

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

**Zentrum für Experimentelle Orthopädie
und Biomechanik
Direktor: Prof. Dr. D.B. Jones**



Zetos: Ein Kulturbelastungssystem für trabekuläre Knochen

**Eine Untersuchung zweier verschiedener Belastungssignale
an bovinen Knochenzylindern**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Andreas Metzner

aus Halle/Saale

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 09.06.2005

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Maisch

Referent: Prof. Dr. D.B.Jones

Korreferent: PD Dr. Schrader

meinen Eltern und meinem Bruder

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung	6
1.1 Thematische Einordnung	6
1.2 Die scheinbare Steifigkeit / E-Modul	8
1.3 Der Knochen	11
1.4 Die Knochenzellen	12
1.4.1 Die Osteoblasten	13
1.4.2 Die Osteozyten	15
1.4.3 Bone-Lining-Zellen	16
1.4.4 Die Osteoklasten	17
1.4.5 Beziehungen zwischen den Knochenzellen	19
1.5 Wachstumsverhalten von Knochen	20
1.6 Knochenzellmarker	24
1.6.1 Die Alkalische Phosphatase	24
1.6.2 Die Laktatdehydrogenase	26
1.6.3 Prostaglandine im Knochenstoffwechsel	27
1.7 Die polychrome Sequenzmarkierung	28
1.8 Die Apoptose	29
1.9 Das Kulturbelastungssystem	33
2 Zielsetzung und Fragestellungen	40
3 Material und Methoden	41
3.1 Herstellung der Knochenpräparate	41
3.1.1 Präparation der Knochenzylinder	41
3.1.2 Waschen der Knochenzylinder	45
3.1.3 Einsetzen der Knochenzylinder in die Kammern	46
3.1.4 Anschluss der Kammern an die Pumpe	47
3.1.5 Mediumwechsel vor Belastungsbeginn	48
3.1.6 Verwendete Medien	49
3.2 Allgemeine Kulturbedingungen	51
3.3 Versuchsdurchführung und Verlauf	51
3.4 Die Belastungssignale	55

3.5 Die scheinbare Steifigkeit der Knochenzylinder / E-Modul	59
3.6 Die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase	62
3.7 Die Bestimmung der Laktatdehydrogenase	63
3.8 Aufarbeitung der Knochenzylinder nach Versuchsende	64
3.8.1 Fixation der Knochenpräparate	64
3.8.2 Einbettung	66
3.8.3 Ponalbeschichtung der Objektträger	68
3.8.4 Anfertigen von Dünnschnitten	69
3.8.5 Entacrylierung	71
3.8.6 Die Färbung der Dünnschnitte	72
3.8.6.1 Die Trichromfärbung nach Goldner	72
3.8.6.2 Die Giemsa-Färbung	76
3.8.6.3 Die Toluidin O-Färbung	78
3.8.6.4 Die modifizierte v.Kossa-Versilberung nach Krutsay	81
3.8.6.5 Die Doppelfärbung nach Hämalaun-Eosin (H&E)	85
3.8.6.6 Die Färbung mit Alcianblau-PAS	88
3.8.6.7 Enzymhistochemie: Alkalische und Saure Phosphatase	92
3.8.7 Die polychrome Sequenzmarkierung	96
3.8.8 Immunhistochemie: Detektion apoptotischer Osteozyten	99
3.8.9 Das Eindecken der Präparate	105
3.9 Materialverzeichnis	106
3.10 Auswertung und Statistik	111
4 Auswertung und Ergebnisse	112
4.1 Die scheinbare Steifigkeit der Knochenexplantate (E-Modul)	112
4.2 Das Osteoid	115
4.3 Deskriptiver Zusammenhang zwischen E-Modul und Osteoid	117
4.4 Die Alkalische Phosphatase	118
4.5 Die Laktatdehydrogenase	119
4.6 Der pH-Wert	121
4.7 Histologische Auswertung	122
4.8 Anmerkungen zur Detektion apoptotischer Zellen	123
4.9 Die Polychrome Sequenzmarkierung	123

5 Diskussion der Ergebnisse	124
6 Ergebniszusammenfassung	131
7 Summary	133
8 Abkürzungsverzeichnis	135
9 Abbildungsverzeichnis	137
10 Literaturverzeichnis	140
11 Firmenverzeichnis	157
12 Danksagung	159
13 Index	160

1 Einführung

1.1 Thematische Einordnung

Wie bereits vor über 400 Jahren von Galileo Galilei (1564-1642) beschrieben, wird die Regulation der Knochenform und -struktur durch mechanische Belastungen beeinflusst. Durch diese wird der Knochen deformiert, was zu einer Änderung der Knochenlänge relativ zur Ausgangslänge führt. Der Quotient aus $\Delta L / L$ wird in *strain* angegeben. Dabei ist ΔL die Länge, um welche der Knochen komprimiert wird und L die Ausgangslänge des Knochens. Der Knochen kann auf Belastung zum einen mit einer Zunahme seiner Dichte, zum anderen mit einer Änderung seines trabekulären Aufbaus reagieren. Diese Reaktionen führen zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit des Knochens gegenüber weiteren Belastungen [49,93]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass eine direkte mechanische Belastung des Knochens eine erhöhte Proliferations- und Differenzierungsaktivität der Osteoblasten bedingt [9,79] und es somit einerseits zu einer Zunahme der Knochendichte und andererseits zu einer Abnahme der altersbedingten Knochenabbauprozesse kommt [51,52,62,63]. Jedoch muss die Belastungsintensität physiologischen Belastungsstärken entsprechen.

Körperlich aktive Menschen weisen eine erhöhte Knochenmasse mit einer erhöhten Festigkeit auf [117]. Liegen jedoch die Belastungsstufen oberhalb des physiologischen Belastungsniveaus, resultiert eine Degeneration der Knochenstruktur [44]. Im Gegensatz dazu zeigen beispielsweise Astronauten, die keiner Schwerkraft ausgesetzt sind und deren Belastung auf den Knochen somit unterhalb einer bestimmten Grenzwelle liegt, einen Verlust ihrer Knochendichte. Nach längeren Aufenthalten im Weltraum zeigt sich bei diesen Personen zum einen eine verminderte Knochenneubildung [6,118] und zum anderen eine Abnahme der für die Knochenneubildung relevanten Proteine [11,78]. Zusammenfassend gilt, dass die Mechanosensitivität von Knochengewebe, auf physiologische Belastungsreize zu reagieren, mit einer erhöhten Syntheserate von Matrixproteinen und einer erhöhten Mitoserate einhergeht.

Um ex vivo Studien unter definierten Kultur- und Belastungsbedingungen an trabekulären Knochen durchführen zu können, wurde von Prof. D.B. Jones ein mechanisches Belastungs- und Messsystem in Kombination mit einer Kultur- und Belastungskammer entwickelt. Mit diesem System kann entweder eine definierte Kompression oder eine definierte Kraft auf Knochenzylinder ausgeübt werden. Dabei werden immer beide Werte bestimmt, da die Vorgabe nur eines Wertes zu ungenau ist. Derzeit können Proben im Frequenzbereich von 0,1 bis 50 Hz dynamisch stimuliert werden. Die Genauigkeit der Kompression beträgt $\pm 0,5 - \pm 1,5 \mu\text{strain}$.

Abb. 1: Der Zetos



Mit Hilfe dieses Systems wird es möglich, genaue Messungen vielerlei mechanischer Eigenschaften des zu untersuchenden Gewebes durchzuführen. Der piezo-elektrische Aktor kann sowohl quasi statische Belastungen als auch periodische Oszillationsmuster erzeugen, während dabei Kraft und Kompression simultan gemessen werden. Die gemessenen Größen dienen der Berechnung der scheinbaren Steifigkeit des Knochens und der physikalischen Änderung während der Kultivierung. Das beschriebene System trägt den Namen ZETOS [Smith EL and Jones D; *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* (relative Kompression) verwendet, das ebenfalls griechische Wort *os* bedeutet Knochen. In der Vergangenheit wurde eine Vielzahl von Modellen entwickelt, die mechanisch induzierte Veränderungen im Knochenmetabolismus und in der Knochenmorphologie untersuchen sollten. Jedoch ist der hinter diesen Veränderungen stehende zelluläre Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt.

Die bisher entwickelten Modelle verwenden Zellkulturen [121,124], Organkulturen [13,54,88] oder den Gesamtorganismus [2,14,94,91,112], können jedoch meist nicht die Amplitude, Richtung, Art und Frequenz imitieren, die in der komplexen Natur der physiologischen Belastung *in vivo* auftritt. Darüberhinaus sind Tierversuche erheblich schwerer zu gestalten und sehr kostenträchtig. Desweiteren verwenden diese Modelle entweder hydraulische Systeme oder eine Vielzahl von Hebeln, Nockenwellen oder Schrauben, um die Gewebe mechanisch zu stimulieren oder deren physikalische Eigenschaften zu bewerten [3,27,29,58,59,90,103,114]. Eine engmaschige Kontrolle der Kraft und der Kompression in Form von Echtzeitmessungen während einer dynamischen Belastung ist bei den erwähnten Systemen, vor allem bei Frequenzen oberhalb 10 Hz, nicht möglich. Andere Belastungssysteme verwenden Dehnungsmessstreifen, die an Knochen oder Knochenstücken fixiert werden, um bei einer limitierten Anzahl an Messungen die elastische Kompression abschätzen und berechnen zu können.

Um Knochenzylinder, die eine hohe Varianz sowohl in ihrer Struktur, als auch in ihren physikalischen Eigenschaften aufweisen können, mit einem definierten mechanischen Signal belasten zu können, wird daher ein präzises und stabiles Belastungssystem benötigt.

1.2 Die scheinbare Steifigkeit / E-Modul

Um die scheinbare Steifigkeit von Knochen oder die Steifigkeit von Referenzkörpern messen zu können, wird eine quasi- statische Belastung durchgeführt, bei der die Kraft langsam in Schritten bis zu 300 – 1000 N über 30 Sekunden ansteigt. Die Kraft und die

Kompression werden gleichzeitig bestimmt, die Daten elektronisch gesammelt und gespeichert. Die scheinbare Steifigkeit wird errechnet, indem der reziproke Verlauf der linearen Regressionslinie 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:

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

Das Kontrollprogramm des Systems sammelt jedoch 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 Paare (f_{\max}, c_{\max}) , (f_{\min}, c_{\min}) . Die scheinbare Steifigkeit folgt aus der Steigung der Regressionsgeraden über diese Werte.

Das Programm errechnet die scheinbare Steifigkeit in der Masseinheit eines Elastizitätsmoduls (Y, Einheit MPa oder GPa), indem es die zylindrischen Parameter Radius (r) und Höhe (h) zur Normalisierung benutzt. Um jedoch einen Wert zu erzeugen, der nicht von den geometrischen Dimensionen abhängt, sondern eine reine Materialkonstante repräsentiert, wird folgende Formel verwendet:

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

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

$$h = \text{Höhe}$$

$$s = \text{Steifigkeit}$$

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.

1.3 Der Knochen

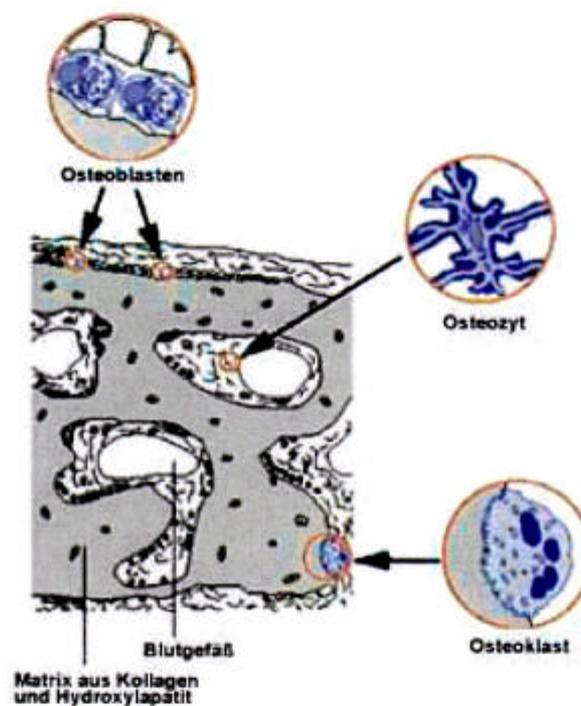
In allen höheren Vertebraten findet man Knochen beziehungsweise ein Skelett, das für die Formgebung und Fortbewegung eines Körpers die notwendige Voraussetzung darstellt. Knochen bezeichnet ein sehr komplexes und hochspezialisiertes Bindegewebe, dessen metabolisch aktive Zellen in einer mit Kalziumsalzen mineralisierten organischen Matrix vorliegen, von dieser umgeben oder deren sie anhängig sind. Die Zugfestigkeit dieses Gewebes wird durch Typ-I-Kollagen bestimmt, welches 95% der organischen Matrix ausmacht. Die übrigen 5% setzen sich aus Proteoglykanen und einer Vielzahl nicht-kollagener Proteine zusammen. Hierzu zählen unter anderem die Glykosaminoglykane und die Polysaccharidketten der Proteoglykane wie beispielsweise das Chondroitinsulfat. Aber auch das Osteokalzin, welches das am besten charakterisierte Knochenprotein ist, sowie weitere nicht-kollagene Proteine z.B. Osteopontin, Bonesialoprotein, Osteonectin und andere sind in der Knochenmatrix anzutreffen. Unter zellulärer Kontrolle erfolgt die Ablagerung von Kalziumsalzen und Kristallen, die dem Hydroxylapatit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ ähneln. Diese Hydroxylapatite sind in einem Abstand von 25-30nm entlang der Kollagenfibrillen angeordnet und werden durch die umgebende Grundsubstanz stabilisiert. Auf diese Weise wird die deutliche Kompressionsfestigkeit des Skeletts gewährleistet, wobei immer eine gewisse Elastizität erhalten bleibt. Ferner enthält der Knochen geringe Mengen an Carbonat (6%), Nitrat (1%), Natrium (0,7%), Magnesium (0,7%) und Spuren von Fluor. Durch mechanische Belastungen werden permanent Umbauvorgänge provoziert, die zu einer trajektoriiellen Ausrichtung des Knochens führen.

Neben der mechanischen Belastung wirken verschiedene Hormone auf den Knochen ein, die das Knochenwachstum modulieren oder aber zur Konstanz des Kalzium-Blutspiegels im Körper beitragen. Die wichtigsten Hormone sind dabei das 1,25-Dihydroxycholecalciferol, das Thyreocalcitonin und das Parathormon (PTH). Das Parathormon, welches über G-Protein-gekoppelte Phospholipase C-Rezeptoren wirkt, kann in physiologischen Konzentrationen einen anabolen Effekt zeigen, indem es die Phospholipase C aktiviert [135,137], die Proliferation der Osteoblasten stimuliert [136] und das Antwortverhalten von Osteoblasten auf mechanische Belastungen verstärkt [134]. In unphysiologisch hohen Konzentrationen bewirkt es eine Kalziummobilisierung aus dem Knochen durch Osteoklastenaktivierung, eine

verminderte Kalziumausscheidung über die Niere und eine gesteigerte Kalziumresorption im Darm. Das Thyreokalzitonin wirkt als direkter Parathormon-Antagonist. Es hemmt die Kalziumfreisetzung aus dem Knochen und reduziert die Zahl der Osteoklasten. Das 1,25-Dihydroxycholekalziferol leitet sich vom Cholesterin ab. Es fördert die intestinale Kalziumresorption.

Kommt es innerhalb dieses Hormonsystems zu Imbalancen, resultiert zumeist eine schwere Störung des Skelettaufbaus.

Abb. 2: Schematische Darstellung von Knochengewebe und dessen Zellen



1.4 Die Knochenzellen

Die im Knochengewebe enthaltenen Zellen liegen in verschiedenen Formen vor, nämlich als:

- Vorläuferzellen
- Osteoblasten

- **Osteozyten**
- **Osteoklasten**
- **Bone-lining-Zellen**
- **Adipozyten**
- **Monocyten** und
- **Nervenzellen**

Dabei sind die Vorläuferzellen, Osteoblasten, Osteoklasten und Bone-Lining-Zellen an der Knochenoberfläche zu finden, während die Osteozyten innerhalb der mineralisierten Matrix liegen.

Die Osteoblasten, Osteozyten und Bone-Lining-Zellen leiten sich von den lokalen mesenchymalen Vorläuferzellen (Osteoprogenitorzellen) ab [104,105,106]. Osteoklasten hingegen entwickeln sich aus der Fusion mononukleärer Vorläuferzellen (wahrscheinlich granulocyte and macrophage colony-forming units „CFU-GM“) hämatopoetischer Gewebe [14,17,35]. Dabei können die Osteoklasten entweder direkt aus den Monozyten hervorgehen oder aber aus den Monozyten entwickeln sich zunächst Makrophagen, aus denen dann Osteoklasten entstehen können.

1.4.1 Die Osteoblasten

Die Osteoblasten sind an der Oberfläche von Knochenbälkchen anzutreffen, an der sie als einschichtige Zelllinie imponieren. Während der Synthesephase haben sie eine kubische bis hochprismatische Form, wohingegen sie bei Syntheseinaktivität eher flach erscheinen. Die Aktivität der Osteoblasten wird vor allem durch Hormone wie beispielsweise das Somatotrope Hormon gesteuert.

Die an der Bälkchenoberfläche in einer Linie liegenden Osteoblasten stehen durch feine zytoplasmatische Fortsätze miteinander in Verbindung. Diese Fortsätze treten besonders deutlich hervor, wenn die Osteoblasten eine hohe Syntheseaktivität zeigen und sich mit Grundsubstanz umgeben.

Die Synthese organischer Bestandteile der Knochengrundsubstanz - Kollagen, Proteoglycane und Glycoproteine - wird von den Osteoblasten vollzogen. Sie bewirken

darüber hinaus die Bildung der Hartschubstanz. Während der Synthesephase zeichnen sich die Osteoblasten durch ein gut entwickeltes Retikuloendotheliales System sowie einen prominenten Golgi-Apparat aus. Lichtmikroskopisch erscheinen sie in dieser Phase basophil. Sie besitzen alle Charakteristika proteinbildender Zellen. Sie produzieren Typ-I Kollagen, aber auch die nichtkollagenen Proteine der Matrix. Zu diesen zählen unter anderem Proteoglykane, Osteokalzin, Osteopontin, Osteonektin, Fibronektin, Bone Sialoprotein, Interleukine, Wachstumsfaktoren, Prostaglandine und Hormonrezeptoren. Eine Vielzahl der nichtkollagenen Proteine konnte bereits isoliert werden [97], jedoch konnte ihnen bisher keine eindeutige Funktion nachgewiesen werden.

Um die Aktivität der Osteoblasten quantifizieren zu können, wird die Alkalische Phosphatase (AP) gemessen, die von diesen Zellen sezerniert wird. Funktion der AP ist die Spaltung der inorganischen Pyrophosphate [129,130], die sonst ihrerseits die Knochenmineralisierung inhibieren können. Je höher die Freisetzung der Alkalischen Phosphatase, desto höher die Aktivität der Osteoblasten und desto intensiver der Knochenanbau. Erhöhte Konzentrationen der Alkalischen Phosphatase werden hauptsächlich während Wachstumsphasen und Frakturheilungsvorgängen beobachtet. Zudem fallen im Zytoplasma der aktiven Osteoblasten PAS-positive Granula auf, die nach derzeitigem Kenntnisstand neutrale Glykoproteine für die Knochengrundsubstanz enthalten.

Osteoblasten erscheinen als polarisierte Zellen: Die Sezernierung anfallender Syntheseprodukte findet immer dort statt, wo die Zellen mit Knochengrundsubstanz in Kontakt stehen. Die Hartschubstanz wird durch Abschnürung von Matrixvesikeln herbeigeführt. Der Zellkern des Osteoblasten, der gross und rund in Erscheinung tritt und fein verteiltes Chromatin besitzt, befindet sich auf der der Matrix abgewandten Seite. Zwischen Matrix und Zellkern befinden sich die Zellorganellen, deren Aufgabe die Synthese der Matrixsubstanz ist. Der Golgi-Apparat imponiert dabei häufig als Aufhellung.

Die von den Osteoblasten gebildete Grundsubstanz, die zunächst noch nicht verkalkt ist und sich durch ungeordnete Kollagenfibrillen auszeichnet, bezeichnet man als Vorknochen oder Osteoid, das später mineralisiert wird.

Jedoch verfügt der Organismus auch über Makromoleküle, die als Inhibitor der physiologischen und pathologischen Kalzifizierung, Knochenmineralisierung und Knochenresorption auftreten. Zu diesen zählen die schon erwähnten inorganischen

Pyrophosphate [8], Pyrophosphat-Analoga wie die Bisphosphanate [20], Nukleosidtriphosphate [109], sowie andere anionische Proteine [89].

Wie bereits beschrieben, findet die Ablagerung der Matrix an der Knochenoberfläche statt. In regelmässigen Abständen lässt sich jedoch eine Generalisierung beobachten, innerhalb derer sich die Osteoblasten mit Knochenmatrix umgeben und somit eine neue Osteozytenschicht gebildet wird. Durch eine spätere Ablagerung von Mineralien wird die organische Matrix impermeabel. Über zytoplasmatische Verbindungen zu anderen Zellen wird die Versorgung der Osteozyten gewährleistet.

1.4.2 Die Osteozyten

Als Osteozyt wird eine Zelle dann bezeichnet, wenn sie ringsum von Knochengrundsubstanz umgeben ist. Wie bereits im vorherigen Kapitel erwähnt, gehen Osteozyten aus Osteoblasten hervor und dienen der Erhaltung des Knochengewebes. Im menschlichen Körper ist ihre Zahl etwa zehnfach grösser als die der Osteoblasten [77]. Gehen Osteozyten zugrunde, wird auch die sie umgebende Knochenmatrix abgebaut.

Bei diesem Zelltyp handelt es sich um dendritische, postmitotische [80], mature Osteoblasten [66,71]. Reife Osteozyten liegen in verkalkter Grundsubstanz und sind in Schichten angeordnet. Von den Knochenhöhlen, in denen sich die Osteozyten befinden, gehen feine filopodienartige Fortsätze aus, die in feinen Knochenkanälchen liegen. Diese Fortsätze dienen hauptsächlich dem Stofftransport zwischen den Osteozyten und sind untereinander durch gap-junctions verbunden [18,38]. Diese Verbindungsstrukturen ermöglichen den interzellulären Transport von Ionen und kleinen Molekülen. Die Stoffe können dabei bis zu 15 Zellen weit transportiert werden. Die charakteristische Form der Osteozyten dient der starken Vergrösserung der Zelloberfläche.

Was die Morphologie von Osteozyten anbelangt, zeichnen sich diese durch eine flache Mandelform aus. Sie haben im Vergleich zu Osteoblasten weniger Rauhes Endoplasmatisches Retikulum (RER), einen kleinen Golgi-Apparat, sowie einen dichten chromatinreichen Kern. Diese Charakteristika betonen die verminderte Syntheseaktivität der Osteozyten verglichen mit Osteoblasten.

Die Osteozyten können funktionell in

- osteoblastische Osteozyten und
- osteolytische Osteozyten

unterteilt werden.

Die osteoblastischen Osteozyten ermöglichen die Erhaltung der bestehenden Grundsubstanz. Ergebnisse histochemischer Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass Osteozyten protein- und glykoproteingebundenes Kalziumphosphat enthalten. Knochenzellen haben vermutlich die Fähigkeit, Kalziumphosphat in ihrem Zytoplasma zu konzentrieren. Kalzium und Phosphat dienen dem Aufbau der interzellulären Hartschubstanz.

Osteolytische Osteozyten, die sich durch einen hohen Gehalt an Lysosomen auszeichnen, befinden sich hauptsächlich in tiefen Schichten der Knochenstoff. Aufgrund ihrer Fähigkeit Hartschubstanz abzubauen, kann Kalzium aus dem Knochenstoff freigesetzt werden.

Theoretisch könnten alle Knochenzellen an der Mechanotransduktion innerhalb des Knochenstoffes beteiligt sein. Es scheint jedoch, als käme diese Aufgabe hauptsächlich den Osteozyten zu [10,15]. Diese Hypothese konnte in mehreren Studien untermauert werden [50,79,91,92,101]. Zwischen den unmittelbar dem Osteoid anliegenden Osteozyten und den Bone-Lining-Zellen beziehungsweise den Osteoblasten besteht ein Kontakt. Über diese Kontakte könnten durch Stress-Belastung an den Osteozyten hervorgerufene zelluläre und chemische Signale an die genannten Zellen weitergeleitet werden. Jedoch handelt es sich hierbei um eine Hypothese, deren Bestätigung noch Gegenstand derzeitiger Forschung ist.

1.4.3 Bone-Lining-Zellen

Morphologisch imponieren Bone-Lining-Zellen als begrenzte, flache, langgezogene, inaktive Zellen, die sich auf der Oberfläche von Osteoid und an mineralisierten Knochenoberflächen befinden. Die geringe Menge an zytoplasmatischen Organellen

lässt darauf schliessen, dass diese Zellen inaktiv sind. Laut derzeitiger Spekulationen können aus Bone-Lining-Zellen Osteoblasten hervorgehen, die sich wiederum in Bone-Lining-Zellen zurückentwickeln können.

Funktionell dienen sie zum einen als Barriere für Kalziumionen [76], enthalten zum anderen ein spezielles knocheninternes Milieu [95] und spielen wahrscheinlich eine Schlüsselrolle in der Lokalisierung und Initiierung des Knochenumbaus [125].

1.4.4 Die Osteoklasten

Osteoklasten erscheinen als grosse, sehr verzweigte Zellen, die in der Lage sind, Knochengrundsubstanz abzubauen. Der Osteoklast kann mehr als 50 Zellkerne enthalten, die an der zur Knochenoberfläche abgewandten Seite lokalisiert sind und zeichnet sich durch einen erheblich vergrösserten, azidophilen Zelleib aus. Die Zellkerne sind durch Zytoskelett-Proteine miteinander verbunden [63]. Die Verzweigungen der Osteoklasten weisen unterschiedliche Durchmesser auf. Meistens legen sich die Zellen der Oberfläche der Knochenbälkchen mit Hilfe von Podosomen an und überlagern andere Osteoklasten, aber auch Osteoblasten. Die Osteoklasten liegen häufig in den Howship-Lakunen, Einbuchtungen der Grundsubstanz, die durch den Knochenfrass dieser Zellen entstanden sind. Innerhalb eines Osteoklasten können Bereiche gefunden werden, in denen aktiv Knochen resorbiert wird, während andere Bereiche inaktiv erscheinen.

Erst die Rasterelektronenmikroskopie konnte die genaue Morphologie von Osteoklasten darstellen. Dabei erscheint die der Knochengrundsubstanz zugewandte Seite der Osteoklasten unregelmässig aufgefaltet („ruffled border“), stark verzweigt und in ständiger Bewegung. Dieses Relief dient der Vergrösserung der aktiv resorbierenden Abschnitte der Osteoklasten.

Die Wirkungsweise der Osteoklasten ist noch nicht vollständig erforscht. Jedoch scheinen verschiedene Enzyme eine massgebliche Rolle zu spielen. Im Bereich der „ruffled border“ werden lysosomale Proteinase und dabei insbesondere das Kathepsin K [28,64,96,123], saure Phosphatasen und Matrix-Metalloproteinase freigesetzt. Kathepsin K kommt während der Knochenresorption die grösste Bedeutung zu. Wird

Kathepsin K blockiert, so resultiert eine signifikante Reduktion der Knochenresorption [131,132]. Aber auch saure Hydrolasen sind von grosser Bedeutung. Die sauren Hydrolasen werden von Osteoblasten synthetisiert, in deren perinukleären Golgi-Apparat verpackt und durch Exozytose in den Extrazellulärraum abgegeben.

In den Resorptionslakunen (Howship-Lakunen) besteht ein saures Milieu [5,7,18,113]. Die dafür erforderlichen H^+ -Ionen werden ebenfalls von den Osteoblasten unter Mitwirkung einer Karboanhydrase und Membran-ATPasen bereitgestellt. Bei aktiv resorbierenden Osteoklasten lassen sich zwischen den Auffaltungen der der Knochenoberfläche zugewandten Seite kalziumhaltige Kristalle finden. Diese und andere abgebaute Knochensubstanzen werden dann offenbar von Osteoblasten resorbiert, in sekundäre Lysosomen aufgenommen, weiter abgebaut und das verbleibende Material in benachbarte Gefässe abgegeben.

Histophysiologisch bleibt zu erwähnen, dass ein Osteoklast innerhalb einer bestimmten Zeiteinheit die gleiche Menge an Knochensubstanz abbauen kann, die von 100-150 Osteoblasten aufgebaut wird.

Die Modulierung der Differenzierung der Osteoklasten-Vorläufer in Osteoklasten wird durch osteoblastische Zellen und deren Zell-zu-Zell Interaktionen induziert. Vermutlich sind diese osteoblastischen Zellen die Zielzellen, die einen Osteoklasten-Differenzierungsfaktor oder -faktoren bilden als Antwort auf osteotrophische Hormone und Zytokine. Desweiteren produzieren osteoblastische Zellen lösliche Faktoren wie zum Beispiel M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) [107,122] und Komplement C3 (reguliert durch 1α 25-Dihydroxyvitamin D_3) [34,42,92], welche die Entwicklung der Osteoklasten regulieren. M-CSF kommt nicht nur eine bedeutende Rolle in der Proliferation und Differenzierung der Osteoklasten-Vorläufer zu, sondern er ist auch essentiell für die Migration, Chemotaxis [26] und für das Überleben reifer Osteoklasten [41].

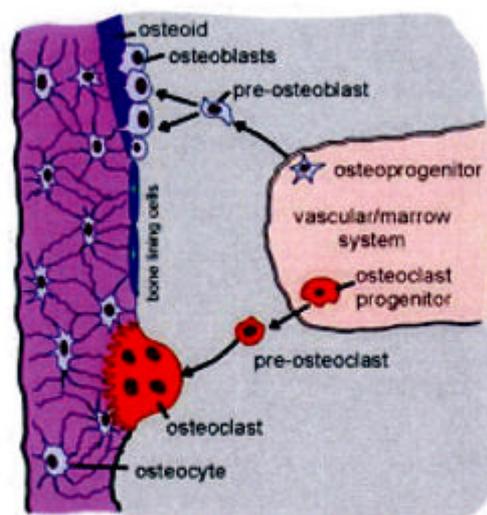
Eine wichtige Rolle hinsichtlich der Aktivität der Osteoklasten kommen dem OPG (Osteoprotegerin), RANKL (NF-Kappa B-Ligand) und dessen Rezeptor RANK zu. Das OPG, das auch unter dem Namen *Osteoclast Inhibiting Factor* geführt wird, nimmt entscheidenden Einfluss auf die Osteoklastenaktivität, da es in der Lage ist, die Differenzierung und die Aktivierung der Osteoklasten zu inhibieren [31,126]. Darüberhinaus scheint OPG die Expression des bereits erwähnten Kathepsin K blockieren zu können, das als wichtigstes Enzym der Knochenresorption gilt. [133].

RANKL wird von Osteoblasten und aktivierten T-Lymphozyten produziert und ist ein wichtiger Faktor hinsichtlich der Osteoklastenformation, ihrer Fusion, Aktivierung und ihrer Lebensdauer. Es führt letztendlich zu Knochenresorption und Substanzverlust. RANKL aktiviert einen speziellen Rezeptor, RANK, der auf Osteoklasten und dendritischen Zellen lokalisiert ist. Die Effekte des RANKL können durch das OPG neutralisiert werden, das daher auch als Neutralisierungsrezeptor bezeichnet wird [99,127].

1.4.5 Beziehungen zwischen den Knochenzellen

Durch verschiedene Experimente wurden Hinweise gefunden, dass zwischen Osteozyten und Osteoblasten Beziehungen bestehen. Dazu wurden Untersuchungen mit radioaktiv markierten Substanzen (^3H -Thymidin) bei jungen Tieren durchgeführt, deren Knochenzellen schnell proliferieren.

Abb. 3: Schematische Darstellung der Knochenzellen und deren Abstammung



Aufgrund der angesprochenen Untersuchungen kann davon ausgegangen werden, dass Osteoblasten aus Knochenstammzellen hervorgehen, die wiederum abgewandelte

Mesenchymzellen sind. Die Generationszeit von Knochenstammzellen, das heisst die Zeit, in der sich ihre Zellzahl verdoppelt, beträgt etwa 36 h. Aus einigen dieser neugebildeten Zellen entstehen Osteoblasten. Dieser Vorgang dauert etwa 9 Stunden. Die Frage, ob Osteoblasten beziehungsweise Osteozyten teilungsfähig sind, ist noch nicht hinreichend aufgeklärt.

Aus etwa 10% der Osteoblasten gehen Osteozyten hervor, zum anderen können sie Osteoblasten bleiben oder aber zugrunde gehen. Wiederum andere Osteoblasten können sich offenbar wieder in Vorläuferzellen zurückverwandeln.

Osteozyten können über viele Jahre Osteozyten bleiben. Da, wie bereits in vorherigen Kapiteln beschrieben, im Rahmen des Knochenumbaus Grundsubstanz abgebaut wird, können Osteozyten auch wieder zu Vorläuferzellen werden. Darüberhinaus gehen vornehmlich im Inneren der substantia compacta kontinuierlich Osteozyten zugrunde.

Wie bereits in *Kapitel 1.4* beschrieben, können Osteoklasten entweder direkt aus Monozyten hervorgehen oder aber es entstehen aus den Monozyten zunächst Makrophagen, aus denen sich Osteoklasten entwickeln können.

1.5 Wachstumsverhalten von Knochen

Das zum Knochenumbau führende Prinzip wird auch als Remodeling bezeichnet und ist charakterisiert durch eine gekoppelte Funktion von Osteoblasten und Osteoklasten. Dieser Mechanismus greift, wenn der Knochen so stark belastet wird, dass es zu einer Verformung kommt (strain). Nach Frost [23] beträgt die dafür notwendige Verformung 1500 bis 3000 μ strain.

Jeder Knochen ist in der Lage, auf ihn einwirkende Kräfte bzw. Stimuli wahrzunehmen und auf diese zu reagieren. Die provozierte Reaktionsform ist das Remodeling. Dieses zeichnet sich dadurch aus, dass es an einzelnen Orten des Knochengewebes auftritt und dabei jeweils eine Gruppe verschiedener Zellen rekrutiert. Etwa 20% der spongiösen Knochenoberfläche befinden sich jeweils im Remodeling-Prozess.

Die Bone Metabolic Units (BMU) stellen die kleinste zelluläre Struktureinheit des Knochengewebes dar. Die Integration einer solchen BMU in den Remodeling-Prozess läuft folgendermassen ab:

1. Organisation einer BMU
2. Aktivierung von Osteoblasten und Osteoklasten
3. Resorption von altem Knochen
4. Formierung einer neuen Knochenmatrix
5. Mineralisierung

Im trabekulären Knochen befinden sich die BMUs entlang der Knochenoberfläche, die ebenfalls von Bone-Lining-Zellen gesäumt ist. Sie bilden eine Lakune oder dehnen sich über einen weiten Bereich aus [30,37,75]. Einer der möglichen Effekte aktivierter BMUs ist eine Erhöhung der Knochenmatrix, andererseits können aber auch einzelne Knochen trabekel isoliert werden. Es entsteht dabei ein Knochenfragment, welches die Fähigkeit verloren hat, auf mechanische Kräfte reagieren zu können und strukturell funktionslos ist. Diese Fragmente werden resorbiert [16,30,37] und führen damit zu einem Verlust an Knochenmasse.

Der physiologische Ablauf des Remodeling, beziehungsweise die Funktionsweise der BMUs wurde mit Hilfe tetrazyklinmarkierter Knochenbiopsien aufgezeigt. Dabei sind besonders die Arbeiten von Frost und Parfitt [24,25,74] zu erwähnen.

Die Vorgänge, aus denen der Aufbau neuer BMUs resultiert, konnten noch nicht vollständig geklärt werden. Eine Theorie geht davon aus, dass Bone-Lining-Zellen durch Osteozyten, welche IGF-1 nach einer mechanischen Belastung exprimieren, aktiviert werden und neue BMUs bilden. Jedoch können Bone-Lining-Zellen auch selbständig auf mechanische Stimuli reagieren. Es konnte gezeigt werden, dass lokale und zirkulierende Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren die Formierung neuer BMUs beeinflussen. In welcher Weise dieses passiert, ist derzeit noch nicht bekannt.

Um eine neue BMU formieren zu können, müssen sich jedoch zunächst initiale Zellen ansammeln. Dieses wiederum bedeutet, dass sich Vorläuferzellen vermehren und verfügbar sein müssen.

Über die Lebensdauer und die Kontrolle einer BMU ist derzeit noch sehr wenig bekannt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass die Lebensdauer einzelner Zellen einer BMU kürzer ist als die ihrer selbst. Für die kontinuierliche Funktion einer BMU müssen ständig neue Zellen rekrutiert werden, was das Wesentliche der Aktivierung darstellt.

Eine BMU kann theoretisch an jeder Stelle der Knochenoberfläche ihren Ausgang nehmen [73]. Jedoch ist es wichtig, zwischen der Neubildung und der Aktivierung einer

BMU zu unterscheiden. Die Neubildung vollzieht sich nur einmalig an einer untätigen Oberfläche oder in Nachbarschaft einer Mikrofraktur. Die Aktivierung hingegen ist ein kontinuierlicher Prozess, der sich am äussersten Rand (Schnittkante) einer BMU vollzieht. In dem Masse, in dem sich eine BMU ausbreitet, muss auch die jeweilige neue Oberfläche eine Aktivierung vollziehen. Die BMU Front schreitet täglich um etwa 10µm voran.

Werden Bone-Lining-Zellen hormonellen Einflüssen unterworfen, ändert sich ihre Form von flachen epithelähnlichen Zellen zu runden Zellen. Dabei entblösen sie einen Teil der Kollagenmatrix. Desweiteren sondern sie Kollagenasen ab, um das Knochenmaterial freizulegen. Diese aktivierten Zellen locken dann durch zelluläre oder hormonelle Signale Osteoklasten an.

Systemische Hormone, Wachstumsfaktoren, Interleukine und Zytokine spielen bei der Rekrutierung der Osteoklasten eine wesentliche Rolle, indem sie den Pool der Vorläuferzellen erweitern. Einige dieser Faktoren waren bereits für das Zustandekommen der BMUs verantwortlich.

Die Resorption wird in zwei Phasen untergliedert. Die erste ist sehr schnell, von multinukleären Osteoklasten getragen und dauert ca. acht Tage. An der anschliessenden zweiten langsameren Phase sind mononukleäre Zellen beteiligt. Diese dauert ca. 34 Tage [19].

Multinukleäre Osteoklasten sind für ca. zwölf Tage aktiv [74], um danach durch apoptotische Mechanismen unterzugehen. Dieser Prozess wird möglicherweise durch $TGF\beta$ beeinflusst. Die durch Apoptose zugrundegegangenen Zellen sind an der Verbindungsstelle zwischen resorbierender Oberfläche und deren Umkehrfläche zu finden. Aufgrund dieser Beobachtung kann vermutet werden, dass dieser Prozess Einfluss auf die Signalwirkung für neue Osteoklasten besitzt. Osteoklasten sondern zudem Zytokine wie beispielsweise das Interleukin-6 ab, die als Signale für neue Osteoklasten dienen. Die Tiefe der Resorptionslakune, die als Howship-Lakune bezeichnet wird, ist unter anderem von der Lebensspanne der Osteoklasten abhängig. Eine sehr frühe Apoptose der Osteoklasten führt zu einer eher flachen Howship-Lakune. Während der Resorptionsphase werden knochengewebsabhängige Wachstumsfaktoren freigesetzt. Zu diesen zählen $TGF\beta$, IGF, FGF und BMP, welche durch frühere Generationen von Osteoblasten in die Knochenmatrix eingebaut wurden. Der Mechanismus, der zur Aktivierung dieser Wachstumsfaktoren führt, ist derzeit noch

nicht vollständig geklärt. Jedoch werden einige dieser Faktoren wie beispielsweise das TGF β möglicherweise durch das saure Milieu aktiviert, das durch die Sekretion von Protonen durch Osteoklasten entsteht. Diese Wachstumsfaktoren spielen eine massgebliche Rolle bei der Rekrutierung von Osteoblasten. Es handelt sich bei diesem Mechanismus somit um einen autokrinen Prozess. Je mehr Knochensubstanz resorbiert wird, desto mehr Wachstumsfaktoren werden freigesetzt und desto mehr Osteoblasten rekrutiert. Dieser Umstand ist somit wahrscheinlich mitverantwortlich für die gekoppelte Funktion zwischen Knochenresorption und neuer Knochenformation.

Während der Resorptionsphase fungiert das abgebaute Kollagen als biochemischer Marker für die Knochenresorption. Einer dieser Marker ist das Hydroxyprolin.

Die maximale Tiefe der Howship-Lakunen beträgt bis zu 70 μm . Ist diese erreicht, schliesst sich eine Umkehrphase an, deren Länge ca. neun Tage beträgt [19]. Während dieser Phase lässt sich eine Annäherung der Osteoblasten an den Boden der Lakunen beobachten. Eine Gruppe von Osteoblasten beginnt anschliessend mit der Produktion von Osteoid. Die Rate an Osteoidproduktion und die der Mineralisierung sind etwa gleich. Die Produktion des Osteoids durch die Osteoblasten dauert solange an, bis die Lakune vollständig, beziehungsweise annähernd vollständig gefüllt ist. Dieser Vorgang nimmt bei gesunden Individuen etwa 124 bis 168 Tage in Anspruch [19].

Die Morphologie der am Boden der Lakune sitzenden Osteoblasten zeichnet sich durch plumpe und vigoröse Zelleiber aus. Die Zellen verfügen über einen grossen Nukleus und produzieren eine dicke Schicht an Osteoid. Im Zuge der Abnahme der Osteoidproduktion flachen die Osteoblasten ab und werden zu Bone-Lining-Zellen. Einige der Osteoblasten werden jedoch auch zu Osteozyten und sind im neu formierten Knochen lokalisiert. Benachbarte Osteoblasten weisen immer das gleiche Alter auf. Man findet nie plumpe und somit aktive Zellen mit flachen inaktiven Zellen vermischt. Das bedeutet, dass sich neu rekrutierte Osteoblasten nicht der Gruppe anschliessen, die bereits die Resorptionslakune wieder auffüllt. Sie lagern sich an den Rand einer BMU an, sodass diese fortschreiten kann.

Die Dichte der Osteoblasten am Entstehungsort einer BMU variiert. Gruppieren sich die Zellen, werden sie grösser und begrenzter und können als Kollektiv mehr Osteoid synthetisieren als wenige einzelne Zellen.

Was die Darstellung der Mineralisierung mit Hilfe fluoreszierender Farbstoffe wie beispielsweise dem Tetrazyklin anbelangt, ergeben sich einige Probleme. Ein hoher

Prozentsatz (40 – 60%) der Osteoidoberflächen verbindet sich nicht mit dem Tetrazyklinlabel. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass die Synthese des Osteoids erst vor einem kurzen Zeitintervall stattfand und die Mineralisierung noch nicht begonnen hat. Diese Erklärung trifft auf etwa 7 % [70] der Osteoidoberflächen zu. Ein anderer Teil des tetrazyklinfreien Osteoids ist möglicherweise eine Schicht terminalen Osteoids, welches am Ende der Formation persistiert und zu langsam mineralisiert, um gemessen werden zu können. Zum anderen besteht auch die Möglichkeit, dass die Bildung des Osteoids diskontinuierlich abläuft [22]. Mehrere Studien an Menschen und Tieren zeigten einen hohen Labelverlust, was die Hypothese einer diskontinuierlichen Synthese untermauert.

1.6.1 Die Alkalische Phosphatase

Der Grossteil der im Serum oder Plasma messbaren Alkalischen Phosphatase (AP) entstammt der Leber beziehungsweise dem Skelettsystem. Etwa 25% der Gesunden haben auch eine Dünndarm-AP, die im Nüchternzustand etwa 10% der Gesamt-AP ausmacht.

Kommt es zu Erhöhungen der Alkalischen Phosphatase, so können diese entweder physiologischer Natur sein oder auf Erkrankungen von Leber und/oder Knochen Hinweise geben.

Folgende Zustände können physiologisch zu erhöhten AP-Werten führen:

- Schwangerschaft ab dem 2. Trimenon (Plazenta-AP)
- Wachstumsphase bei Kindern (Knochen-AP)
- Frakturheilungsprozesse (Knochen-AP)
- postprandial bei Personen der Blutgruppen 0 und B, Lewis-positiv, die Sekretoren der H-Blutgruppensubstanz sind (Dünndarm-AP)

Andere Erkrankungen können zu pathologischen Erhöhungen der AP führen:

- hepatobiliäre Erkrankungen und akute Pankreatitis
- primäre und sekundäre Osteopathien

- neoplastische Neubildungen von AP in Tumorgeweben

Verminderungen der Alkalischen Phosphatase werden sehr selten beobachtet. Klinische Relevanz kommt dabei nur der familiären Hypophosphatämie zu.

Die AP kann in verschiedenen Formen, also AP-Isoenzymen und Isoenzymvarianten, vorkommen. Diese verschiedenen Unterformen können dabei Auskunft geben über:

- das Ausmass einer Gewebeschädigung, z.B. bei hepato-biliärem Schaden
- die Stoffwechselaktivität, z.B. des Skelettsystems bei metabolischen Erkrankungen wie Osteomalazie, Rachitis, postmenopausaler Osteoporose
- das Wachstum malignen Gewebes, z.B. messbar anhand der Erhöhung von AP-Isoenzymen, die aufgrund einer Hyperexpression bestimmter Gene gebildet werden.

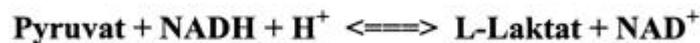
Wie bereits erwähnt, führt ein Teil von Skeletterkrankungen zu einem Anstieg der Gesamt-AP, der dabei die verstärkte Osteoblastentätigkeit widerspiegelt. Zu diesen Erkrankungen zählt der Morbus Paget (Osteoblasten versuchen durch unkontrollierte Aktivität von Osteoklasten resorbiertes Knochengewebe wieder aufzubauen), die Vitamin-D-Mangelrachitis und metastatische Knochenerkrankungen. Liegt jedoch zusätzlich eine chronische Lebererkrankung vor, so muss die Beurteilung durch Bestimmung der knochenspezifischen AP erfolgen.

Metabolische Knochenerkrankungen wie der Hyperparathyreoidismus, sowie osteopenische oder osteoporotische Osteopathien zeigen in der Gesamt-AP nur gelegentlich eine Erhöhung. Hierbei kommt wiederum der Bestimmung der Knochen-AP, insbesondere hinsichtlich der Verlaufsbeurteilung, grosse diagnostische Bedeutung zu.

Übergangsweise Erhöhungen der Alkalischen Phosphatase werden während Knochenheilungsprozessen nach Knochenfrakturen [68] als Zeichen der erhöhten Osteoblastentätigkeit gefunden. Physiologisches Knochenwachstum führt zu einer Erhöhung der Alkalischen Phosphatase im Serum, was dadurch zu belegen ist, dass bei wachsenden Kindern im Vergleich zu Erwachsenen etwa 1,5- bis 2-fach höhere Werte der AP im Serum gefunden werden.

1.6.2 Die Laktatdehydrogenase

Die Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein tetrameres Enzym, das in Form verschiedener Isoenzyme im Körper vorkommt. Diese Isoenzyme unterscheiden sich in ihrer Kinetik bei niedrigen Pyruvatkonzentrationen, sowie in ihrer Substratspezifität. Im Körper kommt der Laktatdehydrogenase die Aufgabe der Reduktion von **Pyruvat** zu **L-Laktat** zu. Als Reduktionsmittel dient dabei NADH, das zu NAD^+ reoxidiert wird. Somit wird das für die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase benötigte NAD^+ regeneriert, was die Glycolyse auch bei vollständigem Sauerstoffmangel ermöglicht.



Die LDH ist ein zytoplasmatisches Enzym und Bestandteil aller Gewebe (Muskel, Herz, Leber, Knochen u.s.w.). Schon bei minimalsten Organschäden kann das Enzym ins Plasma übertreten und findet sich zudem bei vielen pathologischen Zuständen im Plasma erhöht. Hierbei ist zu beachten, dass die Konzentration der LDH in den Geweben etwa 500fach höher über der des Plasmas liegt, was erklärt, dass schon Gewebeschäden sehr geringen Ausmasses zu einer Aktivitätserhöhung im Serum führen.

Besonders hohe spezifische Aktivitäten des Enzyms finden sich vor allem in folgenden Geweben: Leber, Herz- und Skelettmuskel, sowie in der Niere. Die LDH ist somit kein Marker, der zur Beurteilung eines bestimmten Organschadens herangezogen wird und vielen anderen spezifischeren Markern in der Diagnostik unterlegen.

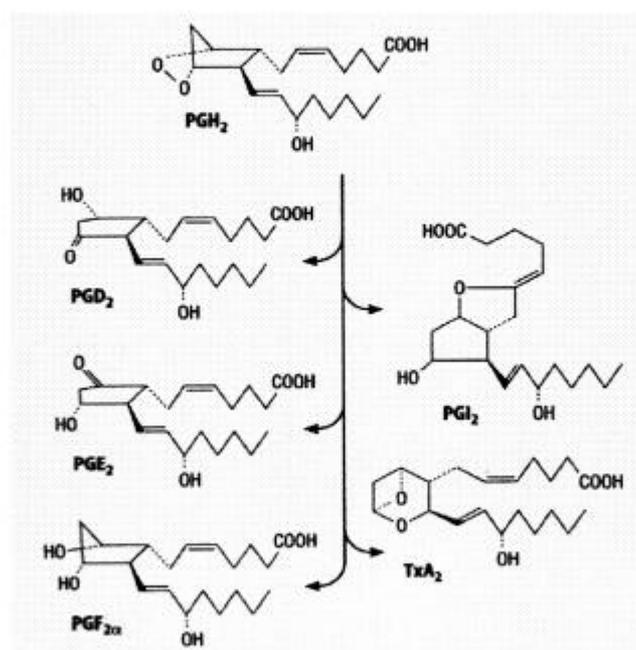
Der Schwerpunkt der Bestimmung der Laktatdehydrogenase in der Diagnostik liegt somit im Erkennen von Gewebeschäden sehr geringen Ausmasses. Diesem Kriterium dient die LDH auch in dem hier vorgestellten Versuch. Sie wird als Untergangsmarker für Knochenzellen betrachtet.

1.6.3 Prostaglandine im Knochenstoffwechsel

Prostaglandine (PG) sind eine Gruppe von Fettsäuren, die viele physiologische Prozesse beeinflussen. Sie bestehen aus 20 Kohlenstoffatomen, weshalb sie auch als Eicosanoide bezeichnet werden, und einem Ring aus fünf C-Atomen. Prostaglandine leiten sich vom Arachidonat und anderen mehrfach ungesättigten Fettsäuren ab. Die Umwandlung der Arachidonsäure in Prostaglandine wird von Cyclooxygenasen (COX) vollzogen, von denen bisher mindestens drei Isoformen bekannt sind. Die Cox 1-Form ist in vielen Zellarten vorhanden und ständig aktiv. Die Cox 2-Form wird von Entzündungsfaktoren wie beispielsweise den Zytokinen in einwandernden Leukozyten und Makrophagen induziert. Die Cox 3-Form, die derzeit noch Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen ist, scheint hauptsächlich im ZNS und im Herzen von Bedeutung zu sein. Die Blockade von Cox 3 durch Medikamente wie Acetaminophen wirkt analgetisch und antipyretisch [128].

Die Hauptklassen der Prostaglandine werden mit PGA bis PGI bezeichnet, ein weiterer Index gibt die Anzahl der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen ausserhalb des Ringes an.

Abb. 4: Aus dem Arachidonat entsteht durch eine Cyclooxygenase das Prostaglandin H_2 , von dem sich die übrigen Prostaglandine ableiten



Da Prostaglandine aufgrund eines schnellen enzymatischen Abbaus sehr kurzlebige Substanzen sind, entfalten sie ihre Wirksamkeit auch nur lokal. Sie binden an verschiedene Zelloberflächenrezeptoren und rufen von Gewebe zu Gewebe unterschiedliche biologische Effekte hervor. Anders als die meisten Signalmoleküle werden sie nicht gespeichert, sondern fortwährend ins Zellmedium sezerniert. Sobald Zellen durch Veränderungen ihrer Umgebung aktiviert werden, erhöhen viele die Synthesegeschwindigkeit beziehungsweise Syntheserate der Prostaglandine. Der resultierende Anstieg des lokalen Prostaglandinspiegels beeinflusst sowohl die Prostaglandin-produzierenden Zellen, als auch direkte Nachbarzellen.

Durch verschiedene *in vivo* und *in vitro* geführte Studien konnten verschiedene Effekte von Prostaglandin E₂ (PGE₂) auf den Knochen gezeigt werden. Es wurde beispielsweise beschrieben, dass exogen zugeführtes PGE₂ den Knochenaufbau in Ratten sowohl stimulieren als auch inhibieren kann [39,40,53,55,72,108,111,116,120]. Auch in Zellkulturstudien konnte nachgewiesen werden, dass PGE₂ sowohl den Knochenaufbau fördern und blockieren [85,86] als auch die Knochenresorption induzieren und inhibieren kann [69]. Trotz der sich teilweise widersprechenden Resultate weist jedoch die Mehrzahl der in den letzten Jahren veröffentlichten Ergebnisse darauf hin, dass exogen zugeführtes oder durch mechanische Belastung erhöhtes PGE₂ Knochenwachstum stimuliert [12,46,124]. PGE₂ könnte den Knochenaufbau zum einen durch direkte Stimulation der Osteoblasten oder Osteoblastenvorläuferzellen fördern oder zum anderen durch eine Stimulation der Osteoklasten, wodurch der Remodeling-Prozess provoziert werden würde.

Jedoch sind die Ergebnisse und die Möglichkeiten der Untersuchung hinsichtlich des Verhaltens der Prostaglandine bei mechanischer Belastung aufgrund der Schwierigkeiten, Knochenzellen in ihrer physiologischen Umgebung zu untersuchen, noch nicht abschliessend entwickelt.

1.7 Die polychrome Sequenzmarkierung

Die polychrome Sequenzmarkierung ist ein Verfahren, welches es ermöglicht, dynamische Knochenumbauprozesse graphisch beziehungsweise mikroskopisch

darzustellen. Fluochrome bilden mit Kalzium einen fluoreszierenden Chelatkomplex [58], der in den mineralisierenden Knochen eingebaut wird [60,81,82,83,102].

Durch die Gabe mehrerer dieser fluoreszierenden Farbstoffe in definierten Zeitabständen kann somit durch die bestimmte Farbenabfolge der zeitliche Ablauf der Knochenmineralisation codiert werden. Rückschlüsse auf die Dynamik der Knochenneubildung werden damit möglich.

Die zum Einsatz kommenden Farben wie Calceingrün oder Xylenolorange erfüllen das generelle Gebot, keine lokale beziehungsweise generelle Toxizität zu besitzen, welche die Knochenbildung und somit unseren Versuch beeinflussen könnten. Sie werden ausserdem nicht durch die spätere Fixierung und Einbettung in Methylmethacrylat verändert. Die intravital markierten Knochen können auch mit anderen histologischen Färbungen versehen werden [67].

Schon im Jahre 1958 wurde von MILCH beschrieben, dass sich Tetrazyklin im lebenden Knochen ablagert und als gelbliche Farbbande erscheint. Das Xylenolorange, welches sich orange darstellt und das als rot imponierende Alizarin wurden von RAHN und PERREN eingeführt [84]. SUZUKI und MATHEWS etablierten das Calcein, das eine leuchtend grüne Bande hervorruft.

1.8 Die Apoptose

Man nimmt an, dass eine Zelle aktiv Prozesse induzieren kann, die zu ihrem Tode führen. Dieser Vorgang wird als Programmierter Zelltod oder Apoptose bezeichnet. Die Apoptose ist scheinbar in jeder Körperzelle möglich [36,115]. Der Begriff Apoptose kommt aus dem Griechischen und setzt sich aus *apo* (=ab, weg, los) und *ptosis* (=Senkung) zusammen. Ursprünglich wurde dieser Begriff zur Beschreibung der fallenden, welken Blätter im Herbst verwendet.

Erstmals von Vogt im Jahre 1842 morphologisch beschrieben, hat sich die Apoptose während der letzten Jahre zu einem der umfangreichsten Forschungsgebiete entwickelt. Eine erste Zusammenfassung wurde 1951 von Glucksmann publiziert. Der eigentliche Begriff Apoptose wurde 1972 von Kerr et al. [47] eingeführt, zuvor wurde stattdessen die Umschreibung *Programmierter Zelltod* benutzt.

Verständlich wurde die der Apoptose zugrundeliegende Genetik durch Untersuchungen an *C.elegans*, bei denen man 1983 die erste *ced*-Mutante (*ced* von cell death abnormal) entdeckte und 1988 das erste für die Apoptose wichtige Protein fand (*bcl-2*). Auch der Mensch besitzt ein homologes Gen zu *bcl-2*, das, wenn es bei *C.elegans* eingesetzt wird, bei diesem den Tod vieler Zellen während der Entwicklung verhindern kann. Somit ließ sich der programmierte Zelltod von *C.elegans* auf den Säuger übertragen.

Die Apoptose kann sowohl intern als auch extern ausgelöst werden. Zu den internen Faktoren zählen dabei Stress jeglicher Form oder aber eine starke Schädigung des Erbgutes. Extern kann der Vorgang durch T-Killerzellen beispielsweise nach Virusbefall ausgelöst werden.

Wichtige Bedeutung kommt der Apoptose bei der Entwicklung der Körpergestalt zu. So muss beispielsweise bei höheren Wirbeltieren das sich zwischen den Fingern und Zehen befindliche Gewebe entfernt oder aufgelöst werden, welches ursprünglich zu Schwimmhäuten geworden wäre. Ein anderes Beispiel ist die Elimination funktionsloser Neurone oder die Zerstörung autoreaktiver T-Lymphozyten.

Aber auch im erwachsenen Organismus kommt der Apoptose eine vitale Bedeutung zu. Das Verhältnis zwischen Zellproliferation und Zelluntergang muss im Gleichgewicht gehalten werden. Ein Ungleichgewicht kann zu einer autonomen Zellwucherung (Krebs) führen. Desweiteren müssen kranke und alte Zellen beseitigt werden oder aber Tumorzellen abgetötet. Somit ist die Apoptose essentiell für Gewebe, die sich durch dauernde Zellproliferation auszeichnen beziehungsweise sich in permanentem Umbau befinden. Beispiele für solche Gewebe sind die Haut, der Darm, die Gebärmutter Schleimhaut, die Brustdrüsen, die Prostata oder aber das Blutbildungssystem.

Wurde in einer Zelle die Apoptose induziert, so wird aus den Mitochondrien Cytochrom c freigesetzt, das sich mit einem Protein namens Apaf1 verbindet. Dieser Komplex führt zur Aktivierung des Kaspasensystems, einer Ansammlung verschiedener Proteine. Sind die Kaspasen aktiviert, werden auch andere Proteine gespalten, die den schnellen Tod der Zelle provozieren. Zu den gespaltenen Proteinen zählen die Laminine, die die Kernmembran stützen. Somit wird die DNA freigelegt. Indem Proteine gespalten werden, die Nukleasen binden, können die damit freigesetzten Nukleasen die DNA zerlegen. Darüberhinaus werden Proteine des Zytoskeletts und Adhäsionsmoleküle angegriffen, was zur Loslösung der Zelle aus ihrem Verband führt und die anschließende Phagozytose erleichtert.

Dazu werden auch die negativ geladenen Phospholipidmoleküle von der Innen- zur Aussenseite der Membran transportiert, wodurch die Zellen nochmals für Makrophagen markiert werden. Die jeweiligen für die Apoptose benötigten Kaspasen können von Zelltyp zu Zelltyp variieren.

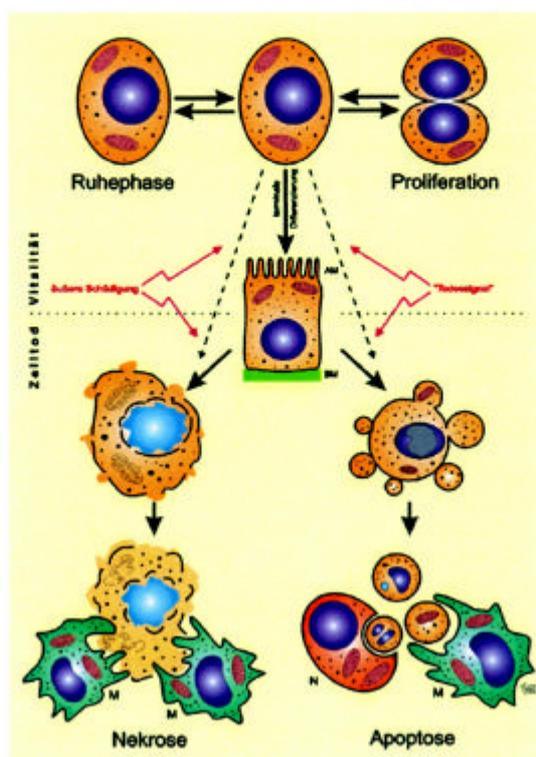
Werden Mitochondrien verletzt, können in der Zelle vorhandene Prokaspasen durch das austretende Cytochrom c aktiviert werden. Cytochrom c strömt jedoch auch dann aus, wenn Zellen von außen zur Apoptose angeregt werden und verstärkt somit den induzierten Prozess. Auch geschädigte DNA im Zellkern kann den Apoptosemechanismus auslösen.

Ein sehr umfangreich untersuchter Mechanismus zur Auslösung der Apoptose ist die Aktivierung von p53, eines Proteins, das autonome Zellproliferation verhindern kann. Es wird aktiviert, wenn es zu DNA-Schäden kommt und verhindert weitere Zellteilungen oder induziert direkt die Apoptose der geschädigten Zelle. In der Mehrzahl der Krebszellen ist es deaktiviert.

Morphologisch kann die Apoptose folgendermassen beschrieben werden. Zunächst kommt es zu einer Verringerung des Zellvolumens. Die Zellorganellen bleiben im Gegensatz zur Nekrose intakt, und der Stoffwechsel der in der Apoptose begriffenen Zellen läuft weiter. Anschliessend schrumpft der Zellkern (Karyopyknose) und das Chromatin verdichtet sich [100]. An der Zytoplasmamembran ist ein ausgedehntes *membrane blebbing* zu beobachten, das heisst, dass es zur Bildung von Membranausstülpungen und -bläschen kommt. Abschliessend schnüren sich die *apoptotic bodies*, membranumschlossene Vesikel, die DNA-Fragmente enthalten, von der Zelle ab (Karyorrhexis) und werden von phagozytierenden Zellen aufgenommen, ohne dass Entzündungsmediatoren freigesetzt oder Antikörper gebildet werden. Die in den Membranen befindlichen DNA-Fragmente enthalten 180-200 BPs (base pairs) [65,119].

Eine Apoptose dauert in vivo 6-24 Stunden, wobei die Dauer von Zelltyp zu Zelltyp variiert [4].

Abb. 5: Gegenüberstellung morphologischer Charakteristika apoptotischer und nekrotischer Zellen



Die Apoptose wird häufig der Nekrose gegenübergestellt, die jedoch keinen aktiv induzierten Zelltod beschreibt, sondern durch irreversible Schädigung der Zelle verursacht wird. Allgemeine Merkmale der Nekrose sind die Zellschwellung, die Denaturierung der zytoplasmatischen Proteine, eine Zerstörung der Zellorganellen und die typischen Kernveränderungen, die alle auf unspezifischem DNA-Abbau beruhen und nach verschiedenen Mustern verlaufen können:

- Schrumpfung und verstärkte Basophilie (Pyknose)
- Abnahme und Verlust der Basophilie (Karyolyse)
- Fragmentierung des pyknotischen Kernes (Karyorrhexis)

Der Zellinhalt der nekrotischen Zelle ruft nach Ruptur und Entleerung ins Zwischengewebe unter Umständen Entzündungsreaktionen hervor.

1.9 Das Kulturbelastungssystem

Das in diesem Versuch zur Anwendung kommende System ist ein ex-vivo Perfusions- und Belastungssystem (PBS) (ZETOS[®]; Marburg), das von D.B.Jones (Marburg) und E.L.Smith (Wisconsin, USA) entwickelt wurde, um vollständige Organproben von trabekulärem Knochen über einen längeren Zeitraum kultivieren und durch mechanische und / oder pharmakologische Stimuli beeinflussen zu können.

Die trabekulären Knochenzylinder, deren Herstellung in *Kap. 3.2.1: Präparation der Knochenzylinder* beschrieben ist, sind 5mm hoch und verfügen über einen Durchmesser von 10 mm. Innerhalb dieser Zylinder lassen sich alle für trabekuläre Knochen typischen Zellen finden: Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten, Bone-Lining-Zellen, Mesenchymale Vorläuferzellen, Megakarocyten, Nervenzellen als auch Bindegewebs- und Fettzellen. Somit können mit Hilfe dieses Systems auch die Interaktionen verschiedener Knochenzellen untereinander untersucht werden.

Das PBS ermöglicht es, auf die Knochenproben innerhalb der Kultur- und Belastungskammer eine definierte Kraft auszuüben, die eine definierte Deformation des Knochens provoziert. Der Benutzer bestimmt dabei die Form der Belastung, deren Frequenz und Zykluszahl. Das PBS zeichnet die Kompression und die dafür aufgewendeten Kräfte in Echtzeit auf. Das beschriebene System ist in der Lage, eine Kompression mit einer Genauigkeit von ± 50 nm zu applizieren.

Die scheinbare Steifigkeit (Young's- oder E-Modulus), die viscoelastischen Eigenschaften (VE), die Bruchfestigkeit (Strength) und die Ermüdungseigenschaften der verwendeten Knochenproben können durch das PBS exakt bestimmt werden.

Die Konfigurationen des PBS erlauben eine Variation der Frequenz von 0,001 Hz bis 1800 Hz und eine maximale Belastung von 4500 N, jeweils in Abhängigkeit der Kombination aus Frequenz und Belastung. 4500 N liegen jedoch weit oberhalb des Bruchindex der hier verwendeten Knochenproben, weshalb das System auf eine maximale Belastung von 1500 N, bei einer Genauigkeit der Kompression von ± 50 nm, kalibriert wurde.

In Abhängigkeit des verwendeten Piezo-Stack und der integrierten Elektronik kann die entwickelte Software auf eine Frequenz von 0,001 Hz – 20 000 Hz und bis auf eine Kraft von 30000 N eingestellt werden. In dem hier beschriebenen Experiment wurden

die Knochenproben der verschiedenen Belastungsgruppen mit einer Frequenz von 1 Hz bei 600 Zyklen täglich belastet.

Das beschriebene Perfusions- und Belastungssystem setzt sich aus folgenden Einzelkomponenten zusammen:

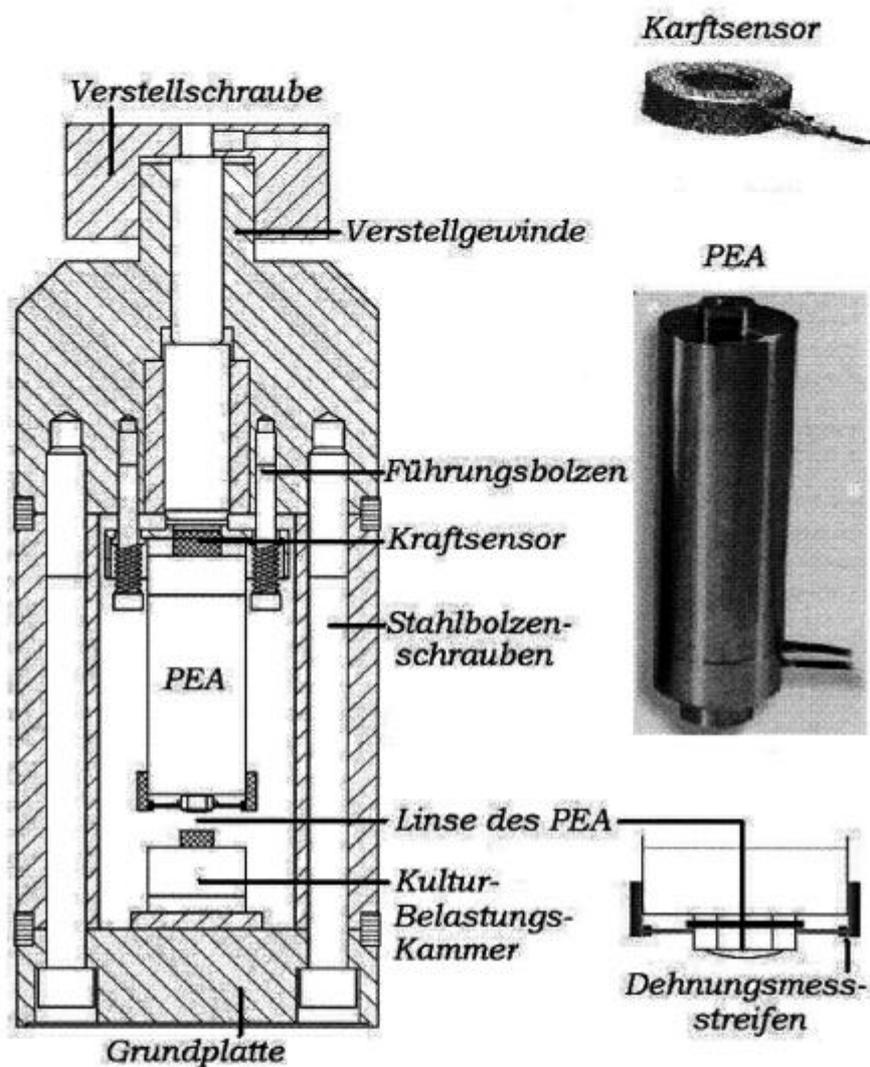
1 Die Belastungseinheit (Zetos):

Der Zetos ist das zentrale Element des PBS, welches die mechanische Belastungseinheit und die Sensoren für die Messung von Kompression und dafür aufgewendeter Kraft enthält. Die Kultur- und Belastungskammern werden in den dafür vorgesehenen Einsatz geschoben und mit Hilfe der Verstellerschraube fixiert und manuell mit einer definierten Vorlast versehen.

Die mechanische Belastung wird über den Piezo-Stack (Physik Instrumente, PI) ausgeübt. Dieser dehnt sich entsprechend der angelegten elektrischen Spannung aus und bewirkt somit einen Druck auf den Belastungs-Piston der Belastungskammer und damit auf die in ihr gelegene Knochenprobe. Der Piezo Kraft Sensor (Kistler) produziert elektrische Ladung durch aufgebrachte Kraft. Die Höhe der elektrischen Ladung steigt proportional der aufgewendeten Kraft an und kann somit zur Messung der Kraft verwendet werden.

Der Kompressions-Sensor misst die Ausdehnung des Piezo-Stack. Beide Sensoren sind Dehnungssensoren.

Abb.6: Der Zetos (Konstruktionszeichnung)



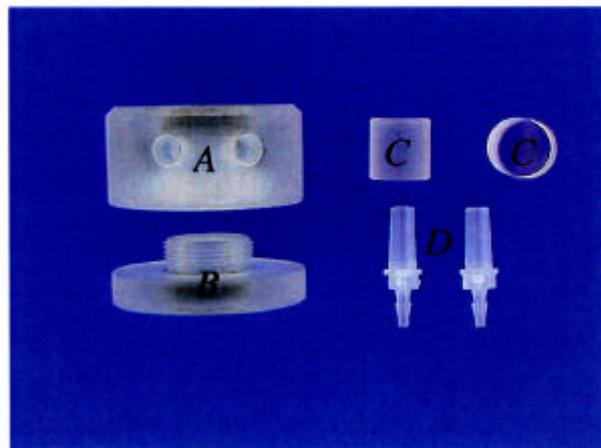
2 Die Kultur- und Belastungskammer

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 Kammer mit einer Rollpumpe verbunden ist und somit eine kontinuierliche Perfusion der Knochenproben mit Kulturmedium gewährleistet werden kann.

Direkt der Knochenprobe aufgesetzt befindet sich der Belastungs-Piston. Dehnt sich der Piezo-Stack aus, wird der Belastungs-Piston auf die Knochenprobe gedrückt und führt zu einer definierten Kompression des Knochens.

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



Die *Abbildung 7* zeigt den Aufbau der Belastungskammer mit den einzelnen Komponenten:

- A: Kammergehäuse
- B: Kammerboden
- C: Belastungs - Piston
- D: Konnektoren

Der Boden der Kultur- und Belastungskammern und der Belastungs-Piston wurden mit einer speziellen Methode geschliffen, um eine möglichst hohe Parallelität und Glattheit der Oberflächen innerhalb der Kammer zu gewährleisten. Somit wird eine möglichst gleichmässige Kraftübertragung auf die gesamte Knochenoberfläche gewährleistet und damit reproduzierbare Belastungen und Ergebnisse.

3 Die Elektronischen Module

Die *Abbildung 8* zeigt die elektronischen Module, die es ermöglichen, das PBS und die dazugehörigen Sensoren zu betreiben.

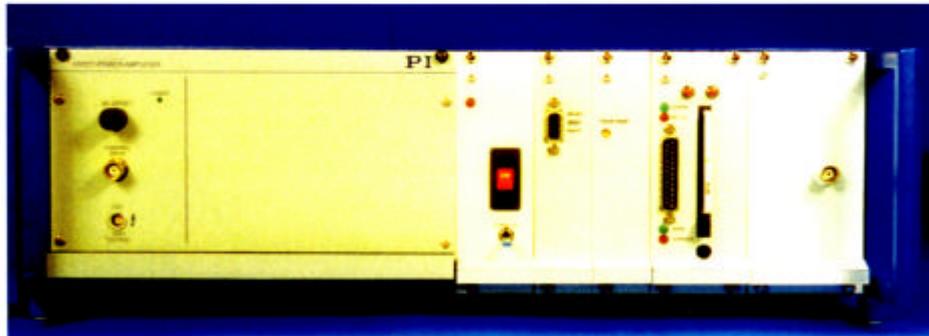
Dazu gehören folgende:

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 Microcontroller 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 der Wheatstone-Brücke, die im Piezo-Aktor zur Expansionsmessung eingebaut ist und von der die Kompression gemessen wird. Da dieser Sensor 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. Microcontroller-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 Piezokraftsensors, der als Antwort auf die auf ihn eingebrachte Kraft eine elektrische Ladung erzeugt, die linear zur Kraft ist.

Abb. 8: Die elektronischen Module



Das PBS wird über ein Anwendungsprogramm namens „Zetos“ (Zetos; Marburg) betrieben, das über eine Windows®-Oberfläche gesteuert wird. Über dieses Programm kann sowohl die Höhe der zur Belastung der Knochenproben verwendeten Kompression, als auch die Vorlast, die Länge der Belastung, die Frequenz und das jeweilige Belastungsmuster gewählt bzw. gesteuert werden. Die aufgewendete Kraft und die Kompression werden dabei in Echtzeit gemessen und aufgezeichnet.

Für ausführliche Informationen sei an folgende Adressen verwiesen:

- Zetos Marburg
- Physik Instrumente (<http://www.physikinstrumente.de>)
- Kistler (<http://www.kistler.com>)

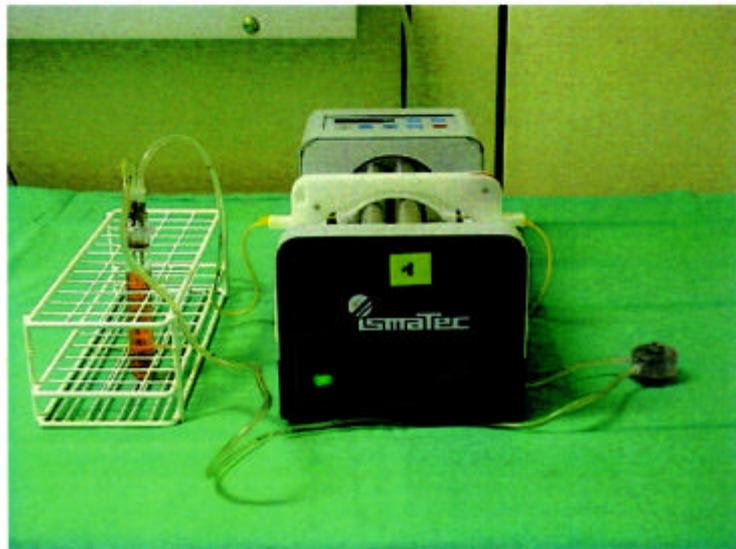
4 Die Perfusionspumpe

Zur Perfusion der Kulturbelastungskammern beziehungsweise der in ihr befindlichen Knochenproben wird eine 24-Kanal-Umlaufpumpe (Ismatec®) 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, da für diesen Flüssigkeitsdruck in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass keine Scheerkräfte auftreten, der Knochen aber dennoch mit ausreichend Medium versorgt wird.

Abb. 9: Die Perfusionspumpe mit einem integrierten System



2 Zielsetzung und Fragestellungen dieser Arbeit

Zielsetzung dieser Arbeit ist die Etablierung des kalibrierten *Zetos*[®] als Kultur- und Belastungssystem für trabekuläre Knochenzylinder, welches in der Form in dieser Arbeit zum ersten Mal Anwendung findet.

Damit ergeben sich folgende **Fragestellungen**, die es zu bearbeiten gilt:

- Reagieren die trabekulären Knochenexplantate auf die hier applizierten physiologischen Belastungssignale auch mit physiologischen Reaktionsmustern und wie sind diese charakterisiert ? Besonderes Augenmerk soll dabei auf die Entwicklung der scheinbaren Steifigkeit und die Zunahme an Knochenmasse in Form eines appositionellen Knochenwachstums gerichtet werden.
- Wie verhalten sich die in diesem Versuch zu bestimmenden Zellmarker hinsichtlich der Knochenpräparation und der mechanischen Belastung ? Bei den Markern handelt es sich um die Laktatdehydrogenase und die Alkalische Phosphatase.
- Bestehen Unterschiede zwischen den beiden hier zur Anwendung kommenden verschieden intensiven Belastungssignalen hinsichtlich der Reaktionsmuster der Knochenproben ? Zur Beantwortung dieser Frage sollen vor allem die Entwicklung der scheinbaren Steifigkeit, der Verlauf der zu bestimmenden Marker und eine umfangreiche histologische Aufarbeitung herangezogen werden.
- Bleibt die Vitalität der Knochenexplantate über den gesamten Kultivierungs- und Belastungszeitraum erhalten ? Auch diese Frage soll vorrangig durch die histologische Aufarbeitung und den Verlauf der Zellmarker beantwortet werden.
- Welche Einsatzmöglichkeiten werden sich in Zukunft für dieses System ergeben ?

Einer der Schwerpunkte der Arbeit sollen die Anwendung und Anpassung histologischer Färbetechniken an nicht-entkalktem Knochengewebe sein.

3 Material und Methoden

3.1 Herstellung der Knochenpräparate

Für jeden der auf dem ZETOS-System basierenden Versuche müssen während einer aufwendigen Prozedur Knochenpräparate hergestellt werden, die später in die Kulturbelastungskammern integriert werden. Als Rohmaterial diente in diesem Versuch der Radius eines 20 Monate alten Kalbes.

Um vitales Knochengewebe zu gewinnen beziehungsweise zu erhalten, muss das Knochenrohmaterial möglichst schnell, d.h. wenige Stunden nach Gewinnung und vor allem unter äußerst sterilen Bedingungen bearbeitet werden.

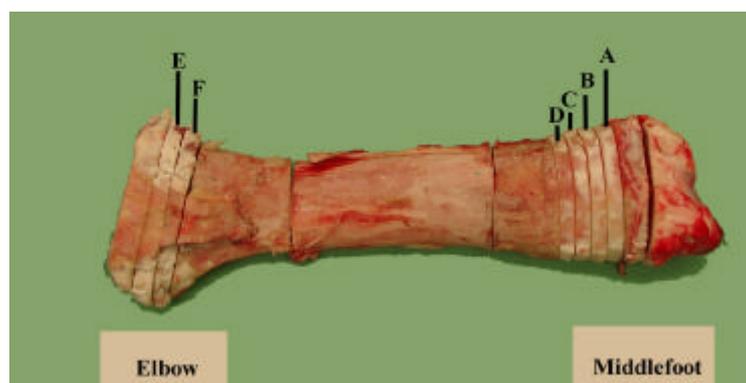
Im Folgenden werden die einzelnen Schritte der Präparation dargestellt.

3.1.1 Präparation der Knochenzylinder

Zunächst sollte das Präparat, das neben dem eigentlichen Knochen auch noch sämtliches Weichgewebe enthält, gründlich gereinigt und desinfiziert werden, um die Gefahr von späteren Infektionen möglichst gering zu halten.

Die folgenden Schritte dienen der Freipräparation des Knochens; das heißt, Weichgewebe wie Muskulatur, Sehnenansätze oder Fett werden zunächst unter dem Abzug mit Hilfe eines sterilen Skalpellts entfernt.

Abb. 10: Freipräparierter Radius (hier schon weiter bearbeitet)



Da es sich um einen kompletten Unterarm handelt, werden zunächst Radius und Ulna mit Hilfe einer chirurgischen Handsäge voneinander getrennt. Da das Präparat, um später in Scheiben geschnitten werden zu können, mit einer Halterung in der Bandsäge fixiert werden muss, besteht die Notwendigkeit, es passgenau vorzubereiten. Dazu werden die Epiphysen am proximalen sowie am distalen Ende des Radius von der Diaphyse abgetrennt. Teile der äusseren Epiphysenkompakta werden danach so bearbeitet, dass zwei zueinander parallele Flächen entstehen, die in der Halterung der Bandsäge eingespannt werden können. Die Gelenkflächen der Epiphysen werden ebenfalls mit der chirurgischen Handsäge abgetrennt, wobei darauf zu achten ist, dass der Schnitt oberhalb der Wachstumsfuge erfolgt. Die Diaphyse wird verworfen, da in dieser der Anteil des für den Versuch ungeeigneten Knochenmarks zu hoch ist.

Die präparierte Epiphyse wird jetzt in der Halterung der Bandsäge (Diamantbandsäge; Firma Exakt Apparatebau GmbH) fixiert und ausgerichtet.

Abb. 11: In der Bandsäge fixierte Epiphyse



Im folgenden werden mit Hilfe der Bandsäge Knochenscheiben mit einer Dicke von 8 mm aus dem Präparat geschnitten. Das Sägeblatt der Bandsäge ist mit feinsten Diamanten besetzt und wird während des gesamten Sägevorganges mit einer auf 4°C temperierten isotonischen Natriumchlorid-Lösung gekühlt, um bearbeitungsbedingte Gewebedefekte so gering wie möglich zu halten.

Die gewonnenen Knochenscheiben werden bis zur weiteren Verarbeitung in mit PBS (siehe *Kap.3.1.6.4*) gefüllten Zellkulturschalen aufbewahrt. Da für den Versuch nur

spongiöses Knochengewebe genutzt werden kann, können auch nur Knochenscheiben verwendet werden, deren spongiotischer Anteil den des Knochenmarks überwiegt.

Während des nun folgenden Arbeitsschrittes werden aus den gewonnenen Knochenscheiben mit Hilfe eines diamantbesetzten Hohlbohrers Knochenzylinder entnommen. Dazu werden die Knochenscheiben auf einem verschieblichen Bohrtisch fixiert und die Zylinder ausgebohrt.

Abb. 12: Entnahme der Knochenzylinder mit einem Hohlbohrer

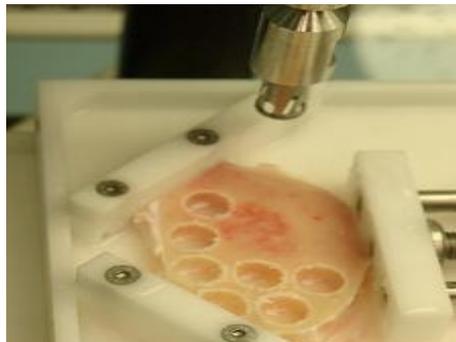


Abb. 13: Der Hohlbohrer (\varnothing 10mm)



Der Hohlbohrer und somit die damit gewonnenen Knochenzylinder weisen einen Durchmesser von 10 mm auf. Auch der Bohrer wird während des gesamten Arbeitsschrittes mit isotonischer Natriumchlorid-Lösung gekühlt.

Um die Gewebekonsistenz betreffend möglichst homogene Knochenzylinder zu erhalten, ist darauf zu achten, dass weder Kortikalis noch Knochenmark ausgebohrt werden, sondern nur spongiöses Knochengewebe.

Nach jedem Bohrvorgang wird der Bohrer aus dem Bohrfutter gelöst und die in ihm enthaltenen Knochenzylinder mit Hilfe eines Extraktors herausgedrückt. Die Knochenzylinder werden in mit PBS gefüllten Reagenzgläsern gelagert. Von jedem Knochenzylinder wird die Herkunft aus der Knochenscheibe vermerkt.

Da die Kulturbelastungskammern, in die später die Knochenzylinder integriert werden sollen, für eine Zylinderhöhe von 5mm ausgelegt sind, werden die 8mm hohen Präparate im folgenden Schritt auf eine einheitliche Höhe von 5mm gebracht.

Dieser Arbeitsschritt erfolgt mit einer Inlocksäge (Leitz 1600). Die Zylinder werden in eine hierfür gefertigte Halterung gespannt, deren Höhe 5mm beträgt. Das oberbeziehungsweise unterhalb dieser Halterung überstehende Knochenmaterial wird im Folgenden durch die Inlocksäge abgetrennt.

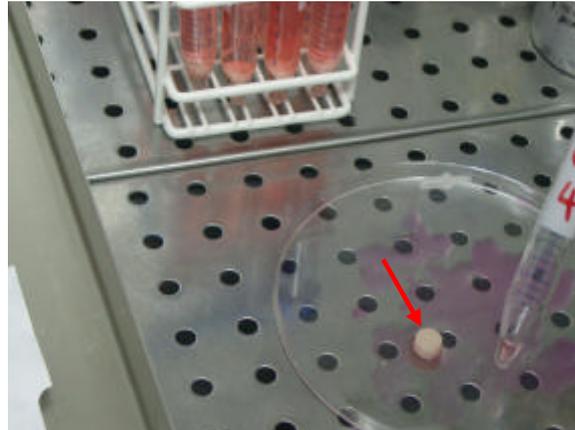
Auch bei diesem Vorgang ist auf permanente Kühlung mit isotonischer Natriumchlorid-Lösung zu achten.

Abb. 14: Mit der Inlocksäge werden die Zylinder auf eine Höhe von 5 mm gebracht



Nach Beendigung dieses Präparationsschrittes hat man Knochenzylinder gewonnen, die aus spongiotischem Gewebe bestehen, deren Höhe 5mm beträgt und die einen Durchmesser von 10 mm haben. Die Zylinder werden zunächst in mit PBS gefüllten Reagenzgläsern gelagert.

Abb. 15: Knochenzylinder nach Präparation



3.1.2 Waschen der Knochenzylinder

Bevor die präparierten Knochenzylinder in die Kammern integriert werden können, müssen sie in einer mehrere Schritte umfassenden Waschprozedur gereinigt werden, zum einen, um bei den Sägevorgängen entstandenes Knochenmehl auszuwaschen, zum anderen, um eventuell vorhandene Keime abzutöten.

Als Waschmedien dienen Earle`s – Medien, die zum Teil mit Antibiotika versetzt sind (Rezepte siehe *Kap. 3.1.6.1/2*). Die Zylinder werden zunächst unter dem Abzug aus den mit PBS gefüllten Reagenzgläsern mit Hilfe einer sterilen Pinzette in mit Earle`s gefüllte Schraubreagenzgläser umgelagert. Um eine bessere Durchspülung zu erreichen, werden die Reagenzien für 10min in einen Rotator (Heidolph; "Reax 2") gestellt.

Abb. 16: Waschen der Proben in einem Rotator



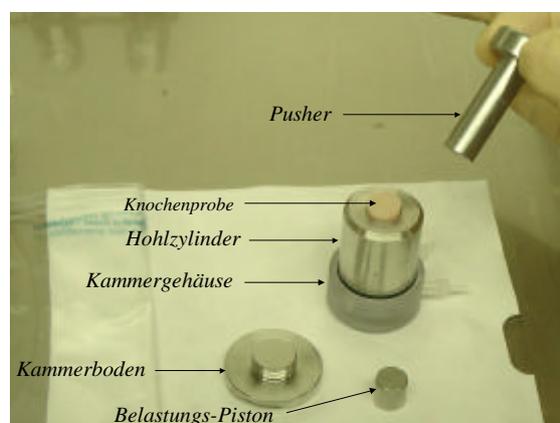
Danach werden die Proben nochmals in mit Earle`s gefüllte Schraubreagenzgläser umgelagert und ein zweites Mal für 10 min in den Rotator gestellt.

Der abschliessende Waschgang findet in mit Antibiotika versetztem Earle`s statt und dauert 20 min. Zu beachten ist, dass die Umlagerungen unter sterilen Bedingungen unter dem Abzug zu erfolgen haben.

3.1.3 Einsetzen der Knochenzylinder in die Kammern

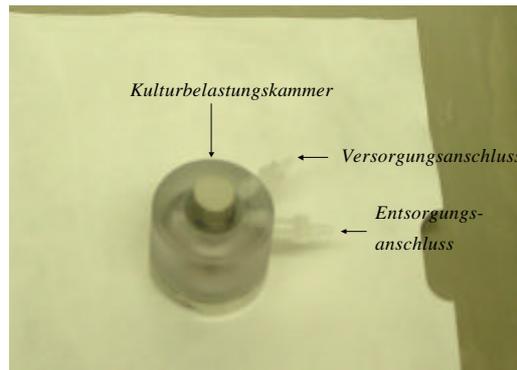
Während der folgenden Arbeitsschritte werden die Knochenpräparate in die Kulturbelastungskammern integriert. Dazu wird auf die Kammern, die unter einer Sterilwerkbank (Fa.Gelaire) der sterilen Verpackung entnommen werden, ein Hohlzylinder geschraubt, der in dem gleichen Gewinde fixiert wird, in dem später der Kammerboden verschraubt wird. Auf das obere Ende des Hohlzylinders wird zunächst der Belastungs- Piston aufgesetzt und in den Zylinder gedrückt. Danach wird das Knochenpräparat aufgesetzt und nachgeschoben. Um sowohl den Belastungs-Piston als auch das Knochenpräparat in der Kammer in die richtige Position zu bringen, werden beide mit einem Pusher über die gesamte Länge des Kammeraufsatzes in die Kammer eingebracht.

Abb. 17: Belastungs-Piston und Knochenzylinder werden mit Hilfe des Pushers in die Kammer eingebracht



Anschliessend wird der Hohlzylinder entnommen und Kammer und Kammerboden werden manuell verschraubt und mit einem dazu passenden Schlüssel festgezogen. Die beiden Versorgungsanschlüsse der Kammern werden dann über zwei Schläuche (siehe *Kap.3.1.4*) mit den Mediumreservoiren verbunden.

Abb. 18: Fertigbestückte Kulturbelastungskammer



3.1.4 Anschluss der Kammern an die Pumpe

Jedes der einzelnen Belastungssysteme besteht aus einer Kammer, die über einen Versorgungs- und einen Entsorgungsschlauch mit dem Reagenzglas verbunden ist, welches das Nährmedium enthält. Im folgenden Schritt wird das Pumpenstück des Versorgungsschlauchs in die dafür vorgesehene Vorrichtung der Rollpumpe eingespannt.

In bestimmten Abständen muss anfangs überprüft werden, ob alle Kammern mit Medium versorgt werden.

Abb. 19: Komplettes System bestehend aus Kammern, Rollpumpe und Mediumreservoir



Das in *Abbildung 19* dargestellte System besteht aus folgenden Einzelkomponenten:

- Schlauchsystem: Verbindungsstücke: Tygon[®] Masterflex[®]; Cat.No.6419-13
Länge Entsorgungsschlauch 80 cm
Länge Versorgungsschlauch 80 cm incl.
Pumpenstück
Pumpenstück: Pharmed[®]; Cat.No. 070539-08
Länge 40 cm
- Mediumreservoir: Rundbodengläser (Klarglas); Art.Nr. 3301953
- Reservoirstopfen: Reagenzstopfen mit Einfluss und Ausfluss (T. Pohl; Marburg)
- Kultur- und Belastungskammer (siehe *Abb.9*)
- Luer-Konnektoren-männlich; Novodirekt[®], Cat.No. B95956
- Pumpe: Ismatec[®] IPC; Rollpumpe
- Versorgungsmedium: DMEM (GIBCO[®]; Cat.No. 52100-039)

3.1.5 Mediumwechsel vor Belastungsbeginn

Während der ersten Versuchstage nach der Präparation der Knochenzylinder muss das Medium mehrfach gewechselt werden (nach jeweils 24 Stunden), da immer wieder präparationsbedingte Gewebesubstanzen ausgewaschen werden und sich im Medium

sammeln. Nach einer Ruhephase von etwa 72 Stunden können die Präparate erstmals belastet werden.

3.1.6 Verwendete Medien

3.1.6.1 Earle`s Waschmedium

Das Earle`s Waschmedium, das für zwei Waschgänge der Proben für jeweils 10 min dient, setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- 100 ml Earle`s Salt Solution 10x (Biochrom KG; Cat.No. L 1925)
- 7,5 ml NaHCO₃ (6%ig)

Diese Zusammensetzung wird mit Aqua Bidest auf 1000 ml aufgefüllt.

3.1.6.2 Earle`s Waschmedium mit Antibiotikum versetzt

Für dieses Medium, das dem dritten Waschgang dient, der 20 min dauert, werden folgende Bestandteile verwendet:

- 100 ml Earle`s Salt Solution 10x (Biochrom KG; Cat.No. L1925)
- 7,5 ml NaHCO₃ (6%ig)
- 4 ml Amphotericin B (Sigma; Cat.No. A2942)
- 500 000 IE Penicillin / Streptomycin (50 ml (Biochrom KG; Cat.No. A221))

Auch dieser Ansatz wird mit Aqua Bidest auf 1000 ml aufgefüllt.

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

Dieses DMEM high glucose–Medium dient während des Versuches als Kulturbeziehungsweise Versorgungsmedium der Knochenproben. Ein Liter des Mediums setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- 13,38 g DMEM (GIBCO BRL; Cat.No. 52100-039)
- 10 ml L-Glutamin (200 mM solution; PAA, Cat.No. M11-004)
- 10mg Vitamin C (Wako; Cat.No. 013-12061)
- 0,12 g Sodium Hydrogen Carbonat (NaHCO₃ (Merck; Cat.No.6329))
- 5 mmol (1,08 g) β-Glycerophosphat Disodium Hydrate (Sigma; Cat.No. G9891)
- 2,383 g HEPES Pulver oder 10 ml HEPES (1M HEPES pH 7,125)
(Sigma;Cat.No.H-3375)
- 50 000 IE Penicillin / Streptomycin = 5,0 ml (BIOCHROM KG; Cat.No. A2213)
- 100 ml FCS (Biochrome-Seromed; 511-S)

200 ml Aqua Bidest werden mit einem Rührer in ein Messglas gegeben und mit den oben angegebenen Substanzen versetzt. Danach wird das Gemisch auf 800 ml mit Aqua Bidest aufgefüllt, der pH – Wert auf 7,25 eingestellt. Anschliessend wird das Messglas auf 900 ml mit Aqua Bidest aufgefüllt . Die gewonnene Lösung wird unter der Sterilwerkbank filtriert (Bottle Top Filter, 0,22 microns). Desweiteren werden durch einen Spritzenvorsatzfilter (0,22µm; Milipore) 100 ml FCS hinzugegeben. Das fertige Kulturmedium wird bis zum Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt.

3.1.6.4 PBS Dulbecco

Wie bereits in *Kapitel 3.1.1: Die Präparation der Knochenzylinder* beschrieben, werden die Knochenpräparate zwischen den einzelnen Präparationsschritten jeweils in mit PBS gefüllten Petrischalen beziehungsweise Reagenzgläsern aufbewahrt.

Dieses PBS – Medium setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- 9,55 g PBS Dulbecco (BIOCHROM; Cat.No. L182-50) gelöst in
- 1 l Aqua Bidest

Das gewonnene Medium wird für 20 min autoklaviert.

3.2 Allgemeine Kulturbedingungen

Nachdem die Knochenzylinder nach der beschriebenen Methodik hergestellt und in die Kammern eingesetzt wurden, werden sie in das Perfusions- und Belastungssystem (PBS) integriert.

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

Die Versorgung der Knochenexplantate wird durch das bereits erwähnte DMEM-high-glucose Medium (siehe *Kap. 3.1.6.3*) gewährleistet, dessen pH-Wert auf 7,25 eingestellt ist. Das Nährmedium wird nach jeweils 72 Stunden gewechselt, sodass für diesen Zeitraum jeder Knochenprobe 6 ml Nährmedium zur Verfügung stehen. Die Durchflussrate des Mediums beträgt 7ml pro Stunde.

Um präparationsbedingten Knochenstaub auszuwaschen, wird während der ersten vier Versuchstage das Medium täglich gewechselt.

3.3 Versuchsdurchführung und Verlauf

Die in der Präparation gewonnenen n=24 Knochenzylinder werden zunächst randomisiert und in drei Gruppen mit n=8 Explantaten eingeteilt.

Gruppe1:

Die Knochenzylinder der ersten Gruppe werden jeden Tag jeweils im Abstand von 24 Stunden mit dem „Walking“-Signal für 10 min bei einer Frequenz von 1Hz belastet, was insgesamt 600 Zyklen pro Tag entspricht. Desweiteren wird jeweils im Anschluss an die dynamische Belastung die Scheinbare Steifigkeit bzw. das E-Modul gemessen.

Gruppe 2:

Die Knochenzylinder der zweiten Gruppe werden jeden Tag jeweils im Abstand von 24 Stunden mit dem „Jumping“-Signal für 10 min bei einer Frequenz von 1Hz belastet, was 600 Zyklen pro Tag entspricht. Desweiteren wird jeweils im Anschluss an die dynamische Belastung die Scheinbare Steifigkeit bzw. das E-Modul gemessen.

Gruppe 3:

Die Knochenzylinder der dritten Gruppe dienen als Kontrollproben und werden nicht dynamisch belastet. Nach jeweils vier Versuchstagen (96 Stunden) wird die scheinbare Steifigkeit bzw. das E-Modul gemessen.

Mit dem Belastungsmodus wird am dritten Tag nach Präparation begonnen.

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 in der Stunde gewählt, da in Vorversuchen gezeigt werden konnte, dass diese Flussrate zu keiner Belastung der Knochenproben durch Scherkräfte führt. Dennoch werden die Proben suffizient mit Medium versorgt.

Die weitere Prozedur verläuft sowohl in den Belastungsgruppen als auch in der Kontrollgruppe identisch.

Nach jeweils 72 Stunden wird das Kulturmedium gewechselt und aus dem verbrauchten Medium jeweils eine Probe zur Bestimmung der Alkalischen Phosphatase und der Laktatdehydrogenase entnommen (siehe *Kap.3.6, 3.7*). Desweiteren wird der pH-Wert im verbrauchten Medium bestimmt.

Gliederung des Versuches für die Belastungsgruppen:

<u>Versuchstag</u>	<u>Belastungstag</u>	<u>Arbeitsschritte</u>
1	-	Präparation und Integration der Knochenzylinder
2	-	Mediumwechsel, pH
3	-	Mediumwechsel, pH
4	1	Belastung, E-Modul, Mediumwechsel, pH
5	2	Belastung, E-Modul, Mediumwechsel, pH
6	3	Belastung, E-Modul
7	4	Belastung, E-Modul
8	5	Belastung, E-Modul, Mediumwechsel, pH, AP, LDH
9	6	Belastung, E-Modul
10	7	Belastung, E-Modul
11	8	Belastung, E-Modul, Mediumwechsel, pH, AP, LDH
12	9	Belastung, E-Modul
13	10	Belastung, E-Modul
14	11	Belastung, E-Modul, Calcein-Label, Mediumwechsel, pH, AP, LDH
15	12	Belastung, E-Modul
16	13	Belastung, E-Modul
17	14	Belastung, E-Modul, Prostaglandinabnahme, Mediumwechsel, pH, AP, LDH
18	15	Belastung, E-Modul
19	16	Belastung, E-Modul
20	17	Belastung, E-Modul, Mediumwechsel, pH, AP, LDH
21	18	Belastung, E-Modul
22	19	Belastung, E-Modul
23	20	Belastung, E-Modul, Alizarin-Label, Mediumwechsel, pH, AP, LDH
24	21	Belastung, E-Modul
25	22	Belastung, E-Modul
26	23	Belastung, E-Modul, Mediumabnahme, pH, AP, LDH

Gliederung des Versuches für die Kontrollgruppe:

Versuchstag Belastungstag Arbeitsschritte

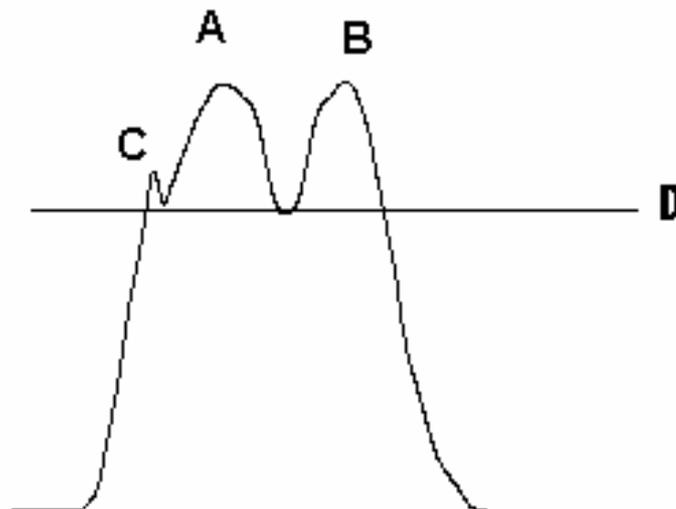
1	-	Präparation und Integration der Knochenzylinder
2	-	Mediumwechsel, pH
3	-	Mediumwechsel, pH
4	1	Mediumwechsel, pH
5	2	Mediumwechsel, pH
6	3	E-Modul
7	4	
8	5	Mediumwechsel, pH, AP, LDH
9	6	
10	7	E-Modul
11	8	Mediumwechsel, pH, AP, LDH
12	9	
13	10	
14	11	E-Modul, Calcein-Label, Mediumwechsel, pH, AP, LDH
15	12	
16	13	
17	14	Prostaglandinabnahme, Mediumwechsel, pH, AP, LDH
18	15	E-Modul
19	16	
20	17	Mediumwechsel, pH, AP, LDH
21	18	
22	19	E-Modul
23	20	Alizarin-Label, Mediumwechsel, pH, AP, LDH
24	21	
25	22	
26	23	E-Modul, Mediumabnahme, pH, AP, LDH,

3.4 Die Belastungssignale

Wie bereits erwähnt, sollen in diesem Experiment zwei unterschiedliche Belastungssignale hinsichtlich ihrer Auswirkung auf Knochenexplantate miteinander verglichen werden. Bei den Belastungssignalen handelt es sich um Belastungsformen, die, was Art und Verlauf anbelangt, physiologischen Bewegungsmustern entsprechen und direkt durch Messung auf einer Kraftmessplattform gewonnen wurden [21,110].

Das erste Signal stimuliert physiologisches Laufen („Walking“-Signal) und stellt sich graphisch wie folgt dar:

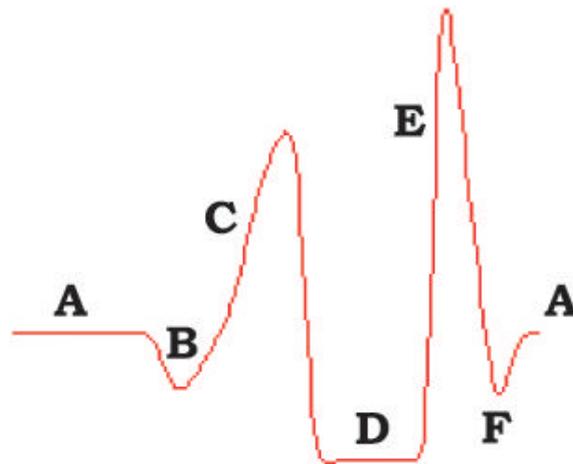
Abb. 20: Das „Walking“-Signal in seinen jeweiligen Phasen



*A: Abrollen Ferse; B: Abrollen Vorderfuss; C: passiver Peak
D: Körpergewicht*

Das Vergleichssignal ist ein physiologisches Springen („Jumping“-Signal) beziehungsweise Hüpfen und lässt sich graphisch folgendermassen darstellen:

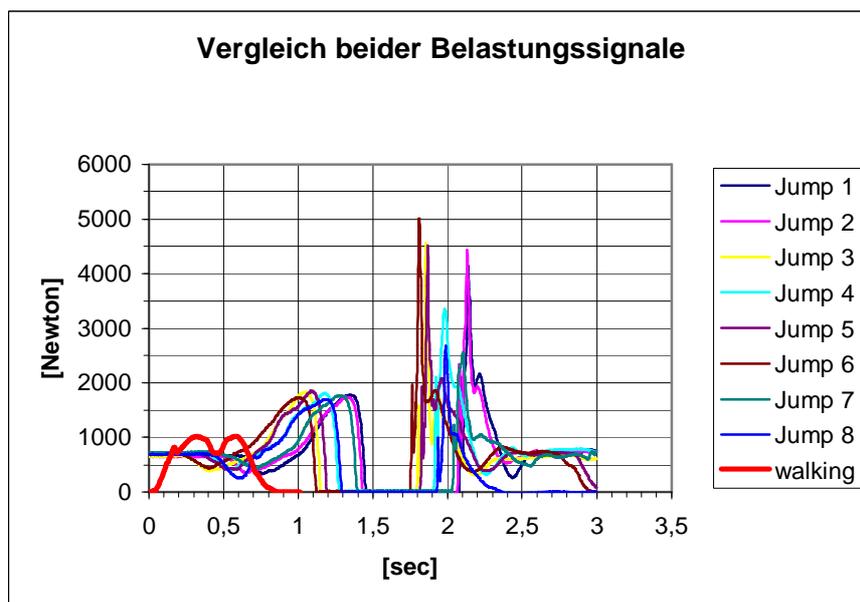
Abb. 21: Das „Jumping“-Signal in seinen jeweiligen Phasen



A: Fuss auf dem Boden; B: Schwungholen; C: Absprung; D: Flug in der Luft
E: Landung; F: Nachfedern

Dass sich die beiden Signale, was ihre Intensität und somit den möglichen Effekt auf den Knochen anbelangt, stark unterscheiden, soll folgende Abbildung verdeutlichen:

Abb. 22: Das „Walking“-Signal aufgetragen auf „Jumping“-Signale



Das rot dargestellte Signal zeigt die „Walking“-Sequenz, die Reihen 1 bis 8 entsprechen den „Jumping“-Sequenzen (*Uni Münster*). Aus dieser Abbildung wird ersichtlich, dass die in der „Jumping“-Sequenz auftretenden Kräfte weit über denen der „Walking“-Sequenz liegen.

Die beiden dargestellten Belastungssignale, aufgenommen als Kraft-Signale, wurden in das Zetos-System übertragen und werden dort als Kompression appliziert mit einer Amplitude, die $4000\mu\text{strain}$ entspricht. Sie werden täglich für eine Belastungsdauer von 10 Minuten bei einer Frequenz von 1Hz angewendet.

Bevor der PEA (Piezo Electrical Activator) die Belastung der Knochenexplantate beginnt, muss an die Proben manuell eine Vorlast angelegt werden. Diese Vorlast beträgt 30 Newton und ist nötig, um sämtliche Oberflächen innerhalb der Belastungskammer als auch zwischen Belastungskammer und PEA beziehungsweise Belastungskammer und Zetos-Rahmen in Kontakt zu bringen. Insgesamt handelt es sich um fünf Grenzflächen zwischen verschiedenen Körpern, die in gutem Kontakt zueinander stehen müssen:

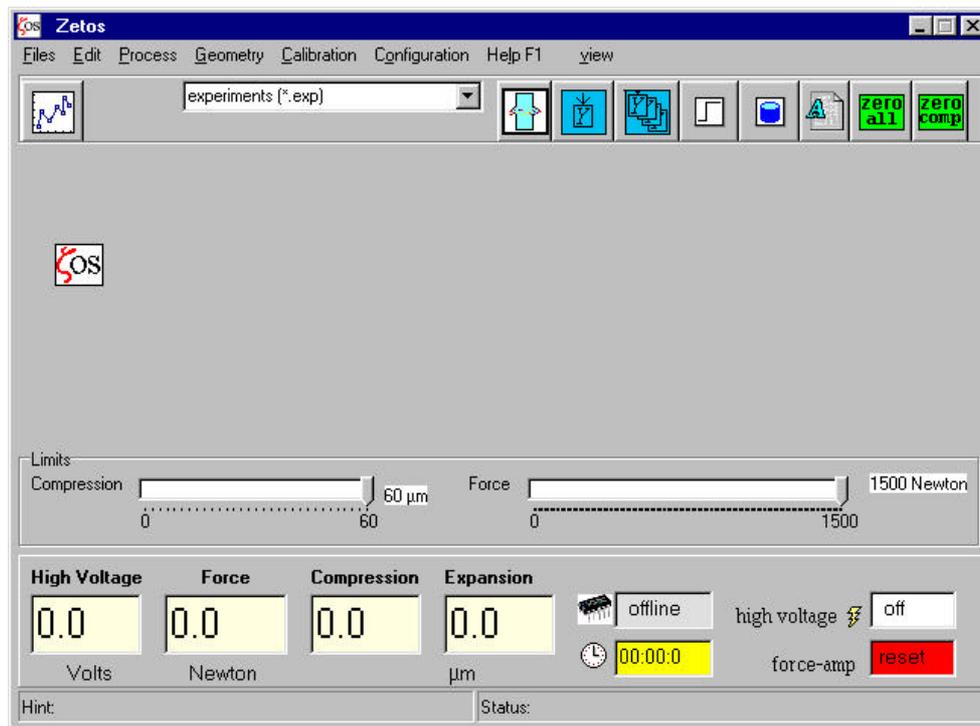
1. Kontakt zwischen PEA und Belastungspiston
2. Kontakt zwischen Belastungspiston und Knochenexplantat
3. Kontakt zwischen Knochenexplantat und Kammerboden
4. Kontakt zwischen Kammerboden und Zetos-Rahmen
5. Kontaktflächen der Gewindeschraube (zur Einstellung der Vorlast)

Die manuell eingestellte Vorlast dient somit zum einen dazu, vor der eigentlichen Belastung sämtliche Komponenten jeweils in maximalen Berührungskontakt zu bringen und somit die Reproduzierbarkeit der Belastungen als auch der Ergebnisse zu gewährleisten. Zum anderen weisen die Knochenexplantate eine raue Oberfläche auf. Diese raue Oberfläche (Unebenheiten bis max. $10\mu\text{m}$) besteht aus schwachem (weichem) und präparationsbedingt totem Knochenmaterial, dessen Einfluss auf die Belastungsergebnisse durch die angelegte Vorlast minimiert wird.

Die gesamte Belastungsprozedur wird über ein Windows[®]-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. 23: Die Windows-Benutzeroberfläche zur Steuerung des Zetos

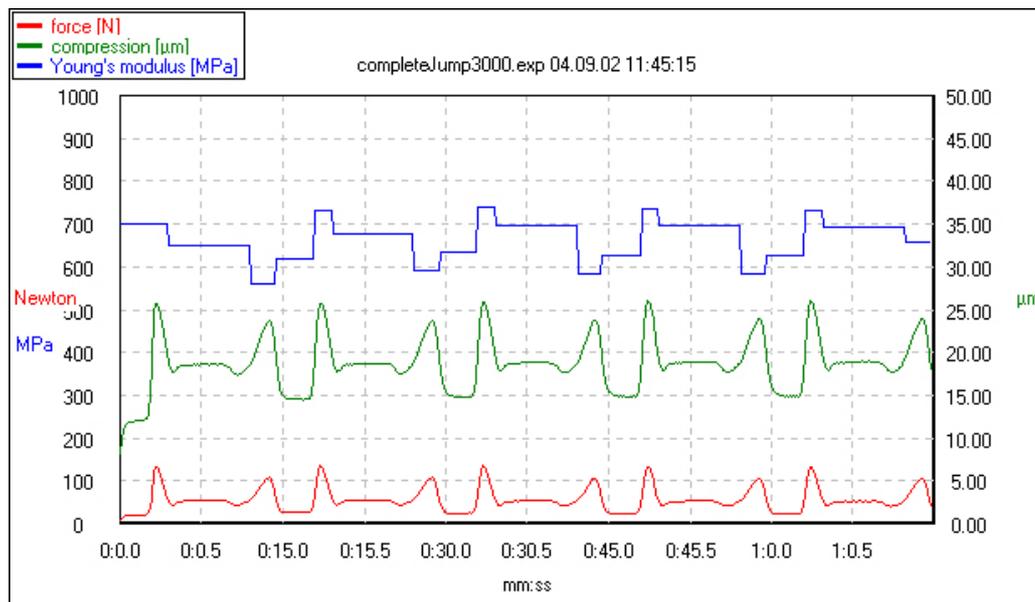


Für den gesamten Versuch ergeben sich $n = 23$ Belastungstage. Die Knochenexplantate werden somit 23 mal für jeweils 10 Minuten bei einer Frequenz von 1Hz je nach Belastungsgruppe mit der „Walking“- oder mit der „Jumping“-Sequenz belastet.

Während der ersten beiden Tage nach der Präparation werden die Proben nicht belastet. Sie gelten als Ruhephase.

Nach jeder Belastung erscheint auf dem Monitor folgendes Belastungsprotokoll:

Abb. 24: Belastungsprotokoll (hier für eine „Jumping“-Sequenz)



Das Belastungsprotokoll stellt zum einen die Belastungssequenz mit der daraus resultierenden Kompression graphisch dar, zum anderen werden die zur Kompression benötigte Kraft in Newton und die scheinbare Steifigkeit (Young`s Modulus / E-Modul) in Mega-Pascal aufgezeichnet.

Jeder dynamischen Explantatbelastung schliesst sich eine Messung der scheinbaren Steifigkeit der Probe an (Young`s Modulus/ E-Modul).

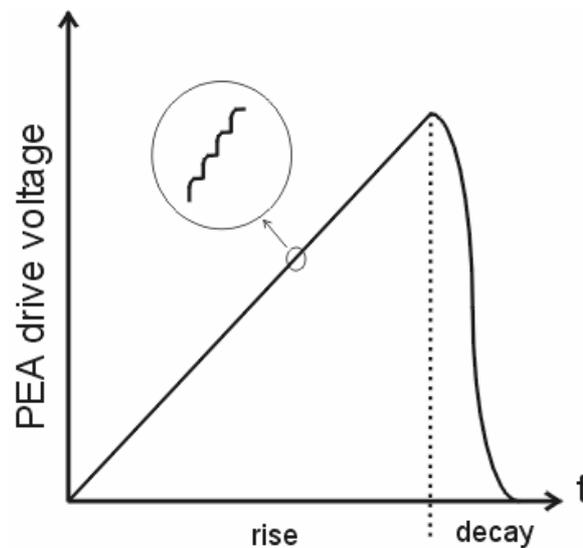
3.5 Die scheinbare Steifigkeit der Knochenexplantate / E-Modul

Unmittelbar nach der dynamischen Belastung der Knochenexplantate wird die scheinbare Steifigkeit jeder Probe bestimmt. Dieser Wert wird derart normalisiert, dass eine praktische Kenngröße entsteht, 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 quasi-statischen Messung wird zunächst, wie auch schon

in Kap. 3.4: Die Belastungssignale beschrieben, über die Gewindeschraube eine manuelle Vorlast von 30 Newton angelegt, um sämtliche Oberflächen in guten Kontakt zueinander zu bringen.

Der Verlauf der PEA-Treiberspannung bei quasi-statischer Messung stellt sich wie folgt dar:

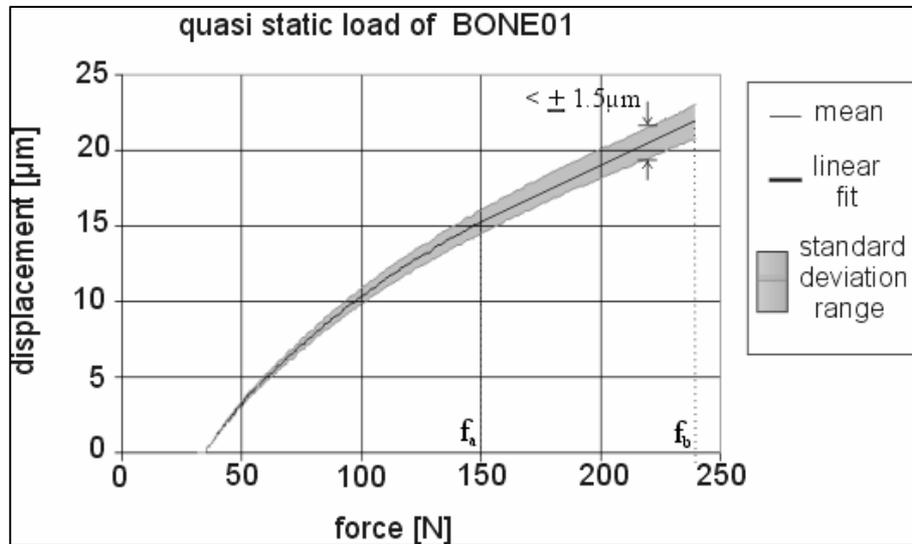
Abb. 25: Verlauf der PEA-Treiberspannung



Direkt proportional der 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. Diese Ausdehnung des PEA erreicht ihr Maximum bei einer Kompression des Explantates von 20 μm . Der Abfall erfolgt nicht abrupt, sondern innerhalb von 10 Sekunden in Form einer Kosinus-Flanke, um dynamische Stimulationen mit höheren Frequenzanteilen zu vermeiden. Während dieser Messung werden Daten von Kraft und Kompression laufend aufgezeichnet und gespeichert. Die scheinbare Steifigkeit wird danach als Regressionsgerade ausgedrückt, wobei für jedes Knochenexplantat immer das gleiche Teilintervall aus der Gesamtheit der Daten zur Auswertung verwendet wird. Die folgende Abbildung zeigt Ergebnisse einer quasi-statischen Messung, den Mittelwert und die Standardabweichung. Darüberhinaus ist das Kraftintervall (hier mit

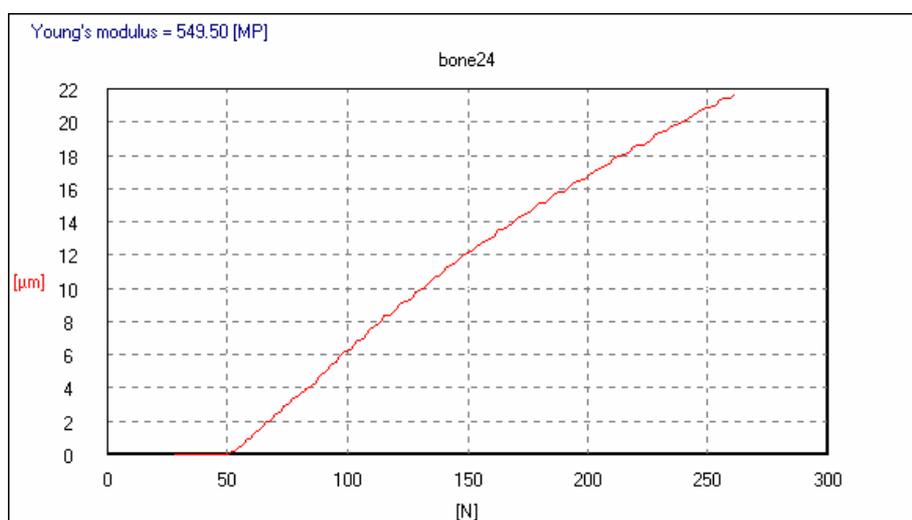
[f_a , f_b] bezeichnet, in welchem die Kurve linear verläuft. Dick hervorgehoben ist die Regressionsgerade, deren reziproke Steilheit direkt die scheinbare Steifigkeit darstellt.

Abb. 26: Quasi-statische Messungen zur Bestimmung der scheinbaren Steifigkeit



Im Anschluss an jede quasi-statische Messung erscheint auf dem Monitor folgendes Messprotokoll:

Abb. 27: Typisches Messergebnis einer quasi-statischen Messung zur Bestimmung der scheinbaren Steifigkeit



Für den gesamten Versuch ergeben sich somit $n = 23$ Messungen der scheinbaren Steifigkeit für jede Probe der Belastungsgruppen.

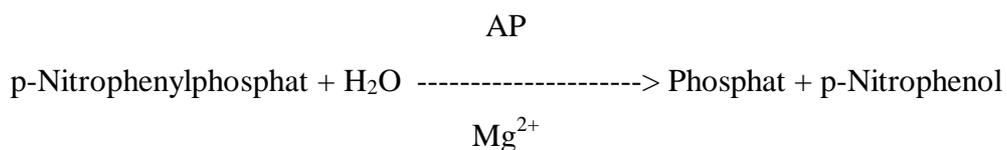
3.6 Die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase

Um Rückschlüsse auf die Knochenzellaktivität ziehen zu können, wird während unseres Versuches jeweils im Abstand von 72 Stunden (=Intervall des Mediumwechsels) die Alkalische Phosphatase (AP) bestimmt. Da während der ersten vier Tage nach Präparation das Medium täglich gewechselt werden muss, um präparationsbedingten Zelldetritus auszuwaschen, findet die erste Probenabnahme zur AP-Auswertung am fünften Belastungstag (= achter Versuchstag) statt. Somit ergeben sich für den gesamten Versuchszeitraum $n=7$ Messungen für jedes Knochenexplantat.

Aus dem verbrauchten Medium wird jeweils 1 ml Medium in 2 ml-Einhängegefäße (Firma Sarstedt) abpipettiert und anschliessend im Zentrallabor der Universität ausgewertet oder bis zur Auswertung bei -20°C tiefgefroren. Im Zentrallabor findet die Messung an einem Hitachi 917 statt.

Von BESSEY, LOWRY und BROCK wurde im Jahre 1946 die Bestimmung der Alkalischen Phosphatase mit p-Nitrophenylphosphat als Substrat und Glycin / NaOH als Puffer beschrieben. HAUSAMEN et al verbesserten die Bestimmung 1967 mit Einführung des Diäthanolamin-Puffers. Die vorliegende Methode entspricht der „Optimierten Standard-Methode“ nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie 1972.

Das Testprinzip entspricht einem Farbttest nach einer standardisierten Methode. Der Probe wird zunächst ein Puffer zugesetzt. Nach nochmaliger Zugabe eines Puffer-Substrat-Gemisches wird der Start der Reaktion induziert:



Das p-Nitrophenylphosphat wird in Gegenwart der Magnesiumionen durch Phosphatasen in Phosphat und p-Nitrophenol gespalten. Das dabei freigesetzte p-Nitrophenol ist proportional der AP -Aktivität und wird photometrisch gemessen.

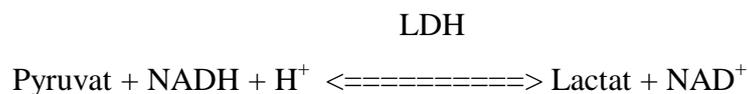
Bei jeder Messung wird als „Null-Probe“ nicht benutztes Medium verwendet. Nach der Messung wird die „Null-Probe“ von den Werten der einzelnen Knochenproben subtrahiert, um die tatsächliche Aktivität der AP in den Proben zu erhalten. In unserem Versuch sind die ermittelten AP-Werte wegen Mangels anderer AP-produzierender Zelllinien in unseren Proben der Knochen-AP gleichzusetzen.

3.7 Die Bestimmung der Laktatdehydrogenase

Die Abnahme der Proben zur Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH) verläuft analog der Bestimmung der Alkalischen Phosphatase.

WACKER et al beschrieben im Jahre 1956 eine Methode zur LDH-Bestimmung mit Lactat als Substrat und NAD als Coenzym. Die vorliegende Methode ist die „Optimierte Standard-Methode“ nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie aus dem Jahre 1972.

Das Testprinzip beruht auf einem UV-Test nach einer standardisierten Methode. Der Probe wird zunächst Puffer / Pyruvat zugegeben. Durch Zugabe von NADH wird die Reaktion gestartet.



Die Lactat-Dehydrogenase katalysiert die Umwandlung von Pyruvat zu Lactat. NADH wird dabei zu NAD oxidiert. Die Geschwindigkeit der NADH-Abnahme ist direkt proportional der LDH-Konzentration und wird photometrisch gemessen.

Auch bei der Messung der LDH wird als „Null-Probe“ nicht benutztes Medium verwendet und diese nach der Messung von den Werten der Knochenproben subtrahiert.

3.8 Aufarbeitung der Knochenzylinder nach Versuchsende

3.8.1 Fixation der Knochenpräparate

Nach Versuchsende werden die Knochenzylinder aus den Kultur- und Belastungskammern entnommen und in flüssigkeitsdurchlässige Kunststoffkästchen (Tissue-Tek Uni-Cassets, Firma Miles, Naperville, Irland) umgelagert. In diese Kästchen wird ein genau beschrifteter Zettel eingelegt, der die spätere Identifizierung der einzelnen Proben ermöglicht.

Die die Proben enthaltenden Kunststoffkästchen werden dann in ein mit 1,4% iger Paraformaldehyd-Lösung gefülltes Becherglas überführt. Dieses Becherglas wird unter ständiger Durchmischung mit einem Magnetrührer in einem Kühlschrank bei 4°C für 24 Stunden aufbewahrt.

Die 1,4% ige Paraformaldehydlösung setzt sich aus folgenden Bestandteilen zusammen:

- 35 ml 8% ige Paraformaldehyd-Stammlösung
- 65 ml Aqua bidest
- 100 ml 0,04 M Phosphatpuffer + 10% Sucrose
- pH wird auf 7,4 eingestellt

Die aufgeführten Bestandteile setzen sich wie folgt zusammen:

8% ige Paraformaldehyd-Stammlösung:

- 40 g Paraformaldehyd (Merck; Cat No: 4005)
- in 500 ml Aqua bidest lösen, aufwärmen und auf neutralen Punkt einstellen
- bei -20°C einfrieren

0,04 M Phosphatpuffer + 10% Sucrose (pH 7,4):

- 40 ml 1M Phosphat-Stammlösung
- 100 g Sucrose (Roth; Cat.No. 9097)
- 10 ml 10% NaN_3 -Solution
= 1g NaN_3 -Solution (Merck; Cat.No. 6544)
in 10 ml aqua bidest
- in 1000 ml Aqua bidest lösen
- auf pH 7,4 einstellen

1M Phosphatpuffer-Stammlösung:

- 112,5 g Na_2HPO_4 (Merck; Cat.No. 106586.0500)
- 30 g KH_2PO_4 (Roth; Cat.No. 39044.1)
- in 1000 ml aqua bidest lösen

Die Fixation wird anschliessend mit 0,04M Phosphatpuffer-Lösung + 10% Sucrose (siehe oben) beendet. Die Proben werden zweimal für jeweils 8 Stunden mit der Phosphatpufferlösung bei 4°C gewaschen. Anschliessend werden sie durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol entwässert.

Aufsteigende Alkoholreihe:

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.	Ethanol 100 %	1 Tag
6.	Xylol	1 Tag
7.	Xylol	1 Tag

3.8.2 Einbettung

Eine wichtige Voraussetzung der nicht-entkalkten Knochenhistologie ist die Kunststoffeinbettung. 1941 wurde von PUCKET das Metacrylat als Gewebereinbettmedium in die Histologie eingeführt. Das neue Einbettmedium setzte jedoch die Entwicklung besserer Mikrotome voraus mit denen das Schneiden der Kunststoffblöcke möglich werden sollte. Im Jahre 1949 wurde dieser Anforderung Rechnung getragen und das erste Sägemikrotom entwickelt.

Dennoch war es zunächst nur möglich, histologische Knochenschnitte mit einer Schnittdicke von mindestens 25 µm herzustellen. Erst die von HIRSCH und BOELLARD im Jahre 1958 entwickelte Methode des Zusatzes eines Weichmachers (Polyethylenglycol) zum Methylmetacrylat ermöglichte die Herstellung dünnerer Schnitte. Schnittdicken von weniger als 10 µm konnten jetzt erreicht werden. Auch die Anwendung normaler Mikrotome mit Hartstahlmessern statt der Sägemikrotome wurde erst durch den Weichmacherzusatz ermöglicht.

Die Einbettung der Knochenzylinder läuft in einer Abfolge mehrerer Schritte. Nach Beenden der aufsteigenden Alkoholreihe beziehungsweise dem Verbleib in Xylol als Intermedium, werden die Knochenzylinder in Technovit[®] 9100 New (Kulzer) eingebettet. Dazu muss die Technovit[®] 9100 Basis zunächst entstabilisiert werden. Eine Chromatographiesäule wird mit 50 g Aluminiumoxid gefüllt und anschliessend die Technovit[®] 9100 – Basislösung hindurchlaufen gelassen. Eine Chromatographiesäule dieser Art ist ausreichend für die Entstabilisierung von 3-4 Litern Basislösung. Die entstabilisierten Lösungen werden portioniert und in dunklen Schraubflaschen maximal vier Wochen bei 4°C gelagert, über längere Zeiträume bei -15 bis -20°C im Gefrierschrank.

Herstellung der Gebrauchslösungen aus den Technovit® 9100 N-Komponenten 1-5:

	1	2	3	4	5	
	Basislösung	PMMA-Pulver	Härter 1	Härter 2	Polymerisations-Regler	Lagerung
Preinfiltration	200 ml		1g			Raumtemperatur
Infiltration	ad 250 ml	20g	1g / 2g*			4°C
Stammlösung A	ad 500 ml	80g	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 besteht aus neun Volumenanteilen der Stammlösung A und einem Volumenanteil der Stammlösung B. Nachdem diese Lösung angesetzt wurde, sollte sie sofort verbraucht werden.

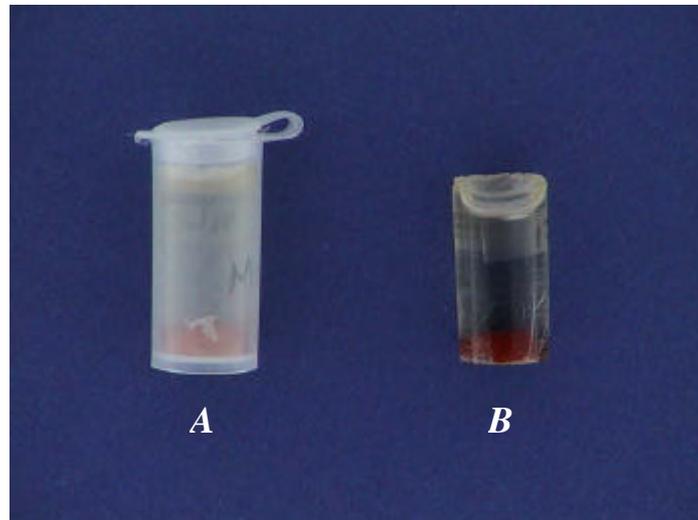
Die Knochenproben werden den Aufbewahrungskästchen entnommen und in Probenbehälter mit Deckel (2,5 ml / 5 ml; Fa. Kobe) senkrecht eingestellt. Anschliessend werden die Behälter bis zum Rand mit der Polymerisationslösung gefüllt und für 5 Minuten im Exsikkator bei 600 MBar evakuiert, um die eventuelle Bildung von Luftblasen im eingebetteten Präparat zu vermeiden. Die Kapseln werden dann mit einer Folie (Polyethylenfolie; Fa. Kulzer) und dem Deckel luftdicht verschlossen.

Die Polymerisationsphase findet in einem Gefrierschrank bei -8 bis -15°C statt. Die Dauer beträgt je nach erreichter Härte 12 – 48 Stunden.

Die auspolymerisierten Blöcke werden danach zunächst im Kühlschrank aufbewahrt und anschliessend an Raumtemperatur adaptiert.

Die Polymerisationsblöcke werden den Probenbehältern entnommen und können danach weiter bearbeitet werden.

Abb. 28: Eingebettete Präparate



A: eingebettete Probe in Einbettungsform; B: eingebettete Probe nach Entnahme aus Einbettungsform

3.8.3 Ponallbeschichtung der Objektträger

Um einen möglichst guten Halt der Präparate auf den Objektträgern zu gewährleisten, werden die Objektträger mit einer Ponallösung beschichtet. Diese Methode hat sich während vieler Versuche hinsichtlich der erzielten Ergebnis als sehr gut herausgestellt.

Folgende Materialien beziehungsweise Lösungen werden dafür benötigt:

- Objektträger (SuperFrost[®] Plus; Art.No. 041300)
- Ponallösung (Holzleim; Fa. Henkel, Verschluss schwarz/orange)
- Poly-L-Lysin-Lösung 0,1%ig (Sigma; Cat.No. P 8920)

Das Mischverhältnis ergibt sich wie folgt:

- 2 Volumenanteile Ponallösung (2% ig in Aqua dest)
- 1 Volumenanteil Poly-L-Lysin-Lösung (0,01% ig)

Die Objektträger werden für 10 min in einem Objektträgerständer stehend in die oben beschriebene Lösung gestellt. Danach lässt man sie abtropfen und bei Raumtemperatur für ca. 24h trocknen.

Die etwas milchige Oberfläche der getrockneten Objektträger sollte nicht irritieren, da diese spätestens nach der Entacrylierung der Schnitte wieder klar erscheint.

3.8.4 Anfertigen von Dünnschnitten

Da wir die Präparate in zwei unterschiedlichen Aushärteformen eingebettet haben, muss zunächst an den Präparaten, die in der grösseren Form ausgehärtet sind, der überschüssige Kunststoff mit einer Bandsäge abgetragen werden. Somit ergibt sich für das folgende Schneiden eine minimale Schnittfläche, wodurch die Abnutzung der Hartstahlmesser möglichst gering gehalten werden kann.

Die histologischen Dünnschnitte werden mit dem Hartschnittmikrotom „Polycut E“ der Firma Reichert-Jung[®] hergestellt. Auch die verwendeten Hartstahlmesser entstammen der Produktion der genannten Firma.

Das Hartstahlmesser wird jeweils in einem Winkel zwischen 0° und 1° zur Schnittebene in dem Mikrotomkopf fixiert. Die eingebetteten Präparate werden auf dem Schlitten des Mikrotoms so festgezogen, dass der Knochen mit der schmalen Seite auf das Messer zeigt. Das Präparat wird zunächst unter das Mikrotommesser gefahren und möglichst dicht an die Schnittkante des Messers angenähert. Da die Oberfläche der eingebetteten Präparate zum Teil sehr uneben ist, werden zunächst bei einer Schnittdicke von 15 µm die obersten Schichten des Präparates abgetrennt. Für diese Schnitte können verbrauchte Stellen des Messers benutzt werden, die aufgrund vorheriger Schneidevorgänge kleine Kerben aufweisen. Die Geschwindigkeit des Mikrotoms kann für diesen ersten Arbeitsschritt höher eingestellt werden, da diese Schnitte verworfen werden. Während des Schneidens müssen sowohl die Präparatoberfläche als auch das Messer des

Mikrotoms mit Schneideflüssigkeit benetzt sein, um ein möglichst reibungsloses Gleiten der Schnitte auf dem Messer zu erreichen und ein Einrollen der Präparate zu verhindern. Als Schneideflüssigkeit wird 30 % iger Alkohol benutzt, der mit einem feinen Borstenpinsel aufgetragen wird.

Nachdem die oberflächlichen Schichten des Präparates abgetragen sind und eine glatte Oberfläche entstanden ist, wird der Schlitten, auf dem die Präparate fixiert sind, an eine unbenutzte beziehungsweise wenig verbrauchte Stelle des Mikrotommessers verschoben. Die Schnittdicke wird jetzt auf 5 μm eingestellt und die Schneidegeschwindigkeit erheblich reduziert (circa fünf Schnitte pro Minute).

Die Präparatoberfläche und das Messer werden nochmals mit Schneideflüssigkeit benetzt und der Schneidevorgang begonnen. Die Schnitte werden mit einem feinen Pinsel auf die Messeroberfläche gezogen und zur Seite geschoben. Um ein Einrollen der Schnitte zu verhindern, müssen sie ständig feucht gehalten werden. Nachdem mehrere Schnitte angefertigt wurden, werden sie einzeln mit einer feinen Pinzette auf die ponalbeschichteten Objektträger aufgelegt und mit 60 %igem Alkohol gestreckt. Auf einen Objektträger werden jeweils zwei Schnitte aufgebracht.

Danach wird der alkoholnasse Objektträger mit einer Polyethylenfolie (Fa. Kulzer) bedeckt und mit Hilfe eines Tupfers der Alkohol zwischen Objektträger und Folie ausgestrichen. Je intensiver der Alkohol ausgestrichen wird, desto besser haften die Schnitte später am Objektträger.

Die Objektträger werden danach in eine Präparatepresse gespannt. Zwischen zwei Objektträger wird jeweils ein Streifen Löschpapier gelegt, der vorher auf Objektträgerformat zugeschnitten wurde. Die Präparatepressen werden fest zugezogen und in einem Brutschrank bei 50 °C getrocknet.

Nach 48 Stunden können die Pressen dem Brutschrank entnommen und auf Raumtemperatur abgekühlt lassen werden. Die Folien werden danach von den Präparaten abgezogen und die Objektträger bis zur späteren Entacrylierung archiviert. Werden die Folien auf den Objektträgern belassen, so können diese über einen längeren Zeitraum gelagert werden.

3.8.5 Entacrylierung

Bevor die Präparate gefärbt werden können, müssen sie entacryliert beziehungsweise entplastiniert werden. Eine histologische Färbung ohne vorheriges Entplasten kann unsererseits nicht empfohlen werden, da die Ergebnisse im Vergleich zur Färbung entplasteter Schnitte unbefriedigend waren.

Nachdem die Entacrylierung durchgeführt wurde, müssen die Präparate gefärbt und abschliessend versiegelt werden. Werden die Präparate hingegen zur fluoreszenzmikroskopischen Auswertung genutzt, werden sie nur versiegelt.

Durchführung der Entacrylierung:

1.	2-Methoxyethylacetat	20 min
2.	2-Methoxyethylacetat	20 min
3.	2-Methoxyethylacetat	20 min
4.	100 %iges Äthanol	3 min
5.	96 %iges Äthanol	3 min
6.	80 %iges Äthanol	3 min
7.	70 %iges Äthanol	3 min
8.	50 %iges Äthanol	3 min
9.	Aqua dest.	3 min
10.	Aqua dest.	3 min

Alternativ zur absteigenden Alkoholreihe (Schritte 4 bis 8), die der Rehydrierung der Präparate dient, können die Präparate auch zweimal für jeweils 5 Minuten in Aceton eingestellt werden.

Das verwendete 2-Methoxyethylacetat dient der Entplastinierung der Präparate und wird als gebrauchsfertige Lösung von der Firma Merck vertrieben. Wie bereits erwähnt, führt die absteigende Alkoholreihe zur Rehydrierung der Präparate und bereitet diese auf die wässrigen Färbelösungen vor. Auch das zweimalige Spülen in Aqua dest. verbessert die Hydratisierung der Präparate.

3.8.6 Die Färbung der Dünnschnitte

3.8.6.1 Die Trichromfärbung nach Goldner

Die Masson–Goldner–Färbung ist eine von mehreren verschiedenen Trichromfärbungen, die heute eine der Standardfärbungen für die Knochenmorphometrie darstellt. Sie ist charakterisiert durch gute Zellanfärbung und farblich klar unterscheidbare Darstellung mineralisierter und nicht-mineralisierter Knochenmatrix.

In den angefärbten Präparaten stellen sich mineralisiertes Knochengewebe und Kollagen leuchtend grün dar. Das Osteoid erscheint rot, Zellkerne blau-schwarz und das Zytoplasma rötlich-braun.

Herstellen der Färbelösungen:

Weigerts Eisenhämatoxylin

Stammlösung: Hämatoxylinlösung

- 1 g Hämatoxylin
- 100 ml 96% iges Äthanol

Das Hämatoxylin wird im Äthanol gelöst und muss etwa eine Woche reifen bevor es zur Anwendung geeignet ist. Das Äthanol kann zum Lösen des Hämatoxylins erwärmt werden.

Stammlösung: Eisenchloridlösung

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

Das Eisen(III)chlorid wird im Aqua dest. gelöst. Anschliessend wird die Salzsäure zugesetzt.

Färbelösung:

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

Säurefuchsin-Ponceau

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

Das Ponceau de Xylidine und Säurefuchsin werden in Aqua dest. gelöst und Eisessig zugesetzt.

Phosphormolybdänsäure-Orange G

- 3-4 g Phosphormolybdänsäure
- 100 ml Aqua dest.
- 2 g Orange G

Die Phosphormolybdänsäure wird im Aqua dest. gelöst und das Orange G zugesetzt.

Lichtgrün

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

Das Lichtgrün wird im Aqua dest. gelöst und der Eisessig zugesetzt.

Färbevorschrift:

- | | | |
|----|------------------------------------|-----------|
| 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	
8.	Differenzieren in Phosphormolybdänsäure – Orange G	7 min
9.	Abspülen mit 1% iger Essigsäure	
10.	Gegenfärben mit Lichtgrün	15 min
11.	Auswaschen mit 1% iger Essigsäure	
12.	Aufsteigende Alkoholreihe	
13.	Xylol als Intermedium	2x 5 min
14.	Eindecken mit Entellan	

Abb. 29: Übersichtsaufnahme in der Trichrom-Färbung nach Goldner

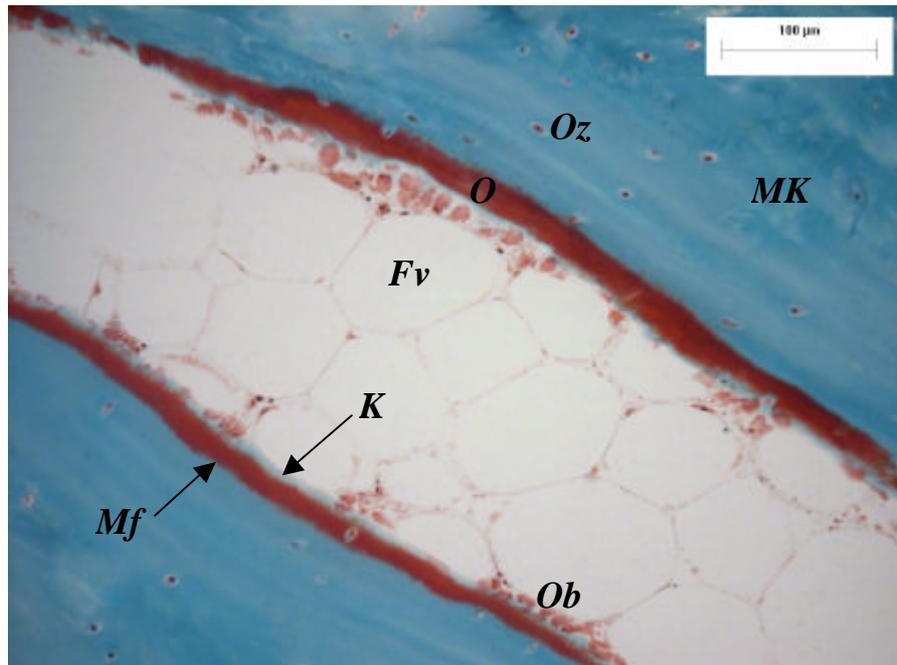
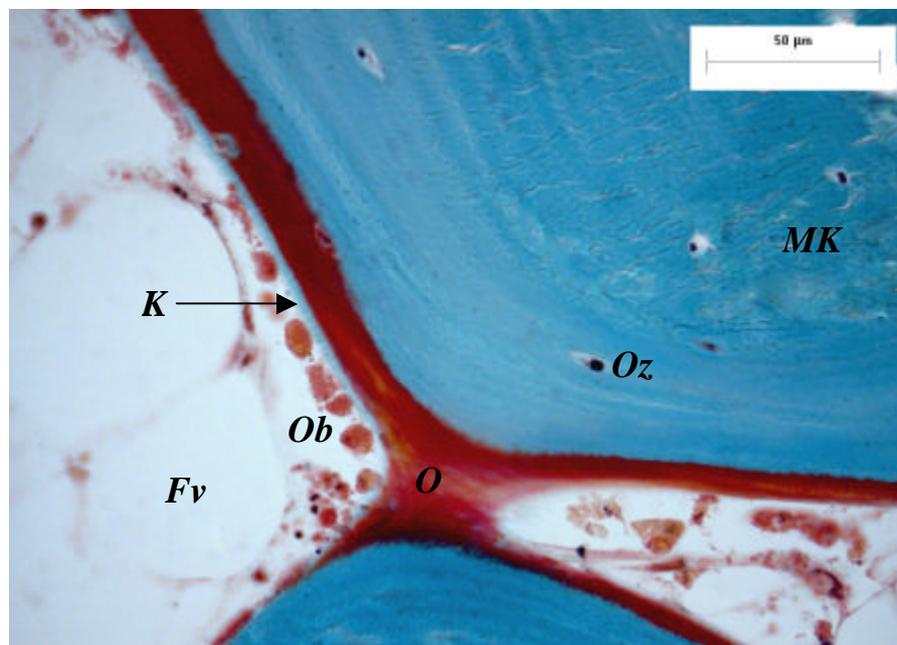


Abb. 30: Zwei verschmelzende Knochen trabekel



(MK) Mineralisierter Knochen; (O) Osteoid; (Mf) Mineralisationsfront
(K) Kollagen; (Oz) Osteozyt; (Ob) Osteoblast; (Fv) Fettvakuole

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 der Weichbeziehungsweise 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 dest.

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

Färbevorschrift:

1.	Entplaten in 2-Methoxyethylacetat	3x 20 min
2.	Absteigende Alkoholreihe	
3.	Spülen in Aqua dest.	2x 3 min
4.	Einstellen in die Giemsa-Lösung	30 min
5.	Differenzieren in 0,1% iger Essigsäure	kurz
6.	Differenzieren in 70% igem Äthanol	kurz
7.	Differenzieren in 96% igem Äthanol	kurz
8.	Xylol als Intermedium	2x 5 min
9.	Eindecken mit Entellan	

Abb. 31: Übersichtsaufnahme in der Giemsa-Färbung

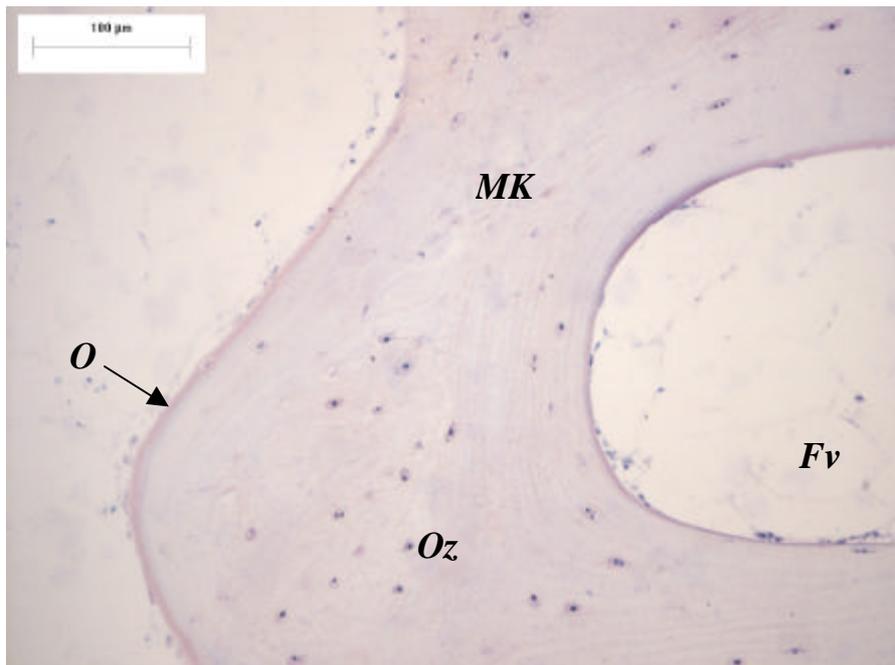
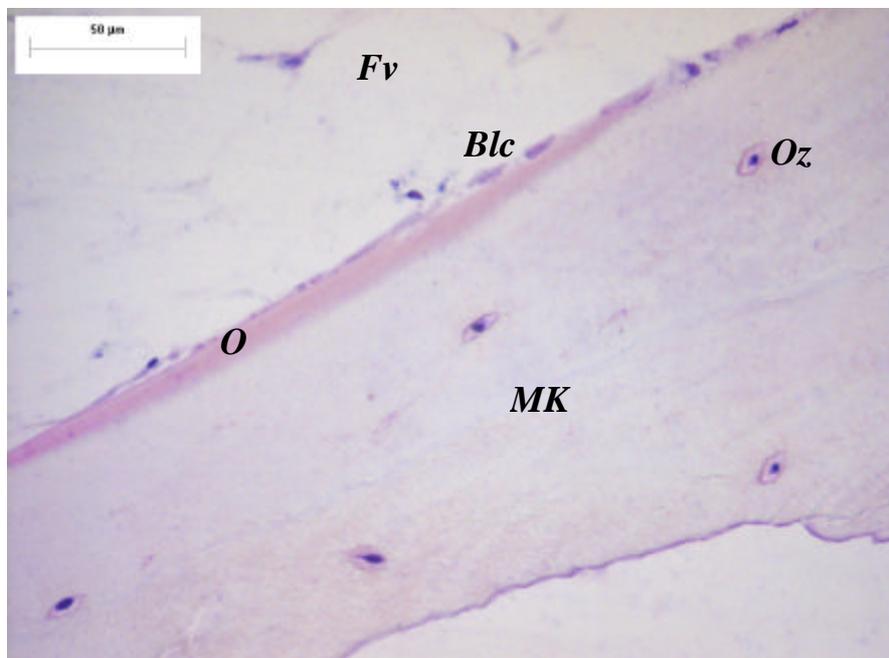


Abb. 32: Knochentrabekel in der Giemsa-Färbung



(MK) Mineralisierter Knochen; (O) Osteoid; (Oz) Osteozyt
(Blc) Bone Lining Zellen; (Fv) Fettvakuole

3.8.6.3 Die Toluidin O – Färbung

Obwohl für die Toluidin O – Färbung nur ein Farbstoff benötigt wird, zeichnet sie sich durch eine sehr gute Gewebsdifferenzierung aufgrund metachromatischer Effekte aus. Durch anschließende Differenzierung in 70 % igem und abschliessend in absolutem Äthanol können diese metachromatischen Farbeffekte aufgrund unterschiedlich starker Entfärbung der einzelnen Gewebearten nochmals intensiviert werden. Somit werden trotz sehr einfacher Durchführbarkeit sehr gute Ergebnisse erzielt.

Unter mikroskopischer Betrachtung stellt sich mineralisiertes Hartgewebe ungefärbt dar, Zellen und Weichgewebe in verschiedenen Blautönen. Die Knorpelmatrix sowie Mastzellgranula imponieren metachromatisch rot-violett, verkalkte Knorpelmatrix dunkelblau. REVELL [87] konnte zeigen, dass die Mineralisationsgrenze in Form einer gekörnten violetten Linie erscheint.

Herstellen der Färbelösung:

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

Mit Hilfe eines Magnetrührers werden Toluidinblau O und Natriumkarbonat in 100 ml Aqua dest. gelöst. Die entstandene Lösung muss vor Gebrauch zweimal filtriert werden.

Färbevorschrift:

1.	Entplasten in 2-Methoxyethylacetat	3x 20 min
2.	Aceton	2x 5 min
3.	Spülen in Aqua dest.	2x 3 min
4.	Toluidin O – Lösung	10 min
5.	Spülen in Aqua dest.	
6.	Differenzieren in 70% igem Äthanol	kurz
7.	Differenzieren in absolutem Äthanol	kurz

- | | | |
|----|-----------------------|----------|
| 8. | Xylol als Intermedium | 2x 5 min |
| 9. | Eindecken in Entellan | |

Abb. 33: Knochentrabekel in der Toluidin O – Färbung

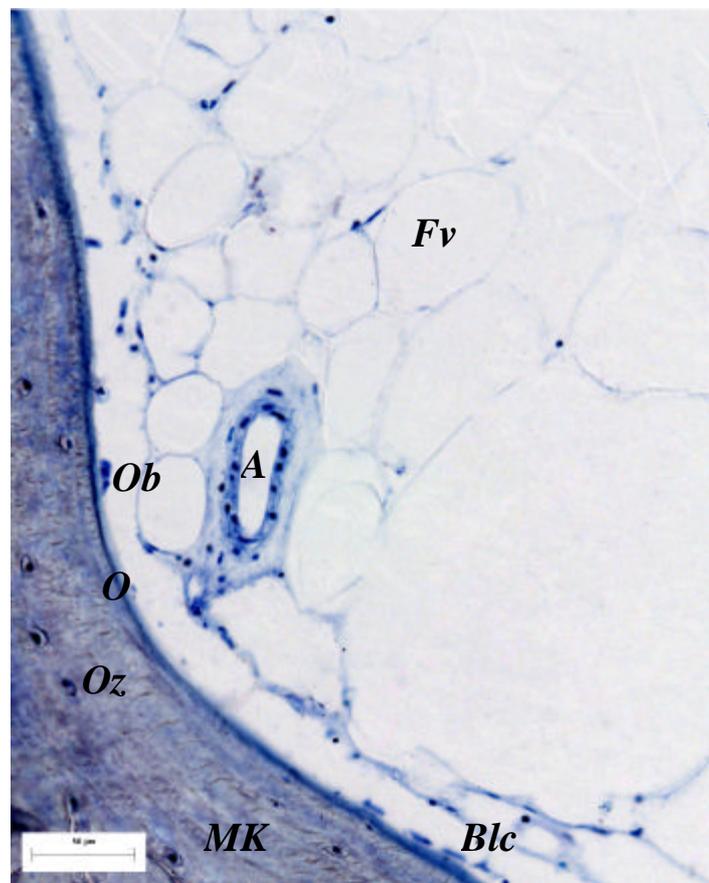
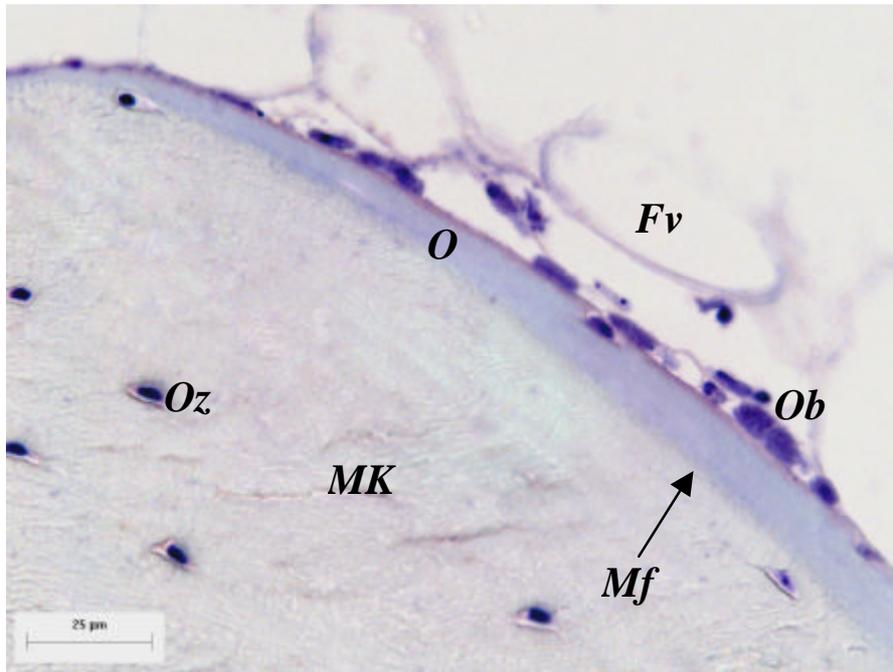


Abb. 34: Knochentrabekel in der Toluidin O – Färbung



*(MK) Mineralisierter Knochen; (O) Osteoid; (Mf) Mineralisationsfront
(Oz) Osteozyt; (Ob) Osteoblast; (Blc) Bone Lining Zellen
(Fv) Fettvakuole; (A) Arterie*

3.8.6.4 Die modifizierte v. Kossa-Versilberung nach Krutsay

Im Jahre 1963 wurde die ursprüngliche Kossa-Versilberung von KRUTSAY modifiziert und wird seitdem auch für kunstharzeingebettete Hartmikrotomschnitte empfohlen. Zudem ist sie auch für Dünnschliffpräparate anwendbar. Die Versilberung beruht auf einem Ionenaustausch, der selektiv alle mineralisierten vor allem aber kalziumphosphathaltigen Gewebeanteile feststellt, was zu äusserst kontrastreichen Darstellungen führt. Jedoch werden strukturelle Unterschiede wie lamelläre oder geflechtartige Kollagenfibrillenarrangements überdeckt.

Besonders geeignet ist die von Kossa-Färbung für die automatische Bildanalyse hinsichtlich histomorphometrischer Auswertungen an verkalkter Substanz.

Das mineralisierte Knorpel- beziehungsweise Knochengewebe wird schwarz dargestellt, Mineralisationsfronten heben sich schwarz-granuliert hervor. Unter Verwendung verschiedener Gegenfärbungen ist es zudem möglich, Osteoidsäume, Zellen und Weichgewebe sehr kontrastreich hervorzuheben.

In unserer histologischen Auswertung fand die Gegenfärbung mit Farbstoffen der Trichrom-Goldner-Färbung Anwendung. Mit dieser stellen sich Osteoid rot, Zellkerne blauschwarz und Zytoplasma rötlich-braun dar.

Die Färbelösungen setzen sich wie folgt zusammen:

5% ige Silbernitrat-Lösung

- 5 g Silbernitrat
- 100 ml Aqua dest

Das Silbernitrat wird in Aqua dest gelöst und die fertige Lösung lichtgeschützt aufbewahrt.

Natriumkarbonat-Formaldehyd-Lösung

- 10 g Natriumkarbonat
- 50 ml 37% ige Formaldehydlösung (wasserfrei)
- 150 ml Aqua dest.

Das Natriumkarbonat wird in Aqua dest. gelöst und die Formaldehydlösung zugesetzt.

Natriumthiosulfatlösung

- 7 g Natriumthiosulfat
- 133 ml Aqua dest.

Das Natriumthiosulfat wird in Aqua dest. 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.

Färbevorschrift:

1.	Entplasten in 2-Methoxyethylacetat	3x 20 min
2.	Spülen in Aceton	2x
3.	Spülen in Aqua dest.	2x 3 min
4.	Einstellen in die Silbernitratlösung	30 min
5.	Spülen in Aqua dest.	3x
6.	Reduzieren in Natriumkarbonat-Formaldehyd	8 min
7.	Spülen in Aqua dest.	10 min
8.	Fixieren in Natriumthiosulfat	5 min
9.	Spülen in Leitungswasser	15 min

Gegenfärbung mit Kernechtrot:

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	

Gegenfärbung mit Farbstoffen der Trichrom-Goldner-Färbung:

10.	Weigerts Eisenhämatoxylin	10 min
11.	Bläuen in Leitungswasser	10 min
12.	Färben in Säurefuchsin-Ponceau	7 min
13.	Abspülen mit 1% iger Essigsäure	
14.	Differenzieren in Phosphormolybdänsäure-Orange G	7 min
15.	Abspülen mit 1% iger Essigsäure	
16.	Aufsteigende Alkoholreihe	
17.	Xylol als Intermedium	2x 5 min
18.	Eindecken mit Entellan	

Abb. 35: Knochen trabekel in der v.Kossa-Färbung und Gegenfärbung mit Trichrom-Goldner-Farbstoffen

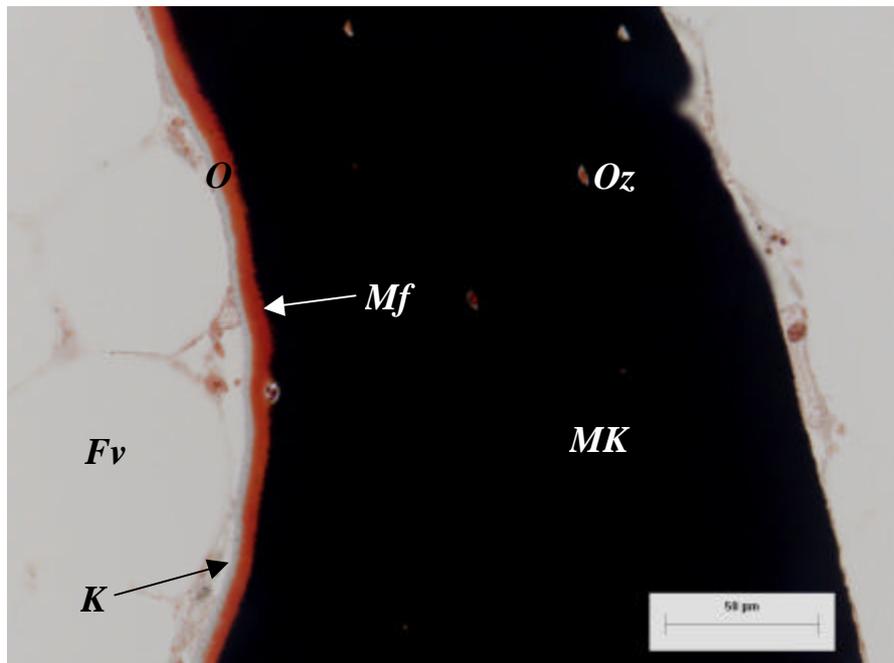
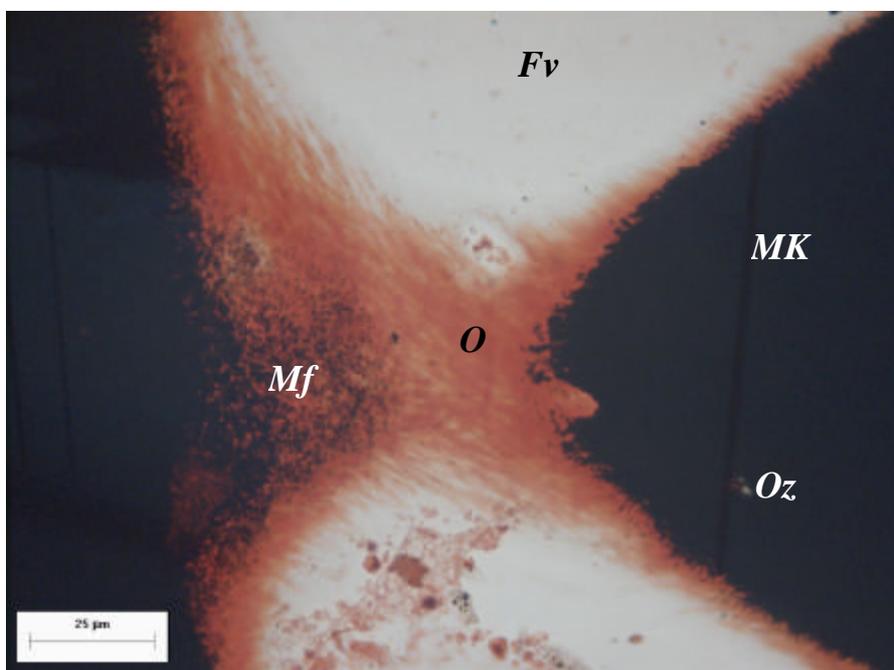


Abb. 36: Zwei verschmelzende Knochen trabekel



(MK) Mineralisierter Knochen; (O) Osteoid; (Mf) Mineralisationsfront
(K) Kollagen; (Oz) Osteozyt; (Fv) Fettvakuole

3.8.6.5 Die Doppelfärbung nach Hämalan-Eosin (H&E)

Die Doppelfärbung nach Hämalan-Eosin ist eine in der Routine häufig angewendete Färbung, die sich durch eine einfache und schnelle Durchführbarkeit auszeichnet.

Im Vergleich zu den vorher aufgeführten Färbetechniken weißt sie jedoch nur eine geringe Differenzierbarkeit der einzelnen Gewebearten auf. So werden Zellkerne blau, alle übrigen Gewebearten in unterschiedlichen Rottönen beziehungsweise Rotabstufungen dargestellt.

Herstellen der Färbelösungen:

Hämalan

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

Das Hämatoxylin, Natriumjodat und Aluminiumkaliumsulfat werden über Nacht in Aqua dest. gelöst. Am folgenden Tag werden Chloralhydrat und Zitronensäure hinzugefügt. Diese Lösung muss 5 Minuten aufgeköcht und anschliessend filtriert werden.

Eosin

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

Das Certstain Eosin G wird in Äthanol gelöst und die Färbelösung vor Gebrauch mit Eisessig etwas angesäuert.

Färbevorschrift:

1.	Entplasten in 2-Methoxyethylacetat	3x 20 min
2.	Absteigende Alkoholreihe	
3.	Spülen in Aqua dest.	2x 3 min
4.	Einstellen in Hämalan	30 min
5.	Bläuen in Leitungswasser	10 min
6.	Einstellen in Eosin	5 min
7.	Spülen in Wasser	
8.	Aufsteigende Alkoholreihe	
9.	Xylol als Intermedium	2x 5 min
10.	Eindecken mit Entellan	

Abb. 37: Übersichtsaufnahme in der H&E-Doppelfärbung

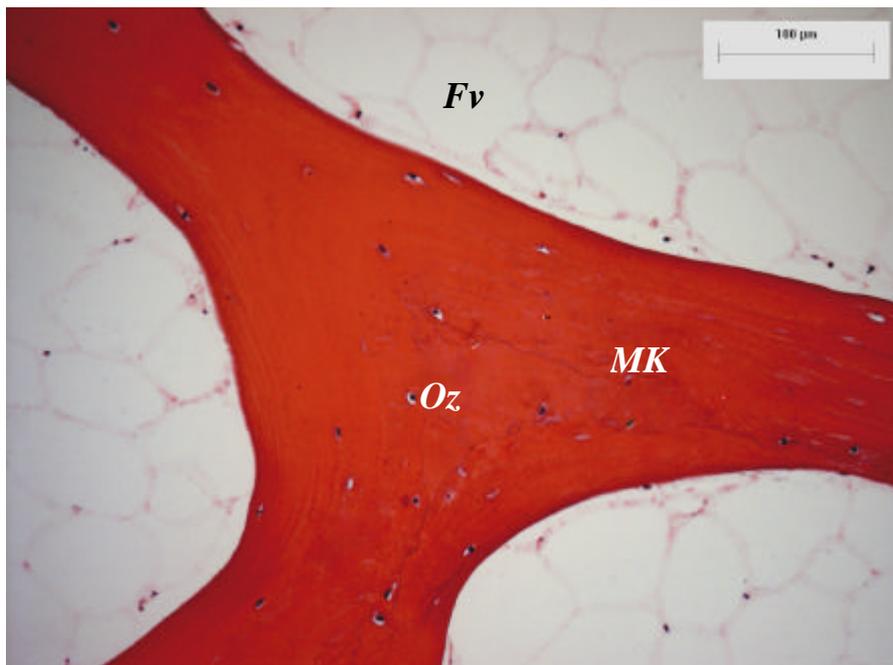
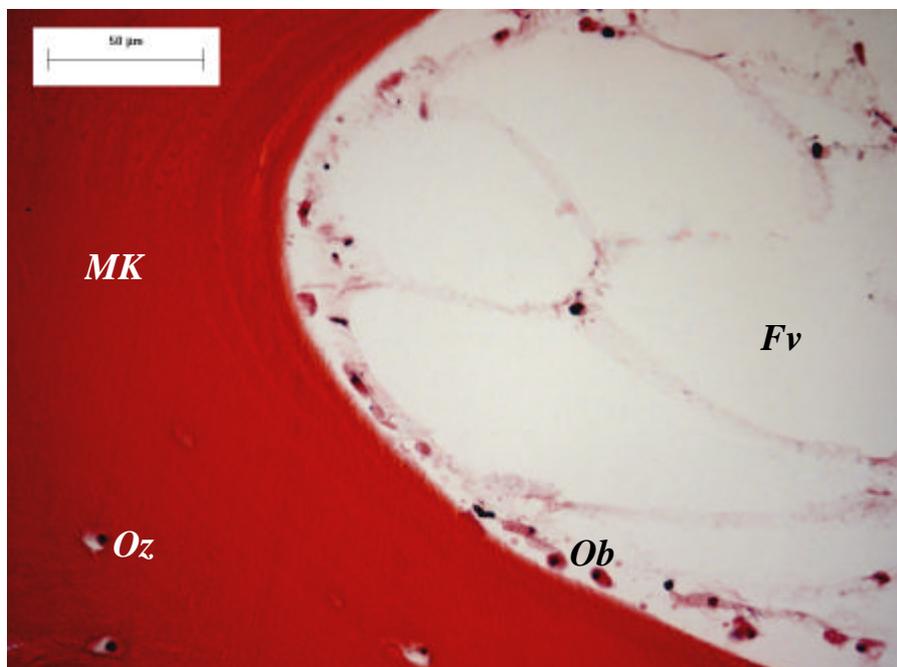


Abb. 38: Trabekeloberfläche in der H&E-Doppelfärbung



(MK) Mineralisierter Knochen; (Oz) Osteozyt; (Ob) Osteoblast
(Fv) Fettvakuole

3.8.6.6 Die Färbung mit Alcianblau-PAS

Die Alcianblau-PAS Färbung ermöglicht die gleichzeitige Darstellung neutraler Polysaccharide und saurer Glykosaminoglykane, ohne jedoch zwischen beiden genau differenzieren zu können.

In den angefärbten Präparaten stellen sich Zellkerne blau, Mastzellgranula und saure Glykosaminoglykane blaugrün, Osteoid und Knorpelmatrix blassrosa, mineralisiertes Hartgewebe blassrötlich, sowie Glykogen und Glykoproteine dunkel purpurrot dar.

Herstellen der Färbelösung:

Alcianblaulösung

- 1 g Alcianblau
- 100 ml 3%ige Essigsäure

Das Alcianblau wird in Essigsäure gelöst.

0,5%ige Perjodsäure

- 10 ml 0,2M Natriumazetatlösung
- 0,8 g Perjodsäure
- 20 ml Aqua dest.
- 70 ml absolutes Äthanol

Um 0,2%ige Natriumazetatlösung zu erhalten, werden 0,272g Natriumazetat in 10 ml Aqua dest. gelöst. Die Perjodsäure wird in Aqua dest. gelöst und im Anschluss die Natriumazetatlösung hinzugegeben. Anschliessend wird diese Lösung mit Äthanol gemischt. Die Färbelösungen sollten lichtgeschützt in einer braunen Glasflasche aufbewahrt werden. Bei einer Braunfärbung der Lösung muss diese verworfen werden.

Schiff`sches Reagenz

Stammlösung I

- 5 g Pararosanilin
- 150 ml 1N Salzsäure

Das Pararosanilin wird in der Salzsäure gelöst.

Stammlösung II

- 5 g Natriumdisulfit
- 850 ml Aqua dest.

Das Natriumdisulfit wird in Aqua dest. gelöst.

Färbelösung

Die Färbelösung besteht aus einem Gemisch der beiden Stammlösungen im Verhältnis 50:50 und wird für 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschliessend werden 3g Aktivkohle hinzugegeben. Die Lösung wird vor der abschliessenden Filtration für 2 Minuten geschüttelt.

Hämalaun

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

Das Hämatoxylin, Natriumjodat und Aluminiumkaliumsulfat werden über Nacht im Aqua dest. gelöst. Am folgenden Tag werden das Chloralhydrat und die Zitronensäure zugesetzt. Diese Lösung wird aufgeköcht und abschliessend filtriert.

Färbeanleitung:

1.	Entplasten in 2-Methoxyethylacetat	3x 20 min
2.	Absteigende Alkoholreihe	
3.	Spülen in Aqua dest.	2x 3 min
4.	Einstellen in 3%ige Essigsäure	3 min
5.	Einstellen in Alcianblaulösung	2 h
6.	Spülen mit Leitungswasser	5 min
7.	Einstellen in Perjodsäure	30 min
8.	Spülen mit Leitungswasser	5 min
9.	Einstellen in Schiff'sches Reagenz	45 min
10.	Spülen mit Leitungswasser	10 min
11.	Einstellen in Hämalaun	10 min
12.	Bläuen in Leitungswasser	10 min
13.	Aufsteigende Alkoholreihe	
14.	Xylol als Intermedium	2x 5 min
15.	Eindecken mit Entellan	

Abb. 39: Osteozyten mit eingelagertem Glykogen

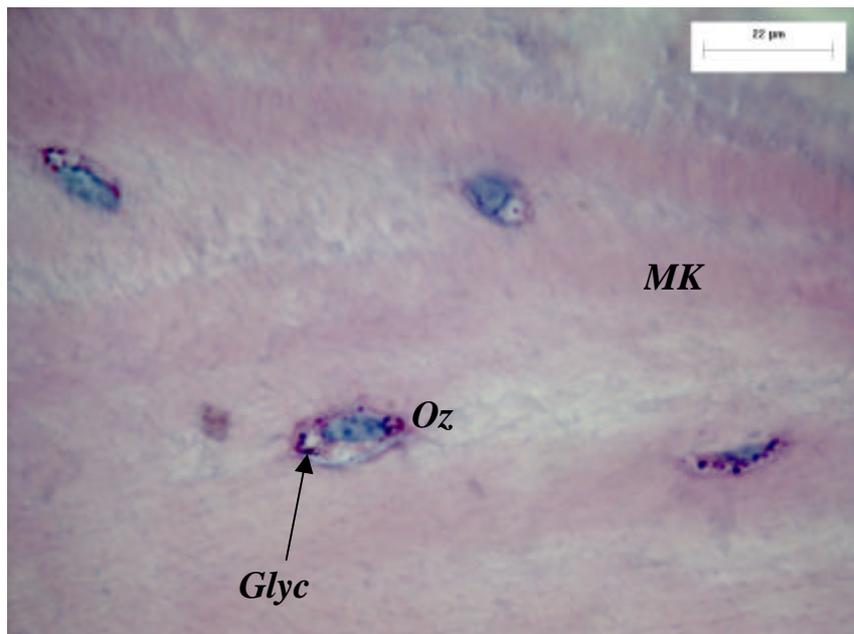


Abb. 40: Osteoklast in Howship-Lakune



(MK) Mineralisierter Knochen; (Oz) Osteozyt; (Ob) Osteoblast
(Ok) Osteoklast in (HL) Howship-Lakune; (Glyc) Glykogen

3.8.6.7 Enzymhistochemie: Alkalische und Saure Phosphatase

Mit Hilfe dieser enzymatischen Färbung wird es möglich, die Enzymaktivitäten der Alkalischen und der Sauren Phosphatase im Präparat darzustellen. Alkalische Phosphatase, die charakteristisch für Osteoblasten ist, stellt sich im Präparat blau dar. Die Saure Phosphatase, durch deren Aktivität Osteoklasten charakterisiert sind, wird rötlich dargestellt. Zellkerne imponieren durch die Gegenfärbung mit Methylgrün leuchtend grün.

Herstellen der Färbelösungen:

1M Tris-Stammlösung

- 121,14 g Tris (Sigma, Cat.No. T1503)
- ad. 1000 ml Aqua dest.

Das Tris wird im Aqua dest. gelöst.

0,1M Tris-Puffer (pH 9,4)

- 100 ml 1M Tris-Stammlösung
- ad. 1000 ml Aqua dest.

100ml der 1M Tris-Stammlösung werden in 1000ml Aqua dest. gelöst. Anschliessend wird der pH auf 9,4 eingestellt.

2M Natriumacetat-Stammlösung

- 74,13 g Natriumacetat (Roth, Cat.No. 6773.1)
- 5,5 ml Eisessig (Merck, Cat.No. 1.00063)
- ad. 500 ml Aqua dest.

Das Natriumacetat und das Eisessig werden im Aqua dest gelöst.

0,1M Natriumacetatpuffer (pH 5,6)

- 50 ml 2M Natriumacetat-Stammlösung
- ad. 1000 ml Aqua dest.

Das Natriumacetat wird im Aqua dest. gelöst. Der pH wird auf 5,6 eingestellt.

Reaktionslösung: Alkalische Phosphatase

- 50 ml 0,1M Tris-Puffer (pH 9,4)
- 50 mg Echtblau Salz (Sigma, Cat.No. F8761)
- 25 mg Naphthol-AS-BI-Phosphat (Sigma, Cat.No. N-2250) gelöst in 0,5ml DMSO/Triton X 100

Reaktionslösung: Saure Phosphatase

- 50 ml 0,1M Natriumacetat-Puffer (pH 5,6)
- 500 µl Hexonium-Pararosanilin (Merck; Cat.No. 1.07509); 250µl 4% Pararosanilin in 2N HCL + 250 µl 4% Natriumnitrit (Merck; Cat.No. 6544) in Aqua dest.; 1min vortexen, 5 min reagieren lassen
- 25 mg Naphthol-AS-BI-Phosphat (gelöst in 0,5ml DMSO/Triton X 100)

Gepufferte 4%-ige Formalinlösung

- 100 ml 37%-iges Formol (Merck; Cat.No. 1.04002)
- 4 g NaH₂PO₄ · H₂O (Merck; Cat.No. 6346)
- 6,5 g Na₂HPO₄ (Merck; Cat.No. 6586)
- ad. 1000 ml Aqua dest.

Der pH-Wert der gepufferten 4%-igen Formalinlösung wird auf 7,0 eingestellt.

Methylgrün

- 0,5 g Methylgrün (Merck; Cat.No. 1.15944)
- ad. 100 ml Aqua dest.
- 25 ml Äthanol absolut

Das Methylgrün wird im Aqua dest. gelöst. Anschliessend wird das Äthanol zugesetzt und der pH-Wert auf 4,5 eingestellt.

Färbeanleitung:

1.	Spülen in 0,1M Tris-Puffer	10 min / RT
2.	Inkubation in Reaktionslösung I	2 h / 37°C
3.	Spülen in Aqua dest.	
4.	Spülen in 0,1M Acetat-Puffer	10 min / RT
5.	Inkubation in Reaktionslösung II	1 h / 37°C
6.	Spülen in Aqua dest.	
7.	Nachfixieren in 4% Formalin	2-3 h / RT
8.	Spülen in Leitungswasser	
9.	Gegenfärbung mit Methylgrün	10 min
10.	Spülen in Leitungswasser	
11.	Eindecken mit Kaisers Glyceringelatine (Merck; Cat.No. 109242)	

Abb. 41: Osteoklasten in der Sauren Phosphatase-Darstellung

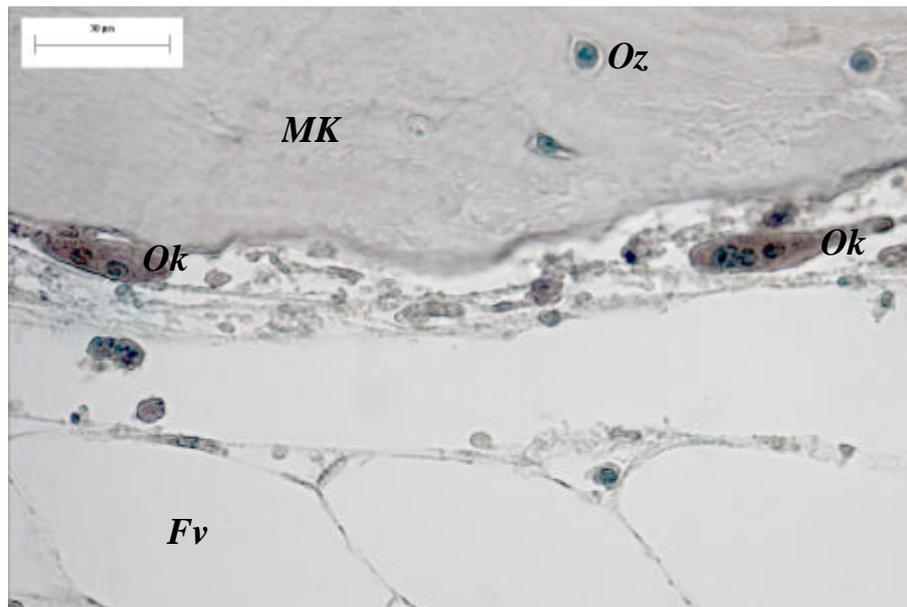
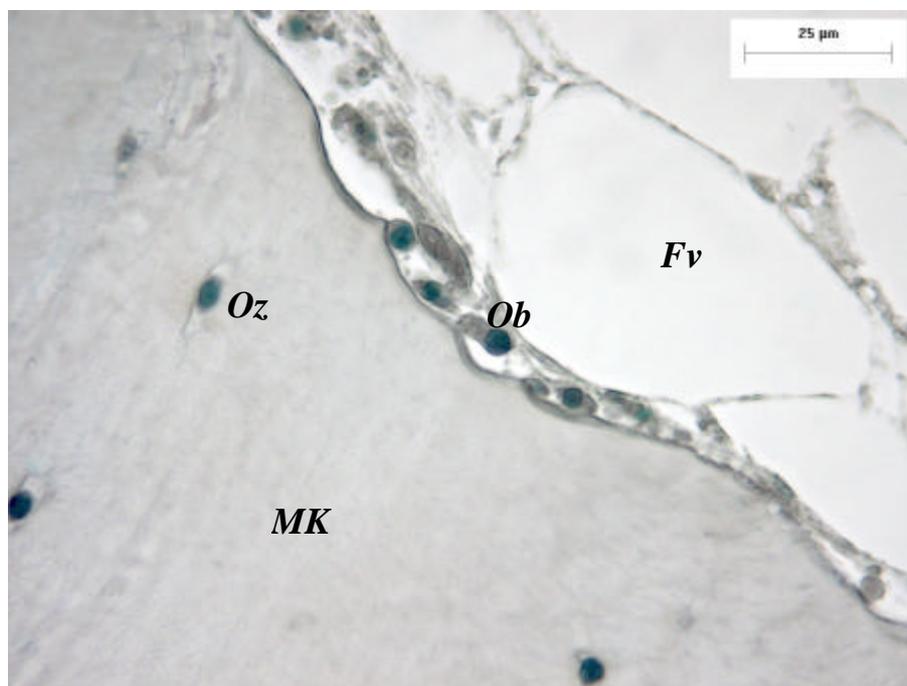


Abb.42: Osteoblasten, deren Alkalische Phosphatase nicht mehr nachweisbar ist



(MK) Mineralisierter Knochen; (Ob) Osteoblasten; (Oz) Osteozyten
(Ok) Osteoklasten; (Fv) Fettvakuole

3.8.7 Die polychrome Sequenzmarkierung

Um Rückschlüsse auf die dynamischen Umbauprozesse in den Knochenexplantaten ziehen zu können, werden die Proben während des Versuches zweifach mit Fluochromen markiert. Die erste Markierung findet am 11. Belastungstag mit Calcein statt, einem sich grün darstellenden Farbstoff.

Herstellen der Calcein-Färbelösung

Stammlösung

- 50 mg Calcein (Sigma; Cat.No. C-0875)
- 75 ml NaCl 0,9 %ig (BRAUN; 1476A95)

Das Calcein wird im NaCl gelöst.

Gebrauchslösung

30 µg Stammlösung / ml Medium

Konzentration der Perfusionslösung

360 µl Calcein-Gebrauchslösung in 8ml Medium (ohne FCS)

Das zweite Mal wird am 20. Belastungstag markiert. Bei dieser Markierung kommt Alizarin zum Einsatz, welches im Unterschied zum Calcein rot anfärbt.

Herstellen der Alizarin-Färbelösung

Stammlösung

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

Das Alizarin wird in NaCl gelöst. Anschliessend wird der pH-Wert auf 6,9 eingestellt und die Lösung steril filtriert.

Gebrauchslösung

45 µg Stammlösung / ml Medium

Konzentration der Perfusionslösung

90 µl Alizarin-Gebrauchslösung in 5,9ml Medium (ohne FCS)

Die Kultur- und Belastungskammern werden unmittelbar nach der dynamischen Belastung der Knochenexplantate und Bestimmung deren E-Moduls mit dem den Fluoreszenzfarbstoff enthaltenden Medium (ohne FCS) verbunden. Die Knochenproben werden 2,5 Stunden mit diesem Medium versorgt. Nach diesem Vorgang werden die Kammern zweimal für jeweils 45 Minuten mit DMEM-Medium (ohne FCS) gespült und anschliessend wieder mit DMEM-Medium (mit FCS) verbunden.

Abb. 43: Alizarinbande mit aufgelagertem Osteoid

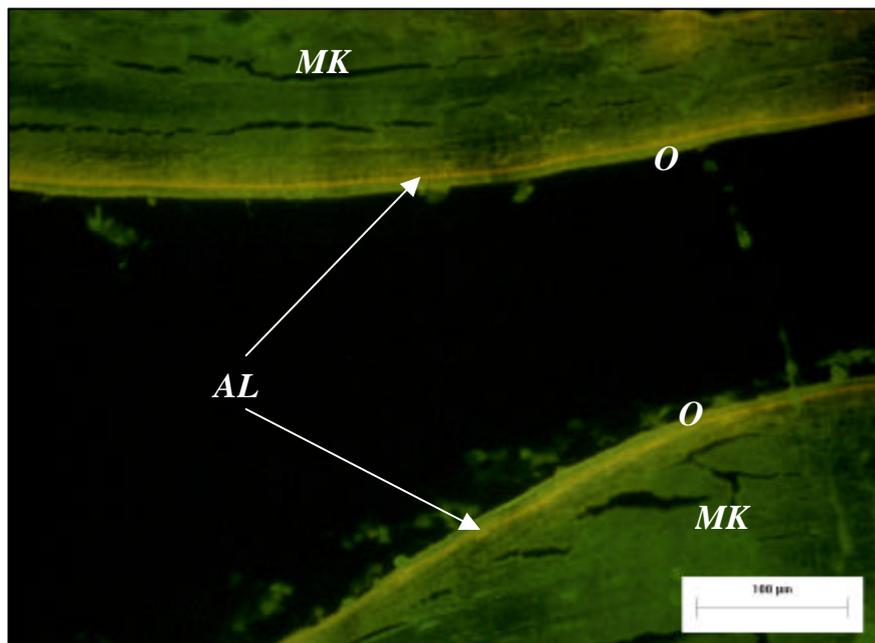
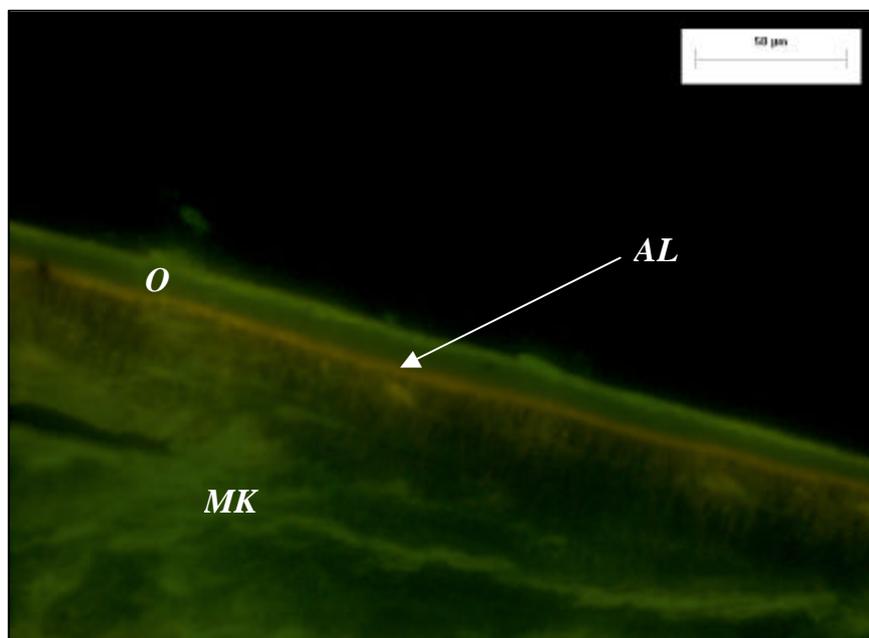


Abb. 44: Alizarinbande mit aufgelagertem Osteoid



(MK) Mineralisierter Knochen; (AL) Alizarinbande mit aufgelagertem (O) Osteoid

3.8.8 Immunhistochemie: Detektion apoptotischer Osteozyten

Zur Darstellung apoptotischer Osteozyten wird der ApopTag *In Situ Oligo Ligation (ISOL) Kit* der Firma Intergen[®] Company verwendet.

Der ApopTag ISOL Kit basiert auf der biochemischen Spezifität der T4 DNA-Ligase. Dieses Enzym bindet kovalent an exakt komplementäre Enden eines Paares doppelsträngiger DNA-Moleküle. Die zu verbindenden Enden sind dabei das der genomischen DNA der Probe und das der synthetischen, biotinidierten Oligonukleotide des ISOL-Kits. Die Detektion dieser gebundenen DNA-Abschnitte erfolgt anschliessend durch zusätzliche Anbindung eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugates. Peroxidase wiederum begünstigt die Anlagerung des Substrates Diaminobenzadin (DAB), das lichtmikroskopisch sichtbar wird.

Die T4 DNA-Ligase kann spezifisch DNase1-typische Enden, die nur bei Aktivierung Apoptose-spezifischer Endonukleasen entstehen, mit biotinmarkierten Oligonukleotiden verbinden. Somit wird auch die gute Differenzierbarkeit zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen beziehungsweise anderweitig geschädigten Zellen gewährleistet.

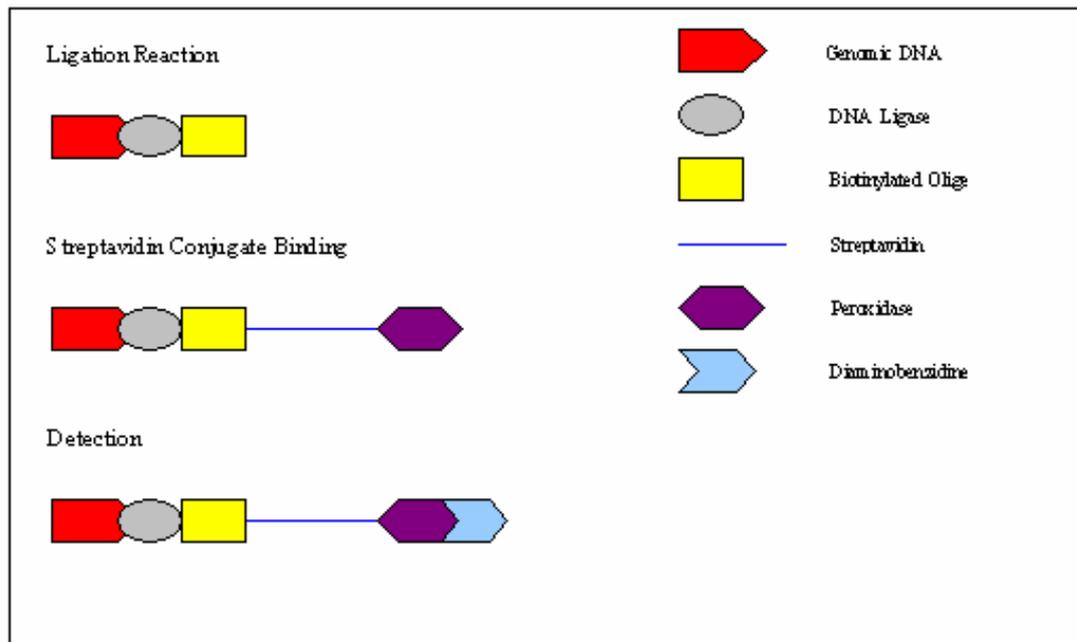
Der ApopTag ISOL Kit verhindert somit die zufällige Markierung zerstörter DNA besser als die TUNEL-Methode, die falsch-positive Ergebnisse und Hintergründe verursachen kann.

Vitale Osteozyten stellen sich blau bis violett dar, wohingegen in Apoptose begriffene Zellen braun imponieren.

Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wird ebenfalls ein Rattendarmpräparat gefärbt, von dem sowohl bekannt ist, dass es viele apoptotische Zellen enthält, als auch wie sich diese darstellen.

Es muss jedoch bemerkt werden, dass hier nur eine von mehreren möglichen Methoden zur Darstellung apoptotischer Zellen untersucht und dargestellt werden soll.

Abb. 45: Detektion apoptotischer Zellen mit dem ApopTag ISOL-Kit



Anwendung des ApopTag In Situ Oligo Ligation Kit:

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 30 min
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 T₄ DNA-Ligase Enzym vermischt.

Bei der Negativ-Kontrolle wird statt der T₄ 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 Stunden
14.	Spülen mit PBS	
15.	Waschen mit Aqua dest.	3x 10 min

Streptavidin-Peroxidase (60 µl / Objektglas)

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

Peroxidase Substrat (75 µl / Objektglas)

73,5 µl Diaminobenzidin (DAB) Verdünnungs-Puffer werden mit 1,75 µl DAB Substrat vermischt.

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

Gegenfärbung mit Häkalaun (Herstellung der Häkalaun-Lösung siehe *Kap.3.9.6.5*)

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

Abb. 46: Vitale Osteozyten nach Anwendung des ApopTag ISOL Kit

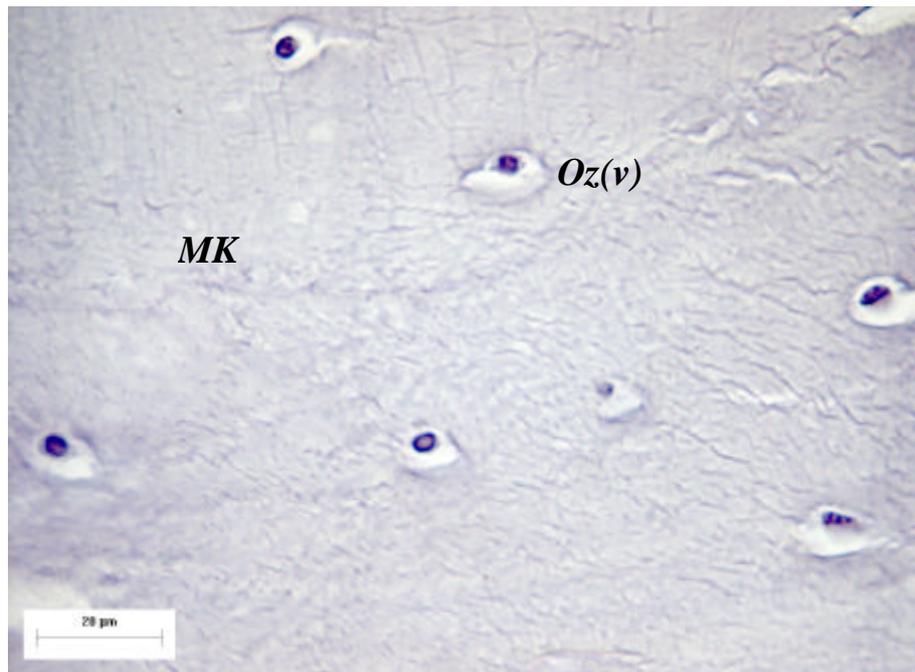


Abb. 47: Apoptotische Osteozyten

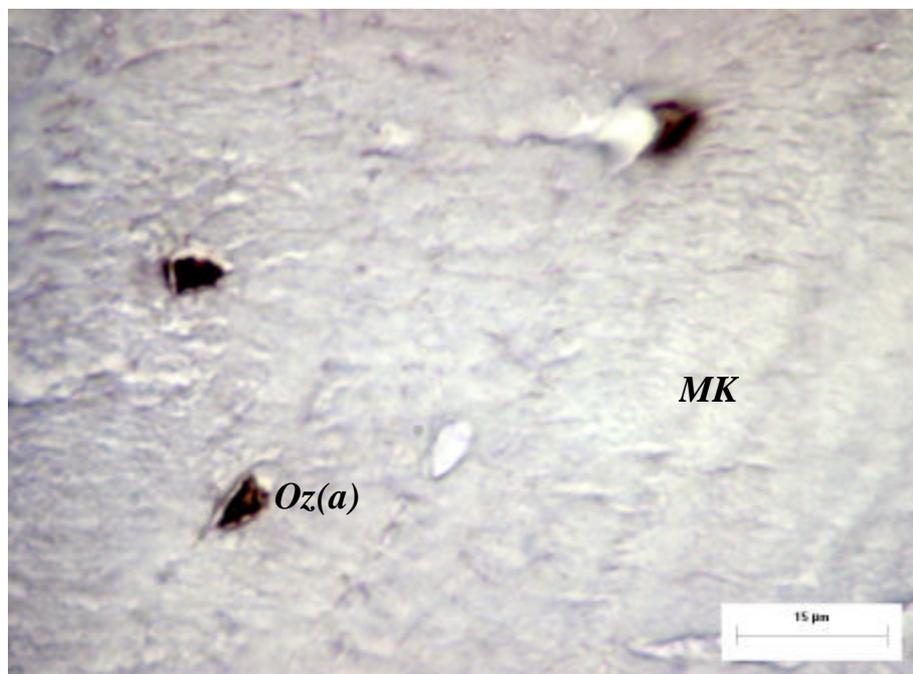
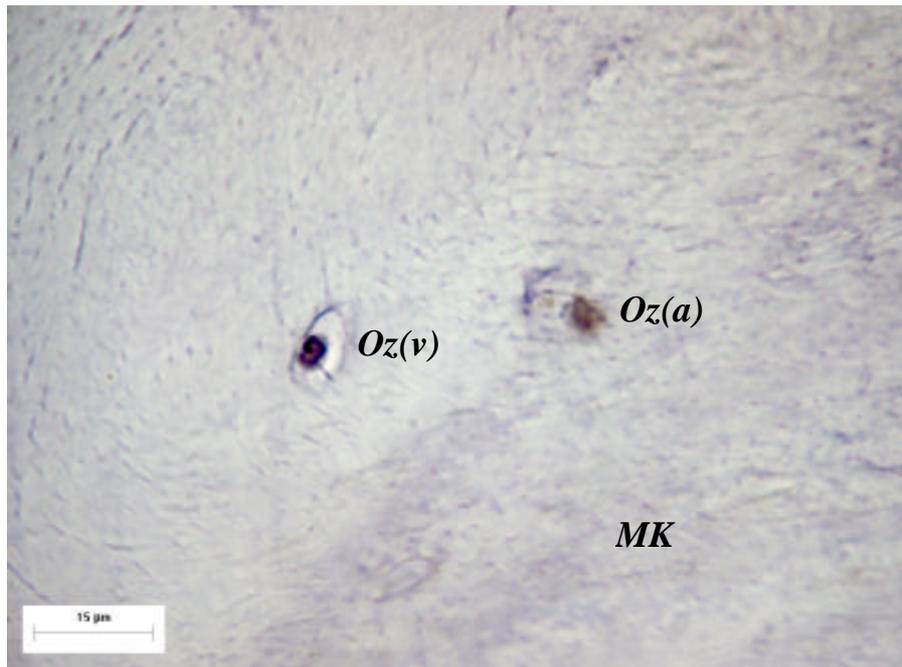


Abb. 48: Gegenüberstellung vitaler und apoptotischer Osteozyten



*(MK) Mineralisierter Knochen; (Oz(v)) vitale Osteozyten
(Oz(a)) apoptotische Osteozyten*

3.8.9 Das Eindecken der Präparate

Nach der Durchführung der verschiedenen Färbetechniken werden die Präparate eingedeckt. Als Eindeckmittel verwenden wir Entellan[®] neu (Merck; Cat.No. 107961). Dieses Eindeckmittel kann für alle entwässerten, mikroskopischen Präparate verwendet werden und ermöglicht stabile Farben über mehrere Jahre.

Am Ende einer jeden Färbereihe werden die Präparate direkt dem Xylol entnommen und unter dem Abzug eingedeckt. Dazu wird auf die Deckgläser mit Hilfe eines Glasstabes ein Tropfen Entellan aufgebracht. Das Deckglas wird dem Präparat am oberen Ende aufgesetzt und unter langsamer Absenkung ausgestrichen. Der Zwischenraum zwischen Präparat und Deckglas muss vollständig mit Entellan ausgefüllt sein. Überschüssiges Eindeckmittel kann mit einem xylolfeuchten Lappen entfernt werden. Nach anschließender Trocknung können die Präparate mikroskopiert werden.

3.9 Materialverzeichnis

Herstellung der Knochenpräparate

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
- NaHCO₃ (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
- NaHCO₃ (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
- Natrium Hydrogen Carbonat; MERCK, Cat.No. 6329
- β -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
- NaN_3 -Solution; MERCK, Cat.No. 6544
- Na_2HPO_4 ; MERCK, Cat.No. 106586.0500
- KH_2PO_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, SUNDO
- 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
- Lichtgrün

Giemsa-Färbung

- Giemsa-Lösung

Toluidin O-Färbung

- Toluidin O
- Natriumkarbonat

Kossa-Versilberung nach Krutsay

- 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
- Natriumacetat
- 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
- NaH_2PO_4 ; MERCK, Cat.No. 6346
- Na_2HPO_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 vorgelegten Ergebnisse wurde vom Institut für Medizinische Biometrie und Statistik der Philipps-Universität Marburg durchgeführt. Als Programm wurde SAS Release 8.0 verwendet. Alle Ergebnisse werden als Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardabweichungen dargestellt.

Zur statistischen Analyse der Effekte der Belastung über die Zeit hinsichtlich der Entwicklung des E-Moduls als auch der hier bestimmten Enzyme, der Laktatdehydrogenase und der Alkalischen Phosphatase, wurde ein allgemeines lineares, gemischtes Modell für Beobachtungen mit Messwiederholungen für unbalancierte Daten zugrundegelegt [138]. Dabei wurden die Belastungen und die Zeit als feste Effekte betrachtet. Da für dieses Modell normalverteilte Daten vorausgesetzt werden, wurde zunächst eine Logarithmustransformation der Werte durchgeführt, die zu einer Annäherung an die Normalverteilung führt. Zum statistischen Vergleich der jeweiligen Gruppen wurden lineare Kontraste berechnet.

Zur statistischen Auswertung der Osteoidmessungen wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse mit einem Faktor mit drei Belastungsstufen durchgeführt [138]. Auch hier wurden, um einer Normalverteilung der Daten gerecht zu werden, sämtliche Ergebnisse zunächst logarithmiert.

Hinsichtlich der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0.05$ zugrunde gelegt, sodass Ergebnisse mit $p = 0.05$ als statistisch signifikant gewertet wurden. Zudem wird jeweils der tatsächliche p-Wert angegeben.

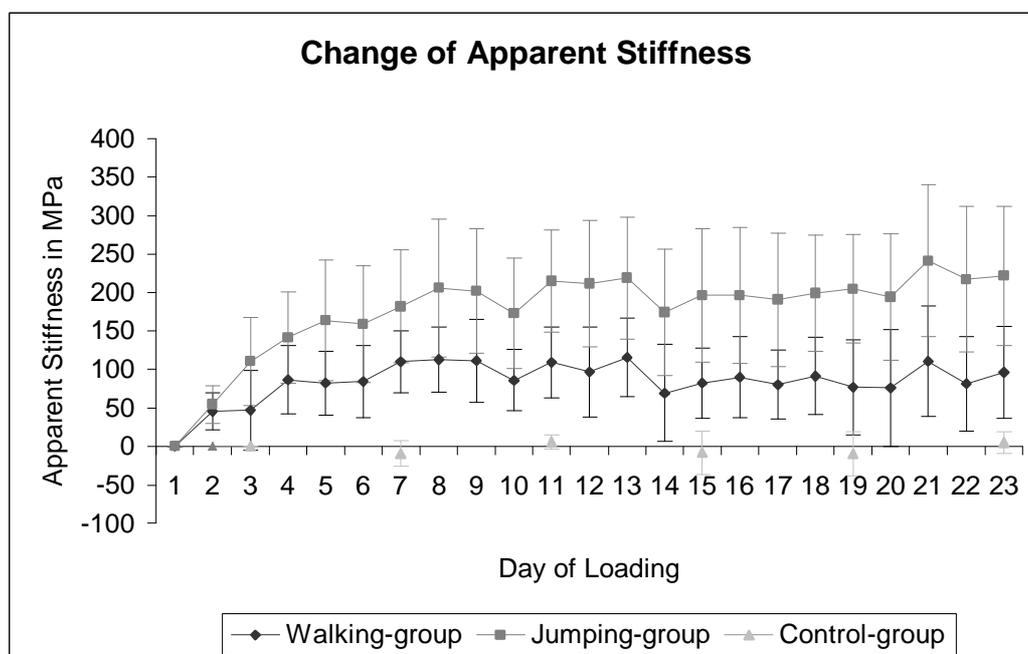
4 Auswertung und Ergebnisse

4.1 Die scheinbare Steifigkeit der Knochenexplantate (E-Modul)

An jedem Belastungstag wurde unmittelbar nach der dynamischen Stimulation einer jeden Probe der Belastungsgruppen deren scheinbare Steifigkeit bzw. E-Modul bestimmt. Während der 23 Belastungstage ergeben sich somit für jede belastete Probe $n=23$ Messungen. Die Proben der Kontrollgruppe wurden nach jeweils vier Tagen (96 Stunden) auf ihre scheinbare Steifigkeit hin untersucht, womit für diese Gruppe $n=6$ Bestimmungen je Probe zur Auswertung vorliegen.

Die folgende Abbildung stellt die Veränderung der gemittelten scheinbaren Steifigkeit der einzelnen Gruppen über den Versuchszeitraum betrachtet dar.

Abb.49: Arithmetische Mittel ($n=23$) der Veränderung der scheinbaren Steifigkeit in den Gruppen und deren Standardabweichungen

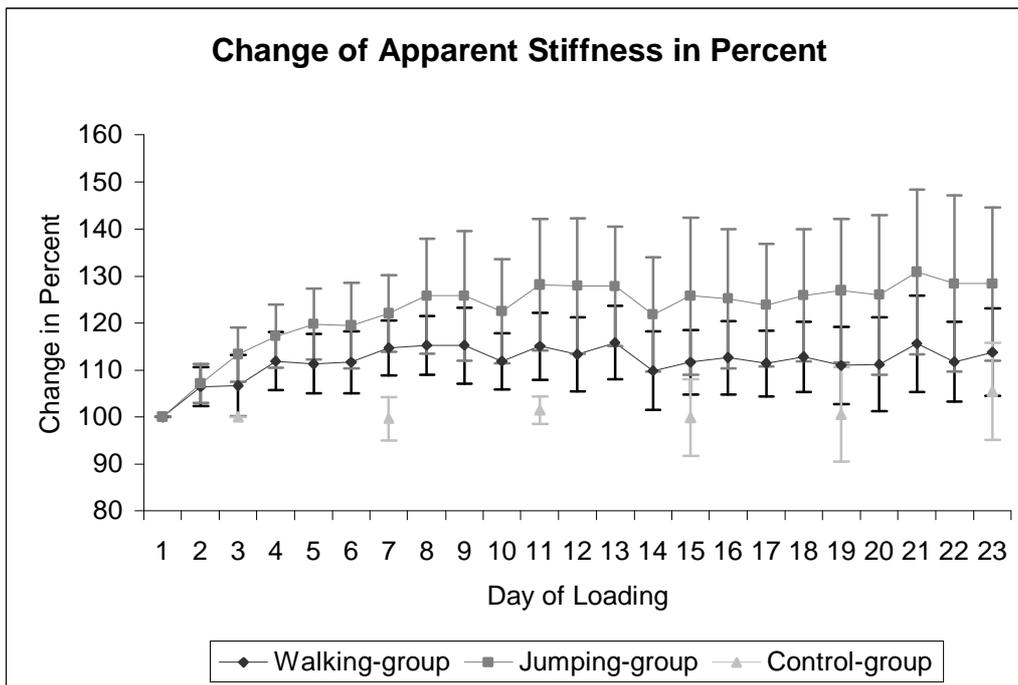


Über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet, kommt es in den beiden Belastungsgruppen zu einer Zunahme der scheinbaren Steifigkeit. Die scheinbare

Steifigkeit der Kontrollgruppe fällt im Verlauf des Versuches zunächst leicht ab, um am Ende wieder ihren Ausgangswert zu erreichen. Im Vergleich zu den belasteten Gruppen kommt es in der Kontrollgruppe zu keiner Zunahme der scheinbaren Steifigkeit.

Wird die Veränderung der verschiedenen Gruppen prozentual ausgedrückt, ergeben sich die nachfolgenden Verläufe.

Abb.50: Arithmetische Mittel ($n=23$) der prozentualen Veränderung der scheinbaren Steifigkeit in den Gruppen und deren Standardabweichungen

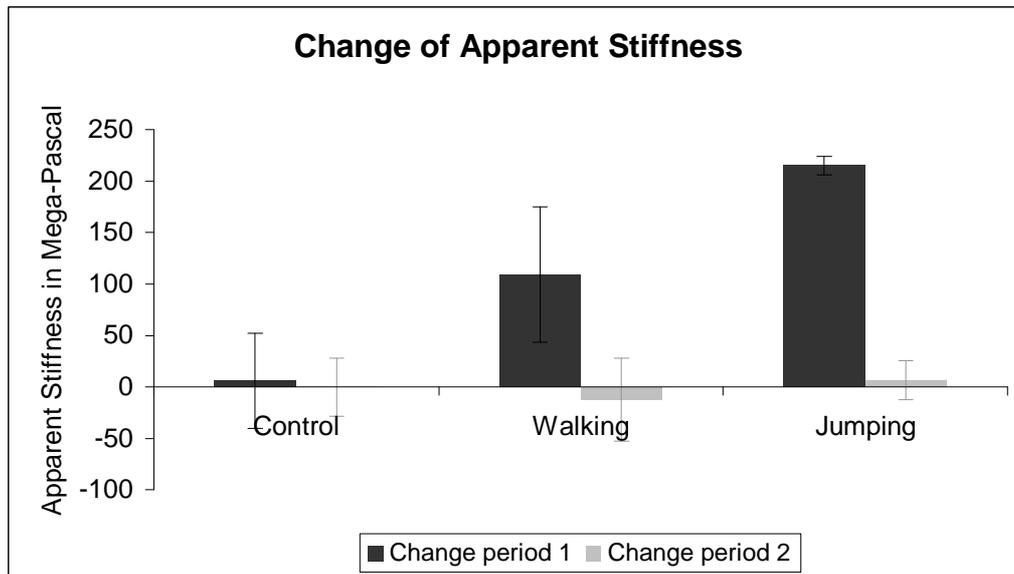


Auffallend ist die unterschiedlich starke Steifigkeitszunahme der belasteten Gruppen. Die mit dem „Jumping“-Signal und somit dem intensiveren Signal belastete Gruppe zeigt im Mittel eine stärkere Zunahme als die mit dem „Walking“-Signal belastete Gruppe.

Zudem zeigen die belasteten Gruppen jeweils einen zweiphasigen Verlauf. Während der ersten Phase, die bis zum elften Belastungstag andauert, kommt es zu einem nahezu kontinuierlichen Anstieg der scheinbaren Steifigkeit. Ab dem zwölften Belastungstag stellt sich ein Plateau ein, in dessen Verlauf Schwankungen beobachtet werden können, die scheinbare Steifigkeit jedoch auf dem erreichten Niveau erhalten bleibt. Die Kontrollgruppe zeigt kaum Veränderungen der scheinbaren Steifigkeit.

Der zweiphasige Verlauf wird durch folgende Abbildung verdeutlicht:

Abb.51: Zu- bzw. Abnahme der arithmetischen Mittel der scheinbaren Steifigkeit in den beschriebenen Belastungsphasen



Die dunkel unterlegten Säulen zeigen die mittleren Veränderungen der scheinbaren Steifigkeit der einzelnen Gruppen während der ersten Phase (1.-11. Belastungstag). Die hellen Säulen zeigen die mittlere Zu- beziehungsweise Abnahme der scheinbaren Steifigkeit der Gruppen in der zweiten Phase (12.-23. Belastungstag). Damit wird nochmals verdeutlicht, dass es während der ersten Phase zu einer starken Zunahme der mittleren Steifigkeit in den Belastungsgruppen kommt, während die zweite Phase nur geringe Änderungen der mittleren Steifigkeit aufweist und somit als Plateauphase bezeichnet werden kann.

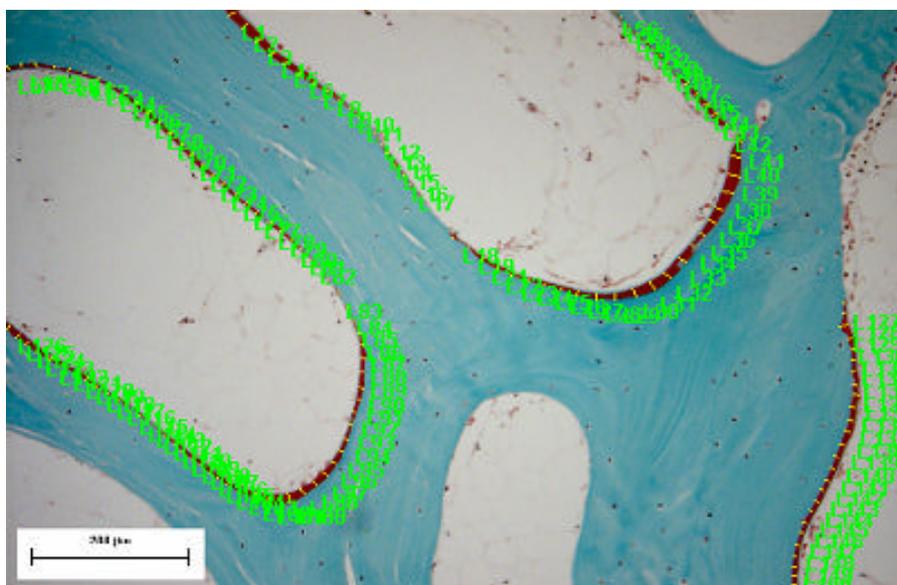
Zur statistischen Analyse der Effekte der Belastung über die Zeit wurde ein allgemeines lineares, gemischtes Modell für Beobachtungen mit Messwiederholungen für unbalancierte Daten zugrundegelegt. Dabei wurden die Belastungen und die Zeit als feste Effekte betrachtet. Da für dieses Modell normalverteilte Daten vorausgesetzt werden, wurde eine Logarithmustransformation durchgeführt, die zu einer Annäherung an die Normalverteilung führt. Der Test auf Unterschiede zwischen den drei Belastungsgruppen ergab einen signifikant globalen Gruppeneffekt mit $p=0,0001$ und einen signifikant globalen Zeiteffekt mit $p<0,0001$. In den Einzelvergleichen mittels linearer Kontraste ergab sich beim Vergleich zwischen Walking-Gruppe und Kontrollgruppe ein p -Wert von $0,0004$ und somit ein signifikanter Unterschied. Statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich auch beim Vergleich der Jumping-

Gruppe und der Kontrollgruppe mit einem $p < 0,0001$. Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich bei Gegenüberstellung der beiden Belastungsgruppen mit einem $p = 0,5767$.

4.2 Das Osteoid

Unter Zuhilfenahme des Programmes *Image®ProPlus* ist es möglich, manuell die Dicke der neugebildeten Osteoidbanden auszumessen. Vorbereitend werden histologische Präparate einer jeden Belastungsprobe mit der Trichromfärbung nach Goldner angefärbt (siehe *Material und Methoden, Kap. 3.8.6.1*), sodass mineralisierte Knochensubstanz grünlich und Osteoid rot dargestellt wird. Anschliessend werden mit *Image®ProPlus* jeweils acht Gesichtsfelder eines jeden Präparates bei einer 100fachen Vergrößerung ausgewertet. Dabei ergeben sich folgende Bilder:

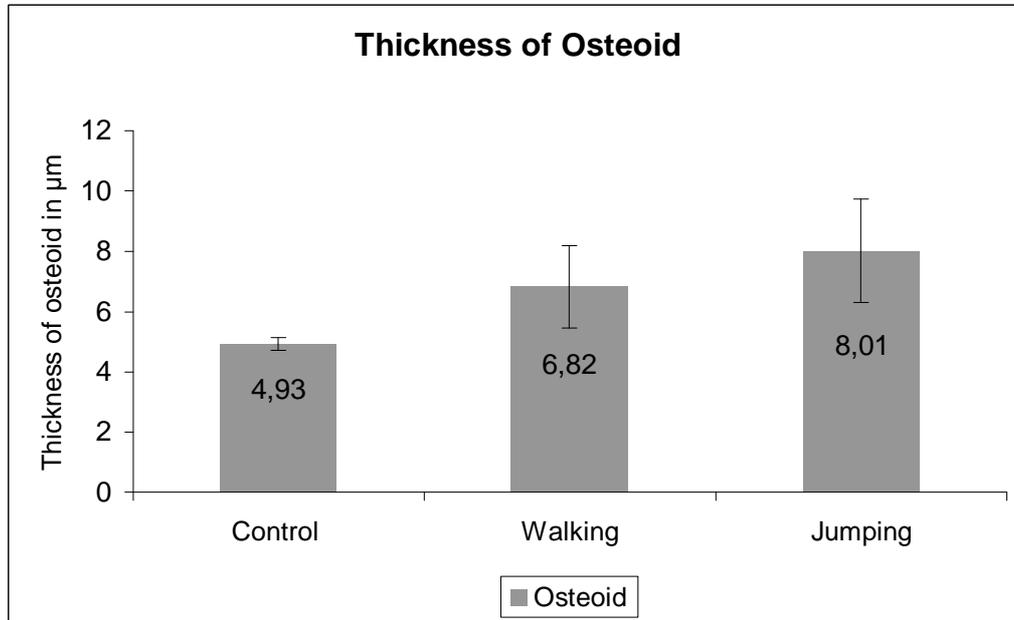
Abb.52: Mit der Trichromfärbung nach Goldner angefärbtes und mit *Image®ProPlus* ausgewertetes Präparat (hier $n=152$ Messungen)



Im Anschluss werden aus den gemessenen Werten die arithmetischen Mittel der Proben und der jeweiligen Versuchsgruppen gebildet und einander gegenübergestellt. Beim

Vergleich der arithmetischen Mittel der jeweiligen Gruppen ergibt sich folgende Darstellung:

Abb.53: Arithmetische Mittel der Osteoidauflagerung und deren Standardabweichung



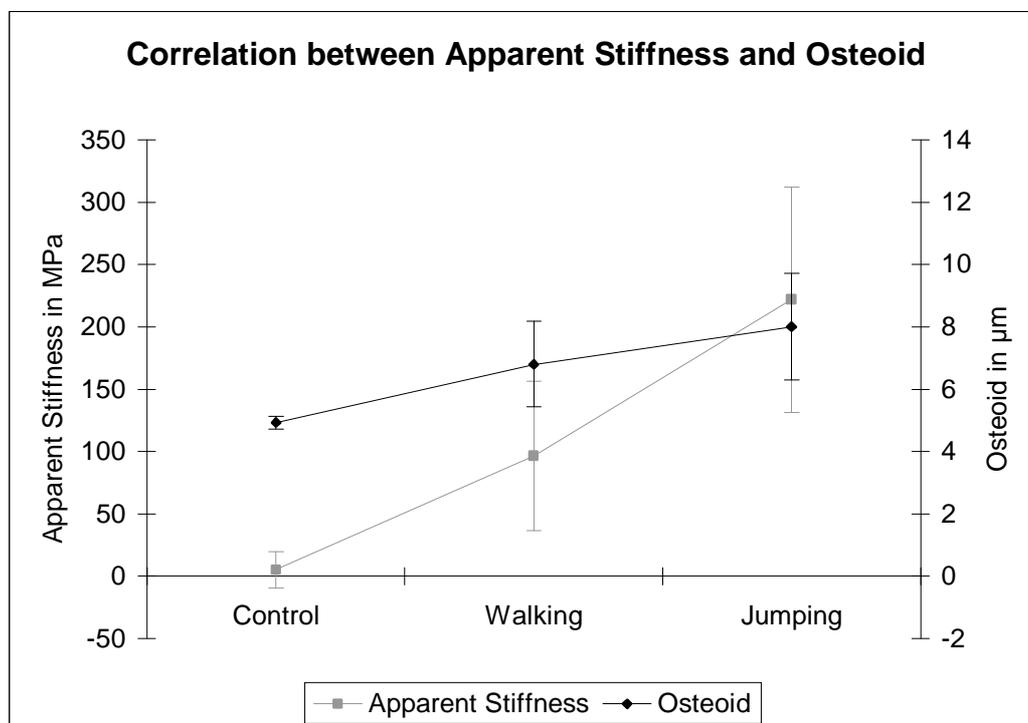
Die mit dem Jumping-Signal belastete Gruppe zeigt mit einem arithmetischen Mittel von 8,01µm die stärksten Osteoidauflagerungen. Die mit dem Walking-Signal belastete Gruppe zeigt eine mittlere Osteoiddicke von 6,82µm, die Kontrollgruppe weist eine Dicke von 4,93µm auf.

Für die statistische Auswertung der Osteoidergebnisse wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse in drei Stufen durchgeführt. Um einer Normalverteilung gerecht zu werden, wurden die Daten zunächst logarithmiert. Für den Gesamtvergleich der hier betrachteten Versuchsgruppen ergibt sich ein signifikant globaler Gruppeneffekt mit $p=0,0033$ und ein F-Wert von 8,33. Bei der Gegenüberstellung der einzelnen Gruppen ergeben sich hinsichtlich der Osteoidauflagerung signifikante Unterschiede mit $p<0,05$ im Vergleich einer jeweiligen Belastungsgruppe mit der Kontrollgruppe. Es zeigen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen der Jumping- und der Walking-Gruppe.

4.3 Deskriptiver Zusammenhang zwischen E-Modul und Osteoid

Im Folgenden werden zum einen die gemittelten Zunahmen der scheinbaren Steifigkeit der einzelnen Versuchsgruppen im Versuchsverlauf dargestellt. Zum anderen werden diesen Werten die gemittelten Osteoidmessungen der einzelnen Gruppen nach Versuchsende gegenübergestellt. Dabei ergibt sich folgender Zusammenhang:

Abb.54: Gegenüberstellung der Veränderung der scheinbaren Steifigkeit und ermittelter Osteoiddicke (arithmetische Mittel und deren Standardabweichungen)

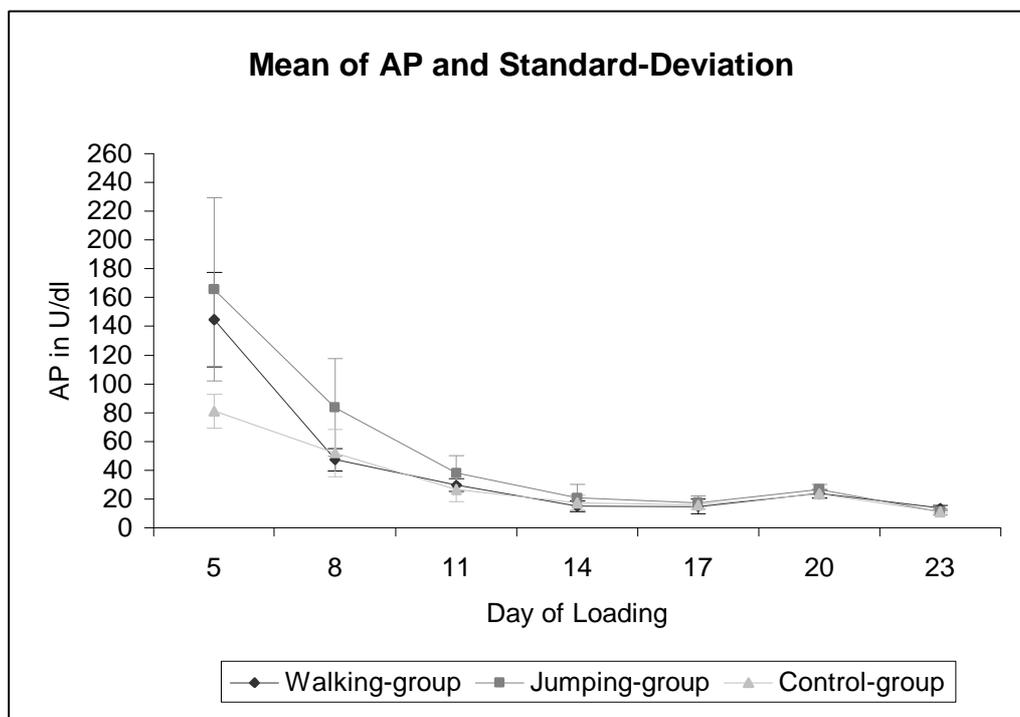


Der Graph zeigt einerseits die Abhängigkeit der Steifigkeitsentwicklung der Proben von der Intensität des Belastungssignals. Darüberhinaus scheint auch die ermittelte Osteoiddicke mit der Belastungsintensität und somit mit der Zunahme der scheinbaren Steifigkeit zu korrelieren. Die mit dem „Jumping“-Signal belastete Gruppe zeigt gegenüber der mit dem „Walking“-Signal belasteten Gruppe sowohl eine im Mittel höhere Zunahme der scheinbaren Steifigkeit als auch eine stärkere Osteoidauflagerung. Die nicht belastete Kontrollgruppe lässt einen geringen Anstieg der scheinbaren Steifigkeit erkennen und zeigt eine Osteoidauflagerung, die klar unterhalb der erreichten Werte der belasteten Gruppen liegt.

4.4 Die Alkalische Phosphatase

Über den gesamten Versuch ergeben sich für jede Probe $n=7$ Messungen der Alkalischen Phosphatase. Die erste Messung wurde am fünften Belastungstag durchgeführt, da während der ersten beiden Belastungstage das Medium täglich gewechselt werden musste, um präparationsbedingten Knochenstaub auszuspülen. Danach fanden der Mediumwechsel und die Probenabnahme zur Erlangung der folgenden Daten nach jeweils drei Belastungstagen (72 Stunden) statt.

Abb.55: Arithmetische Mittel der Alkalischen Phosphatase und deren Standardabweichungen



Die Abb.55 stellt den Verlauf der Alkalischen Phosphatase über den Belastungszeitraum betrachtet dar. Der Verlauf der Mittelwerte der Gruppen ist über den gesamten Belastungszeitraum identisch. Die auffallend erhöhten AP-Werte der ersten und zweiten Messung lassen sich hauptsächlich auf die präparationsbedingte Zellschädigung zurückführen. Der Verlauf der Graphen ist somit dem typischen Verlauf der AP nach einer Fraktur oder Osteotomie sehr ähnlich.

Darüberhinaus zeigt der Graph auffallende Unterschiede der AP zwischen den belasteten Gruppen und der Kontrollgruppe während der ersten Messung (=Versuchstag 5). Die Mittelwerte der belasteten Gruppen liegen während dieser Messung über dem der Kontrollgruppe, was die Frage aufwirft, ob die Zellen der durch die Belastungssignale stimulierten Knochenexplantate entweder angeregt werden und Alkalische Phosphatase exprimieren, was dem Verlauf der Steifigkeitsentwicklung der Proben während dieser Belastungsphase entsprechen würde, oder ob die Zellen durch die Belastung zusätzlich geschädigt werden. Wird dieser Auswertung der Verlauf der Laktatdehydrogenase (siehe *Kap. 4.5*) hinzugezogen, kann vermutet werden, dass zumindest einem Teil der erhöhten AP-Werte der Belastungsgruppen während der ersten Belastungstage eine zusätzliche belastungsbedingte Zellschädigung zugrunde liegt.

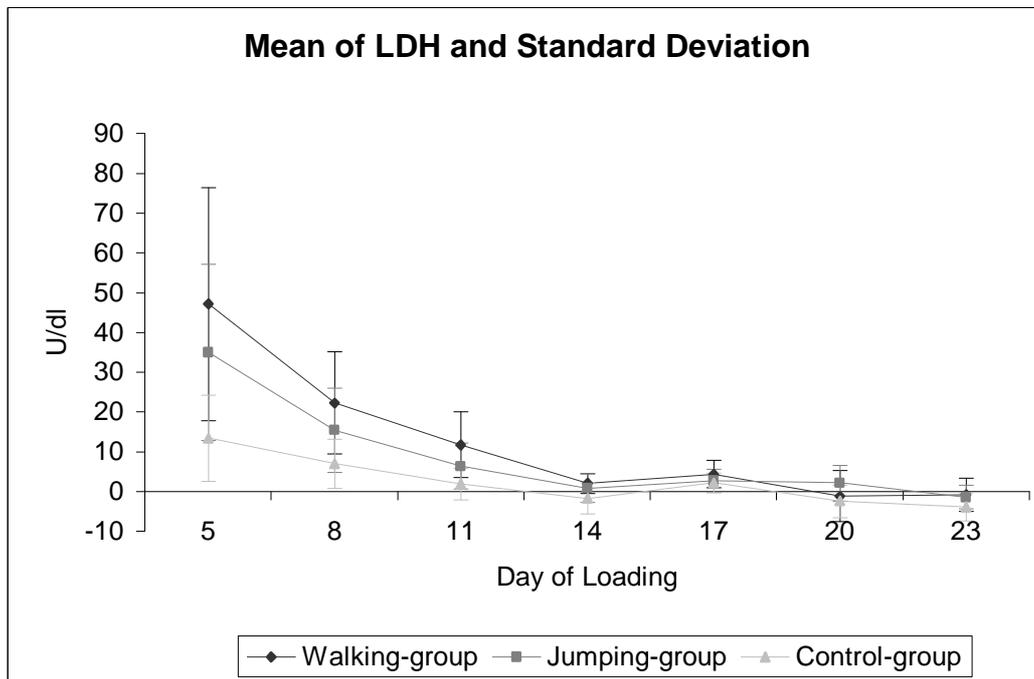
Während der folgenden beiden Messtage (=Belastungstage 8 und 11) fällt die AP weiter ab, wobei sich die Werte der einzelnen Versuchsgruppen einander annähern. Im weiteren Versuchsverlauf stellt sich ein Plateau der AP ein, was für eine kontinuierliche, metabolische Stoffwechsellage der Knochenzellen spricht. Diese Interpretation deckt sich mit unseren histologischen Ergebnissen.

Für die statistische Auswertung wurde das Modell einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor Zeit gewählt. Es zeigten sich jedoch bei einem $p=0,8$ keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

4.5 Die Laktatdehydrogenase

Wie bereits für die Alkalische Phosphatase beschrieben, liegen auch für die Laktatdehydrogenase (LDH) über den Gesamtverlauf des Versuches betrachtet $n=7$ Messungen je Probe vor.

Abb.56: Arithmetische Mittel der Laktatdehydrogenase und deren Standardabweichungen



Die Abbildung 56 stellt den gemittelten Verlauf der LDH der einzelnen Gruppen während des Versuches dar. Der jeweilige Verlauf der Versuchsgruppen ist dabei identisch. Die ersten drei Messungen zeigen in allen Gruppen erhöhte LDH-Werte. Diese sind zum Teil durch die präparationsbedingte Gewebeschädigung beziehungsweise den damit verbundenen Zelluntergang zu erklären.

Zusätzlich lassen sich wie auch schon bei der Alkalischen Phosphatase Unterschiede zwischen den belasteten Gruppen und der Kontrollgruppe erkennen. Während der ersten drei Messtage (=Belastungstage 5, 8, 11) zeigen die belasteten Gruppen im Mittel erheblich höhere Werte der LDH als die nicht belastete Kontrollgruppe. Die wahrscheinlichste Interpretation dieser Unterschiede ist auch in diesem Fall, dass durch die mechanische Belastung ein zusätzlicher Zelluntergang provoziert wurde. Ab der vierten Messung jedoch zeigt die LDH in allen Gruppen Werte nahe Null, was den Schluss zulässt, dass während dieser Phase keine weitere Zellschädigung auftrat. Diese Interpretation deckt sich mit unseren histologischen Ergebnissen.

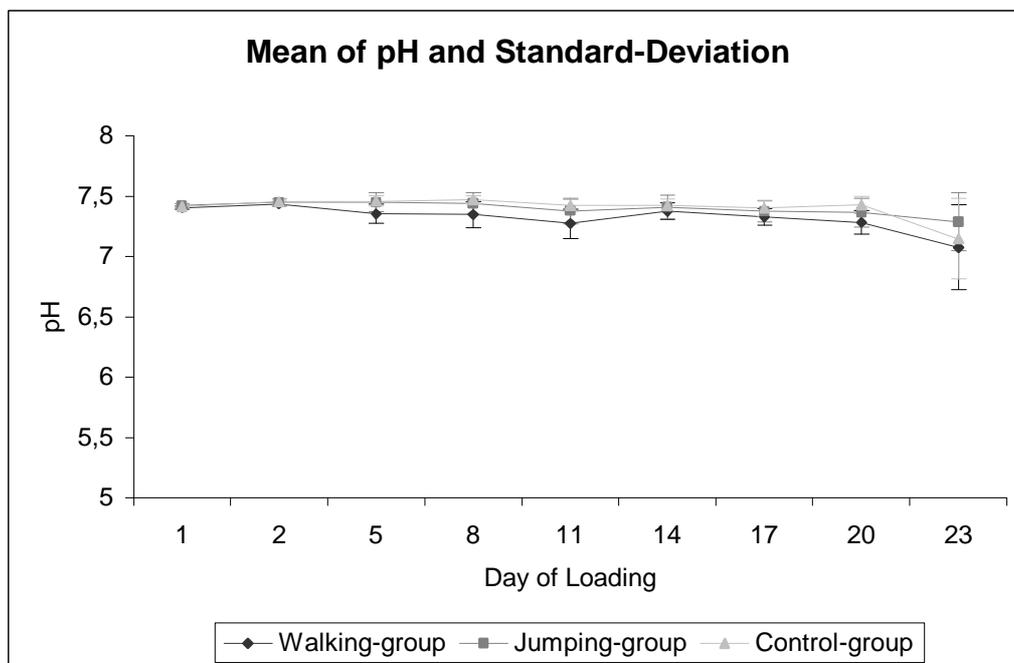
Bei der statistischen Auswertung der dargelegten Werte durch eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor Zeit ergibt sich ein signifikant globaler Gruppeneffekt mit einem $p=0,03$. Bei einer Gegenüberstellung der

Versuchsgruppen untereinander zeigen sich signifikante Unterschiede im Verlauf der LDH zwischen der Jumping-Gruppe und der Kontrollgruppe mit $p=0,009$. Im Vergleich der Walking-Gruppe mit der Kontrollgruppe ergibt sich ein $p=0,24$ und somit kein signifikanter Unterschied. Ebenso verhält es sich beim Vergleich der beiden Belastungsgruppen mit einem $p=0,9$.

4.6 Der pH-Wert

Während der ersten beiden Belastungstage musste das Medium täglich gewechselt werden, um letzten präparationbedingten Knochenstaub auszuspülen. Im weiteren Verlauf des Versuches wurde das Medium nach jeweils drei Tagen (72 Stunden) ausgetauscht. In dem jeweils verbrauchten Medium wurde der pH-Wert gemessen, so dass über den gesamten Versuch gesehen $n=9$ Messungen für jede Probe der einzelnen Gruppen zur Auswertung vorliegen.

Abb.57: Arithmetische Mittel der pH-Werte und deren Standardabweichungen



Die *Abbildung 57* stellt den Verlauf der gemittelten pH-Werte über den Belastungszeitraum dar. Der vorher von uns festgelegte Toleranzbereich, innerhalb dessen sich die pH-Werte während des Versuches befinden sollten, liegt zwischen pH 7,0 und pH 7,5 und wurde im Mittel weder über- noch unterschritten, was auf eine gute Pufferkapazität des verwendeten Kulturmediums schliessen lässt.

Am 9. Messtag (23. Belastungstag) fällt der mittlere pH-Wert in allen Gruppen ab. Diese Werte entsprechen der ersten Messung nach dem Alizarin-labeling, das am 20. Belastungstag durchgeführt wurde. Diese Markierung ist ein möglicher Einflussfaktor, der als Ursache des Abfalls gelten kann.

Richtungsweisende Unterschiede zwischen den Belastungsgruppen untereinander beziehungsweise zwischen den Belastungsgruppen und der Kontrollgruppe sind nicht zu erkennen.

4.7 Histologische Auswertung

Die histologische Aufarbeitung der nicht entkalkten Knochenzylinder, deren Ergebnisse zum Teil bereits im Abschnitt *Material und Methoden* dargelegt sind, stellt einen Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Sie soll verdeutlichen, dass es mit dem hier vorgestellten Zetos-System möglich wird, trabekuläre Knochenexplantate über einen Zeitraum von mehreren Wochen bei voll erhaltener Vitalität zu kultivieren. Diese Aussage lässt sich auf Grundlage der vollständig erhaltenen Gewebestruktur und der guten Kernfärbung und -darstellung treffen. Auch die stichprobenartige Anwendung des ApopTag *In Situ Oligo Ligation Kit*, welcher in den belasteten Proben anteilmässig nur sehr wenige Zellen detektieren konnte, die im Prozess der Apoptose begriffen waren, unterstreicht die erhaltene Vitalität der Knochenexplantate. In den nicht belasteten Kontrollproben konnten anteilmässig mehr apoptotische Zellen detektiert werden.

Mit Hilfe der Alcianblau-PAS Färbung, die Glykogen innerhalb der Zellen anfärbt, konnte zudem die suffiziente Versorgung der Knochenzylinder demonstriert werden.

Auch die Auflagerung von Osteoid lässt auf die erhaltene beziehungsweise gesteigerte Syntheseaktivität der Osteoblasten schliessen. Durch die Osteoidauflagerung über der Alizarinbande wird die erhaltene Osteoblastenaktivität bis zum Ende des Experimentes

unterstrichen, da die polychrome Sequenzmarkierung mit Alizarin erst am 20. Belastungstag bzw. dem 23. Versuchstag durchgeführt wurde.

4.8 Anmerkungen zur Detektion apoptotischer Zellen

Die Untersuchung der Präparate hinsichtlich apoptotischer Zellen wurde bereits im Teil *Material und Methoden, Kap.4.8* beschrieben und hatte aufgrund des hohen Kostenaufwandes und der Tatsache, dass diese Untersuchung nicht Schwerpunkt dieser Arbeit ist, eher stichprobenartigen Charakter. Sie wurde mit der Intention durchgeführt, festzustellen, welcher Anteil an Zellen hinsichtlich 26-tägiger Kultivierung beziehungsweise 23-tägiger Belastung in Apoptose begriffen ist.

Dabei konnten wir, wie bereits erwähnt, feststellen, dass innerhalb der untersuchten Präparate der Belastungsgruppen nur sehr wenige Zellen als apoptose-positiv detektiert wurden. In untersuchten Proben der Kontrollgruppe war der Anteil apoptotischer Zellen höher.

4.9 Die Polychrome Sequenzmarkierung

Bei der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung der Präparate mussten wir feststellen, dass sich nur vereinzelt Kalzein in unsere Knochenexplantate eingelagert hat. Alizarin hingegen stellt sich in beinahe jedem Präparat als kontinuierliche Bande dar. Infolge dieser Beobachtung verzichteten wir auf eine Auswertung der dynamischen Umbauvorgänge des Knochens auf Grundlage einer Doppelbande (Doppellabel).

Jedoch können über jeder Alizarinbande Osteoidauflagerungen gezeigt werden. Wird berücksichtigt, dass das Alizarinlabeling erst am 20. Belastungstag durchgeführt wurde, spricht diese Beobachtung dafür, dass die Bildung neuen Osteoids einen kontinuierlichen Prozess während des gesamten Belastungszeitraums darstellt.

5 Diskussion der Ergebnisse

Die hier vorgelegte und ausgewertete Arbeit ist die erste, die an einem kalibrierten Zetos-System durchgeführt wurde. Sie hat gezeigt, dass es mit diesem System möglich ist, Knochenproben über einen Zeitraum von mehreren Wochen zu kultivieren und vital zu halten, was sich anhand der dargelegten histologischen Ergebnisse und dem Verlauf der Alkalischen Phosphatase sowie der Laktatdehydrogenase belegen lässt. Darüberhinaus erlaubt dieses System, die Knochenproben mit definierten mechanischen Belastungsmustern beziehungsweise pharmakologischen Substanzen zu stimulieren, ohne in das geschlossene System eingreifen zu müssen, was bisherigen Systemen nicht in dieser Form gelungen ist. Es wird somit auch möglich werden, tierexperimentelle Studien hinsichtlich der Knochenforschung, deren Aufwand finanzträchtiger und organisatorisch anspruchsvoller ist, zumindest partiell zu ersetzen.

Die Versuche konnten zeigen, dass die Knochenproben auf Belastungssignale, die komplexen physiologischen Belastungsformen entsprechen, auch mit normalen physiologischen Reaktionsmustern antworten. Zu diesen gehören die Zunahme der scheinbaren Steifigkeit der Knochenzylinder, die hier als E-Modul angegeben wird und die Zunahme an Knochenmasse in Form neugebildeten Osteoids und somit eines appositionellen Knochenwachstums. Das System kann also als voll funktionsfähig angesehen werden.

Hinsichtlich der Zunahme der scheinbaren Steifigkeit zeigten sich hochsignifikante Unterschiede zwischen den Proben der Kontrollgruppe und denen der mit dem „Walking“-Signal ($p=0,0004$) beziehungsweise mit dem „Jumping“-Signal ($p<0,0001$) belasteten Gruppen. Während die Kontrollproben weder eine deutliche Zu- noch Abnahme der scheinbaren Steifigkeit zeigten, antworteten die belasteten Proben mit einer klaren Zunahme während der ersten elf Belastungstage, um danach das erreichte Niveau zu halten. Im statistischen Vergleich der beiden belasteten Versuchsgruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p=0,57$) hinsichtlich der Entwicklung der scheinbaren Steifigkeit. Jedoch scheint die Intensität beider Signale oberhalb einer physiologischen Belastungsschwelle zu liegen, deren Überschreitung zu den schon beschriebenen physiologischen Veränderungen des Knochengewebes führt. Basierend auf den Verlaufsbeobachtungen scheinen die Adaptionsvorgänge an die neuen Belastungen während der ersten elf Belastungstage am intensivsten zu sein.

Zu diskutieren bleibt allerdings der Einfluss des viskoelastischen Effektes auf die Messungen der scheinbaren Steifigkeit. Dieser Effekt beschreibt die Relaxation, das heisst, das Nachlassen der benötigten Kraft bei lang anhaltender Kompression. Der Knochen wird zunächst komprimiert, was zu einer Verkürzung seiner Länge relativ zur Ausgangslänge führt. Innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls, das in unseren Versuchen etwa bis zu einer Stunde betrug, geben die Knochenzylinder etwas nach, was sich anhand der Abnahme der benötigten Kraft belegen lässt. Dieser Prozess ist zumindest teilweise reversibel. Da auch die hier zur Anwendung kommende dynamische Stimulation eine Last darstellt, die bis zu zehn Minuten andauern kann, ist mit einer Relaxation des Knochens aufgrund gewisser viskoelastischer Eigenschaften zu rechnen, welche den Messwert der scheinbaren Steifigkeit verändern beziehungsweise beeinflussen können. Um die Messwerte unserer quasi-statischen Messungen vergleichen zu können, haben wir uns darauf geeinigt, die scheinbare Steifigkeit nach dem beschriebenen Verfahren jeweils in direktem Anschluss an die dynamische Stimulation zu messen, nicht zu Beginn und niemals eine Stunde nach dynamischer Belastung. Die Messung der viskoelastischen Parameter ist eine zusätzliche Fragestellung, die in nachfolgenden Arbeiten untersucht werden wird. Dazu muss das Auswertungsprogramm entsprechend angepasst und erweitert werden.

Mit den dargelegten Beobachtungen ergeben sich sogleich weitere Fragen beziehungsweise Anregungen für nachfolgende Versuche. Welche Rolle spielt beispielsweise der Faktor Zeit hinsichtlich der Steifigkeitszunahme. Resultiert aus einer längeren täglichen Belastungsdauer auch eine höhere scheinbare Steifigkeit oder könnte auch schon eine kürzere tägliche Belastung von beispielsweise zwei oder fünf Minuten beziehungsweise 120 oder 300 Zyklen die gleichen Reaktionen provozieren. Eine andere sich aufdrängende Frage wäre, ob es ein bestimmtes Schwellenpotential gibt, unterhalb dessen keine Reaktion des Knochens auftritt oder es gar zu einem Abfall der scheinbaren Steifigkeit käme. In dem hier vorgelegten Versuch wurden die Proben mit einer Intensität von 4000 μ strain belastet, was einer Kompression von 20 μ m entspricht. Wie würde jedoch der Knochen auf eine Belastung von nur 500, 1000 oder 2000 μ strain reagieren?

Dass eine bestimmte Belastungsintensität, die oberhalb des physiologischen Belastungsniveaus liegt, zu einer Degeneration des Knochengewebes in Form von Mikrofrakturen beziehungsweise einer Abnahme der Knochensteifigkeit führt, konnte bereits gezeigt werden [16]. Die Belastungsschwelle liegt dafür bei etwa 5000 μ strain.

In der histologischen Auswertung konnte demonstriert werden, dass die Dicke der Osteoidauflagerung von der Intensität des Belastungssignals und somit auch von der Entwicklung der scheinbaren Steifigkeit abhängig zu sein scheint. Die beiden belasteten Gruppen zeigten signifikant stärkere Osteoidauflagerungen als die Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Histologisch zeigte sich jedoch auch in den Kontrollproben ein Aufbau an Osteoid. Ein möglicher Einfluss der Messung der scheinbaren Steifigkeit auf dieses Osteoidwachstum ist deshalb zu diskutieren, da bei dieser Messung der Knochen um $20\mu\text{m}$ komprimiert wird und diese somit als Stimulus auf das Knochenwachstum oder auch nur auf den Knochenumbau wirken könnte. In folgenden Versuchen sollte daher in Betracht gezogen werden, die scheinbare Steifigkeit entweder in grösseren zeitlichen Intervallen zu bestimmen wie beispielsweise nach jeweils sieben oder zehn Belastungstagen. Andererseits wäre es auch möglich, einen Teil der Kontrollgruppe nur jeweils zu Beginn und am Ende des Versuches hinsichtlich der scheinbaren Steifigkeit auszuwerten. Eine andere Möglichkeit, den eventuellen Einfluss der quasi-statischen Belastung zu verringern, besteht in der Reduzierung der Kompression der Proben während dieser Messmethode. So wäre es denkbar, die Kompressionstiefe auf $15\mu\text{m}$ oder nur $10\mu\text{m}$ zu reduzieren.

Was unsere histologische Aufarbeitung anbelangt, ist zunächst festzustellen, dass es gelungen ist, gute Schnitte und Färbungen nicht entkalkter Knochenproben herzustellen. In allen Färbungen konnten intaktes Knochengewebe und vitale Knochenzellen demonstriert werden. Mit Hilfe der Alzianblau PAS-Färbung, die in vielen Zellen Glykogen nachweisen konnte, wurde gezeigt, dass die Zellen suffizient versorgt werden. Zum anderen konnte, wie schon erwähnt, histologisch die Auflagerung neuen Osteoids gezeigt werden, ein Ergebnis, das unsere physikalischen Messungen in Form der scheinbaren Steifigkeit, die auf eine Zunahme der Knochenmasse hindeuten, bestätigt. Für den histologischen Nachweis von Osteoidauflagerung können die Trichromfärbung nach Goldner (*Kap.3.8.6.1*) und die Versilberung nach Kossa (*Kap.3.8.6.4*) aufgrund sehr klarer Farbkontraste zwischen mineralisierter und nicht-mineralisierter Matrix sehr empfohlen werden.

Jedoch gab es zunächst Probleme hinsichtlich der histologischen Aufarbeitung, die gelöst werden mussten. Nachdem die in Technovit 9100 New eingebetteten Proben geschnitten und auf Objektträgern fixiert wurden sind, mussten wir feststellen, dass sich die Schnitte entweder während der Entacrylierung oder aber während des Färbens vom Objektträger lösten. Diesem Problem konnte jedoch durch eine Beschichtung der

Objektträger mit Ponal (Kap.3.8.3) wirksam begegnet werden. Auch die in histologischen Leitlinien angegebenen Färbezeiten stellten sich hinsichtlich der Anfärbung der Gewebe als nicht zufriedenstellend heraus. Daher wurden diese Zeiten von uns modifiziert und sind in den jeweiligen Kapiteln des Material und Methoden-Teils aufgeführt.

Wie bereits schon erwähnt, wurden die Apoptoseuntersuchungen mit dem ApopTag *In Situ Oligo Ligation Kit* der Firma Intergen Company eher stichprobenartig durchgeführt, um Tendenzen aufzuzeigen. Intention war dabei die Darstellung einer Methode, welche die Untersuchung und Beurteilung der Vitalität der Zellen hinsichtlich 26-tägiger Kultivierung beziehungsweise 23-tägiger Belastung erlaubt. Dabei stellte sich wie erwartet heraus, dass in den nicht-belasteten Kontrollproben aufgrund fehlender Stimuli anteilmässig mehr apoptotische Zellen detektiert werden können, als in den belasteten Proben. Jedoch könnte die Frage des Einflusses mechanischer Belastungssignale auf das Apoptoseverhalten der Knochenzellen Schwerpunkt einer weiteren Arbeit sein. Aber auch diese Untersuchung bestätigt die Fähigkeit unseres Systems, die belasteten Knochenexplantate über einen Zeitraum von mehreren Wochen vital zu halten.

Es wäre mit Blick auf eine noch umfassendere histologische Aufarbeitung der Proben auch zu empfehlen, die Proben nach Beendigung des Versuches und Entnahme aus den Kultur- und Belastungskammern mit Hilfe der Bandsäge längs zu teilen und eine Hälfte wie in diesem Versuch in Paraformaldehyd einzubetten. Die andere Hälfte könnte entkalkt und in Paraffin eingebettet werden mit dem sich daraus ergebenden Vorteil, auch immunhistochemische Färbungen einfacher durchführen zu können, die bei paraformeingebetteten, nicht entkalkten Proben zum Teil keine hinreichend zufriedenstellenden Ergebnisse erbrachten. Hinsichtlich der enzymhistochemischen Aufarbeitung bleibt zu bemerken, dass es unter Anwendung der Saure Phosphatase-Reaktion gelungen ist, Osteoklasten darzustellen. Die Darstellung der Osteoblasten mit der Alkalischen Phosphatase-Reaktion hingegen war trotz verschiedenster Versuchsansätze nicht möglich. Dabei wäre es denkbar, dass während der Aufarbeitung die Enzymaktivität nachgelassen hat.

Die histomorphometrische Auswertung auf Grundlage der von uns durchgeführten Fluoreszenzlabel zeigte einen sehr guten Einbau des Alizarins mit überwiegend kontinuierlichen Banden. Das Calcein hingegen konnte nur sehr vereinzelt nachgewiesen werden. Somit würde ich vorschlagen, in kommenden Versuchen statt

des Calceins entweder ein zweites Mal mit Alizarin zu labeln oder aber als zweiten Farbstoff Tetracyclin oder Xylenolorange einzusetzen, Farbstoffe, die sich schon in anderen Arbeiten bewährt haben [84]. Vorstellbar wäre auch eine dreimalige Anwendung der polychromen Sequenzmarkierung, wobei die erste noch vor der ersten Belastung durchgeführt werden sollte, eine zweite nach etwa elf Belastungstagen und eine dritte am Ende der Belastungsphase. Mit einem solchen Trippellabel ließe sich verifizieren, ob die während der ersten elf Belastungstage sehr stark gestiegene und während der folgenden Belastungszeit eher konstante scheinbare Steifigkeit mit einer entsprechenden phasenweisen Osteoidauflagerung korreliert. Jedoch konnte über jeder Alizarinbande aufgelagertes Osteoid nachgewiesen werden. Wird berücksichtigt, dass das Alizarinlabel erst am 20. Belastungstag durchgeführt wurde, so lässt diese Beobachtung den Schluss zu, dass die Bildung neuen Osteoids einen permanenten Prozess während des gesamten Belastungszeitraumes darstellt.

Was die Kulturbedingungen anbelangt, konnte gezeigt werden, dass das von uns verwendete DMEM high-glucose Medium den Ansprüchen der Kultivierung der Knochenzylinder über einen längeren Zeitraum gerecht wurde. Die Überlegenheit des hier verwendeten DMEM high-glucose Mediums gegenüber DMEM low-glucose oder Haem's F 10 konnte in Vorversuchen gezeigt werden. Es besitzt gute Puffereigenschaften, was mit Hilfe der pH-Werte demonstriert werden konnte und erlaubt einen ausreichenden Knochenzellmetabolismus. Jedoch wäre zu empfehlen, in zukünftigen Versuchen das Kulturmedium nicht erst nach jeweils 72 Stunden zu wechseln, sondern täglich. Ein häufigerer Wechsel hat den Vorteil, dass die von uns bestimmten Enzyme, die Laktatdehydrogenase und die Alkalische Phosphatase, im Versuchsverlauf noch genauer untersucht werden könnten. Wir konnten diese Enzyme jeweils nur nach einem Mediumwechsel, also nach 72 Stunden bestimmen. Diese Methode erlaubt jedoch nicht, den sehr interessanten Versuchsbeginn hinreichend auszuwerten. Von grossem Interesse wäre eine genaue Differenzierung zwischen dem Verlauf der Enzyme unmittelbar nach der Knochenpräparation und dem sich daran anschliessenden Verlauf während der ersten Belastungstage, um den eventuellen Einfluss der Belastung auf den Enzymverlauf während dieser Phase bewerten zu können. Da wir jedoch nur während der ersten beiden Belastungstage täglich das Medium gewechselt haben, konnten diese Abnahmen aufgrund anderer Volumenkonzentrationen nicht mit den übrigen Messungen verglichen werden. Jedoch konnte auf Grundlage der vorhandenen Werte gezeigt werden, dass ein grosser Anteil

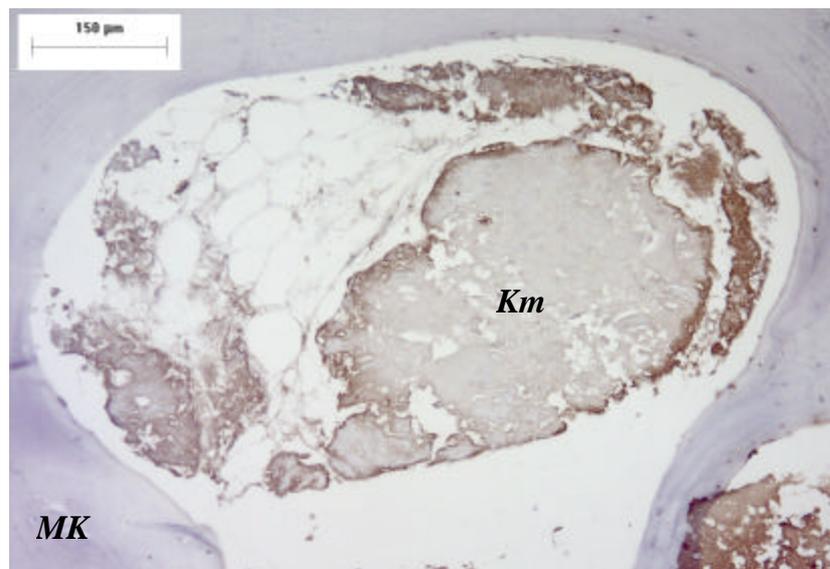
der zu Versuchsbeginn sehr hohen Enzyme auf die Präparation zurückzuführen sein muss, da auch die nicht belasteten Kontrollproben einen Anstieg der AP und der LDH während dieser Messungen aufweisen. Dennoch besteht ein signifikanter Unterschied zwischen den belasteten Proben und den Kontrollproben im LDH-Verlauf, den es aufzuklären gilt.

Im Versuchsverlauf fiel die LDH in allen Gruppen auf ein Niveau um 0 U/dl ab, was belegt, dass es zu keiner weiteren Zellschädigung kam. Die AP pendelte sich bei Werten um 25 U/dl ein und lässt damit auf einen kontinuierlichen Knochenzellmetabolismus schliessen.

Zu empfehlen ist auch die Bestimmung weiterer knochenzellspezifischer Marker, die eine noch genauere Untersuchung der Reaktion der Zellen auf die hier verwendeten Belastungsformen erlauben würden. Beispiele hierfür wären extrazelluläre Matrixproteine, deren Verhalten unter Belastung zum Teil schon in anderen Arbeiten untersucht wurde, wie das Osteocalcin [45,56,57,78] oder aber Kollagen Typ I, Fibronectin, oder Osteopontin [1,48]. Auch eine Bestimmung von extrazellulärem Kalzium [43,78] oder Osteoprotegerin könnte interessante Ergebnisse liefern. Gerade das Osteoprotegerin (OPG), das auch unter dem Namen Osteoclast Inhibiting Factor (OIF) bekannt ist, scheint einen starken Einfluss auf das Knochenremodeling zu nehmen, da es in der Lage ist, die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten zu inhibieren. Zu dem Zusammenhang zwischen OPG und Knochenumbau sind bereits einige Arbeiten erschienen [31,32,33,99]. Es gibt jedoch noch keine Veröffentlichungen zur Untersuchung der dargestellten Zusammenhänge an bovinem Knochengewebe.

Was die gesamte Präparation anbelangt, muss angemerkt werden, dass die dargestellte Prozedur als sehr ausgereift bewertet werden kann. Trotz sehr vieler aufeinander folgender Arbeitsschritte und einer zeitlichen Dauer von wenigstens fünf Stunden, traten keine Infektionen auf und das Resultat waren voll vitale Knochenexplantate. Zu verbessern bleibt lediglich der Vorgang, dessen Ziel die Kürzung der Knochenzylinder auf eine Höhe von fünf Millimeter ist. Trotz sehr sorgfältiger Bearbeitung fielen in den histologischen Schnitten in den äusseren Bereichen der Zylinder Ansammlungen von präparationsbedingtem Knochenmehl oder Knochenstaub auf, die trotz mehrfacher Waschdurchgänge nicht beseitigt werden konnten und eventuell zu einer Einschränkung der Versorgung der Knochenzellen führen könnten.

Abb.60: Präparationsbedingtes Knochenmehl im Aussenbereich der Knochenzylinder



(MK) Mineralisierter Knochen; (Km) Präparationsbedingtes Knochenmehl

Dieser Tatsache könnte begegnet werden, indem zur Kürzung der acht Millimeter hohen Knochenzylinder statt der Inlochsäge die Diamantbandsäge verwendet wird, die schon beim Schneiden der Knochenscheiben zur Anwendung kommt.

Zum Abschluss ein Ausblick auf geplante zukünftige Einsatzgebiete des hier vorgestellten Systems. Ein wichtiges Einsatzgebiet des Zetos könnte die Biomaterialforschung beziehungsweise Implantatforschung sein, da es mit diesem System möglich sein wird, relativ kostengünstig und im Vergleich zu Tierversuchen mit organisatorisch geringerem Aufwand Materialverträglichkeiten oder aber Gewebewachstumverhalten zu testen. Darüberhinaus kann der Einfluss verschiedenster Belastungssignale oder aber Pharmaka auf den Knochen untersucht werden.

In naher Zukunft soll zudem ein komplettes miniaturisiertes und vollautomatisiertes Zetos-System im Weltraum in der ISS eingesetzt werden. Ziel dieser Versuche soll die Erforschung des Knochenstoffwechsels in der Schwerelosigkeit sein. In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Schwerelosigkeit im Weltraum eine Abnahme an Knochenmasse bedingt [6,11]. Man könnte jedoch mit dem Zetos untersuchen, ob bestimmte Belastungsformen, in bestimmten Zeitintervallen appliziert, diesen Substanzverlust reduzieren oder gar verhindern können.

6 Ergebniszusammenfassung

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung des ZETOS als Kultur- und Belastungssystem für trabekuläre Knochenzylinder. Dazu wurden während eines 26-tägigen Versuchs- bzw. 23-tägigen Belastungszeitraumes zwei Versuchsgruppen von jeweils acht Knochenzylindern, die aus dem Radius eines 18 Monate alten Kalbes gewonnen wurden, mit zwei unterschiedlichen physiologischen Belastungssignalen stimuliert und einer nicht belasteten, aus ebenfalls acht Knochenexplantaten bestehenden Kontrollgruppe gegenübergestellt. Das erste Belastungssignal stimuliert das physiologische Laufen („Walking“-Signal), das zweite das physiologische Springen („Jumping“-Signal). Beide Belastungssignale wurden auf einer Kraftmessplattform gewonnen und kamen täglich für 600 Zyklen bei einer Frequenz von 1 Hz und einer Intensität von $4000\mu\text{strain}$ zur Anwendung. Unmittelbar nach der Belastung wurde die scheinbare Steifigkeit einer jeden Probe bestimmt, die als Elastizitätsmodul (E-Modul) angegeben wird. Bei den nicht belasteten Proben der Kontrollgruppe wurde die scheinbare Steifigkeit nach jeweils vier Versuchstagen gemessen.

Beide Belastungsgruppen zeigten während des Versuchszeitraumes einen deutlichen Anstieg ihrer scheinbaren Steifigkeit. Die Kontrollgruppe hingegen zeigte weder eine deutliche Zu- noch Abnahme. Hinsichtlich der scheinbaren Steifigkeit ergaben sich bei der statistischen Auswertung signifikante Unterschiede zwischen der mit dem „Walking“-Signal belasteten Gruppe und der Kontrollgruppe ($p=0,0004$). Statistisch signifikante Unterschiede zeigten sich zudem beim Vergleich zwischen der „Jumping“-Gruppe und der Kontrollgruppe ($p<0,0001$). Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich hingegen bei der Gegenüberstellung der beiden Belastungsgruppen ($p=0,5767$).

Die Zunahme der scheinbaren Steifigkeit konnte histologisch durch den Nachweis eines appositionellen Knochenwachstums in Form aufgelagerten Osteoids bestätigt werden. Auch hier zeigten sich deutliche Zunahmen in den Belastungsgruppen. Die Zunahme an Osteoid in den nicht-belasteten Proben der Kontrollgruppe war weniger stark. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen der „Walking“-Gruppe und der Kontrollgruppe ($p<0,05$), sowie zwischen der „Jumping“-Gruppe und der Kontrollgruppe ($p<0,05$). Wiederum kein signifikanter Unterschied zeigte sich zwischen den beiden Belastungsgruppen ($p>0,05$).

Die in dieser Arbeit bestimmten Zellmarker, die Laktatdehydrogenase (LDH) und die Alkalische Phosphatase (AP), die mit Ausnahme der ersten beiden Belastungstage jeweils im Abstand von 72 Stunden bestimmt wurden, zeigten während der ersten Messungen in allen Versuchsgruppen erhöhte Werte, die auf präparationsbedingte Zellschädigung zurückzuführen sind. Im weiteren Versuchsverlauf zeigte die LDH Werte um Null, was dafür spricht, dass es zu keinem weiteren Zelluntergang kam. Die AP hielt sich auf einem stabilen Niveau von ca. 25 U/dl und unterstreicht somit eine kontinuierliche Aktivität der Zellen.

Neben dem Verlauf der Enzyme wurde zum Nachweis vitalen Knochengewebes eine umfangreiche histologische Aufarbeitung der Proben durchgeführt. In allen Färbungen konnten jeweils eine voll erhaltene Gewebestruktur und vitale Zellen beziehungsweise vitale Zellkerne demonstriert werden.

Darüberhinaus wurde eine stichprobenartige Apoptoseuntersuchung der Proben durchgeführt. Dabei zeigten sich anteilmässig nur sehr wenige apoptotische Zellen in den Belastungsgruppen. In den Proben der nicht belasteten Kontrollgruppe konnten mehr in Apoptose begriffene Zellen detektiert werden.

Die dargelegten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Knochenzylinder während des gesamten Versuchszeitraumes voll vital waren und, dass die Proben auf applizierte physiologische Belastungssignale mit physiologischen Reaktionsmustern antworten. Das System kann somit als voll funktionsfähig bezeichnet werden. Die beiden verwendeten Belastungssignale liegen jeweils oberhalb einer physiologischen Belastungsschwelle, zeigen jedoch hinsichtlich ihrer Auswirkungen keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Die zukünftigen Einsatzgebiete des ZETOS können sehr vielfältig sein. In der Entwicklung ist ein miniaturisiertes, vollautomatisiertes System, das in der Internationalen Raumstation ISS eingesetzt werden soll, um die Auswirkungen der Schwerelosigkeit auf die Knochenphysiologie zu untersuchen. Darüberhinaus wird es möglich werden, beispielsweise die Verträglichkeit und das Einwachsverhalten neuer Implantationsmaterialien kostengünstig zu testen. Zum anderen können die Auswirkungen verschiedener Pharmaka auf den Knochen demonstriert und untersucht werden. Kostenträchtigere und organisatorisch aufwendiger zu gestaltende Tierversuche werden partiell ersetzt werden können.

7 Summary

The purpose of this work is the investigation of the ZETOS as a system for cultivation and mechanical stimulation of bone cores. During a 23 days period two different loading groups, each containing eight bone cores, were loaded with two different mechanical signals and compared to a non-loaded control-group. The first loading-signal corresponds to physiological walking (“walking”-signal), the second one to physiological jumping (“jumping”-signal). Both loading signals were used for 600 cycles daily with a frequency of 1 Hz and an intensity of 4000 μ strain. Immediately after mechanical loading we measured the apparent stiffness of each bone-core, which is expressed as an Elastic-modulus (E-modulus). The apparent stiffness of the non-loaded control-group was always measured after four days.

During the run both loading groups showed a clear increase of their apparent stiffness. The non-loaded control-group had neither a clear increase nor decrease. With regard to the apparent stiffness resulted statistically significant differences between the walking-group and the control-group ($p=0,0004$) as well as between the jumping-group and the control-group ($p<0,0001$). No significant differences were detected in the comparison between our loaded groups ($p=0,5767$).

The increase of apparent stiffness was confirmed histologically by an appositional bone-growth in the form of osteoid. In both loading-groups we could show a significant increase of bone mass whereas the increase of osteoid in the control-group was lower. Statistically significant differences with regard to new osteoid were measured between the walking-group and our control-group ($p<0,05$) and between the jumping-group and the control-group ($p<0,05$). No significant differences resulted in the comparison of the loaded groups ($p>0,05$).

With exception of the first two loading-days, we measured the Alkaline Phosphatase (AP) as well as Lactatdehydrogenase (LDH) always after three days (72 hours) of loading. Caused by the preparation of the bone cores, the enzymes showed higher values during the first measurements in each group. The following measurements showed LDH-values of around zero, which means no further cell-death. The AP kept a stable level of about 25 U/dl, which underlines the continuous cell-activity.

In addition to enzym-measurements we proofed the vitality of our bone-cores by doing an extensive histological analysis. In all colourings that were done, we could

demonstrate a preserved tissue-structure as well as vital cells respectively vital cell-nuclei.

Moreover we made spot checks for apoptotic cells in our loaded and non-loaded bone cores. Proportionately there were only a few apoptotic cells in the loaded samples. In the non-loaded bone cores of the control-group proportionately more apoptotic cells were detected.

Based on these results we can conclude that the bone cores were vital during the whole period of the run and that the cores reacted on physiological stimulation in a physiological way. The mechanical loading-signals that were used exceed a certain physiological threshold that induces certain reactions in the form of increasing apparent stiffness which correlates histologically in an appositional bone growth.

Future prospects for the Zetos are the development of a miniature version that will be used at the ISS to investigate influences of microgravity on bone physiology. Moreover it will be possible to examine new implantation-materials with regard to their digestibility or to investigate influences of new drugs on bone physiology.

8 Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
Aqua bidest	Zweifach destilliertes Wasser
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BMU	Bone Metabolic Unit
BP	Base Pairs / Basenpaare
C 3	Komplementfaktor C3
Ced	Cell Death Abnormal
Cox	Cyclooxygenase
DMEM-Medium	Dulbecco`s Mod. Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E-Modul	Elastizitäts-Modul
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GPa	Giga Pascal
HE	Hämalaun-Eosin
Hz	Hertz
IGF	Insulin-like Growth Factor
ISS	International Space Station
KV	Kilovolt
LDH	Laktatdehydrogenase
MBar	Millibar
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MPa	Mega Pascal
N	Newton
OIF	Osteoclast Inhibiting Factor
OPG	Osteoprotegerin
PAS-Reaktion	Perjodsäure Schiff-Reaktion
PBS	Perfusions- und Belastungssystem
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PC	Personal Computer

PEA	Piezzo Electrical Activator
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PPi	Inorganisches Pyrophosphat
PTH	Parathormon
RANK	nuclear factor kappaB
RANKL	nuclear factor kappaB-ligand
RER	Rauhes Endoplasmatisches Retikulum
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TNF	Tumornekrose-Faktor
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick End-Labeling
U (/dl)	Units (/dl)
V	Volt
VE	Viszeroelastische Eigenschaften
Zetos	Kultur- und Belastungssystem

9 Abbildungsverzeichnis

1	<i>Der Zetos</i>	S.7
2	<i>Schematische Darstellung von Knochengewebe und dessen Zellen (©Pfizer GmbH 2002)</i>	S.12
3	<i>Schematische Darstellung der Knochenzellen und deren Abstammung (University Orthopaedics, Southampton, UK)</i>	S.19
4	<i>Aus dem Arachidonat entsteht durch eine Cyclooxygenase das Prostaglandin H₂, von dem sich die übrigen Prostaglandine ableiten</i>	S.27
5	<i>Gegenüberstellung morphologischer Charakteristika apoptotischer und nekrotischer Zellen (©Boeringer Mannheim)</i>	S.32
6	<i>Der Zetos (Konstruktionszeichnung)</i>	S.35
7	<i>Die Kultur- und Belastungskammer in ihren Einzelkomponenten</i>	S.37
8	<i>Die elektronischen Module</i>	S.38
9	<i>Die Perfusionspumpe</i>	S.39
10	<i>Freipräparierter Radius</i>	S.41
11	<i>In der Bandsäge fixierte Epiphyse</i>	S.42
12	<i>Entnahme der Knochenzylinder mit einem Hohlbohrer</i>	S.43
13	<i>Der Hohlbohrer</i>	S.43
14	<i>Mit der Inlocksäge werden die Zylinder auf eine Höhe von 5mm gebracht</i>	S.44
15	<i>Knochenzylinder nach der Präparation</i>	S.45
16	<i>Waschen der Proben in einem Rotator</i>	S.45
17	<i>Belastungspiston und Knochenzylinder werden mit Hilfe eines Pushers in die Kammer eingebracht</i>	S.46
18	<i>Fertigbestückte Kammer</i>	S.47
19	<i>Komplettes System bestehend aus Kammern, Rollpumpe und Mediumreservoir</i>	S.48
20	<i>Das „Walking“-Signal in seinen jeweiligen Phasen</i>	S.55
21	<i>Das „Jumping“-Signal in seinen jeweiligen Phasen</i>	S.56
22	<i>Das „Walking“-Signal aufgetragen auf „Jumping“-Signale</i>	S.56

23	<i>Die Windows-Benutzeroberfläche zur Steuerung des Zetos</i>	S.58
24	<i>Das Belastungsprotokoll</i>	S.59
25	<i>Verlauf der PEA-Treiberspannung</i>	S.60
26	<i>Quasi-statische Messungen zur Bestimmung der scheinbaren Steifigkeit</i>	S.61
27	<i>Typisches Messergebnis einer quasi-statischen Messung zur Bestimmung der scheinbaren Steifigkeit</i>	S.61
28	<i>Eingebettete Präparate</i>	S.68
29	<i>Übersichtsaufnahme in der Trichrom-Färbung nach Goldner</i>	S.75
30	<i>Zwei verschmelzende Knochentrabekel</i>	S.75
31	<i>Übersichtsaufnahme in der Giemsa-Färbung</i>	S.77
32	<i>Knochentrabekel in der Giemsa-Färbung</i>	S.77
33+34	<i>Knochentrabekel in der Toluidin O-Färbung</i>	S.79/80
35	<i>Knochentrabekel in der v.Kossa-Färbung mit Gegenfärbung mit Trichrom-Goldner-Farbstoffen</i>	S.84
36	<i>Zwei verschmelzende Knochentrabekel in der v.Kossa-Färbung</i>	S.84
37	<i>Übersichtsaufnahme in der H&E-Doppelfärbung</i>	S.87
38	<i>Oberfläche eines Knochentrabekels in der H&E-Doppelfärbung</i>	S.87
39	<i>Osteozyten mit eingelagertem Glykogen</i>	S.91
40	<i>Osteoklast in Howship-Lakune</i>	S.91
41	<i>Osteoklast in der Sauren Phosphatase-Darstellung</i>	S.95
42	<i>Osteoblasten, deren Enzymaktivität nicht mehr nachweisbar ist</i>	S.95
43+44	<i>Alizarinbande mit aufgelagertem Osteoid</i>	S.98
45	<i>Detektion apoptotischer Zellen mit dem ApopTag ISOL Kit</i>	S.100
46	<i>Vitale Osteozyten nach Anwendung des ApopTag ISOL Kit</i>	S.103
47	<i>Apoptotische Osteozyten</i>	S.103
48	<i>Gegenüberstellung vitaler und apoptotischer Osteozyten</i>	S.104
49	<i>Arithmetische Mittel (n=23) der Veränderung der scheinbaren Steifigkeit in den Gruppen und deren Standardabweichungen</i>	S.112
50	<i>Arithmetische Mittel (n=23) der prozentualen Veränderung der scheinbaren Steifigkeit und deren Standardabweichungen</i>	S.113
51	<i>Zu- bzw. Abnahme der arithmetischen Mittel der scheinbaren Steifigkeit in den beschriebenen Belastungsphasen</i>	S.114

52	<i>Mit der Trichromfärbung nach Goldner angefärbtes und mit Image[®] Pro Plus ausgewertetes Präparat</i>	<i>S.115</i>
53	<i>Arithmetische Mittel der Osteoidauflagerung und deren Standardabweichungen</i>	<i>S.116</i>
54	<i>Gegenüberstellung der Veränderung der scheinbaren Steifigkeit und ermittelter Osteoiddicke (arithmetische Mittel mit ihren Standardabweichungen)</i>	<i>S.117</i>
55	<i>Arithmetische Mittel der Alkalischen Phosphatase und deren Standardabweichungen</i>	<i>S.118</i>
56	<i>Arithmetische Mittel der Laktatdehydrogenase und deren Standardabweichungen</i>	<i>S.120</i>
57	<i>Arithmetische Mittel der pH-Werte und deren Standardabweichungen</i>	<i>S.121</i>
58	<i>Präparationsbedingtes Knochenmehl im Aussenbereich der Knochenzylinder</i>	<i>S.130</i>

10 Literaturverzeichnis

- (1) 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
- (2) M.P. Akhter, 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) T.Albrektsson, 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) Y.Avrieli, 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) P.J.Bekker, 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
- (6) D.D.Bikle, B.P.Halloran, E.R.Morey-Holton. Space flight and the skeleton: lessons for the earthbound. *Endocrinologist*, 7(1):10-22, 1997
- (7) H.C.Blair, S.L.Teitelbaum, R.Ghiselli, S.Gluck. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*, 245(4920):855-7, 1989
- (8) N.C.Blumenthal. Mechanisms of inhibition of calcification. *Clin Orthop.*,(247):279-89, 1989

-
- (9) M.D. Boppart, 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) E.H.Burger, J.Klein-Nulend. Mechanotransduction in bone-role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J*, 13 Suppl:S101-12, 1999
- (11) A.Caillot-Augusseau, 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
- (12) B.Cheng, 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
- (13) M.Z. Cheng, 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
- (14) J.W.Chow, 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
- (15) S.C.Cowin, L.Moss-Salentijn, M.L.Moss. Candidates for the mechanosensory system in bone. *J Biomech Eng*, 113(2):191-7, 1991
- (16) D.W.Dempster, 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

-
- (17) M.Dexter, T.Allen. Haematopoiesis. Multi-talented stem cells? *Nature*, 360(6406):709-10, 1992
- (18) S.B.Dotty. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int*, 33(5):509-12, 1981
- (19) E.F.Eriksen, H.J.Gundersen, F.Melsen, L.Mosekilde. Reconstruction of the formative site in iliac trabecular bone in 20 normal individuals employing a kinetic model for matrix and mineral apposition. *Metab Bone Dis Relat Res*, 5(5):243-52, 1984
- (20) H.A.Fleisch. Bisphosphanates: preclinical aspects and use in osteoporosis. *Horm Metab Res*, 29(3):145-50, 1997
- (21) U. Frink, D. Schmidbleicher, C. Wörn. Vergleich biomechanischer Messverfahren zur Bestimmung der Sprunghöhe bei Vertikalsprüngen, *Leistungssport*, 2. Ausgabe, page 48-53, 1991
- (22) H.M.Frost. Resting seams: On and off in lamellar bone forming centers. *Metab. Bone Dis. Rel. Res.* 2S, 167-170, 1980
- (23) H.M.Frost. Skeletal structural adaptations to mechanical usage (SATMU): 2.Redefining Wolff's law: the remodeling problem. *Anat Rec*, 226(4):414-22, 1990
- (24) H.M.Frost. Some ABCs of skeletal pathophysiology. I: Introduction to the series. *Calcif Tissue Int*, 45(1):1-3, 1989
- (25) H.M.Frost. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res*, 3(3):211-37, 1969
- (26) K.Fuller, 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
- (27) S.A.Goldstein, L.S.Matthews, J.L.Kuhn, S.J.Hollister. Trabecular bone remodeling: an experimental model. *J Biomech*, 24 Suppl 1 :135-50, 1991
- (28) A.W.Gray, 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
- (29) R.E.Guldberg, 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
- (30) M.Hahn, M.Vogel, M.Amling, H.Ritzel, G.Delling. Microcallus formations of the cancellous bone: a quantitative analysis of the human spine. *J Bone Miner Res*, 10(9):1410-6, 1995
- (31) L.C. Hofbauer, 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
- (32) 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
- (33) L.C. Hofbauer, C. Shui, B.L. Riggs, C.R. Dunstan, T.C. Spelsberg, T. O'Brien, S. Khosla. Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF-kappa B ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic and coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 280(1):334-9, Jan 2001
- (34) M.H.Hong, 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 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in mouse marrow-derived stromal cells (ST2) and primary osteoblastic cells. *Endocrinology*, 129(5):2774-9, 1991
- (35) S.Huang, L.W.Terstappen. Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature*, 368(6472):664, 1994
- (36) M.D.Jacobson, 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
- (37) J.A.Jayasinghe, S.J.Jones, A.Boyde. Scanning electron microscopy of human lumbar vertebral trabecular bone surfaces. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 422(1):25-34, 1993
- (38) B.G.Jeansonne, 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
- (39) W.S.Jee, Y.F.Ma. The in vivo anabolic actions of prostaglandins in bone. *Bone*, 21(4):297-304, 1997
- (40) W.S.Jee, 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
- (41) E.Jimi, 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
- (42) C.H.Jin, T.Shinki, M.H.Hong, T.Sato, A.Yamaguchi, T.Ikeda, S.Yoshiki, E.Abe, T.Suda. 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 regulates in

- vivo production of the third component of complement (C3) in bone. *Endocrinology*, 131(5):2468-75, 1992
- (43) N.R. Joergensen, Z. Henriksen, C. Brot, E.F. Eriksen, O.H. Soerensen, R. Civitelli, T.H. Steinberg. Human osteoblastic cells propagate intercellular calcium signals by two different mechanisms. *J Bone Miner Res*, 1024-1032, 2000
- (44) D. Jones, G. Leivseth, and J. Tenbosh. Mechano reception in osteoblast-like cells. *Biochem Cell Biol*, 73(7-8):525-34, 1995
- (45) P. Kannas, 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
- (46) H. Kawaguchi, 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
- (47) JF Kerr, 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
- (48) K.S. Ko, C.A. McCulloch. Intercellular mechanotransduction: cellular circuits that coordinate tissue responses to mechanical loading. *Biochem Biophys Res*, 285(5):1077-83, Aug. 2001
- (49) L.E. Lanyon. Control of bone architecture by functional load bearing. *J Bone Miner Res*, 7 Suppl 2:S369-75, 1992
- (50) L.E. Lanyon. Functional strain as a determinant for bone remodeling. *Calcif Tissue Int*, 36 Suppl1:S56-61, 1984

-
- (51) L.E. