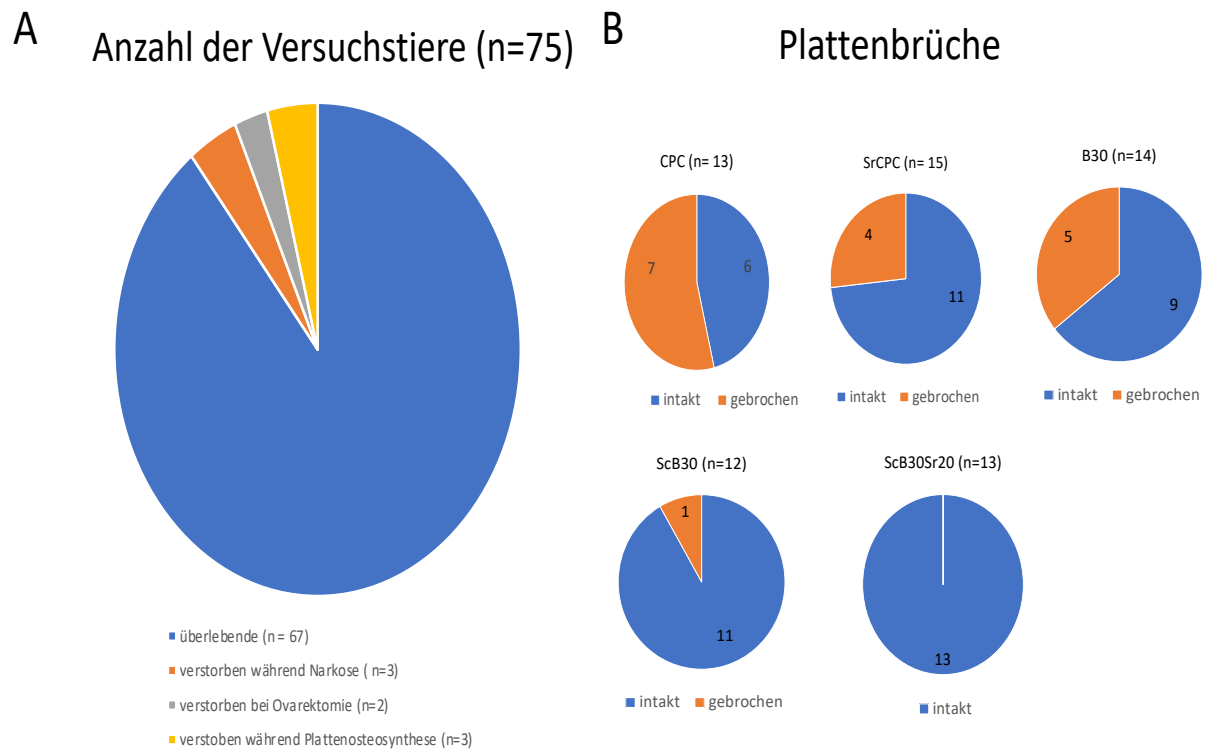


Abbildung 12: Anzahl der Versuchstiere im Verlauf des Experiments (A) sowie Anzahl der intakten und gebrochenen Platten in den einzelnen Subgruppen (B)

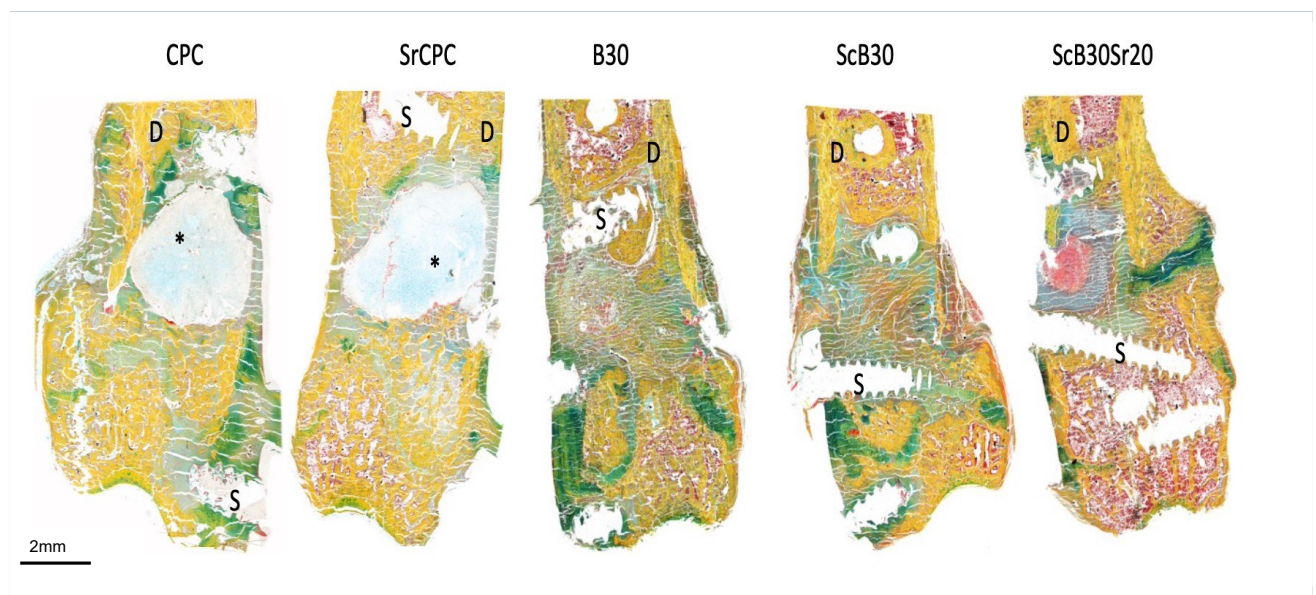


Abbildung 13: Implantatrückstände (*) in den einzelnen Subgruppen. Movat-Pentachrom-Färbung in fünffacher Vergrößerung (D= Diaphyse, S= beispielhaft für Schraubenkanäle) mit Maßstabsleiste 2mm.

3.2 Histomorphometrie der Standardfärbungen

3.2.1 Implantatdegradation

Bei allen Gruppen fanden sich noch mikroskopische Materialreste, da jedoch die Anteile in den Gruppen B30, ScB30 und ScB30Sr20 unerheblich gering waren, wurde zur Analyse des Einflusses von Strontium auf die Abbaubarkeit des Materials CPC mit SrCPC verglichen (Abb. 13 & 14). Es konnte gezeigt werden, dass sich im Bereich des ROI minimal weniger Restmaterial von CPC befand im Gegensatz zu SrCPC. Die histomorphometrische Auswertung ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen.

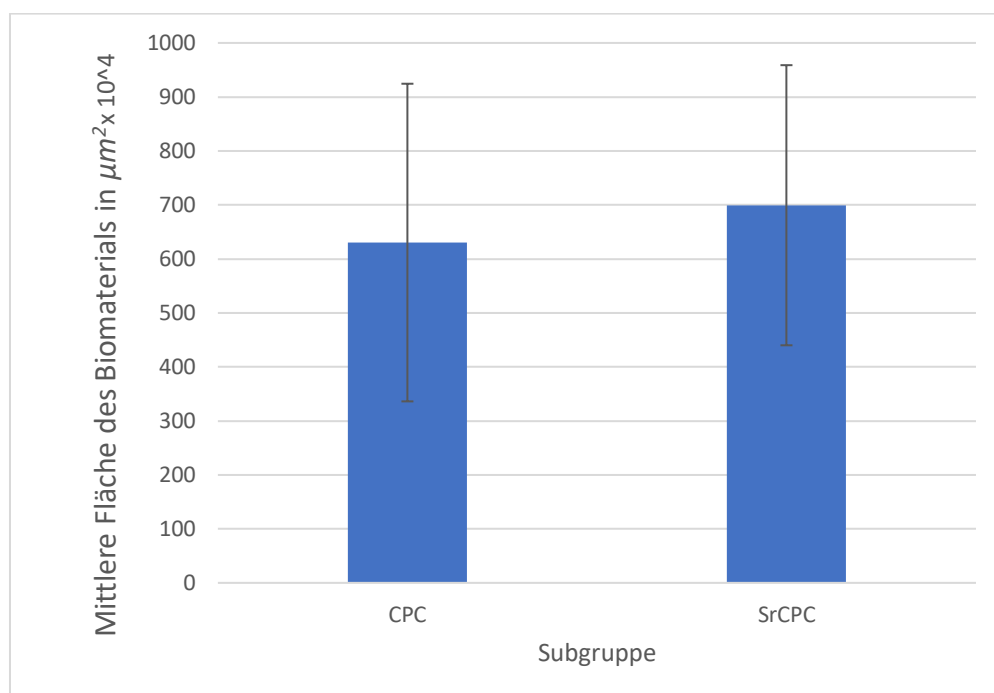


Abbildung 14: Histomorphometrische Analyse der Implantatdegradation zwischen den Gruppen CPC und SrCPC in der MOVAT-Färbung. Im Mittel fand sich deutlich weniger CPC als SrCPC, jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant ($p=0,636$).

3.2.2 Knochengewebe

Die histomorphometrische Auswertung der Fläche des Gesamtknochens (μm^2) im Bereich des ROI zwischen den Gruppen zeigte eine minimal kleinere Fläche für CPC [Mittelwert $\pm$ Standardabweichung] [117930,75 $\pm$ 14953,674] im Vergleich zu SrCPC [118444,71 $\pm$ 21666,003] (Abb. 15). Diese Unterschiede sind jedoch nicht signifikant ($p= 0,289$).

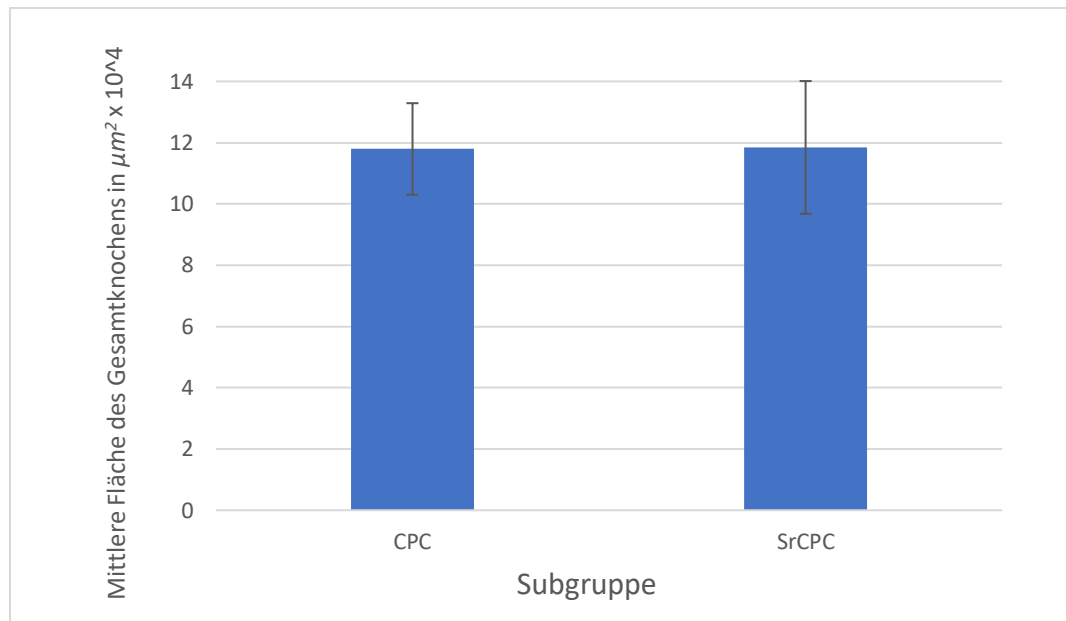


Abbildung 15: Histomorphometrische Analyse des Gesamtknochengewebes im Bereich des ROI zwischen den Gruppen CPC und SrCPC in der MOVAT-Färbung. Es zeigt sich deutlich mehr Gesamtknochenfläche bei SrCPC im Vergleich zu CPC, jedoch sind die Unterschiede nicht signifikant ($p=0,289$)

3.2.3 Neugebildetes Bindegewebe

Bei der histomorphometrischen Analyse der neugebildeten Bindegewebe im Bereich des ROI konnten keine signifikanten Wechselwirkungen der Gewebe mit Strontium festgestellt werden ($p=0,459$), obwohl mit Hilfe von Strontium minimal mehr Knorpel gebildet wurde (Abb. 16). Ebenfalls gab es keine signifikanten Unterschiede bei der alleinigen Betrachtung der beiden Subgruppen CPC und SrCPC ($p=0,670$). Es zeigten sich jedoch statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen neugebildeten Geweben. So wurde deutlich mehr Osteoid [Mittelwert $\pm$ Standardabweichung; Minimum: Maximum] [50210,27 $\pm$ 6112,69; 35420: 57832] im Vergleich zu Knorpel [986,63 $\pm$ 619,40; 191: 2326] gebildet ($p < 0,001$), während sich ebenfalls Kollagengewebe [67060,90 $\pm$ 15594,64; 44640: 96914] in den Versuchstieren im Vergleich zu Knorpel signifikant mehr ($p < 0,001$) bildete. Einzig der Unterschied zwischen neu gebildetem Osteoid und Kollagengewebe war nicht statistisch signifikant ($p=0,212$). (Eine genaue Aufschlüsselung über die einzelnen Individuen sowie über die Darstellung der Fläche in μm^2 findet sich in Appendix 2)

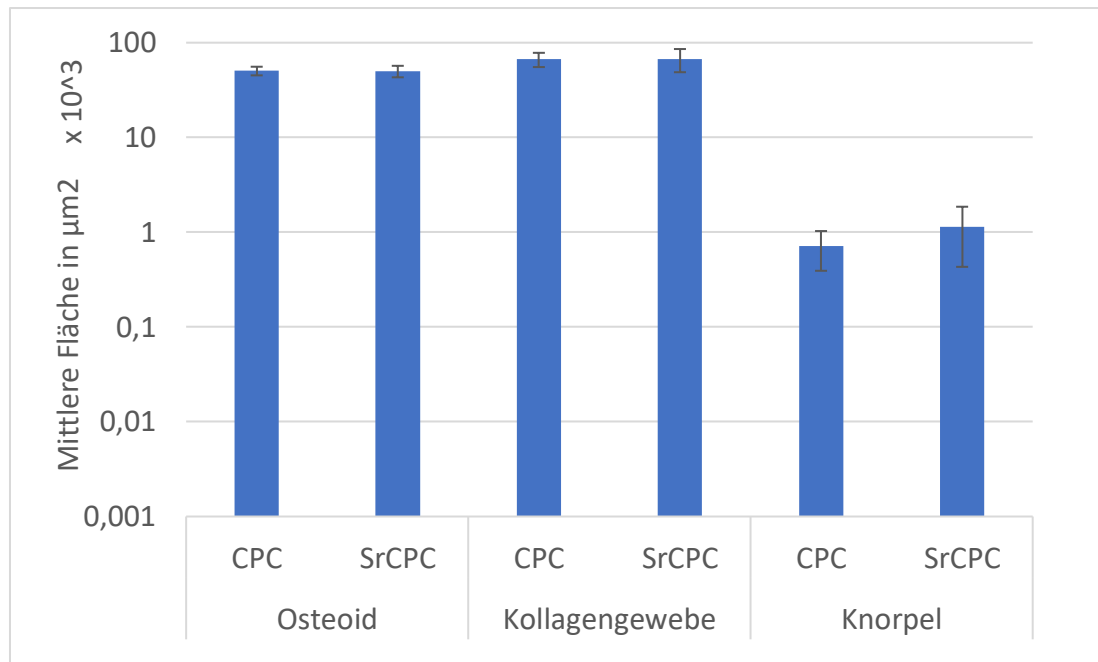


Abbildung 16: Histomorphometrische Analyse der verschiedenen Bindegewebe im Bereich des ROI zwischen den Gruppen CPC und SrCPC in der MOVAT-Färbung. Es zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Osteoid und Knorpel ($p < 0,001$) sowie zwischen Kollagengewebe und Knorpel ($p < 0,001$). Zwischen Osteoid und Kollagengewebe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p = 0,212$). Obwohl unter Einfluss von Strontium minimal mehr Knorpel gebildet wurde, hatte Strontium keinen signifikanten Einfluss auf die verschiedenen Gewebe ($p = 0,459$).

3.2.4 Osteozytenzählung

Die statistische Auswertung der Anzahl der Osteozyten erfolgte über die Zählung der charakteristisch angefärbten Osteozyten im Bereich des zuvor festgelegten ROI. Dabei wurden diese 3 Zustandsarten unterschieden: spindelförmige Zellen, runde Zellen und Zellen mit leeren Lakunen. Die Darstellung der Graphen zeigt die logarithmierten Mittelwerte, um eine Normalverteilung zu erreichen. Insgesamt zeigt sich für alle Gruppen ein relativ ähnlicher Verlauf, bezüglich der Zustandsarten. Jede Gruppe enthält am meisten spindelförmige Zellen, gefolgt von den runden Zellen und Zellen mit leeren Lakunae. Einzig in den Gruppen CPC und ScB30Sr20 fanden sich mehr leere Zelllakunae als runde Zellen (Abb. 17). Zu beobachten ist, dass die Gesamtzellzahl von CPC, SrCPC und ScB30Sr20 auf einem ähnlich höheren Niveau liegt im Vergleich zu B30 und ScB30. Dieser Unterschied stellt sich jedoch in der statistischen Analyse als nicht signifikant dar ($p = 0,190$). Bezüglich der Anzahl der verschiedenen Zustandsarten und den einzelnen Gruppen lässt sich keine statistische Interaktion nachweisen ($p = 0,564$).

In der statistischen Analyse konnten allerdings signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Zustandsarten an sich festgestellt werden. Bei der genaueren Analyse der Daten zeigen sich deutlich höhere Werte für spindelförmige Zellen [4,118± 0,237; 3,628: 4,608], im Vergleich zu runden Zellen [2,969± 0,240; 2,474: 3,464] ($p<0,001$) und leeren Zelllakunae [2,655± 0,242; 2,156: 3,153] ($p<0,001$). Die Unterschiede zwischen runden Zellen und den leeren Zelllakunae waren nicht signifikant ($p=0,148$).

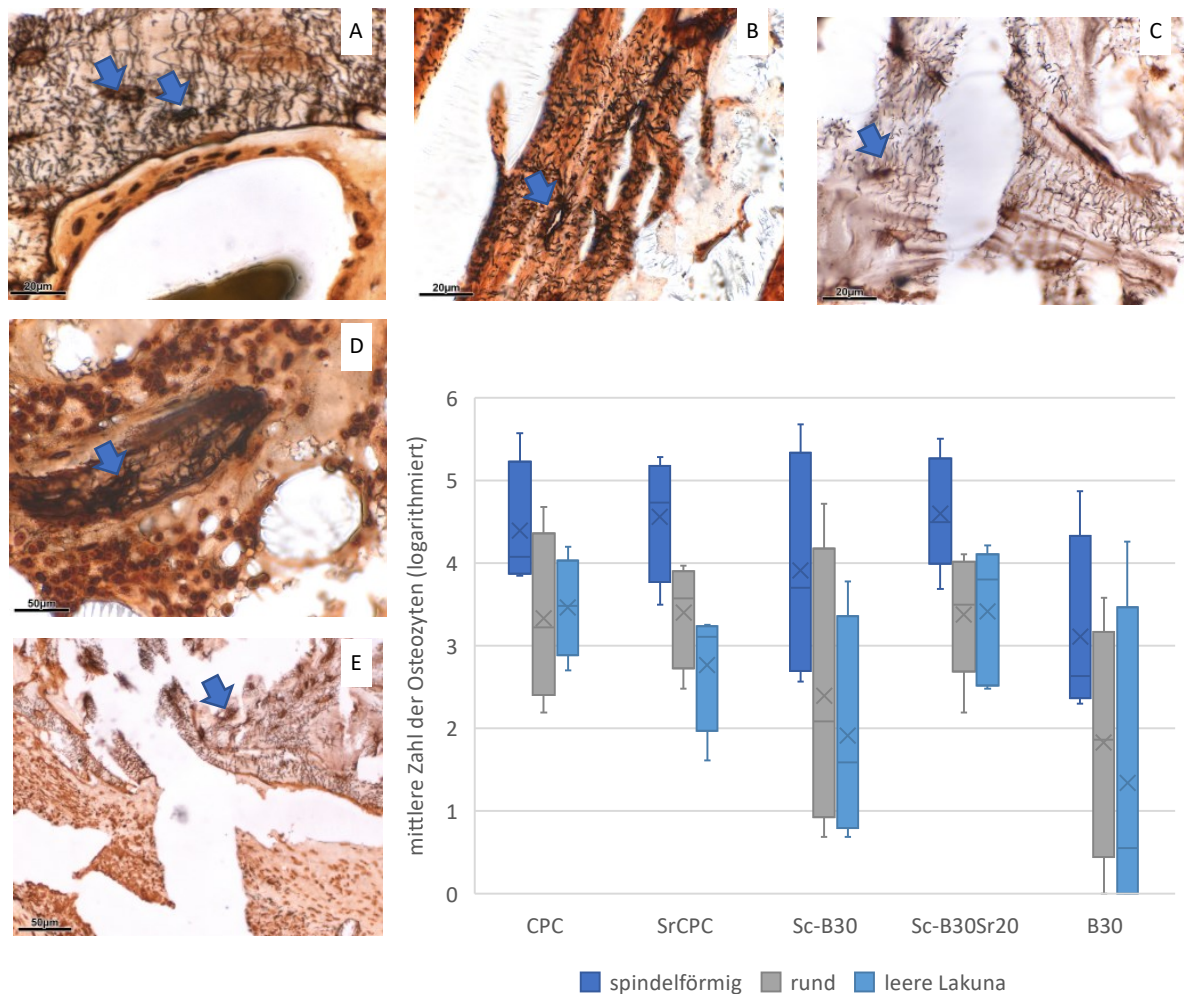


Abbildung 17: Histomorphometrische Analyse der logarithmierten Anzahl der Osteozyten in den 3 verschiedenen Zustandsarten im Bereich des ROI in der Silbernitratfärbung für jede Gruppe (A: CPC, B: SrCPC, C: B30, D: ScB30, E: ScB30Sr20; A und B mit 20µm Maßstabsleiste, C-E mit 50µm Maßstabsleiste, Pfeile: Osteozyten). Es zeigten sich keine statistisch signifikanten Interaktionen zwischen den verschiedenen Zustandsarten und dem jeweiligen Material ($p=0,564$). Ebenfalls keinen Unterschied ergab der isolierte Vergleich der einzelnen Gruppen (F) untereinander ($p=0,190$). Letztendlich konnten aber statistische Unterschiede in der Anzahl der verschiedenen Zustandsarten festgestellt werden ($p<0,001$).

In einer weiteren Analyse wurden die Strontium-gedopten Materialien mit den jeweiligen Kontrollgruppen CPC und Bioglas (B30, ScB30) verglichen (Abb. 18). Bezogen auf die mittlere Anzahl der Zellen ist der Verlauf ähnlich wie in Abb. 17. Auf der Seite von CPC ist ein fast kongruenter Verlauf der Graphen erkennbar, jedoch zeigen sich analog zu Abb. 17 weniger leere Zelllakunae unter Anwesenheit von Strontium. In der Gruppe des Bioglas zeigten sich multiple Unterschiede zwischen den Graphen. Zunächst liegt die mittlere Anzahl für jede Zustandsart unter Einfluss von Strontium über denen ohne Strontium. Weiterhin kann ein Anstieg der leeren Zelllakunae, über die Anzahl der runden Zellen, unter Einfluss von Strontium beobachtet werden. In dieser Auswertung zeigten sich aber keine signifikanten Interaktionen zwischen dem Strontiumgehalt und den einzelnen Gruppen ($p=0,094$). Des Weiteren konnten keine signifikanten Unterschiede innerhalb des Strontiumgehalts ($p=0,230$) und keine signifikanten Veränderungen im Vergleich von CPC mit Bioglas ($p=0,301$) nachgewiesen werden. Lediglich die unterschiedlichen Zustandsarten untereinander zeigten wiederum signifikante Unterschiede ($p<0,001$).

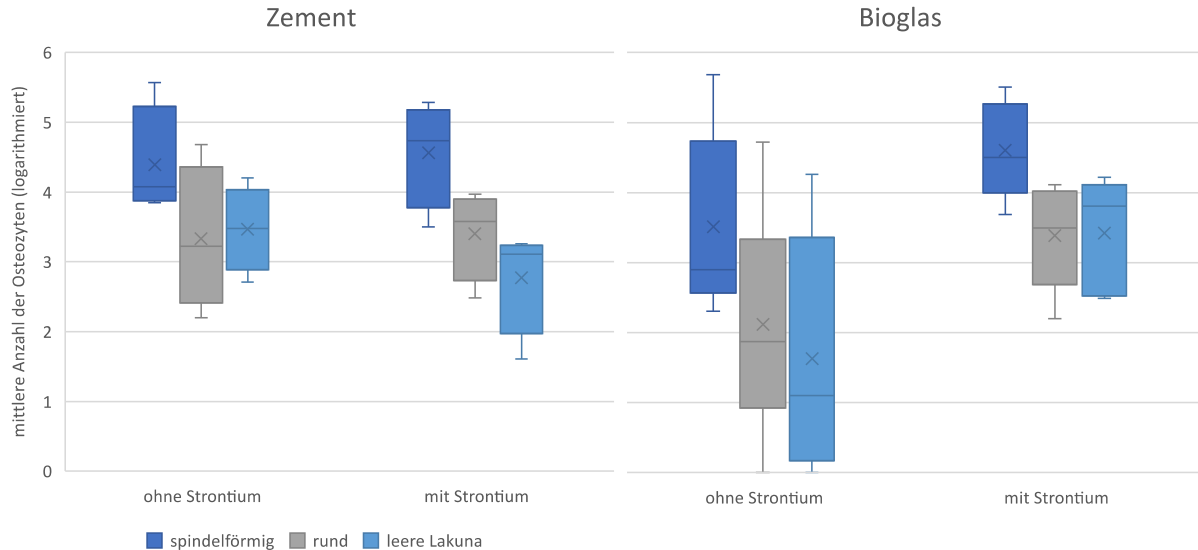


Abbildung 18: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von Osteozyten in den 3 Zustandsarten im Vergleich von CPC (mit/ohne Strontium) sowie Bioglas (B30, ScB30, ScB30Sr20, mit/ohne Strontium). Es ergeben sich keine signifikanten Interaktionen zwischen den Gruppen und dem Strontiumgehalt ($p=0,094$). Ebenfalls nicht signifikant waren die Unterschiede im einfachen Vergleich des Strontiumgehaltes ($p=0,230$) sowie im Vergleich der Gruppen CPC und Bioglas ($p=0,301$). Letztendlich zeigten sich aber signifikante Unterschiede in der Anzahl der verschiedenen Zustandsarten ($p<0,001$).

3.3 Histomorphometrie der immunhistochemischen Färbungen

3.3.1 Matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE)

Wie bereits in Kap. 2.6.2.5 beschrieben, sorgt das von Osteozyten produzierte Glykoprotein, mit seinem Signalweg, für eine Inhibition der Matrixmineralisation. Bei der Analyse der Daten konnte gezeigt werden, dass es unter Einfluss von Strontium beim CPC zu einer deutlichen Reduktion der MEPE-positiven Osteozyten kam (Abb. 19). Auf einem ähnlichen Level befinden sich ebenfalls B30 und ScB30. Lediglich bei ScB30Sr30 konnten im Vergleich zu den beiden zuletzt genannten Gruppen mehr MEPE-positive Osteozyten nachgewiesen werden. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen stellen sich als statistisch signifikant dar ($p=0,015$). Bei der genaueren Analyse der Daten konnte gezeigt werden, dass CPC [$35 \pm 7,39$] gegenüber B30 [$2,667 \pm 4,62$] ($p=0,018$), SrCPC [$3 \pm 11,01$] ($p=0,048$) und ScB30 [$3,25 \pm 3,77$] ($p=0,016$) signifikant ist. Beim Vergleich von CPC und ScB30Sr20 [$10,8 \pm 6,83$] kann jedoch maximal von einer Tendenz ausgegangen werden ($p=0,077$).

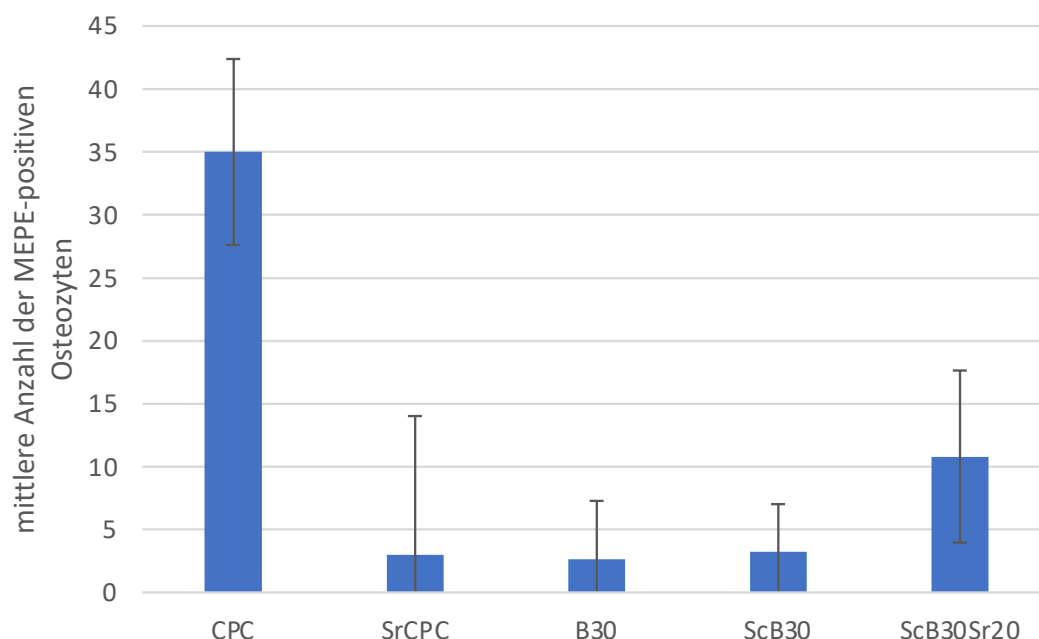


Abbildung 19: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von MEPE-positiven Osteozyten im Bereich des ROI. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen stellen sich statistisch signifikant dar ($p=0,015$). CPC enthält signifikant mehr MEPE-positive Osteozyten verglichen mit B30 ($p=0,018$), SrCPC ($p=0,048$) und ScB30 ($p=0,016$). Beim Vergleich mit ScB30Sr20 kann von einer Tendenz gesprochen werden ($p=0,077$).

In einer weiteren Analyse wurden erneut CPC jeweils mit und ohne Strontium und Bioglas (B30, ScB30, ScB30Sr20) mit und ohne Strontium verglichen (Abb. 20C). Ohne Strontium bestehen Unterschiede zwischen den beiden Materialgruppen. Unter dem Einfluss von Strontium egalisieren sich diese Unterschiede und beide Materialgruppen gleichen sich an, wobei der Wert von CPC noch unter dem von Bioglas liegt. Die statistische Analyse zeigt eine signifikante Interaktion zwischen Strontiumgehalt und den Materialien ($p=0,001$). Ebenfalls signifikant sind die Unterschiede zwischen den Materialgruppen untereinander ($p=0,006$) und dem Strontiumgehalt an sich ($p=0,037$). Die genauere Untersuchung der Interaktionen ergibt jedoch nur statistisch signifikante Werte für den Vergleich der beiden Materialien ohne Strontium ($p=0,001$).

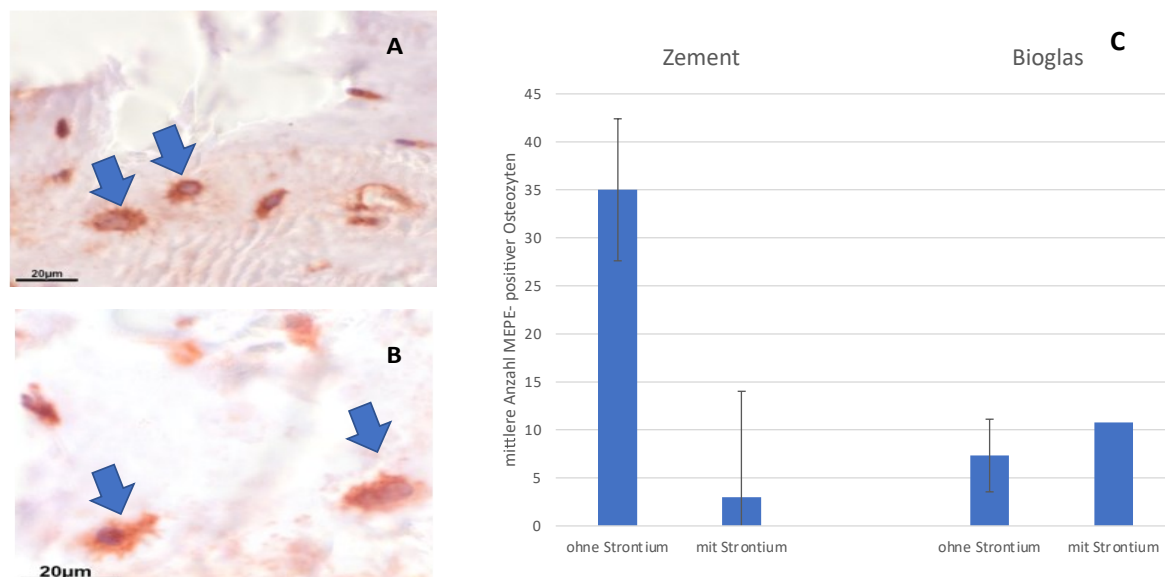


Abbildung 20: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von MEPE- positiven Osteozyten (Pfeile) im Bereich des ROI (A: CPC, B: SrCPC mit 20µm Maßstabsleiste). Die deutlichen Unterschiede zwischen den Materialgruppen ohne Strontium scheinen sich durch die Anwesenheit von Strontium zu egalisieren (C). Bei der statistischen Analyse zeigt sich eine signifikante Interaktion zwischen Strontiumgehalt und Materialklasse ($p=0,001$). Ebenfalls signifikant sind die Unterschiede zwischen den Materialgruppen ($p=0,006$) und dem Strontiumgehalt ($p=0,037$).

3.3.2 Sklerostin (SOST)

Bei Sklerostin handelt es sich um ein von reifen Osteozyten sezerniertes Glykoprotein, welches den Knochenumbau reguliert (vgl. Kap. 2.6.2.6) und durch das SOST-Gen kodiert wird. Bei

der Auswertung (Abb. 21) der Daten wurde ein Logarithmus verwendet um eine Normaverteilung zu erreichen. Es zeigte sich danach, dass CPC die meisten Sklerostin-positiven Zellen aufweist [$19 \pm 5,66$]. Unter Anwesenheit von Strontium sinkt der Wert deutlich [$8 \pm 3,46$]. Dennoch finden sich immer noch mehr positive Osteozyten als in den Bioglasgruppen. Verglichen mit B30 [$0,75 \pm 1,5$] kommt es bei ScB30 [$9,5 \pm 9,712$] und ScB30Sr20 [$4 \pm 5,96$] zu einem deutlichen Anstieg. Insgesamt sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen als statistisch signifikant ($p=0,049$) anzusehen.

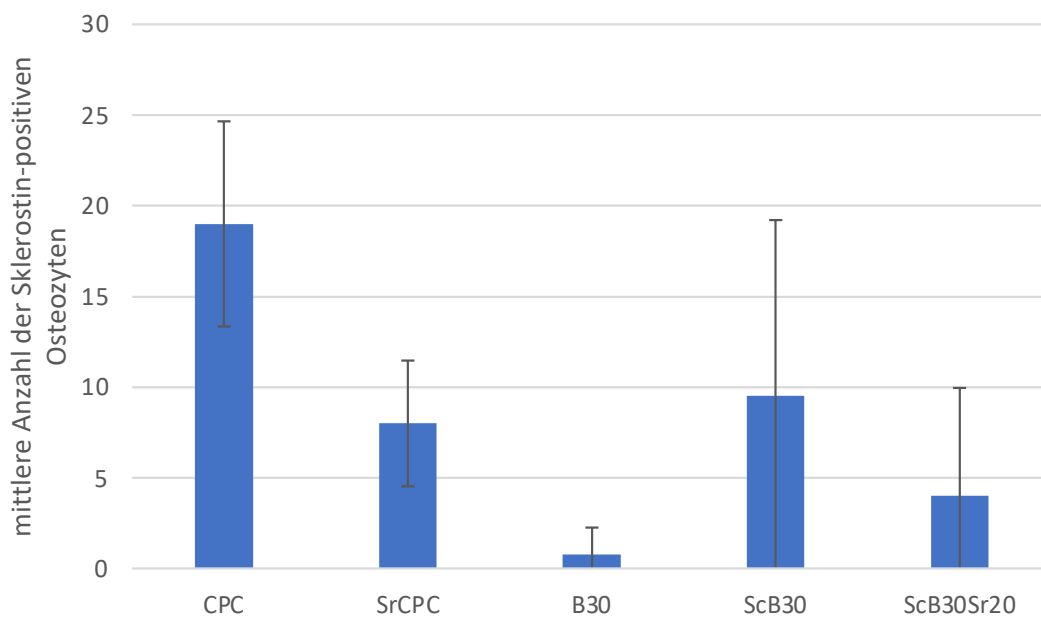


Abbildung 21: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von Sklerostin-positiven Osteozyten im Bereich des ROI. In der CPC-Gruppe finden sich die meisten positiven Zellen. Durch die Anwesenheit von Strontium kommt es zu einer deutlichen Reduktion der Anzahl. Verglichen mit B30 finden sich in den Gruppen ScB30 und ScB30Sr20 deutlich mehr SOST-positive Osteozyten. Diese bleiben jedoch unter den Werten von CPC bzw. SrCPC. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sind statistisch signifikant ($p=0,049$).

Bei der Analyse der Daten zeigen sich im Vergleich von CPC mit Bioglas, jeweils mit und ohne Strontium, deutliche Unterschiede (Abb. 22C). Die Werte von CPC liegen auf einem höheren Niveau als bei Bioglas. Unter Anwesenheit von Strontium nähern sich diese aneinander an, CPC verbleibt aber auf einem höheren Niveau. Die Werte für Strontium-gedoptes Bioglas sind geringfügig kleiner als die ohne Strontium. Die statistische Analyse der Daten konnte keine signifikante Interaktion zwischen Strontium und der Materialgruppe zeigen ($p=0,576$). Ebenfalls konnte kein relevanter Unterschied beim Strontiumgehalt an sich gezeigt werden.

($p=0,524$). Es zeigten sich jedoch signifikante Unterschiede zwischen Zement [$13,5 \pm 4,56$] und Bioglas [$4,75 \pm 5,72$] ($p=0,022$).

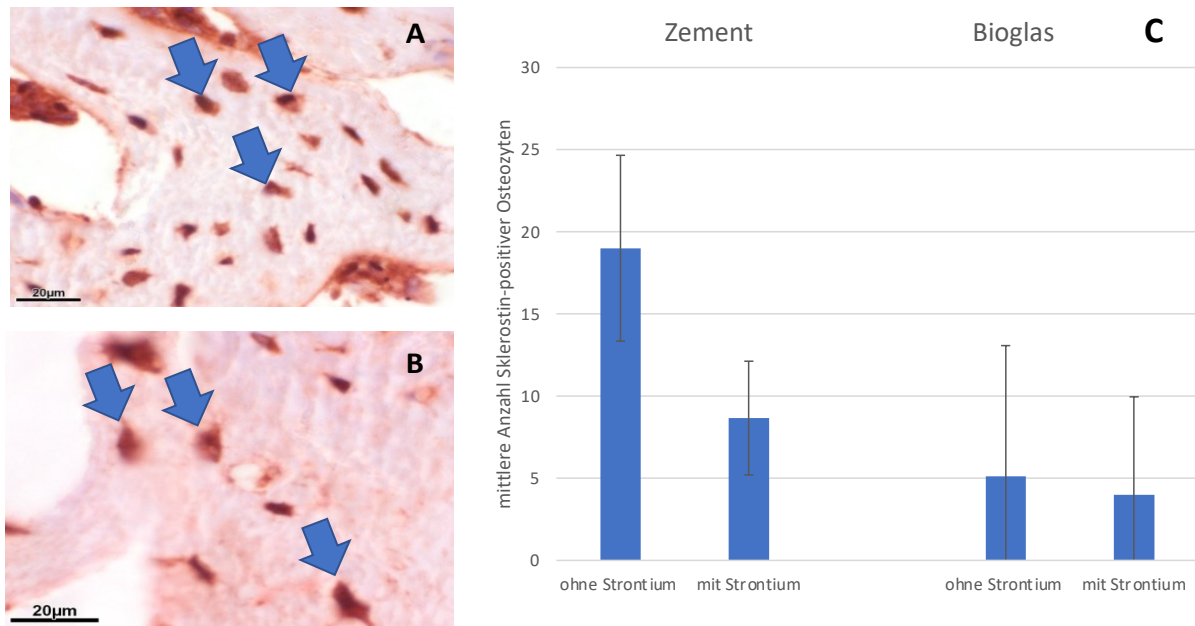


Abbildung 22: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von Sklerostin- positiven Osteozyten im Bereich des ROI. Die deutlichen Unterschiede zwischen den beiden Materialgruppen wurden geringer unter der Anwesenheit von Strontium (A: CPC, B: SrCPC mit 20µm Maßstabsleiste). In beiden Gruppen reduziert sich die Anzahl der Sklerostin-positiven Zellen unter Anwesenheit von Strontium(C). Es konnten keine signifikanten Interaktionen ($p=0,576$) zwischen Material und Strontium oder Unterschiede im Strontiumgehalt ($p=0,524$) gezeigt werden. Die Unterschiede zwischen beiden Materialgruppen sind jedoch signifikant ($p=0,022$).

3.3.3 Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)

Beim Bone morphogenetic protein 2 handelt es sich um einen potenten Wachstumsfaktor (vgl. Kap. 2.6.2.1), welcher unter anderem von Osteozyten sezerniert wird. Durch seine Wirkungsweise kommt es zur Induktion osteoanaboler Prozesse. Die Analyse der logarithmierten Daten zeigt deutlich mehr BMP-2- positive Osteozyten in der CPC-Gruppe als in der B30 oder ScB30 Gruppe (Abb. 23). Durch den Zusatz von Strontium zeigen sich im Vergleich dazu deutlich mehr BMP-2- positive Osteozyten. Beim direkten Vergleich der Werte liegt jedoch CPC [$26,25 \pm 13,33$] über den Werten von SrCPC [$19,83 \pm 10,26$]. Die beschriebenen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sind nicht statistisch signifikant ($p>0,1$).

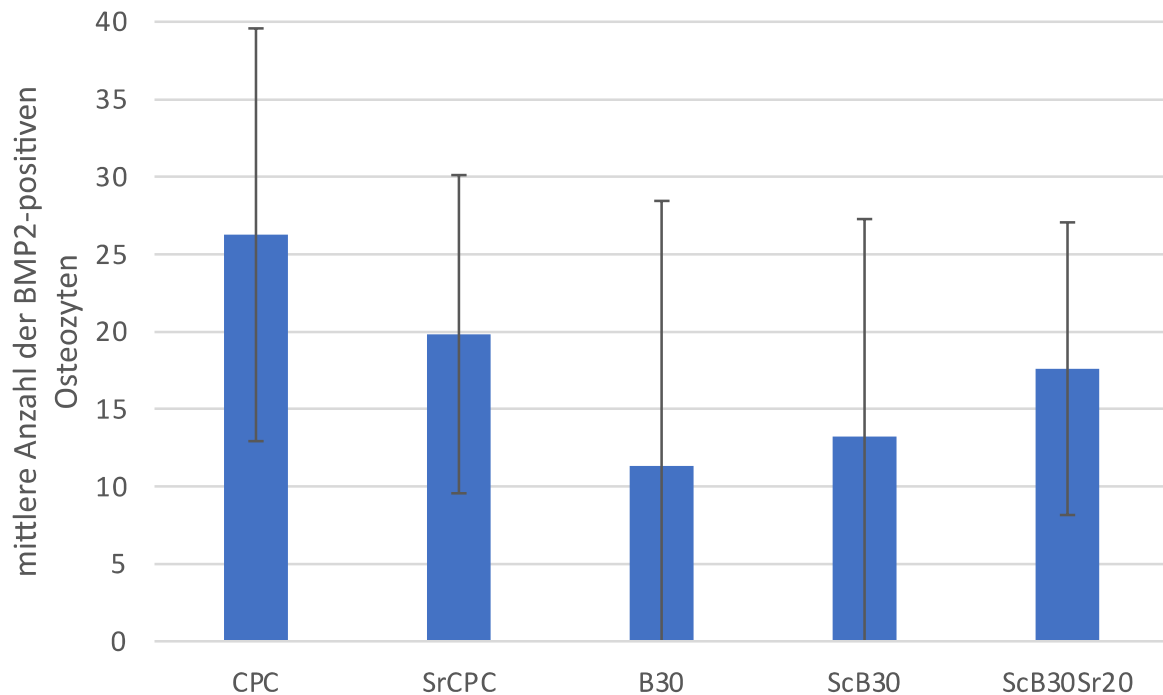


Abbildung 23: Histomorphometrische Analyse der mittleren logarithmierten Anzahl von BMP-2-positiven Osteozyten im Bereich des ROI. Die strontiumhaltigen Gruppen SrCPC und ScB30Sr20 enthalten mehr positive Zellen im Vergleich zu B30 und ScB30. Es zeigt sich außerdem, dass CPC mehr positive Osteozyten enthält als SrCPC. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sind jedoch statistisch nicht signifikant ($p=0,197$).

Analysiert man die Daten nach Strontiumgehalt und teilt sie in die Gruppen CPC (CPC, SrCPC) und Bioglas (B30, ScB30, ScB30Sr20), so kann gezeigt werden, dass analog zu Abb. 19, die Anzahl an BMP-2-positiven Osteozyten unter Anwesenheit von Strontium geringer wird. In der Bioglasgruppe kommt es hingegen zu einem deutlichen Anstieg der BMP-2-positiven Zellen durch den Einfluss von Strontium (Abb. 24C). Insgesamt nähern sich beide Gruppen aneinander an, sobald sie Strontium enthalten. Statistisch konnten keine signifikanten Interaktionen zwischen Material und Strontiumgehalt festgestellt werden ($p=0,182$). Ebenfalls nicht signifikant waren die Unterschiede beim isolierten Vergleich des Strontiumgehaltes. Interessanterweise bestehen ohne Strontium zwischen den beiden Materialien signifikante Unterschiede ($p=0,041$). Unter Anwesenheit von Strontium jedoch nicht mehr ($p=0,805$).

