

Aus dem Zentrum für Operative Medizin  
der Philipps-Universität Marburg/Lahn  
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. Dr. A. Wilke

**Institut für Experimentelle Orthopädie  
und Biomechanik  
Leiter: Prof. Dr. David B. Jones**



**Zetos: Ein Kulturbelastungssystem für trabekuläre Knochen**

**Untersuchung eines Belastungssignals  
mit verschiedenen Intensitäten an  
bovinen Knochenzylindern**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Sebastian Wunsch**

aus Bautzen

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin

der Philipps-Universität Marburg am 18.08.2005

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. Maisch

Referent: Prof. Dr. D. B. Jones

1. Korreferent: Dr. R. Stiletto

2. Korreferent: Prof. Dr. B. Steiniger

*meinen Eltern und meinem Bruder*

# **Inhaltsverzeichnis**

## **1 Einführung**

1.1	Einleitung und Thematische Einordnung	7
1.2	Der Knochen	10
1.3	Die Knochenzellen	12
1.3.1	Die Osteoblasten	12
1.3.2	Die Osteozyten	13
1.3.3	Bone-Lining-Zellen	15
1.3.4	Die Osteoklasten	15
1.3.5	Beziehungen zwischen den Knochenzellen	18
1.4	Wachstumsverhalten von Knochen	20
1.4.1	Wachstum und Modeling	20
1.4.2	Remodeling	20
1.5	Knochenzell- und Vitalitätsmarker	23
1.5.1	Die Alkalische Phosphatase	23
1.5.2	Die Laktatdehydrogenase	24
1.5.3	Prostaglandine im Knochenstoffwechsel	25
1.6	Die polychrome Sequenzmarkierung	28
1.7	Die Apoptose	29
1.8	Die Steifigkeit / E-Modul	32
1.9	Das Perfusions- und Belastungssystem	35
1.9.1	Bestandteile	36

## **2 Zielsetzung und Fragestellungen** 41

## **3 Material und Methoden** 42

3.1	Herstellung der Knochenpräparate	42
3.1.1	Beschaffung und Aufbereitung des Knochens	42
3.1.2	Präparation der Knochenzylinder	43
3.1.3	Nachbearbeitung der Knochenzylinder	45
3.1.4	Waschen der Präparate	46

3.1.5 Einsetzen der Zylinder in die Kammer	47
3.1.6 Anschluss der Kammern an das Zetos-System	48
3.1.7 Mediumwechsel	50
3.1.8 verwendete Medien	50
3.2 Allgemeine Kulturbedingungen	52
3.3 Versuchsdurchführung und Verlauf	52
3.4 Die Steifigkeit der Knochenzylinder / E-Modul	53
3.5 Das Belastungssignal	56
3.6 Die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase	60
3.7 Die Bestimmung der Laktatdehydrogenase	61
3.8 Versuchsende - Aufarbeitung der Knochenzylinder	62
3.8.1 Fixation	62
3.8.2 Einbettung	64
3.8.3 Anfertigen von histologischen Dünnschnitten	66
3.8.4 Ponalbeschichtung der Objektträger	68
3.8.5 Entacrylierung	69
3.8.6 Die Färbung der histologischen Dünnschnitte und exemplarische Abbildungen	70
3.8.6.1 Die Doppelfärbung nach Hämalaun-Eosin (H&E)	71
3.8.6.2 Die Giemsa-Färbung	74
3.8.6.3 Die Toluidin O-Färbung	76
3.8.6.4 Die Trichromfärbung nach Goldner	78
3.8.6.5 Die modifizierte v.Kossa-Versilberung nach Krutsay	82
3.8.6.6 Die Färbung mit Alcianblau-PAS	86
3.8.6.7 Enzymhistochemie: Alkalische und Saure Phosphatase	90
3.8.7 Die polychrome Sequenzmarkierung	93
3.8.8 Immunhistochemie: Detektion apoptotischer Osteozyten	96
3.8.9 Das Eindecken der Präparate	102
3.9 Materialverzeichnis	103
3.10 Auswertung und Statistik	109
<b>4 Ergebnisse und Auswertung</b>	<b>110</b>
4.1 Die Steifigkeit der Knochenexplantate (E-Modul)	110

4.2	Das Osteoid	114
4.3	Beziehung zwischen Steifigkeit und Osteoidbildung	115
4.4	Die Alkalische Phosphatase	117
4.5	Die Laktatdehydrogenase	118
4.6	Die pH-Werte	120
4.7	Die Polychrome Sequenzmarkierung	121
4.8	Histologische Auswertung	122
<b>5</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	<b>123</b>
<b>6</b>	<b>Ergebniszusammenfassung</b>	<b>130</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>132</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>135</b>
<b>9</b>	<b>Firmenverzeichnis</b>	<b>154</b>
<b>10</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>156</b>
<b>11</b>	<b>Index</b>	<b>158</b>
<b>12</b>	<b>Danksagung</b>	<b>159</b>
<b>13</b>	<b>Ehrenwörtliche Erklärung</b>	<b>160</b>
<b>14</b>	<b>Verzeichnis der akademischen Lehrer</b>	<b>161</b>
<b>15</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>162</b>

# 1 Einführung

## 1.1 Einleitung und thematische Einordnung

Es ist bekannt, dass mechanische Belastungen Einfluss auf die Regulation von Knochenmasse und Knochenstruktur nehmen. Es kommt dabei zu Deformationen des Knochens, verbunden mit einer Änderung ( $\Delta L$ ) der ursprünglichen Knochenlänge ( $L_0$ ). Diese Änderung wird auch als Kompression bezeichnet. Die relative Änderung  $\Delta L/L_0$  wird in strain angegeben und ist eine dimensionslose Größe.

Auf Grund von mechanischen Belastungen reagiert Knochen mit einer Dichtezunahme und oder mit der Änderung seines trabekulären Aufbaus. Daraus resultiert eine erhöhte Widerstandsfähigkeit [65,115]. Die Belastungen können dabei direkt oder indirekt wirken. Verschiedene Studien bestätigen erhöhte Proliferationsraten und Differenzierungsaktivitäten bestimmter Knochenzellen [9,100]. Bei diesen Knochenzellen handelt es sich um Osteoblasten, deren Aktivierung eine Zunahme der Knochendichte bedingt und altersbedingte Knochenabbauprozesse hemmt [67, 68, 79, 80]. Belegt ist dies dadurch, dass körperlich aktive Menschen eine höhere Knochenmasse und Knochendichte aufweisen [149], wie nicht aktive (z.B. Astronauten). Bei ihnen ist eine verminderte Knochenneubildung [13,150], sowie ein geringerer Gehalt an dafür benötigten Proteinen [15,99] zu beobachten. Als Empfänger und Überträger physiologischer Belastungssignale gelten die Osteozyten. Eine weitere Voraussetzung für eine entsprechende Reaktion des Knochens auf eine mechanische Belastung ist, dass physiologische Belastungsgrenzen nicht überschritten werden. Ist dies der Fall, kommt es zu einer Degeneration der Knochenstruktur [57].

Diese Phänomene zeigen, dass Knochen also auf Belastungsreize in bestimmter Form reagieren, was auch schon von Galileo Galilei (1564-1642) vor ca. 400 Jahren beschrieben wurde.

Verbunden ist diese Reaktion mit erhöhten Syntheseraten von Matrixproteinen und erhöhten Mitoseraten.

Um Verständnis und Einblick in die Knochenphysiologie zu bekommen, wurden in der Vergangenheit verschiedene Modelle entwickelt, angefangen bei Zellkulturen [156,159] über Organkulturen [17,70,116] bis hin zu Versuchen am Gesamtorganismus

[2,18,107,117,142]. Dabei wurden hydraulische Systeme, Hebel, Nockenwellen und Schrauben verwendet. Knochen wurde mechanisch stimuliert und die physikalischen Eigenschaften zu bestimmt [3, 40, 41, 77, 82, 118, 140, 144]. Engmaschige Kontrollen von Kraft und Kompression in Form von Echtzeitmessungen waren während dynamischer Belastung, bei einer Frequenz über 10Hz, in diesen Systemen aber nicht mehr möglich. Zudem konnten meist nicht alle Faktoren (Amplitude, Richtung, Art und Frequenz), die in der komplexen Natur der mechanisch dynamischen Belastung auftreten, imitiert werden. Tierversuche galten zu dem als äußerst schwierig und kostenträchtig.

Des weiteren nutzte man Dehnungsmessstreifen. Diese wurden am Knochen oder an Knochenstücken fixiert, um die elastische Kompression abzuschätzen bzw. berechnen zu können.

Durch diese Versuche konnten bereits einige wichtige Erkenntnisse über Knochen verzeichnet werden, doch die durch mechanische Belastung induzierten Veränderungen im Knochenmetabolismus, sowie in der Knochenmorphologie und die dahinter stehenden zellulären Mechanismen konnten dadurch noch nicht vollständig aufgeklärt werden.

Um den Knochen, welcher in seiner Struktur und seinen physikalischen Eigenschaften einer großen Variabilität unterliegt, mit definierten mechanischen Signalen zu belasten und alle schon erwähnten Parameter zu bestimmen, ist ein stabiles, präzises und sensibles Belastungs- und Messsystem notwendig.

Auf Grund der bisherigen Erkenntnisse wurde von Prof. D. B. Jones ein mechanisches Belastungs- und Messsystem in Kombination mit einer Kultur- und Belastungskammer entwickelt. Damit können *ex vivo* Studien unter definierten Bedingungen an trabekulären Knochen durchgeführt werden. Über das System können bestimmte Kompressionen und Kräfte auf den Knochen ausgeübt und gleichzeitig bestimmt werden. Zum jetzigen Zeitpunkt können Knochenproben im Frequenzbereich von 0,1 bis 50Hz dynamisch stimuliert werden. Die Genauigkeit der Kompression beträgt  $\pm 0,5 - \pm 1,5 \mu\text{strain}$ .

Auf diesem System basierend, können somit viele und genaue Messungen mechanischer Eigenschaften durchgeführt werden. Der integrierte piezo-elektrischer Aktor (PEA) kann zum einen mit periodischen Oszillationsmustern angeregt werden, bei simultaner Kraft- und Kompressionsbestimmung und zum anderen kann er quasi-statische Belastungen durchführen. So können Steifigkeit und physikalisch/physiologische

Änderungen am Knochen während der Kultivierung verfolgt werden. Zu den periodischen Oszillationsmustern gehören auch die Imitation von physiologischen Bewegungsabläufen, wie das Gehen oder das Springen. So wurden in der Vergangenheit schon die Unterschiede zwischen den Auswirkungen des Gehens und Springens demonstriert.

Dieser Versuch dient nun dazu, Erkenntnisse darüber zu erlangen, wie sich nun verschiedene Belastungsintensitäten auf die Knochenproben und deren Stoffwechsel auswirken und auch mögliche Grenzen des Systems aufzuzeigen.

Abb.1-1: *Der ZETOS*



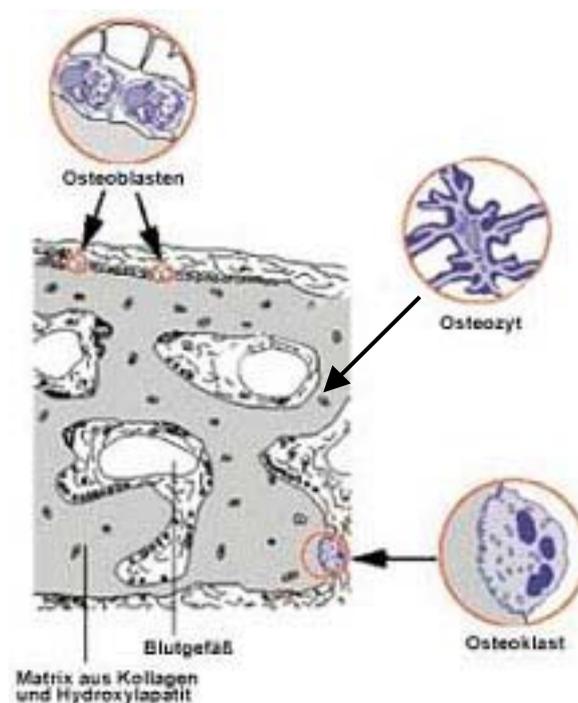
Das System trägt den Namen ZETOS [Smith E.L. and Jones D.B.: *Combined perfusion and mechanical loading system for explanted bone*. US patent 6171812; 2001] und besteht aus zwei Wortanteilen. Der griechische Buchstabe ζ (Zeta) wird manchmal als Symbol für *strain* ( $\Delta L/L_0$ , relative Kompression, s.o.) verwendet. Das lateinische Wort *os* bedeutet Knochen.



Erhaltung eines konstanten Kalziumspiegels im Blut. PTH wirkt über G-Protein gekoppelte Phospholipase C – Rezeptoren. Physiologische Konzentrationen zeigen anabole Effekte am Knochen durch Aktivierung der Phospholipase C [26,120], Stimulation der Osteoblastenproliferation [121] und Verstärkung des Antwortsignals auf mechanische Belastung [104].

Hohe Konzentrationen von PTH bewirken durch Osteoklastenaktivierung eine Kalziumfreisetzung aus dem Knochen, eine Verminderung der renalen Elimination und eine gesteigerte Resorption im Gastrointestinaltrakt. Thyreocalzitonin wirkt PTH-antagonistisch und reduziert die Osteoklastenzahl. 1,25-Dihydroxycholecalciferol bewirkt eine gesteigerte Kalziumresorption. Da diese Hormone in einem bestimmten Gleichgewicht zu einander stehen, resultieren aus Abweichungen dieses System meist schwere Störungen im Knochen- und Skelettaufbaus.

Abb.1-2: *Knochengewebe und Zellen*



## **1.3 Die Knochenzellen**

Bei den im Knochengewebe enthaltenen Zellen handelt es sich um Vorläuferzellen, Osteoblasten (OB), Osteozyten, Osteoklasten (OK), Bone-lining Zellen (BLZ), Monozyten, Fett- und Nervenzellen.

### **1.3.1 Die Osteoblasten**

Osteoblasten leiten sich von lokalen mesenchymalen Vorläuferzellen (Osteoprogenitorzellen) ab [134-136]. Eine Zwischenstufe in der Entwicklung stellen die Präosteoblasten dar.

Osteoblasten synthetisieren, sezernieren und formieren die unmineralisierte Knochenmatrix (Osteoid) und beteiligen sich bei der Kalzifizierung. Sie sind auch an der Regulierung des Kalzium- und Phosphathaushalts beteiligt. An der Oberfläche des trabekulären Knochens gelegen erscheinen sie als einschichtige Zelllinie. Die Osteoblasten sind über feine Zellfortsätze miteinander verbunden. Im aktiven Zustand, erscheinen sie in kuboidaler Form mit einer Dicke von 15-30µm [64,103]. Nichtaktive Osteoblasten erscheinen eher flach. Ihre Aktivität wird zum größten Teil über Hormone, wie z.B. das somatotrope Hormon (STH), und über Zellinteraktionen gesteuert.

Während der Synthesephase zeichnen sich die Osteoblasten durch einen prominenten Golgi-Apparat und ein gut entwickeltes raues endoplasmatisches Retikulum aus. Im Lichtmikroskop erscheinen sie basophil.

Während Osteoblasten aktiv sind, wird von ihnen alkalische Phosphatase (AP) sezerniert. Je höher die Freisetzung, desto höher die Aktivität. Dies ist vor allem während Wachstumsphasen und bei Frakturheilungen der Fall. Aufgabe der Alkalischen Phosphatase ist die Spaltung von anorganischen Pyrophosphaten [47,51], welche die Knochenmineralisierung hemmen können. Die PAS-positiven Granula im Zytoplasma der Osteoblasten enthalten aus heutiger Sicht neutrale Glykoproteine für die Knochengrundsubstanz. Die Sezernierung dieser und anderer Syntheseprodukte findet an der Kontaktstelle von Zelle und Knochenmatrix statt. Die zunächst noch nicht mineralisierte Grundsubstanz wird als Osteoid bezeichnet. Die Mineralisierungsdauer beim Erwachsenen beträgt ca. 10 Tage [16]. In zeitlich bestimmten Abständen lässt sich beobachten, dass die Osteoblasten in der sezernierten Matrix verbleiben und von ihr

umgeben werden. Diese in die Knochenmatrix eingemauerten Osteoblasten bezeichnet man jetzt als Osteozyten. Durch weitreichende Zellausläufer stehen sie einerseits in Kontakt mit anderen Knochenzellen und gewährleisten andererseits auch ihre Versorgung, da die Knochenmatrix nach der Mineralisation impermeabel geworden ist. Andere Osteoblasten wiederum gehen in den Ruhezustand über (Transformation zu Bone-lining Zellen) oder gehen durch Apoptose zu Grunde [84, 133, 146].

Neben den bereits erwähnten anorganischen Pyrophosphaten [10] existieren noch weitere Makromoleküle, welche die physiologische und pathologische Kalzifizierung, die Knochenmineralisierung und die Knochenresorption beeinflussen können. Dazu gehören Nukleosidtriphosphate [137], Pyrophosphatanaloga wie Bisphosphonate [33] und andere anionische Proteine [105]. Bisphosphonate hemmen z.B. die Knochenresorption.

Osteoblasten können durch Sezernierung von Kollagenasen, Metalloproteasen und Plasminogen-Aktivatoren die Knochenresorption durch Osteoklasten initiieren. Sie entfernen die schützende Kollagenschicht von der Knochenoberfläche, wonach Osteoklasten wirksam werden können [6, 64, 75].

### **1.3.2 Die Osteozyten**

Osteozyten kommen im adulten Knochen am häufigsten vor. Sie entsprechen postmitotischen [160] muren Osteoblasten [86,94] und weisen eine mandelartige Form mit dendritischen Ausläufern auf. Sie wurden im Zuge der Knochenbildung in die mineralisierte Matrix eingebaut. Während dieser Differenzierung in Osteozyten gehen viele osteoblastische Zellorganellen verloren. Demnach besitzen Osteozyten eine geringere Zellaktivität. Sie sind flach und haben weniger raues endoplasmatisches Retikulum und einen kleineren Golgi-Apparat. Der Kern ist dicht und chromatinreich. Die Osteozytenzahl ist etwa 10mal höher als die der Grundsubstanzbildenden Osteoblasten [98]. Vitale Osteozyten sind in der mineralisierten Knochensubstanz schichtweise eingebaut. Da diese impermeabel ist, bilden Osteozyten filopodienartige Fortsätze aus. Die Fortsätze liegen in feinen Knochenkanälchen und dienen der Kommunikation und dem Stoffaustausch zwischen den Osteozyten. Sie sind über gap junctions miteinander verbunden [24,52]. In den ausgebildeten Fortsätzen können Ionen und kleine Moleküle über etwa 15 Zellen transportiert werden. Zudem vergrößern sie

die Zelloberfläche. Aus der vergrößerten Zelloberfläche leitet sich eine der Hauptaufgaben der Osteozyten, nämlich die der Mechanotransduktion ab [8,19]. Dieser Sachverhalt wurde in mehreren Studien bestätigt. [66,100,107,108,122]

Gegenstand derzeitiger Forschung ist die Untersuchung der Kontakte zwischen den Osteozyten einerseits, sowie den Bone-lining Zellen und Osteoblasten andererseits. TURNER et al. (2002) beschrieben diesen Kontakt als eine Art neuronales Netzwerk, in welchem Glutamat als Transmitter eine entscheidende Rolle spielen soll. Eine von Osteozyten registrierte Stressbelastung könnte dann über Signaltransduktion an Osteoblasten und Bone-lining Zellen weitergeleitet werden und eine entsprechende Reaktion an diesen Zellen induzieren. Des weiteren unterscheidet man die Osteozyten noch funktionell in osteoblastische und osteolytische Osteozyten.

In **Osteoblastischen Osteozyten** wurde durch histochemische Untersuchungen protein- und glykoproteingebundenes Kalziumphosphat nachgewiesen. Da Kalzium und Phosphat dem Aufbau der interzellulären Hartschubstanz dienen, wird diesen Osteozyten eine Aufgabe bei der Erhaltung der mineralisierten Knochenmatrix zugeschrieben.

**Osteolytische Osteozyten**, welche eher in den tieferen Schichten der Knochenmatrix zu finden sind, weisen einen hohen Gehalt an Lysosomen auf. Damit sind sie in der Lage Hartschubstanz abzubauen und Kalzium aus dem Knochen freizusetzen. Dieser Mechanismus spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Kalziumhaushalts.

Das Altern, der Verlust an Östrogen und chronische Glukocortikoidwirkung führen zu einem Anstieg der Apoptoserate bei Osteozyten. Gehen Osteozyten zu Grunde wird auch die umgebende Knochenmatrix abgebaut. Dies ist ein wichtiger Punkt in der Osteoporoseforschung. Östrogen schützt Osteozyten und mechanische Belastung führt zu einer Reduktion der Apoptoserate. [28,33,83,84,132,146].

### **1.3.3 Bone-lining Zellen (BLZ)**

BLZ sind morphologisch betrachtet, begrenzende flache Zellen von länglicher Gestalt. Sie befinden sich über dem neugebildeten Osteoid und über der mineralisierten Knochenmatrix. BLZ sind organellenarm, was den Schluss zulässt, dass sie eher inaktiv

sind. Es wird die Annahme vertreten, dass es sich um ruhende Osteoblasten handelt, die auch wieder in den aktiven Zustand übergehen können. Ihnen wird eine Schlüsselrolle zur Lokalisation und Initiation eines bevorstehenden Knochenumbaus zugeschrieben [21,157]. Weiterhin dienen sie als Barriere für Kalziumionen [97] und erhalten ein spezielles knocheninternes Milieu aufrecht [106].

### **1.3.4 Die Osteoklasten**

Der Knochenumbau ist eng mit dem Abbau von vorhandenem Gewebe verbunden. Dies ist die Aufgabe der Osteoklasten, welche sich aus mononukleären Vorläuferzellen (granulocyte and macrophage colony-forming units „CFU-GM“) [18, 23, 44] entwickeln und somit Abkömmlinge des hämatopoetischen Systems sind [48]. Die Differenzierung der Osteoklastenvorläuferzellen wird durch osteoblastische Zellen und deren Zell-Zell-Interaktionen moduliert und induziert. Diese osteoblastischen Zellen bilden Differenzierungsfaktoren als Antwort auf osteotrophische Hormone und Zytokine. Weiterhin schütten sie lösliche Faktoren wie M-CSF (macrophage colony stimulating factor) [138,154] und Komplement C3 (durch 1,25-Dihydroxycholecalciferol reguliert) [45, 56, 108] aus und regulieren so die Entwicklung der Osteoklasten. Für Migration, Chemotaxis [37] und das Überleben reifer Osteoklasten [55] spielt M-CSF eine weitere wichtige Rolle.

Osteoklasten imponieren als große verzweigte Zellen mit einem acidophilen Zytoplasma. Sie können von 1 bis über 50 Zellkerne enthalten, die an der zur Knochenoberfläche abgewandten Seite lokalisiert und durch Zytoskelettproteine miteinander verbunden [80] sind. Osteoklasten legen sich mit Hilfe von Podosomen an der Trabekeloberfläche an und können dabei andere Osteoklasten und auch Osteoblasten überlagern. Meist sind Osteoklasten in Howship-Lakunen zu finden. Dies sind Buchten in der Knochenmatrix, welche durch vorhergehende Resorption, durch eben diese Zellen, entstanden sind. Auf Grund ihrer Größe kann man Bereiche finden, an denen aktiv Knochen resorbiert wird und Bereiche die inaktiv sind. Wenn Osteoklasten resorbieren, erscheint die dem Knochen zugewandte Seite stark aufgefaltet, verzweigt und in ständiger Bewegung. Dies konnte mittels der Rasterelektronenmikroskopie dargestellt werden. Die Auffältelung bezeichnet man auch als „ruffled border“ und dient der Oberflächenvergrößerung der aktiv resorbierenden

Abschnitte. Die Signale, die zur Auswahl eines bestimmten Knochenabschnitts führen, sind noch nicht bekannt. Die genaue Wirkungsweise der Osteoklasten ist noch nicht vollständig erforscht. In den Howship-Lakunen besteht ein saures Milieu mit einem pH-Wert von etwa 3,5 [11, 12, 24, 143]. Die notwendigen  $H^+$ -Ionen entstehen über eine Karboanhydrase im Osteoklastzytoplasma und werden mit Hilfe einer Membran-ATPase in den zu resorbieren Abschnitt gepumpt. Zusätzlich werden noch verschiedene Enzyme freigesetzt. Dazu gehören lysosomale Proteinasen, speziell Kathepsin K [39, 81, 123, 158], saure Phosphatasen und Matrixmetalloproteinasen. Blockiert man zum Beispiel Kathepsin K, so kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Knochenresorption [124, 126]. Damit bei diesem Vorgang umliegendes Gewebe nicht geschädigt wird, schließt der Osteoklast mittels seiner „ruffled border“ den Resorptionsraum dicht ab.

Auch Osteoblasten und Bone-lining Zellen sind aktiv an der Knochenresorption beteiligt. Sie beseitigen mittels saurer Hydrolasen, welche über Exozytose in den Extrazellularraum abgegeben werden, die schützende Osteoidschicht über der mineralisierten Matrix. Des weiteren resorbieren Osteoblasten offenbar kalziumhaltige Kristalle, welche zwischen den Auffaltungen des Osteoklasten hervor treten. In sekundären Lysosomen werden diese weiter abgebaut und gespalten. Einige Spaltprodukte werden in benachbarte Gefäße abgegeben.

Ein Osteoklast kann innerhalb einer bestimmten Zeiteinheit die gleiche Menge an Knochensubstanz abbauen, die von ca. 150 Osteoblasten aufgebaut wurde.

Osteoprotegerin (OPG), RANKL (NF-Kappa B Ligand) und dessen Rezeptor RANK nehmen ebenfalls Einfluss auf die Aktivität von Osteoklasten. Das OPG, auch bekannt unter Osteoclast Inhibiting Factor, hemmt die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten [46,125] und scheint die Expression von Kathepsin K zu hemmen, welches als wichtigstes Enzym der Knochenresorption gilt [147].

Im Gegensatz dazu ist RANKL ein wichtiger Faktor im Hinblick auf Formation, Fusion, Aktivierung und Lebensdauer von Osteoklasten. Er wird von Osteoblasten und T-Lymphozyten produziert und führt dementsprechend zu Knochenresorption und Substanzverlust. RANKL aktiviert einen speziellen Rezeptor (RANK), der auf Osteoklasten und dendritischen Zellen exprimiert ist. OPG kann die Effekte des RANKL neutralisieren [43,127].

### 1.3.5 Beziehung zwischen den Knochenzellen

In diesem Abschnitt soll noch einmal ein Überblick über das Zusammenwirken und die Beziehung zwischen den Knochenzellen gegeben werden.

Die Entwicklung von Osteoblasten und Osteoklasten ist unmittelbar miteinander verbunden. Beide Zelltypen stammen von Vorläuferzellen ab, welche im Knochenmark ihren Ursprung haben. (Osteoblasten von multipotenten mesenchymalen Stammzellen, Osteoklasten von hämatopoetischen Stammzellen der Monozyten-Makrophagen-Reihe). Die Differenzierung zu Osteoblasten wird durch BMP's (Bone Morphogenic Proteins) und TGF- $\beta$  initiiert [1, 63, 75]. Diese BMP's stimulieren die Expression des Osteoblasttranskriptionsregulators Cbfa1/Osf2 [22] in den Osteoblastvorläuferzellen, welche wiederum osteoblastspezifische Gene und Osteoklast-Funktionsfaktoren aktivieren. Zuletzt spielen der Osteoclast differentiation factor (ODF/OPG-L) und der Osteoclast inhibiting factor (OCIF/OPG) und die Bindung dieser Faktoren an Osteoklastvorläuferzellen eine Rolle bei der Differenzierung, Fusion, Aktivierung und bei der Apoptose von Osteoklasten. Das Zusammenwirken der BMP – Cbfa1 – ODF/OPG-L und OCIF/OPG-Genexpression ist die molekulare Basis der Osteoblast-Osteoklast-Verbindung [72].

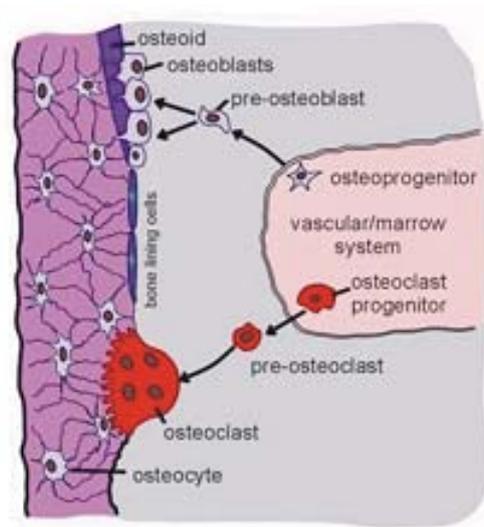
Die Beziehung zwischen Osteoblasten, Osteozyten und Bone-lining Zellen (BLZ) wurde mit radioaktiv markierten Substanzen ( $^3\text{H}$ -Thymidin) an jungen Tieren untersucht, deren Knochenzellen schnell proliferieren. Dabei konnte nicht festgestellt werden, ob diese Zellen teilungsfähig sind.

Beteiligen sich Osteoblasten nicht aktiv an der Knochenformation, flachen sie ab und bedecken die Knochenoberfläche. In diesem Stadium werden sie auch als BLZ bezeichnet. Dabei besteht eine Verbindung zwischen den einzelnen BLZ und oberflächennahen Osteozyten über gap junctions. BLZ leiten sich von Osteoblasten ab. Möglicherweise stammen sie von deren Vorläuferzellen ab. BLZ können sich zum einen zu Osteoblasten zurückentwickeln und zum anderen auch in den Stammzellpool bzw. Vorläuferzellpool zurückkehren oder unterliegen der Apoptose. Das Proliferations- und Differentiationspotential von BLZ unter normalen physiologischen Bedingungen ist aber bisher noch nicht ausreichend verstanden.

Verbleiben Osteoblasten in neu gebildeter Matrix, bei fortschreitender Osteoidbildung, differenzieren sie zu Osteozyten, u.a. durch den Verlust zahlreicher Zellorganellen. Werden diese Osteozyten durch Umbauvorgänge wieder freigelegt, können auch sie

sich wieder in Vorläuferzellen differenzieren oder auch unabhängig von einer Freilegung durch Apoptose zu Grunde gehen.

Abb.1-3: Schematische Darstellung der Knochenzellen und Ursprung



©University

Orthopaedics,

Southampton,

UK

## 1.4 Wachstumsverhalten von Knochen

### 1.4.1 Wachstum und Modeling

Das Knochenwachstum und die Anpassung der Form und Struktur (Modeling) stehen in unmittelbarem Zusammenhang [5, 29, 32, 49, 50]. Dabei unterteilt sich das Modeling in Resorptions- und Formationsabschnitte, bei dem Knochen über weite Abschnitte entweder resorbiert oder an- bzw. umgebaut wird. Während des Wachstums, wird periostaler Knochen schneller angebaut als endostaler abgebaut wird. Das Modeling kontrolliert das Wachstum, Form, Größe, Festigkeit und Anatomie von Knochen und Gelenken. Es führt zum Wachstum des äußeren Kortex, zur Vergrößerung der Markhöhle und zur Formung der langen Enden der Knochen. Das Modeling führt nicht nur zur Entwicklung einer normalen Architektur während des Wachstums, sondern passt die Architektur und Knochenmasse auch der sich ständig ändernden mechanischen Belastung an. Bei einer Belastungsintensität von 1000-1500 $\mu$ strain ist der Modeling-Grenzwert (bei jungen Erwachsenen) MES (minimum effective strain) erreicht und es werden Formationsvorgänge in Gang gesetzt. Diese Angaben beziehen sich auf die Mechanostat-Hypothese von FROST [30,31]. Bei darunter liegenden Intensitäten bleiben die Formationsvorgänge inaktiv.

### 1.4.2 Remodeling

Dieser Vorgang produziert und erhält Knochen, welcher für Biomechanik und Metabolismus verantwortlich ist. Da der Knochen von Erwachsenen mit der Zeit an Qualität verliert, muss er regelmäßig ersetzt bzw. erneuert werden (bone turnover). Dies beinhaltet v.a. trabekuläre Knochenresorption gefolgt von Trabekelformation mit Erhöhung oder Absenkung der Knochendichte.

Die normalen Raten des bone turnover betragen bei Erwachsenen für kortikalen Knochen im Mittel 20 Jahre und für trabekulären Knochen zwischen 1 bis 4 Jahre. [91]. Dabei hat das Remodeling positive und negative Effekte. Die positiven Effekte sind die Beseitigung von Mikrofrakturen, der Ersatz von totem, hypo- oder hypermineralisiertem Knochen und die Anpassung der Mikroarchitektur an lokalen Belastungsstress. Als

nachteilig können sich eventuell zerstörte Trabekel und poröser kortikaler Knochen mit sinkender Knochenfestigkeit herausstellen, da dabei Schäden durch eine Fehlregulation des nachfolgenden Ablaufschemas des Remodeling entstehen können.

Die Knochenzellen, die an diesem Prozess beteiligt sind werden auch als BRU (bone remodeling unit) oder als BMU (basic multicellular Unit) bezeichnet. Diese unterliegen einem Zyklus, welcher aus 6 Phasen besteht. Dabei handelt es sich um die Ruhe-, Aktivations-, Resorptions-, Umkehr-, Formations- und Mineralisationsphase. Sie können an jeder Stelle des Knochens ihre Arbeit aufnehmen [93]

### ***Die Ruhephase***

80% des trabekulären Knochens befindet sich in der Ruhephase. BMU's sind nicht ständig aktiv, können aber jederzeit aktiviert werden. Der Knochen ist mit Bone-lining Zellen und mit einer endostealen Membran, bestehend aus Kollagen und wenig mineralisierter Grundsubstanz, bedeckt [74]

### ***Die Aktivierungsphase***

Wie die Aktivierung der BMU's abläuft ist noch nicht genau erforscht, man glaubt aber, dass lokale strukturelle oder biomechanische Veränderungen Einfluss nehmen. Der Remodeling-Zyklus verlangt die Rekrutierung von Osteoklasten und deren ungehinderten Zugang an die Knochenoberfläche. Eine Ausbildung von Blutgefäßen, sowie die Migration der Osteoklasten ist Voraussetzung dafür [49]. Dazu kommt die Verdauung der endostealen Membran durch Bone-lining Zellen. Die Freilegung der mineralisierten Matrix hat chemotaktische Wirkung auf Osteoklastvorläuferzellen [14, 73, 92, 103].

### ***Die Resorptionsphase***

Kommen nun die eingewanderten Osteoklasten mit der mineralisierten Matrix in Kontakt, beginnen sie diese zu erodieren. Die dabei entstehenden Mulden werden in trabekulären Knochen auch als Howship-Lakunen bezeichnet. Bei kortikalem Knochen werden sie auch als Resorptionshöhlen oder „cutting cones“ bezeichnet. Die Howship-

Lakunen können bei einer Resorptionsdauer von 1-3 Wochen eine Tiefe von 60 $\mu$ m erreichen [29].

### ***Die Verzögerungsphase***

Sie ist eine Intervallphase zwischen kompletter Resorption und beginnender Formation. Die Howship-Lakunen weisen keine Osteoklasten mehr auf, sondern nur noch mononukleäre Zellen bisher unbekannter Herkunft und Funktion [7]. In dieser Phase erfolgt auch die Aktivierung der Osteoblasten. Über den genauen Ablauf ist man sich nicht sicher. Zum einen wird die Wachstumsfaktorthese vertreten, bei welcher Osteoblast-stimulierende Faktoren, wie IGF I und II, TGF- $\beta$  und FGFs von der BMU freigesetzt werden. Zum anderen glaubt man, dass sich Osteoblastvorläuferzellen am Rand der BMU auf Grund von Zelloberflächenmolekülen versammeln und entsprechend aktiviert werden [73, 102, 103].

### ***Formations- und Mineralisationsphase***

Zuerst beginnen die neu eingewanderten Osteoblasten Osteoid abzulagern und zwar solange bis die Lakune annähernd vollständig aufgefüllt ist. Nach ca. 5-10 Tagen ist bis zu 70% des Osteoids mineralisiert. Nach einer Dauer von 3-6 Monaten ist die Mineralisation komplett [27, 32, 49, 93, 101]. Morphologisch erscheinen die Osteoblasten groß und plump. Im Zuge der Osteoidablagerung flachen sie ab und werden zu Bone-lining Zellen. Die formierenden Osteoblasten weisen alle das gleiche Alter auf. Neu einwandernde Osteoblasten warten am Rand der BMU auf deren fortschreiten.

Das Remodeling bezieht sich im Gegensatz zum Modeling auf kleinste kortikale und trabekuläre Knochenabschnitte. Es führt zu Auflagerungen und Dichtezunahmen besonders an trabekulären Knochen. Der Remodeling-Grenzwert (MESr) liegt nach FROST [30,31] unter 200 $\mu$ strain. Der physiologische Ablauf des Remodeling und die Funktionsweise der BMU wurden mit tetrazyklinmarkierten Knochenbiopsien dargestellt. Die Arbeiten von FROST und PARFITT [35, 36, 96] seien dabei besonders erwähnt.

Was die Betrachtung der Mineralisierung mittels fluoreszierender Farbstoffe angeht, ergeben sich auf Grund der Erkenntnisse der Formations- und Mineralisationsphase einige Probleme. Zum einen ist es möglich, dass sich die Farbstoffe nicht mit dem Osteoid verbinden und zum anderen könnte die Mineralisation noch nicht begonnen haben [90]. Ein weiteres Problem ist die These einer diskontinuierlichen Osteoidbildung [34], was mehrere Studien an Mensch und Tier mit hohen Verlusten an Fluoreszenzmarkierungen untermauern.

## **1.5 Knochenzell- und Vitalitätsmarker**

### **1.5.1 Die alkalische Phosphatase (AP)**

Die AP ist ein zur Gruppe der Hydrolasen gehörendes Enzym, welches organische Phosphorsäuremonoester in ihre Komponenten spaltet. Das pH-Optimum der AP liegt bei 7-8. Der Hauptanteil der im Serum vorkommenden AP entstammt aus der Leber und dem Skelettsystem. Bei 25 % der Gesunden kommt auch eine Dünndarm-AP vor, welche 10 % der Gesamt-AP ausmacht.

Eine Erhöhung kann physiologisch bedingt sein oder Kennzeichen einer Leber- oder Skeletterkrankung sein. Physiologisch erhöhte Werte finden sich bei Schwangerschaften, in der Wachstumsphase (Kinder und Jugendliche), bei Heilungsprozessen von Frakturen oder nach Mahlzeiten. Letzteres ist meist bei Personen mit den Blutgruppen B oder 0 der Fall, welche Lewis-positiv sind und eine Sekretion der H-Blutgruppensubstanz aufweisen (Dünndarm-AP). Kinder und Jugendliche haben im Vergleich 1,5- bis 2fach höhere AP-Werte im Serum. Hepatobiliäre oder pankreatische Erkrankungen, primäre oder sekundäre Osteopathien sowie neoplastische Erkrankungen mit Skelettbeteiligungen können zu einer pathologischen AP-Erhöpfung führen. Erniedrigte AP-Konzentrationen findet man eher selten. Als Beispiel sei hier die Hypophosphatämie angegeben.

Wie bei der Laktatdehydrogenase kommen auch bei der AP verschieden Isoenzyme und Isoenzymvarianten vor, wobei die Knochen-AP und Leber-AP zu den Wichtigsten zählen. Sie geben zum Beispiel Auskunft über das Ausmaß einer Gewebeschädigung bei hepato-biliären Defekten, über die Stoffwechselaktivität des Skelettsystems bei

metabolischen Erkrankungen (Osteomalazie, Rachitis, postmenopausale Osteoporose) oder über das Wachstum malignen Gewebes (Isoenzymhöhung auf Grund einer Hyperexpression bestimmter Gene).

Da die AP auch von Osteoblasten gebildet und sezerniert wird, gibt sie gleichzeitig über deren Aktivitätszustand Auskunft. Beispiel gebend sei hier der Morbus Paget. Osteoblasten versuchen hierbei resorbiertes Knochengewebe wieder aufzubauen, welches durch permanente unkontrollierte Osteoklastentätigkeit resorbiert wurde. Weitere Krankheiten sind die Vitamin D Mangelrachitis und metastatische Prozesse. Liegt zusätzlich eine Lebererkrankung vor muss die knochenspezifische AP bestimmt werden.

Metabolische Erkrankungen, wie der Hyperparathyreodismus, Osteoporose und osteopenische Osteopathien zeigen in der Gesamt-AP nur gelegentlich einen erhöhten Wert. Deshalb sollte hier, wie auch in den oben beschriebenen Fällen, neben der Gesamt-AP auch die knochenspezifische AP bestimmt werden. Neben der diagnostischen Bedeutung kann dabei auch der Verlauf beurteilt werden und eine prognostische Aussage getroffen werden. Gelegentliche AP-Erhöhungen werden bei Knochenheilungsprozessen, z.B. nach Frakturen, als Zeichen erhöhter Osteoblastenaktivität gefunden [88].

### 1.5.2 Die Laktatdehydrogenase (LDH)

Die LDH kommt in fast allen Zellen des Körpers vor und ist im Zytoplasma lokalisiert. Eine gewisse Grundaktivität findet sich auch im Serum. Die LDH ist ein tetrameres Enzym, welches in 5 verschiedenen Isoenzymen vorkommt. Im Herzmuskel, in der Niere und in den Erythrozyten dominieren die Isoenzyme LDH-1 und LDH-2. LDH-4 und LDH-5 bestimmen den Skelettmuskel- und Lebergehalt.

Diese Isoenzyme unterscheiden sich durch ihre Substratspezifität sowie durch ihre Kinetik bei niedrigen Pyruvatkonzentrationen. Die LDH dient der Reduktion von Pyruvat zu L-Laktat.



Als Reduktionsmittel dient NADH, das dabei zu  $\text{NAD}^+$  reoxidiert wird. Es erfolgt in diesem Schritt also die Regeneration des für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase benötigten  $\text{NAD}^+$ . Dies erlaubt, dass die Glykolyse auch bei vollständigem Sauerstoffmangel ablaufen kann.

Bei einem Zellmembrandefekt oder bei einem minimalsten Gewebsschaden (Infektion, Hypoxie) kann das Enzym bereits ins Plasma übertreten. Auch bei pathologischen Zuständen finden sich erhöhte Plasmaspiegel. Da die Konzentrationen der LDH in den Geweben ca. 500mal höher liegen als im Plasma, erklärt dies, dass es schon bei kleinsten Schäden zu einer Konzentrationserhöhung im Serum kommt. Da die LDH in allen Geweben vorkommt, besonders erwähnt seien hier noch einmal die Leber, Herz- und Skelettmuskel und Niere, kann sie nicht als spezifischer Marker bei der Verlaufsbeurteilung eines bestimmten Gewebsschadens herangezogen werden. Der Schwerpunkt der LDH-Bestimmung liegt also im erkennen eines Zell- oder Gewebeschadens, so wie in diesem Versuch als Untergangsmarker für Knochenzellen.

### **1.5.3 Prostaglandine (PG) und Knochenstoffwechsel**

PG gehören zur Gruppe der Fettsäuren und werden, wegen ihrer Wirkung auf den Zellstoffwechsel in geringsten Konzentrationen, zu den Gewebshormonen gerechnet. Sie werden auch als Eikosanoide bezeichnet, da sie aus 20 C-Atomen und aus einem Ring von 5-Atomen bestehen. PG kommen überall im Körper vor und entstehen aus Arachidonsäure, einer der wichtigsten in Zellmembranen gespeicherten essentiellen Fettsäuren sowie anderen ungesättigten Fettsäuren. Sie modulieren eine große Zahl hormoneller und andersartiger Stimuli. Darüber hinaus spielen sie eine wichtige Rolle bei Überempfindlichkeits- und Entzündungsreaktionen. Durch die Wirkung einer Phospholipase  $A_2$  wird aus arachidon- und fettsäurehaltigen Membranphospholipiden Arachidonat (Eikosatetraensäure) abgespalten.

Für einen weiteren Syntheseschritt werden Cyclooxygenasen (COX) benötigt, die in drei Unterformen vorkommen (COX1, COX2, COX3).

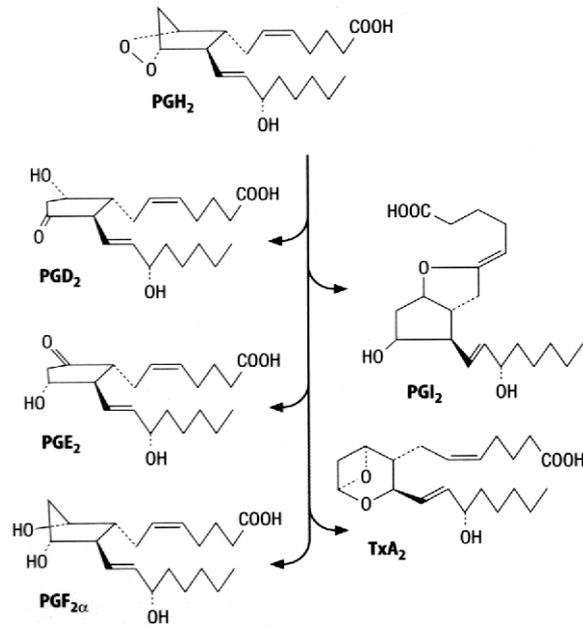
COX1 kommt in vielen Zellen des Körpers vor und ist ständig aktiv. Die Aktivität der COX2 wird von Zytokinen aus Leukozyten und Makrophagen, speziell bei Entzündungsreaktionen, induziert. Hauptsächliche Bedeutung im ZNS und Herz hat die

COX3. Sie ist derzeit Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Ihre Blockade durch Acetaminophen wirkt antipyretisch und analgetisch [20].

PG werden in Hauptklassen von PGA bis PGI unterteilt. Zuerst entsteht PGH<sub>2</sub> aus welchem sich die anderen Prostaglandine ableiten. Ein zusätzlicher Index ist die Anzahl der C-Atome außerhalb des Kohlenstoffrings. Auf Grund des raschen enzymatischen Abbaus wirken PG's nur lokal. Ihre Wirkung vermitteln sie über Oberflächenrezeptoren auf den Zellen. Da sie nicht gespeichert werden können, werden sie fortlaufend sezerniert.

Durch bestimmte Stimulationen aktivierte Zellen zeigen eine erhöhte PG-Syntheserate. Neben dem Einfluss auf Entzündungsreaktionen und Gefäßkontraktilität, wurden bei in vivo und in vitro Versuchen auch Einflüsse auf den Knochenstoffwechsel festgestellt, besonders durch PGE<sub>2</sub>. So konnte der Knochenaufbau von Ratten durch exogen zugeführtes PGE<sub>2</sub> angeregt aber auch gehemmt werden [53, 54, 69, 76, 95, 139, 141, 148, 155]. Dieser Sachverhalt konnte auch bei Zellkulturen nachgewiesen werden [113,114]. Auch bei der Knochenresorption wurden fördernde und hemmende Effekte beobachtet [89]. Jüngste Veröffentlichungen weisen darauf hin, dass exogen zugeführtes und das durch mechanisch belastete Zellen ausgeschüttetes PGE<sub>2</sub> zu einer Stimulation des Knochenstoffwechsels führt [16, 61, 159]. Zum einen könnte dies durch direkte Stimulation der Osteoblasten oder der Osteoblastenvorläuferzellen geschehen und zum anderen über Aktivierung des Remodelingprozesses durch Osteoklastenstimulation.

Abb.1-4: Dargestellt sind das Prostaglandin  $H_2$  und sich daraus ableitende Prostaglandine



©Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie

## **1.6 Die polychrome Sequenzmarkierung**

Um nach einem Experiment mit mechanischer Belastung von Knochen die erfolgten Knochenumbau- oder Neubildungsprozesse mikroskopisch bzw. graphisch darzustellen, wird die polychrome Sequenzmarkierung angewandt. Dabei kommen so genannte Fluochrome zum Einsatz, welche während des Experiments angewandt werden. Diese Farbstoffe bilden mit Kalzium einen Chelatkomplex [82], welcher in den mineralisierten Knochen eingebaut wird. [78, 109-111, 128]

Mikroskopisch, unter dem Einsatz von ultraviolettem Licht, leuchten diese Komplexe in der Farbeigenschaft des Fluochroms. Durch Gabe mehrerer dieser fluoreszierenden Farbstoffe in bestimmten Zeitabständen kann somit der zeitliche Ablauf der Knochenmineralisation nachvollzogen werden. Rückschlüsse auf die Dynamik der Knochenneubildung werden damit möglich.

Eingesetzte Farben, wie das Kalzeingrün oder das Xylenorange, erfüllen das allgemeine Gebot, keine lokale bzw. generelle Toxizität zu besitzen, welche die Knochenbildung und somit Versuche beeinflussen könnte. Außerdem werden sie bei der späteren Fixierung und Einbettung in Methylmethacrylat nicht verändert. Die intravital markierten Knochen können nach Ende des Versuches trotzdem mit histologischen Färbungen versehen werden [87].

Schon im Jahre 1958 wurde von MILCH beschrieben, dass sich Tetrazyklin im lebenden Knochen ablagert und als gelbliche Farbbande erscheint. Das Xylenorange, welches sich orange darstellt und das als rot imponierende Alizarin wurden von RAHN und PERREN eingeführt [112]. SUZUKI und MATHEWS etablierten das Kalzein, das eine leuchtend grüne Bande hervorruft. In diesem Versuch wurden Kalzein und Alizarin verwendet.

## **1.7 Apoptose**

Für das Leben ist der Zelltod mindestens genauso wichtig wie Zellteilung und Wachstum, denn das Verhältnis zwischen Zellproliferation und Zelltod muss im Gleichgewicht gehalten werden. Man unterscheidet beim Zelltod die Nekrose und die Apoptose.

Nekrose ist die nicht spezifische Art des Zelltods und wird unter physiologischen Bedingungen nur durch das Komplementsystem oder durch eine Infektion mit lytischen Viren ausgelöst. Des weiteren führen exogene Einflüsse wie Vergiftungen, Verbrennungen oder mangelnde Sauerstoffversorgung, durch den Angriff der Plasmamembran und den daraufhin folgenden Austritt von lytischen Enzymen, zur Nekrose. [25]

Der Apoptose von Zellen im Organismus wird eine weit größere Bedeutung zugeschrieben. Sie spielt schon während der Embryonalentwicklung bei der korrekten Ausbildung von Händen und Füßen eine wichtige Rolle, in dem das zwischen den Fingern und Zehen befindliche Gewebe entfernt bzw. aufgelöst wird, was sich ursprünglich zu Schwimmhäuten entwickelt hätte. Weitere Beispiele sind die Elimination von funktionslosen Neuronen oder autoreaktiver T-Lymphozyten.

Apoptose stammt aus dem Griechischen und setzt sich aus den Wörtern apo (ab, weg, los) und ptosis (Senkung) zusammen. 1842 beschrieb Vogt erstmals morphologisch dieses Phänomen, was sich seit dem zu einem umfangreichen Forschungsgebiet entwickelt hat. Publierte Zusammenfassungen von Glucksmann 1951 benutzen die Umschreibung programmierter Zelltod. Erst 1972 wurde der Begriff Apoptose von KERR et. al [62] eingeführt.

Apoptose ist in fast jeder Körperzelle möglich [58,152] und soll autonome Zellwucherung (Tumor) verhindern, sowie alte und kranke Zellen beseitigen. Besonders genannt seien hier Zellen mit einer hohen Teilungsrate, z.B. Haut-, Darm-, Uterusschleimhaut-, Brustdrüsen- und Prostatazellen sowie Zellen des blutbildenden Systems.

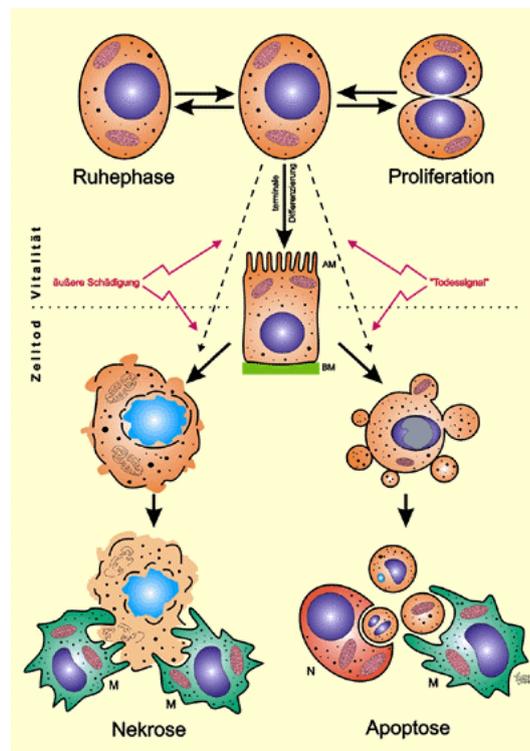
Im Jahre 1977 wurden beim Fadenwurm *C. elegans* die ersten verantwortlichen Gene [130] für Apoptose und 1988 das erste antiapoptotische Protein (*bcl2*) gefunden.

Es gibt eine Vielzahl an Auslösern und Induktoren des apoptotischen Zelltods [Li and Yuan 1999]. Dies können neben dem Tumornekrosefaktor (TNF) oder dem Liganden

des APO-1/CD95-Rezeptors [71] auch Gamma- oder UV-Strahlen, Chemotherapie, freie Radikale, Wasserstoffperoxid, Hitzeschock sowie Schädigungen der DNA sein [25]. Auf Grund dessen gibt es womöglich auch viele unterschiedliche auf diese Stimulation folgende Signaltransduktionswege. Bisher sind zwei davon detailliert erforscht. Der eine Weg beschreibt die Aktivierung der Apoptose in der Zelle durch die Proteinfamilie der TNF-Rezeptoren (tumor necrosis factor receptors). Die Bindung des Liganden an den Rezeptor führt zur Aktivierung einer Signalkaskade im Zellinneren, die über eine Aktivierung von Kaspasen die Apoptose im Zellkern auslöst [131,151]. Dabei handelt es sich um den extrinsischen Weg.

Der intrinsische Weg wird durch die Freisetzung von Proteinen (z.B. Cytochrom c) aus den Mitochondrien eingeleitet, welche dann, mit dem Protein Apaf1 verbunden, zu einer Aktivierung des Kaspasensystems führen [42,119]. Dies führt zur Spaltung von Zytoskelettproteinen, Adhäsionsmolekülen und Laminen. Lamine stützen die Kernmembran und binden Nukleasen, welche freigelegt, die DNA angreifen und spalten. Der Angriff auf Adhäsionsmoleküle führt zur Lösung der Zelle aus dem Zellverband [25]. Diese Mechanismen, sowie die Umverteilung negativ geladener Phospholipidmoleküle an die Außenseite der Zellmembran führen zu Ausstülpungen der Membran [membran blebbing], welche sich zu Vesikeln abschnüren (apoptotic bodies) und von Makrophagen aufgenommen und verdaut [145] werden. Im Gegensatz zur Nekrose gelangt also kein Zellinhalt unkontrolliert in den Extrazellularraum, was zu einer Entzündungsreaktion führen kann.

Abb.1-5: *Gegenüberstellung der Morphologie von Apoptose und Nekrose*  
(©Boeringer Mannheim)



Morphologisch schrumpft die Zelle, durch Verringerung des Volumens bei intakten Organellen. Es kommt zur Karyopyknose (Kernschrumpfung) und Chromatinverdichtung [129] mit anschließender Spaltung der DNA in Fragmente (Karyorrhesis) und vollständiger Auflösung des Kerns mit Verlust der Basophilie (Karyolyse).

Die in den apoptotic bodies enthaltenen DNA-Fragmente besitzen ca. 180-200 Basenpaare [85,153]. Die Dauer eines Apoptosevorgangs in vivo beträgt 6-24 Stunden, wobei es zeitliche Variationen zwischen den Zelltypen gibt [4].

## 1.8 Die Steifigkeit / E-Modul

Um die Steifigkeit von Knochen messen zu können, wird eine quasi-statische Belastung durchgeführt, bei der die Kraft langsam auf 300 – 1000 N über 30 Sekunden ansteigt. Der piezo-elektrische Aktor wird dabei mit einer kontinuierlich ansteigenden Treiberspannung angesteuert, in deren Folge er sich ausdehnt und dabei eine ansteigende Kraft auf den Knochenzylinder appliziert. Die Kraft und die Kompression werden gleichzeitig bestimmt, die Daten elektronisch gesammelt und gespeichert.

Die Steifigkeit wird errechnet, indem der reziproke Verlauf der Regressionslinie von Kompression und Kraft über ein wählbares Kraftintervall aufgetragen wird. Im Falle eines nicht linearen Verlaufs muss der Benutzer auf der Kraftachse ein Intervall wählen, welches einen nahezu linearen Verlauf aufweist.

Das Kontrollprogramm des Systems ermittelt zunächst die tatsächliche Steifigkeit. Die Steifigkeit ist über das Hook'sche Gesetz definiert:

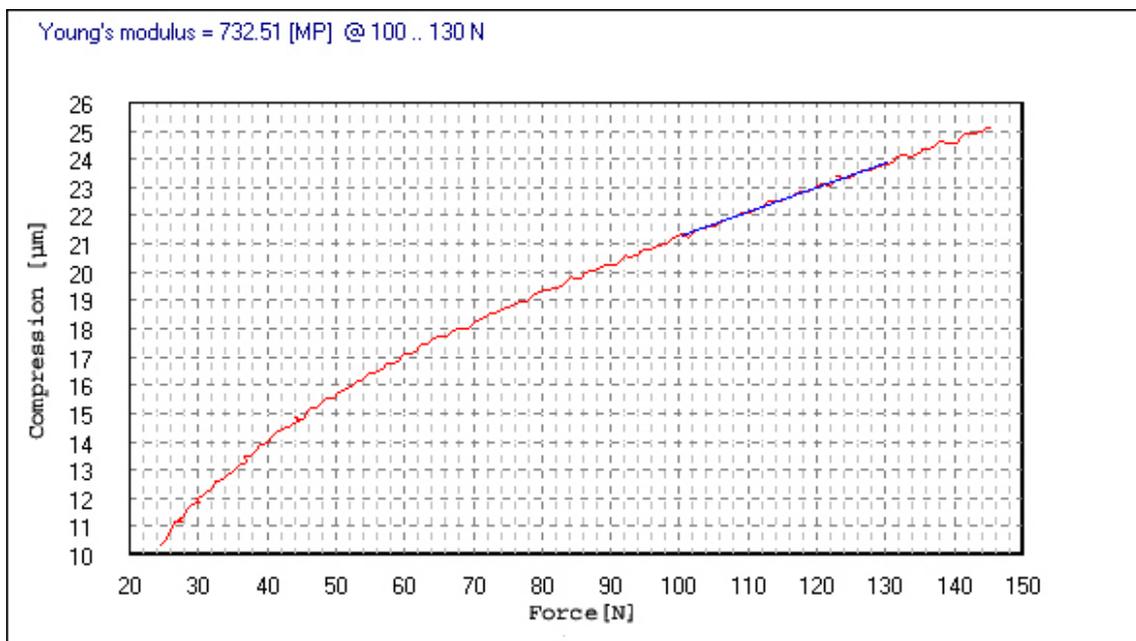
$$s = \Delta f / \Delta c = (f_{\max} - f_{\min}) / (c_{\max} - c_{\min})$$

f: Kraft, c: Kompression

Das Kontrollprogramm des Systems sammelt dadurch eine große Anzahl (ca. 300) von Daten  $\{f_1 \dots f_n\}$ ,  $\{c_1 \dots c_n\}$  in einem bestimmten Kraftintervall  $[f_1 \dots f_2]$ , anstatt nur zweier Datenpaare  $(f_{\max}, c_{\max})$ ,  $(f_{\min}, c_{\min})$ . Die Steifigkeit ergibt sich aus der Steigung der Regressionsgeraden über diese Werte (siehe Abb.:1-6)

Das Programm errechnet die Steifigkeit in der Maßeinheit eines scheinbaren Elastizitätsmoduls (Y, Einheit MPa oder GPa), indem es die zylindrischen Parameter Radius (r) und Höhe (h) zur Normalisierung nutzt. Die Bezeichnung „scheinbar“ wird verwendet, weil der Begriff Elastizitätsmodul nur für kontinuierliche, homogene und isotrope Körper definiert ist.

Abb.: 1-6 graphische Darstellung einer Steifigkeitsmessung



Dargestellt sind Kompression und Kraft, sowie das Kraftintervall (100-130N) mit der dazu gehörenden Regressionsgerade, deren Steigung der Steifigkeit entspricht.

Um jedoch einen Wert zu erzeugen, der nicht von den geometrischen Dimensionen abhängt, sondern eine reine Materialkonstante repräsentiert, wird folgende Formel verwendet:

$$Y = s \cdot h / (\pi \cdot r^2)$$

$$\pi \cdot r^2 = \text{Stirnfläche}$$

$$h = \text{Höhe}$$

$$s = \text{Steifigkeit}$$

$$Y = \text{Elastizitätsmodul}$$

Auf diese Weise erhält man einen Wert, der praktikabel mit den mechanischen Eigenschaften anderer Materialien verglichen werden kann.

Andere Definitionen sind mathematisch völlig gleichwertig, heben aber andere Begriffe hervor. So wird oft geschrieben:

$$Y = \frac{\Delta f \cdot h}{\Delta c \cdot A} = P / \zeta = \text{Druck} / \text{Dehnung}$$

$$A = \text{Stirnfläche}$$

$$P = \text{Druck} = \text{Kraft pro Fläche} (\Delta f / A)$$

$$\zeta = \text{Dehnung} = \Delta c / h$$

Dieser Zusammenhang kann auch folgendermaßen beschrieben werden:

Setzt man in obiger Gleichung  $\Delta c = h$ , so ist  $Y = P$ , also der theoretische Druck, der erforderlich ist, um den Körper auf die Höhe Null zu komprimieren. Dieses ist jedoch nicht möglich, denn bei Druck verdichtet sich das Material und wird steifer, wehrt sich somit gegen den Druck und verlangt, dass immer mehr Druck ausgeübt werden muss, um noch weiter zu komprimieren.

## 1.9 Das Perfusions- und Belastungssystem (PBS)

Es handelt sich um ein ex-vivo Perfusions- und Belastungssystem (PBS), welches von D. B. Jones (Marburg) und E. L. Smith (Wisconsin, USA) entwickelt wurde [171]. Es dient dazu, vollständige Organproben von trabekulären Knochen über einen längeren Zeitraum zu kultivieren und durch mechanische und/oder chemische Stimuli beeinflussen zu können. (ZETOS, Marburg).

Dieses System arbeitet mit trabekulären Knochenzylindern, welche durch eine aufwendige Prozedur hergestellt werden (*Material und Methoden*). Sie besitzen eine Höhe von 5 mm und einen Durchmesser von 10 mm und enthalten alle für trabekulären Knochen typischen Zellen. Dazu gehören Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten, bone-lining Zellen, mesenchymale Vorläuferzellen, Megakaryozyten, Nervenzellen, Bindegewebs- und Fettzellen, deren Interaktionen untereinander ebenfalls mit dem PBS untersucht werden können. Weiterhin ist es möglich, auf die Knochenproben unterschiedlichste definierte Belastungsformen auszuüben, deren Frequenz und Zykluszahl dabei selbst bestimmt werden kann. Die Kompression und die dafür aufgewendeten Kräfte werden in Echtzeit aufgezeichnet. Die Kompression kann mit einer Genauigkeit von  $\pm 50$  nm appliziert werden.

Ebenfalls möglich ist die exakte Bestimmung der aktuellen Steifigkeit (Young's- oder E-Modulus), der viskoelastischen Eigenschaften (VE), der Bruchfestigkeit (Strength) und der Ermüdungseigenschaften einer verwendeten Knochenprobe.

Die Konfiguration des PBS erlaubt eine Variation der Frequenz von 0,1 – 50 Hz und eine maximale Belastung von 4500 N, jeweils in Abhängigkeit von der Kombination aus Frequenz und Belastung. 4500 N liegen weit oberhalb des Bruchindex der hier verwendeten Knochenproben. Deshalb wurde das System auf eine maximale Belastung von 1500 N, bei einer Kompressionsgenauigkeit von  $\pm 50$  nm, kalibriert.

In dem hier beschriebenen Experiment wurden die Knochenproben der verschiedenen Gruppen bei einer Frequenz von 1 Hz und 300 Zyklen täglich belastet.

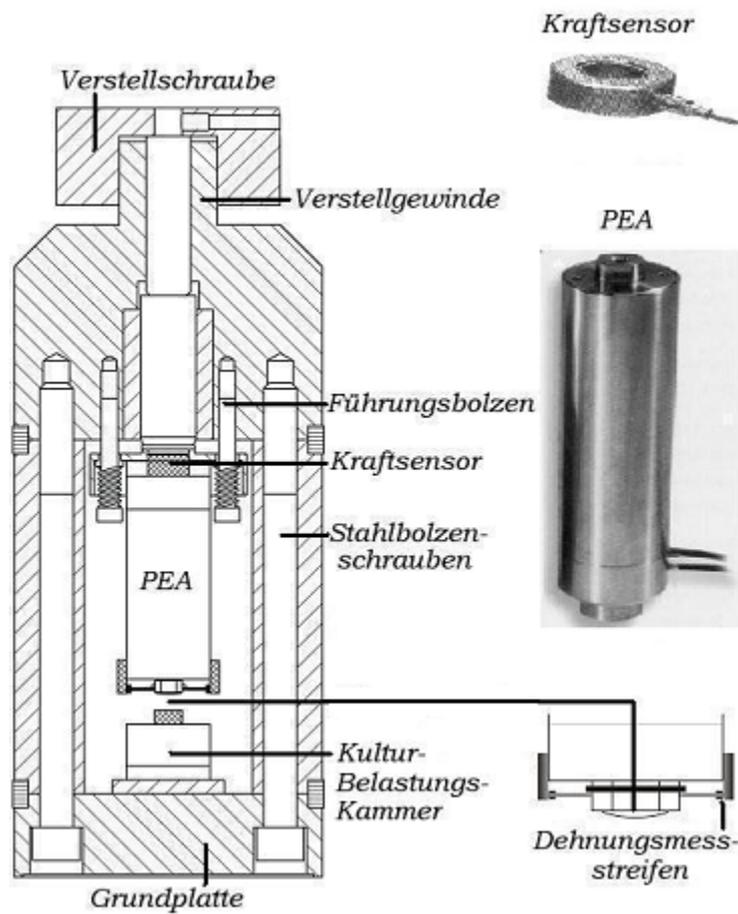
## 1.9.1 Die Bestandteile

### 1.9.1.1 Die Belastungseinheit (Zetos)

Sie stellt das zentrale Element (Abb.: 1-6) im Perfusions- und Belastungssystem dar und enthält die mechanische Belastungseinheit, sowie die Sensoren für die Messung von Kompression und zugehöriger Kraft.

Im folgenden ist der Konstruktionsplan der Zetos-Belastungseinheit dargestellt.

Abb.1-6: Der Zetos – Konstruktionszeichnung



Die Perfusions- und Belastungskammern werden in den dafür vorgesehenen Schacht eingeschoben, mit Hilfe der Verstellerschraube fixiert und manuell mit einer definierten Vorlast versehen (2,5 - 3,5N). Die mechanische Belastung wird über den piezoelektrischen Aktor (PEA) ausgeübt (Physik Instrumente). Dieser dehnt sich entsprechend der angelegten elektrischen Spannung aus und bewirkt einen Druck auf den Belastungspiston der Kammer und dementsprechend auch auf die Knochenprobe innerhalb der Kammer. Die Kompression der Knochen ergibt sich aus den Messgrößen Expansion, Kraft und geräte-spezifischen Kalibrierdaten.

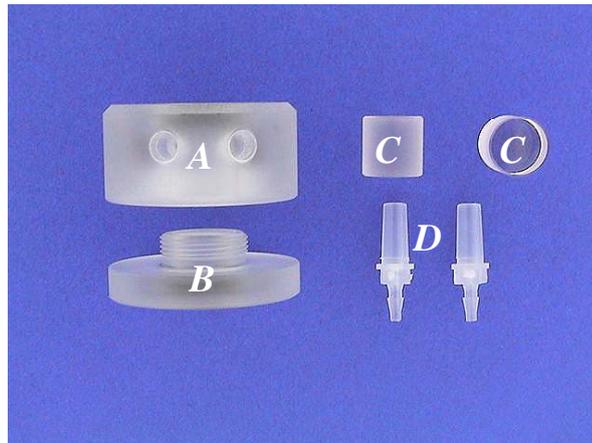
Der Kraftsensor (Kistler) produziert, durch die aufgebrachte Kraft, elektrische Ladung. Kraft und Ladung verhalten sich proportional zueinander und somit kann die Ladung zur Bestimmung der Kraft verwendet werden.

### **1.9.1.2 Die Kultur- und Belastungskammer**

Die Kultur- und Belastungskammer ermöglicht es zum einen, Knochenproben über einen längeren Zeitraum in Kultur zu halten und zum anderen die Knochenproben mechanisch zu belasten. Dazu verfügen die Kammern über zwei Anschlüsse, einen Zu- und einen Abfluss, über welche die Kammern mit einer Rollpumpe verbunden sind. Damit ist eine kontinuierliche Perfusion der Knochenproben mit Kulturmedium gewährleistet.

Direkt auf der Knochenprobe befindet sich der Belastungspiston. Dehnt sich der PEA aus, wird der Belastungspiston auf die Knochenprobe gedrückt und führt zu einer definierten Kompression des Knochens.

Abb.1-7: Die Kultur- und Belastungskammer in ihren Einzelkomponenten



Die Abbildung zeigt die einzelnen Komponenten:

A: Kammergehäuse      B: Kammerboden      C: Belastungspiston      D: Konnektoren

Der Boden der Kultur- und Belastungskammer und der Belastungspiston wurden mit einer speziellen Methode geschliffen, um eine möglichst hohe Parallelität und Feinheit der Oberflächen innerhalb der Kammer zu gewährleisten. Somit wird eine möglichst gleichmäßige Kraftübertragung auf die gesamte Knochenoberfläche gewährleistet, was damit zu reproduzierbaren Belastungen und auch Ergebnissen führt.

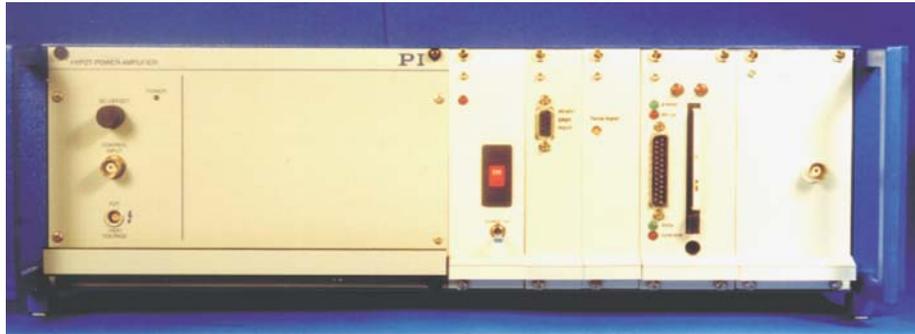
### 1.9.1.3 Die Elektronischen Module

Die Abb. 1-8 zeigt die elektronischen Module, die es ermöglichen, das PBS und die dazugehörigen Sensoren zu betreiben.

Dazu gehören folgende:

1. HVPZT High Voltage Amplifier (Physik Instrumente)  
Dieser Verstärker betreibt den Piezo-Stack mit einer Spannung zwischen 0 – 1000 V. Die Stromversorgung des HVPZT wird durch den Mikrocontroller in Modul 5 für die Dauer einer Messung eingeschaltet, um in den Messpausen das störende Lüftergeräusch zu vermeiden.

2. Hauptstromversorgung
3. Expansions-Verstärker  
Dieser Verstärker erhält Signale von Dehnungsmessstreifen, die im Piezo-Aktor zur Expansionsmessung eingebaut sind. Da jeder Sensor dieser Art einen hohen Null-Fehler besitzt, verfügt der Verstärker über eine digital kontrollierte Null-Justierung.  
Die Kontrolle erfolgt über den Microcontroller in Modul 5.
4. Datenaquisitionsmodul  
Dieses Modul enthält digital-analog- und analog-digital-Konverter sowie Filter.
5. Mikrocontroller-Modul  
Der Microcontroller steuert die Stromversorgung der Hauptenergie, des High-Voltage-Amplifiers, des Datentransfers und des Ladungsverstärkers.  
Weitere Teile dieses Moduls sind die parallele Schnittstelle für die Datenübertragung von und zum PC und ein Speicher
6. Ladungsverstärker  
Der Ladungsverstärker empfängt und verarbeitet Signale des Piezo-Kraftsensors, der als Antwort auf die auf ihn eingebrachte Kraft eine elektrische Ladung erzeugt, die linear zur Kraft ist.

**Abb.1-8: Die elektronischen Module**

Die gesamte Elektronik des PBS wird über das Anwendungsprogramm „Zetos“ betrieben, welches eine Windows<sup>®</sup>-Oberfläche besitzt. Mit diesem Programm kann die Höhe der Kompression, die Vorlast, die Länge der Belastung, die Frequenz und das jeweilige Belastungsmuster gewählt und gesteuert werden. Wie oben bereits erwähnt, werden aufgewendete Kraft und Kompression dabei in Echtzeit gemessen und aufgezeichnet.

Für ausführliche Informationen sei an folgende Adressen verwiesen:

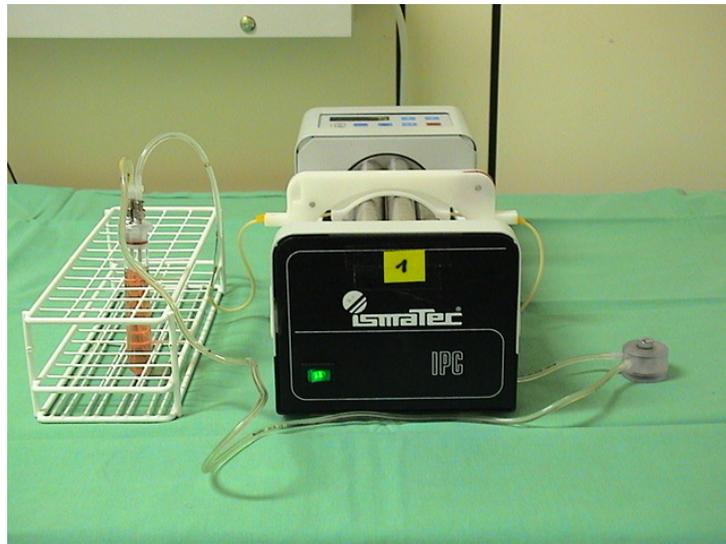
- Zetos ([jones@med.uni-marburg.de](mailto:jones@med.uni-marburg.de))
- Physik Instrumente(<http://www.physikinstrumente.de>)
- Kistler (<http://www.kistler.com>)

#### **1.9.1.4 Die Perfusionspumpe**

Zur Perfusion der Kulturbelastungskammern bzw. der in ihr befindlichen Knochenproben wird eine 24-Kanal-Umlaufpumpe (Ismatec<sup>®</sup>) verwendet. Mit dieser können zeitgleich 24 Probenkammern mit einer frei wählbaren Durchflussrate versorgt werden.

In dem hier beschriebenen Versuch wurde eine Flussrate von 7 ml/Stunde gewählt, um flussbedingte Scheerkräfte möglichst gering zu halten.

Abb.1-9: 24-Kanal-Umlaufpumpe mit angeschlossener Kultur- und Belastungskammer



## **2 Zielsetzungen und Fragestellungen dieser Arbeit**

Diese Arbeit soll der weiteren Etablierung des kalibrierten Zetos<sup>®</sup>-Systems dienen. Es findet Anwendung in der Kultivierung und Belastung von trabekulären Knochenproben. Es wurde in dieser Form erst zum zweiten Mal angewandt und soll zum Einen Ergebnisse und Erkenntnisse der ersten Nutzung bestätigen und zum Zweiten der Weiterentwicklung dienen.

Die erste Anwendung hat gezeigt, dass die Knochenproben auf physiologische Belastungssignale mit charakteristischen physiologischen Reaktionsmustern reagieren.

Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen für diese Arbeit:

- Wie reagieren die Knochenexplantate auf verschiedene Belastungsintensitäten und können generelle Erkenntnisse der ersten Versuche bestätigt werden? Besonderes Augenmerk liegt dabei wieder auf der Entwicklung der Steifigkeit und der Zunahme der Knochenmasse durch appositionelles Knochenwachstum.
  
- Wie verhalten sich die zu bestimmenden Zell- und Vitalitätsmarker Alkalische Phosphatase und Laktatdehydrogenase hinsichtlich der mechanischen Belastung?
  
- Bleiben die Knochenproben über den gesamten Verlauf vital? Auch hier sollen wiederum der Verlauf der Marker Alkalische Phosphatase, Laktatdehydrogenase, pH-Werte und die histologische Auswertung Antwort geben.
  
- Ein weiterer Schwerpunkt ist die Anwendung und Anpassung histologischer Färbungen bei nicht entkalktem Knochen
  
- Wo liegen die zukünftigen Einsatzgebiete des Systems?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Herstellung der Knochenpräparate

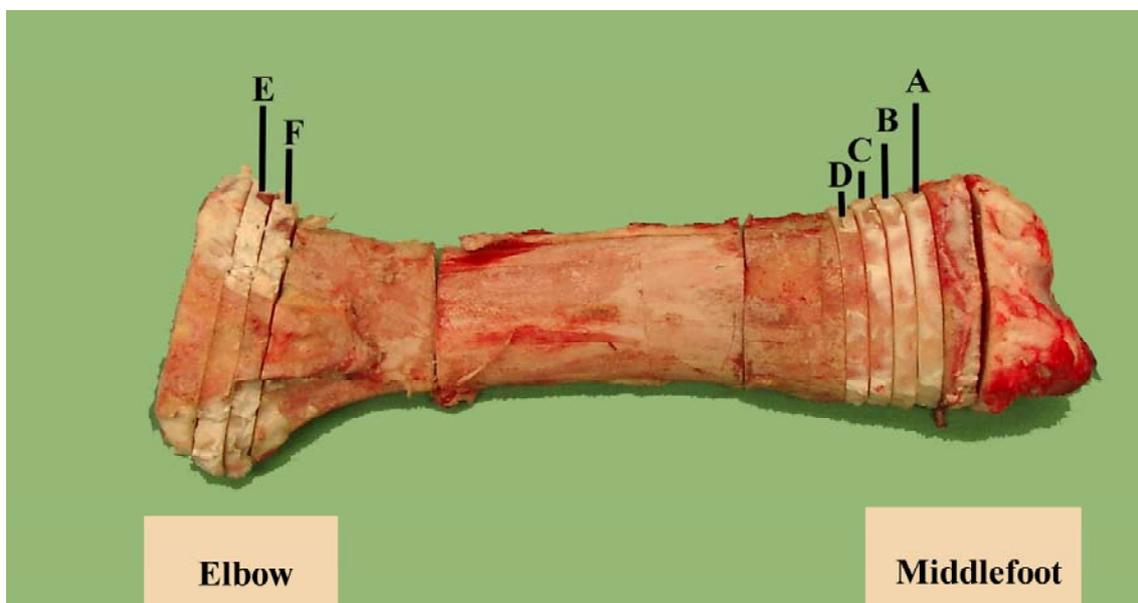
Die Herstellung der Knochenpräparate umfasst eine Vielzahl einzelner Arbeitsschritte mit einem großem Zeitaufwand von bis zu 10 Stunden.

#### 3.1.1 Beschaffung und Aufbereitung des Knochens

Für dieses Experiment wurde boviner Knochen verwendet, welcher von der Metzgerei Manger in Wetter/Hessen erworben wurde. Unmittelbar nach der Tötung des 22 Monate alten Rindes wurde der Unterarm, bestehend aus Radius und Ulna, abgetrennt und zur weiteren Bearbeitung ins Labor gebracht. Dies musste möglichst schnell geschehen, damit so viel wie möglich vitales Knochengewebe erhalten bleibt.

Nach gründlicher Reinigung mit lauwarmen Wasser und Sprühdesinfektion mit 70%igem Alkohol wurde zunächst an einer Arbeitsbank mit Abzug unter sterilen Bedingungen das noch anhängende Muskel-, Band- und Kapselgewebe mit Hilfe von Einmalskalpellen abgetrennt und der Knochen somit freigelegt.

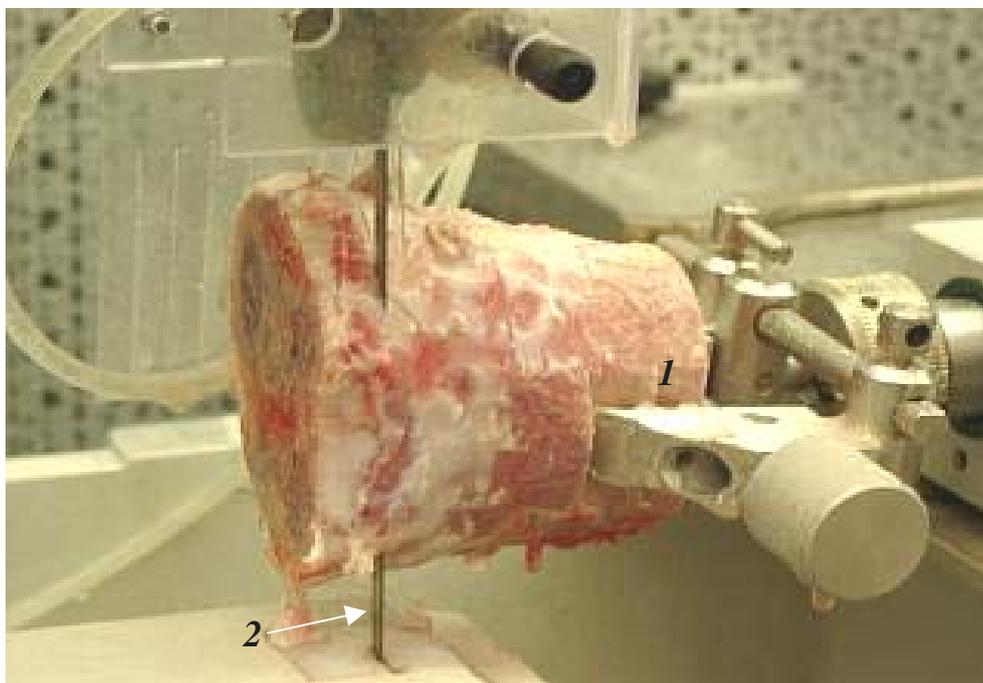
Abb.3-1: Radius vom Rind, bereits präpariert und bearbeitet



### 3.1.2 Präparation der Knochenzylinder

Die eigentliche Präparation am Knochen beginnt mit der Trennung von Radius und Ulna unter Verwendung einer chirurgischen Handsäge. Des Weiteren werden die proximalen und distalen Epiphysen von der Diaphyse des Radius abgetrennt. Dabei ist der Knochen in einer Schraubzwinde eingespannt, welche vorher mit sterilen Operationstüchern abgedeckt wurde. Für die spätere Fixation an der Bandsäge war es notwendig zwei parallel zueinander stehende Kortikalisflächen an den diaphysären Endstücken der Epiphysen zu schaffen. Die Diaphysenstücke wurden verworfen, da sie nur Kompakta, Fettgewebe und Knochenmark enthalten. Die Gelenkflächen der Epiphysen wurden oberhalb der Wachstumsfuge abgetrennt und ebenfalls verworfen. Nun erfolgte das Einspannen und Ausrichten der Epiphyse an der Bandsäge, fixiert an den vorbereiteten Diaphysenendstücken (Abb.3-2 1). Die Bandsäge besteht aus einem dünnen und mit feinsten Diamanten besetzten Metallband (Abb.3-2 2).

Abb. 3-2: Bandsäge – Epiphyse eingespannt

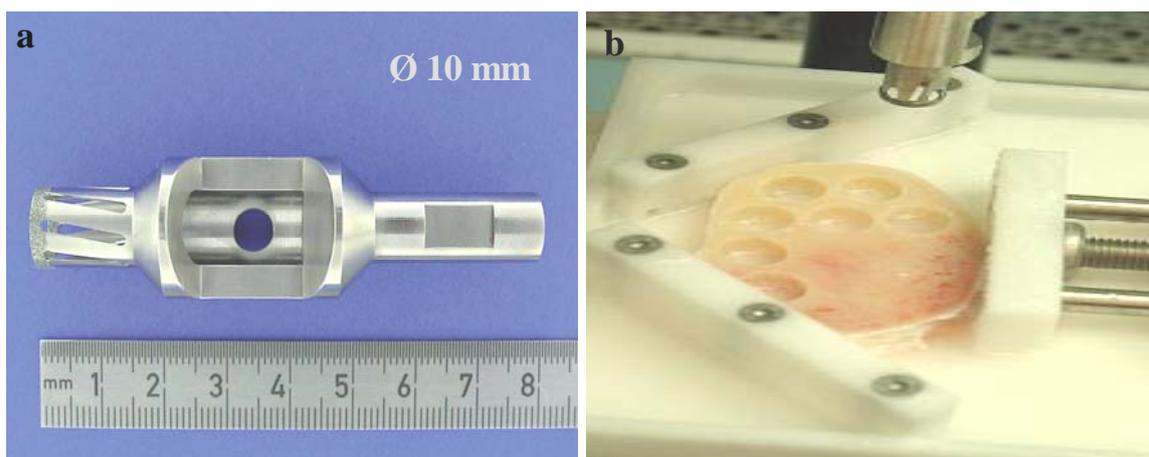


Im folgenden werden 8 mm dicke Knochenscheiben geschnitten. Die Einstellung erfolgt über einen skalierten Drehregler, welcher mit der Halterung des Knochens in Kontakt steht.

Bei dem Sägevorgang wurde ständig mit einer vorgekühlten isotonischen Kochsalzlösung gekühlt, um Gewebeschäden so gering wie möglich zu halten. Die gewonnenen Knochenscheiben werden bis zur weiteren Verarbeitung in mit PBS gefüllten Petrischalen aufbewahrt. Für den Versuch sollten nur Knochenscheiben verwendet werden, die einem hohen Spongiosagehalt und möglichst keinen Knochenmarkanteil enthalten.

Im folgenden Schritt wurden nun aus diesen Scheiben die Knochenzylinder ausgebohrt. Dazu wurde die jeweilige Knochenscheibe auf dem Bohrtisch fixiert. Mit Hilfe einer Bohrmaschine, in die ein Hohlbohrer eingespannt und deren Arbeitsweg über einen Hebel manuell gesteuert ist, wurden nun die Knochenzylinder ausgebohrt.

Abb.3-3: Ausbohren der Knochenzylinder (b) mit Hilfe des Hohlbohrers (a)



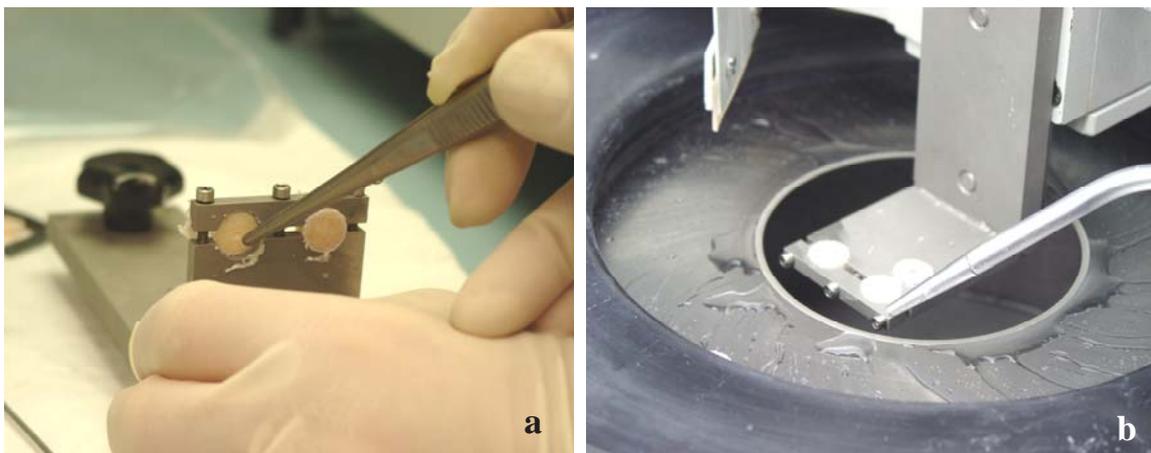
Beim Bohrvorgang wurde ebenfalls mit isotonischer Kochsalzlösung gekühlt. Dieser Bohrer ist auch mit feinsten Diamanten besetzt und hat einen Innendurchmesser von 10mm. Nach dem Bohrvorgang wurde der im Bohrer sitzende Knochenzylinder mit Hilfe eines Pushers feinfühlig heraus gepresst. Es war darauf zu achten, dass der Knochenzylinder keine Kortikalisanteile und auch keine Knochenmarksanteile enthielt. Die Knochenzylinder wurden bis zur weiteren Bearbeitung in verschließbaren, sterilen und mit PBS gefüllten Röhrchen (Falcon Tubes) aufbewahrt.

### 3.1.3 Nachbearbeitung der Knochenzylinder

Damit die Knochenzylinder später in die Kulturbelastungskammer eingebaut werden konnten, mussten sie parallel, unter Verwendung einer Innen-Loch-Säge, auf eine einheitliche Höhe von 5 mm geschnitten werden.

Die Zylinder wurden in eine Halterung mit kreisförmiger Öffnung eingespannt. Ober- und Unterfläche ragen dabei aus der Halterung heraus. Die Säge kann auch über einen skalierten Drehregler bewegt werden und hat ebenfalls einen feinen Diamantenbesatz. Unter Kühlung mit isotonischer Kochsalzlösung erfolgte der erste Schnitt an der Zylinderoberfläche. Danach wurde mit dem Drehregler die Halterung genau um 5mm bewegt und es erfolgte ein zweiter Schnitt an der Zylinderunterseite.

Abb.3-4: *a Einbau der Zylinder in die Halterung*  
*b Zylinder werden mit der Innen-Loch-Säge auf 5mm Höhe gebracht*



Nach diesem Arbeitsschritt sind nun Knochenzylinder aus spongiotischem Gewebe mit einer Höhe von 5 mm und einem Durchmesser von 10 mm entstanden, welche genau in die Kulturbelastungskammer passen. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Zylinder auch wieder in verschließbaren Röhrchen mit PBS aufbewahrt.

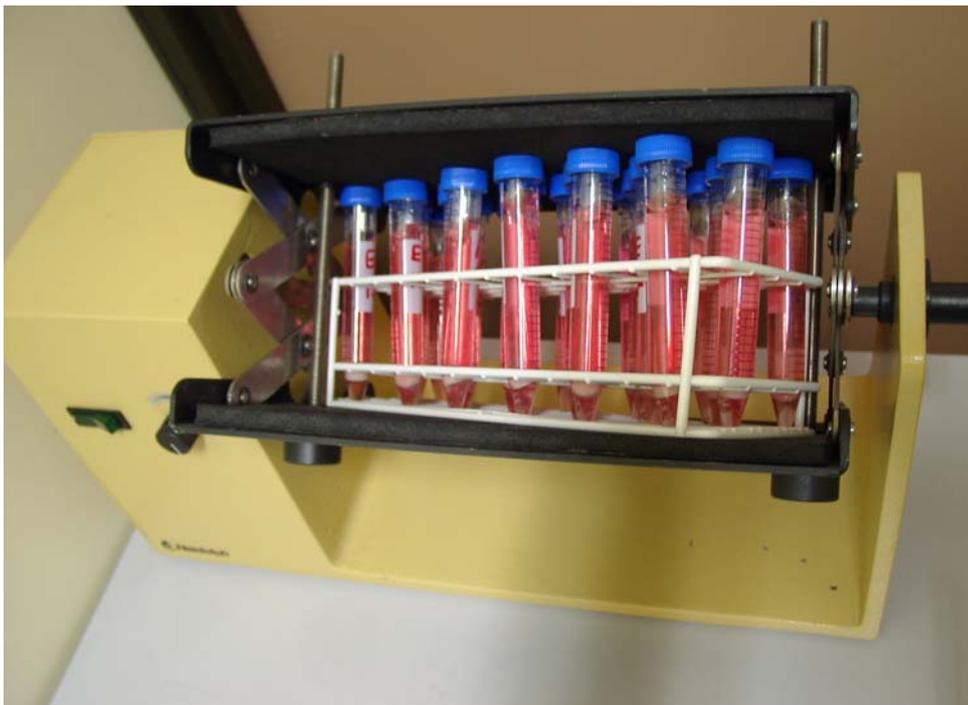
### 3.1.4 Waschen der Knochenzylinder

Bevor die Knochenzylinder in die Kulturbelastungskammer eingesetzt und an das Zetos-System angeschlossen wurden, mussten sie einer aufwendigen Waschprozedur unterzogen werden. Mit dem Ziel, dass beim Sägen entstandene Knochenmehl aus den Spongiosazwischenräumen der Schnittflächen auszuwaschen und einer eventuell bei der Präparation entstehenden Infektion vorzubeugen. Die Waschprozedur umfasste 3 Waschgänge. Als Waschmedien wurden Earle's Medien verwendet, welche zum Teil mit Antibiotika versetzt waren. (Kapitel 3.1.8) Dazu wurden die Knochenzylinder unter sterilen Bedingungen in verschließbare Röhren mit Waschmedium umgesetzt. Die Röhren wurden in einen Ständer gestellt und in einen Rotator (Heidolph; „Reax 2“) eingespannt, damit eine gute Um- und Durchspülung des Knochenzylinders gewährleistet ist.

Die Dauer dieses Waschvorganges betrug 10 Minuten. Nach dem Umsetzen der Knochenzylinder in neue Röhren, wurde die erste Waschprozedur wiederholt.

Für den 3. Waschgang wurde Earle's Medium, welches mit Antibiotika versetzt ist, verwendet. Die Dauer des 3. Waschganges betrug 20 Minuten.

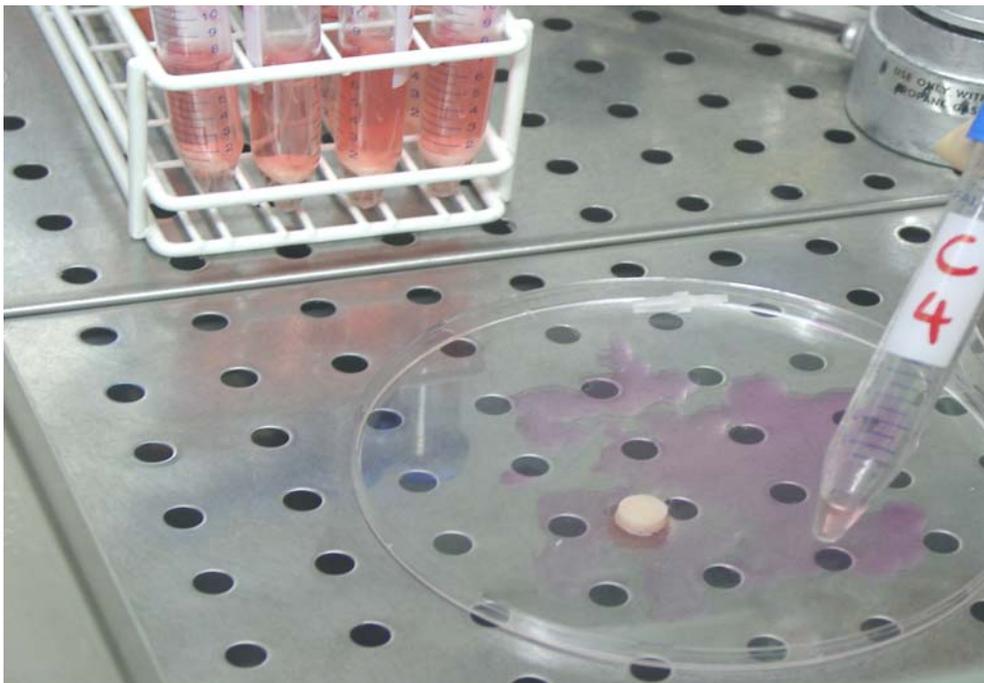
Abb.3-5: Waschen der Knochenzylinder im Rotator



### 3.1.5 Einsetzen der Knochenzylinder in die Kammer

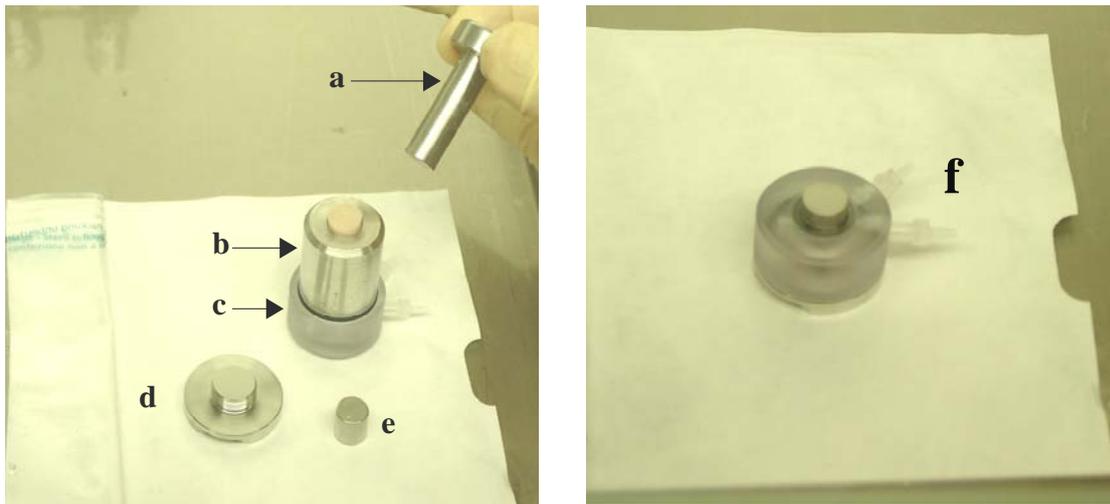
Nach der Waschprozedur wurden nun die Knochenzylinder in die Kammer eingesetzt, welche dabei auch gleich zusammengebaut wird. Auch diese Arbeitsschritte erfolgten bei sterilen Bedingungen unter dem Abzug.

Abb.3-6: Knochenzylinder nach Präparation und Waschvorgang



Die Kammerbestandteile wurden unter dem Abzug aus der sterilen Verpackung genommen. Auf das Kammergehäuse wurde zunächst ein Hohlzylinder geschraubt, welcher als Führungsschacht für den Knochenzylinder und den Belastungspiston dient. Das Gewinde ist gleich dem des verwendeten Kammerbodens. Zunächst wurde der Piston in den Hohlzylinder geschoben, gefolgt vom Knochenzylinder. Mit Hilfe eines Pushers wurden dann Piston und Knochenzylinder in die richtige Position innerhalb der Kammer gebracht. Die Länge des Pushers entspricht dabei der Länge des Hohlzylinders und des Kammerbodens. Der Anschlag des Pushers am Hohlzylinder verhindert dabei eine falsche Positionierung. Danach wurde der Hohlzylinder vom Kammergehäuse abgeschraubt und der Kammerboden angeschraubt (Abb. 3-7). Mit Hilfe eines passenden Schlüssels wurde diese Verschraubung festgezogen.

Abb.3-7: Einsatz des Knochenzylinders und Zusammenbau der Kammer



*a* Pusher; *b* Hohlzylinder; *c* Kammergehäuse; *d* Kammerboden; *e* Belastungs-Piston; *f* Versorgungsanschlüsse

Danach erfolgte das Anstecken der Versorgungsanschlüsse (f). Auf diese wurden nun die Versorgungsschläuche aufgesteckt. Das andere Ende der Versorgungsschläuche wurde auf die Stopfen des Reagenzglas gesteckt. Diese Stopfen enthalten ebenfalls 2 kleine Schläuche. Der eine kommt dabei in Kontakt mit dem Medium, um dieses für die Versorgung aufzunehmen, der andere ist etwas kürzer, hat keinen Kontakt mit dem Medium und stellt die Endstrecke des verbrauchten Mediums dar.

### 3.1.6 Anschluss der Kammern an das Zetos-System

Das zusammengebaute System wurde nun an die Rollpumpe (Ismatec®) angeschlossen. Wie oben schon einmal beschrieben, besteht das System aus einem Versorgungs- und einem Entsorgungsschlauch. Der Versorgungsschlauch enthält frisches Nährmedium, welches er zur Kammer führt. Dieser wurde an die Pumpe angeschlossen. Der Entsorgungsschlauch führt verbrauchtes Medium, welches er passiv, nur durch den Versorgungsdruck beeinflusst, zum Reagenzglas zurückführt. Der Versorgungsschlauch, inklusive Pumpenstück, hat wie der Entsorgungsschlauch eine Länge von 80 cm. Das Pumpenstück hat eine Länge von 40 cm.

Ob die Kammern zum einen mit Medium versorgt wurden und zum anderen auch wirklich dicht waren, musste in regelmäßigen Abständen überprüft werden.

Abb.3-8: Zusammengesetztes komplettes System mit Mediumreservoiren, Versorgungsschläuchen, Rollpumpe und Kammern



### Einzelkomponenten des dargestellten Systems

- Schlauchsystem:           - Verbindungsstücke: Tygon® Masterflex® 6419-13  
                                   - Pumpenstück: Pharmed®; Lot No. 2205086
- Mediumreservoir:         - Rundbodengläser ( Klarglas ); Art.Nr. 3301953
- Reservoirstopfen:        - Reagenzstopfen mit Ein- und Ausfluss ( T. Pohl; Marburg )
- Pumpe:                     - Ismatec®; Rollpumpe
- Versorgungsmedium:     - DMEM ( GIBCO™; Lot.No. 3066456 )
- Perfusions- und Belastungskammer ( siehe Abb. 3-7)

### 3.1.7 Mediumwechsel

Da innerhalb der ersten Tage immer noch präparationsbedingte Gewebssubstanzen und Knochenmehl ausgewaschen werden und sich im Versorgungsmedium ansammeln, musste dieses innerhalb von 24 Stunden mindestens einmal gewechselt werden. Nach einer Ruhephase von ca. 48 Stunden konnte erstmals belastet werden.

### 3.1.8 Verwendete Medien

#### Earle's Waschmedium

Es dient, wie oben erwähnt, für die ersten beiden Waschgänge (10min) und hat folgende Zusammensetzung:

- 100 ml Earle's Salt Solution 10x ( Biochrom KG; Cat.No. L 1925 )
- 7,5 ml NaHCO<sub>3</sub> ( 6%ig )
- die Mischung mit Aqua bidest auf 1000 ml auffüllen

#### Earle's Waschmedium mit Antibiotikum

Es dient für den 3. Waschgang und hat folgende Zusammensetzung:

- 100 ml Earle's Salt Solution 10x ( Biochrom KG; Cat.No. L1925 )
- 7,5 ml NaHCO<sub>3</sub> ( 6%ig )
- 4 ml Amphotericin B ( Sigma; Lot 61K2383 )
- 500 000 IE Penicillin/Streptomycin (50 ml) ( Biochrom KG; Cat.No. A2213 )
- die Mischung mit Aqua bidest auf 1000 ml auffüllen

#### Dulbecco's Mod. Eagle Medium ( DMEM – high glucose ) mit 10% FCS

Dieses Medium dient als Versorgungsmedium der Knochenzylinder und setzt sich wie folgt zusammen:

- 13,38 g DMEM (GIBCO BRL; Cat.No. 52100-039)
- 10 ml L-Glutamin (200 mmol solution Fa. GIBCO)
- 2ml / l Vitamin C

- 0,12 g Natriumhydrogencarbonat [ $\text{NaHCO}_3$ ] (Merck; 6329)
- 5 mmol (1,08 g)  $\beta$ -Glycerophosphat Disodium, hydrate (Sigma; Lot 71K5421)
- 2,383 g HEPES Pulver oder 10 ml HEPES ( 1M HEPES pH 7,125 ) (Sigma; Lot 118H5413)
- 50 000 IE Penicillin/Streptomycin; entspricht 5,0 ml Lösung (BIOCHROM KG; Cat.No. A2213)

Zum Ansetzen des Mediums wurden 200 ml Aqua bidest in einen 1 Liter fassenden Messkolben gegeben. Hinzu kommt ein Stabmagnet. Der Messkolben wurde auf einen Magnetrührer gestellt. Nun wurden nach und nach die aufgeführten Substanzen zugegeben. Danach wurde auf 900 ml mit Aqua bidest aufgefüllt und der pH-Wert auf 7,25 eingestellt.

Die entstandene Lösung wurde unter dem Abzug in eine 1000ml fassende Glasflasche mit Schraubverschluss filtriert (Filterporengröße: 22  $\mu\text{m}$ ). Zusätzlich wurden nun 100ml FCS durch einen Spritzenfilter mit ebenfalls 22  $\mu\text{m}$  Porengröße zugegeben. Die Flasche wurde noch unter dem Abzug fest verschlossen und bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt.

### **PBS Dulbecco**

Es diene, wie bereits erwähnt, während der Präparation der vorübergehenden Aufbewahrung der einzelnen Knochenstücke.

- 9,55 g PBS Dulbecco (BIOCHROM; Cat.No. L182-50) gelöst in
- 1000 ml Aqua bidest

Diese Lösung wurde in eine Glasflasche gefüllt, verschraubt und für 20 min autoklaviert.

### 3.2 Allgemeine Kulturbedingungen

Das gesamte Perfusions- und Belastungssystem, bestehend aus Kultur- und Belastungskammern, der 24-Kanalkassettenpumpe, den Nährmedium-Reservoirs und der Zetos-Belastungseinheit wurde während des Versuches in einem abgedunkelten Warmraum gelagert, dessen Temperatur kontinuierlich bei 37°C gehalten wurde.

Die Versorgung der Knochenexplantate wurde durch das bereits erwähnte DMEM-high-glucose Medium (siehe Kap. 3.1.8) gewährleistet, dessen pH-Wert auf 7,25 eingestellt war. Das Nährmedium wurde nach jeweils 72 Stunden gewechselt. Für diesen Zeitraum standen jeder Knochenprobe 6ml Nährmedium zur Verfügung. Die Durchflussrate des Mediums betrug 7ml pro Stunde. Um noch möglicherweise vorhandenen präparationsbedingten Knochenstaub auszuwaschen, wurde während der ersten vier Versuchstage das Medium täglich gewechselt.

### 3.3 Versuchsdurchführung und Verlauf

Dieses Experiment beinhaltet die Arbeit mit 48 Knochenexplantaten eines 20 Monate alten Rindes. Die bei der Präparation gewonnenen Knochenproben wurden mittels Randomisierung in 6 Gruppen zu je 8 Proben eingeteilt. Nachfolgende Tabelle zeigt die Einteilung der Gruppen mit der zur jeweiligen Gruppe gehörenden Belastungsintensität.

Tab.3-1: *Gruppeneinteilung und Belastungsintensität*

Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5	Gruppe 6
Kontrolle	1000 $\mu$ strain	1500 $\mu$ strain	2000 $\mu$ strain	3000 $\mu$ strain	4000 $\mu$ strain

Gruppe 1 diene als Kontrollgruppe, welche keine mechanische Belastung erfuhr. Bei diesen Knochenproben wurde nur die Steifigkeit in einem Zeitraum von 72 Stunden gemessen. Die Knochenproben der 2. bis 6. Gruppe wurden dagegen mechanisch mit der angegebenen Intensität für 5 min, bei einer Frequenz von 1 Hz, belastet. Die Steifigkeit wurde vor der mechanischen Belastung gemessen. Mit der mechanischen Belastung wurde 3 Tage nach der Präparation begonnen.

Alle weiteren Versuchsprozeduren waren für alle Gruppen identisch.

Mit Hilfe der verwendeten 24-Kanal-Kassettenpumpe ist es möglich, die Durchflussrate des Nährmediums stufenlos zu variieren. Bei diesem Versuch wurde eine Durchflussrate von 7ml pro Stunde gewählt um eine Belastung der Knochenproben durch eventuell vorhandene Scherkräfte möglichst zu verhindern. Eine suffiziente Versorgung der Proben mit Medium war stets gewährleistet. Das Medium wurde alle 72 Stunden gewechselt. Aus dem verbrauchten Medium wurden Proben zur Bestimmung der Alkalischen Phosphatase, der Laktatdehydrogenase (siehe *Kap. 3.6 & 3.7*) und des pH-Wertes entnommen.

Am 8. und 17. Belastungstag wurde die polychrome Sequenzmarkierung mit Kalzein (8.Tag) und Alizarin (17.Tag) durchgeführt. (*siehe Kap. 3.8.7*)

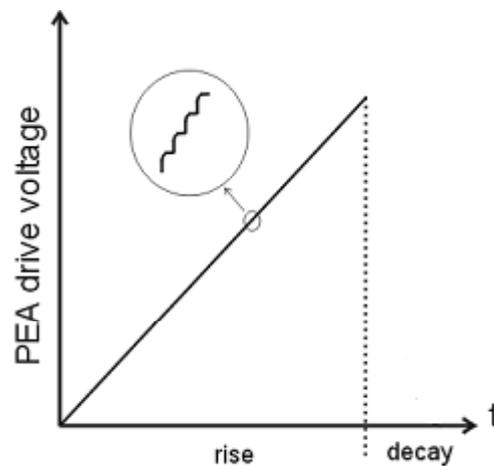
Am 14. Belastungstag wurden Proben für die Bestimmung der Prostaglandinkonzentration, nach einer bestimmten Belastungszeit, entnommen.

### **3.4 Die Steifigkeit der Knochenexplantate / E-Modul**

Unmittelbar vor der dynamischen Belastung der Knochenexplantate wurde die Steifigkeit jeder Probe bestimmt. (*siehe Kap. 1.8*) Dieser Wert ist derart normalisiert, dass er eine praktische Kenngröße darstellt, die von der Geometrie unabhängig ist und eine reine Materialeigenschaft darstellt, die mit anderen geläufigen Materialien leicht zu vergleichen ist. Diese Kenngröße wird auch als E-Modul oder Young's Modulus bezeichnet. Zu Beginn dieser Messung wird zunächst über eine Gewindeschraube der piezo-elektrische Aktor (PEA) mit dem Belastungspiston der Kammer in Kontakt gebracht. Dabei wurde für ca. 15 sec eine Vorlast von 30N gewählt um die Oberflächenrauigkeit des Knochens auszugleichen. Danach wurde die Vorlast auf 3,5N gesenkt und die Messung gestartet.

In der folgenden Abbildung ist der Verlauf der Treiberspannung des PEA dargestellt.

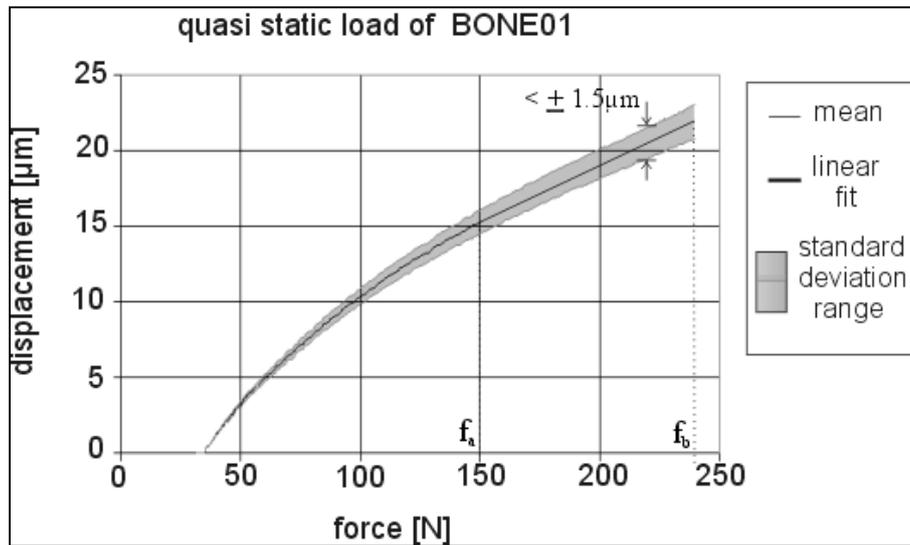
Abb.3-9: Verlauf der PEA-Treiberspannung



Direkt proportional zur Zeit erhöht sich die angelegte Spannung des PEA kontinuierlich, was zu einer langsamen Ausdehnung des Piezo-Stack und somit zu einer Komprimierung des Knochenexplantates in der Kultur- und Belastungskammer führt. Die maximale Kompression ist  $20\mu\text{m}$  begrenzt. Danach erfolgt der Spannungsabfall. Während der Messung werden Daten von Kraft und Kompression laufend aufgezeichnet und gespeichert. Die Steifigkeit wird danach als Steigung der Regressionsgerade ausgedrückt, wobei für jedes Knochenexplantat immer das gleiche Kraftintervall aus der Gesamtheit der Daten zur Auswertung verwendet wird (siehe Kap. 1.8).

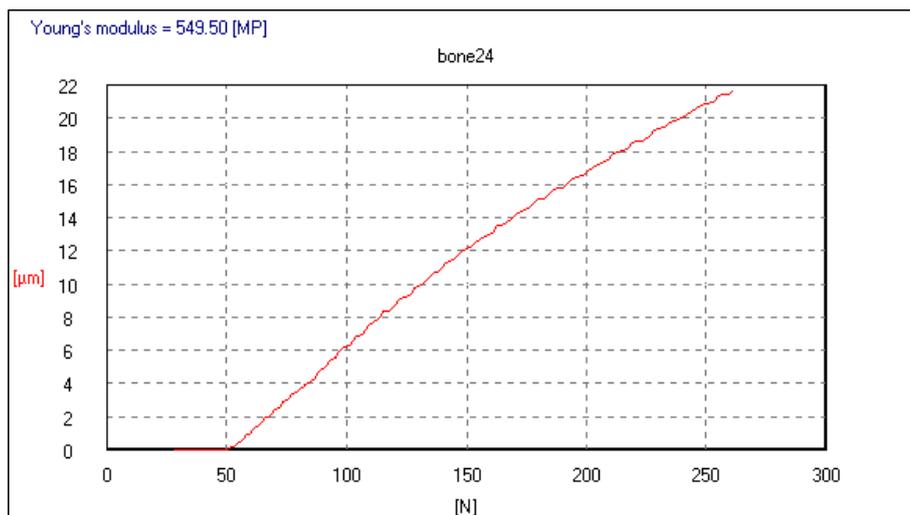
In der folgenden Abbildung sind Ergebnisse einer quasi-statischen Messung, wie der Mittelwert und die Standardabweichung dargestellt. Des weiteren ist das Kraftintervall (hier mit  $[f_a, f_b]$ ) bezeichnet, in welchem die Kurve linear verläuft. Dick hervorgehoben ist die Regressionsgerade, deren reziproke Steilheit direkt die Steifigkeit darstellt.

Abb.3-10: Beispiel der Ergebnisse *mehrerer quasi-statischer Messungen zur Ermittlung der Steifigkeit.*



Am Anschluss an eine quasi-statische Messung wird auf dem Monitor ein der folgenden Abbildung ähnliches Bild ausgegeben.

Abb.3-11: *Beispiel der Messergebnisse einer quasi-statischen Messung*



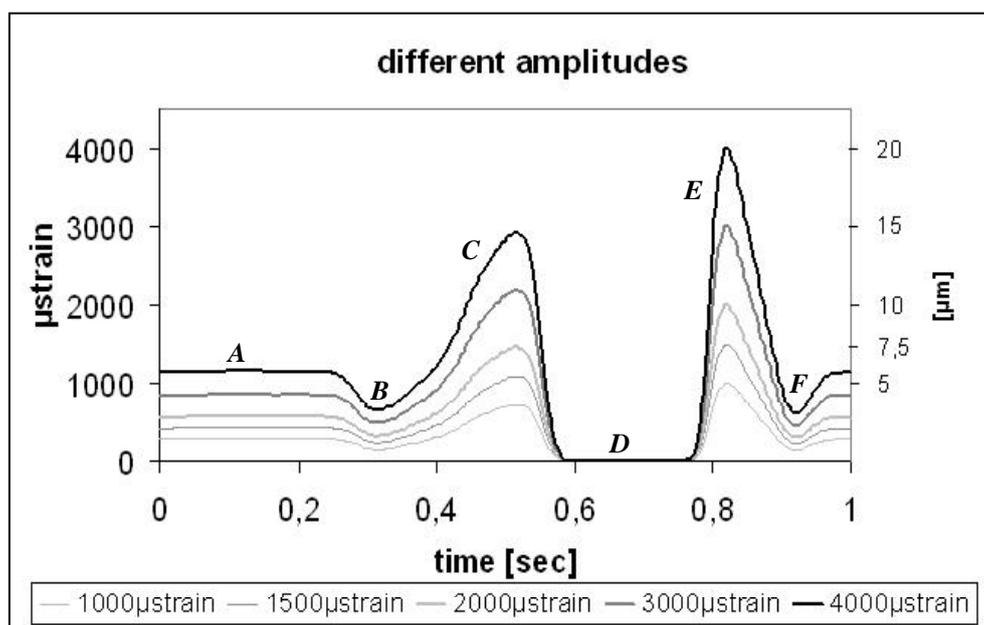
Für jedes Knochenexplantat der Kontrollgruppe ergeben sich 8 und für jedes der Belastungsgruppen ergeben sich 23 solcher Messprotokolle, inklusive der Steifigkeit.

### 3.5 Das Belastungssignal

Das in dieser Arbeit verwendete physiologische Belastungssignal entspricht dem Springen. In einem früheren Experiment wurden die Auswirkungen des Gehens und des Springens auf den Knochenstoffwechsel untersucht. Bei diesen Belastungssignalen handelt es sich um Belastungsformen, die, was Art und Verlauf anbelangt, physiologischen Bewegungsmustern entsprechen und direkt durch Messung auf einer Kraftmessplattform gewonnen wurden [161,162]. Die dabei genutzte Intensität der Kompression betrug  $4000\mu\text{strain}$  bei einer Belastungsdauer von 10 Minuten. Dabei wurde festgestellt, dass das Springen dem Gehen, in Bezug auf Steifigkeitsentwicklung und Osteoidbildung, überlegen ist.

Auf Grund der Ergebnisse in diesem Versuch wurde das Bewegungsmuster des Springens gewählt, mit dem Ziel, die Belastung diesmal in unterschiedlichen Intensitäten auf den Knochen zu applizieren. In der nachstehenden Abbildung sind die verschiedenen Intensitäten der Kompression noch einmal verdeutlicht.

Abb.3-12: *Belastungsmuster des Springens in den verschiedenen Intensitäten der Kompressionen*



Den einzelnen Phasen wird folgende Bedeutung zugeschrieben.

**A:** Fuß auf dem Boden **B:** Schwung holen **C:** Absprung **D:** Flug in der Luft

**E:** Landung **F:** Nachfedern

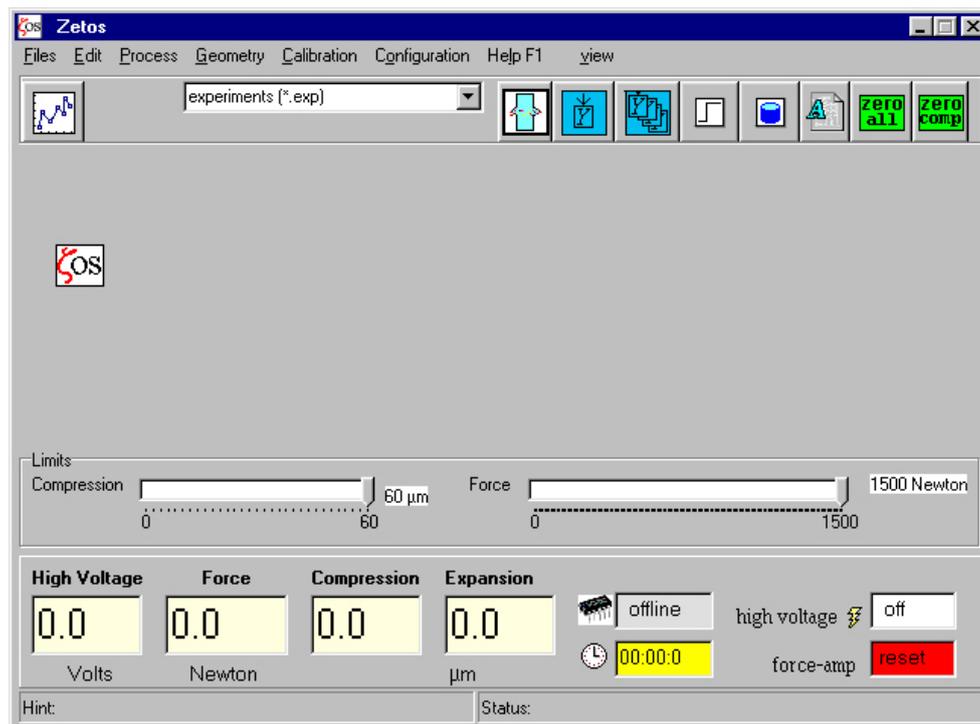
Bevor der PEA die Belastung der Knochenexplantate beginnt, muss ähnlich wie in Kapitel 3.4 die Gewindeschraube so eingestellt werden, dass sämtliche Oberflächen innerhalb der Belastungskammer als auch zwischen Belastungskammer und PEA beziehungsweise Belastungskammer und Zetos-Rahmen in Kontakt stehen. Insgesamt handelt es sich dabei um fünf Grenzflächen:

1. Kontakt zwischen PEA und Belastungspiston
2. Kontakt zwischen Belastungspiston und Knochenexplantat
3. Kontakt zwischen Knochenexplantat und Kammerboden
4. Kontakt zwischen Kammerboden und Zetos-Rahmen
5. Kontaktflächen der Gewindeschraube (zur Einstellung der Vorlast)

Die manuell eingestellte Vorlast dient also dazu, vor der eigentlichen Belastung sämtliche Komponenten jeweils in maximalen Berührungskontakt zu bringen und damit die Reproduzierbarkeit der Belastungen als auch der Ergebnisse zu gewährleisten. Dazu kommt der Ausgleich der rauen Oberfläche der Knochenexplantate um deren Einfluss auf die Belastungsergebnisse zu minimieren. Diese raue Oberfläche (Unebenheiten bis max. 10µm) besteht aus schwachem (weichem) und präparationsbedingt totem Knochenmaterial.

Die gesamte Belastungsprozedur wird über ein Windows<sup>®</sup>-Programm gesteuert, das neben der Applizierung der genannten Signale auch die Auswahl anderer Belastungsformen ermöglicht und die Kreation eigener Stimulationsmuster erlaubt. Auch die übrigen für die Belastung relevanten Parameter sind über diese Benutzeroberfläche steuerbar wie beispielsweise die Stärke oder die Frequenz des Belastungssignals.

Abb.3-13: Die Windows-Benutzeroberfläche zur Steuerung des Zetos



Für den gesamten Versuch ergeben sich für die Belastungsgruppen  $n=23$  Belastungstage. Die Knochenexplantate werden somit 23 mal für jeweils 5 Minuten bei einer Frequenz von 1Hz mit der „Jumping“-Sequenz und der entsprechenden Intensität belastet.

Nach jeder Belastung erscheint auf dem Monitor folgende Darstellung der Messergebnisse.

Abb.3-14: *Beispiel der Messergebnisse einer „Jumping“-Sequenz mit der Intensität 3000 $\mu$ strain*



Die Messergebnisse stellen zum einen die Belastungssequenz mit der daraus resultierenden Kompression graphisch dar, zum anderen werden die zur Kompression benötigte Kraft in Newton und das E-Modul in MegaPascal aufgezeichnet.

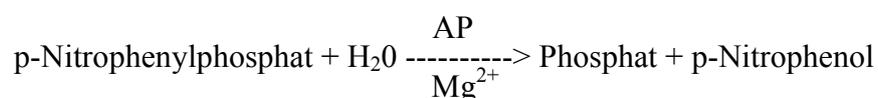
### 3.6 Bestimmung der alkalischen Phosphatase (AP)

Anhand der alkalischen Phosphatase können Rückschlüsse auf die Knochzellaktivität, insbesondere der Osteoblasten, gemacht werden. In diesem Versuch wurde die alkalische Phosphatase immer aus 72 Stunden alten Versorgungsmedium bestimmt. Auf Grund des 24-stündigen Wechsels in den ersten 3 Tagen nach Präparation erfolgte die erste Messung erst am 7. Versuchstag bzw. fünften Belastungstag. Insgesamt resultieren n=7 Messungen der alkalischen Phosphatase für jede Knochenprobe. Der Mediumwechsel in den ersten 3 Tagen diente dem Auswaschen von verbliebenen präparationsbedingtem Zelldetritus. Da die gewonnenen Werte zum einen vergleichbar sein mussten und zum anderen Kostengründe eine Rolle spielten, konnte keine detailliertere Bestimmung erfolgen.

1ml des verbrauchten Mediums wurde mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette in 2ml fassende Einhängegefäße (Sarstett®) pipettiert und anschließend in das Zentrallabor der Universität Marburg zur Messung gebracht. Einige Proben konnten nicht immer zeitgleich zur Abnahme gemessen werden. Bis zum Bestimmungszeitpunkt wurden sie bei -20 °C gelagert. Im Zentrallabor fand die Bestimmung an einem Hitachi 917 statt.

Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase wurde erstmals von BESSEY, LOWRY und BLOCK im Jahre 1946 beschrieben. Dabei wurden p-Nitrophenylphosphat als Substrat und Glycin / NaOH als Puffer verwendet. Durch die Einführung des Diäthanolamin-Puffers wurde die Bestimmung von HAUSAMEN et. al noch verbessert. Die angewandte Methode entspricht der „Optimierten Standardmethode“ nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie von 1972. Das Prinzip entspricht einem Farbtest, was als standardisierte Methode anerkannt ist. Zunächst wird der Probe ein Puffer zugesetzt. Danach erfolgt die Zugabe einer Puffer-Substratlösung, welche den Start der Messreaktion induziert.

Abb.3-15: *Reaktion zur Bestimmung der AP*



Die Alkalische Phosphatase spaltet das p-Nitrophenylphosphat in Gegenwart von Magnesiumionen in Phosphat und p-Nitrophenol. Das photometrisch bestimmte p-Nitrophenol ist proportional zur Aktivität der Alkalischen Phosphatase.

Bei jeder Messung erfolgte auch eine Bestimmung der AP-Konzentration in unverbrauchtem Medium. Diese wurde von den Werten der Knochenproben subtrahiert, um die tatsächliche AP-Konzentration einer jeden Knochenprobe zu erhalten. Auf Grund fehlender anderer AP-produzierender Zellen handelt es dabei um Konzentrationen der knochenspezifischen AP.

### 3.7 Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH)

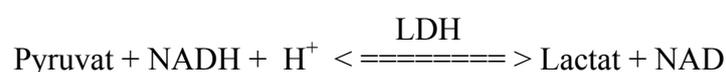
Die Laktatdehydrogenase wird wie auch die alkalische Phosphatase aus dem verbrauchten Medium bestimmt. Dazu wird ebenfalls 1ml dieses Mediums in ein Einhängegefäß pipettiert und zur Bestimmung in das Zentrallabor gebracht. Konnte die Bestimmung nicht sofort erfolgen, wurden die Proben bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Bei dieser Bestimmung wird Lactat als Substrat und NAD als Coenzym genutzt. Diese Methode wurde erstmals von WACKER et al. im Jahre 1956 beschrieben. Sie gilt als „Optimierte Standardmethode“ nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie von 1972.

Das Prinzip beruht auf einem standardisiertem UV-Test. Dabei wird der Probe zunächst Puffer / Pyruvat zugegeben. Zugeführtes NADH startet die Reaktion. Die LDH katalysiert dabei die Umwandlung von Pyruvat zu Lactat. NADH wird dabei zu NAD oxidiert. Die Geschwindigkeit der NADH-Abnahme ist direkt proportional zur LDH-Konzentration und wird photometrisch bestimmt. Analog zur AP-Bestimmung wird auch die Konzentration der LDH im Frischmedium bestimmt. Diese wird von der Konzentration im Verbrauchsmedium der Knochenproben abgezogen. Der so ermittelte Wert stellt die reale LDH-Konzentration für jede einzelne Knochenprobe dar.

Folgende Abbildung stellt die Reaktionsgleichung dar.

Abb.3-16: *Reaktion von Pyruvat zu Laktat unter Kontrolle des Katalysators LDH*



## 3.8 Versuchsende – Aufarbeitung der Knochenproben

### 3.8.1 Fixation der Knochenzylinder

Zum Abschluss des Versuches wurden die Knochenzylinder aus der Kultur-Belastungskammer ausgebaut und in separate flüssigkeitsdurchlässige Kunststoffkästchen (Tissue-Tek Uni-Cassets, Firma Miles, Naperville, Irland) gepackt. Zusätzlich wurde ein mit Bleistift beschriebenes Filterpapierstück hinein gelegt, auf welchem Probennummer und Fixationsmethode zur späteren Identifikation vermerkt wurden. Im Anschluss erfolgte die Fixation der Knochenproben in einem mit 1,4%iger Paraformaldehydlösung gefüllten Becherglas. Die Fixationsdauer betrug 24 Stunden bei 4° C im Kühlschrank unter ständiger Durchmischung mit einem Magnetrührer.

#### Zusammensetzung der 1,4%igen Paraformaldehydlösung:

- 35 ml 8%ige Paraformaldehydstammlösung
- 63 ml Aqua bidest
- 100 ml 0,04 M Phosphatpuffer + 10% Succrose
- pH-Wert Einstellung auf 7,4

#### Zusammensetzung der Bestandteile

- 8%ige Paraformaldehydstammlösung
  - 40 g Paraformaldehyd (Merck, Cat.-No. 4005)
  - gelöst in 500 ml Aqua bidest, erwärmen, Neutral-pH einstellen
  - einfrieren bei -20°C
- 0,04 M Phosphatpuffer + 10% Succrose (pH 7,4)
  - 40 ml 1M Phosphatstammlösung
  - 100 g Succrose (Roth, Cat.No. 9097)
  - 10 ml 10% NaN<sub>3</sub> - Lösung
  - 1 g NaN<sub>3</sub> (Merck, Cat.No. 6544)
  - 10 ml Aqua bidest
  - in 1000 ml Aqua bidest lösen
  - pH-Wert auf 7,4 einstellen

- 1M Phosphatpuffer-Stammlösung
  - 112,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck, Cat No. 106586.0500)
  - 30 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Roth, Cat No. 39044.1)
  - in 1000 ml Aqua bidest lösen

Abschließender Schritt der Fixation ist die Umlagerung der Kunststoffkästchen mit den Knochenproben in die 0,04 M Phosphatpuffer + 10 % Succrose Lösung. Dort werden sie für zweimal 8 Stunden, unter Einsatz eines Magnetrührers, bei 4°C gewaschen. Anschließend erfolgt die Entwässerung der Proben mit der aufsteigenden Alkoholreihe und die Entfettung mit Xylol.

Nachfolgende Tabelle zeigt die Alkoholkonzentrationen und den zeitlichen Ablauf.

Tab.3-2: *Aufsteigende Alkoholreihe zur Probenentwässerung*

1.	Alkohol 70 %	4 Tage, Alkohol wird täglich gewechselt
2.	Alkohol 80 %	1 Tag
3.	Alkohol 90 %	1 Tag
4.	Alkohol 96 %	2 Tage, Alkohol wird täglich gewechselt
5.	Alkohol absolut	1 Tag
6.	Xylol	1 Tag
7.	Xylol	1 Tag

## 3.8.2 Die Einbettung der Knochenproben

### Historisches

Die Einbettung der unentkalkten Knochenproben in einen geeigneten ausreichend festen Kunststoff ist Voraussetzung für die histologische Aufarbeitung. Das für unsere Zwecke eingesetzte Metacrylat wurde erstmals 1941 von PUCKET eingeführt. Dazu bedurfte es besonderer Mikrotome, welche diesen Kunststoff auch schneiden konnten. 1949 gelang dies erstmals mit einem sogenannten Sägemikrotom. Dies ermöglichte aber nur Schnitte bis zu einer Dicke von 25 µm. 1958 wurde durch HIRSCH und BOELLARD dem Metacrylat der Weichmacher Polyethylenglykol zugesetzt. Dies ermöglichte nun Schnittstärken bis zu 10 µm und erlaubte auch den Austausch der Sägemikrotome gegen Mikrotome mit Hartstahlmessern.

### Die Einbettung

Nach dem Abschluss der Fixation erfolgte die Einbettung der Knochenzylinder in Technovit® 9100 New (Kulzer). Dazu musste zunächst die Basis von Technovit® 9100 entstabilisiert werden.

Eine Chromatographie-Säule wird zuerst mit 50 mg Aluminiumoxid gefüllt. Dann lässt man das Technovit® 9100 Basis durchlaufen. Diese Säule kann 3-4 l Basislösung entstabilisieren.

Nach dem Abfüllen in dunkle Schraubflaschen können die Lösungen maximal 4 Wochen bei 4° C aufbewahrt werden. Eine längere Aufbewahrung bedarf einer Temperatur von -15 bis -20°C. Nach Aufbereitung der Basislösung erfolgt die Herstellung der Gebrauchslösungen aus den Technovit® Komponenten 1-5. Nachfolgende Tabelle (3-3) zeigt die Zusammensetzung dieser Lösungen.

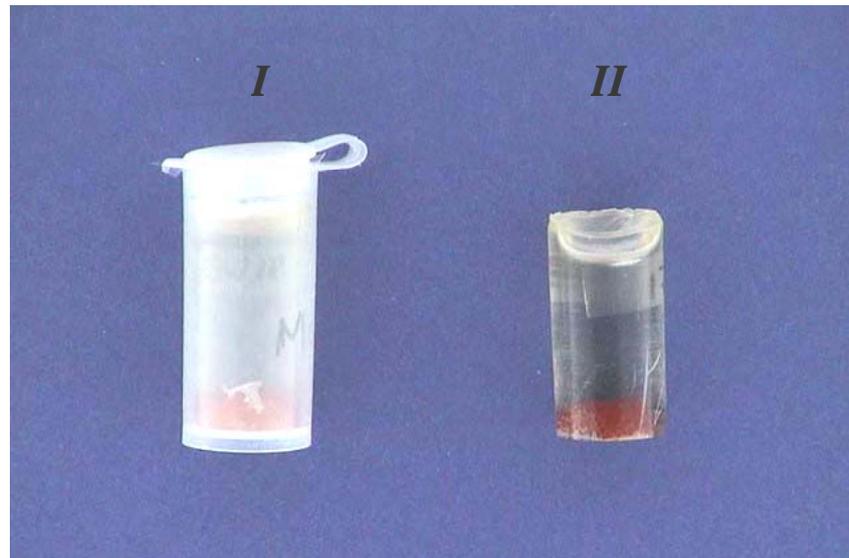
Tab.3-3: Zusammensetzung der Gebrauchslösung

Komponente	1	2	3	4	5	Lagerung
Gebrauchslösung	Basislösung	PMMA-Pulver	Härter 1	Härter 2	Polymerisations-Regler	
Preinfiltration	200 ml		1g			Raumtemperatur
Infiltration	ad 250 ml	20 g	1g / 2g*			4°C
Stammlösung A	ad 500 ml	80 g	3g / 4g*			4°C
Stammlösung B	ad 50 ml			4 ml	2 ml	4°C

\* Bei der Verwendung von stabilisiertem Technovit® 9100 N muss die größere Menge an Härter eingesetzt werden

Die Polymerisationslösung setzt sich aus 9 Volumenanteilen der Stammlösung A und 1 Volumenanteil der Stammlösung B zusammen und sollte unmittelbar nach Herstellung verbraucht werden.

Die Knochenproben werden nun senkrecht in verschließbare Plastikgefäße (2,5/5ml; Fa. Kobe Marburg) gestellt. Anschließend werden diese bis zum Rand mit Polymerisationslösung gefüllt. Danach werden die gefüllten Gefäße in den Exsikkator gestellt und für einige Minuten bei 600mBar evakuiert. Dies dient der Entfernung von Luftblasen, welche beim Einfüllen der Polymerisationslösung mit in die Gefäße gelangt sind. Die Gefäße werden mit einer Folie (Polyethylenfolie; Fa. Kobe Marburg) und dem passenden Deckel luftdicht verschlossen. Für die Auspolymerisation werden die Gefäße für 12 – 48 Stunden bei etwa –20°C in den Gefrierschrank gestellt. Im Anschluss werden die Gefäße der Raumtemperatur ausgesetzt und die auspolymerisierten Blöcke zur weiteren Verarbeitung entnommen.

Abb.3-17: *Eingebettete Knochenpräparate*

I: Knochenpräparat in Einbettungsform

II: auspolymerisierter Block mit Knochenprobe

schemenhaft sind die Identifikationsfilterplättchen zu erkennen

### 3.8.3 Anfertigung histologischer Dünnschnitte

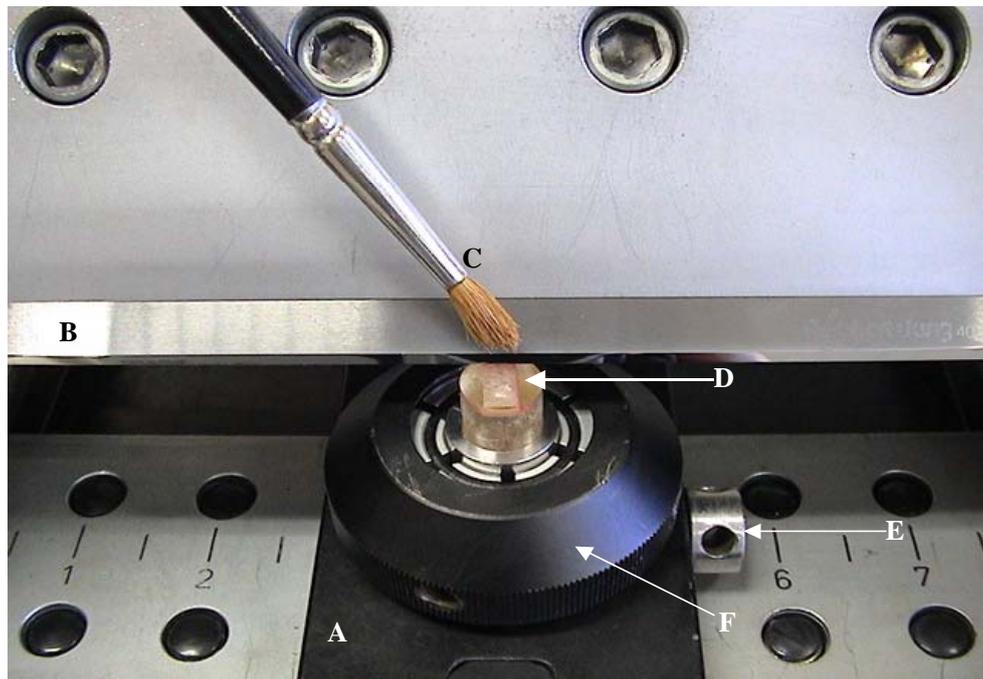
Die histologischen Dünnschnitte wurden mit dem Hartstahlmikrotom „Polycut E“ (Abb. 3-18) der Fa. Reichert-Jung<sup>®</sup> angefertigt. Aus deren Produktsortiment stammen auch die dazu benötigten Hartstahlmesser (Abb.3-18 B ).

Nach dem Einspannen des Messers wird es einem Winkel zwischen 0° und 1° zur Schnittebene fixiert. Die eingebetteten Präparate werden so auf dem Mikrotomschlitten fixiert, dass die Längsachse Richtung Messer zeigt (Abb. 3-18 D ). Bevor der erste Schnitt erfolgte, wurde noch einmal die Festigkeit aller zu fixierenden Schrauben und Gewinde überprüft (Abb.3-18 E,F ).

Zunächst wurde der Schlitten mit dem Präparat unter das Messer gefahren und das Messer, soweit optisch möglich, ganz nah an die Probe geführt. Da deren Oberfläche sehr uneben ist, wurden die obersten Schichten mit einer Schnittstärke von 15 µm abgetragen. Diese Schnitte können mit schon benutzten Schnittflächen gemacht werden,

da diese meist schon kleine Kerben enthalten. Die Geschwindigkeit des automatischen Schneidevorgangs kann dabei etwas höher eingestellt sein. Für die entgültigen Schnitte wählt man eine der Schneideerfahrung angepasste Geschwindigkeit. Des weiteren benötigt man einen weichen Borstenpinsel (Abb.3-18 C ) und 30%igen Alkohol als Schneidflüssigkeit. Probe und Messer müssen damit benetzt werden, damit der 5µm dicke Schnitt sich flach auf das Messer anlegen kann und nicht einrollt. Diese 5µm dicken Schnitte werden mit möglichst noch unbenutzten Messerstellen geschnitten. Man legt während des Schneidens den Pinsel leicht auf die Probe und „fährt“ mit. Sobald der Schnittvorgang beginnt, übt man unter leichtem Druck auf das Präparat eine Zugbewegung Richtung Messer aus und versucht so das Präparat auf das Messer zu ziehen. Nach dem man mehrere Schnitte angefertigt hat, nimmt man eine feine Pinzette und überführt die Schnitte auf die mit Ponal beschichteten Objektträger und streckt sie mit 60%igem Alkohol. Auf einen Objektträger werden jeweils zwei Schnitte aufgebracht und mit einer Beschriftung versehen. Der mit Alkohol angefeuchtete Objektträger wird mit einer Polyethylenfolie (Kulzer®) bedeckt und mit Hilfe eines Tupfers ausgestrichen. Je mehr Alkohol ausgestrichen wird, desto besser hält das Präparat auf dem Objektträger. Danach werden die Objektträger in die Präparatepresse gespannt und für 48 Stunden bei 50°C im Brutschrank getrocknet. Dabei werden zwischen die Objektträger kleine, auf diese zugeschnittene, Filterpapierplättchen gelegt. Bevor die Polyethylenfolien abgezogen werden, müssen die Objektträger auskühlen. Die Präparate können bis zur späteren Entacrylierung in entsprechenden Präparatekästen aufbewahrt werden.

Abb.3-18: Mikrotom mit Hartstahlmesser und Präparatschlitten



*A Präparateschlitten; B Hartstahlmesser; C Pinsel;  
D eingebettetes Knochenexplantat; E,F Feststellgewinde*

### 3.8.4 Beschichtung der Objektträger mit Ponal

Damit die histologischen Schnitte gut auf dem Objektträger haften, bedarf es der Verwendung speziell beschichteter Objektträger. Diese sind aber sehr teuer und zeigten in Vorversuchen nicht die gewünschte Qualität. Das Vertrauen in speziell beschichtete Objektträger kostete ca. **1500** histologische Schnitte und enorm viel Zeit, da die geschnittenen Präparate unter dem chemischen Einfluss der Entacrylierung und verschiedener histologischer Färbeprozeden nicht auf dem Objektträger haften blieben. Aus diesem Grund wurde auf die altbewährte Beschichtung mit einem Ponal–Poly-Lysin–Gemisch zurückgegriffen.

Folgende Stoffe beziehungsweise Materialien wurden dafür benötigt:

- Objektträger (SuperFrost<sup>®</sup> Plus; Art.No. 041300)
- Ponal-Holzleim (Fa. Henkel, Verschluss schwarz/orange)
- Poly-L-Lysin-Lösung 0,1%ig (Fa. Sigma; P 8920)

Ponal und Poly-Lysin wurden dabei in einem bestimmten Verhältnis gemischt.

- 2 Volumenanteile 2%-iges Ponal (gelöst in Aqua bidest)
- 1 Volumenanteil 0,01%-ige Poly-L-Lysin (gelöst in Aqua bidest)

Nach guter Durchmischung dieser Lösung wurden die Objektträger, in einem Objektträgerständer stehend, für 10 min in diese Lösung gestellt. Nach dieser Zeit sollten sie etwa 24 Stunden bei Raumtemperatur trocknen. Das milchige Aussehen nach Beschichtung verschwand bei der Entacrylierung.

### **3.8.5 Entacrylierung der Dünnschnitte**

Ehe die Präparate den unterschiedlichen histologischen Färbungen zugeführt wurden, musste der Einbettungskunststoff entfernt werden. Dieser Vorgang wird auch als Entacrylierung oder Entplastinierung bezeichnet. Eine histologische Färbung ohne diesen Vorgang führt zu unbefriedigenden Ergebnissen, da sich unter anderem der Kunststoff mit anfärbt bzw. der jeweilige Farbstoff den Kunststoff nicht genügend durchdringen kann. Nach der Entacrylierung müssen die Schnitte gleich gefärbt und versiegelt werden. Für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung wurden die Präparate nach Entacrylierung gleich versiegelt.

Tab.3-4: *Durchführungsplan der Entacrylierung*

1.	2-Methoxyethylacetat	20 min
2.	2-Methoxyethylacetat	20 min
3.	2-Methoxyethylacetat	20 min
4.	Äthanol absolut	3 min
5.	Äthanol 96%ig	3 min
6.	Äthanol 80%ig	3 min
7.	Äthanol 70%ig	3 min
8.	Äthanol 50%ig	3 min
9.	Aqua bidest	3 min
10.	Aqua bidest	3 min

Alternativ zur absteigenden Äthanolreihe (4.-8.), welche der Rehydrierung der Präparate dient, können diese auch zweimal für je 5 min in Aceton gestellt werden.

2-Methoxyethylacetat dient dazu den Kunststoff aus den Schnitten zu entfernen (Entplastinierung/Entacrylierung). Es wird als gebrauchsfertige Lösung von der Firma Merck vertrieben. Die absteigende Äthanolreihe dient der Rehydrierung der Präparate und somit der Vorbereitung auf die wässrigen Färbelösungen. Das zweimalige Spülen in Aqua bidest verbessert ebenfalls der Hydratisierung der Präparate.

### 3.8.6 Die histologischen Färbungen der Dünnschnitte

Die Vorschriften für die angewandten Färbungen entstammen einschlägiger histologischer Literatur und können da auch nachgelesen werden. Leider wird dabei fast nur von in Paraffin eingebetteten Präparaten ausgegangen. Hartgewebe wie Knochen oder Zähne werden nicht extra berücksichtigt. Die meisten Vorschriften beziehen sich auf entkalktes Gewebe. Existierende Anleitungen für nicht entkalkte Gewebe sind oft missverständlich oder auf sehr spezielle Problematiken bezogen. Die bei unseren Experimenten angewandten Färbvorschriften bedurften einer großen Anzahl an Tests, Geduld und vor allem Ehrgeiz.

### 3.8.6.1 Die Doppelfärbung nach Hämalaun-Eosin (H&E)

Diese Färbung ist einfach und schnell durchführbar und wird deshalb häufig in der Routine angewandt. Im Gegensatz zu anderen Färbungen lässt sie nur eine dürftige Differenzierung einzelner Gewebearten zu. Sie dient als Übersichtsfärbung mit guter Kerndarstellung. Kerne werden blau gefärbt, übrige Gewebsanteile in verschiedenen Rottönen beziehungsweise Rotabstufungen dargestellt.

#### Das Herstellen der Färbelösung

##### **• Hämalaun**

- 2,5 g Hämatoxylin
- 0,5 g Natriumjodat
- 125 g Aluminiumkaliumsulfat
- 2500 ml Aqua dest.
- 125 g Chloralhydrat
- 2,5 g Zitronensäure

Hämatoxylin, Natriumjodat und Aluminiumkaliumsulfat wurde über Nacht in Aqua bidest gelöst. Anschließend erfolgt die Zugabe von Chloralhydrat und Zitronensäure. Danach wird diese Lösung für 5 Minuten gekocht und schließlich filtriert.

##### **• Eosin**

- 1 ml Certstain Eosin G ( gelblich )
- 100 ml Äthanol (70%)

Das Certstain Eosin G wird im Äthanol gelöst. Die Färbelösung wird vor Gebrauch mit etwas Eisessig angesäuert.

Tab.3-5: Die Färbearbeitung:

1.	Entplasten in 2-Methoxyethylacetat	3x 20 min
2.	Aceton	2x 5 min
3.	Spülen in Aqua dest.	2x 3 min
4.	Einstellen in Hämalaun	30 min
5.	Bläuen in Leitungswasser	10 min
6.	Einstellen in Eosin	5 min
7.	Spülen in Wasser	kurz eintauchen
8.	Aufsteigende Alkoholreihe	kurz eintauchen
9.	Dehydratisieren in Xylol	2x 5 min
10.	Eindecken mit Entellan	

Abb.3-19: *Übersichtsaufnahme in der H&E Doppelfärbung (20x)*

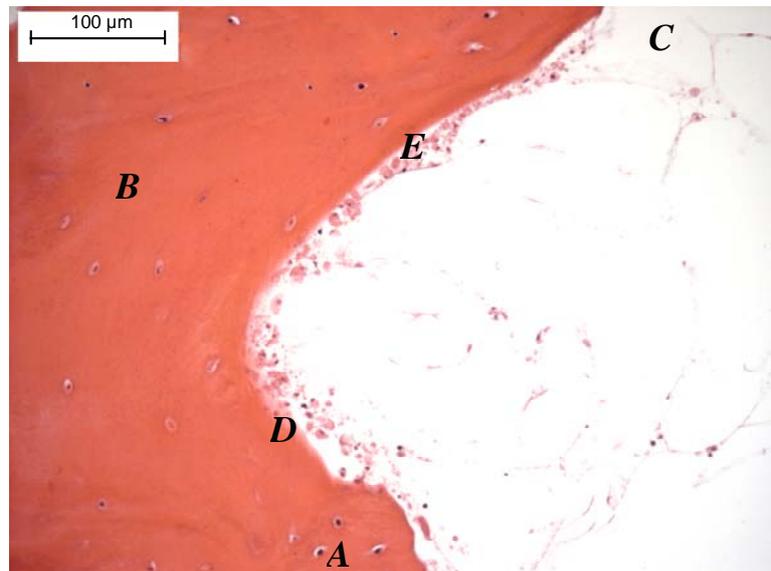
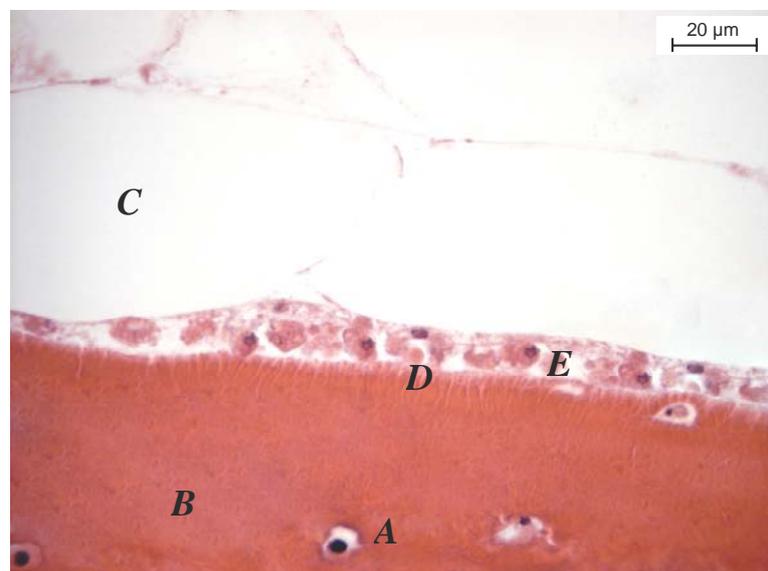


Abb.3-20: *Knochenoberfläche in der H&E Doppelfärbung (63x)*



In den beiden Abbildung sind folgende Strukturen gekennzeichnet:

**A** Osteozyten, **B** mineralisierter Knochen, **C** Fettzelle, **D** Mineralisationsgrenze, **E** Osteoblasten (kuboidale Form und großer runder Kern) und Bone-lining Zellen

### 3.8.6.2 Die Giemsa-Färbung

Der Vorteil der Giemsa-Färbung besteht in der schnellen und einfachen Durchführbarkeit. Sie liefert gute Differenzierungsmöglichkeiten hinsichtlich der Farbkontraste zwischen Zellen und der Interzellulärsubstanz, sowie wie Weich- bzw. Hartgewebe.

In den Präparaten imponiert die mineralisierte Knochenmatrix rosa bis zartrosa, das Kollagen rosa, Osteoid blassblau sowie Zellen und Zellkerne in einem blau unterschiedlicher Farbtöne.

Herstellen der Färbelösung:

- 40 ml Giemsa – Lösung
- 160 ml abgekochtes Aqua bidest

Die Giemsa – Lösung, die vor jeder Färbereihe frisch angesetzt werden sollte, wird mit dem Aqua bidest verdünnt.

Tab.3-6: Die Färbeanleitung

1.	Entplasten in 2-Methoxyethylacetat	3x 20 min
2.	Aceton	2x 5 min
3.	Spülen in Aqua bidest	2x 3 min
4.	Einstellen in Färbelösung (Giemsa)	30 min
5.	Differenzieren in 0,1%iger Essigsäure	kurz eintauchen
6.	Differenzieren in 70%igem Alkohol	kurz eintauchen
7.	Differenzieren in 96%igem Alkohol	kurz eintauchen
8.	Dehydratisieren in Xylol	2x 5 min
9.	Eindecken mit Entellan	

Abb.3-21: *Übersichtsaufnahme eines Giemsa gefärbten Präparats (20x)*

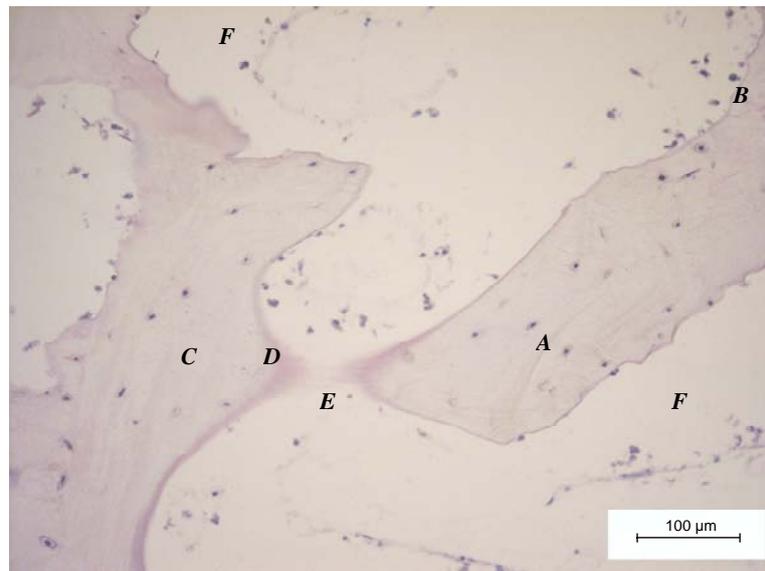
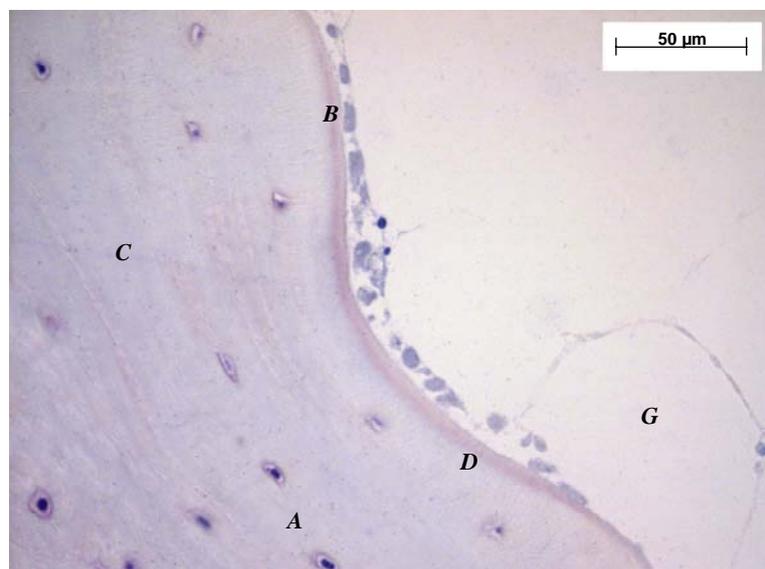


Abb.3-22: *Knochenoberfläche in der Giemsa-Färbung (40x)*



**A** Osteozyten, **B** Osteoblasten (3-20) und Bone Lining Cells (3-21), **C** mineralisierter Knochen, **D** Mineralisationsgrenze, **E** kollagene Leitstrukturen bei Ausbildung einer Osteoidbrücke, **F** Weichgewebsschrumpfung bedingt durch Färbeprozedur, **G** Fettzelle

### 3.8.6.3 Die Färbung mit Toluidin O

Bei der Färbung mit Toluidin O wird zwar nur ein Farbstoff verwendet, doch sie zeichnet sich durch ihre einfache und schnelle Durchführung sowie eine gute Zellfärbung aus. Auf Grund metachromatischer Farbeffekte ist eine gute Gewebsdifferenzierung möglich. Diese Effekte werden noch deutlicher, wenn durch 70%igen und absoluten Alkohol die einzelnen Gewebearten unterschiedlich stark entfärbt werden. Auch diese Färbung eignet sich für Übersichtsaufnahmen.

Die mineralisierte Hartgewebematrix stellt sich ungefärbt bis blassblau dar. Weichgewebe und Zellen zeigen sich in unterschiedlichen Blautönen. Knorpelmatrix und Mastzellgranula erscheinen metachromatisch rot-violett. Die verkalkte Knorpelmatrix ist dunkelblau. Die Mineralisationsgrenzen sind an gekörnten violetten Linien erkennbar [163].

#### •Herstellung der Färbelösung

- 0,3 g Toluidinblau O
- 2,5 g Natriumkarbonat
- 100 ml Aqua bidest

Das Toluidinblau O und das Natriumkarbonat werden unter Verwendung eines Magnetrührers im Aqua bidest gelöst. Vor Gebrauch wird die Färbelösung zweimal durch Filterpapier filtriert.

#### **Tab.3-7: Die Färbeanleitung:**

1.	Entplasten in 2-Methoxyethylacetat	3x 20 min
2.	Aceton	2x 5 min
3.	Spülen in Aqua bidest	2x 3 min
4.	Toluidinblau O Färbelösung	10 min
5.	Spülen in Aqua bidest	kurz eintauchen
6.	Differenzierung in 70%igem Alkohol	kurz eintauchen
7.	Differenzierung in absolutem Alkohol	kurz eintauchen
8.	Xylol	2x 5 min
9.	Eindecken mit Entellan®	

Abb.3-23: *Knochen trabekel in der Übersicht bei Färbung mit Toluidin O (20x)*

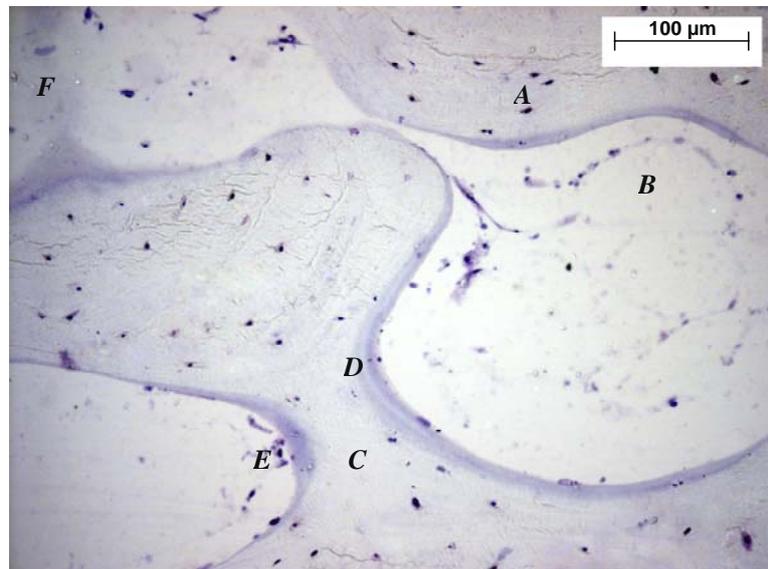
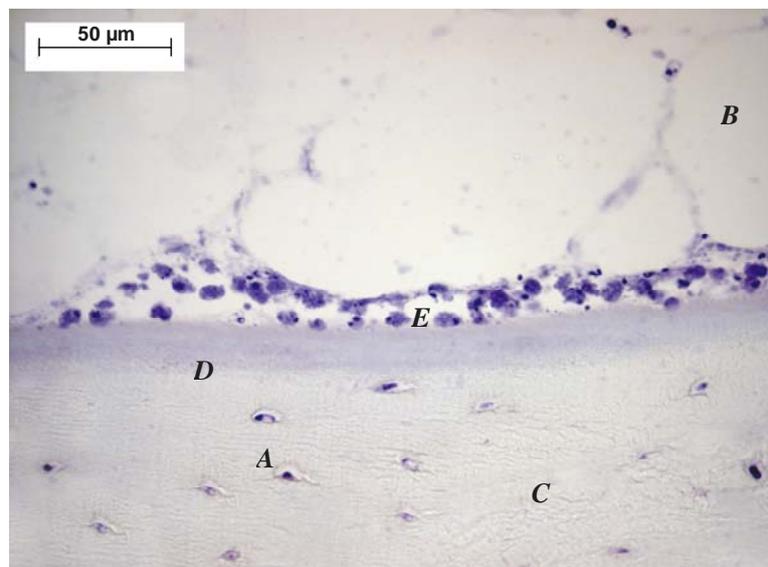


Abb.3-24: *Trabekeloberfläche in Toluidin O Färbung (40x)*



*A* Osteozyten, *B* Fettzelle, *C* Knochenmatrix, *D* Mineralisationsgrenze, *E* Osteoblasten und bone-lining Zellen, *F* Kollagene Leitstrukturen bei entstehender Osteoidbrücke

### 3.8.6.4 Trichromfärbung nach Goldner

Diese Färbung ist eine von multipel existierenden Trichromfärbungen. Sie gehört zu den Standardfärbungen in der Knochenmorphometrie. Die farblich klar unterscheidbare Darstellung von mineralisierter und nicht mineralisierter Knochenmatrix gehört zu ihren besonderen Eigenschaften. Des weiteren zeigt sie eine gute Zellanfärbung.

Mineralisiertes Gewebe und Kollagen stellen sich leuchtend grün, Osteoid rot, Zellkerne blau-schwarz und das Zytoplasma rötlich-braun dar.

Die Färbelösungen und ihre Herstellung

#### • Weigerts Eisenhämatoxylin

Stammlösung: Hämatoxylinlösung

- 1 g Hämatoxylin
- 100 ml 96% iges Äthanol

Das Hämatoxylin wird in Äthanol gelöst. Dabei kann Äthanol leicht erwärmt werden. Erst nach etwa 1 Woche ist die Lösung einsatzbereit.

Stammlösung: Eisenchloridlösung

- 1,5 g Eisen(III)chlorid wasserfrei
- 100 ml Aqua bidest
- 1 ml konzentrierte Salzsäure

Das Eisen(III)chlorid wird in Aqua bidest gelöst und anschließend die Salzsäure zugesetzt.

Als Färbelösung dient eine Mischung beider Stammlösungen im Verhältnis 50:50. Sie sollte erst unmittelbar vor Gebrauch hergestellt werden.

• **Säurefuchsin-Ponceau**

- 0,2 g Ponceau de Xylidine
- 0,1 g Säurefuchsin
- 100 ml Aqua bidest
- 0,6 ml Eisessig

Das Ponceau de Xylidine und das Säurefuchsin werden in Aqua bidest gelöst.  
Der Eisessig wird danach zugesetzt.

• **Phosphormolybdänsäure-Orange G**

- 3-4 g Phosphormolybdänsäure
- 100 ml Aqua bidest
- 2 g Orange G

Die Phosphormolybdänsäure wird in Aqua bidest gelöst und danach das Orange G zugesetzt.

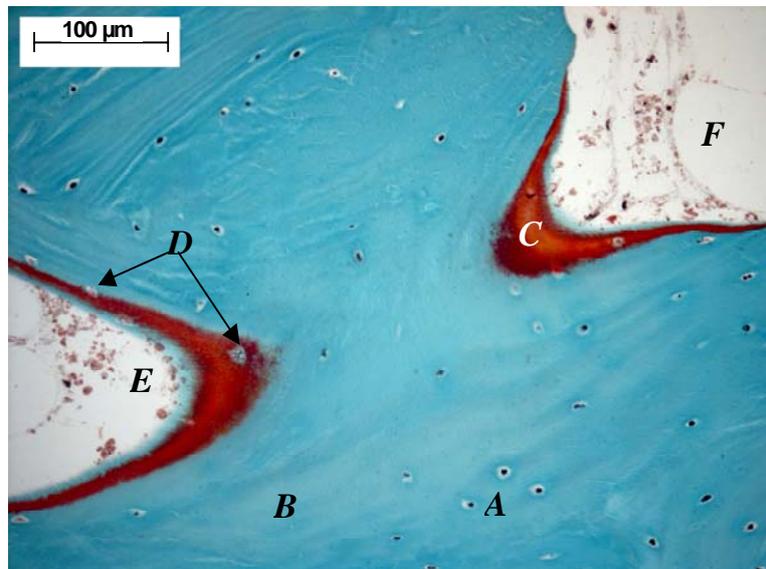
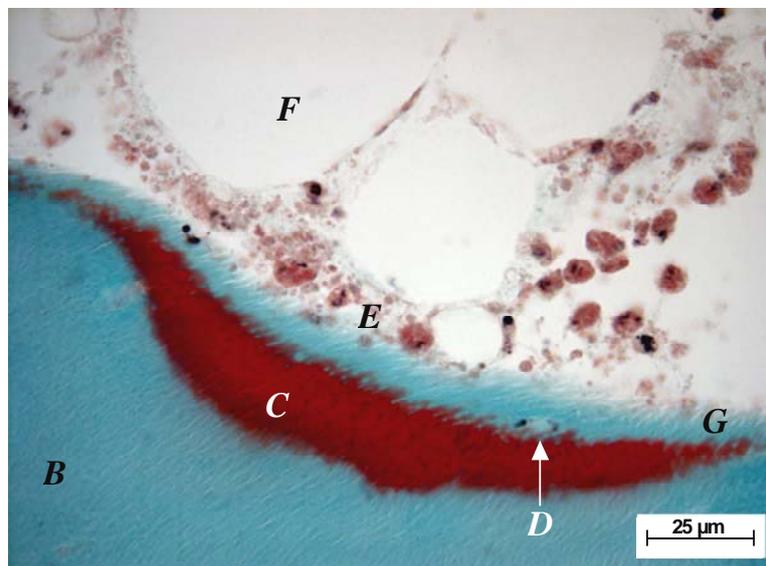
• **Lichtgrün**

- 0,1 – 0,2 g Lichtgrün
- 100 ml Aqua bidest
- 0,2 ml Eisessig

Das Lichtgrün wird im Aqua bidest gelöst und danach der Eisessig zugesetzt.

Tab.3-8: Die Färbearbeitung:

1.	Entplasten in 2-Methoxyethylacetat	3x 20 min
2.	Aceton	2x 5 min
3.	Spülen in Aqua dest.	2x 3 min
4.	Weigerts Eisenhämatoxylin	10 min
5.	Bläuen in Leitungswasser	10 min
6.	Färben in Säurefuchsin-Ponceau	7 min
7.	Abspülen mit 1%iger Essigsäure	kurz eintauchen
8.	Differenzieren in Phosphormolybdänsäure – Orange G	7 min
9.	Abspülen mit 1%iger Essigsäure	kurz eintauchen
10.	Gegenfärben mit Lichtgrün	15 min
11.	Auswaschen mit 1%iger Essigsäure	kurz eintauchen
12.	Aufsteigende Alkoholreihe	kurz eintauchen
13.	Dehydratisieren in Xylol	2x 5 min
14.	Eindecken mit Entellan	

Abb.3-25: *Übersichtsaufnahme in der Trichromfärbung nach Goldner (20x)*Abb.3-26: *Detailaufnahme in der Trichromfärbung nach Goldner (63x)*

In beiden Abbildungen sind folgende Strukturen dargestellt: **A** Osteozyten, **B** mineralisierter Knochen, **C** Osteoid, **D** eingemauerte Osteoblasten (zur späteren Transformation in Osteozyten), **E** Osteoblasten, **F** Fettzelle, **G** kollagene Fasern

### 3.8.6.5 Modifizierte von Kossa – Versilberung (nach Krutsay)

1963 modifizierte KRUTSAY die ursprüngliche Kossa – Versilberung. Seit dem ist sie für kunstharzeingebettete Hartmikrotomschnitte empfohlen. Sie kann außerdem in der Dünnschlifftechnik angewendet werden. Die Versilberung beruht auf einem Ionenaustausch, welcher selektiv alle mineralisierten, vor allem kalziumhaltige, Gewebsanteile feststellt. Dies führt zu äußerst kontrastreichen Darstellungen. Nachteilig ist, dass Unterschiede wie lamelläre oder geflechtartige Kollagenstrukturen überdeckt werden. Von Vorteil ist, dass automatische Bildanalysen hinsichtlich histomorphometrischer Betrachtungen an verkalkter Substanz sehr gut durchführbar sind.

Mineralisierte Knorpel- bzw. Knochengewebe werden tiefschwarz dargestellt. Verschiedene Gegenfärbungen ermöglichen eine Darstellung von Osteoid, Zellen und Weichgewebe. Die Mineralisationsgrenzen zeigen sich schwarz granuliert.

Für die Gegenfärbung wurden die Farbstoffe der Trichrom–Goldner–Färbung angewendet, bei welcher Osteoid rot, Zellkerne blau-schwarz und Zytoplasma rötlich-braun dargestellt werden.

Die Zusammensetzung der Färbelösungen

#### **• 5%ige Silbernitratlösung**

- 5 g Silbernitrat (Merck 1512)
- 100 ml Aqua bidest

Das Silbernitrat wird im Aqua bidest gelöst. Die fertige Lösung wird lichtgeschützt aufbewahrt.

#### **• Natriumkarbonat – Formaldehyd – Lösung**

- 10 g Natriumkarbonat
- 50 ml wasserfreie Formaldehyd – Lösung (37%ig)
- 150 ml Aqua bidest

Das Natriumkarbonat wird im Aqua bidest gelöst und der Formaldehydlösung zugesetzt.

**• Natriumthiosulfat – Lösung**

- 7 g Natriumthiosulfat
- 133 ml Aqua bidest

Das Natriumthiosulfat wird im Aqua bidest gelöst.

**• Kernechtrot-Färbelösung**

- 0,2 g Kernechtrot
- 200 ml 5%ige wässrige Aluminiumsulfatlösung

Die Aluminiumsulfatlösung wird zunächst zum Kochen gebracht, anschließend wird das Kernechtrot eingerührt. Die erhaltene Lösung wird für weitere 10 min gekocht und nach Erkalten filtriert.

Tab.3-9: Die Färbearbeitung

1.	Entplasten in 2-Methoxyethylacetat	3x 20min
2.	Aceton	2x 5 min
3.	Aqua bidest	2x 3 min
4.	in Silbernitratlösung einstellen	30 min
5.	Spülen in Aqua bidest	3x kurz eintauchen
6.	Reduzieren in Natriumkarbonat – Formaldehyd	8 min
7.	Spülen in Aqua bidest	10 min
8.	Fixieren in Natriumthiosulfat	5 min
9.	Spülen in Leitungswasser	15 min

## Gegenfärbung mit Farbstoffen der Trichrom–Goldner–Färbung

10.	Weigerts Eisenhämatoxylin	10 min
11.	Bläuen in Leitungswasser	10 min
12.	Färben mit Säurefuchsin – Ponceau	7 min
13.	Spülen mit 1%iger Essigsäure	kurz eintauchen
14.	Differenzieren in Phosphomolybdänsäure – Orange G	7min
15.	Spülen mit 1%iger Essigsäure	kurz eintauchen
16.	Gegenfärbung mit Lichtgrün	15 min
17.	Spülen mit 1%iger Essigsäure	kurz eintauchen
18.	Aufsteigende Alkoholreihe	kurz eintauchen
19.	Dehydratisieren in Xylol	2x 5 min
20.	Eindecken mit Entellan®	

**Kernechtrot ist eine weitere Möglichkeit für eine Gegenfärbung.**

10.	in Aqua dest. wässern	
11.	Einstellen in Kernechtrot	45 min
12.	Spülen in Aqua dest.	
13.	Aufsteigende Alkoholreihe	
14.	Xylol als Intermedium	2x 5 min
15.	Eindecken mit Entellan	

Vorversuche mit der Kernechtrot-Gegenfärbung lieferten einen sehr schwachen Kontrast zwischen mineralisiertem und nicht mineralisiertem Gewebe, sodass im weiteren Verlauf auf diese Methode verzichtet wurde.

Abb.3-27: *Knochenoberfläche in der v. Kossa Färbung und Gegenfärbung mit Trichrom-Goldner Farbstoffen (40x)*

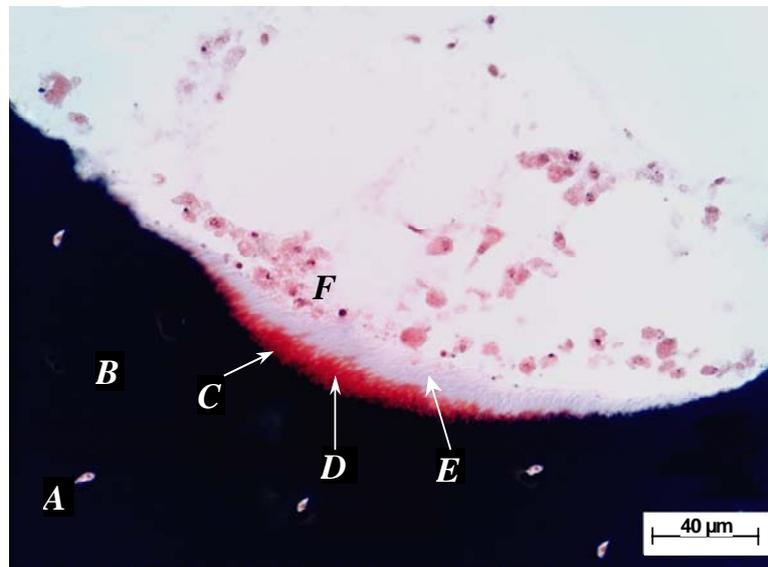
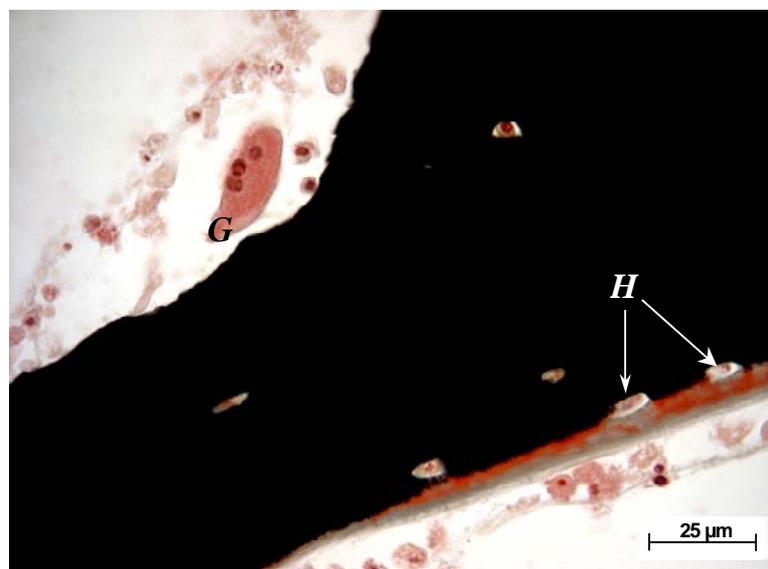


Abb.3-28: *Umbauvorgänge am Knochen trabekel in der v. Kossa Färbung und Gegenfärbung mit Trichrom-Goldner Farbstoffen (63x)*



*A* Osteozyten, *B* mineralisierte Matrix, *C* Mineralisationsgrenze,  
*D* Osteoid, *E* Kollagen, *F* Osteoblasten, *G* Osteoklast,  
*H* Einmauerung von Osteoblasten

In Abbildung 3-28 können wunderbar die Umbauvorgänge am Knochen beobachtet werden. Auf der einen Seite wird Knochen durch Osteoklasten abgebaut und auf der anderen Seite wird Knochen aufgebaut. Dabei werden sogar Osteoblasten eingemauert, welche später zu Osteozyten transformieren. Offenbar findet hier gerade eine Anpassung auf die neue Belastungsform statt (z.B. Knochen im Rind vs. Knochen in der Belastungskammer). Generell können diese Vorgänge auch auf der gleichen Seite stattfinden.

### 3.8.6.6 Färbung mit Alcianblau-PAS

Mit dieser Färbung können saure Glykosaminoglykane und neutrale Polysaccharide differenziert werden. Hauptsächlich in Polysacchariden kommen bestimmte Atomgruppen vor, welche durch die verwendete Perjodsäure zunächst aufgespalten und danach zu Aldehyden oxidiert werden. Diese Aldehyde reagieren mit fuchsin-schwefliger Säure (Schiff'sches Reagenz), was zu einer deutlich roten Anfärbung führt. Mit dieser Methode können Polysaccharide, neutrale Glykosaminoglykane, Muko- und Glykoproteine, Glykolipide, ungesättigte Fettsäuren und Phospholipide nachgewiesen werden. Eine genaue Differenzierung zwischen den Stoffen ist dabei aber nicht möglich. Vitale Zellen können Glukose in Form von Glykogen speichern, wenn Glukose im Nährmedium ausreichend vorhanden ist und dieses Nährmedium die Zellen auch erreicht. Glykogen dient als Energiespeicher. Saure Glykosaminoglykane zeigen sich blaugrün. Zellkerne sind blau. Glykogen und auch Glykoproteine stellen sich dunkel purpurrot dar.

Die Herstellung der Färbelösungen

#### • Alcianblau – Lösung

- 1 g Alcianblau wird in
- 100 ml 3%ige Essigsäure gelöst

**• 0,5%ige Perjodsäure**

- 10 ml 0,2 M Natriumacetat – Lösung  
(0,272 g Natriumacetat werden in 10 ml Aqua bidest gelöst)
- 0,8 g Perjodsäure
- 20 ml Aqua bidest
- 70 ml Äthanol absolut

Die Perjodsäure wurde im Aqua bidest gelöst und die Natriumacetat-Lösung zugegeben. Diese Lösung mischt man mit dem Äthanol. Zur Aufbewahrung gibt man die fertige Lösung in eine braune verschließbare Flasche und bewahrt sie, vor Licht geschützt, auf. Sollte sich diese Lösung braun verfärben, muss sie neu angesetzt werden.

**• Schiff'sches Reagenz***Stammlösung I*

- 5 g Pararosanilin werden in
- 150 ml 1 N Salzsäure gelöst

*Stammlösung II*

- 5 g Natriumdisulfit werden in
- 850 ml Aqua bidest gelöst.

Beide Stammlösungen werden im Verhältnis 50:50 gemischt und anschließend bei Raumtemperatur 24 Stunden stehen gelassen. Nach dieser Zeit versetzt man die Lösung mit 3g Aktivkohle, schüttelt sie für etwa 2 Minuten und filtriert abschließend.

**• Hämalaun – Lösung**

- 2,5 g Hämatoxylin
- 0,5 g Natriumjodat
- 125 g Aluminiumkaliumsulfat

- 2500 ml Aqua bidest
- 125 g Chloralhydrat
- 2,5 g Zitronensäure

Hämatoxylin, Natriumjodat und Aluminiumkaliumsulfat werden im Aqua bidest gelöst (12-24 Stunden). Chloralhydrat und Zitronensäure werden anschließend zugeben. Nach 5 minütigem Aufkochen der Lösung wird schließlich filtriert.

Tab.3-10: Die Färbearbeitung

1.	Entplasten in 2-Methoxyethylazetat	3x 20min
2.	Einstellen in Azeton	2x 5 min
3.	Spülen in Aqua bidest	2x 3 min
4.	Einstellen in 3%ige Essigsäure	3 min
5.	Einstellen in Alcianblau – Lösung	2 Stunden
6.	Spülen in Leitungswasser	5 min
7.	Einstellen in Perjodsäure	30 min
8.	Spülen in Leitungswasser	5 min
9.	Einstellen in Schiff'sches Reagenz	45 min
10.	Spülen in Leitungswasser	10 min
11.	Einstellen in Hämalaun	10 min
12.	Bläuen in Leitungswasser	10 min
13.	aufsteigende Alkoholreihe	kurz eintauchen
14.	Dehydratisieren in Xylol	2x 5 min
15.	Eindecken mit Entellan®	

Abb.3-29: *Osteozyten (A) und Osteoblasten (B) mit gespeichertem Glykogen (63x)*

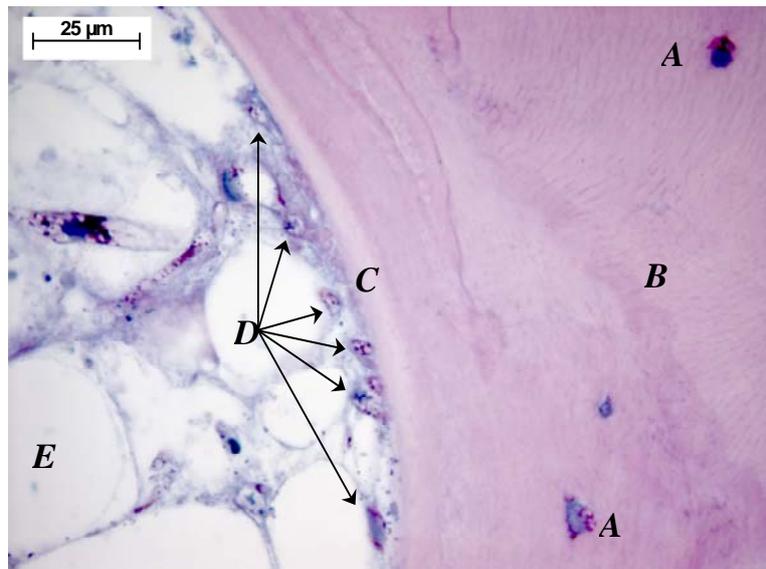
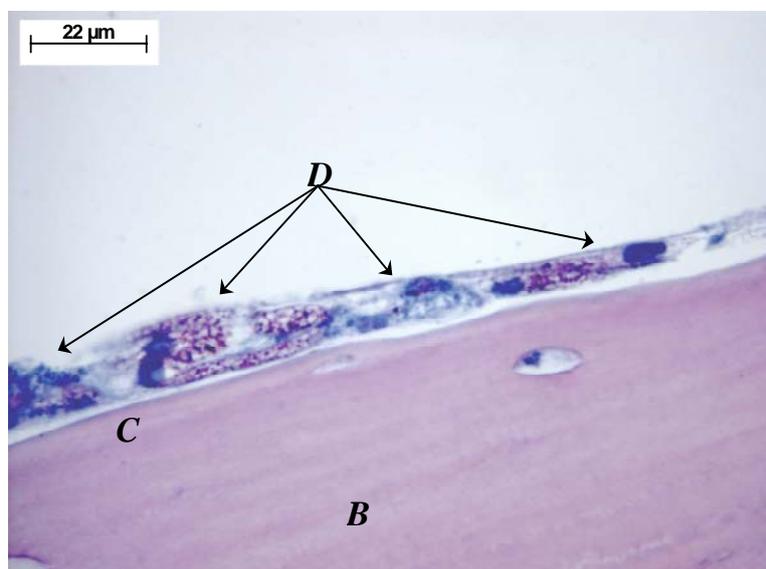


Abb.3-30: *Bone-lining Zellen und Osteoblasten (D) mit gespeichertem Glykogen (78x)*



*A* Osteozyten, *B* mineralisierte Matrix, *C* Osteoid,  
*D* Osteoblasten beziehungsweise Bone-lining Zellen, *E* Fettzelle

### 3.8.6.7 Enzymhistochemische Darstellung von alkalischer und saurer Phosphatase in Konchenzellen

Bei dieser Methode werden Alkalische und Saure Phosphatase in den Knochenzellen dargestellt. Die alkalische Phosphatase färbt sich in den Osteoblasten blau. Die saure Phosphatase in Osteoklasten stellt sich rot dar. Die Kerne stellen sich auf Grund der Gegenfärbung mit Methylgrün grünlich schimmernd dar.

Ansatz der Reaktionslösungen

#### **• Reaktionslösung für Alkalische Phosphatase**

- 50 ml 0,1 M Tris-Puffer (pH 9,4)
- 50 mg Echtblau Salz
- 25 mg Naphtol-AS-BI-Phosphat  
(gelöst in 0,5 ml DMSO/Triton X 100)

#### **• Reaktionslösung für Saure Phosphatase**

- 50 ml 0,1 M Natriumazetat-Puffer (pH 5,6)
- 500 µl Hexonium-Pararosanilin  
(250µl 4%iges Pararosanilin in 2N HCl + 250µl 4% Natriumnitrit  
in Aqua bidest; 1min vortexen, 5min reagieren lassen)
- 25 mg Naphtol-AS-BI-Phosphat (gelöst in 0,5 ml DMSO/Triton X 100)

#### **• Methylgrün**

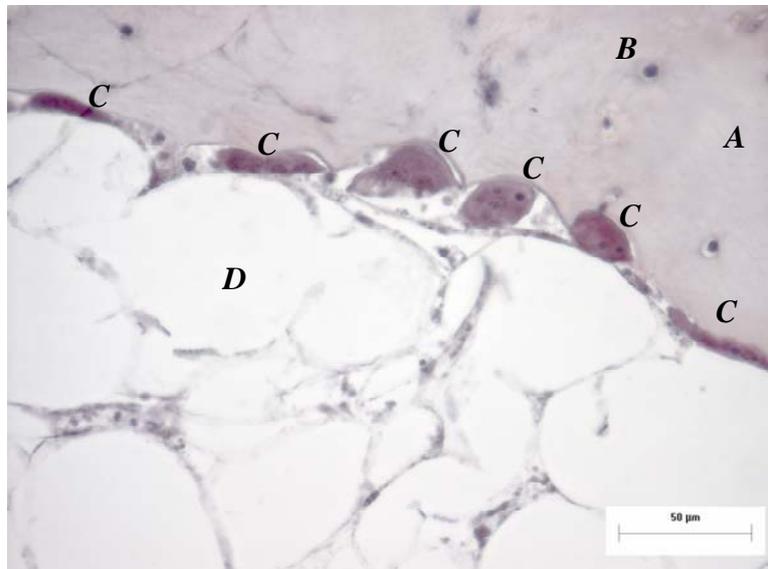
- 0,5 g Methylgrün
- 100 ml Aqua bidest
- 25 ml Ethanol absolut

Das Methylgrün wird im Aqua bidest gelöst. Anschließend erfolgt Zugabe von Äthanol absolut.

Tab.3-11: Die Färbearbeitungen für Alkalische und Tartrat-Resistente Saure Phosphatase

1.	Entplasten mit 2-Methoxyethylacetat	3x 20 min
2.	Dehydrieren in 70%igen Ethanol	1x 5 min
3.	Dehydrieren in 40%igen Ethanol	1x 5 min
4.	spülen in Aqua bidest	kurz eintauchen
5.	spülen in 0,1 M Tris-Puffer (pH 9,4)	10 min/Raumtemp.
6.	Inkubation in Reaktionslösung für Alk. Phosphatase	2 h / 37°C
7.	spülen in Aqua bidest	kurz eintauchen
8.	spülen in 0,1 M Acetat-Puffer (pH 5,6)	10 min/ Raumtemp.
9.	Inkubation in Reaktionslösung für saure Phosphatase	1 h / 37°C
10.	spülen in Aqua bidest	kurz eintauchen
11.	Nachfixieren in 4% Formalin	2-3 h / Raumtemperatur
12.	spülen in Leitungswasser	kurz eintauchen
13.	Gegenfärbung mit Methylgrün	
14.	Eindecken mit Entellan®	

Abb.3-31: *Enzymhistochemische Darstellung der Sauren Phosphatase (rot) in Osteoklasten (63x)*



*A* mineralisierter Knochen, *B* Osteozyten, *C* Osteoklasten,  
*D* Fettzellen

### 3.8.7 Die polychrome Sequenzmarkierung

Um Rückschlüsse über die dynamischen Um- und Anbauprozesse zu erhalten, werden die Knochenproben während des Experiments zweimal mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die erste Markierung findet am 10. Versuchstag (8.Belastungstag) mit Kalzein statt. Dieser Farbstoff stellt sich in der Fluoreszenzmikroskopie grün dar. Die zweite Markierung findet am 19. Versuchstag (17.Belastungstag) mit Alizarin statt. Dieser Farbstoff stellt sich in der Fluoreszenzmikroskopie orange-rot dar.

Die Herstellung der Kalzeinfärbelösung

• **Stammlösung:**

- 45 mg Calcein (Sigma; Lot: 65H0986)
- 100 ml H<sub>2</sub>O

Das Calcein wird mittels eines Magnetrührers im Wasser gelöst.

• **Gebrauchskonzentration:**

- 45µg Calcein/ml Medium

• **Perfusionslösung für eine Knochenprobe:**

- 800 µl Stammlösung
- 7,2 ml Medium (ohne FCS)

Die Herstellung der Alizarinfärbelösung

• **Stammlösung:**

- 60 mg Alizarin Complexone (ICN Biomedicals Inc.; Cat. No.: 195027)
- 10 ml NaCl 0,9 %ig (Braun; Ch.-B. 1476A95)

Das Alizarin wird mittels Magnetrührer in NaCl gelöst. Der pH-Wert wird auf 6,9 eingestellt. Danach wird die Lösung steril unter dem Abzug filtriert.

• **Gebrauchskonzentration:**

- 60µg Alizarin/ml Medium

• **Perfusionslösung für eine Knochenprobe:**

- 80 µl Alizarin-Stammlösung in

- 7,9 ml Medium (ohne FCS)

Die Perfusionslösung wird in Rundbodengläser abgefüllt. Unmittelbar nach der E-Modul Messung und Belastung der Knochenzylinder wird die Perfusionslösung an das System angeschlossen. Die Calzeinperfusionslösung wird für 4 Stunden und die Alizarinperfusionslösung für 2,5 Stunden an das System angeschlossen.

Nach dieser Zeit werden die Knochen zweimal mit Medium ohne FCS für jeweils 45 Minuten gespült. Dieser Vorgang dient dazu, noch verbliebene Perfusionslösung aus dem System zu waschen. Nach dem Spülen wird wieder Versorgungsmedium (mit FCS) an das System angeschlossen.

Abb.3-32: Calzeinbande mit aufgelagertem Osteoid (20x)

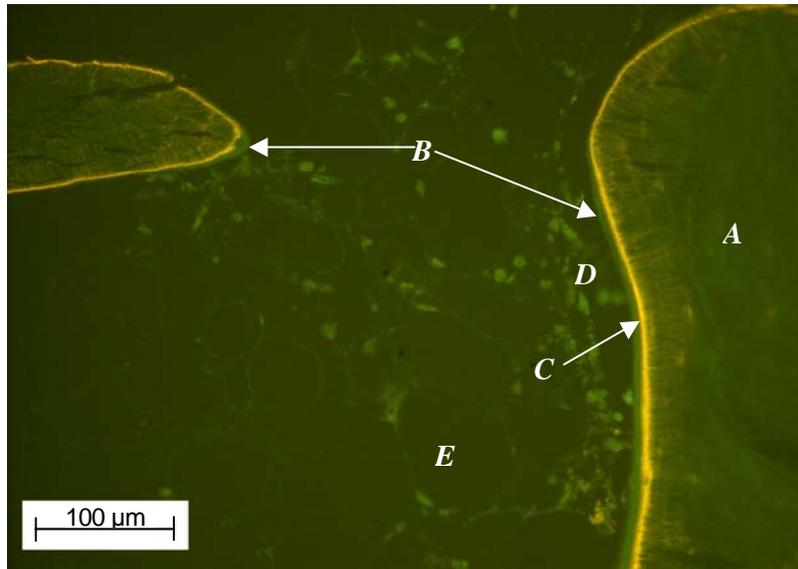
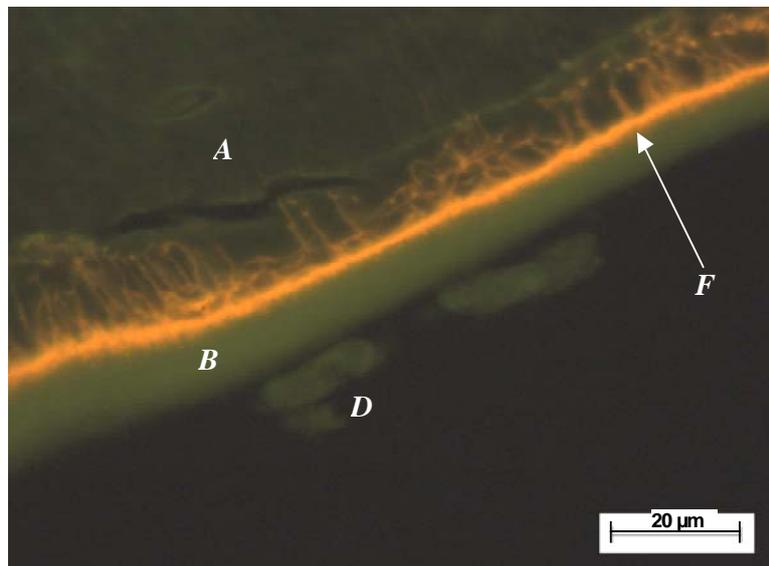


Abb.3-33: Alizarinbande mit aufgelagertem Osteoid (63x)



**A:** mineralisierter Knochen, **B:** Mineralisationsfront,  
**C:** Calzeinbande, **D:** Knochenzellen, **E:** Fettzelle, **F:** Alizarinbande

### 3.8.8 Immunhistochemische Detektion apoptotischer Osteozyten

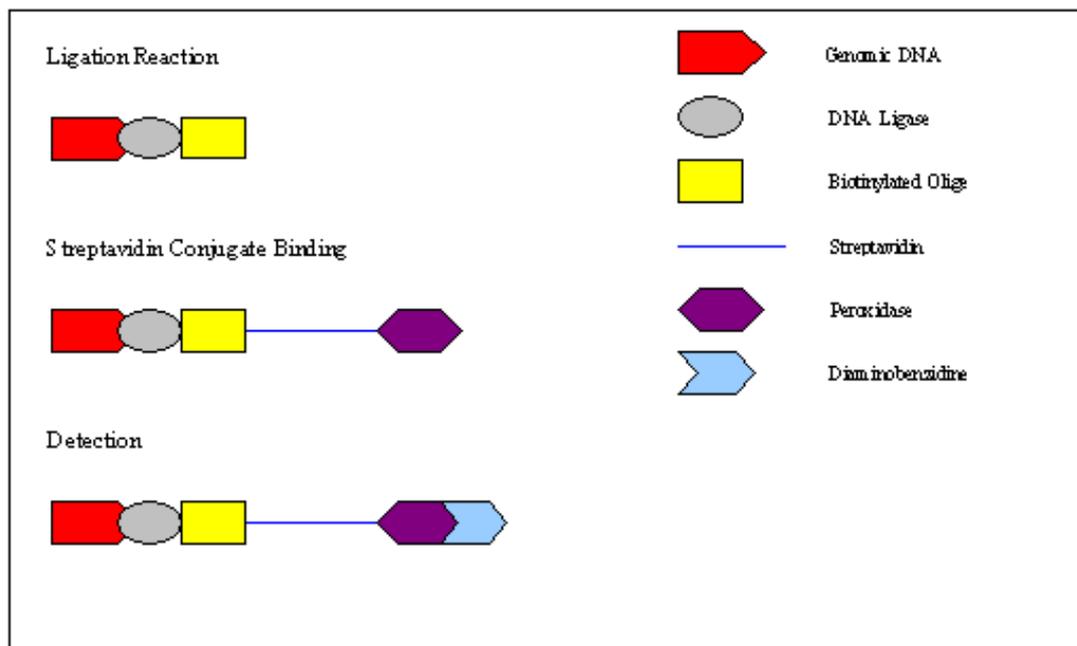
Für die Darstellung apoptotischer Osteozyten wurde der ApopTag *In Situ Oligo Ligation (ISOL)* Kit der Firma Intergen<sup>®</sup> Company verwendet. Er basiert auf der biochemischen Spezifität der T4 DNA-Ligase. Diese bindet kovalent an ein exakt komplementäres Ende eines doppelsträngigen DNA-Molekül-Paares. Bei diesen Enden handelt es sich zum einen um das Ende der genomischen DNA der Probe und zum anderen um das Ende der synthetischen biotinidierten Oligonukleotide des ISOL-Kits. Die Detektion dieser gebundenen DNA-Abschnitte erfolgt durch zusätzliche Anbindung eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugates. Dieses begünstigt die Anlagerung von Diaminobenzadin (DAB), welches lichtmikroskopisch sichtbar wird.

Die T4 DNA-Ligase bindet dabei mit biotinmarkierten Oligonukleotiden spezifisch an DNase1-typische Enden, die nur bei Aktivierung Apoptose-spezifischer Endonukleasen entstehen. Somit ist eine gute Differenzierbarkeit zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen oder anderweitig geschädigten Zellen gewährleistet. Der ApopTag ISOL Kit verhindert somit die zufällige Markierung zerstörter DNA besser als die TUNEL-Methode, die falsch-positive Ergebnisse und Hintergründe verursachen kann. Vitale Osteozyten stellen sich blau-violett dar. In Apoptose begriffene Zellen imponieren braun.

Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wurde ebenfalls ein Rattendarmpräparat gefärbt, von dem bekannt war, dass es viele apoptotische Zellen enthält und wie sich diese darstellen.

Es sei jedoch erwähnt, dass hier nur eine von mehreren möglichen Methoden zur Darstellung apoptotischer Zellen in nicht entkalktem Knochen getestet wurde. Eine weiter gehende Untersuchung des Apoptoseverhaltens von Knochenzellen wäre aus finanziellen und zeitlichen Gründen nicht möglich gewesen. Dies könnte ein Thema für eine weitere Arbeit darstellen.

Abb.3-34: Reaktionsschema bei Anwendung des ApopTag ISOL-Kit



### Anwendung des ApopTag In Situ Oligo Ligation Kit:

Tab.3-12 Die Anleitung

#### • Entacrylierung

1.	Entplasten in 2-Methoxyethylacetat	3x 20 min
2.	Absteigende Alkoholreihe	
3.	Spülen in Aqua dest.	2x 3 min
4.	Spülen in PBS	5 min

#### • 3%ige Wasserstoffperoxid-Lösung

- 20 ml 30%ige Wasserstoffperoxid-Lösung werden mit 180 ml PBS verdünnt.

5.	Einstellen in Wasserstoffperoxid	5 min
6.	Spülen mit PBS	
7.	Waschen mit Aqua dest.	2x 2 min

• **Proteinase K** (100 µl / Objektglas)

- Die Proteinase K Stammlösung wird mit PBS auf eine Gebrauchskonzentration von 50 µg/ml verdünnt.

8.	Einstellen in Proteinase K	15 min
9.	Spülen mit PBS	
10.	Waschen mit Aqua dest.	2x 2 min

• **Äquilibrationspuffer**

11.	Auftragen des Äquilibrationspuffers	in feuchter Kammer 30min
12.	Spülen mit PBS	

• **Oligonukleotid-Ligase Lösung** ( 60 µl / Objektglas )

- Entsprechend der Fragestellung werden pro Objektglas 45 µl Oligo A- oder Oligo B -Lösung mit 6 µl T<sub>4</sub> DNA Ligase Enzym vermischt.

Bei der Negativ-Kontrolle wird statt der T<sub>4</sub> DNA Ligase der Äquilibrationspuffer verwendet. Die Positiv-Kontrollen werden analog mit den zu detektierenden Präparaten behandelt.

13.	Auftragen der Oligonukleotid-Ligase Lösung	in feuchter Kammer 10–16 Std.
14.	Spülen mit PBS	
15.	Waschen mit Aqua dest.	3x 10 min

**• Streptavidin-Peroxidase** ( 60  $\mu$ l / Objektglas )

16.	Auftragen der Streptavidin-Peroxidase	in feuchter Kammer 30min
17.	Spülen mit PBS	
18.	Waschen mit PBS	3x 5 min

**• Peroxidase Substrat** ( 75  $\mu$ l / Objektglas )

- 73,5  $\mu$ l Diaminobenzidin (DAB) Verdünnungs-Puffer werden mit 1,75  $\mu$ l DAB Substrat vermischt.

19.	Auftragen des Peroxidase Substrates	in feuchter Kammer 10min
20.	Spülen mit PBS	
21.	Waschen mit Aqua dest.	2x 2 min

• **Gegenfärbung mit Hämalaun** ( Herstellung der Hämalaun-Lösung s. Kap.3.8.6.1)

22.	Einstellen in Hämalaun	30 min
23.	Bläuen in Leitungswasser	10 min
24.	Aufsteigende Alkoholreihe	
25.	Dehydratisieren in Xylol	2x 5 min
26.	Eindecken mit Entellan	

Abb.3-35: Darstellung Vitaler Osteozyten (63x)

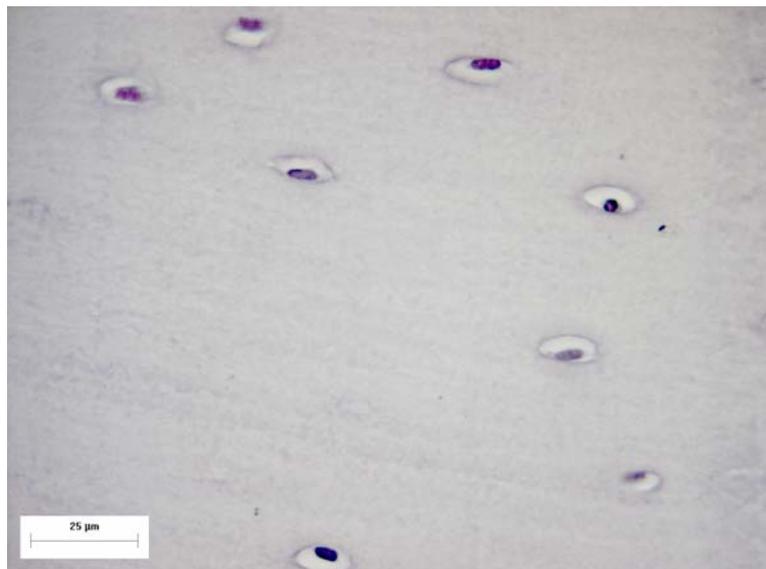


Abb.3-36: *Darstellung apoptotischer Osteozyten (126x)*

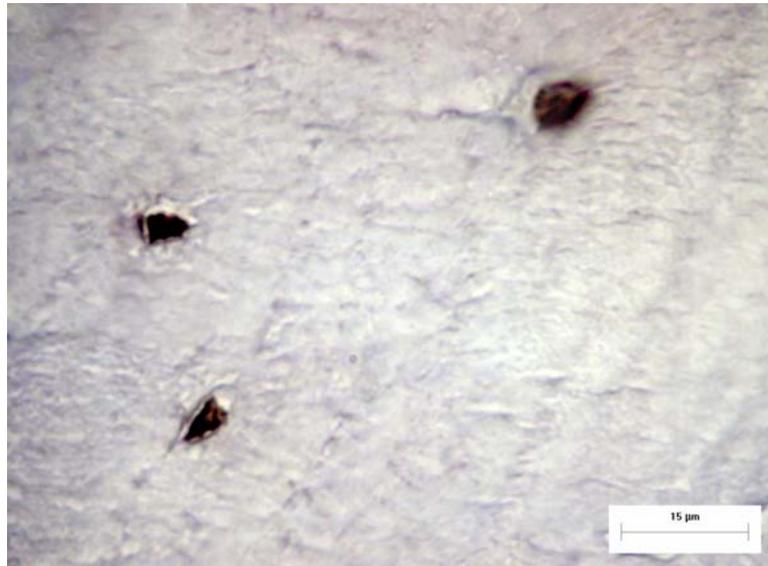
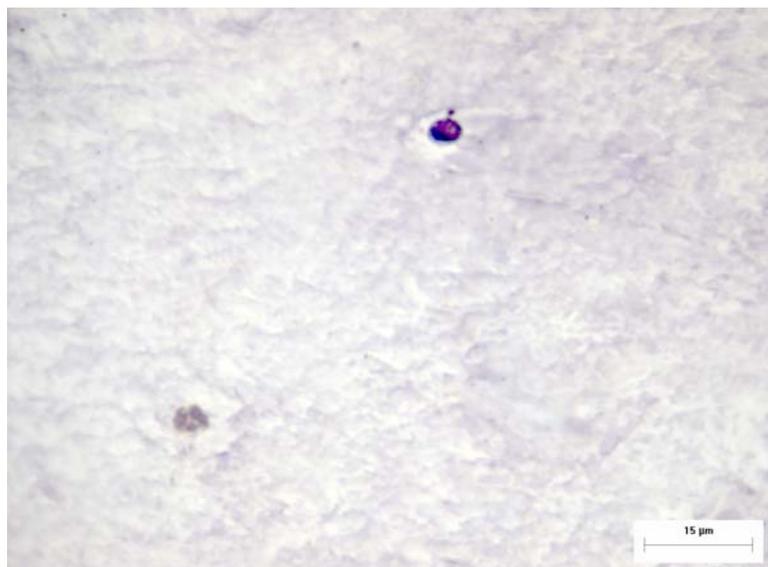


Abb.3-37: *Apoptotischer Osteozyt (braun) und vitaler Osteozyt (blau-violett) unmittelbar nebeneinander (107,1x)*



### 3.8.9 Das Eindecken der Präparate

Nach Durchführung verschiedener histologischer Färbetechniken erfolgt das Eindecken der Präparate mit einem Deckgläschen. Als Deckmittel wurde Entellan<sup>®</sup> neu (Merck; Cat.No. 107961) verwendet. Dadurch ist es möglich die Färbungen über mehrere Jahre stabil zu halten.

Mit Hilfe eines Glasstabes wird ein kleiner Tropfen auf das Deckgläschen gesetzt. Dieses wird nun schräg auf den Objektträger zugeführt. Sobald das Deckmittel mit dem Objektträger in Berührung gekommen ist, wird das Deckgläschen langsam komplett auf den Objektträger gelegt. Nun wird es an einer Seite leicht festgehalten und mit Hilfe eines stäbchenförmigen Gegenstandes oder dem Finger unter leichtem Druck nach der Gegenseite ausgestrichen. Sinn und Zweck ist es, dass Deckmittel einerseits gleichmäßig zu verteilen und andererseits alle noch vorhandenen Luftbläschen zwischen Objektträger und Deckgläschen auszustreichen. Das Eindeckmittel kann für alle entwässerten, mikroskopischen Präparate verwendet werden.

Da am Ende jeder Färbereihe das Xylol steht und auch in Entellan<sup>®</sup> Xylol enthalten ist, sollte der Eindeckvorgang unter einem Abzug geschehen. Wenn zwischen Deckgläschen und Objektträger etwas Eindeckmittel hervor quillt, kann dieses problemlos mit einem xylolgetränktem Läppchen entfernt werden. Getrocknete Präparate können im Anschluss mikroskopiert werden.

### 3.9 Materialverzeichnis

#### *Präparation der Knochenzylinder*

- Chirurgische Handsäge
- Diamantbandsäge mit 2mm Sägeband; EXAKT Apparatebau GmbH
- Standbohrmaschine; PROXXON PF 360
- Hohlbohrer diamantbesetzt; T.Pohl, Marburg
- Inlochsäge; LEITZ 1600
- Zellkulturschalen; NUNC, Cat.No. 168381
- Rundbodengläser (Klarglas); Art.Nr. 3301953
- Reservoirstopfen mit Ein- und Ausfluss; T.Pohl, Marburg
- Schraubreagenzgläser 15ml; FALCON, Cat.No. 352095
- Rotator; HEIDOLPH, Reax 2
- Rollpumpe / 24 Kanal-Kassettenpumpe; ISMATEC IPC
- Kulturbelastungskammer; T.Pohl, Marburg
- Kammerzubehör; T.Pohl, Marburg
- Verbindungsschläuche; TYGON Masterflex, Cat.No. 06419-13
- Pumpenschlauch; PHARMED, Cat.No. 070539-08
- Luer-Konnektoren; NOVODIREKT, B95956
- Schlauchkonnektor; ARI
- Sterilwerkbank; GELAIRE BSB4
- NaCl 0,9%; FRESENIUS, Art.Nr. 0431061/00

#### *Earle`s Waschmedium*

- Earle`s Salt Solution 10x; BIOCHROM KG, Cat.No. L1925
- NaHCO<sub>3</sub> (6%); MERCK, Cat.No.106329

#### *Earle`s Waschmedium mit Antibiotikum*

- Earle`s Salt Solution 10x; BIOCHROM KG, Cat.No. L1925
- Amphotericin B; SIGMA, Cat.No. A2942
- Penicillin / Streptomycin; BIOCHROM KG, Cat.No. A221
- NaHCO<sub>3</sub>(6%); MERCK, Cat.No.106329

***Dulbecco`s Mod. Eagle Medium (DMEM high-glucose) mit 10% FCS***

- DMEM; GIBCO BRL, Cat.No. 52100-039
- L-Glutamin; PAA, Cat.No. M11-004
- Vitamin C; WAKO, Cat.No. 013-12061
- Sodium Hydrogen Carbonat; MERCK, Cat.No. 6329
- $\beta$ -Glycerophosphat Disodium Hydrate; SIGMA, Cat.No. G-9891
- HEPES Pulver; SIGMA, Cat.No. H-3375
- Penicillin / Streptomycin; BIOCHROM KG, Cat.No. A2213
- FCS; BIOCHROM KG, Cat.No. S511

***PBS Dulbecco***; BIOCHROM KG, Cat.No. L182-50

***Kultur- und Belastungssystem***

- ZETOS; D.B.Jones, Marburg; E.L.Smith, Wisconsin
- Elektronische Module; PHYSIK INSTRUMENTE
- Kultur- und Belastungskammer; T.Pohl, Marburg
- Reservoirstopfen mit Ein- und Ausfluss; T.Pohl, Marburg
- Rollpumpe / 24Kanal-Kassettenpumpe; ISMATEC IPC
- Verbindungsschläuche; TYGON Masterflex, Cat.No. 06419-13
- Pumpenschlauch; PHARMED, Cat.No. 070539-08
- Luer-Konnektoren; NOVODIREKT, B95956
- Schlauchkonnektor; ARI
- Mediumreservoir; Rundbodengläser (Klarglas), Art.Nr. 3301953

***AP- / LDH-Bestimmung***

- 2ml – Einhängegefäße; SARSTEDT
- Pipette; GILSON, Pipetman
- Messgerät: HITACHI 917

### ***Fixation der Knochenpräparate***

- Paraformaldehyd; MERCK, Cat.No. 4005
- Sucrose; ROTH, Cat.No. 9097
- $\text{NaN}_3$ -Solution; MERCK, Cat.No. 6544
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; MERCK, Cat.No. 106586.0500
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; ROTH, Cat.No. 39044.1

### ***Einbettung der Knochenpräparate***

- Technovit 9100N; KULZER, Cat.No. 7413
- Aluminiumoxid; MERCK, Cat.No. 1076
- Probenbehälter mit Deckel 2,5 / 5ml; Fa. KOBE
- Polyethylenfolie; KULZER
- Exsikkator; HERAEUS

### ***Ponalbeschichtung der Objektträger***

- Objektträger; SUPERFROST Plus, Art.Nr.041300
- Ponallösung; HENKEL, Verschluss schwarz/orange
- Poly-L-Lysinlösung 0,1%; SIGMA, Cat.No. P8920

### ***Anfertigen der Dünnschnitte***

- Hartschnittmikrotom Polycut E; REICHERT-JUNG
- Hartstahlmesser; REICHERT-JUNG
- Borstenpinsel; JOF, SUND0
- Polyethylenfolie; KULZER
- Präparatepressen; T.Pohl, Marburg
- Brutschrank; MEMMERT

### ***Entacrylierung***

- 2-Methoxyethylacetat; MERCK, Cat.No. 8.06061
- Äthanol abs.; RIEDEL-DE HÄEN, Cat.No. 32205
- Xylol; MERCK, Cat.No. 1.08681
- Aceton; ROTH, Cat.No. 9372.2
- Äthanol 96%; AWT, 451/1

## ***Histologie („Routinefärbungen“)***

### ***Trichromfärbung nach Goldner***

- Hämatoxylin
- Eisen(III)chlorid
- Konz. Salzsäure
- Ponceau de Xylidine
- Säurefuchsin
- Eisessig
- Phosphormolybdänsäure
- Orange-G und Lichtgrün

### ***Giemsa-Färbung***

- Giemsa-Lösung

### ***Toluidin O-Färbung***

- Toluidin O
- Natriumkarbonat

### ***Kossa-Versilberung nach Krutsky***

- Silbernitrat
- Natriumkarbonat
- 37%ige Formaldehydlösung
- Natriumthiosulfat
- Kernechtrot
- 5%ige Aluminiumsulfatlösung

### ***Doppelfärbung nach Hämalaun-Eosin***

- Hämatoxylin
- Natriumjodat
- Aluminiumkaliumsulfat
- Chloralhydrat
- Zitronensäure
- Certstain Eosin G

### ***Alcianblau-PAS***

- Alcianblau
- 3%ige Essigsäure
- Natriumazetat
- Perjodsäure
- Pararosanilin
- 1N Salzsäure
- Natriumdisulfit
- Hämatoxylin
- Natriumjodat
- Aluminiumkaliumsulfat
- Chloralhydrat
- Zitronensäure

### ***Enzymhistochemie***

#### ***Alkalische und Saure Phosphatase***

- Tris; SIGMA, Cat.No. T1503
- Natriumacetat; ROTH, Art.No. 6773.1
- Eisessig; MERCK, Cat.No. 1.00063
- Echtblau-Salz; SIGMA, Cat.No. F8761
- Naphthol-AS-BI-Phosphat; SIGMA, Cat.No. N-2250
- Hexonium-Pararosanilin; MERCK, Cat.No. 1.07509
- Natriumnitrit; MERCK, Cat.No. 6544
- Formaldehyd; MERCK, Cat.No. 1.04002
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; MERCK, Cat.No. 6346
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; MERCK, Cat.No. 6586
- Methylgrün; MERCK, Cat.No. 1.15944

#### ***Polychrome Sequenzmarkierung***

- Calcein; SIGMA; Cat.No. C-0875
- Alizarin Complexone; ICN BIOMEDICALS INC., Cat.No. 195027
- 0,9%ig NaCl; BRAUN, 1476A95

## ***Immunhistochemie***

### ***Detektion apoptotischer Osteozyten***

- Apop Tag *In Situ Oligo Ligation (ISOL) Kit*; INTERGEN COMPANY

### ***Eindecken der Präparate***

- Entellan neu; MERCK, Cat.No. 107961
- Kaisers Glyceringelatine; MERCK, Cat.No. 109242
- Deckgläschen; MENZELGLÄSER

### ***Mikroskop; LEITZ, Aristomet***

### ***Digitalkamera; LEICA DC 300***

### ***pH-Meter; INOLAB, WTW***

### 3.10 Auswertung und Statistik

Die statistische Auswertung der hier dargestellten Ergebnisse wurde vom Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Als Programm wurde SAS Release 8.0 verwendet.

Sämtliche Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit dazugehörigen Standardabweichungen graphisch dargestellt.

Zur statistischen Analyse von Effekten der Belastung über die Zeit wurde ein allgemeines lineares gemischtes Modell für Beobachtungen mit Messwiederholungen für unbalancierte Daten zugrunde gelegt. [164] (Entwicklung des E-Moduls, Laktatdehydrogenase, Alkalische Phosphatase, pH-Wert)

Die Belastungen und die Zeit wurden als feste Effekte betrachtet. Da dieses Modell normalverteilte Daten voraussetzt, wurde zunächst eine Logarithmustransformation der Daten durchgeführt. Dieser Schritt führt zu einer Annäherung an die Normalverteilung. Zunächst wurde ein globaler Test auf Unterschiede zwischen den Gruppen und gegebenenfalls den Zeitpunkten durchgeführt. Angegeben wird jeweils die Prüfgröße F und der p-Wert. Ein p-Wert  $< 0,05$  weist auf allgemein signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen hin.

Der Vergleich einzelner Gruppen wurde mit linearen Kontrasten nach Tukey durchgeführt. Auf Grund der Vielzahl der Gruppen musste eine alpha-Adjustierung der Daten für multiples Testen durchgeführt werden. Dies hatte zur Folge, dass es beim Vergleich einzelner Gruppen zu nicht signifikanten Unterschieden kam.

Für die Auswertung der Osteoidmessungen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit sechs Belastungsstufen durchgeführt [164]. Auch in diesem Fall wurden die Ergebnisse zunächst logarithmiert, um eine Normalverteilung der Daten zu gewährleisten.

Für die Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde ein Signifikanzniveau von  $\alpha = 0,05$  zugrunde gelegt und somit Ergebnisse mit  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant gewertet.

## 4 Ergebnisse und Auswertung

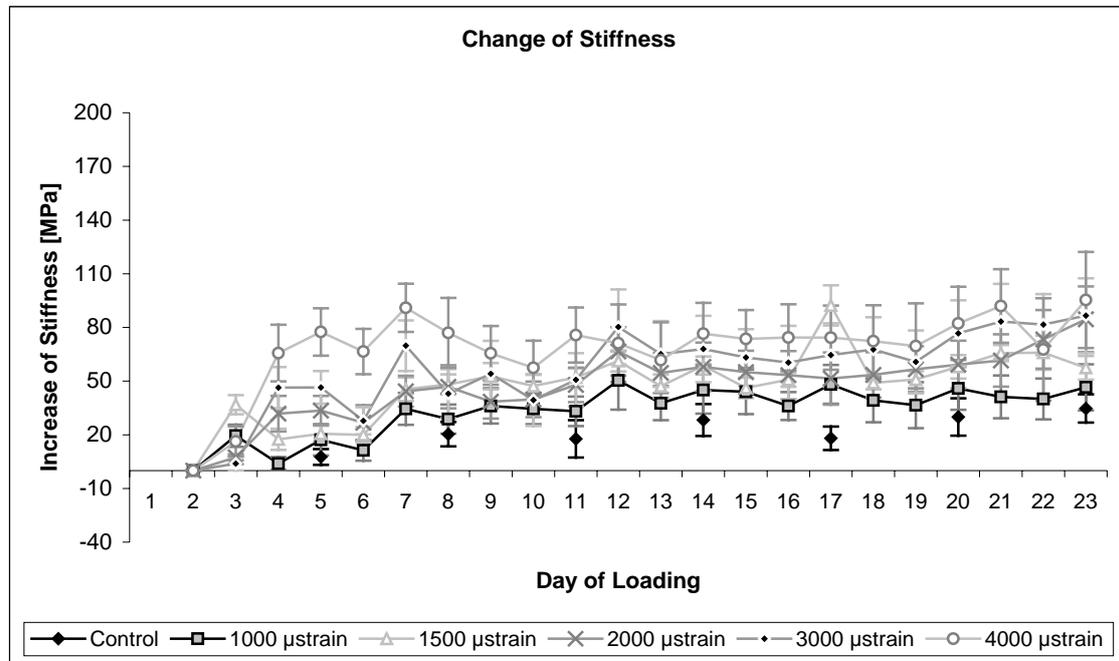
### 4.1 Die Steifigkeit der Knochenexplantate (E-Modul)

Die Steifigkeit bzw. das E-Modul wurde an jedem Belastungstag jeweils vor der dynamischen Stimulation einer jeden Probe bestimmt. Diese Reihenfolge kam bei dem Versuch erstmalig zum Einsatz. Dabei lieferte die erste Messung entweder keine oder nicht zu deutende Ergebnisse. Um die Proben keiner unnötigen zusätzlichen Belastung durch die Steifigkeitsmessung auszusetzen, wurde auf eine erneute Bestimmung verzichtet und die Ergebnisse des ersten Belastungstages verworfen. Bei 23 Belastungstagen ergeben sich demnach  $n=22$  Messungen für jede belastete Probe. Die Proben der Kontrollgruppe wurden nach jeweils 3 Tagen (72 Stunden) auf ihre Steifigkeit hin untersucht. Damit liegen für diese Gruppe  $n=8$  Bestimmungen zur Auswertung vor.

Die Gruppeneinteilung sowie die in den Gruppen verwendete Belastungsintensität ist in Kapitel 3.3 (S.52) dargestellt.

In den folgenden Abbildungen sind die Veränderungen der gemittelten Steifigkeiten der einzelnen Gruppen, über den Versuchszeitraum betrachtet, dargestellt.

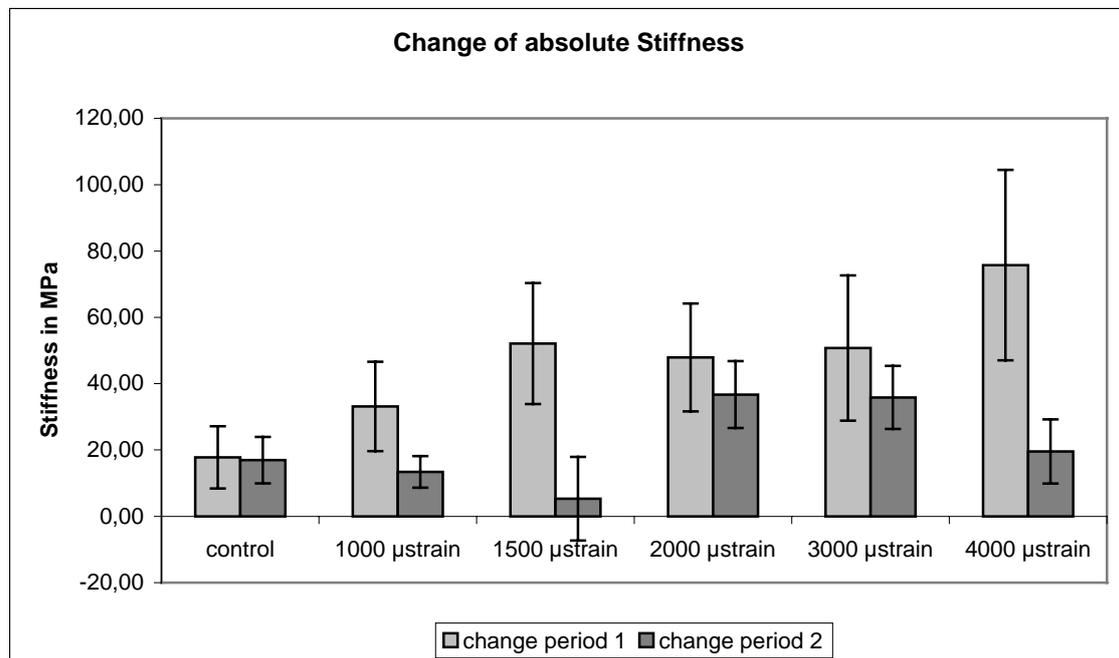
Abb.4-1: *Arithmetische Mittel (n=8) bei 22 Messtagen für belastete Gruppen bzw. 8 für die Kontrollgruppe. Veränderung der Steifigkeit und Standardabweichungen.*



Bei Betrachtung des gesamten Versuchszeitraums, kommt es in allen Belastungsgruppen zu einem Anstieg der Steifigkeit.

Es fällt weiterhin auf, dass auch die Steifigkeit der Kontrollgruppe zunimmt. Im Vergleich zu den Belastungsgruppen ist diese Zunahme eher gering und hält ein recht konstantes Niveau. Eine Steifigkeitsabnahme ist nicht zu beobachten. Die Belastungsgruppe 4000µstrain erfährt in relativ kurzer Zeit eine maximale Steifigkeitszunahme. Danach schließt sich eine Plateauphase an. Diese Beobachtung deckt sich mit Vorversuchen, bei denen auch mit einer Maximalbelastung von 4000µstrain gearbeitet wurde. Die Gruppen mit den Belastungsintensitäten 2000 und 3000µstrain erfahren hingegen über den gesamten Versuch eine gleichmäßig starke kontinuierliche Steifigkeitszunahme. Dennoch ist auffallend, dass etwa bis zur Hälfte der Versuchzeit (Tag 11-12 change period 1) die Zunahme der Steifigkeit stärker ausgeprägt ist als in der zweiten Versuchshälfte (change period 2). Dieser Sachverhalt soll in der folgenden Abbildung noch einmal deutlich gemacht werden.

Abb.4-2: Veränderung der arithmetischen Mittel der Steifigkeit im beschriebenen Zeitraum



Die hell unterlegten Säulen zeigen die mittlere Steifigkeitszunahme in der ersten Versuchshälfte. Die dunkel unterlegten Säulen zeigen die Änderung der Steifigkeit in der 2. Versuchshälfte.

Die kontinuierliche Zunahme der Steifigkeit in der Kontrollgruppe wird deutlich. Die erreichte Endsteifigkeit ist aber insgesamt geringer, als in den anderen Gruppen. Die Gruppen mit der Maximalbelastung von 1000 und 1500µstrain zeigen im weiteren Versuchsverlauf nur eine schwach kontinuierliche Steifigkeitszunahme, welche aber geringer ist, als in der Kontrollgruppe. Auch die Gruppe mit 4000µstrain zeigt nur eine geringe Zunahme der Steifigkeit in der 2. Versuchshälfte, wobei zu beachten ist, dass diese Gruppe die größte aller Steifigkeitszunahmen in der ersten Versuchshälfte aufweist. Die größten Zunahmen der scheinbaren Steifigkeit in der zweiten Versuchshälfte zeigen die beiden Gruppen mit der Maximalbelastung von 2000 und 3000µstrain.

Der Test auf Unterschiede zwischen den 6 Gruppen ergab einen signifikant globalen Gruppeneffekt mit einer Prüfgröße  $F=18,04$  und  $p=0,0001$ , sowie einen signifikant globalen Zeiteffekt mit der Prüfgröße  $F=68,61$  und  $p=0,0001$ . In den Einzelvergleichen mittels linearer Kontraste ergab sich beim Vergleich zwischen den Gruppen folgendes Bild.

Vergleich der Gruppen	p-Wert	Signifikanz
0 und 1	> 0.05	nein
0 und 2	0.0002	ja
0 und 3	0.0128	ja
0 und 4	0.008	ja
0 und 5	0.0005	ja
1 und 5	0.0098	ja
andere Gruppen untereinander	> 0.05	nein

Alle Belastungsgruppen, außer Gruppe 1, unterscheiden sich signifikant von der Kontrollgruppe. Bei den Belastungsgruppen unterscheiden sich nur Gruppe 1 und Gruppe 5 signifikant voneinander. Die Vergleiche zwischen den anderen Belastungsgruppen lieferten keine signifikanten Unterschiede.

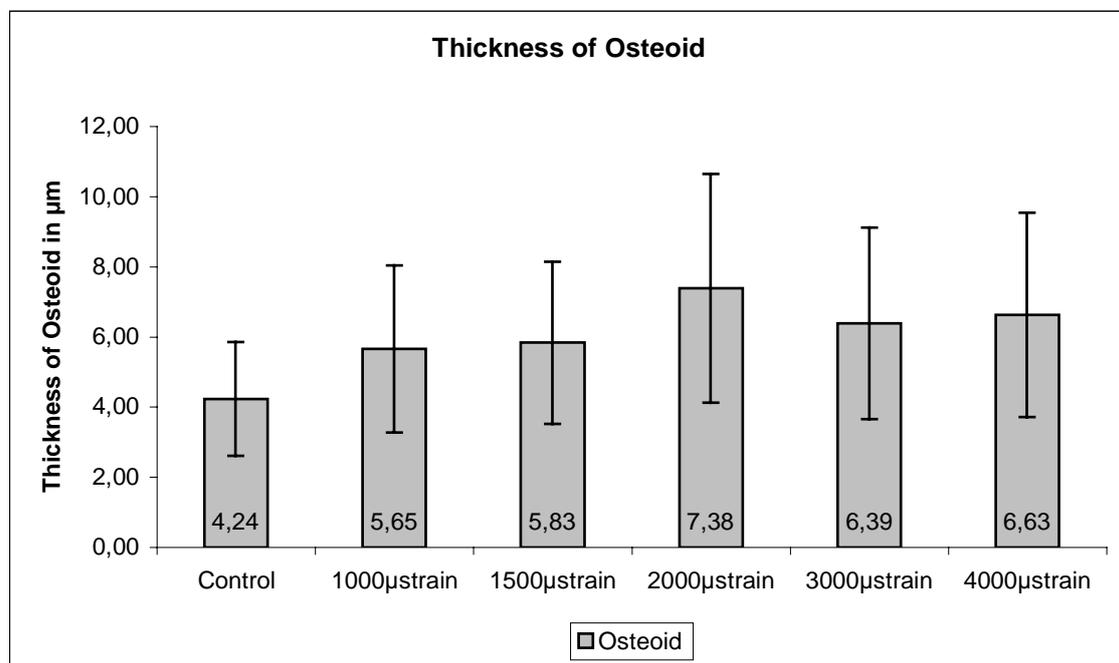
Bei Betrachtung der Steifigkeitszunahmen in der ersten Versuchshälfte ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Belastungsgruppe 4000 $\mu$ strain mit  $p=0,0198$ . Für die Steifigkeitszunahmen in der zweiten Versuchshälfte ergibt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen.

## 4.2 Das Osteoid

Die Ausmessung der Osteoidbanden erfolgte unter Benutzung des Programms Image<sup>®</sup>ProPlus manuell. Um zwischen mineralisierter Knochensubstanz und Osteoid unterscheiden zu können, wurden die histologischen Präparate einer jeden Belastungs- und Kontrollprobe mit der Trichromfärbung nach Goldner (Material und Methoden) angefärbt. In dieser stellt sich Osteoid rot und mineralisierte Knochensubstanz grün dar. Unter Verwendung von Image<sup>®</sup>ProPlus wurden jeweils acht Gesichtsfelder eines jeden Präparates bei einer 100fachen Vergrößerung ausgewertet.

Anschließend wurde aus den gemessenen Werten das arithmetische Mittel einer jeden Probe und das einer jeden Gruppe gebildet. Die Gruppen wurden einander gegenübergestellt, verglichen und in folgender Abbildung graphisch dargestellt.

Abb.4-3: *Arithmetische Mittel der Osteoidauflagerung und Standardabweichung*



Die stärkste Osteoidauflagerung zeigt die Gruppe mit der Maximalbelastung von  $2000\mu\text{strain}$ , gefolgt von den Gruppen mit  $3000\mu\text{strain}$  bzw.  $4000\mu\text{strain}$ . Die geringsten Osteoidauflagerungen waren in der Kontrollgruppe zu beobachten.

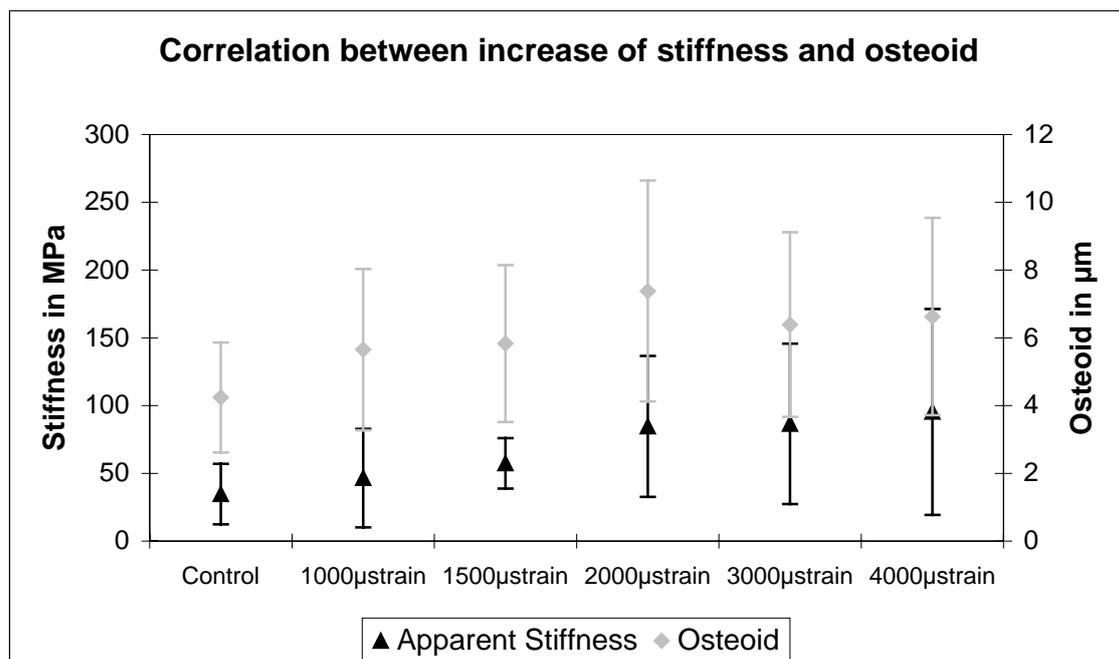
Für den Gesamtvergleich der betrachteten Gruppen ergibt sich ein signifikant globaler Gruppeneffekt mit der Prüfgröße  $F=5,83$  und  $p=0,0004$ .

Die anschließenden Einzelvergleiche durch lineare Kontraste (nach Tukey) zeigten einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Belastungsgruppen  $2000$ ,  $3000$  und  $4000\mu\text{strain}$ .

### 4.3 Beziehung zwischen Steifigkeit und Osteoidbildung

Um den Zusammenhang der Steifigkeitsentwicklung mit der Osteoidbildung zu zeigen, wurde in folgender Grafik die Zunahme der Steifigkeit und die Dicke der Osteoidbanden am Versuchsende gegenüber gestellt. Dazu wurden die jeweiligen arithmetischen Mittel einer jeden Gruppe verwendet. Es ergibt sich folgender graphischer Zusammenhang.

Abb. 4-4: *Gegenüberstellung der Steifigkeitszunahme und gemessener Osteoiddicke (arithmetische Mittel und Standardabweichung)*

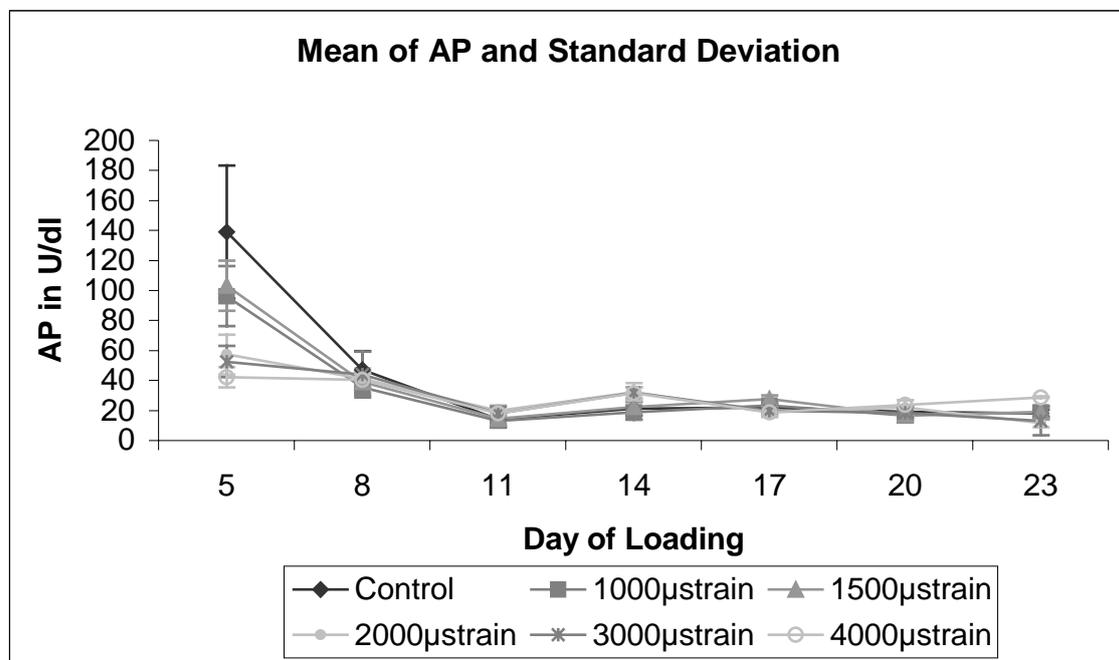


Die Steifigkeitsentwicklung ist abhängig von der Belastung. Darüber hinaus korreliert die Osteoidbildung mit der Intensität der Belastung (Korrelationskoeffizient  $r = 0,87$ ). Es kann demnach gefolgert werden, dass mit steigender Belastungsintensität die Steifigkeit der Knochenproben zunimmt, u.a. bedingt durch die Bildung von Osteoid. Auffallend ist Gruppe 2 mit der Maximalintensität von  $2000\mu\text{strain}$ , in der die gemessene Osteoidauflagerung höhere Werte erreicht, als die Gruppen mit  $3000\mu\text{strain}$  bzw.  $4000\mu\text{strain}$  Maximalintensität.

#### 4.4 Alkalische Phosphatase

Es ergeben sich n=7 Bestimmungen für die Alkalische Phosphatase aus 72 Stunden altem Versorgungsmedium. Die erste Messung resultiert vom fünften Belastungstag, da zu Versuchsbeginn das Versorgungsmedium drei mal alle 24 Stunden gewechselt wurde, um noch vorhandenen präparationsbedingten Knochenstaub auszuwaschen.

Abb. 4-5: *Arithmetische Mittel der Alkalischen Phosphatase, sowie deren Standardabweichungen*



Dargestellt ist der Verlauf der Alkalischen Phosphatase in allen Belastungsgruppen und der Kontrollgruppe. Bis auf die erste Bestimmung haben sich identische Werte in allen Gruppen ergeben. Die erhöhten Werte der ersten und auch der zweiten Messung resultieren in erster Linie aus der präparationsbedingten Zellschädigung und begonnener Reparaturvorgänge. Der Verlauf der Konzentration von Alkalischen Phosphatase ist ähnlich dem nach einer Fraktur oder Osteotomie.

Auffallend ist dennoch, dass bei der ersten Bestimmung, die Alkalische Phosphatase der Kontrollgruppe die höchste Konzentration erreicht. Die niedrigste Konzentration am ersten Bestimmungstag zeigt sich in der Gruppe mit der Maximalbelastung 4000µstrain.

Es stellt sich die Frage, ob eine Belastung, in unmittelbarer Folge eines Schadens, Einfluss auf die Exprimierung der Alkalischen Phosphatase nimmt und damit auch auf den Knochenstoffwechsel. Betrachtet man zusätzlich die Entwicklung der Steifigkeit, kann dies aber erwidert werden, da die Steifigkeit gerade in der ersten Versuchshälfte stark zunimmt. Unter Berücksichtigung dieser Tatsache kann auch eine weitere Schädigung durch Belastung ausgeschlossen werden. Die Betrachtung der Laktatdehydrogenase liefert nur ein mäßiges Gegenargument. Sie weist zwar am ersten Bestimmungstag die höchsten Konzentrationen auf, wobei auch da die Konzentration in der mit 4000 $\mu$ strain belasteten Gruppe am geringsten ist.

Bei Betrachtung der nachfolgenden Messungen fällt auf, dass sich sämtliche Werte auf ein konstantes Niveau einstellen und dieses bis zum Ende des Versuches beibehalten. Dies spricht für eine kontinuierlich konstante Stoffwechsellage und Vitalität der Knochenproben und deckt sich mit den histologischen Ergebnissen.

Es ergibt sich ein signifikant globaler Gruppeneffekt mit der Prüfgröße  $F=2,56$  und  $p=0,027$ . Zwischen den Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

## 4.5 Laktatdehydrogenase

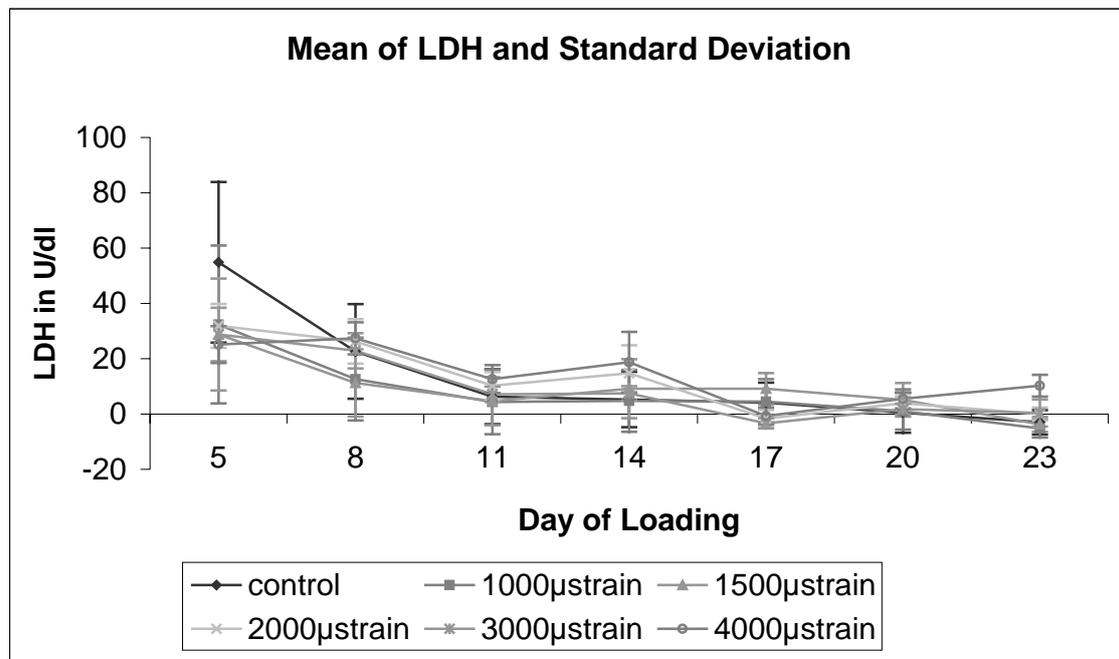
Die Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) erfolgte parallel zur Bestimmung der Alkalischen Phosphatase. Es resultieren  $n = 7$  Messungen für jede Knochenprobe. Zur Auswertung wurden ebenfalls die arithmetischen Mittel der Gruppen sowie die Standardabweichungen herangezogen.

In Abb. 4-6 sind die Mittelwerte der LDH-Konzentrationen für jede Gruppe dargestellt. Der Verlauf jeder Gruppe ist ähnlich. Einer hohen Startkonzentration folgt ein kontinuierlicher Abfall bis zur Einstellung eines konstanten Niveaus. Zu beachten ist auch hier die höchste Konzentration in der Kontrollgruppe sowie die geringste Konzentration in der 4000 $\mu$ strain Gruppe zu Beginn des Versuches. Auch hier liegt der Hauptgrund für die hohen Anfangskonzentrationen in der präparationsbedingten Gewebeschädigung und dazu gehörender Zellschädigung. Es fällt auf, dass am zweiten Messtag die Konzentrationen in den Gruppen mit hoher Belastungsintensität (2000 $\mu$ strain, 3000 $\mu$ strain, 4000 $\mu$ strain] größer sind, als in den Gruppen geringer

Belastungsintensität. Das lässt auf eine weitere Zellschädigung durch hohe Belastung schließen, deckt sich aber nicht mit der Entwicklung der Steifigkeit. Im weiteren Verlauf lassen sich nur geringste LDH-Konzentrationen feststellen, was den Schluss zulässt, dass keine weitere Schädigung aufgetreten ist. Für den Anstieg der Konzentration in der 4000 $\mu$ strain Gruppe am letzten Tag, gibt es nach Betrachtung der Steifigkeit und der Histologie keine treffende Begründung.

Die statistische Auswertung ergab weder bei der globalen Betrachtung noch bei den Gruppenvergleichen einen signifikanten Unterschied.

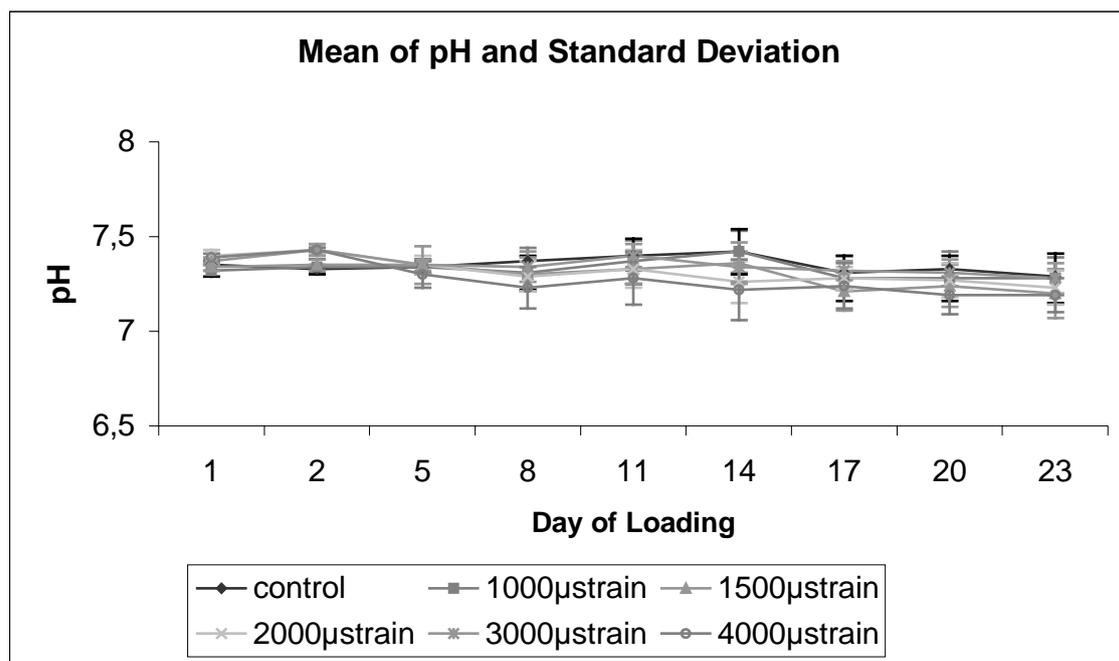
Abb.4-6: Arithmetische Mittel der Laktatdehydrogenase und zugehörige Standardabweichungen



## 4.6 pH-Werte

Die pH-Wert Messung orientiert sich an den Bedingungen der Bestimmung der Alkalischen Phosphatase und der Laktatdehydrogenase. Einzige Ausnahme ist die zusätzliche Bestimmung des pH-Wertes während der ersten beiden Belastungstage, bedingt durch den 24-stündigen Mediumwechsel zum Auswaschen präparationsbedingten Knochenstaubs. Es liegen somit  $n = 9$  pH-Wert-Bestimmungen für jede Probe vor.

Abb.4-7: *Arithmetische Mittel der pH-Werte und dazu gehörende Standardabweichungen*



Dargestellt ist der Verlauf der gemittelten pH-Werte jeder einzelnen Gruppe während des Belastungszeitraums. Der vorher festgelegte Normbereich von 7,0 bis 7,5 wurde nicht über- bzw. unterschritten. Das lässt auf eine gute Pufferkapazität des Versorgungsmediums schließen. Globale und signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht nachweisbar.

#### **4.7 Anmerkung zur polychromen Sequenzmarkierung**

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Knochenexplantate wurde festgestellt, dass sich Calzein und Alizarin in den Knochen als sogenannte Bande eingelagert haben. Dabei wurden überwiegend Calzeinbanden festgestellt. Über diesen und den vorhandenen Alizarinbanden wurden Osteoidauflagerungen gefunden. Das spricht für eine erhalten gebliebene Syntheseaktivität der Osteoblasten und dafür, dass es während des gesamten Belastungszeitraumes zur Osteoidbildung kam.

Es konnten nicht ausreichend Doppelbanden (Doublelabel) detektiert werden. Auf eine Auswertung der dynamischen Umbauvorgänge des Knochens wurde deshalb verzichtet. Eine Aussage über die Osteoidbildungs- und Mineralisierungsrate pro Tag konnte nicht getroffen werden. In der Literatur wird beim Erwachsenen eine Mineralisierungsdauer von 10 Tagen beschrieben [16].

Des Weiteren hat der Versuch gezeigt, dass die verwendeten Konzentrationen von Calzein und Alizarin, keinen merkbaren Schaden an Knochen und Zellen hinterlassen haben und der nachfolgenden Auswaschprozedur ein protektiver Effekt zuzuschreiben ist.

## 4.8 Histologische Auswertung und Bemerkung zur Detektion apoptotischer Zellen

In der histologischen Auswertung dieses Versuches liegen zwei Hauptthemen dieser Arbeit. Zum einen ist es die Arbeit mit verschiedenen Färbetechniken an nicht entkalktem Knochen. Die bereits im Kapitel *Material und Methoden* beschriebenen Färbvorschriften entstammen einer Vielzahl von Vorversuchen mit einem enormen Zeitaufwand. Die Abbildungen (3-19 bis 3-37 Kap. Material und Methoden), welche diesem Experiment (Kulturbelastungssystem Zetos, 26 Tage) entstammen, zeigen exemplarisch, dass die angeführten Färbetechniken und Anleitungen für weitere Versuche genutzt werden können. Dies ist besonders wichtig für zukünftige Arbeiten mit dem Zetos-System.

Zum anderen soll verdeutlicht werden, dass es möglich ist, mit dem vorgestellten Zetos-System trabekulären Knochen über einen Zeitraum von mehreren Wochen unter Erhaltung der Vitalität zu kultivieren. Diese Aussage lässt sich mit folgenden Erkenntnissen bestätigen.

Die Gewebestruktur ist vollständig, Zellkerne sind gut erhalten und stellen sich mit guter Kernfärbung dar (S.71-77). Die Alcianblau-PAS Färbung (Abb.3-29,3-30;S.89) beweist eine ausreichende Versorgung der Knochenzylinder während des Versuches, da Glykogen innerhalb der Zellen dargestellt werden konnte. Die Bildung von Osteoid (Abb. 3-25 – 3-28;S.81,85) lässt auf eine erhaltene Syntheseaktivität der Osteoblasten schließen. Diese zeigt sich in den verschiedenen Gruppen variabel ausgeprägt und lässt daraus schließen, dass die Applikation verschiedener Belastungsintensitäten durch das Zetos-System funktioniert hat und für zukünftige Versuche verwendet werden kann. Die Osteoidauflagerung über Alizarinbanden beweist eine erhaltene Osteoblastenaktivität bis zum Abschluss des Experiments, da das Alizarin-labeling erst am 20. Belastungstag durchgeführt wurde.

Einen abschließenden Hinweis für erhaltene Zellvitalität liefert der angewandte ApopTag *In Situ Oligo Ligation Kit*. In den belasteten Proben detektierte er anteilmäßig weniger apoptotische Zellen, als in den Kontrollproben. Zeitliche und finanzielle Gründe, sowie das Arbeitsthema schränkten die Anwendung dieses Tests ein, so dass er nur stichprobenartig zur Anwendung kam. Für die weitere Perfektionierung des Zetos-Systems, sowie dessen Anwendungsdauer wäre ein weiterer Versuch mit dem Augenmerk auf in Apoptose begriffene Zellen notwendig.

## **5. Diskussion der Ergebnisse**

Ziel dieser Arbeit war es, Erkenntnisse darüber zu erlangen wie trabekulärer Knochen auf verschiedene Belastungsintensitäten reagiert. Des Weiteren sollten die gewonnenen Ergebnisse dazu beitragen, die Arbeit mit dem Zetos-System zu verbessern und weiter zu etablieren.

Es ist gelungen, die Knochenproben über einen Zeitraum von mehreren Wochen bei vollständigem Erhalt der Vitalität zu kultivieren. Belegt ist dies durch den Verlauf der Alkalischen Phosphatase, der Laktatdehydrogenase, der pH-Werte und durch die histologischen Ergebnisse. Das System erlaubt die Applikation von verschiedenen definierten Belastungsintensitäten auf Knochenexplantate. Weiterhin wäre es ohne weiteres möglich, den Einfluss von pharmakologischen bzw. hormonellen Substanzen auf den Knochen zu untersuchen ohne dabei in das geschlossene System eingreifen zu müssen. Besonders diese Tatsache gestaltete sich bei bisherigen Systemen und Experimentanordnungen sehr schwierig. Der im Vergleich zu Tierversuchen geringere finanzielle und organisatorische Aufwand gilt bei weiterer Perfektionierung des System als besonders vorteilhaft.

In diesem Experiment wurde ein Belastungssignal verwendet, welches dem des physiologischen Springens entspricht. Es wurde mit unterschiedlicher Belastungsintensität auf trabekulären Knochen appliziert. Die belasteten Proben haben auf diesen Reiz mit physiologischen Reaktionsmustern geantwortet. Dazu gehört die Zunahme der Steifigkeit (E-Modul) und die Zunahme der Knochenmasse durch appositionelles Knochenwachstum in Form von Osteoidauflagerung. Der Nachweis von Alkalischer Phosphatase im Verbrauchsmedium bis zum Ende des Versuches beweist eine ständige Osteoblastenaktivität.

Bei der Betrachtung der Steifigkeit zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Kontrollproben und den Belastungsproben, ab einer Intensität von 1500 $\mu$ strain. Zwischen der Kontrollgruppe und der Belastungsgruppe 1000 $\mu$ strain gab es keinen signifikanten Unterschied. Die in der Kontrollgruppe beobachtete Zunahme der Steifigkeit liegt möglicherweise im Messablauf selbiger begründet, da es am Ende der Messung zu einem abrupten Spannungsabfall kommt (siehe Kap. 3.4) und der Knochen damit durch möglicherweise dabei auftretende hohe Frequenzanteile mechanisch stimuliert worden sein könnte. Ab einer Intensität von 1500 $\mu$ strain kommt es also zu

signifikanten Veränderungen des Knochenstoffwechsels, in deren Folge die Steifigkeit ansteigt.

Im Gegensatz zu Vorversuchen wurde die Steifigkeit vor der eigentlichen Belastung gemessen. Dadurch sollte vermieden werden, dass eine vorher stattgefundene Belastung Einfluss auf die viskoelastischen Eigenschaften des Knochens nimmt und somit den wahren Wert der Steifigkeit beeinflusst.

Auf Grund nicht real erscheinender Messergebnisse am ersten Belastungstag, wurde beschlossen, vor der Messung einen kurzzeitigen Druck auf den Belastungspiston zu geben (siehe Kap. 3.4). Grund dafür war die Feststellung, dass der Piston bei einigen Proben noch keinen direkten Kontakt mit der Knochenzylinderoberfläche hatte. Dieser Druck könnte, v.a. die Kontrollproben betreffend, ausreichend gewesen sein, um den Knochenstoffwechsel zu beeinflussen und damit auch die Steifigkeit. Ein weiterer Einflussfaktor ist die eigentliche Steifigkeitsmessung. Bei dieser wird der Knochen bis zu 20 $\mu$ m komprimiert, was ebenfalls als Stimulus auf das Knochenwachstum oder auf den Knochenumbau wirken könnte.

Weiterhin könnte das im Versorgungsmedium enthaltene FCS, in welchem eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren enthalten sind, die Steifigkeitszunahme in den Kontrollproben erklären.

Da bis auf die fehlende mechanische Belastung in der Kontrollgruppe die Bedingungen für alle Gruppen identisch waren, können die gewonnenen Ergebnisse trotzdem als valide und verwertbar angesehen werden.

Bei der Planung zukünftiger Versuche sollten aber folgende Überlegungen in Betracht gezogen werden um genannte Einflüsse abzustellen bzw. zu reduzieren.

1. Bestimmung der Steifigkeit der Kontrollproben in größeren zeitlichen Abständen oder nur zu Versuchsbeginn und zu Versuchsende.
2. Um den möglichen Einfluss der Steifigkeitsmessung zu verringern, sollte die Kompression der Proben auf 15 $\mu$ m oder 10 $\mu$ m reduziert werden.
3. Vermeidung des abrupten Spannungsabfalls am PEA am Ende einer Steifigkeitsmessung, um eine dynamische Stimulation durch hohe Frequenzanteile zu verhindern.
4. Um auch den ersten Belastungstag mit in die Auswertung einzubeziehen und Messartefakte zu vermeiden, sollte über eine Arretierungsmöglichkeit des Belastungspiston in richtiger Position nachgedacht werden.

Die Belastungsgruppen 2-5 zeigen eine deutliche Zunahme der Steifigkeit. Wie bereits in einem vorrausgegangenem Experiment festgestellt, nahm die Steifigkeit besonders in der ersten Versuchshälfte (11 - 12 Tage) stark zu. Gegensätzlich zu diesem Experiment stellte sich in der zweiten Versuchshälfte kein Steifigkeitsplateau ein. Die Steifigkeit hat auch da noch einmal, wenn auch weniger stark, zugenommen. Der Plateaueffekt konnte nur in der Belastungsgruppe 4000 $\mu$ strain beobachtet werden.

Bei der histologischen Auswertung der Osteoidauflagerung konnten Resultate aus voraus gegangenen Versuchen bestätigt werden. Die Dicke der Osteoidauflagerung scheint von der Intensität des Belastungssignals abhängig und korreliert mit der Entwicklung der Steifigkeit ( $r=0,87$ ).

Das die Kontrollgruppe ebenfalls Osteoidauflagerungen zeigt, kann auf o.g. Effekte zurück geführt werden und natürlich auch darauf, dass die Einwirkung der Steifigkeitsmessung selbst eine Richtungsänderung der ursprünglich vorhandenen Kräfte/Kompressionen (Kalb auf der Wiese) bewirkt.

Basierend auf den Verlaufsbeobachtungen scheinen die Adaptationsvorgänge an die neuen Belastungen während der ersten 12 Belastungstage am intensivsten zu sein. Die Belastungsgruppen 1500, 2000 und 3000 $\mu$ strain zeigen dabei kontinuierliche Anpassungsvorgänge, auch während des gesamten Versuchszeitraumes. Eine Belastungsintensität von 4000 $\mu$ strain ist als maximal zu betrachten, da in der zweiten Versuchshälfte keine wesentlichen Änderungen der Knocheneigenschaften zu beobachten waren. Dies ist vergleichbar mit dem sportlichen Training, wo ab einem gewissen Zeitpunkt keine suffiziente Leistungssteigerung mehr möglich ist. Betrachtet man den Faktor Zeit, so kann davon ausgegangen werden, dass, bei einer Intensität von 4000 $\mu$ strain, 5 Minuten tägliche Belastung ausreichend sind um Maximaleffekte in relativ kurzer Zeit am Knochen zu bewirken. Bei Belastungen geringerer Intensität sollte über eine Verlängerung der Belastungsdauer nachgedacht werden, wenn Maximaleffekte erwünscht sind.

Liegt eine Belastungsintensität oberhalb eines physiologischen Belastungsniveaus, führt dies zu einer Degeneration des Knochengewebes in Form von Mikrofrakturen und zur Abnahme der Knochensteifigkeit [165] Die Belastungsschwelle liegt bei etwa 5000 $\mu$ strain.

Osteoidauflagerungen waren in allen Gruppen zu beobachten. Signifikante Unterschiede gab es zwischen der Kontrollgruppe einerseits und den Belastungsgruppen 2000, 3000 und 4000 $\mu$ strain andererseits. Bezieht man sich ausschließlich auf die

Osteoidauflagerungen, so führt erst eine Belastungsintensität von 2000 $\mu$ strain zu signifikant physiologischen Reaktionen in Form von appositionellem Knochenwachstum.

Die histologische Auswertung war ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit. Es ist gelungen, gute Schnitte und Färbungen der unentkalkten Knochenexplantate herzustellen. Alle Färbungen zeigten intaktes Knochengewebe und vitale Knochenzellen. Durch die Darstellung neu gebildeten Osteoids konnten die Ergebnisse der Steifigkeitsmessung bestätigt werden. Die Trichromfärbung nach Goldner und die Versilberung nach Kossa können auf Grund ihrer klareren Farbkontraste zwischen mineralisierter und nicht mineralisierter Matrix (Osteoid) für diese Auswertung besonders empfohlen werden.

Der Nachweis suffizienter Versorgung der Knochenzellen konnte mit der Alcianblau-PAS Färbung erbracht werden. Bei dieser Färbung wurde das in den Zellen gespeicherte Glykogen dargestellt.

Jedoch gab es bei der histologischen Aufarbeitung ein großes Problem. Nachdem die in Technovit 9100 New eingebetteten Proben geschnitten und auf den Objektträgern fixiert waren, mussten wir feststellen, dass sich die Schnitte entweder während der Entacrylierung oder während der Färbeprozedur vom Objektträger ablösten. Dies führte zu einem geschätzten „Verlust“ von ca. 1500 Schnitten, welche nicht mehr für Färbungen verwendet werden konnten. Bei der Austestung verschiedenst beschichteter Objektträger lieferte erst eine Ponalbeschichtung der Objektträger ein zufriedenstellendes Ergebnis.

Ein weiteres Problem stellten die in den histologischen Leitlinien angegebenen Färbezeiten dar. Erst die im Kapitel *Material und Methoden* dargestellten modifizierten Färbezeiten lieferten ein ansprechendes Ergebnis.

Die enzymhistochemischen Auswertung lieferte nur zum Teil zufriedenstellende Ergebnisse. Unter Anwendung der Saure Phosphatase Reaktion konnten Osteoklasten sehr gut dargestellt werden. Eine Darstellung von Osteoblasten mittels der Alkalischen Phosphatase Reaktion war trotz verschiedenster Versuchsansätze nicht möglich. Der Einfluss der Aufarbeitung und die komplizierten Färbeschritte könnten eine Ursache für den Verlust der Enzymaktivität darstellen.

Bei der Auswertung der polychromen Sequenzmarkierung zeigte sich ein sehr guter Einbau von Calzein mit überwiegend durchgehenden Banden. Alizarin konnte ebenfalls

nachgewiesen werden, doch nicht so häufig und kontinuierlich. Für zukünftige Experimente wäre es denkbar, Calzein ein zweites Mal zu verwenden oder auf einen anderen Farbstoff, wie Tetrazyklin oder Xylenolorange zurückzugreifen. Diese Farbstoffe haben sich auch schon in anderen Arbeiten bewährt [112].

Denkbar wäre auch eine dreimalige Anwendung der polychromen Sequenzmarkierung. Die erste sollte vor der ersten Belastung, die zweite zur Versuchshälfte und die dritte zum Ende des Versuches durchgeführt werden. Damit könnten Korrelationen zwischen der Dynamik der Osteoidauflagerung und der Entwicklung der Steifigkeit nachgewiesen werden. Interessant ist dabei besonders die erste Versuchshälfte mit dem starken Anstieg der Steifigkeit. Trotz allem stellt die Bildung neuen Osteoids einen permanenten Prozess während des gesamten Belastungszeitraums dar, was Osteoidauflagerungen über der Alizarinbande verdeutlichen.

Für die Beurteilung der Vitalität von Knochenzellen wäre der ApopTag *In Situ Oligo Ligation Kit* zu empfehlen. Es hat sich gezeigt, dass in den nicht belasteten Kontrollproben anteilmäßig mehr apoptotische Zellen vorhanden sind, als in den belasteten Gruppen. Der Einfluss mechanischer Belastung auf das Apoptoseverhalten von Knochenzellen kann mit diesem Test untersucht werden und stellt einen weiteren Ansatz für zukünftige Versuche dar.

Die Betrachtung der Kulturbedingungen zeigte, dass das hier verwendete DMEM high-glucose Medium den Ansprüchen zur Kultivierung der Knochenzylinder über einen längeren Zeitraum gerecht wird. Die guten Puffereigenschaften bestätigen sich im aufgezeigten Verlauf der pH-Werte. Es garantiert einen ausreichenden Knochenzellmetabolismus, was mit dem Verlauf der Alkalischen Phosphatase und mit den aufgezeigten Osteoidauflagerungen bestätigt wird. Für zukünftige Versuche verbunden mit entsprechenden finanziellen Ressourcen wäre ein täglicher Wechsel des Mediums optimal. Damit könnte der Verlauf der Alkalischen Phosphatase und der Laktatdehydrogenase besonders am Versuchsbeginn noch genauer untersucht werden. Besonderes Interesse liegt dabei auf dem Einfluss der Präparation und der ersten Belastungen, mit entsprechender Intensität. Das Medium wurde zwar an den ersten Versuchstagen täglich gewechselt, doch die genommenen Abnahmen konnten auf Grund anderer Volumenkonzentrationen nicht mit den übrigen verglichen werden.

Die vorhandenen Werte zeigten jedoch, dass die sehr hohen Enzymkonzentrationen eine Folge der Präparation sein mussten, da auch die nicht belastete Kontrollgruppe sehr hohe Konzentrationen aufwies. Bestätigt wird diese Annahme durch die Auswertung

der Laktatdehydrogenase, welche zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede zeigt. Im weiteren Verlauf fiel diese in allen Gruppen gleich stark ab und näherte sich einem Niveau um 0 U/dl. Dies gilt als Beleg dafür, dass es im Versuchsverlauf zu keiner weiteren signifikanten Zellschädigung gekommen ist.

Eine genauere Betrachtung der Knochenreaktion, besonders auf die Zeit nach der Präparation und während des Belastungszeitraumes, könnte mit der Bestimmung weiterer knochenzellspezifischer Marker vorgenommen werden. Dabei handelt es sich um extrazelluläre Matrixproteine wie Osteocalcin [99,166,167], Kollagen Typ I, Fibronectin oder Osteopontin [168,169]. Interessant wäre auch die Bestimmung von extrazellulärem Kalzium oder von Osteoprotegerin (OPG), welches auch als Osteoclast Inhibiting Factor (OIF) bekannt ist. Es hemmt die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten und scheint damit Einfluss auf das Knochenremodeling zu nehmen. Arbeiten zu diesem Zusammenhang sind bereits erschienen [46,170], doch leider nicht für bovines Knochengewebe, da zum jetzigen Zeitpunkt noch kein Antikörper für bovines OPG zur Verfügung steht.

Die gesamte Präparation kann als ausgereifte und nahezu perfekte Prozedur beschrieben werden. Während vieler Arbeitsschritte und einem zeitlichen Aufwand von ca. 5-10 Stunden entstanden voll vitale Knochenzylinder und es traten auch keine Infektionen auf. Problematisch ist zum einen das Ausbohren der Zylinder und zum anderen die Kürzung der Knochenzylinder von ca. 8mm auf genau 5mm. Die Ausbohrung erfolgte mit einem diamantbesetzten Hohlbohrer und die Kürzung wurde mit der Innenlochsäge vorgenommen. Trotz sorgfältiger Bearbeitung und ständiger Anwendung gekühlter isotonischer Kochsalzlösung zum spülen und kühlen, fielen in den histologischen Schnitten, besonders am Außenbereich der Zylinder, Ansammlungen von präparationsbedingtem Knochenstaub bzw. Knochenmehl auf. Dieser konnte der aufwendigen Waschprozedur standhalten und könnte zu einer eventuellen partiellen Einschränkung der Knochenzellversorgung geführt haben oder wirkte als ungewollter Filter bei der polychromen Sequenzmarkierung für die verwendeten Farbstoffe. Dies kann bezweifelt werden, da Calzein und Alizarin in den Knochen eingebaut wurden. Auszuschließen ist es aber nicht, da diese Schnittbereiche im ultravioletten Licht besonders intensiv erschienen.

Man könnte diesem Problem begegnen, indem man bei dem Hohlbohrer eventuell eine gröbere Körnung des Diamantbesatzes wählt, bzw. zur Kürzung der Zylinder die Bandsäge benutzt. Es sollte immer darauf geachtet werden, dass jede

Präparationsmaßnahme eine Zerstörung von Knochengewebe zur Folge hat und vorher auf jeden Fall ein Schaden-Nutzen Vergleich gezogen werden sollte.

Vorteilhaft wäre auch eine Möglichkeit zur Bestimmung der Sauerstoffkonzentration in der Kulturbelastungskammer um eine suffiziente O<sub>2</sub>-Versorgung des Knochens zu beweisen. Des weiteren könnten Knochendichtemessungen, vor und nach dem Versuch, die gewonnenen Erkenntnisse bestätigen.

Zukünftige Einsatzgebiete des hier vorgestellten Systems wären sehr vielfältig. Eines davon wäre die Biomaterial- bzw. Implantatforschung. Im Vergleich zu Tierversuchen ist es relativ kostengünstig und benötigt weniger organisatorischen Aufwand um Materialien zu testen und Gewebewachstumverhalten zu beurteilen. Des weiteren kann der Einfluss verschiedenster Belastungssignale, sowie pharmazeutischer Produkte auf das Knochengewebe getestet werden. Dabei ist besonders an die Osteoporoseforschung zu denken

Das spannendste Gebiet ist mit Sicherheit die Erforschung des Knochenstoffwechsels in der Schwerelosigkeit. Verschiedene Veröffentlichungen konnten zeigen, dass Schwerelosigkeit zu einer Abnahme der Knochenmasse führt [13,15]. Aus diesem Grund soll in naher Zukunft ein komplettes miniaturisiertes und vollautomatisiertes Zetos-System in der internationalen Raumstation (ISS) eingesetzt werden, um bestimmte Belastungsformen zu erforschen, die in definierten Zeitintervallen appliziert, den Substanzverlust reduzieren oder verhindern können.

## 6 Zusammenfassung

In diesem Versuch wurden 48 trabekuläre bovine Knochenzylinder über einen Zeitraum von 26 Tagen kultiviert und an 23 Tagen belastet. Das Belastungssignal entsprach dem physiologischen Springen und wurde mit verschiedenen Intensitäten auf die Knochenproben appliziert.

Die Knochenzylinder wurden per Randomisierung in 6 Gruppen mit je 8 Proben eingeteilt. Einer Kontrollgruppe wurden 5 Belastungsgruppen mit den Maximalintensitäten von 1000, 1500, 2000, 3000 und 4000  $\mu$ strain gegenüber gestellt. Das Belastungssignal wurde täglich mit 300 Zyklen bei einer Frequenz von 1Hz, mit entsprechender Intensität, auf die Knochenproben appliziert. Vor der eigentlichen Belastung wurde die Steifigkeit (E-Modul) der Knochenzylinder bestimmt. In der Kontrollgruppe wurde diese alle 72 Stunden bestimmt.

Die belasteten Gruppen zeigten unterschiedliche Steifigkeitsanstiege, wobei sich die Gruppen, ab der Maximalbelastung von 1500 $\mu$ strain, signifikant von der Kontrollgruppe unterschieden ( $p < 0,05$ ). Bei dem Vergleich der Belastungsgruppen gab es nur zwischen 1000 $\mu$ strain und 4000 $\mu$ strain signifikante Unterschiede ( $p = 0,0098$ ). Die Verlaufsbetrachtung der Steifigkeit zeigte in allen Belastungsgruppen eine weitgehend kontinuierliche Zunahme, welche in der ersten Versuchshälfte (bis 11. Belastungstag) stärker ausgeprägt war. Die Belastungsgruppe 4000 $\mu$ strain erreichte nach relativ kurzer Belastungszeit (8-10) Tage ein Steifigkeitsmaximum, welches bis zum Versuchsende nahezu konstant blieb. In der Kontrollgruppe hat die Steifigkeit nur leicht zugenommen. Ein Abfall war nicht zu beobachten. Diese Zunahme in der Kontrollgruppe könnte durch eine zu häufige Messfrequenz oder durch Wachstumshormone im FCS (fetal calf serum), welches Bestandteil des Versorgungsmediums ist, erklärbar sein.

Die Anstiege der Steifigkeiten erklären sich durch das nachgewiesene appositionelle Knochenwachstum in Form von Osteoidauflagerung.

Die Gruppen mit der Maximalbelastung 2000, 3000, 4000 $\mu$ strain unterscheiden sich in der Osteoiddicke signifikant von der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ), obwohl es auch in der Kontrollgruppe zu Osteoidauflagerungen kam. Es konnte zudem ein deskriptiver, fast linearer, Zusammenhang zwischen Intensität der Belastung und Osteoidauflagerung festgestellt werden ( $r = 0,87$ ). Je höher die Intensität, um so höher die Steifigkeitszunahme, desto mehr Osteoidauflagerung.

Die Parameter der Alkalischen Phosphatase und Laktatdehydrogenase zeigten während der ersten Versuchstage erhöhte Konzentrationen. Dies ist auf die präparationsbedingte Zellschädigung zurückzuführen. Im weiteren Versuchsverlauf sank die Konzentration der LDH, als Zelltodmarker, auf Werte gegen Null, was für keinen weiteren Zellverlust spricht. Die Werte der AP lagen im weiteren Verlauf zwischen 25 – 30 U/dl, was für eine ständige Stoffwechselaktivität des Knochens spricht.

Ein weiterer Beweis für die Vitalität und die Steifigkeitszunahme der Knochenproben, nach 26tägiger Kultivierungs- und Belastungsdauer, waren die Ergebnisse der histologischen Aufarbeitung. Dazu zählen vollständig erhaltene Gewebestrukturen, gute Darstellungen von Zellen und Zellkernen, sowie Osteoidauflagerungen über den, bei der polychromen Sequenzmarkierung entstandenen, Calcein- und Alizarinbanden.

In den nur stichprobenartig durchgeführten Apoptoseuntersuchungen bestätigte sich der Erhalt der Vitalität, da mehr vitale als apoptotische Zellen detektiert werden konnten.

Auf Grund der Ergebnisse der Steifigkeit, der Enzymbestimmungen (Alk. Phosphatase, Laktatdehydrogenase), der pH-Werte und der histologischen Aufarbeitung, inklusive der Osteoidbestimmung und Apoptoseuntersuchung, hat sich das Zetos-System bei der Arbeit mit trabekulären Knochen als funktionsfähig bestätigt und kann unter den anderen Möglichkeiten zur Erforschung der Knochenphysiologie als etabliert betrachtet werden.

Die zukünftigen Einsatzgebiete des Zetos-Systems erscheinen daher sehr vielfältig. Zum einen liegen sie in der weiteren Erforschung der Knochenphysiologie bei Schwerelosigkeit (Raumfahrt) und in der Osteoporoseforschung. Zum anderen in der Testung von Biomaterialien und pharmakologischen Erzeugnissen.

## 7 **Abbildungsverzeichnis**

1-1	Der Zetos	S. 9
1-2	Knochengewebe und Zellen (© Pfizer GmbH 2002)	S. 11
1-3	Schematischer Darstellung der Knochenzellen (© University Orthopaedics Southampton)	S. 18
1-4	Prostaglandin H <sub>2</sub> – Strukturformel (© Löffler/Petrides Biochemie & Pathobiochemie)	S. 26
1-5	Gegenüberstellung der Morphologie von Apoptose und Nekrose (© Boeringer Mannheim)	S. 30
1-6	graphische Darstellung einer Steifigkeitsmessung	S. 32
1-7	Der Zetos – Konstruktionszeichnung	S. 35
1-8	Die Kultur- und Belastungskammer in ihren Einzelkomponenten	S. 37
1-9	Die elektronischen Module	S. 39
1-10	24-Kanal Umlaufpumpe mit angeschlossener Kultur- und Belastungskammer	
3-1	Radius vom Rind – bereits präpariert und bearbeitet	S. 42
3-2	Bandsäge – Epiphyse eingespannt	S. 43
3-3a	Hohlbohrer	S. 44
3-3b	Ausbohren der Knochenzylinder	S. 44
3-4a	Einbau der Zylinder in die Halterung	S. 45
3-4b	Zylinder werden mit der Innen-Loch-Säge auf 5mm Höhe gebracht	S. 45
3-5	Waschen der Knochenzylinder im Rotator	S. 46
3-6	Knochenzylinder nach Präparation und Waschvorgang	S. 47
3-7	Einsatz des Knochenzylinders und Zusammenbau der Kammer	S. 48
3-8	Zusammengebautes komplettes System mit Mediumreservior, Versorgungsschläuchen, Rollpumpe und Kammern	S. 49
3-9	Verlauf der PEA-Treiberspannung	S. 53
3-10	Beispiel der Ergebnisse mehrerer quasi-statischer zur Ermittlung der Steifigkeit	S. 55
3-11	Beispiel der Messergebnisse einer quasi-statischen Messung	S. 55
3-12	Belastungsmuster des Springens in den verschiedenen Intensitäten der Kompressionen	S. 56

3-13	Die Windows-Benutzeroberfläche zur Steuerung des Zetos	S. 58
3-14	Beispiel der Messergebnisse einer „Jumping“-Sequenz mit der Intensität 3000 $\mu$ strain	S. 59
3-15	Reaktion zur Bestimmung der Alkalischen Phosphatase	S. 60
3-16	Reaktion von Pyruvat zu Laktat	S. 61
3-17	Eingebettete Knochenpräparate	S. 66
3-18	Mikrotom mit Hartstahlmesser und Präparateschlitten	S. 68
3-19	Übersichtsaufnahme in der H&E Doppelfärbung (20x)	S. 73
3-20	Knochenoberfläche in der H&E Doppelfärbung (63x)	S. 73
3-21	Übersichtsaufnahme eines Giemsa gefärbten Präparates (20x)	S. 75
3-22	Knochenoberfläche in der Giemsafärbung (40x)	S. 75
3-23	Knochen trabekel in der Übersicht bei Färbung mit Toluidin O (20x)	S. 77
3-24	Trabekeloberfläche in Toluidin O Färbung (40x)	S. 77
3-25	Übersichtsaufnahme in der Trichromfärbung nach Goldner (20x)	S. 81
3-26	Detailaufnahme in der Trichromfärbung nach Goldner (63x)	S. 81
3-27	Knochenoberfläche in der v. Kossa-Färbung und Gegenfärbung mit Trichrom-Goldner Farbstoffen (40x)	S. 85
3-28	Umbauvorgänge am Knochen trabekel in der v. Kossa-Färbung und Gegenfärbung mit Trichrom-Goldner Farbstoffen (63x)	S. 85
3-29	Osteozyten und Osteoblasten mit gespeichertem Glykogen (63x)	S. 89
3-30	Bone-lining Zellen und Osteoblasten mit gespeichertem Glykogen (78x)	S. 89
3-31	Enzymhistochemische Darstellung der Sauren Phosphatase in OK (63x)	S. 92
3-32	Calceinbande mit aufgelagertem Osteoid (20x)	S. 95
3-33	Alizarinbande mit aufgelagertem Osteoid (63x)	S. 95
3-34	Reaktionsschema bei Anwendung des ApopTag-ISOL-Kit	S. 97
3-35	Darstellung vitaler Osteozyten (63x)	S. 100
3-36	Darstellung apoptotischer Osteozyten (126x)	S. 101
3-37	Apoptotischer Osteozyt (braun) und vitaler Osteozyt (blauviolett) unmittelbar nebeneinander (107,1x)	S. 101
4-1	Arithmetische Mittel (n=8) bei 22 Messtagen für belastete Gruppen bzw. 8 für die Kontrollgruppe. Veränderung der Steifigkeit und Standardabweichungen	S. 111

4-2	Veränderung der arithmetischen Mittel der Steifigkeit im beschriebenen Zeitraum	S. 112
4-3	Arithmetische Mittel der Osteoidauflagerung und Standardabweichung	S. 114
4-4	Gegenüberstellung der Steifigkeitszunahme und gemessener Osteoid-Dicke. (arithmetische Mittel und Standardabweichung)	S. 115
4-5	Arithmetische Mittel der Alkalischen Phosphatase	S. 117
4-6	Arithmetische Mittel der Laktatdehydrogenase	S. 119
4-7	Arithmetische Mittel der pH-Werte	S. 120

## 8 Literaturverzeichnis

- (1) Abe, E., Yamamoto, M., Taguchi, Y., Lecka-Czernik, B., Economides, A.N., Stahl, N., Jilka, R.L., Manolagas, S.C., *Requirement of BMP's 2/4 for postnatal osteoblast and Osteoclast formation: antagonism by noggin*, Bone, 1998
- (2) Akhter, M.P., D.M.Cullen, R.R.Recker. *Bone adaptation response to sham and bending stimuli in mice*. J Clin Densitom, 5(2):207-16, 2002
- (3) Albrektsson, T., A.R.Eriksson, M.Jakobsson, P.Kalebo, K.G.Strid, A.Tjellstrom. *Bone repair in implant models: a review with emphasis on the harvest chamber for bone regeneration studies*. Int J Oral Maxillofac Implants, 4(1):45-54, 1989
- (4) Avrieli, Y., Y. Sherman, S. A. Ben-Sasson. *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. J Cell Biol, 119(3):493-501, 1992
- (5) Baron, R., *Anatomy and ultrastructure of bone*, Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism 1999
- (6) Barnes, G.L., Kostenuik, P.J., Gerstenfeld, L.C. and Einhorn, T.A., *Perspective, growth factor regulation of fracture repair*, J. Bone Mineral Research, 1999
- (7) Baron, R., Vignery, A., Tran Van, P., *The significance of lacunar erosion without osteoclasts: Studies on the reversal phase of the remodelling sequence*, Bone Histomorphometry 1981
- (8) Burger, E.H., J.Klein-Nulend. *Mechanotransduction in bone-role of the lacuno-canalicular network*. FASEB J, 13 Suppl:S101-12, 1999
- (9) Boppart, M.D., D.B. Kimmel, J.A. Yee, D.M. Cullen. *Time course of osteoblast appearance after in vivo mechanical loading*. Bone, 23(5):409-15, 1998.

- 
- (10) Blumenthal, N.C. *Mechanisms of inhibition of calcification*. Clin Orthop.,(247):279-89
- (11) Bekker, P.J., C.V.Gay. *Biochemical characterization of an electrogenic vacuolar proton pump in purified chicken osteoclast plasma membrane vesicles*. J Bone Miner Res, 5(6):569-79, 1990
- (12) Blair, H.C., S.L.Teitelbaum, R.Ghiselli, S.Gluck. *Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump*. Science, 245(4920):855-7, 1989
- (13) Bikle, D.D., B.P.Halloran, E.R.Morey-Holton. *Space flight and the skeleton: lessons for the earthbound*. Endocrinologist,7(1):10-22, 1997
- (14) Chambers, T.J., Revell, P.J., Fuller, K. et al, *Resorption of bone by isolated osteoclasts*, J. Cell Sci., 66, 383, 1984
- (15) Caillot-Augusseau, A., M.H. Lafage-Proust, C.Soler, J.Pernod, F.Dubois, C.Alexandre. *Bone formation and resorption biological markers in cosmonauts during and after a 180-day space flight (Euromir 95)*. Clin chem, 44(3):578-85, 1998
- (16) Cheng, B., Y.Kato, S.Zhao, J.Luo, E.Sprague, L.F.Bonewald, J.X.Jiang. *PGE(2) is essential for gap junction-mediated intercellular communication between osteocyte-like MLO-Y4 cells in response to mechanical strain*. Endocrinology, 142(8):3464-73, 2001
- (17) Cheng, M.Z., G.Zaman, S.C.Rawlinson, R.F.Suswillo, L.E.Lanyon. *Mechanical loading and sex hormone interactions in organ cultures of rat ulna*. PG – 502-11. J Bone Miner Res, 11(4), 1996
- (18) Chow, J.W., A.J.Wilson, T.J.Chambers, S.W.Fox. *Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats*. PG – 1760-7. J Bone Miner Res, 13(11), 1998

- 
- (19) Cowin, S.C , L.Moss-Salentijn, M.L.Moss. *Candidates for the mechanosensory system in bone*. J Biomech Eng, 113(2):191-7, 1991
- (20) Chandrasekharan, N.V., H.Dai, K.L.Roos, N.K.Evanson, J.Tomsik, T.S.Elton, D.L. Simmons. *Cox 3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic / antipyretic drugs: cloning, structure, and expression*. Proc Natl Acad. Sci USA, 99(21):13371-3, 2002
- (21) Dobnig, H. and Turner, R., *Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increase bone formation in adult rats by activation of bone lining cells*, Endocrinology 1995
- (22) Ducy, P., Zhang,R., Geoffroy, V., Ridall,A.L., Karsenty, G., *Osf2/Cbfa1: a transcriptional activator of osteoblast differentiation*, Cell 1997
- (23) Dexter, M., T.Allen. *Haematopoiesis. Multi-talented stem cells?* Nature, 360(6406):709-10, 1992
- (24) Dotty , S.B.. *Morphological evidence of gap junctions between bone cells*. Calcif Tissue Int, 33(5):509-12, 1981
- (25) Dive C; Gregory CD; Phipps DJ; Evans DL; Milner AE; Wyllie AH; *Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry*; Biochim Biophys Acta 1992 Feb 3;1133(3):275-85
- (26) Dunlay, R., K.Hruska. *PTH receptor coupling to phospholipase C is an alternate pathway of signal transduction in bone and kidney*. Am J Physiol, 258(2 Pt 2):F223-31, 1990
- (27) Ericksen, E.F., Axelrod,D.W., Melsen,F., Bone Histomorphology 1999
- (28) Frost, H.M. *In vivo osteocyte death*, Journ. Bone Joint Surg. 1960

- 
- (29) Frost, H.M., *Bone development during childhood; a tutorial in Paediatric Osteology*, 1996
- (30) Frost, H.M., *Bone "mass" and the "mechanostat"*, *Anat. Rec.*, 1987
- (31) Frost, H.M., *The mechanostat: a proposed pathogenetic mechanism of osteoporosis and the bone mass effects of mechanical and nonmechanical agents*, *Bone Miner.*, 1987
- (32) Frost, H.M., *Introduction to a New Skeletal Physiology* 1995
- (33) Fleisch, H. A. *Bisphosphonates: preclinical aspects and use in osteoporosis*. *Horm Metab Res*, 29(3):145-50, 1997
- (34) Frost, H.M., *Resting seams: On and off in lamellar bone forming centers*. *Metab. Bone Dis. Rel. Res.* 2S, 167-170, 1980
- (35) Frost, H.M. *Some ABCs of skeletal pathophysiology. I: Introduction to the series*. *Calcif Tissue Int*, 45(1):1-3, 1989
- (36) Frost, H.M., *Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling*. *Calcif Tissue Res*, 3(3):211-37, 1969
- (37) Fuller, K., J.M.Owens, C.J.Jagger, A.Wilson, R.Moss, T.J.Chambers. *Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts*. *J Exp Med*, 178(5):1733-44, 1993
- (38) Gehron-Robey, P. and Boskey, A.L., *The biochemistry of bone*, Osteoporosis 1996
- (39) Gray, A.W., M.E.Davies, L.B.Jeffcott. *Localisation and activity of cathepsin K and B in equine osteoclasts*. *Res Vet Sci*, 72(2):95-103, 2002

- 
- (40) Goldstein, S.A., L.S.Matthews, J.L.Kuhn, S.J.Hollister. *Trabecular bone remodeling: an experimental model*. J Biomech, 24 Suppl 1 :135-50, 1991
- (41) Guldberg, R.E., N.J.Caldwell, X.E.Guo, R.W.Goulet, S.J.Hollister, S.A.Goldstein. *Mechanical stimulation of tissue repair in the hydraulic bone chamber*. J Bone Miner Res, 12(8):1295-302, 1997
- (42) Green DR, Reed JC. *Mitochondria and apoptosis*. Science. 1998 Aug 28;281(5381):1309-12
- (43) Gori, F., L.C. Hofbauer, C.R.Dunstan, T.C.Spelsberg, S.Khosla, B.L.Riggs. *The expression of osteoprotegerin and Rank ligand and the support of osteoclast formation by stromal osteoblast lineage cells is developmentally regulated*. Endocrinology, 141(12):4768-76, 2000
- (44) Huang, S., L.W.Terstappen. *Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells*. Nature, 368(6472):664, 1994
- (45) Hong, M.H., C.H.Jin, T.Sato, Y.Ishimi, E.Abe, T.Suda. *Transcriptional regulation of the production of the third component of complement (C3) by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D $_3$  in mouse marrow-derived stromal cells (ST2) and primary osteoblastic cells*. Endocrinology, 129(5):2774-9, 1991
- (46) Hofbauer, L.C., A.E. Heufelder. *Role of receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand and osteoprotegerin in bone cell biology*. J Mol Med, 79(5-6):243-53, Jun 2001
- (47) Hessle, L., K.A.Johnson, H.C.Anderson, S.Narisawa, A.Sali, J.W.Goding, R.Terkeltaub, J.L.Millan. *Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralisation*. Proc Natl Acad Sci USA, 99(14):9445-9, 2002

- 
- (48) Jee, W.S. and Nolan, P.D. *Origin of Osteoclasts from the fusion of phagocytes*, Nature 1963
- (49) Jee, W.S., *The skeletal tissues*, Cell and Tissue Biology 1988
- (50) Jee, W.S., *Structure and Function of bone tissue Orthopäedics*, Principles of Basic and Clinical Science 1999
- (51) Johnson, K.A., L.Hessle, S.Vaingankar, C.Wennebrg, S.Mauro, S.Narisawa, J.W.Goding, K.Sano, J.L.Millan, R.Terkeltaub. *Osteoblast tissue-nonspecific alkaline phosphatase antagonizes and regulates PC-1*. Am J Physiol Regul Integr Comp, 279(4):R1365-77, 2000
- (52) Jeansonne, B.G, .F.F.Feagin, R.W.McMinn, R.L.Shoemaker, W.S.Rehm. *Cell-to-cell communication of osteoblasts*. J Dent Res, 58(4):1415-23, 1979
- (53) Jee, W.S., Y.F.Ma. *The in vivo anabolic actions of prostaglandins in bone*. Bone, 21(4):297-304, 1997
- (54) Jee, W.S., K.Ueno, Y.P.Deng, D.M.Woodbury. *The effects of prostaglandin E2 in growing rats: increased metaphyseal hard tissue and cortico-endosteal bone formation*. Calcif Tissue Int, 37(2):148-57, 1985
- (55) Jimi, E., T.Shuto, T.Koga. *Macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 alpha maintain the survival of osteoclast-like cells*. Endocrinology, 136(2):808-11, 1995
- (56) Jin, C.H , T.Shinki, M.H.Hong, T.Sato, A.Yamaguchi, T.Ikeda, S.Yoshiki, E.Abe, T.Suda. *1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 regulates in vivo production of the third component of complement (C3) in bone*. Endocrinology, 131(5):2468-75, 1992
- (57) Jones, D., G.Leivseth, and J.Tenbosh. *Mechano reception in osteoblast-like cells*. Biochem Cell Biol, 73(7-8):525-34, 1995

- 
- (58) Jacobson, M.D., M. Weil, M. C. Raff. *Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death*. J Cell Biol. 133(5):1041-51, 1996
- (59) Khosla, S. and Kleerekoper, M. *Biomechanical markers and bone turnover*, Primer on Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism 1999
- (60) Kotzar, G.M., Davy, D.T., Goldberg, V.M., Heiple, K.G., Berilla, J., *Telemeterized in vivo hip joint force data: a report on two patients after total hip surgery*, J. Orthop. Res., 1991
- (61) Kawaguchi, H., C.C.Pilbeam, J.R.Harrison, L.G.Raisz. *The role of prostaglandins in the regulation of bone metabolism*. Clin Orthop, (313):36-46, Apr. 1995
- (62) Kerr, J.F., A.H.Wyllie, A.R.Currie. *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. Br J Cancer, 26(4):239-57, Aug. 1972
- (63) Lian, J.B., Stein, G.S. Canalis, E., Gehron-Robey,P. and Boskey,A.L. *Bone formation: osteoblast lineage cells, growth factors, matrix proteins and the mineralization process*; Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism 1999
- (64) Lian, J.B., and Stein,G.S. *Osteoblast biology*, Osteoporosis 1996
- (65) Lanyon, L.E., *Control of bone architecture by functional load bearing*. J Bone Miner Res, 7 Suppl 2:S369-75, 1992
- (66) Lanyon. L.E., *Functional strain as a determinant for bone remodeling*. Calcif Tissue Int, 36 Suppl1:S56-61, 1984
- (67) Lanyon, L.E., *Functional strain in bone tissue as an objective, and controlling stimulus for adaptive bone remodeling*. J.Biotech, 20(11-12):1083-93

- 
- (68) Lanyon, L.E. ,*Using functional loading to influence bone mass and architecture: objectives, mechanisms, and relationship with estrogen of the mechanically adaptive process in bone.* Bone,1(Suppl):37-43, 1996
- (69) Lin, C.H., W.S.Jee, Y.F.Ma, R.B.Setterberg. *Early effects of prostaglandin E2 on bone formation and resorption in different bone sites of rats.* Bone, 17(4 Suppl):255S-259S, Oct. 1995
- (70) Lozupone, E., C.Palumbo, A.Favia, M.Ferretti, S.Palazzini, F.P.Cantatore. *Intermittent compressive load stimulates osteogenesis and improves osteocyte viability in bones cultured in vitro.* Clin Rheumatol, 15(6):563-72
- (71) Lu B, Wang L, Medan D, Toledo D, Huang C, Chen F, Shi X, Rojanasakul Y. *Regulation of Fas (CD95)-induced apoptosis by nuclear factor-kappaB and tumor necrosis factor-alpha in macrophages.* Am J Physiol Cell Physiol. 2002 Sep;283(3):C831-8.
- (72) Manolagas, S.C., Weinstein, R.S., *New developments in the pathogenesis and treatment of steroid-induced osteoporosis,* J. Bone Miner. Res. 1999
- (73) Mundy, F.R.; *Bone remodelling; Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism;*1999
- (74) Miller, S.C., Jee, W.S.; *The bone lining cell: a distinct phenotyp?* Calcif. Tissue Int.,41,1; 1992
- (75) Marie, P.J., *Cellular and molecular alterations of osteoblasts in human disorders of bone formation,* Histol. Histopathol. 1999
- (76) Ma, Y.F., X.J.Li, W.S.Jee, J.McOsker, X.J.Liang, R.Setterberg, S.Y.Chow. *Effects of prostaglandin E2 and F2 alpha on the skeleton of osteopenic ovariectomized rats.* Bone, 17(6):549-54, Dec. 1995

- 
- (77) Moalli, M.R., S. Wang, N.J.Caldwell, P.V. Patil, C.R.Maynard. *Mechanical stimulation induces pp125(FAK) and pp60(src) activity in an in vivo model of trabecular bone formation.* J Appl Physiol, 91(2):912-8, 2001
- (78) Modis, L., A.Botos, I.Kiviranta, L.Lukacsko, H.J.Helminen. *Differences in submicroscopic structure of the extracellular matrix of canine femoral and tibial condylar articular cartilages as revealed by polarization microscopical analysis.* Acta Biol Hung, 47(1-4):341-53, 1996
- (79) Morey-Holton, E.R. and S.B.Arnaud. *Spaceflight and calcium metabolism.* Physiologist, 28(6 Suppl):S9-12, 1985
- (80) Mosley, J.R., B.M. March, J. Lynch, L.E. Lanyon. *Strain magnitude related change in whole bone architecture in growing rats.* Bone, 20(3): S191-8, 1997
- (81) Mulari, M.T., H.Zhao, P.T.Lakkakorpi, H.K.Vaananen. *Osteoclast ruffled border has distinct subdomains for secretion and degraded matrix uptake.* Traffic, 4(2):113-25, 2003
- (82) Moalli, M.R., N.J.Caldwell, P.V.Patil, S.A.Goldstein. *An in vivo model for investigations of mechanical signal transduction in trabecular bone.* J Bone Miner Res, 15(7):1346-53, 2000
- (83) Noble, B.S., Stevens,H. Mosley, J.R., Pitsillides, A.A., Reeve, J., Lanyon, L.; *Bone loading changes the number and distribution of apoptotic osteocytes in cortical bone* , J. Bone and Mineral Research, 2000
- (84) Noble, B., Stevens, H., Loveridge, N., Reeve,J., *Identification of apoptotic changes in osteocytes in normal und pathological human bone,* Bone 1997
- (85) Nagata, S., *Apoptotic DNA fragmentation.* Exp Cell Res, 256(1):12-8, Apr. 2000

- 
- (86) Nefussi, J.R., J.M.Sautier, V.Nicolas, N.Forest. *How osteoblasts become osteocytes : a decreasing matrix forming process.* J Biol Buccale, 19(1):75-82, 1991
- (87) Niederdellmann, H., B.A.Rahn. *Histological studies following osteosynthesis on the canine mandible using the Freiburg tension plate* Fortschr Kiefer Gesichtschir, 21:307-9, 1976
- (88) Nyman, M.T., P.Paavolainen, S.Forsius, C.Lamberg-Allardt. *Clinical evaluation of fracture healing by serum osteocalcin and alkaline phosphatase.* Ann Chir Gynaecol, 80(3):289-93, 1991
- (89) Okuda, A., L.M.Taylor, J.N.Heersche. *Prostaglandin E2 initially inhibits and then stimulates bone resorption in isolated rabbit osteoclast cultures.* Bone Miner, 7(3):255-66, Nov. 1989
- (90) Ott, S.M., *Bone formation periods studied with triple tetracycline labels in women with postmenopausal osteoporosis.* J Bone Miner Res, 8(4):443-50, 1993
- (91) Parfitt, A.M., *The physiologic and clinical significance of bone histomorphometric data,* Bone Histomorphometrie: Techniques and Interpretation, 1983
- (92) Puzas, E.J., Lewis, G.D.; *Biology of osteoclasts and osteoblasts;* Orthopaedics – Principles of Basic and Clinical Science; 1999
- (93) Parfitt, A.M., M.K.Drezner, F.H.Glorieux, J.A.Kanis, H.Malluche, P.J.Meunier, S.M.Ott, R.R.Recker. *Bone Histomorphometry: Standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee.* J Bone Miner Res, 2(6):595-610, 1987
- (94) Palumbo, C., S.Palazzini, G.Marotti. *Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation.* Bone, 11(6):401-6, 1990

- 
- (95) Pan, Z., W.S.Jee, Y.F.Ma, J.E.McOsker, X.J.Li. *Intermittent treatments of prostaglandin E2 plus risedronate and prostaglandin E2 alone are equally anabolic on tibial shaft of ovariectomized rats*. Bone, 17(4):291-296, Oct. 1995
- (96) Parfitt, A.M., G.R.Mundy, G.D.Roodman, D.E.Hughes, B.F.Boyce. *A new model for the regulation of bone resorption, with particular reference to the effects of bisphosphanates*. J Bone Miner Res, 11(2):150-9, 1996
- (97) Parfitt, A.M., *Plasma calcium control at quiescent bone surfaces: a new approach to the homeostatic function of bone lining cells*. Bone, 10(2):87-8, 1989
- (98) Parfitt, A.M. *The cellular basis of bone turnover and bone loss: a rebuttal of the osteocytic resorption-bone flow theory*. Clin Orthop, (127):236-47, 1977
- (99) Patterson-Buckendahl, P., R.K.Globus, D.D.Bikle, L.E.Cann, E.R.Morey-Holton. *Effects of stimulated weightlessness on rat osteocalcin and bone calcium*. Am J Physiol, 257(5Pt2):1103-9, 1989
- (100) Pead, M.J. , R. Suswillo, T.M. Skerry, S. Vedi, and L.E. Lanyon. *Increased 3H-uridine levels in osteocytes following a single short period of dynamic bone loading in vivo*. Calcif Tissue Int, 43(2):92-6, 1988.
- (101) Recker, R.R., *Bone Histomorphometry: Techniques and Interpretation*, 1983
- (102) Rodan, G.A., *Mechanical loading, estrogen deficiency and the coupling of bone formation to bone resorption*, J. Bone Miner. Res., 1991
- (103) Rodan, G.A. and Rodan, S.B. *The cells of bone, Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management* 1995
- (104) Ryder, K.D., R.L.Duncan. *Parathyroid hormone modulates the response of osteoblast-like cells to mechanical stimulation*. Calcif Tissue Int, 67(3):241-6, 2000

- (105) Romberg, R.W., P.G.Werness, B.L.Riggs, K.G.Mann. *Inhibition of hydroxyapatite crystal growth by bone-specific and other calcium-binding proteins*. Biochemistry, 25(5):1176-80, 1986
- (106) Rubinacci, A., M.Covini, C.Bisogni, I.Villa, M.Galli, C.Palumbo, M.Ferretti, M.A.Muglia, G.Marotti. *Bone as an ion exchange system: evidence for a link between mechanotransduction and metabolic needs*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 282(4):E851-64, 2002
- (107) Rubin, C.T., L.E.Lanyon. Kappa Delta Award Paper. *Osteoregulatory nature of mechanical stimuli: function as a determinant for adaptive remodeling in bone*. PG – 300-10. J Orthop res, 5(2), 1987
- (108) Rubin, C.T., L.E.Lanyon. *Regulation of bone formation by applied dynamic loads*. J Bone Joint Surg Am, 66(3):397-402, 1984
- (109) Rahn, B.A., S.M.Perren. *Alizarin complexon-fluorochrome for bone and dentine labeling*. Experientia, 28(2):180, Feb. 1972
- (110) Rahn, B.A., S.M.Perren. *Calcein blue as a fluorescent label in bone*. Experientia, 26(5):519-20, May 1970
- (111) Rahn, B.A., S.M.Perren. *Xylenol orange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labeling of calcifying tissues*. Stain Technol. , 46(3):125-9, May 1971
- (112) Rahn, B.V., F.C.Bacellar, L.Trapp, S.M.Perren. *A method for morphometry of bone formation using fluorochromes (author's transl)* Aktuelle Traumatol, 10(2):109-15, Apr. 1980
- (113) Raisz, L.G., P.M.Fall. *Biphasic effects of prostaglandin E2 on bone formation in cultured fetal rat calvariae: interaction with cortisol*. Endocrinology, 126(3):1654-9, Mar. 1990

- 
- (114) Raisz, L.G., C.C.Pilbeam, P.M.Fall. *Prostaglandins: mechanisms of action and regulation of production in bone*. Osteoporos Int, 3 Suppl 1:136-40, 1993
- (115) Rubin, C.T. and L.E.Lanyon. *Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude*. Calcif Tissue Int, 37 (4):411-7, 1985
- (116) Rodan, G. A., T.Mensi, A.Harvey. *A quantitative method for the application of compressive forces to bone in tissue culture*. PG – 125-31. Calcif Tissue Res, 18(2), 1975
- (117) Rubin, C., A.S.Turner, R.Muller, E.Mittra, K.McLeod, W.Lin, Y.X. Qin. *Quantity and quality of trabecular bone in the femur are enhanced by a strongly anabolic, noninvasive mechanical intervention*. PG – 349-57. J Bone Miner Res, 17(2), 2002
- (118) Rubin, C.T., T.S.Gross, K.J.Mcleod, S.D.Bain. *Morphologic stages in lamellar bone formation stimulated by a potent mechanical stimulus*. J Bone Miner Res, 10(3):488-95, 1995
- (119) Reed JC. *Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies*. Semin Hematol. 1997 Oct;34(4 Suppl 5):9-19
- (120) Swarthaut, J.T., T.A.Doggett, J.L.Lemker, N.C.Partridge. *Stimulation of extracellular signal-regulated kinases and proliferation in rat osteoblastic cells by parathyroid hormone is protein kinase C-dependent*. J Biol Chem, 276(10):7586-92, 2001
- (121) Sabatini, M., C.Lesur, M.Pacherie, P.Pastoureau, N.Kucharczyk, J.L.Fauchere, J.Bonnet. *Effects of parathyroid hormone and agonists of the adenylyl cyclase and protein kinase C pathways on bone cell proliferation*. Bone, 18(1):59-65, 1996

- (122) Skerry, T.M., L.Bitensky, J.Chayen, L.E.Lanyon. *Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo*. J Bone Miner Res, 4(5):783-8, 1989
- (123) Sahara, T., K.Hoh, K.Debari,T.Sasaki. *Specific biological functions of vacuolar-type H<sup>+</sup>-ATPase and lysosomal cysteine proteinase, cathepsin K, in osteoclasts*. Anat Rec, 270A(2):152-61, 2003
- (124) Stroup, G.B., M.W.Lark, D.F.Veber, A.Bhattacharyya, S.Blake, C.C.Dare, K.F.Erhard, S.J.Hoffmann, I.E.James, R.W.Marquis, Y.Ru, J.A.Vasko-Moser, B.R.Smith, T.Tomaszek, M.Gowen. *Potent and selectiv inhibition of bone resorption in vivo in a nonhuman primate*. J Bone Miner Res, 16(10):1739-46, 2001
- (125) Shiotani, A., M.Takami, K.Itoh, Y.Shibasaki, T.Sasaki. *Regulation of osteoclast differentiation and function by receptor activator of NFκB ligand and osteoprotegerin*. Anat Rec, 268(2):137-46, 2002
- (126) Saftig, P., E.Hunziker, V.Everts, S.Jones, A.Boyde, O.Wehmeyer, A.Suter, .v.Figura. *Functions of cathepsin in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice*. Adv Exp Med Biol, 477:293-303, 2000
- (127) Schoppet, M., K.T. Preissner, L.C. Hofbauer. *RANK ligand and osteoprotegerin: paracrine regulators of bone metabolism and vascular function*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 22(4):549-53, Apr 2002
- (128) Suzuki, H.K., A.Mathews. *Two-color fluorescent labeling of mineralizing tissues with tetracycline and 2,4-bis[N,N'-di-(carbomethyl)aminomethyl] fluorescein*. Stain Technol, 41(1):57-60, Jan. 1966
- (129) Sgonc, R., G.Wick. *Methods for the detection of apoptosis*. Int Arch Allergy Immunol, 105(4):327-32, Dec. 1994

- 
- (130) Sulston J.E., Horvitz H.R. *Post-embryonic cell lineages of the nematode, Caenorhabditis elegans*. Dev Biol (United States), Mar 1977, 56(1) p110-56
- (131) Salvesen, G.S., Dixit, V.M., *Caspases: intracellular signalling by proteolysis*, Cell. 1997 Nov 14;91(4):443-6.
- (132) Tomkinson, A., Bevers, E., Wit, J.M., Reeve, J., Noble, B.S. *The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis* 1998
- (133) Tomkinson, A, Reeve, J., Shaw, R.W., Noble, B.S. *The death of osteocyte by apoptosis in human bone is observed following estrogen withdrawal by GnRH analog*, J Clin. Endocrinol. Metabolism 1997
- (134) Taichman, R.S., S.G.Emerson. *Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony stimulating factor*. J Exp Med, 179(5):1677-82, 1994
- (135) Taichman, R.S., S.G.Emerson. *Human osteosarcoma cell lines MG-63 and SaOS-2 produce G-CSF and GM-CSF: identification and partial characterization of cell-associated isoforms*. Exp Hematol, 24(4):509-17, 1996
- (136) Taichman, R.S., M.J.Reilly, S.G.Emerson. *Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures*. Blood, 87(2):518-24, 1996
- (137) Termine, J.D. , K.M.Cann. *Inhibition of apatite formation by phosphorylated metabolites and macromolecules*. Calcif Tissue Res, 22(2): 149-57, 1976
- (138) Tanaka, S., N.Takahashi, N.Udagawa, T.Tamura, T.Akatsu, E.R.Stanley, T.Kurokawa, T. Suda. *Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors*. J Clin Invest, 91(1):257-63, 1993

- (139) Tang, L.Y., D.M.Cullen, J.A.Yee, W.S.Jee, D.B.Kimmel. *Prostaglandin E2 increases the skeletal response to mechanical loading.* J Bone Miner Res, 12(2):276-82, Feb. 1979
- (140) Tagil, M., P .Aspenberg. *Cartilage induction by controlled mechanical stimulation in vivo.* J Orthop Res, 17(2):200-4, 1999
- (141) Ueno, K., T.Haba, D.Woodbury, P.Price, R.Anderson, W.S.Jee. *The effects of prostaglandin E2 in rapidly growing rats: depressed longitudinal and radial growth and increased metaphyseal hard tissue mass.* Bone, 6(2):79-86, 1985
- (142) Umemura, Y., D. J. Baylink, J.E. Wergedal, S. Mookan, A.K.Srivastava. *A time course of bone response to jump exercise in C57BL/6J mice.* Bone Miner Metab, 20(4):209-15, 2002
- (143) Vaananen, H.K., M.Horton. *The osteoblast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure.* J Cell Sci, 108(Pt8):2729-32, 1995
- (144) Vashishth, D., K.E.Tanner, W.Bonfield. *Fatigue of cortical bone under combined axial-torsional loading.* J Orthop Res, 19(3):414-20, 2001
- (145) Vaux, D.L., Strasser, A., *The molecular biology of apoptosis, Proc Natl Acad Sci USA.* 1996 Mar 19;93(6):2239-44
- (146) Weinstein,R.S., Jilka,R., Parfitt,A.M. *Inhibition of osteoblastogenesis and promotion of apoptosis of osteoblasts and osteocytes by glucocorticoids,* J. Clin. Invest. 1998
- (147) Wittrant, Y., S.Couillaud, S.Theoleyre, C.Dunstan, D.Heymann, F.Redini. *Osteoprotegerin differentially regulates protease expression in osteoclast cultures.* Biochem Biophys Res Commun, 293(1): 38-44, 2002

- (148) Woodiel, F.N., P.M.Fall, L.G.Raisz. *Anabolic effects of prostaglandins in cultured fetal rat calvariae: structure-activity relations and signal transduction pathway.*  
J Bone Miner Res, 11(9):1249-55, Sep. 1996
- (149) Wronski, T.J., E.R.Morey-Holton, S.B.Doty, A.C. Maese, C.C.Walsh. *Histomorphometric analysis of rat skeleton following spaceflight.* Am J Physiol, 252(2Pt2):R252-5, 1987
- (150) Wronski, T.J., E.R.Morey-Holton, W.S.Ju. *Skeletal alteration in rats during space flight.* Adv Space Res, 1(14):135-40, 1981
- (151) Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP, *Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms.* Annu Rev Immunol. 1999;17:331-67
- (152) Weil, M., M.D.Jacobson, H.S.Coles, T.J.Davies, R.L.Gardner, K.D.Raff, M.C.Raff. *Constitutive expression of the machinery for programmed cell death.* J Cell Biol, 133(5):1053-9, Jun. 1996
- (153) Wyllie, A.H., *Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation.* Nature, 284(5756):555-6, Apr. 1980
- (154) Yoshida, H., S.Hayashi, T.Kunisada, M.Ogawa, L.D.Shultz, S.Nishikawa, H.Okamura, T.Sudo. *The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene.* Nature, 345(6274):442-4, 1990
- (155) Yao, W., W.S.Jee, H.Zhou, J.Lu, L.Cui, R.Setterberg, T.Liang, Y.Ma. *Anabolic effect of prostaglandin E2 on cortical bone of aged male rats comes mainly from modeling-dependent bone gain.* Bone, 25(6):697-702, Dec. 1990

- 
- (156) Yeh, C.K., G.A.Rodan. *Tensile forces enhance prostaglandine E synthesis in osteoblastic cells grown on collagen ribbons*. PG – S67-71. *Calcif Tissue Int*, 36 Suppl 1, 1984
- (157) Zerwekh, J.E.. *Bone metabolism*. *Semin Nephrol*, 12(2):79-90, 1992
- (158) Zaidi, M., H.C.Blair, B.S.Moonga, E.Abe, C.L.Huang. *Osteoclastogenesis, bone resorption, and osteoclast-based therapeutics*. *J Bone Miner Res*, 18(4):299-609, 2003
- (159) Zaman, G., R.F.Suswillo, M.Z.Cheng, I.A.Tavares, L.E.Lanyon. *Early responses to dynamic strain change and prostaglandins in bone-derived cells in culture*. *J Bone Miner Res*, 12(5):769-77, May 1997
- (160) van der Plas, A., E.M.Aarden, H.Feijen, A.H. de Boer, A.Wiltink, M.J.Alblas, L.de Leij, P.J.Nijweide. *Characteristics and properties of osteocytes in culture*. *J Bone Miner Res*, 9(11):1697-704, 1994
- (161) Thorwesten, L., *Der Einfluss von Bandagen und Orthesen auf sensormotorische Defizite am oberen Sprunggelenk*, *Orthopaedie-Technik* 51, No. 6, page 552ff, 2000
- (162) Frink, U., D. Schmidtbleicher, C. Wörn. *Vergleich biomechanischer Messverfahren zur Bestimmung der Sprunghöhe bei Vertikalsprüngen*, *Leistungssport*, 2. Ausgabe, page 48-53, 1991
- (163) Revell, P.A. *Histomorphometry of bone*. *J Clin Pathol*, 36(12):1323-31, Dec. 1983
- (164) Brown, H., R. Prescott. *Applied Mixed Models in Medicine*. WILEY, 1999

- 
- (165) Dempster, D.W., E.Shane, W.Horbert, R.Lindsay. *A simple method for correlative light and scanning electron microscopy of human iliac crest bone biopsies: qualitative observations in normal and osteoporotic subjects.* J Bone Miner Res, 1(1):15-21, 1986
- (166) Kannas, P., L.Josza, M. Kvist, T.L. Jarvinen, V.M. Mauna, T. Hurme, M.Jarvinen. *Expression of osteocalcin in the patella of experimentally immobilized and remobilized rats.* J Bone Miner Res, 11(1):79-87, Jan. 1991
- (167) Meyer, U., T. Meyer, J. Vosshans, U. Joos. *Decreased expression of osteocalcin and osteonectin in relation to high strains and decreased mineralization in mandibular distraction osteogenesis.* J Craniomaxillofac Surg, 27(4)222-7, Aug. 1999
- (168) E.M. Aarden, A.M. Wassenaar, M.J. Alblas, P.J. Nijweide. *Immunocytochemical demonstration of extracellular proteins in isolated osteocytes.* Histochem Cell Biol, 106(5):495-501, Nov. 1996
- (169) Ko, K.S., C.A. McCulloch. *Intercellular mechanotransduction: cellular circuits that coordinate tissue responses to mechanical loading.* Biochem Biophys Res, 285(5):1077-83, Aug. 2001
- (170) L.C. Hofbauer, S. Khosla, C.R. Dunstan, D.L. Lacey, W.J. Boyle, B.L. Riggs. *The roles of osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption.* J Bone Miner Res, 15(1):2-12, Jan 2000
- (171) D.B. Jones, E. Bröckmann, T. Pohl, E.L. Smith *Development of a mechanical testing and loading system for trabecular bone studies for long term culture*  
European Cells and Materials Vol. 5. 2003 (pages48-60)

## 9 Firmenverzeichnis

Biochrom	Biochrom KG, Berlin
Braun Medical	Braun Medical AG, Sempach / CH
Exakt	Exakt Apparatebau GmbH&Co.KG, Norderstedt
Falcon	Falcon/Becton Dickinson Labware Europe, Le Pont De Claix / France
Fresenius	Fresenius AG, Bad Homburg
Gelaire	über Biological Instrumentation Services Ltd., Kirkham / UK
Gibco	Gibco Invitrogen Corporation GmbH, Karlsruhe
Gilson	Gilson AG, Schweiz
Heidolph	Heidolph GmbH, Schwabach
Henkel	Henkel AG, Düsseldorf
Hitachi	Hitachi Data Systems Europe
ICN Biomedicals	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
Inolab	WTW GmbH&Co.KG, Weilheim
Intergen Company	Intergen Company, Oxford / UK
Ismatec	Ismatec GmbH, Wertheim-Mondfeld
Kistler	Kistler Instrumente GmbH, Ostfildern
Kobe	Kobe GmbH, Marburg
Kulzer	Heraeus Kulzer GmbH&Co.KG, Wehrheim
Leica	Leica Camera AG, Solms
Leitz	Leitz GmbH&Co.KG, Stuttgart
Memmert	Memmert GmbH&Co.KG, Schwabach
Merck	Merck Eurolab GmbH, Frankfurt / Main
Miles	Miles, Naperville / Irland
Milipore	Milipore Bedford, Ma / USA
Novodirekt	Novodirekt GmbH, Kehl
Nunc	Nalge Nunc International / DK
PAA	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Pharmed	Ismatec GmbH, Wertheim-Mondfeld
Physik-Instrumente	Physik Instrumente GmbH&Co., Karlsruhe

Proxxon	über Conrad Elektronik GmbH, Hirschau
Riedel-de Haen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Roth	Roth GmbH&Co., Karlsruhe
Sarstedt	Sarstedt AG&Co.KG, Nümbrecht
Sigma	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Tygon	über Ismatec GmbH, Wertheim-Mondfeld
Wako	Wako Chemicals GmbH, Neuss

## 10 Abkürzungsverzeichnis

AP	-	Alkalische Phosphatase
Aqua bidest	-	zweifach destilliertes Wasser
BSP	-	Bone-Sialoprotein
BLZ	-	Bone-lining Zellen
BMP	-	Bone Morphogenic Proteins
BMU	-	Bone Multicellular Unit
BP	-	Base Pairs/ Basenpaare
BRU	-	Bone Remodeling Unit
C3	-	Komplementfaktor C3
CFU-GM	-	Granulocyte and Macrophage Colony-forming Units
COX	-	Cyclooxygenase
DMEM	-	Dulbecco's Mod. Eagle Medium
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
E-Modul	-	Elastizitäts-Modul
FCS	-	Fetal Calf Serum
FGF	-	Fibroblast Growth Factor
Hz	-	Hertz
IGF I / II	-	Insulin-like Growth Factor I / II
ISS	-	International Space Station
LDH	-	Laktatdehydrogenase
M-CSF	-	Macrophage Colony Stimulating Factor
MES	-	Minimum Effective Strain
MES <sub>r</sub>	-	Minimum Effective Strain (remodeling)
N	-	Newton
OB	-	Osteoblast
OIF	-	Osteoklast Inhibiting Factor
OK	-	Osteoklast
OPG	-	Osteoprotegerin
Pa	-	Pascal (M_Mega, G_Giga)
PAS-Reaktion	-	Perjodsäure Schiff-Reaktion

PEA	-	Piezo Elektrischer Aktor
PBS	-	Perfusions- und Belastungssystem
PBS	-	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PEA	-	Piezo Elektrical Aktor
PC	-	Personal Computer
PG	-	Prostaglandin
PTH	-	Parathormon
PPi	-	inorganisches Pyrophosphat
RANK	-	Nuclear Factor KappaB
RANKL	-	Nuclear Factor KappaB-Ligand
STH	-	Somatotropes Hormon
TGF- $\beta$	-	Transforming Growth Factor $\beta$
TNF	-	Tumor Nekrose Faktor
TUNEL	-	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling
U (/dl)	-	Units (/dl)
V	-	Volt
Zetos	-	Perfusions- und Belastungssystem

## **11 Index**

Abbildungsverzeichnis, 134

Abkürzungsverzeichnis, 132

Danksagung, 158

Diskussion der Ergebnisse, 123

Ergebnisse und Auswertung, 110

Einführung, 7

Firmenverzeichnis, 156

Literaturverzeichnis, 137

Material und Methoden, 42

Zielsetzung und Fragestellung, 41

Zusammenfassung, 130

## **12 Danksagung**

Zuerst möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, die mir den Freiraum für diese Arbeit ermöglichten und deren Unterstützung ich mir immer sicher sein konnte und kann.

Ohne die Unterstützung, Hilfe und Motivation vieler weiterer Personen und Institute wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Besonders bedanken möchte ich mich daher bei

- Herrn Prof. Dr. David B. Jones für die Überlassung des spannenden Themas, die immer kompetente Beratung und freundliche Betreuung.
- Frau Marita Kratz, die mir als Laborchefin immer freundlich und hilfsbereit gesinnt war. Durch ihre konstruktive Kritik hat sie sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Auch außerhalb des Labors war und ist sie immer für mich da gewesen. Danke Marita !
- Meinem Freund und Mitstreiter Andreas Metzner, sowie Dr. Hans Peter Klapdohr für die allseits zuverlässige Zusammenarbeit.
- Herrn Eckhard Bröckmann und Herrn Torsten Pohl für die Unterstützung und Aufklärung in allen technischen und physikalischen Fragen und bei Herrn Weng Tan Toh für die zuverlässige Hilfe und die gute Teamarbeit.

Ein Dankeschön geht an das Institut für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik, sowie an das Institut für Pathologie, insbesondere an Frau Angelika Lehnhardt für die Unterstützung und Hilfestellung bei vielen histologischen Fragen.

Auch Frau Dr. Heinzl-Guntermann vom Institut für Medizinische Biometrie und Statistik gebührt ein besonderer Dank für die statistische Beratung und Aufarbeitung der Ergebnisse.

Des weiteren möchte ich mich bei Frau Carina Deuker für das Korrekturlesen der vorgelegten Arbeit sowie für die schönen gemeinsamen, netten und witzigen Stunden bedanken.

## 13 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel: *„Zetos: Ein Kulturbelastungssystem für trabekuläre Knochen. Eine Untersuchung eines Belastungssignals mit verschiedenen Intensitäten an bovinen Knochenzylindern.“* im Medizinischen Zentrum für Operative Medizin / Zentrum für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik unter Leitung von Prof. Dr. D. B. Jones mit Unterstützung durch Frau M. Kratz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Eine Publikation, die die Ergebnisse der vorgelegten Arbeit enthält, befindet sich in Vorbereitung.

Marburg,

24.03.2005

## **14 Verzeichnis der akademischen Lehrer**

Meine akademischen Lehrer an der Philipps-Universität Marburg waren die Damen und Herren:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Bach, Baum, Becker, Bien, Christiansen, Czubayko, Cetin, Daut, Engel, Eilers, Feuser, Geus, Gotzen, Grimm, Griss, Gudermann, Happle, Hellinger, Hesse, Hofmann, Jones, Joseph, Jungclas, Kern, Kienapfel, Klenk, Klose, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Lang, Lange, Lammel, Lengsfeld, Lohoff, Löffler, Lorenz, Maier, Maisch, Max, Mennel, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Pfeiffer, Remschmidt, Renz, Rothmund, Röhm, Schäfer, Schlenzka, Schmidt, Schnabel, Schneyer, Sekundo, Seitz, Seyberth, Simon, Stief, Stiletto, Steininger, Suske, Vogelmeier, Voigt, Vohland, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wilke, Wirth, Wulf, Zielke

## Lebenslauf

Name: Wunsch, Sebastian Mathias

Geburtsdatum: 02.06.1978

Geburtsort: Bautzen

Anschrift: Sebastian Wunsch  
Kasseler Straße 118  
35091 Cölbe, Deutschland

Telefon: 0049-176-23719069

E-Mail: sebastian-wunsch@freenet.de

Schulbildung: 1985-1992 Grund- und Mittelschule Purschwitz  
1992-1997 Friedrich Schiller Gymnasium Bautzen  
1997 Abitur

Wehrdienst: 11/1997-07/1998 Breitenburg/Cottbus

Studium: seit Oktober 1998 Studium der Humanmedizin an der  
Philipps - Universität Marburg

April 2004 Zweites Staatsexamen

Promotion: im Zentrum für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik unter  
Leitung von Prof. Dr. D. B. Jones; Thema: „Zetos, Ein  
Kulturbelastungssystem für trabekuläre Knochen. Eine Untersuchung  
eines Belastungssignals mit verschiedenen Intensitäten an bovinen  
Knochenzylindern

Famulaturen: 01.03.-31.03.2001 Anästhesie Diakoniekrankenhaus Wehrda  
01.03.-31.03.2002 Orthopädie Universität Marburg  
26.08.-22.09.2002 Innere Medizin Bezirksspital Thierstein  
Breitenbach/Schweiz  
28.07.-31.08.2003 Herz- und Gefäßchirurgie Texas Heart  
Institute Houston/Texas

Praktisches Jahr: April-August 2004 Orthopädie an der Phillips-Universität  
Marburg  
August/September 2004 Chirurgie am Spital Dornach/Schweiz  
Oktober/November 2004 Chirurgie am Klinikum Fulda  
Dezember 2004-März 2005 Innere Medizin am Klinikum Fulda

Fremdsprachen: Englisch, Russisch (Schulkenntnisse)

Sonstiges: SS 2002 – SS 2004 Betreuung des Studentenunterrichts als  
HiWi in den Instituten der Klinischen  
Chemie und Pathologie der Philipps-  
Universität Marburg

Hobbies: Fußball, Joggen, Radfahren, Wintersport

Cölbe, 24.03.2005