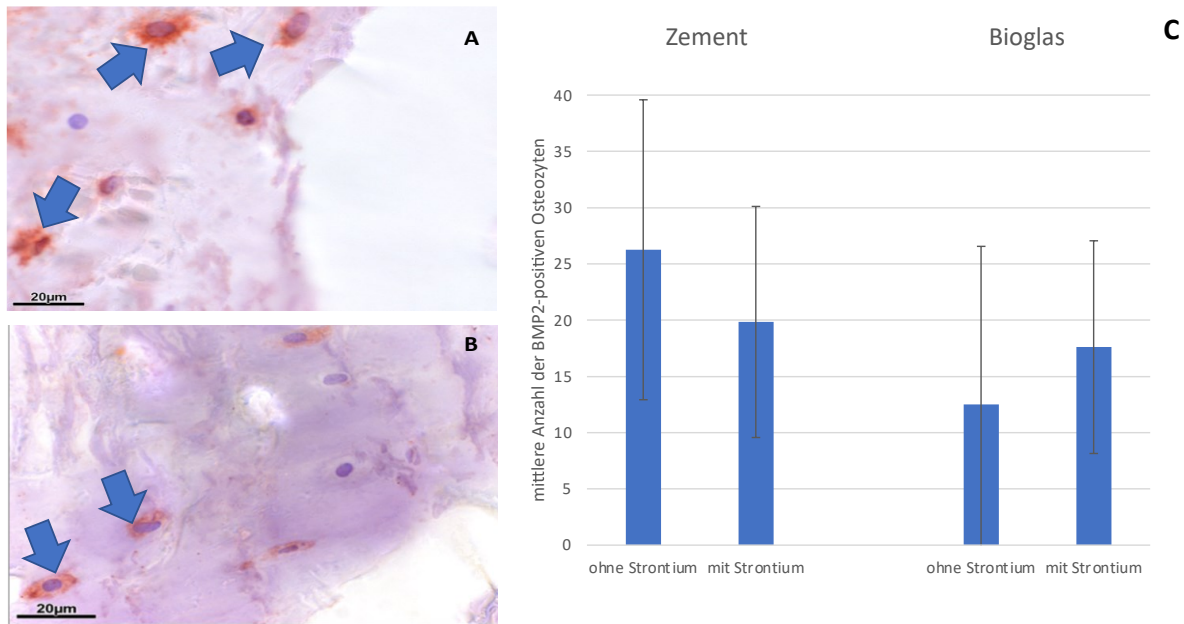


Abbildung 24: Histomorphometrische Analyse der logarithmierten mittleren Anzahl von BMP-2-positiven Osteozyten (Pfeile) im Bereich des ROI (A: CPC, B: SrCPC mit 20µm Maßstabsleiste). CPC liegt auf einem deutlich höheren Niveau als Bioglas ohne Strontium (C). Durch Strontium nähern sich beide Graphen aneinander an, so dass Bioglas deutlich mehr BMP-2-positive Zellen aufweist, unter Anwesenheit von Strontium. Die Unterschiede beider Gruppen ohne Strontium sind signifikant ($p=0,041$), wohingegen mit Strontium die Unterschiede egalisiert werden ($p=0,805$).

3.3.4 Dickkopf 1 (DKK1)

Dickkopf 1 ist ein Glykoprotein, welches inhibierenden Einfluss auf den Wnt/ β -catenin Signalweg hat. Dadurch bewirkt DKK1 unter anderem eine Verminderung der Osteoblastendifferenzierung und fördert den Knochenabbau durch Osteoklasten. Die Analyse der logarithmierten DKK1-positiven Osteozyten hat gezeigt, dass Gruppen ScB30Sr20, ScB30 und B30 auf einem ähnlich niedrigen Niveau liegen (Abb. 25). Dagegen liegt SrCPC bereits auf einem höheren Niveau. Verglichen mit den anderen Gruppen finden sich am meisten DKK1-positive Osteozyten in der CPC-Gruppe. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sind nicht signifikant ($p=0,986$).

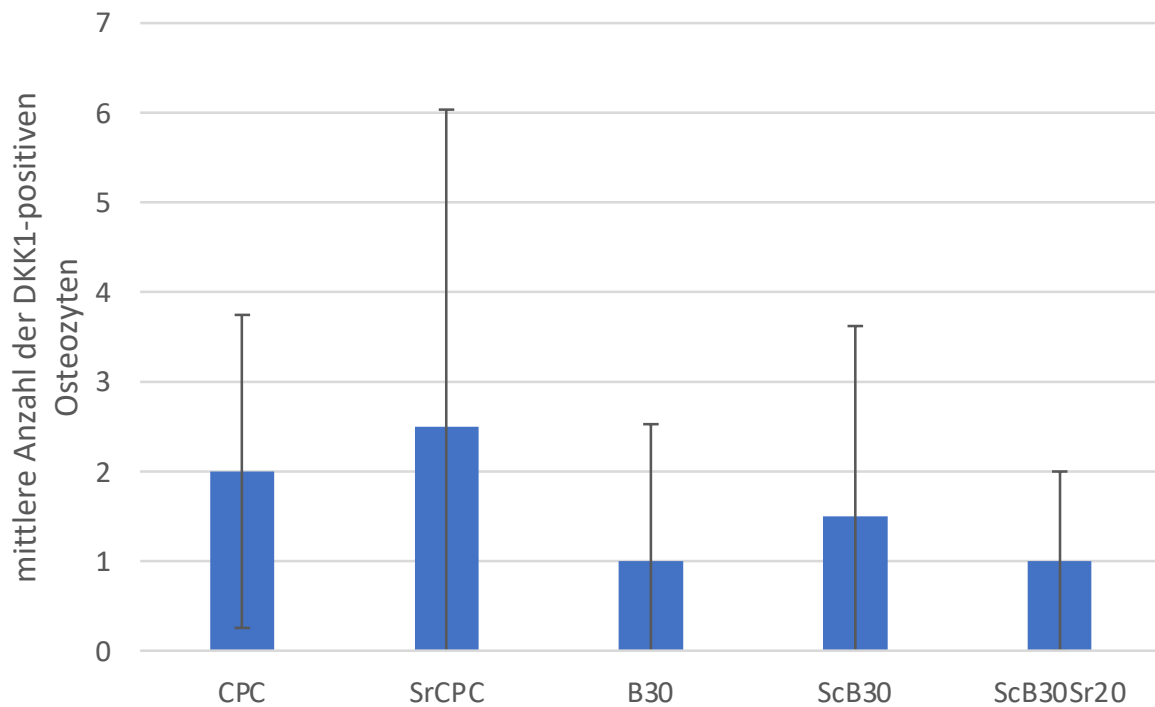


Abbildung 25: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von DKK1- positiven Osteozyten im Bereich des ROI. Die Werte für ScB30Sr20, B30 und ScB30 liegen auf einem ähnlich niedrigen Niveau. Lediglich SrCPC und CPC heben sich davon ab. Insgesamt zeigen sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,986$).

Bezogen auf die Analyse der logarithmierten Daten zwischen CPC und Bioglas, zeigen sich deutliche Unterschiede (Abb. 26C). Der Graph von CPC verläuft auf einem höheren Niveau, als der Graph von Bioglas. Unter Einfluss von Strontium kommt es in beiden Gruppen zur Verminderung der Anzahl von DKK1- positiven Osteozyten. Die statistische Analyse konnte keine signifikanten Interaktionen zwischen Strontiumgehalt und Material ($p=0,917$) oder Unterschiede zwischen den Materialien ($p=0,595$) zeigen. Außerdem konnten keine Unterschiede zwischen dem Strontiumgehalt ($p=0,828$) festgestellt werden.

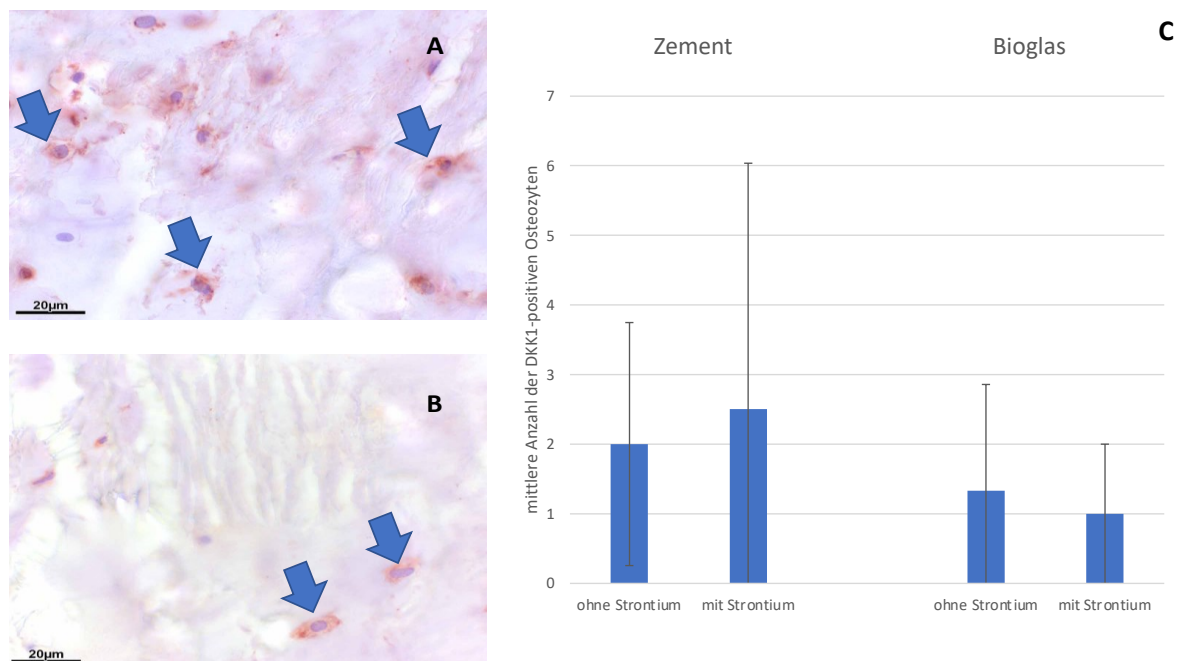


Abbildung 26: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von DKK1-positiven Osteozyten im Bereich des ROI (A: CPC, B: SrCPC mit 20µm Maßstabsleiste). Der Graph von CPC liegt im Vergleich zu Bioglas auf einem deutlich höheren Niveau(C). In beiden Materialien ließen sich unter Anwesenheit von Strontium weniger DKK1-positive Osteozyten nachweisen. Es konnten jedoch keine signifikanten Interaktionen ($p=0,917$) festgestellt werden.

3.3.5 Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)

Beim RANKL handelt es sich um ein hauptsächlich von Osteoblasten, aber auch von Osteozyten produziertes Membranprotein. Dieses ist von wichtiger Bedeutung bei der Aktivierung von Osteoklasten. RANKL führt somit zu einer Steigerung des Knochenabbaus. Die graphische Auswertung der logarithmierten Daten bezogen auf RANKL-positive Osteozyten zeigt mehr Osteozyten in den Gruppen von CPC und SrCPC, verglichen mit B30 oder ScB30 (Abb. 27). Der Strontiumgehalt vermindert die Anzahl von positiven Osteozyten in der strontiumhaltigen CPC-Gruppe. In der ScB30Sr20 ließen sich im Vergleich zu allen anderen Gruppen die meisten positiven Osteozyten nachweisen. Die Veränderungen in den einzelnen Gruppen sind jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,313$).

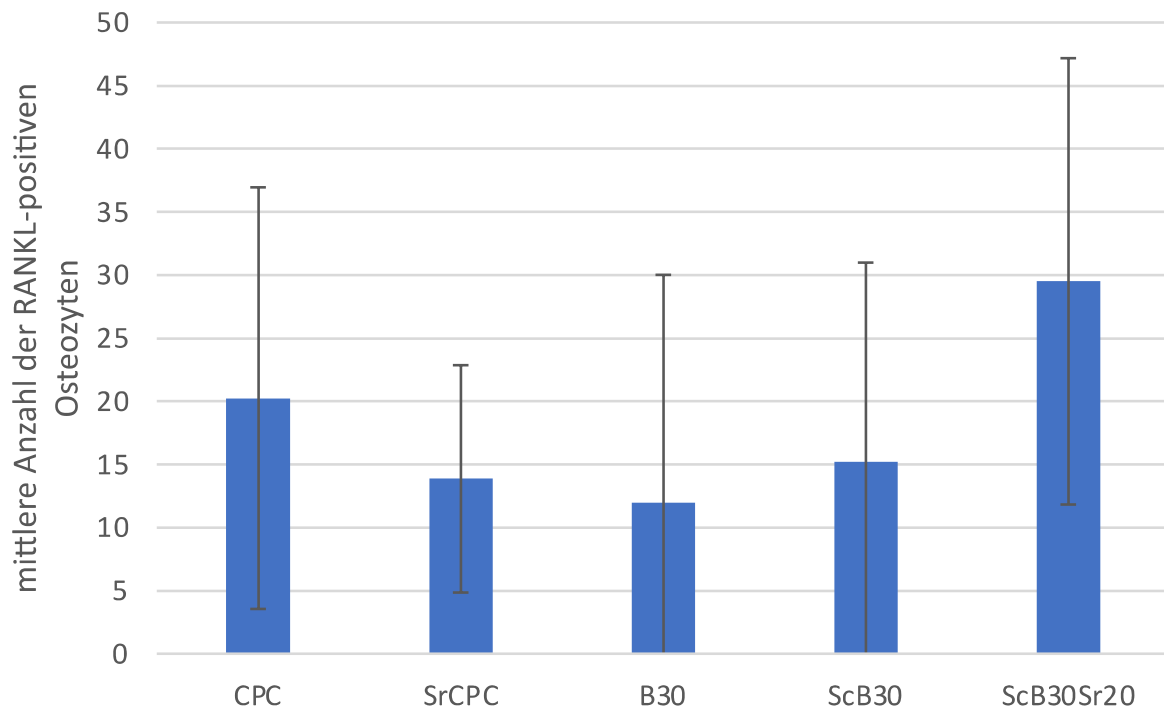


Abbildung 27: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von RANKL- positiven Osteozyten im Bereich des ROI. CPC und SrCPC enthalten mehr positive Osteozyten als die Gruppen B30 und ScB30. ScB30Sr20 enthält verglichen mit allen anderen Gruppen am meisten positive Osteozyten. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sind nicht signifikant ($p=0,313$).

Vergleicht man die Gruppen CPC und Bioglas mit und ohne Strontium (Abb. 28C) kann gezeigt werden, dass beide Graphen komplett entgegengesetzt verlaufen. CPC hat ohne Strontium deutlich mehr RANKL- positive Osteozyten im Vergleich zu Bioglas. Unter Anwesenheit von Strontium sinkt dieser Wert deutlich, während in der Bioglas -Gruppe hingegen dieser Wert merklich ansteigt, so dass er unter Einfluss von Strontium über dem Wert von CPC liegt. In der statistischen Analyse konnten keine signifikanten Interaktionen zwischen Strontiumgehalt und Material ($p= 0,096$), Unterschiede zwischen den Materialien ($p= 0,789$) oder Unterschiede im Strontiumgehalt ($p=0,291$) festgestellt werden.

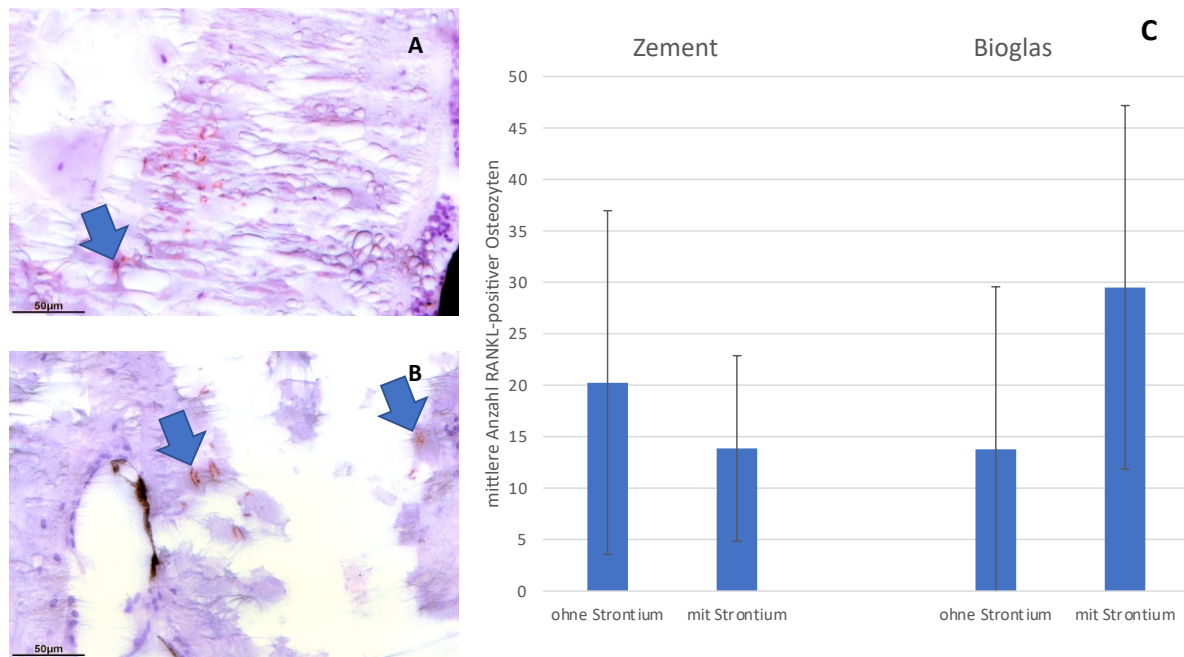


Abbildung 28: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von RANKL-positiven Osteozyten (Pfeile) im Bereich des ROI (A: CPC, B: SrCPC mit 50µm Maßstabsleiste). Bei CPC konnten ohne Strontium mehr positive Osteozyten nachgewiesen werden (C). Unter Einfluss von Strontium kehren sich die Graphen jedoch um, so dass CPC mit Strontium weniger positive Zellen enthält, als der Ausgangswert oder als Bioglas mit Strontium. Es konnten jedoch keine signifikanten Interaktionen ($p=0,096$) festgestellt werden.

3.3.6 Osteoprotegerin (OPG)

Osteoprotegerin (OPG) ist eine lösliche Rezeptorattrappe für RANKL, welche von Osteoblasten und Osteozyten produziert und sezerniert wird. OPG hemmt den Knochenabbau, da die Reifung von Vorläuferzellen zu reifen Osteoklasten inhibiert wird [Clem et al. 2008].

Beim graphischen Vergleich (Abb. 29) der logarithmierten Daten der Gruppen, fallen Analogien zu RANKL (Abb. 27) auf. Es zeigen sich mehr OPG-positive Osteozyten in den Gruppen von CPC und SrCPC, verglichen mit B30 oder ScB30. Der Strontiumgehalt vermindert die Anzahl von positiven Osteozyten in der strontiumhaltigen CPC-Gruppe. ScB30Sr20 enthält zwar mehr positive Zellen als B30 und ScB30, bleibt aber unter dem Niveau von CPC und SrCPC. Statistisch sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen mit $p=0,041$ signifikant. Eine Vergleichsanalyse der einzelnen Gruppen untereinander zeigte allerdings keine Signifikanz (Appendix 3).

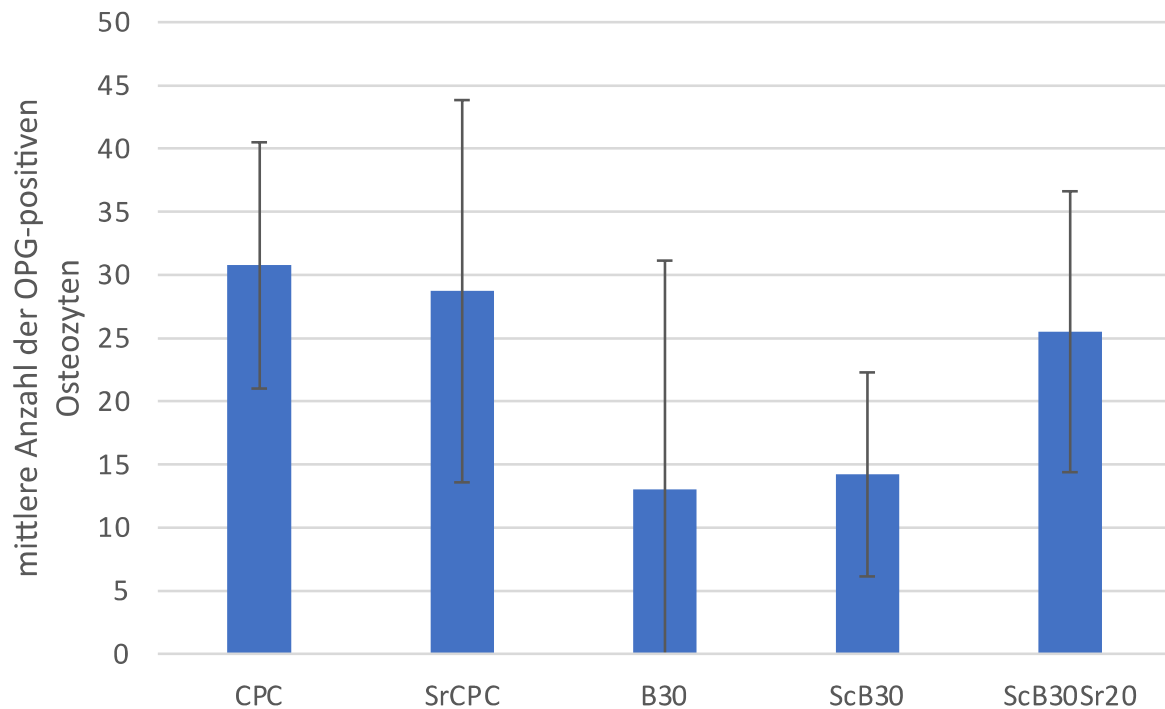


Abbildung 29: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von OPG-positiven Osteozyten im Bereich des ROI. CPC und SrCPC liegen deutlich über dem Niveau von B30 und ScB30. Unter dem Einfluss von Strontium kann bei CPC eine leichte Verminderung der OPG-positiven Zellen beobachtet werden. ScB30Sr20 liegt zwar über dem Niveau von B30 und ScB30, bleibt jedoch unter dem von CPC und Sr-CPC. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen sind mit $p=0,041$ signifikant.

Stellt man die beiden Gruppen CPC und Bioglas grafisch dar, so erkennt man deutliche Unterschiede zwischen den Materialgruppen (Abb. 30C), da CPC signifikant mehr ($p=0,017$) OPG-positive Osteozyten im Vergleich zu Bioglas aufweist. Durch die Anwesenheit von Strontium kommt es zur deutlichen Annäherung der beiden Graphen durch ein leichtes Absinken von CPC und einen deutlichen Anstieg des Graphen für Bioglas. Die Annäherung ergibt keine signifikanten Unterschiede mehr ($p=0,880$). Es konnte keine statistisch relevante Interaktion zwischen Material und Strontiumgehalt festgestellt werden ($p=0,105$). Ebenfalls ohne Signifikanz ist der Unterschied im Strontiumgehalt ($p=0,245$). Die Unterschiede zwischen den beiden Materialien weisen hingegen einen deutlichen Trend auf ($p=0,070$).

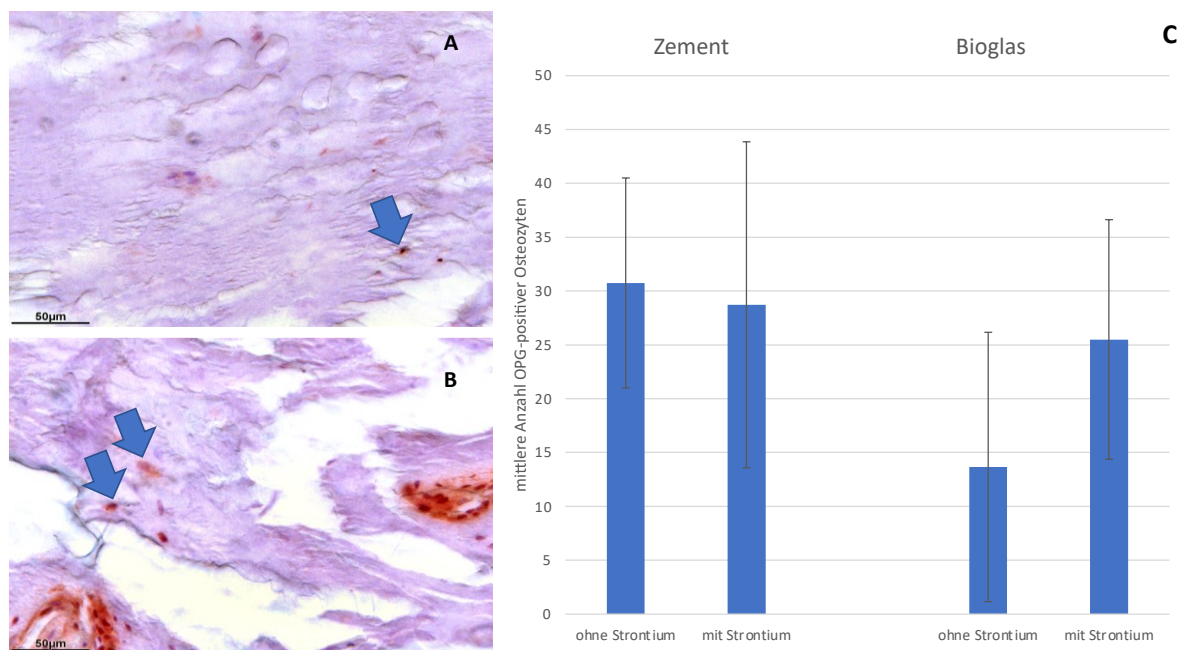


Abbildung 30: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von OPG- positiven Osteozyten (Pfeile) im Bereich des ROI (A: CPC, B: SrCPC mit 50µm Maßstabsleiste). Zwischen den beiden Gruppen (C) bestehen ohne Strontium signifikante Unterschiede ($p=0,017$), welche sich jedoch unter Anwesenheit von Strontium egalisieren ($p=0,880$). Insgesamt kann von einem Trend bei den Materialunterschieden ($p=0,070$) ausgegangen werden. Die Unterschiede beim Strontiumgehalt stellen sich nicht signifikant dar ($p=0,245$).

3.3.7 RANKL/OPG- Quotient

Wie bereits in 2.3.5 und 2.3.6 beschrieben, haben RANKL und OPG antagonistische Funktionen. RANKL sorgt für die Aktivierung und Reifung der Osteoklasten und fördert damit den Knochenabbau, während OPG hingegen selbigen hemmt und damit den Knochenabbau vermindert. Eine Analyse dieses Quotienten zeigt demnach, ob hemmende oder fördernde Einflüsse für den Knochenabbau überwiegen. Wie in Abb. 31 grafisch dargestellt, liegen die Werte für CPC und SrCPC deutlich unter den Werten von B30, ScB30 und ScB30Sr20, wobei sich die letzteren 3 Gruppen sehr wenig voneinander unterscheiden. Insgesamt zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen allen Gruppen ($p=0,104$).

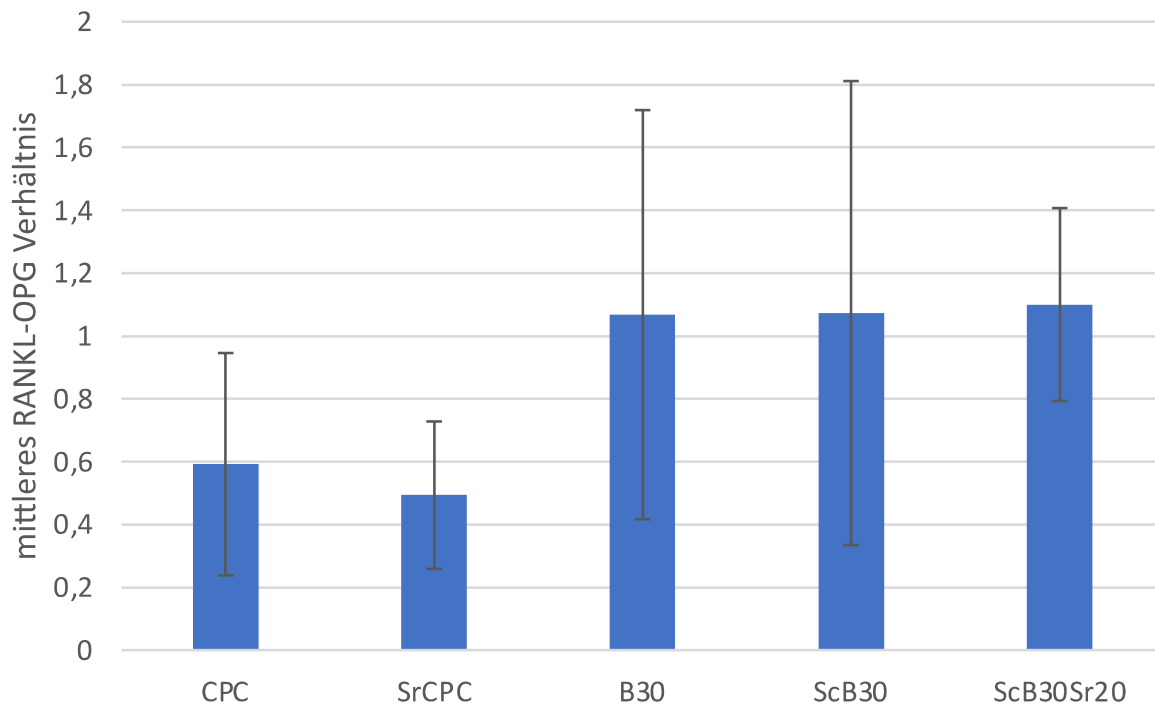


Abbildung 31: Darstellung des Quotienten aus der histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von RANKL- positiven Osteozyten, geteilt durch die mittlere Anzahl von OPG-positiven Osteozyten im Bereich des ROI. CPC und SrCPC bleiben deutlich unter den Werten von B30, ScB30 und ScB30Sr20, wobei die letzteren sich nahezu gleichen. Insgesamt sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant ($p=0,104$).

Teilt man für die Analyse der Daten die Gruppen in Zement und Bioglas, so zeigen sich signifikante Unterschiede ($p=0,009$) zwischen den beiden Materialgruppen (Abb. 32). Bioglas liegt deutlich über den Werten von Zement. Durch die Anwesenheit von Strontium kommt es zu einem weiteren Divergieren der Graphen. Die Analyse von Interaktionen zwischen Material und Strontiumgehalt zeigte keine signifikanten Unterschiede ($p=0,621$). Gleiches gilt für den Strontiumgehalt an sich ($p=0,972$).

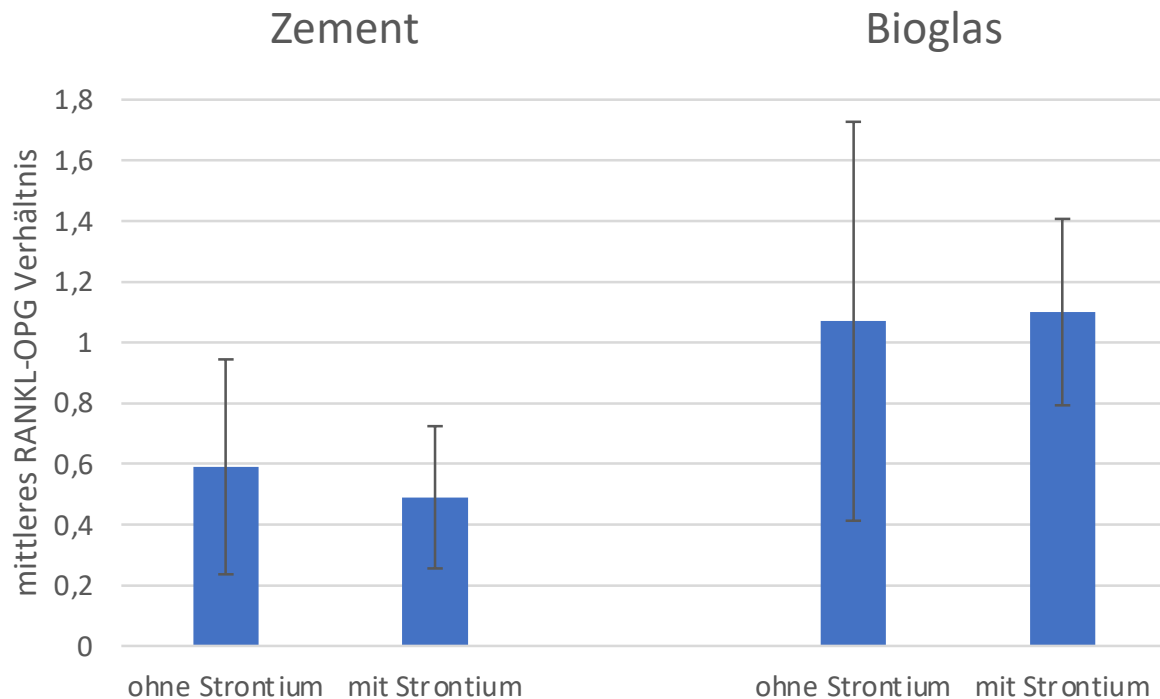


Abbildung 32: Darstellung des logarithmierten Quotienten aus der histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von RANKL- positiven Osteozyten, geteilt durch die mittlere Anzahl von OPG-positiven Osteozyten im Bereich des ROI. Bioglas liegt auf einem deutlich höheren Niveau als Zement. Durch die Anwesenheit von Strontium kommt es zu einem weiteren Divergieren der Graphen, so dass sich signifikante Unterschiede zwischen beiden Materialien ergeben ($p= 0.009$). Signifikante Interaktionen zwischen Material und Strontiumgehalt ($p=0,621$) oder Unterschiede im Strontiumgehalt ($p=0,972$) konnten nicht nachgewiesen werden.

4. Diskussion

Durch den demografischen Wandel vervielfacht sich das Risiko für systemische Erkrankungen des Skelettsystems bei älteren Patienten deutlich. Eine signifikante Steigerung von Osteoporose-Erkrankten ist die Folge [Häussler et al 2007]. Es konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der Patienten im Laufe ihres Lebens eine Fraktur ohne adäquates Trauma entwickeln [Bäbgen et al 2012]. Als Folge davon steht die moderne Medizin im klinischen Alltag vor neuen Herausforderungen. Es gilt neue Therapieansätze für die Versorgung von häufig komplexen Knochendefekten zu entwickeln, welche nicht selten nur schlecht oder gar nicht heilen und mit einem Substanzverlust einhergehen [Hollinger et al 2007]. Durch den Einsatz von innovativen Knochenersatzmaterialien können diese Defekte gefüllt werden und das umgebende Knochengewebe zur Heilung angeregt werden. Diese neuen Biomaterialien müssen jedoch zahlreiche Voraussetzungen erfüllen, damit eine klinische Anwendbarkeit infrage kommt. Die in dieser Arbeit verwendeten Knochenersatzmaterialien konnten bereits gute Ergebnisse in Bezug auf Festigkeit, Resorbierbarkeit und Biokompatibilität liefern [Quade et al 2017, Rohnke et al 2017, Schumacher et al 2017, Heinemann et al 2011]. Neben der Funktion der Defektauffüllung wurde in dieser Arbeit erstmalig der Einfluss der verschiedenen Knochenersatzmaterialien sowie der Einfluss des Strontiumgehaltes auf die Osteozyten untersucht.

Im Folgenden soll nun weiter ausgeführt werden, in wie fern die neuen Biomaterialien und die Anwesenheit von Strontium, in der Umgebung von Osteozyten, Einfluss auf deren Stoffwechsel, Anzahl und Interaktionen mit anderen Zellen haben. Hierzu werden die Ergebnisse der histomorphometrischen Auswertungen vergleichend diskutiert.

4.1 Ratte als Kleintiermodell

Der Einsatz von Versuchstieren für wissenschaftliche Arbeiten ist sehr kritisch zu diskutieren. Bei der Planung von wissenschaftlichen Versuchen sollte immer dem „3R-Prinzip“ von Russel und Burch [1959] Sorge getragen werden. Wenn möglich sollten Tierversuche im Allgemeinen durch den Einsatz von Alternativmethoden vermieden werden (Replace). Aktuell gibt es jedoch keine alternativen Modelle die den komplexen Vorgang der osteoporotischen Frakturheilung im Ganzen abbilden können. Wenn Versuchstiere zum Einsatz kommen, sollte sich ihre Zahl auf ein Minimum reduzieren (Reduce) und es sollte darauf geachtet werden, dass sie möglichst

wenig Leid empfinden (Refine). Diese Maßnahmen müssen bei der Versuchsplanung Berücksichtigung finden und werden durch strenge Regularien der zuständigen Behörden und der Ethikkommission kontrolliert.

In den letzten Jahren rückten zunehmend Kleintiere in den Mittelpunkt von Studien zur Frakturheilung [Histing et al 2011]. Wie Egermann et al [2005] herausgearbeitet hat, bieten kleine Nagetiere, wie beispielsweise Ratten, eine Reihe von Vorteilen gegenüber größeren Versuchstieren wie Schafen oder Kaninchen. Die Kosten für die Haltung der Tiere, der pflegerische Aufwand und die Nahrungsmengen sind deutlich geringer. Zudem ermöglicht eine relativ kurze Tragezeit der Ratte eine Anzucht von vielen Versuchstieren in kurzer Zeit. Ein weiterer Vorteil in der späteren Auswertung der Ergebnisse ist die Tatsache, dass zahlreiche monoklonale Antikörper für die Untersuchung diverser Faktoren existieren und bei bestimmten Fragestellungen Knock-out-Ratten in relevanter Stückzahl verfügbar sind. Eine Limitation des Modells besteht darin, dass Ratten einer intensiveren Kontrolle bezüglich der Abstammung, des Alters und des Geschlechts bedürfen, damit standardisierte und definierte Studienbedingungen erreicht werden. Außerdem ist die Knochenstruktur von Ratten primitiver als die von Menschen [Histing et al 2011]. Nichtsdestotrotz ist die Knochenheilung von Ratten über Resorptionslakunen vergleichbar mit dem Haverschen Knochenremodeling in größeren Säugetieren und Menschen [Nunamaker 1998]. Insgesamt kann man in Versuchstieren wie Ratten die pathologischen Prozesse, welche in Patienten ablaufen, sehr nah nachbilden. Daraus ergibt sich, dass Ratten ein valides Werkzeug sind um den komplexen Prozess der Knochenheilung zu verstehen [McCann et al 2007].

4.2 Klinische Relevanz des gewählten Modells

Bei der tierexperimentellen Untersuchung der Knochenersatzmaterialien sollte bei der Planung des Versuchsaufbaus, auf die angedachte klinische Nutzung des Materials geachtet werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Materialien sollen später Frakturdefekte von Patienten füllen, zusätzliche Stabilität bieten und das Knochenremodelling anregen. Thompson et al [1995] empfehlen dazu die Begutachtung der Effizienz und Sicherheit in zwei verschiedenen Spezies. Neben einem Modell mit ovariectomierten Ratten sollten im Nachgang die Ergebnisse in einem Nicht-Nagetier-Modell bestätigt werden.

Die *in vivo* – Testung von Knochenersatzmaterialien erfolgt häufig in einfachen Bohrlochdefekten des Femurs [Theiss et al 2005]. Die Wahl des Femurs ist zwar aufgrund der schnellen Reparaturfähigkeit sinnvoll [Mukherjee et al 2008], jedoch stellen Bohrlochdefekte keinen re-

präsentativen Defekt beim Vorliegen einer osteoporotischen Fraktur dar [Alt et al 2013]. Die Metaphyse der langen Röhrenknochen, beispielsweise des Femurs, ist von der Osteoporose deutlich betroffen und Frakturen erscheinen häufiger in diesen Bereichen [Riggs et al 1995]. Daher liegt die Stärke des in dieser Arbeit verwendeten Modells, in der Möglichkeit, die Knochenersatzmaterialien in einer klinisch relevanten Situation zu untersuchen [Alt et al 2013]. Weiterhin konnte durch Heiss et al [2012] sowie Schlewitz et al [2013] gezeigt werden, dass durch eine Ovariectomie und spezielle Diät, zuverlässig und reproduzierbar eine Osteoporose in den Ratten erzeugt werden kann, welche die Osteoporose bei Patienten imitiert. Neben DXA-Messungen konnte die erfolgreiche Induktion der Osteoporose ebenfalls in μ CT- Analysen nachgewiesen werden [El Khassawna et al 2015]. Die Materialien werden in einen Frakturdefekt der metaphysären Region appliziert. Die Versorgung erfolgt über eine T-förmige Platte am distalen Femur analog zur Versorgung humaner Frakturen in diesem Bereich. Thormann et al [2013] konnten bereits zeigen, dass der 4mm keilförmige Defekt als critical-size defect für diesen Versuchsaufbau zu werten ist. Folglich können daraus gute Schlüsse über die potentiell fördernden Effekte der verschiedenen Knochenersatzmaterialien gezogen werden.

Im Rahmen des Versuchs kam es zu vereinzelt Plattenbrüchen. Dies könnte als potenzieller Nachteil für das Modell angesehen werden. Es zeigt aber eher die klinische Realität, bei der es ebenfalls immer wieder zu Materialbrüchen, verzögerter Knochenbruchheilung oder gar Pseudarthrosen kommt [Giannoudis et al 2006]. Insgesamt könnte davon ausgegangen werden, dass Strontium einen protektiven Effekt hat, da es unter Anwesenheit von Strontium lediglich zu 14,28% Plattenbrüchen im Vergleich zu 33,33% ohne Strontium kam.

4.3 Biomaterialdegradation

Entscheidend für eine gute Wirksamkeit von zugesetzten Medikamenten oder Wirkstoffen in Knochenersatzmaterialien ist die Degradationsfähigkeit, sowie die Dauer, welche vom jeweiligen Organismus für den Abbau des Materials benötigt wird. Geschieht der Abbau zu schnell, könnten unter Umständen toxische Effekte an den Tag treten. Geschieht der Abbau hingegen zu langsam, so kann eventuell kein Vorteil des zugesetzten Wirkstoffs nachgewiesen werden. Zusätzlich beeinflussen die Wirkstoffe selbst unter Umständen den Abbau, sodass dies ebenfalls beim Design des Werkstoffs bedacht werden muss. Faktoren, die den Abbau von Implantaten beeinflussen, sind beispielsweise die Zusammensetzung, die räumliche Struktur der Materialien, die Oberfläche/ Beschichtung sowie die Porosität [Yildirim 2016].

Nach Implantation des Materials kommt es durch den Kontakt von körpereigenem Gewebe mit dem Knochenersatzmaterial zu einer biologischen Antwort [Anderson 2007], welche erwünschterweise in der Osteointegration endet. Dabei handelt es sich um einen immun-modulierten, multifaktoriellen und komplexen Heilungsvorgang, in den zahlreiche Zellen und Mediatoren eingebunden sind. Es kommt unter anderem durch eine Komplementsystem-Aktivierung und Oberflächenprotein-Präsentation zum Aufbau einer Fibrinmatrix, gefolgt von der Rekrutierung von Granulozyten, mesenchymalen Stammzellen und Makrophagen/Monozyten. Diese sorgen mit einem ätzenden Mix aus Flüssigkeit, Ionen und Proteinen für die Degradation des Materials. Um andere Zellen dabei nicht zu schädigen erfolgt dieser Prozess abgeschlossen von der direkten Umgebung. Die Immunzellen nehmen anschließend das Fremdmaterial auf und Fusionieren zu sogenannten „foreign body giant cells“ (FBGC). Zeitgleich beginnen Knochenzellen mit der Synthese und dem Remodelling von Hydroxylapatit [Trindade et al 2014]. Schlussfolgernd aus diesem Sachverhalt ergibt sich für die Zusammensetzung und Biodegradation des Knochenersatzmaterials, dass es aus körpereigenem oder ähnlichem Material bestehen sollte, um keine überschießende Immunantwort zu produzieren und außerdem so langsam abgebaut werden sollte, dass es durch gesundes Gewebe ersetzt werden kann [Ray 2014]. Durch die Optimierung der Materialdegradation kommt es zudem zu einer schnelleren klinischen Erholung der Patienten [Sethuraman et al. 2016].

Makroskopisch und mikroskopisch konnten in den Bioglas-Gruppen B30, ScB30 und ScB30Sr20 nach 6 Wochen kaum Materialrückstände beobachtet werden (vgl. Abb. 13), daher erfolgte die Untersuchung des Einflusses von Strontium nur bei CPC und SrCPC. Ray et al. [2016] konnten jedoch zeigen, dass B30 signifikant weniger abgebaut wurde, im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen. Zusätzlich zeigten sich in der B30-Gruppe Vakuolen, Detritus und Schaumzellen.

Bei der Untersuchung der Materialdegradation zwischen CPC und SrCPC hatte Strontium eher einen minimal negativen Einfluss auf die Abbaubarkeit des Materials. Ray [2014] beschreibt dagegen einen minimal höheren Abbau von SrCPC, verglichen mit CPC. Daraus ergibt sich, dass der Einfluss von Strontium auf die Abbaubarkeit von CPC eher gering ist, wohingegen sich Strontium in anderen Materialien wie Bioglas positiv auswirken kann. Man kann daraus die Schlussfolgerung aufstellen, dass es sich bei CPC nicht um die ideale Trägersubstanz für die lokale Freisetzung von Strontium handelt. Weiterhin ergibt sich, dass das Design der Trägersubstanz einen entscheidenderen Einfluss auf die Abbaubarkeit hat, als der Zusatz von Strontium.

4.4 Knochen- und Gewebekonstruktion

Der Einfluss von Strontium auf die Knochen- und Gewebekonstruktion wurde bereits in zahlreichen Studien an verschiedenen Tiermodellen untersucht. Dabei wurden verschiedene Spezies sowie ein unterschiedlicher Knochenstatus untersucht [Ibrahim et al 2018, Pelletier et al 2012, Boivin 1996]. Untersuchungen bei osteoporösen Knochen [Malaise et al 2007] oder Ovariectomie-induzierter Osteoporose [Bain 2009], sowie osteonekrotischer Knochen [Chen et al 2018] konnten zeigen, dass es zu einem Anstieg der Knochenbildungs-Marker kommt. Parallel werden die Marker für Knochenresorption supprimiert, was in der Konsequenz zu einer Zunahme des Knochens führt. Der Durchmesser der langen Röhrenknochen wird gesteigert, die Knochendichte nimmt in der DXA- Untersuchung zu und die Mikroarchitektur wird in der histomorphometrischen Untersuchung verbessert.

Die Knochendichtezunahme durch Strontium bzw. Strontiumranelat geht einher mit einer Reduktion des Frakturrisikos [Seeman 2006].

Diese Arbeit untersucht nun die Effekte von lokalem Strontium aus einem Knochenersatzmaterial, bei traumatisch induzierten osteoporotischen Frakturen. Es ließ sich eine leichte Steigerung der Knochenformation durch Strontium nachweisen, welche nicht signifikant war. Alenzi et al. [2019] erzielten ähnliche Ergebnisse bei ihrer Studie mit Strontiumranelat-beschichteten Titanplatten. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Strontiumgruppe bezüglich der Knochen-Implantat-Kontaktfläche und der Gesamtknochenfläche. Gleichwohl muss man die Vergleichbarkeit einschränken, da lediglich die Platten mit Wirkstoff (Strontium) beschichtet wurden und Strontium nicht in den Knochen eingebracht wurde.

In dieser Arbeit konnte im Bereich des ROI signifikant mehr Osteoid und Knorpelgewebe nachgewiesen werden. Dies unterstützt die Tatsache, dass zum Zeitpunkt der Euthanasie die Knochenheilung bereits relativ weit fortgeschritten war und sich ein harter Kallus aus Geflechtknochen durch enchondrale Ossifikation entwickelt hat. Zusätzlich führt eine stabile Frakturversorgung mittels Plattenosteosynthese zu einem klaren klinischen Vorteil, denn in der Arbeit von Estai et al [2011] kam es aufgrund von inadäquater Versorgung von osteoporotischen Frakturen mittels K-Draht eher zu einer verzögerten Knochenbruchheilung mit länger bestehendem, weichem Kallus und damit verbundenen hohen Anteilen von Knorpelgewebe. Die Limitation dieser Arbeit liegt darin, dass der Schwerpunkt der Auswertung auf den direkten Implantat-/Gewebeübergang gelegt wurde. Der tatsächliche Defektbereich ist jedoch wesentlich größer (Abb.11), daher Bedarf es weiterer Untersuchungen mit einem ROI das den kompletten Frakturbereich abbildet.

4.5 Freisetzung von Strontium

Die Freisetzung einer biologisch aktiven Dosis von Strontium aus dem Knochenersatzmaterial ist notwendig, um eine erhöhte Knochenformation in der Implantat-Interface-Region bzw. im umgebenden Gewebe zu erreichen. Dies wurde bereits von Schumacher et al [2013] *in vitro* belegt. Offermanns et al. [2016] und Andersen et al. [2013] konnten in ihren Studien mit Wistar Ratten über die lokale Freisetzung von Strontium aus der Oberfläche von Titanimplantaten nachweisen, dass durch Strontium eine Steigerung des Knochen-Implantat-Kontaktes und des Implantat-umgebenden Knochengewebes erfolgte. Bereits 2009 konnte Ni et al. mittels TOF-SIMS-Analyse und EDX die Freisetzung von Strontium aus Sr-haltigem Hydroxyapatitzement in das umgebende Gewebe *in vivo* nachweisen. Ray et al. [2016] und Thormann et al. [2013] konnten eine hohe Freisetzung von Strontium in der direkten Implantatumgebung von CPC bzw. Bioglas bis zu einer Entfernung von 6mm zum Implantat nachweisen. Es ist anzunehmen, dass das freigesetzte Strontium in den neu aufgebauten Knochen eingelagert wird [Ray 2014]. Es konnte jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden, ob im Verlauf das eingelagerte Strontium durch Calcium ersetzt wird. Darüber hinaus handelt es sich bei der TOF-SIMS- Analyse um ein komplexes Modell, in dem einige Daten extrapoliert werden, was zu statistischen Fehlern führen kann.

4.6 Osteozyten

Osteozyten sind langlebiger und bei weitem zahlreicher als die kurzlebigen Osteoblasten und Osteoklasten. Eingemauert zwischen ihrem lakunär-kanalikulärem System und der mineralisierten Matrix, haben sie den idealen Platz um den Bedarf des Knochens an Regenerationsprozessen zu detektieren und zur choreographieren [Manolagas et al 2013].

Zwischen 2000 und 2020 wurde in zahlreichen Studien das Knochen-Remodeling auf zellulärer Ebene untersucht. Der Fokus lag dabei hauptsächlich auf dem Verhalten von Osteoblasten und Osteoklasten, sowie deren Vorläuferzellen, wobei die Rolle der Osteozyten weitgehend unentdeckt blieb [Graham et al 2013]. Dies gilt insbesondere für Erkrankungen wie Osteoporose oder die Vorgänge bei der Knochenbruchheilung. Während die Osteoporose durch abnehmende Knochendichte, Dicke der Kortikalis und des trabekulären Knochens gekennzeichnet ist [Seeman 2013], zeigen sich auch Veränderungen bezogen auf die Osteozyten. Es kommt zu einer deutlichen Verringerung der Dichte von Osteozyten und osteozytären Lakunae um 20-30% [Mori et al 1997, Vashishth 2000]. Außerdem kommt es zum altersbedingten Schrumpfen der Osteozyten um 15-20% des Zellkörpervolumens [Tiede-Lewis et al 2019], wobei Osteozyten der weiblichen Studienteilnehmer scheinbar lediglich in ihrer Lakuna schrumpften, bei den

männlichen Teilnehmern schrumpften jedoch der Zellkörper und die Lakuna der Osteozyten. Ein weiterer Aspekt ist die Form der Osteozyten. Während gesunde junge Osteozyten eher eine flache Spindelform aufweisen, weisen Osteozyten im osteoporotischen Knochen eher eine sphärische Form auf [van Hoove et al 2009]. Neben der Abnahme der Lakunae und Osteozyten sowie der Veränderung der Form kommt es zur Reduktion der Canaliculi und der Dendriten [Kobayashi et al 2015]. Untersuchungen der Anzahl von osteozytären Canaliculi in den Femora von älteren Frauen (75-95 Jahre) verglichen mit jüngeren Frauen (20-40 Jahre) ergaben 30% weniger Canaliculi. Weiterhin verfügten die Canaliculi über weniger Verzweigungen und waren nicht in der Lage die Grenzen von Osteonen zu überschreiten [Milovanovic et al 2013]. Die Apoptose von Osteozyten kann durch verschiedene Stimuli induziert bzw. gesteigert werden. Dazu zählen neben Mikroverletzungen [Kennedy et al 2012] auch Immobilität [Augirre et al 2006], Glucokortikoide [Kogianni et al 2013], Östrogenmangel [Lirani-Galvao et al 2009] und oxidativer Stress [Kobayashi et al 2015]. Diese Stimuli finden sich vor allem bei der (glucokortikoidinduzierten-) Osteoporose. Es entsteht eine Abwärtsspirale durch die verminderte Osteozytenkonnektivität und den gesteigerten Zelltod, die zu einer weiteren Reduktion von Osteozyten führt.

Ziel neuer Therapien ist daher die Osteozytenkonnektivität zu fördern und zu erhalten sowie die gesteigerte Apoptose zu verhindern. Es ist bekannt, dass Strontium die Osteoblastendifferenzierung verbessert und es zur gesteigerten Expression von osteozytären Markern kommt. Bernhardt et al [2019] konnten *in vitro* zeigen, dass Strontium den Schrumpfungsprozess von Osteozyten verhindern kann. Ein Einfluss auf die Morphologie wurde hingegen nicht ausgeübt. Diese Arbeit konnte bei der histomorphometrischen Auswertung der Osteozyten die Daten vorangegangener Studien *in vivo* bestätigen. Es zeigt sich in allen Gruppen ein relativ hoher Anteil von Osteozyten mit leeren Lakunae sowie sphärischen Osteozyten (Abb. 17,18). Dies bestätigt die Studien von Meakin et al [2014], die von 32-34% leeren Lakunae im osteoporotischen Knochen sprechen sowie von El Khassawna et al [2015]. Daher ist dies als weiterer Beweis für die erfolgreiche Induktion einer Osteoporose in den Ratten anzusehen. Tiede-Lewis [2019] merkt dazu jedoch kritisch an, dass ein Teil durch den Schrumpfungsprozess bei der Einbettung bedingt sein kann.

In dieser Arbeit waren am signifikant häufigsten in allen Gruppen spindelförmige und damit vitale Osteozyten zu finden (Abb. 17,18). Dies steht im Einklang mit der zum Zeitpunkt der Euthanasie fortgeschrittenen Knochenbruchheilung mit Ausbildung von Geflechtknochen (harter Kallus).

Der Einfluss von Strontium auf die Anzahl der Osteozyten scheint sich eher gering auszuwirken. Dies lässt zumindest die Betrachtung der Graphen von CPC und Sr-CPC annehmen (Abb. 18). Wie aber bereits erwähnt, kommt es bei CPC aufgrund der Beschaffenheit des Knochenersatzmaterials zu einem deutlich langsameren Abbau des Materials und damit zur Freisetzung von Strontium ins umliegende Gewebe. Bei der Betrachtung der Bioglasgruppen sind die Unterschiede größer. Es finden sich insgesamt mehr Zellen aller Formen, wobei es eine deutliche Steigerung der spindelförmigen Osteozyten durch Strontium gibt (Abb. 18). Dies lässt auf eine Steigerung der Knochenformation schließen, welche bereits hinreichend belegt ist [Marx et al 2020]. Die ebenfalls vorhandene Steigerung der Anzahl von runden Zellen bzw. leeren Zell-lakuna ist kritisch zu diskutieren. Ursächlich hierfür könnten Umbauvorgänge im Zuge des Knochenremodelings sein oder Zeichen einer Instabilität und den damit verbundenen Mikroverletzungen des Knochens, aufgrund des zu schnellen Abbaus des Knochenersatzmaterials. Weiterhin wäre es denkbar, dass Strontium ähnlich wie bei Osteoklasten über den Calcium-Sensor Einfluss auf die Apoptose nimmt [Hurtel- Lemaire et al 2008]. Insgesamt ist die Studienlage bezüglich des Einflusses von Strontium auf Osteozyten schlecht und es bedarf weiterer Untersuchungen, um diese Thesen zu überprüfen. Hinsichtlich der Auswertung der Osteozyten im Bereich des ROI muss die Aussagekraft kritisch diskutiert werden, da die ROI anhand des klinischen Defektes festgelegt wurde. Dieses Verfahren ist zwar als etabliert anzusehen [Ray 2014, Ray et al 2016, Thormann et al 2013], da die Defekte annähernd gleich groß waren, eine Auswertung normalisierter Osteozyten pro mm² Knochenfläche erfolgte jedoch nicht. Hier könnten auch neue Einbettungstechniken und vollautomatisierte Auswertungsmethoden entscheidend sein, um eine genauere Auswertung der Osteozyten mit ihren Lakunae sowie der Dendriten zu ermöglichen.

4.7 Marker der Knochenformation

Die Wirkung von Strontium auf Osteoblasten und Osteoklasten wurde in Studien bereits vielfach untersucht. *In vitro*- Studien zeigen, dass Strontium die Osteoblastenfunktion stimuliert und die Osteoklasten-Funktion inhibiert [Marx et al 2020]. In *in vivo*- Studien mit Mäusen wurde nachgewiesen, dass Strontium einen positiven Effekt auf die Proliferation, Differenzierung und Mineralisation von Osteoblasten hat [Takaoka et al 2010]. Hintergrund ist unter anderem die Aktivierung des Calcium-sensing Rezeptor (CaSR) durch Strontium auf der Oberfläche von Osteoblasten [Chattopadhyay et al 2007]. Weiterhin führt Strontium zu einem deutlichen Anstieg des osteogenen Wachstumsfaktors BMP 2 [Quade et al 2020]. In der immuno-

logischen Färbung konnte zwischen CPC und Bioglas ohne Strontium ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Abb. 23). Durch den Zusatz von Strontium kam es besonders bei Bioglas zu einem deutlichen Anstieg. Damit kann belegt werden, dass sich Strontium ebenfalls positiv auf die Sekretion von BMP2 aus Osteozyten auswirkt. Der fehlende Anstieg in der CPC-Gruppe könnte durch den protrahierten Abbau des Materials bedingt sein.

Weiterhin greift Strontium in den Wnt/ β -catenin Signalweg ein [Yang et al 2010]. Normalerweise inhibiert Dkk1 die Chondrogenese sowie die Osteogenese und verhindert damit die enchondrale Knochenbildung [Chen et al 2007]. *In vitro*-Studien konnten keinen Einfluss von Strontium auf die Expression von Dkk1 zeigen [Nardone et al 2015]. Dem gegenüber steht eine Arbeit von Föger-Samwald [2016], in welcher Patienten mit osteoporotischem Knochenstatus Strontium-Ranelat p.o. erhalten haben. Es konnten verminderte Serumwerte für Dkk1 und Sklerostin im Vergleich zur Placebogruppe nachgewiesen werden. Gleiches zeigen die Daten dieser Arbeit. Unter dem Einfluss von Strontium kommt es zur Reduktion der Dkk1-positiven Zellen (Abb. 26).

Ebenfalls inhibierenden Einfluss auf den Wnt/ β -catenin Signalweg hat Sklerostin und sorgt damit für eine verminderte Mineralisation. Es kommt zu einer Hemmung der Osteoblastendifferenzierung. Gleichzeitig werden Osteozyten angeregt, vermehrt RANKL zu sezernieren [Wijenayaka et al 2011]. Sklerostin wird von Osteozyten ausgeschüttet, um den Knochenumbau beispielsweise bei fehlender Belastung oder Östrogenmangel zu regulieren [Suen 2016]. *In vitro* führt Strontium zu einer deutlichen Reduktion von SOST-positiven „osteocyte-like“-Osteoblasten [Rybchyn et al 2011]. *In vivo* konnten durch Geng et al [2018] bei Mäusen ähnliche Ergebnisse erzielt werden. Auch im Fall von CPC und Bioglas konnte in dieser Arbeit eine Reduktion von SOST-positiven Osteozyten erreicht werden (Abb. 22).

Ein weiterer, regulierender Marker für die Matrixmineralisation ist das, von Osteozyten produzierte MEPE [Agiro et al 2001]. Lu et al [2004] konnten in ihrer Studie mit Mäusen den Einfluss von MEPE auf die Knochenbruchheilung von langen Röhrenknochen nachweisen. Erstmals wurde MEPE in der Frakturheilung sechs Tage nach der Fraktur nachgewiesen. 10-14 Tage nach der Fraktur (in der Phase des harten Kallus) wurde MEPE von Osteozyten im Regeneratgewebe nachgewiesen. 28 Tage nach der Fraktur hielt die hohe Expression von MEPE aus den Osteozyten im Regeneratknochen an. Klinisch ist der Serumgehalt von MEPE eng mit dem Phosphathaushalt und dem PTH-Spiegel verbunden. Zusätzlich kommt es mit zunehmendem Alter und Abnahme der Knochendichte zu einer Abnahme des MEPE-Serumspiegels [Jain et al 2004]. In dieser Arbeit zeigt sich ein signifikant höherer MEPE-Gehalt in den CPC-Gruppen

verglichen mit den Bioglas-Gruppen (Abb. 20). Es ist daher anzunehmen, dass die Knochenbruchheilung zum Zeitpunkt der Euthanasie im Bioglas weiter vorangeschritten war und sich die MEPE-Aktivität reduziert hat, während sie bei CPC noch hoch ist. Durch den Zusatz von Strontium kommt es dann zur signifikanten Reduktion von MEPE-positiven Osteozyten, während das strontiumversetzte Bioglas ähnliche Werte wie reines Bioglas aufweist. Dies lässt darauf schließen, dass die Knochenbruchheilung durch den Zusatz von Strontium beschleunigt wird. Zahlreiche Studien in den letzten Jahrzehnten konnten die entscheidende Rolle des RANKL/OPG-System in der Knochenphysiologie belegen [Martin et al 2015]. RANKL ist durch Bindung an den RANK -Rezeptor von Osteoklasten-Vorläufern essentiell für die Osteoklastogenese [Li et al 2000]. Dem gegenüber steht die Rezeptorattrappe OPG, welche konstitutiv von reifen Osteoblasten und Osteozyten sezerniert wird und die RANK/RANKL- Interaktion blockiert. Während eine vermehrte RANKL-Expression mit Knochenverlust, aufgrund von mechanischer Entlastung und Calciummangel verbunden ist, ist die Bedeutung der Osteozyten für die Regulierung des RANKL/OPG-Systems bei Osteoporose nicht abschließend geklärt [El Khassawna et al 2017]. In Studien konnte gezeigt werden, dass die Expressionen von RANKL durch Osteozyten in der Nähe von Mikrofrakturen ansteigt, um die Knochenreparatur zu initiieren [Martin et al 2015]. Gleichzeitig sinkt die OPG-Expression [Kennedy et al 2012]. Dies führt dazu, dass das RANKL/OPG-Verhältnis ansteigt. Durch die Zugabe von Strontium konnte in Studien ein Anstieg der OPG-positiven Zellen sowie eine Reduktion der RANKL-positiven Zellen, insbesondere der Osteoblasten und damit einer Reduktion des RANKL/OPG-Verhältnis belegt werden [Brennan et al 2009, Ray 2014]. Demzufolge kann es möglich sein, dass sich das RANKL/OPG-Verhältnis von Osteozyten anders bzw. entgegengesetzt zum Gesamtverhältnis verhält. Die Analyse der Daten aus den Bioglas-Gruppen lässt darauf schließen, dass es durch den Zusatz von Strontium zu einer deutlichen Steigerung der Reparaturvorgänge und damit zum Anstieg der RANKL-positiven Osteozyten kommt (Abb. 28). Reflektorisch steigt damit auch die Anzahl an OPG positiven Osteozyten an (Abb. 30). Ein weiterer Beweis für die stattfindenden Umbauvorgänge ist die bereits beschriebene erhöhte Anzahl an apoptotischen/präapoptotischen Osteozyten mit leerer Lakunae. Die Analyse der Daten ergibt ein anderes Bild. Durch den Zusatz von Strontium kommt es analog zu Osteoblasten zur Reduktion von RANKL-positiven Zellen. Gleichzeitig verbleibt OPG auf einem ähnlich hohen Niveau. Insgesamt kommt es, wie bereits nachgewiesen, zu einer Reduktion des RANKL/OPG- Verhältnisses unter Anwesenheit von Strontium (Abb. 32). Insgesamt muss bei dieser kleinen Anzahl an Versuchstieren davon ausgegangen werden, dass sich die Signifikanz der Ergebnisse bei einer größeren Stichprobe ändern könnte. Für zukünftige Versuche sollte zudem eine neue

immunhistochemische Färbemethode etabliert werden, welche lediglich Osteozyten anfärbt, sodass eine fehleranfällige manuelle Korrelation von Osteozytenspezifischen Färbungen mit immunhistochemischen Aktivitätsfärbungen in konsekutiven Schnitten nicht mehr notwendig ist.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Betrachtet man die Untersuchungen in dieser Arbeit, so kann zusammengefasst gezeigt werden, dass die lokale Anwendung von zugesetztem Strontium in verschiedenen Knochenersatzmaterialien die Wirkung auf Osteozyten *in vivo* signifikant ändert, im Vergleich zu den Knochenersatzmaterialien ohne Zusatz. Es konnte insbesondere bei den Bioglas-Gruppen eine schneller voranschreitende Frakturheilung festgestellt werden. Inhibierende Faktoren für die Matrixmineralisation und die Reifung von Osteoblasten werden deutlich reduziert und knöcherne Umbauprozesse gesteigert.

Aus diesen Ergebnissen kann die Hypothese belegt werden, dass es in Bezug auf die Wirkung von Knochenersatzmaterialien auf Osteozyten, deutliche Unterschiede gibt und sich der Zusatz von Strontium am Beispiel von Bioglas als vorteilhaft für Knochenumbauprozesse und damit für die Knochenheilung erweist. Der Zusatz von Strontium in bereits existierende oder neue Knochenersatzmaterialien ist ein vielversprechendes und zukunftsweisendes Verfahren, welches bei der Behandlung von osteoporoseinduzierten Frakturen und deren assoziierten knöchernen Defekten erhebliches therapeutisches Potential bietet. Weiterhin könnte die Analyse der Anzahl und Form der Osteozyten von klinischer Relevanz für das postoperative Belastungsausmaß sein.

An dieser Stelle muss jedoch angebracht werden, dass die Ergebnisse dieser Arbeit mit weiteren Untersuchungen untermauert und ergänzt werden sollten. Aufgrund des „3R- Prinzips“ gab es nur eine kleine Versuchsgruppe mit wenigen Proben. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich die positiven Effekte auf Osteozyten von Knochenersatzmaterialien, durch den Zusatz von Strontium steigern lassen. Dies ist jedoch nicht bei jedem Knochenersatzmaterial der Fall. Ursächlich dafür könnte eine insuffiziente oder verzögerte Materialdegradation, mit schlechtem Release des Strontiums in das umgebende Gewebe sein. Der Zusatz von Strontium kann dementsprechend bei einer effektiven Carriersubstanz sinnvoll sein. Es muss an dieser Stelle aber angemerkt werden, dass es sich bei dieser Arbeit nur um einen Beobachtungszeitraum von 6 Wochen handelt. Eine vollständige Frakturheilung dauert zwischen zwei und drei Monaten. Daher könnten sich die Ergebnisse in einem längeren Beobachtungszeitraum noch verändern. Ebenfalls notwendig sind in diesem Zusammenhang weitere Studien, welche eine ideale Strontiumdosis für den Zusatz finden.

In dieser Arbeit wurde das Augenmerk im Besonderen auf die Osteozyten gelegt, da diese in der wissenschaftlichen Betrachtung häufig von Nachrang sind. Dies wird ihnen in ihrer Bedeutung für den Knochenstoffwechsel jedoch nicht gerecht wird. Der Einfluss von Osteoblasten

und Osteoklasten war nicht Gegenstand dieser Arbeit und wird daher weitgehend ausgeblendet. Bei der Analyse und Entwicklung von neuen Knochenersatzmaterialien sollte der Knochen hingegen als Ganzes betrachtet und dementsprechend analysiert werden. Dazu gehören neben klassischen deskriptiven und histomorphometrischen Auswertungen aller Zellen des Knochenstoffwechsels sowie deren immunhistochemischen Aktivitätsparametern, auch neuere Methoden, wie Massenspektrometrie, um den Wirkstoffrelease und die Wirkstoffadressaten zu identifizieren, biomechanische Analysen des Knochens oder der Einsatz von Knockout-Tieren, bei denen bestimmte Aktivitätsparameter direkt durch Fluoreszenzmoleküle sichtbar gemacht werden.

6. Zusammenfassung

Im Zuge des demografischen Wandels wächst die Anzahl der an Osteoporose erkrankten Patienten an. In der Folge steigt ebenfalls das Risiko für Osteoporose-assoziierte Frakturen an. Dies hat massive Auswirkungen auf die Morbidität, Mortalität und Lebensqualität der Patienten, aber auch auf die Volkswirtschaft.

Bisher konnten klinisch positive Effekte einer systemischen Strontiumgabe auf den Gesamtknochenstatus belegt werden. Der nächste Schritt ist nun diese vielversprechenden Resultate durch lokale Applikation in Knochendefekte nutzbar zu machen, wobei eine positive Wirkung auf Osteoblasten und Osteoklasten bereits bestätigt wurde.

Ziel dieser tierexperimentellen Arbeit war es, nun am Rattenmodell mit osteoporotischem Knochenstatus anhand eines critical-size Defektes, den Einfluss von Strontium in verschiedenen Knochenersatzmaterialien auf Osteozyten in der direkten Umgebung des Materials zu untersuchen.

In 14-Wochen alten weiblichen Sprague-Dawley Ratten wurde einer Osteoporose durch multidefizitäre Diät in Kombination mit einer bilateralen Ovariectomie induziert. Die Implantation der verschiedenen Knochenersatzmaterialien erfolgte in einen standardisierten critical-size Defekt im Bereich der femoralen Metaphyse, welcher zusätzlich mit einer Plattenosteosynthese stabilisiert wurde. 6 Wochen nach der Operation wurden die Ratten euthanasiert und die Femora zur weiteren Analyse entnommen. Es erfolgte die histologische, immunhistochemische und histomorphometrische Auswertung der Proben am Implantat-/Gewebeübergang.

Es zeigte sich ein nahezu vollständiger Abbau des Materials in den Gruppen B30, ScB30 und ScB30Sr30, wohingegen in CPC und Sr-CPC noch deutliche Materialrückstände zu finden waren. Beim Vergleich des Bindegewebes im Defektbereich (Region of Interest) zwischen CPC und Sr-CPC konnte signifikant mehr Osteoid und Kollagengewebe im Vergleich zu Knorpelgewebe nachgewiesen werden ($p < 0,001$). Daraus kann geschlossen werden, dass die Knochenbruchheilung zum Zeitpunkt der Euthanasie relativ weit fortgeschritten war. Bei der Analyse der Anzahl der Osteozyten im Bereich des ROI ergaben sich signifikante Unterschiede bei den Zustandsarten ($p < 0,001$), jedoch keine relevanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Bei der Auswertung der osteozytären Marker konnte ein deutlicher Anstieg von BMP2 durch Strontium in der Bioglas-Gruppe nachgewiesen werden.

Dkk1 inhibiert über den Wnt/ β -catenin Signalweg die Osteogenese. Unter dem Einfluss von Strontium ließ sich eine Reduktion der Dkk1-positiven Zellen nachweisen. Ebenfalls inhibie-

rend auf den Wnt/ β -catenin Signalweg wirkt Sklerostin. Bei signifikanten Unterschieden zwischen CPC und Bioglas ($p=0,022$) sanken die SOST-positiven Osteozyten unter dem Einfluss von Strontium. Bei der Anzahl der MEPE-positiven Osteozyten zeigen sich ebenfalls signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen ($p=0,006$). Durch Strontium sinkt die Anzahl der Zellen in der CPC-Gruppe massiv ab, wohingegen die Anzahl in der Bioglas-Gruppe nahezu unverändert ist. Es ist anzunehmen, dass die Knochenbruchheilung in den Bioglasgruppen weiter vorangeschritten ist, es jedoch durch Strontium zu einer Beschleunigung der Knochenbruchheilung in der CPC-Gruppe kommt. Bei der Analyse von RANKL und OPG zeigen sich erneut deutliche Unterschiede zwischen CPC und Bioglas. Durch den Zusatz von Strontium wird die Aktivität von RANKL und OPG in Bioglas erhöht, wobei sie bei CPC sinkt.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Strontium einen signifikanten Einfluss auf die Osteozyten hat und die Knochenbruchheilung anregt sowie inhibierende Marker herunterreguliert. Weiterhin konnte bei Bioglas im Vergleich zu CPC eine schneller voranschreitende Knochenbruchheilung festgestellt werden.

7. Summary

In the course of the demographic change, there is an increasing number of patients suffering from osteoporosis. As a result, there is also an increasing risk of osteoporosis-associated fractures. This has a massive impact on morbidity, mortality and life quality of the patients, but also on the economy.

So far, clinically positive effects of systemic strontium administration on the overall bone status have been proven. The next step is to make these promising results usable through local application in bone defects, whereby a positive effect on osteoblasts and osteoclasts has already been confirmed.

The aim of this animal study was to analyze the influence of strontium in different bone graft materials using an osteoporotic rat model with a critical-size defect.

14 weeks old female Sprague-Dawley rats underwent induction of osteoporosis by a multi-deficient diet combined with a bilateral ovariectomy.

A standardized critical-size defect in the metaphyseal region of the femur was created, stabilized with a plate and filled with the different implant materials. 6 weeks after the surgery the rats were euthanized and the femora were harvested for further investigations. Histological, immunohistochemical and histomorphometric analysis of the specimens in the direct bone-implant interface were carried out.

There was almost a complete degradation of the biomaterials in B30, ScB30 and ScB30Sr20, whereas in CPC and SrCPC material remnants were found. A comparison of the connective tissue of the defect region (Region of interest) between CPC and SrCPC showed significant more osteoid and collagen tissue compared to cartilage ($p < 0,001$). Hence, it can be concluded that the fracture healing has progressed far at the time of euthanasia. The analysis of the data from the osteocyte counting in the region of interest showed significant differences in the shape of osteocytes ($p < 0,001$), however no relevant differences between the different groups. The analysis of the osteocytic markers showed a significant increase of BMP2 due to strontium in the bioglass group.

Dkk1 inhibits osteogenesis by the Wnt/ β -catenin pathway. Because of the influence of strontium, a reduction of Dkk1-positive cells could be detected. Also, sclerostin has an inhibitory effect on the Wnt/ β -catenin pathway. With significant differences between CPC and bioglass ($p = 0,022$) the number of SOST-positive osteocytes decreased under the influence of strontium. The analysis of MEPE-positive cells showed also significant differences between both groups ($p = 0,006$). The number of positive cells in the CPC group is under the influence of strontium

decreasing, whereas the number of positive cells in the bioglass groups stays stable. It can be assumed that the bone fracture healing is far more progressed in the bioglass groups, however by the use of strontium in the CPC group the bone fracture healing gets enhanced. Analyzing the data of RANKL and OPG clear differences between bioglass and CPC can be seen. The addition of strontium increases the activity of RANKL and OPG. Conversely both markers decrease in the CPC group.

In summary strontium has a significant influence on the osteocytes and the bone fracture healing gets enhanced. Also, a downregulation of inhibiting markers can be seen. Furthermore, a faster progressing bone fracture healing could be found in bioglass compared to CPC.

8. Appendices

Appendix 1

Histomorphometrie mit ImageJ (Version 1.45s)

Voraussetzungen für die Software:

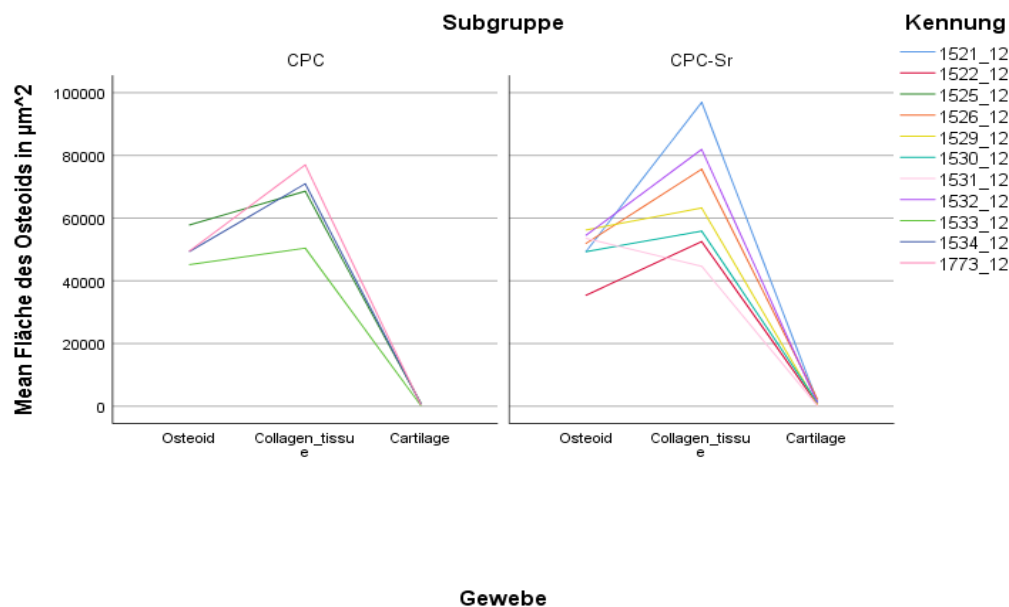
1. Java Version 8
2. Trainierbares Weka Segmentierungs-Plugin (Version 3.2.13)
3. Mindestens 4 GB RAM.

Protokoll:

1. Importieren Sie das Bild in ImageJ (Ziehen und Ablegen/ Datei→Öffnen).
2. Gehen Sie zu Image → Stacks → Tools → Montage to Stack. Wählen Sie einen Stapel, der alle Segmente einer histologischen Färbung darstellt.
3. Gehen Sie zu Plugins → Segmentierung → Trainierbare Weka-Segmentierung. Daraufhin öffnet sich ein Fenster mit verschiedenen Optionen.
4. Standardmäßig sind zwei Klassen voreingestellt, die Anzahl kann jedoch auf der Grundlage der Analyse mit der Option "Neue Klasse erstellen" auf der linken Seite beliebig erhöht werden. Der Name der ersten beiden Klassen kann über die Option "Einstellungen" geändert werden. Definieren Sie die Klassen auf der Grundlage der Farben, die in einem bestimmten Fleck angezeigt werden. Die Punkte können für jede Klasse mit dem Polygonwerkzeug oder der Linie definiert werden.
5. Nachdem Sie 10-15 Punkte für jede Klasse definiert haben, gehen Sie zu "Train Classifier". Der Vorgang dauert je nach Speicherkapazität des Computers und der Bildgröße eine gewisse Zeit.
6. Sobald die Segmentierung abgeschlossen ist, werden im Protokollfenster Informationen angezeigt. Gehen Sie auf "Ergebnis erstellen", um die vom Plugin durchgeführte Segmentierung zu überprüfen.
7. Wenn die durchgeführte Segmentierung mit der des Ausgangsbildes vergleichbar ist, wählen Sie die Optionen "Klassifikator speichern" und "Daten speichern", um Zeit für die Analyse von Bildern derselben histologischen Färbung zu sparen.

8. Alle anderen Bilder desselben Flecks können durch Hochladen des Klassifikators und der Datendatei mit den Optionen "Load Classifier" und "Load Data" im Fenster Trainable Weka Segmentation analysiert werden.
9. Nach der Segmentierung gehen Sie zu Analysieren→Messen, um den prozentualen Anteil der Fläche zu ermitteln, der von jeder definierten Klasse in einem Bild abgedeckt wird.
10. Wählen Sie Analyze→Set Scale. Die Pixelgröße hängt von dem Mikroskop und der Vergrößerung ab, mit denen das Bild aufgenommen wurde. Der prozentuale Anteil der Fläche kann in den von ASBMR definierten Maßstab (mm oder μm) umgerechnet werden, indem der Maßstab des Bildes mit dem im vorherigen Schritt ermittelten prozentualen Anteil multipliziert wird.
11. Die erhaltenen Ergebnisse können später statistisch geprüft werden.

Appendix 2



Appendix 3

Pairwise Comparisons ^a								
(I) Knochenersatzmaterial		Mean Difference (I-J)	Std. Error	df	Sig. ^b	95% Confidence Interval for Difference ^b		
						Lower Bound	Upper Bound	
B30	CPC	-1,391	0,496	19	0,107	-2,959	0,178	
	CPC-Sr	-1,238	0,439	19	0,105	-2,628	0,152	
	Sc-B30	-0,515	0,470	19	0,966	-2,002	0,973	
	Sc-B30Sr20	-1,171	0,496	19	0,255	-2,739	0,398	
CPC	B30	1,391	0,496	19	0,107	-0,178	2,959	
	CPC-Sr	0,153	0,439	19	1,000	-1,238	1,543	
	Sc-B30	0,876	0,470	19	0,556	-0,612	2,364	
	Sc-B30Sr20	0,220	0,496	19	1,000	-1,348	1,788	
CPC-Sr	B30	1,238	0,439	19	0,105	-0,152	2,628	
	CPC	-0,153	0,439	19	1,000	-1,543	1,238	
	Sc-B30	0,723	0,411	19	0,628	-0,575	2,022	
	Sc-B30Sr20	0,067	0,439	19	1,000	-1,323	1,458	
Sc-B30	B30	0,515	0,470	19	0,966	-0,973	2,002	
	CPC	-0,876	0,470	19	0,556	-2,364	0,612	
	CPC-Sr	-0,723	0,411	19	0,628	-2,022	0,575	
	Sc-B30Sr20	-0,656	0,470	19	0,861	-2,144	0,832	
Sc-B30Sr20	B30	1,171	0,496	19	0,255	-0,398	2,739	
	CPC	-0,220	0,496	19	1,000	-1,788	1,348	
	CPC-Sr	-0,067	0,439	19	1,000	-1,458	1,323	
	Sc-B30	0,656	0,470	19	0,861	-0,832	2,144	
Based on estimated marginal means								
a. Dependent Variable: In_OPG.								
b. Adjustment for multiple comparisons: Sidak.								

9. Abkürzungsverzeichnis

Sr/ Sr ²⁺	Strontium / Strontium- Ion
Ca/ Ca ²⁺	Calcium / Calcium- Ion
SrCPC	Strontium modifizierter Calciumphosphat-Zement
CPC	Calciumphosphat-Zement
B30	Kompaktes Xerogel
ScB30	Xerogel mit makroporösem Gerüst
ScB30Sr20	Strontiummodifiziertes Xerogel mit makroporösem Gerüst
OVX	Ovarektomie
DXA	Dual- energy X-ray Absorptiometrie
μCT	Mikro- Computertomografie
BMD	Bone mineral density / Knochendichte
BMP 2	Bone morphogenetic protein 2
OPG	Osteoprotegerin
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
MEPE	Matrix extracellular phosphoglycoprotein
SOST	Sklerostin
DKK 1	Dickkopf 1
Runx2	Runt-related transcription factor 2

ROI	Region of Interest
PTH	Parathormon
IGF`s	Insulin like growth factors
TGF- β	Tumor growth factor beta
TOF-SIMS	Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry
BMU	Bone Multicellular Unit
TNF	Tumor Nekrose Faktor
NF- κ B	Nuclear factor kappa B
IL	Interleukin
CaSR	Calcium Sensing Receptor
PGE	Prostaglandin
CaHPO ₄	Calciumhydrogenphosphat
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	Calciumhydroxylapatit
CaCO ₃	Calciumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumphosphat
AgNO ₃	Silbernitrat
PMMA	Polymethylmethacrylat
α -TCP	Alphatricalciumphosphat
IHC	Immunhistochemie
SrCO ₃	Strontiumcarbonat

RANK	Receptor activator of NF- κ B
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon
MSC	Mesenchymale Stammzellen
PDGF	platelet derived growth factor
M-CSF	Makrophagenkolonie stimulierender Faktor
ATP	Adenosintriphosphat
FGF23	Fibroblast Growth Faktor 23
DMP1	Dentin matrix acidic phosphoprotein 1
PHEX	Phosphate-regulating neutral endopeptidase
NO	Stickstoffmonoxid
SFRP1	secreted- frizzled-related protein
GSK3	Glykogen-synthase-kinase 3
LRP's	low-density lipoprotein receptor- related proteins
TRAP	Tartrate Resistant Acid Phosphatase
ALP	Alkalische Phosphatase
USD	US-Dollar
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung

TEOS	Tetraethoxysilane
pH	potentia Hydrogenii
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
M	Mol
Al ₂ O ₃	Aluminiumoxid
MEA	2- Methoxyethylacetat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
ODF	Osteoklasten differenzierender Faktor

10. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau eines langen Röhrenknochens

Abbildung 2: Schematische Darstellung des Lamellenknochens

Abbildung 3: Klassifikation der Zellen des Knochens

Abbildung 4: Funktionen des Osteozyten

Abbildung 5: Schematische Knochenbruchheilung

Abbildung 6: Schematischer Vergleich von gesundem und osteoporotischem Knochen

Abbildung 7: Mechanismen der Wirkung von Strontium auf Knochenzellen

Abbildung 8: Modell des Femurs mit Plattenosteosynthese

Abbildung 9: Schematische Darstellung des Experimentieraufbaus

Abbildung 10: Chirurgische Intervention

Abbildung 11: Festlegen des ROI

Abbildung 12: Anzahl der Versuchstiere im Verlauf des Experiments und Anzahl der intakten und gebrochenen Platten in jeder Subgruppe

Abbildung 13: Implantatrückstände in den einzelnen Subgruppen

Abbildung 14: Histomorphometrische Analyse der Implantatdegradation zwischen CPC und SrCPC

Abbildung 15: Histomorphometrische Analyse des Gesamtknochengewebes im Bereich des ROI

Abbildung 16: Histomorphometrische Analyse der verschiedenen Bindegewebe im Bereich des ROI

Abbildung 17: Histomorphometrische Analyse der Anzahl der Osteozyten in den 3 verschiedenen Zustandsarten im Bereich des ROI für jede Gruppe

Abbildung 18: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von Osteozyten in den 3 Zustandsarten im Vergleich von CPC und Bioglas

Abbildung 19: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von MEPE- positiven Osteozyten im Bereich des ROI pro Gruppe

Abbildung 20: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von MEPE- positiven Osteozyten im Bereich des ROI von CPC und Bioglas

Abbildung 21: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von SOST- positiven Osteozyten im Bereich des ROI pro Gruppe

Abbildung 22: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von SOST- positiven Osteozyten im Bereich von CPC und Bioglas

Abbildung 23: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von BMP-2- positiven Osteozyten im Bereich des ROI pro Gruppe

Abbildung 24: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von BMP-2- positiven Osteozyten im Bereich von CPC und Bioglas

Abbildung 25: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von DKK1- positiven Osteozyten im Bereich des ROI pro Gruppe

Abbildung 26: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von DKK1- positiven Osteozyten im Bereich des ROI von CPC und Bioglas

Abbildung 27: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von RANKL- positiven Osteozyten im Bereich des ROI pro Gruppe

Abbildung 28: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von RANKL- positiven Osteozyten im Bereich des ROI von CPC und Bioglas

Abbildung 29: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von OPG- positiven Osteozyten im Bereich des ROI pro Gruppe

Abbildung 30: Histomorphometrische Analyse der mittleren Anzahl von OPG- positiven Osteozyten im Bereich des ROI von CPC und Bioglas

Abbildung 31: Darstellung des Quotienten von RANKL- positiven Osteozyten und OPG-positiven Osteozyten im Bereich des ROI pro Gruppe

Abbildung 32: Darstellung des Quotienten von RANKL- positiven Osteozyten und OPG-positiven Osteozyten im Bereich des ROI von CPC und Bioglas

11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Technovit® 9100 Einbettung

Tabelle 2: Materialien für die Movat Pentachrom Färbung

Tabelle 3: Materialien für die Silbernitrat- Färbung

Tabelle 4: Materialien für die immunhistochemische ABC- Färbung

12. Literaturverzeichnis

- Aerssens, J.; Boonen, S.; Lowet, G.; Dequeker, J. (1998): Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. In: *Endocrinology* 139 (2), S. 663–670. DOI: 10.1210/endo.139.2.5751.
- Aguirre, J. Ignacio; Plotkin, Lilian I.; Stewart, Scott A.; Weinstein, Robert S.; Parfitt, A. Michael; Manolagas, Stavros C.; Bellido, Teresita (2006): Osteocyte apoptosis is induced by weightlessness in mice and precedes osteoclast recruitment and bone loss. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 21 (4), S. 605–615. DOI: 10.1359/jbmr.060107.
- Alenezi, Ali; Galli, Silvia; Atefyekta, Saba; Andersson, Martin; Wennerberg, Ann (2019): Osseointegration effects of local release of strontium ranelate from implant surfaces in rats. In: *Journal of materials science. Materials in medicine* 30 (10), S. 116. DOI: 10.1007/s10856-019-6314-y.
- Alghazali, Karrer M.; Nima, Zeid A.; Hamzah, Rabab N.; Dhar, Madhu S.; Anderson, David E.; Biris, Alexandru S. (2015): Bone-tissue engineering: complex tunable structural and biological responses to injury, drug delivery, and cell-based therapies. In: *Drug metabolism reviews* 47 (4), S. 431–454. DOI: 10.3109/03602532.2015.1115871.
- Alt, Volker; Thormann, Ulrich; Ray, Seemun; Zahner, Daniel; Dürselen, Lutz; Lips, Katrin et al. (2013): A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures. In: *Acta biomaterialia* 9 (6), S. 7035–7042. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.02.002.
- Andersen, Ole Z.; Offermanns, Vincent; Sillassen, Michael; Almqvist, Klaus P.; Andersen, Inge H.; Sørensen, Søren et al. (2013): Accelerated bone ingrowth by local delivery of strontium from surface functionalized titanium implants. In: *Biomaterials* 34 (24), S. 5883–5890. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.04.031.
- Andrew, J. G.; Andrew, S. M.; Freemont, A. J.; Marsh, D. R. (1994): Inflammatory cells in normal human fracture healing. In: *Acta orthopaedica Scandinavica* 65 (4), S. 462–466. DOI: 10.3109/17453679408995493.
- Atkins, G. J.; Welldon, K. J.; Halbout, P.; Findlay, D. M. (2009): Strontium ranelate treatment of human primary osteoblasts promotes an osteocyte-like phenotype while eliciting an osteoprotegerin response. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 20 (4), S. 653–664. DOI: 10.1007/s00198-008-0728-6.
- Aubin, Jane E.; Turksen, Kursad (1996): Monoclonal antibodies as tools for studying the osteoblast lineage. In: *Microsc. Res. Tech.* 33 (2), S. 128–140. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0029(19960201)33:2<128::AID-JEMT4>3.0.CO;2-P.
- Aumüller, Gerhard; Wurzinger, Laurenz J. (2010): Anatomie. 208 Tabellen. 2. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme (Duale Reihe). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1055/b-002-46981>.
- Bain, S. D.; Jerome, C.; Shen, V.; Dupin-Roger, I.; Ammann, P. (2009): Strontium ranelate improves bone strength in ovariectomized rat by positively influencing bone resistance determinants. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 20 (8), S. 1417–1428. DOI: 10.1007/s00198-008-0815-8.

- Balemans, W.; Ebeling, M.; Patel, N.; van Hul, E.; Olson, P.; Dioszegi, M. et al. (2001): Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). In: *Human molecular genetics* 10 (5), S. 537–543. DOI: 10.1093/hmg/10.5.537.
- Bartl, R.; Gradinger, R. (2009): Aktuelle Diagnostik und Therapie der Osteoporose auf der Basis der "European Guidance 2008". In: *Der Orthopäde* 38 (4), 365-79; quiz 380. DOI: 10.1007/s00132-008-1404-4.
- Bartl, Reiner (2011): Osteoporose. Prävention ; Diagnostik ; Therapie ; 12 Tabellen. Unter Mitarbeit von Christoph Bartl und Karin Baum. 4., vollst. überarb. und erw. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme.
- Bässgen, Kathrin; Westphal, Thomas; Haar, Patrick; Kundt, Günther; Mittlmeier, Thomas; Schober, Hans-Christof (2013): Population-based prospective study on the incidence of osteoporosis-associated fractures in a German population of 200,413 inhabitants. In: *Journal of public health (Oxford, England)* 35 (2), S. 255–261. DOI: 10.1093/pubmed/fds076.
- Bernhardt, Anne; Weiser, Emilia; Wolf, Sophie; Vater, Corina; Gelinsky, Michael (2019): Primary Human Osteocyte Networks in Pure and Modified Collagen Gels. In: *Tissue engineering. Part A* 25 (19-20), S. 1347–1355. DOI: 10.1089/ten.TEA.2018.0338.
- Bischoff-Ferrari, Heike A.; Dawson-Hughes, Bess; Willett, Walter C.; Staehelin, Hannes B.; Bazemore, Marlet G.; Zee, Robert Y.; Wong, John B. (2004): Effect of Vitamin D on falls: a meta-analysis. In: *JAMA* 291 (16), S. 1999–2006. DOI: 10.1001/jama.291.16.1999.
- Bodine, Peter V. N.; Zhao, Weiguang; Kharode, Yogendra P.; Bex, Frederick J.; Lambert, Andre-Jean; Goad, Mary Beth et al. (2004): The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 18 (5), S. 1222–1237. DOI: 10.1210/me.2003-0498.
- Bodine, Peter V. N.; Zhao, Weiguang; Kharode, Yogendra P.; Bex, Frederick J.; Lambert, Andre-Jean; Goad, Mary Beth et al. (2004): The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 18 (5), S. 1222–1237. DOI: 10.1210/me.2003-0498.
- Boivin, G.; Deloffre, P.; Perrat, B.; Panczer, G.; Boudeulle, M.; Mauras, Y. et al. (1996): Strontium distribution and interactions with bone mineral in monkey iliac bone after strontium salt (S 12911) administration. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 11 (9), S. 1302–1311. DOI: 10.1002/jbmr.5650110915.
- Bolander, M. E. (1992): Regulation of fracture repair by growth factors. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)* 200 (2), S. 165–170. DOI: 10.3181/00379727-200-43410a.
- Boskey, Adele L.; Chiang, Phyllis; Fermanis, Alexis; Brown, Jared; Taleb, Hayat; David, Valentin; Rowe, Peter S. N. (2010): MEPE's diverse effects on mineralization. In: *Calcified tissue international* 86 (1), S. 42–46. DOI: 10.1007/s00223-009-9313-z.
- Brandi, M. L.; Hukkanen, M.; Umeda, T.; Moradi-Bidhendi, N.; Bianchi, S.; Gross, S. S. et al. (1995): Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (7), S. 2954–2958. DOI: 10.1073/pnas.92.7.2954.
- Brennan, T. C.; Rybchyn, M. S.; Green, W.; Atwa, S.; Conigrave, A. D.; Mason, R. S. (2009): Osteoblasts play key roles in the mechanisms of action of strontium ranelate. In: *British journal of pharmacology* 157 (7), S. 1291–1300. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2009.00305.x.

Brighton, C. T.; Hunt, R. M. (1986): Histochemical localization of calcium in the fracture callus with potassium pyroantimonate. Possible role of chondrocyte mitochondrial calcium in callus calcification. In: *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 68 (5), S. 703–715.

Buckwalter, J.A.; Glimcher, M.J.; Cooper, R.R.; Recker, R. (1995): Bone Biology. In: *J Bone Joint Surg Am* 77, S. 1256-1275.

Burge, Russel; Dawson-Hughes, Bess; Solomon, Daniel H.; Wong, John B.; King, Alison; Tosteson, Anna (2006): Incidence and Economic Burden of Osteoporosis-Related Fractures in the United States, 2005-2025. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 22 (3), S. 465–475. DOI: 10.1359/jbmr.061113.

Cabrera, W. E.; Schrooten, I.; Broe, M. E. de; D'Haese, P. C. (1999): Strontium and bone. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 14 (5), S. 661–668. DOI: 10.1359/jbmr.1999.14.5.661.

Caetano-Lopes, Joana; Canhão, Helena; Fonseca, João Eurico (2007): Osteoblasts and bone formation. In: *Acta reumatologica portuguesa* 32 (2), S. 103–110.

Carano, Richard A.D; Filvaroff, Ellen H. (2003): Angiogenesis and bone repair. In: *Drug Discovery Today* 8 (21), S. 980–989. DOI: 10.1016/S1359-6446(03)02866-6.

Chang, Yujung; Cho, Byounggook; Kim, Siyoung; Kim, Jongpil (2019): Direct conversion of fibroblasts to osteoblasts as a novel strategy for bone regeneration in elderly individuals. In: *Experimental & molecular medicine* 51 (5), S. 1–8. DOI: 10.1038/s12276-019-0251-1.

Chattopadhyay, Naibedya; Quinn, Stephen J.; Kifor, Olga; Ye, Chianping; Brown, Edward M. (2007): The calcium-sensing receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast proliferation. In: *Biochemical pharmacology* 74 (3), S. 438–447. DOI: 10.1016/j.bcp.2007.04.020.

Chen, Yan; Whetstone, Heather C.; Youn, Andrew; Nadesan, Puviindran; Chow, Edwin C. Y.; Lin, Alvin C.; Alman, Benjamin A. (2007): Beta-catenin signaling pathway is crucial for bone morphogenetic protein 2 to induce new bone formation. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (1), S. 526–533. DOI: 10.1074/jbc.M602700200.

Choudhary, Shilpa; Halbout, Philippe; Alander, Cynthia; Raisz, Lawrence; Pilbeam, Carol (2007): Strontium ranelate promotes osteoblastic differentiation and mineralization of murine bone marrow stromal cells: involvement of prostaglandins. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 22 (7), S. 1002–1010. DOI: 10.1359/jbmr.070321.

Consensus development conference: Diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis (1993). In: *The American Journal of Medicine* 94 (6), S. 646–650.

Cooper, C.; Campion, G.; Melton, L. J. (1992): Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 2 (6), S. 285–289. DOI: 10.1007/bf01623184.

Cosman, F.; Beur, S. J. de; LeBoff, M. S.; Lewiecki, E. M.; Tanner, B.; Randall, S.; Lindsay, R. (2014): Clinician's Guide to Prevention and Treatment of Osteoporosis. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 25 (10), S. 2359–2381. DOI: 10.1007/s00198-014-2794-2.

Cummings, Steven R.; San Martin, Javier; McClung, Michael R.; Siris, Ethel S.; Eastell, Richard; Reid, Ian R. et al. (2009): Denosumab for prevention of fractures in postmenopausal

- women with osteoporosis. In: *The New England journal of medicine* 361 (8), S. 756–765. DOI: 10.1056/NEJMoa0809493.
- Dallas, Sarah L.; Prideaux, Matthew; Bonewald, Lynda F. (2013): The osteocyte: an endocrine cell ... and more. In: *Endocrine reviews* 34 (5), S. 658–690. DOI: 10.1210/er.2012-1026.
- Driessens, F. C., Khairoun, I., Boltong, M. G., Planell, J. A. (1997): Design of calcium phosphate bone cement suitable for fixation of metal endoprotheses. In: *Bioceramics*, S. 279–281.
- Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. (2005): Animal models for fracture treatment in osteoporosis. In: *Osteoporos Int.* 2005 (Suppl 2), S.129-38. DOI: 10.1007/s00198-005-1859-7.
- Einhorn, T. A. (1998): The cell and molecular biology of fracture healing. In: *Clinical orthopaedics and related research* (355 Suppl), S7-21. DOI: 10.1097/00003086-199810001-00003.
- El Khassawna T, Böcker W, Brodsky K, Weisweiler D, Govindarajan P, Kampschulte M, Thormann U, Henss A, Rohnke M, Bauer N, Müller R, Deutsch A, Ignatius A, Dürselen L, Langheinrich A, Lips KS, Schnettler R, Heiss C (2015): Impaired extracellular matrix structure resulting from malnutrition in ovariectomized mature rats. In: *Histochem Cell Biol.* 144(5), S.491-507. DOI: 10.1007/s00418-015-1356-9.
- El Khassawna, T.; Merboth, F.; Malhan, D.; Böcker, W.; Des Daghma; Stoetzel, S. et al. (2017): Osteocyte Regulation of Receptor Activator of NF- κ B Ligand/Osteoprotegerin in a Sheep Model of Osteoporosis. In: *The American journal of pathology* 187 (8). DOI: 10.1016/j.ajpath.2017.04.005.
- Eriksen, Erik Fink (2010): Cellular mechanisms of bone remodeling. In: *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 11 (4), S. 219–227. DOI: 10.1007/s11154-010-9153-1.
- Estai, Mohamed Abdalla; Soelaiman, Ima Nirwana; Shuid, Ahmad Nazrun; Das, Srijit; Ali, Aishah Mohd; Suhaimi, Fariyah Hj (2011): Histological changes in the fracture callus following the administration of water extract of piper sarmentosum (daun kadok) in estrogen-deficient rats. In: *Iranian journal of medical sciences* 36 (4), S. 281–288.
- Föger-Samwald, Ursula (2016): Gene Expression, Bone Turnover Markers, and Microarchitecture in Metabolic Bone Diseases. Genexpression, Kochenstoffwechsel und Mikrostruktur in metabolischen Knochenkrankheiten. Dissertation.
- Fromigué, Olivia; Haÿ, Eric; Barbara, Alain; Petrel, Christophe; Traiffort, Elisabeth; Ruat, Martial; Marie, Pierre J. (2009): Calcium sensing receptor-dependent and receptor-independent activation of osteoblast replication and survival by strontium ranelate. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 13 (8B), S. 2189–2199. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2009.00673.x.
- Frost, H. M. (1989): The biology of fracture healing. An overview for clinicians. Part I. In: *Clinical orthopaedics and related research* (248), S. 283–293.
- Gerstenfeld, Louis C.; Alkhiary, Yaser M.; Krall, Elizabeth A.; Nicholls, Fred H.; Stapleton, Stephanie N.; Fitch, Jennifer L. et al. (2006): Three-dimensional reconstruction of fracture callus morphogenesis. In: *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 54 (11), S. 1215–1228. DOI: 10.1369/jhc.6A6959.2006.
- Gerstenfeld, Louis C.; Cullinane, Dennis M.; Barnes, George L.; Graves, Dana T.; Einhorn, Thomas A. (2003): Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. In: *Journal of cellular biochemistry* 88 (5), S. 873–884. DOI: 10.1002/jcb.10435.

- Giannoudis, P. V.; Schneider, E. (2006): Principles of fixation of osteoporotic fractures. In: *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 88 (10), S. 1272–1278. DOI: 10.1302/0301-620X.88B10.17683.
- Gong, Yaoqin; Slee, Roger B.; Fukai, Naomi; Rawadi, Georges; Roman-Roman, Sergio; Reginato, Anthony M. et al. (2001): LDL Receptor-Related Protein 5 (LRP5) Affects Bone Accrual and Eye Development. In: *Cell* 107 (4), S. 513–523. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00571-2.
- Ghosh SK (2020): Camillo Golgi (1843-1926): scientist extraordinaire and pioneer figure of modern neurology. In: *Anat Cell Biol.*;53(4):385-392. DOI: 10.5115/acb.20.196.
- Graham, Jason M.; Ayati, Bruce P.; Holstein, Sarah A.; Martin, James A. (2013): The role of osteocytes in targeted bone remodeling: a mathematical model. In: *PloS one* 8 (5), e63884. DOI: 10.1371/journal.pone.0063884.
- Hannan, M. T.; Felson, D. T.; Dawson-Hughes, B.; Tucker, K. L.; Cupples, L. A.; Wilson, P. W.; Kiel, D. P. (2000): Risk factors for longitudinal bone loss in elderly men and women: the Framingham Osteoporosis Study. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 15 (4), S. 710–720. DOI: 10.1359/jbmr.2000.15.4.710.
- Harland RM(1994): The transforming growth factor beta family and induction of the vertebrate mesoderm: bone morphogenetic proteins are ventral inducers. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*. DOI: 10.1073/pnas.91.22.10243.
- Hauge, E. M.; Qvesel, D.; Eriksen, E. F.; Mosekilde, L.; Melsen, F. (2001): Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 16 (9), S. 1575–1582. DOI: 10.1359/jbmr.2001.16.9.1575.
- Haugen, Håvard Jostein; Lyngstadaas, Ståle Petter; Rossi, Filippo; Perale, Giuseppe (2019): Bone grafts: which is the ideal biomaterial? In: *Journal of clinical periodontology* 46 Suppl 21, S. 92–102. DOI: 10.1111/jcpe.13058.
- Häussler, B.; Gothe, H.; Göl, D.; Glaeske, G.; Pientka, L.; Felsenberg, D. (2007): Epidemiology, treatment and costs of osteoporosis in Germany--the BoneEVA Study. In: *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 18 (1), S. 77–84. DOI: 10.1007/s00198-006-0206-y.
- Heinemann, S.; Gelinsky, M.; Worch, H.; Hanke, T. (2011): Resorbierbare Knochenersatzmaterialien: Eine Übersicht kommerziell verfügbarer Werkstoffe und neuer Forschungsansätze auf dem Gebiet der Komposite. In: *Der Orthopäde* 40 (9), S. 761–773. DOI: 10.1007/s00132-011-1748-z.
- Heiss, Christian; Govindarajan, Parameswari; Schlewitz, Gudrun; Hemdan, Nasr Y.A.; Schliefer, Nathalie; Alt, Volker et al. (2012): Induction of osteoporosis with its influence on osteoporotic determinants and their interrelationships in rats by DEXA. In: *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research* 18 (6), BR199–207. DOI: 10.12659/MSM.882895.
- Histing, T.; Garcia, P.; Holstein, J. H.; Klein, M.; Matthys, R.; Nuetzi, R. et al. (2011): Small animal bone healing models: standards, tips, and pitfalls results of a consensus meeting. In: *Bone* 49 (4), S. 591–599. DOI: 10.1016/j.bone.2011.07.007.

Ho, Andrew T. V.; Palla, Adelaida R.; Blake, Matthew R.; Yucel, Nora D.; Wang, Yu Xin; Magnusson, Klas E. G. et al. (2017): Prostaglandin E2 is essential for efficacious skeletal muscle stem-cell function, augmenting regeneration and strength. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114 (26), S. 6675–6684. DOI: 10.1073/pnas.1705420114.

Hock, J. M.; Gera, I. (1992): Effects of continuous and intermittent administration and inhibition of resorption on the anabolic response of bone to parathyroid hormone. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 7 (1), S. 65–72. DOI: 10.1002/jbmr.5650070110.

Hofbauer, L. C.; Gori, F.; Riggs, B. L.; Lacey, D. L.; Dunstan, C. R.; Spelsberg, T. C.; Khosla, S. (1999): Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. In: *Endocrinology* 140 (10), S. 4382–4389. DOI: 10.1210/endo.140.10.7034.

Hollinger, Jeffrey O.; Onikepe, Andrew O.; MacKrell, Jim; Einhorn, Thomas; Bradica, Gino; Lynch, Samuel; Hart, Charles E. (2008): Accelerated fracture healing in the geriatric, osteoporotic rat with recombinant human platelet-derived growth factor-BB and an injectable beta-tricalcium phosphate/collagen matrix. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 26 (1), S. 83–90. DOI: 10.1002/jor.20453.

Huang, Wei; Yang, Shuying; Shao, Jianzhong; Li, Yi-Ping (2007): Signaling and transcriptional regulation in osteoblast commitment and differentiation. In: *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 12, S. 3068–3092. DOI: 10.2741/2296.

Ibrahim, Mohd Rafiq Mohd; Singh, Simmrat; Merican, Azhar Mahmood; Raghavendran, Hanumantha Rao Balaji; Murali, Malliga Raman; Naveen, Sangeetha Vasudevaraj; Kamarul, Tunku (2016): The effect of strontium ranelate on the healing of a fractured ulna with bone gap in rabbit. In: *BMC veterinary research* 12 (1), S. 112. DOI: 10.1186/s12917-016-0724-6.

Igarashi, Masato; Kamiya, Naoko; Ito, Koichi; Takagi, Minoru (2002): In situ localization and in vitro expression of osteoblast/osteocyte factor 45 mRNA during bone cell differentiation. In: *The Histochemical journal* 34 (5), S. 255–263. DOI: 10.1023/a:1021745614872.

Ikeda, T.; Utsuyama, M.; Hirokawa, K. (2001): Expression profiles of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand, receptor activator of nuclear factor kappaB, and osteoprotegerin messenger RNA in aged and ovariectomized rat bones. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 16 (8), S. 1416–1425. DOI: 10.1359/jbmr.2001.16.8.1416.

In osteoporotic women treated with strontium ranelate, strontium is located in bone formed during treatment with a maintained degree of mineralization.

Jain, A.; Fedarko, N. S.; Collins, M. T.; Gelman, R.; Ankrom, M. A.; Tayback, M.; Fisher, L. W. (2004): Serum levels of matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE) in normal humans correlate with serum phosphorus, parathyroid hormone and bone mineral density. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 89 (8), S. 4158–4161. DOI: 10.1210/jc.2003-032031.

Jain, A.; Fedarko, N. S.; Collins, M. T.; Gelman, R.; Ankrom, M. A.; Tayback, M.; Fisher, L. W. (2004): Serum Levels of Matrix Extracellular Phosphoglycoprotein (MEPE) in Normal Humans Correlate with Serum Phosphorus, Parathyroid Hormone and Bone Mineral Density. In: *J Clin Endocrinol Metab* 89 (8), S. 4158–4161. DOI: 10.1210/jc.2003-032031.

Jilka, Robert L. (2003): Biology of the basic multicellular unit and the pathophysiology of osteoporosis. In: *Medical and pediatric oncology* 41 (3), S. 182–185. DOI: 10.1002/mpo.10334.

- Kakar, Sanjeev; Einhorn, Thomas A.; Vora, Siddharth; Miara, Lincoln J.; Hon, Gregory; Wigner, Nathan A. et al. (2007): Enhanced chondrogenesis and Wnt signaling in PTH-treated fractures. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 22 (12), S. 1903–1912. DOI: 10.1359/jbmr.070724.
- Kanis, J. A.; Johnell, O.; Oden, A.; Sernbo, I.; Redlund-Johnell, I.; Dawson, A. et al. (2000): Long-Term Risk of Osteoporotic Fracture in Malmö. In: *Osteoporosis International* 11 (8), S. 669–674. DOI: 10.1007/s001980070064.
- Kanis, J. A.; McCloskey, E. V.; Johansson, H.; Strom, O.; Borgstrom, F.; Oden, A. (2008): Case finding for the management of osteoporosis with FRAX--assessment and intervention thresholds for the UK. In: *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 19 (10), S. 1395–1408. DOI: 10.1007/s00198-008-0712-1.
- Kartsogiannis, V.; Zhou, H.; Horwood, N.J.; Thomas, R.J.; Hards, D.K.; Quinn, J.M.W et al. (1999): Localization of RANKL (receptor activator of NFκB ligand) mRNA and protein in skeletal and extraskeletal tissues. In: *Bone* 25 (5), S. 525–534. DOI: 10.1016/S8756-3282(99)00214-8.
- Kato, Masaki; Patel, Millan S.; Levasseur, Regis; Lobov, Ivan; Chang, Benny H-J; Glass, Donald A. et al. (2002): Cbfa1-independent decrease in osteoblast proliferation, osteopenia, and persistent embryonic eye vascularization in mice deficient in Lrp5, a Wnt coreceptor. In: *The Journal of cell biology* 157 (2), S. 303–314. DOI: 10.1083/jcb.200201089.
- Kennedy, Oran D.; Herman, Brad C.; Laudier, Damien M.; Majeska, Robert J.; Sun, Hui B.; Schaffler, Mitchell B. (2012): Activation of resorption in fatigue-loaded bone involves both apoptosis and active pro-osteoclastogenic signaling by distinct osteocyte populations. In: *Bone* 50 (5), S. 1115–1122. DOI: 10.1016/j.bone.2012.01.025.
- Klein-Nulend, J.; Sterck, J. G. H.; Semeins, C. M.; Lips, P.; Joldersma, M.; Baart, J. A.; Burger, E. H. (2002): Donor age and mechanosensitivity of human bone cells. In: *Osteoporosis international: a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA* 13 (2), S. 137–146. DOI: 10.1007/s001980200005.
- Kobayashi, Keiji; Nojiri, Hidetoshi; Saita, Yoshitomo; Morikawa, Daichi; Ozawa, Yusuke; Watanabe, Kenji et al. (2015): Mitochondrial superoxide in osteocytes perturbs canalicular networks in the setting of age-related osteoporosis. In: *Scientific Reports* 5, S. 9148. DOI: 10.1038/srep09148.
- Kolar, Paula; Schmidt-Bleek, Katharina; Schell, Hanna; Gaber, Timo; Toben, Daniel; Schmidmaier, Gerhard et al. (2010): The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. In: *Tissue engineering. Part B, Reviews* 16 (4), S. 427–434. DOI: 10.1089/ten.TEB.2009.0687.
- Komori, T.; Yagi, H.; Nomura, S.; Yamaguchi, A.; Sasaki, K.; Deguchi, K. et al. (1997): Targeted Disruption of Cbfa1 Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturation Arrest of Osteoblasts. In: *Cell* 89 (5), S. 755–764. DOI: 10.1016/S0092-8674(00)80258-5.
- Larsson, Sune; Fazzalari, Nicola L. (2014): Anti-osteoporosis therapy and fracture healing. In: *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 134 (2), S. 291–297. DOI: 10.1007/s00402-012-1558-8.

Leeuwenkamp, O. R.; van der Vijgh, W. J.; Hüsken, B. C.; Lips, P.; NETELENBOS, J. C. (1990): Human pharmacokinetics of orally administered strontium. In: *Calcified tissue international* 47 (3), S. 136–141. DOI: 10.1007/bf02555977.

Li, Chenghao; Paris, Oskar; Siegel, Stefan; Roschger, Paul; Paschalis, Eleftherios P.; Klaushofer, Klaus; Fratzl, Peter (2010): Strontium is incorporated into mineral crystals only in newly formed bone during strontium ranelate treatment. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 25 (5), S. 968–975. DOI: 10.1359/jbmr.091038.

Li, J.; Sarosi, I.; Yan, X. Q.; Morony, S.; Capparelli, C.; Tan, H. L. et al. (2000): RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (4), S. 1566–1571. DOI: 10.1073/pnas.97.4.1566.

Lian, Jane B.; Stein, Gary S.; van Wijnen, Andre J.; Stein, Janet L.; Hassan, Mohammad Q.; Gaur, Tripti; Zhang, Ying (2012): MicroRNA control of bone formation and homeostasis. In: *Nature reviews. Endocrinology* 8 (4), S. 212–227. DOI: 10.1038/nrendo.2011.234.

Lirani-Galvão, A. P. R.; Chavassieux, P.; Portero-Muzy, N.; Bergamaschi, C. T.; Silva, O. L.; Carvalho, A. B. et al. (2009): Low-intensity electrical stimulation counteracts the effects of ovariectomy on bone tissue of rats: effects on bone microarchitecture, viability of osteocytes, and nitric oxide expression. In: *Calcified tissue international* 84 (6), S. 502–509. DOI: 10.1007/s00223-009-9227-9.

Liu, Shiguang; Tang, Wen; Zhou, Jianping; Vierthaler, Luke; Quarles, L. Darryl (2007): Distinct roles for intrinsic osteocyte abnormalities and systemic factors in regulation of FGF23 and bone mineralization in Hyp mice. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 293 (6), E1636–44. DOI: 10.1152/ajpendo.00396.2007.

Lohmann, R.; Frerichmann, U.; Stöckle, U.; Riegel, T.; Raschke, M. J. (2007): Proximale Femurfrakturen im Alter. In: *Der Unfallchirurg* 110 (7), S. 603–609. DOI: 10.1007/s00113-007-1257-z.

Lu, Chuanyong; Huang, Steve; Miclau, Theodore; Helms, Jill A.; Colnot, Céline (2004): Mepe is expressed during skeletal development and regeneration. In: *Histochemistry and cell biology* 121 (6), S. 493–499. DOI: 10.1007/s00418-004-0653-5.

Lüllmann-Rauch, Renate (2012): Taschenlehrbuch Histologie. Unter Mitarbeit von Friedrich Paulsen. 4. Auflage.

Manolagas, S. C.; Am Parfitt (2013): For whom the bell tolls: distress signals from long-lived osteocytes and the pathogenesis of metabolic bone diseases. In: *Bone* 54 (2). DOI: 10.1016/j.bone.2012.09.017.

Manolagas, Stavros C.; Parfitt, A. Michael (2013): For whom the bell tolls: distress signals from long-lived osteocytes and the pathogenesis of metabolic bone diseases. In: *Bone* 54 (2), S. 272–278. DOI: 10.1016/j.bone.2012.09.017.

Marie, Pierre J. (2006): Strontium ranelate: a dual mode of action rebalancing bone turnover in favour of bone formation. In: *Current opinion in rheumatology* 18 Suppl 1, S11–5. DOI: 10.1097/01.bor.0000229522.89546.7b.

Marsell, Richard; Einhorn, Thomas A. (2010): Emerging bone healing therapies. In: *Journal of orthopaedic trauma* 24 Suppl 1, S4–8. DOI: 10.1097/BOT.0b013e3181ca3fab.

Marsell, Richard; Einhorn, Thomas A. (2011): The biology of fracture healing. In: *Injury* 42 (6), S. 551–555. DOI: 10.1016/j.injury.2011.03.031.

Martin, T. John; Sims, Natalie A. (2015): RANKL/OPG; Critical role in bone physiology. In: *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders* 16 (2), S. 131–139. DOI: 10.1007/s11154-014-9308-6.

Marx, Daniella; Rahimnejad Yazdi, Alireza; Papini, Marcello; Towler, Mark (2020): A review of the latest insights into the mechanism of action of strontium in bone. In: *Bone reports* 12, S. 100273. DOI: 10.1016/j.bonr.2020.100273.

McCann, Roseleen M.; Colleary, Gary; Geddis, Carolyn; Clarke, Susan A.; Jordan, Grant R.; Dickson, Glenn R.; Marsh, David (2008): Effect of osteoporosis on bone mineral density and fracture repair in a rat femoral fracture model. In: *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 26 (3), S. 384–393. DOI: 10.1002/jor.20505.

Meakin, Lee B.; Galea, Gabriel L.; Sugiyama, Toshihiro; Lanyon, Lance E.; Price, Joanna S. (2014): Age-related impairment of bones' adaptive response to loading in mice is associated with sex-related deficiencies in osteoblasts but no change in osteocytes. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 29 (8), S. 1859–1871. DOI: 10.1002/jbmr.2222.

Meunier, Pierre J.; Roux, Christian; Seeman, Ego; Ortolani, Sergio; Badurski, Janusz E.; Spector, Tim D. et al. (2004): The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. In: *The New England journal of medicine* 350 (5), S. 459–468. DOI: 10.1056/NEJMoa022436.

Milovanovic, Petar; Zimmermann, Elizabeth A.; Hahn, Michael; Djonic, Danijela; Püschel, Klaus; Djuric, Marija et al. (2013): Osteocytic canalicular networks: morphological implications for altered mechanosensitivity. In: *ACS nano* 7 (9), S. 7542–7551. DOI: 10.1021/nn401360u.

Mori, S.; Harruff, R.; Ambrosius, W.; Burr, D. B. (1997): Trabecular bone volume and micro-damage accumulation in the femoral heads of women with and without femoral neck fractures. In: *Bone* 21 (6), S. 521–526. DOI: 10.1016/s8756-3282(97)00200-7.

MOVAT, H. Z. (1955): Demonstration of all connective tissue elements in a single section; pentachrome stains. In: *A.M.A. archives of pathology* 60 (3), S. 289–295.

Moyer, Virginia A. (2013): Vitamin D and calcium supplementation to prevent fractures in adults: U.S. Preventive Services Task Force recommendation statement. In: *Annals of internal medicine* 158 (9), S. 691–696. DOI: 10.7326/0003-4819-158-9-201305070-00603.

Mukherjee, Siddhartha; Raje, Noopur; Schoonmaker, Jesse A.; Liu, Julie C.; Hideshima, Teru; Wein, Marc N. et al. (2008): Pharmacologic targeting of a stem/progenitor population in vivo is associated with enhanced bone regeneration in mice. In: *The Journal of clinical investigation* 118 (2), S. 491–504. DOI: 10.1172/JCI33102.

Nagata, T.; Kaho, K.; Nishikawa, S.; Shinohara, H.; Wakano, Y.; Ishida, H. (1994): Effect of prostaglandin E2 on mineralization of bone nodules formed by fetal rat calvarial cells. In: *Calcified tissue international* 55 (6), S. 451–457. DOI: 10.1007/bf00298559.

Nakashima, Tomoki; Hayashi, Mikihiro; Fukunaga, Takanobu; Kurata, Kosaku; Oh-Hora, Matsugu; Feng, Jian Q. et al. (2011): Evidence for osteocyte regulation of bone homeostasis through RANKL expression. In: *Nature medicine* 17 (10), S. 1231–1234. DOI: 10.1038/nm.2452.

Neer, R. M.; Arnaud, C. D.; Zanchetta, J. R.; Prince, R.; Gaich, G. A.; Reginster, J. Y. et al. (2001): Effect of parathyroid hormone (1-34) on fractures and bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. In: *The New England journal of medicine* 344 (19), S. 1434–1441. DOI: 10.1056/NEJM200105103441904.

- Ni, Guo X.; Lin, Jian H.; Chiu, Peter K. Y.; Li, Zhao Y.; Lu, William W. (2010): Effect of strontium-containing hydroxyapatite bone cement on bone remodeling following hip replacement. In: *Journal of materials science. Materials in medicine* 21 (1), S. 377–384. DOI: 10.1007/s10856-009-3866-2.
- Niehhs C (2006): Function and biological roles of the Dickkopf family of Wnt modulators. In: *Oncogene* 25(57), S.7469-81. DOI: 10.1038/sj.onc.1210054.
- Nunamaker, D. M. (1998): Experimental models of fracture repair. In: *Clinical orthopaedics and related research* (355 Suppl), S56-65. DOI: 10.1097/00003086-199810001-00007.
- Offermanns, Vincent; Andersen, Ole Zoffmann; Riede, Gregor; Andersen, Inge Hald; Almtoft, Klaus Pagh; Sørensen, Søren et al. (2016): Bone regenerating effect of surface-functionalized titanium implants with sustained-release characteristics of strontium in ovariectomized rats. In: *International journal of nanomedicine* 11, S. 2431–2442. DOI: 10.2147/IJN.S101673.
- Osteoporosis prevention, diagnosis, and therapy (2001). In: *JAMA* 285 (6), S. 785–795.
- Ott, Susan M. (2005): Sclerostin and Wnt signaling--the pathway to bone strength. In: *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90 (12), S. 6741–6743. DOI: 10.1210/jc.2005-2370.
- Pavone, Vito; Testa, Gianluca; Giardina, Serena M. C.; Vescio, Andrea; Restivo, Domenico A.; Sessa, Giuseppe (2017): Pharmacological Therapy of Osteoporosis: A Systematic Current Review of Literature. In: *Frontiers in pharmacology* 8, S. 803. DOI: 10.3389/fphar.2017.00803.
- Pelletier, Jean-Pierre; Kapoor, Mohit; Fahmi, Hassan; Lajeunesse, Daniel; Blesius, Alexia; Maillet, Juliette; Martel-Pelletier, Johanne (2013): Strontium ranelate reduces the progression of experimental dog osteoarthritis by inhibiting the expression of key proteases in cartilage and of IL-1 β in the synovium. In: *Annals of the rheumatic diseases* 72 (2), S. 250–257. DOI: 10.1136/annrheumdis-2012-201710.
- Pesta, Dominik H.; Tsigotis, Dimitrios N.; Befroy, Douglas E.; Caballero, Daniel; Jurczak, Michael J.; Rahimi, Yasmeen et al. (2016): Hypophosphatemia promotes lower rates of muscle ATP synthesis. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 30 (10), S. 3378–3387. DOI: 10.1096/fj.201600473R.
- Plotkin, Lilian I.; Bellido, Teresita (2016): Osteocytic signalling pathways as therapeutic targets for bone fragility. In: *Nature reviews. Endocrinology* 12 (10), S. 593–605. DOI: 10.1038/nrendo.2016.71.
- Qing, Hai; Ardeshirpour, Laleh; Pajevic, Paola Divieti; Dusevich, Vladimir; Jähn, Katharina; Kato, Shigeaki et al. (2012): Demonstration of osteocytic perilacunar/canalicular remodeling in mice during lactation. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 27 (5), S. 1018–1029. DOI: 10.1002/jbmr.1567.
- Quade, Mandy; Schumacher, Matthias; Bernhardt, Anne; Lode, Anja; Kampschulte, Marian; Voß, Andrea et al. (2018): Strontium-modification of porous scaffolds from mineralized collagen for potential use in bone defect therapy. In: *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* 84, S. 159–167. DOI: 10.1016/j.msec.2017.11.038.
- Quade, Mandy; Vater, Corina; Schlootz, Saskia; Bolte, Julia; Langanke, Robert; Bretschneider, Henriette et al. (2020): Strontium enhances BMP-2 mediated bone regeneration in a femoral murine bone defect model. In: *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 108 (1), S. 174–182. DOI: 10.1002/jbm.b.34376.

- Querido, William; Rossi, Andre L.; Farina, Marcos (2016): The effects of strontium on bone mineral: A review on current knowledge and microanalytical approaches. In: *Micron (Oxford, England : 1993)* 80, S. 122–134. DOI: 10.1016/j.micron.2015.10.006.
- Raffalt, Anders C.; Andersen, Jens E. T.; Christgau, Stephan (2008): Application of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) and quality assurance to study the incorporation of strontium into bone, bone marrow, and teeth of dogs after one month of treatment with strontium malonate. In: *Analytical and bioanalytical chemistry* 391 (6), S. 2199–2207. DOI: 10.1007/s00216-008-2171-0.
- Raisz, L. G.; Fall, P. M.; Gabbittas, B. Y.; McCarthy, T. L.; Kream, B. E.; Canalis, E. (1993): Effects of prostaglandin E2 on bone formation in cultured fetal rat calvariae: role of insulin-like growth factor-I. In: *Endocrinology* 133 (4), S. 1504–1510. DOI: 10.1210/endo.133.4.7691577.
- Raisz, L. G.; Kream, B. E. (1983): Regulation of bone formation (second of two parts). In: *The New England journal of medicine* 309 (2), S. 83–89. DOI: 10.1056/NEJM198307143090206.
- Ray, Nancy Fox; Chan, Julien K.; Thamer, Mae; Melton, L. Joseph (1997): Medical Expenditures for the Treatment of Osteoporotic Fractures in the United States in 1995: Report from the National Osteoporosis Foundation. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 12 (1), S. 24–35. DOI: 10.1359/jbmr.1997.12.1.24.
- Ray, Seemun (2014): Effects of strontium loaded calcium phosphate cement on osteoporotic fracture defect healing. Dissertation. 1. Aufl. 1 Band. Giessen.
- Ray, Seemun; Thormann, Ulrich; Sommer, Ursula; Khassawna, Thaqif El; Hundgeburth, Marvin; Henß, Anja et al. (2016): Effects of macroporous, strontium loaded xerogel-scaffolds on new bone formation in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. In: *Injury* 47, S52–S61. DOI: 10.1016/S0020-1383(16)30013-4.
- Reginster, J-Y; Malaise, O.; Neuprez, A.; Bruyere, O. (2007): Strontium ranelate in the prevention of osteoporotic fractures. In: *International journal of clinical practice* 61 (2), S. 324–328. DOI: 10.1111/j.1742-1241.2006.01249.x.
- Riggs BL, Melton LJ 3rd. (1995): The worldwide problem of osteoporosis: insights afforded by epidemiology. In: *Bone* (5 Suppl), S.505–511. DOI: 10.1016/8756-3282(95)00258-4.
- Robertson, M. Clare; Campbell, A. John; Gardner, Melinda M.; Devlin, Nancy (2002): Preventing injuries in older people by preventing falls: a meta-analysis of individual-level data. In: *Journal of the American Geriatrics Society* 50 (5), S. 905–911. DOI: 10.1046/j.1532-5415.2002.50218.x.
- Rocheffort, Gaël Y. (2014): The osteocyte as a therapeutic target in the treatment of osteoporosis. In: *Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease* 6 (3), S. 79–91. DOI: 10.1177/1759720X14523500.
- Rodan, G. A. (1998): Bone homeostasis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (23), S. 13361–13362. DOI: 10.1073/pnas.95.23.13361.
- Rohnke, Marcus; Pfitzenreuter, Stefanie; Mogwitz, Boris; Henß, Anja; Thomas, Jürgen; Bieberstein, Dina et al. (2017): Strontium release from Sr²⁺-loaded bone cements and dispersion in healthy and osteoporotic rat bone. In: *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 262, S. 159–169. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.07.036.
- Russell WMS and Burch RJ (1959): The principles of humane experimental technique. London: Methuen

- Rybczyn, Mark S.; Slater, Michael; Conigrave, Arthur D.; Mason, Rebecca S. (2011): An Akt-dependent increase in canonical Wnt signaling and a decrease in sclerostin protein levels are involved in strontium ranelate-induced osteogenic effects in human osteoblasts. In: *The Journal of biological chemistry* 286 (27), S. 23771–23779. DOI: 10.1074/jbc.M111.251116.
- Saag, K. G.; Emkey, R.; Schnitzer, T. J.; Brown, J. P.; Hawkins, F.; Goemaere, S. et al. (1998): Alendronate for the prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis. Glucocorticoid-Induced Osteoporosis Intervention Study Group. In: *The New England journal of medicine* 339 (5), S. 292–299. DOI: 10.1056/NEJM199807303390502.
- Schiebler, Theodor Heinrich; Korf, Horst-Werner (2007): Anatomie. Histologie, Entwicklungsgeschichte, makroskopische und mikroskopische Anatomie, Topographie. 10., vollständig überarbeitete Auflage. Darmstadt: Steinkopff Verlag. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-7985-1771-4>.
- Schlewitz, G.; Govindarajan, P.; Schlieke, N.; Alt, V.; Böcker, W.; Elkhassawna, T. et al. (2013): Ovariectomy and Calcium-/Vitamin D2/D3-poor Diet as Osteoporosis model in the Rat Sprague-Dawley. In: *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie* 151 (1), S. 14–19. DOI: 10.1055/s-0032-1327976.
- Schumacher, M.; Lode, A.; Helth, A.; Gelinsky, M. (2013): A novel strontium(II)-modified calcium phosphate bone cement stimulates human-bone-marrow-derived mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation in vitro. In: *Acta biomaterialia* 9 (12), S. 9547–9557. DOI: 10.1016/j.actbio.2013.07.027.
- Schumacher, M.; Reither, L.; Thomas, J.; Kampschulte, M.; Gbureck, U.; Lode, A.; Gelinsky, M. (2017): Calcium phosphate bone cement/mesoporous bioactive glass composites for controlled growth factor delivery. In: *Biomaterials science* 5 (3), S. 578–588. DOI: 10.1039/c6bm00903d.
- Seeman, Ego (2006): Strontium ranelate: vertebral and non-vertebral fracture risk reduction. In: *Current opinion in rheumatology* 18 Suppl 1, S17–20. DOI: 10.1097/01.bor.0000229523.89546.32.
- Seeman, Ego (2013): Age- and menopause-related bone loss compromise cortical and trabecular microstructure. In: *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences* 68 (10), S. 1218–1225. DOI: 10.1093/gerona/glt071.
- Sethuraman, Swaminathan; Krishnan, Uma Maheswari; Subramanian, Anuradha (Hg.) (2016): Biomaterials and nanotechnology for tissue engineering. Boca Raton: CRC Press.
- SIPS, A. J. A. M.; van der Vijgh, W. J. F.; BARTO, R.; NETELENBOS, J. C. (1996): Intestinal absorption of strontium chloride in healthy volunteers: pharmacokinetics and reproducibility. In: *British Journal of Clinical Pharmacology* 41 (6), S. 543–549. DOI: 10.1046/j.1365-2125.1996.33411.x.
- Sözen, Tümay; Özışık, Lale; Başaran, Nursel Çalık (2016): An overview and management of osteoporosis. In: *European Journal of Rheumatology* 4 (1), S. 46–56. DOI: 10.5152/eur-jrheum.2016.048.
- Suen, Pui Kit; Qin, Ling (2016): Sclerostin, an emerging therapeutic target for treating osteoporosis and osteoporotic fracture: A general review. In: *Journal of orthopaedic translation* 4, S. 1–13. DOI: 10.1016/j.jot.2015.08.004.
- Takaoka, S.; Yamaguchi, T.; Yano, S.; Yamauchi, M.; Sugimoto, T. (2010): The Calcium-sensing Receptor (CaR) is involved in strontium ranelate-induced osteoblast differentiation and mineralization. In: *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et métabolisme* 42 (9), S. 627–631. DOI: 10.1055/s-0030-1255091.

- Teitelbaum, S. L. (2000): Bone resorption by osteoclasts. In: *Science (New York, N.Y.)* 289 (5484), S. 1504–1508. DOI: 10.1126/science.289.5484.1504.
- Theiss, Felix; Apelt, Detlef; Brand, Bastian; Kutter, Annette; Zlinszky, Katalin; Bohner, Marc et al. (2005): Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. In: *Biomaterials* 26 (21), S. 4383–4394. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2004.11.056.
- Thompson, Zachary; Miclau, Theodore; Hu, Diane; Helms, Jill A. (2002): A model for intramembranous ossification during fracture healing. In: *J. Orthop. Res.* 20 (5), S. 1091–1098. DOI: 10.1016/S0736-0266(02)00017-7.
- Thompson, D. D.; Simmons, H. A.; Pirie, C. M.; Ke, H. Z. (1995): FDA guidelines and animal models for osteoporosis. In: *Bone* 17 (4), S125–S133. DOI: 10.1016/8756-3282(95)00285-L.
- Thormann, Ulrich; El Khawassna, Thaqif; Ray, Seemun; Duerselen, Lutz; Kampschulte, Marian; Lips, Katrin et al. (2014): Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats. In: *Injury* 45 (3), S. 487–493. DOI: 10.1016/j.injury.2013.10.033.
- Thormann, Ulrich; Ray, Seemun; Sommer, Ursula; Elkhassawna, Thaqif; Rehling, Tanja; Hundgeburth, Marvin et al. (2013): Bone formation induced by strontium modified calcium phosphate cement in critical-size metaphyseal fracture defects in ovariectomized rats. In: *Biomaterials* 34 (34), S. 8589–8598. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.07.036.
- Tiede-Lewis, LeAnn M.; Dallas, Sarah L. (2019): Changes in the osteocyte lacunocanalicular network with aging. In: *Bone* 122, S. 101–113. DOI: 10.1016/j.bone.2019.01.025.
- Torzewski, M. (2015): Die Movat-Pentachromfärbung – eine farbenprächtige Darstellung verschiedener zellulärer und extrazellulärer Gewebekomponenten. In: *MK* 2 (10), S. 204–208. DOI: 10.5414/MKX0060.
- Trindade, Ricardo; Albrektsson, Tomas; Tengvall, Pentti; Wennerberg, Ann (2016): Foreign Body Reaction to Biomaterials: On Mechanisms for Buildup and Breakdown of Osseointegration. In: *Clinical implant dentistry and related research* 18 (1), S. 192–203. DOI: 10.1111/cid.12274.
- Turner, C. H.; Robling, A. G.; Duncan, R. L.; Burr, D. B. (2002): Do bone cells behave like a neuronal network? In: *Calcified tissue international* 70 (6), S. 435–442. DOI: 10.1007/s00223-001-1024-z.
- Uzbekov, R. E.; Maurel, D. B.; Aveline, P. C.; Pallu, S.; Benhamou, C. L.; Rochefort, G. Y. (2012): Centrosome fine ultrastructure of the osteocyte mechanosensitive primary cilium. In: *Microscopy and microanalysis : the official journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* 18 (6), S. 1430–1441. DOI: 10.1017/S1431927612013281.
- van der Kraan PM, Davidson EN (2015): Cross-talk between bone morphogenetic proteins and inflammatory pathways. In: *Arthritis Res Ther.* 2015 Nov 23;17:326. DOI: 10.1186/s13075-015-0817-9.
- van Hove RP, Nolte PA, Vatsa A, Semeins CM, Salmon PL, Smit TH, Klein-Nulend J. Osteocyte morphology in human tibiae of different bone pathologies with different bone mineral density--is there a role for mechanosensing? In: *Bone.* 2009 Aug;45(2):321-9. DOI: 10.1016/j.bone.2009.04.238.

- Vashishth, D.; Verborgt, O.; Divine, G.; Schaffler, M. B.; Fyhrie, D. P. (2000): Decline in osteocyte lacunar density in human cortical bone is associated with accumulation of microcracks with age. In: *Bone* 26 (4), S. 375–380. DOI: 10.1016/S8756-3282(00)00236-2.
- Vezeridis, Peter S.; Semeins, Cornelis M.; Chen, Qian; Klein-Nulend, Jenneke (2006): Osteocytes subjected to pulsating fluid flow regulate osteoblast proliferation and differentiation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 348 (3), S. 1082–1088. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.07.146.
- Wang, Cuicui; Abu-Amer, Yousef; O’Keefe, Regis J.; Shen, Jie (2017): Loss of Dnmt3b in Chondrocytes Leads to Delayed Endochondral Ossification and Fracture Repair. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 33 (2), S. 283–297. DOI: 10.1002/jbmr.3305.
- Watts, Nelson B.; Bilezikian, John P.; Camacho, Pauline M.; Greenspan, Susan L.; Harris, Steven T.; Hodgson, Stephen F. et al. (2010): AMERICAN ASSOCIATION OF CLINICAL ENDOCRINOLOGISTS MEDICAL GUIDELINES FOR CLINICAL PRACTICE FOR THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF POSTMENOPAUSAL OSTEOPOROSIS. In: *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists* 16 (Suppl 3), S. 1–37.
- Winkler, David G.; Sutherland, May Kung; Geoghegan, James C.; Yu, Changpu; Hayes, Trenton; Skonier, John E. et al. (2003): Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. In: *The EMBO Journal* 22 (23), S. 6267–6276. DOI: 10.1093/emboj/cdg599.
- Yamaguchi, Toru (2008): The calcium-sensing receptor in bone. In: *Journal of bone and mineral metabolism* 26 (4), S. 301–311. DOI: 10.1007/s00774-008-0843-7.
- Yang, Fan; Yang, Dazhi; Tu, Jie; Zheng, Qixin; Cai, Lintao; Wang, Liping (2011): Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 29 (6), S. 981–991. DOI: 10.1002/stem.646.
- Yildirimer, Lara; Seifalian, Alexander M. (2014): Three-dimensional biomaterial degradation - Material choice, design and extrinsic factor considerations. In: *Biotechnology advances* 32 (5), S. 984–999. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2014.04.014.
- Zaman, G.; Pitsillides, A. A.; Rawlinson, S. C.; Suswillo, R. F.; Mosley, J. R.; Cheng, M. Z. et al. (1999): Mechanical strain stimulates nitric oxide production by rapid activation of endothelial nitric oxide synthase in osteocytes. In: *Journal of Bone and Mineral Research* 14 (7), S. 1123–1131. DOI: 10.1359/jbmr.1999.14.7.1123.
- Zhang, Hongyang; Shi, Xiaojuan; Wang, Long; Li, Xiaojie; Zheng, Chao; Gao, Bo et al. (2018): Intramembranous ossification and endochondral ossification are impaired differently between glucocorticoid-induced osteoporosis and estrogen deficiency-induced osteoporosis. In: *Scientific Reports* 8. DOI: 10.1038/s41598-018-22095-1.
- Zhang, Rong; Lu, Yongbo; Ye, Ling; Yuan, Baozhi; Yu, Shibin; Qin, Chunlin et al. (2011): Unique roles of phosphorus in endochondral bone formation and osteocyte maturation. In: *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 26 (5), S. 1047–1056. DOI: 10.1002/jbmr.294.

13. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Karlsruhe, 01.März 2022

Ort, Datum



Unterschrift

14. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Thaqif El Khassawna sowie meinem ehemaligen Doktorvater Prof. Dr. Dr. Volker Alt und PD Dr. Ulrich Thormann für die Möglichkeit zur Promotion sowie für die gute Betreuung während der gesamten Zeit.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Univ.-Prof. Dr. Dr. Christian Heiss bedanken, der mir den Zugang zum Labor und die gesamte Arbeit ermöglicht hat.

Vielen Dank auch an Dr. Seemun Ray für die außerordentliche Betreuung während meiner Promotion und an Dr. Pons-Kühnemann vom Institut für medizinische Informatik Giessen für die fundierte Auswertung der Daten sowie die Unterstützung in allen statistischen Belangen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors für Experimentelle Unfallchirurgie in Gießen bedanken, für die freundliche Aufnahme in das Team und die Hilfsbereitschaft bei aufkommenden Fragen. Mein Dank gilt insbesondere Ida Oberst, Rainer Braun und Dr. Sabine Stötzel sowie Frau Prof. Dr. Katrin Lips und Dr. Ursula Sommer.

Ich bedanke mich bei dem gesamten ehemaligen Team des Sonderforschungsbereiches / Transregio 79 für die gute Zusammenarbeit sowie den regen Wissens- und Erkenntnisaustausch.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch ganz herzlich bei meiner Familie und meinen Freunden für die dauerhafte und tiefgreifende Unterstützung während meiner Promotion bedanken. Insbesondere gilt mein Dank Leah Strauss für die unermüdliche Motivation.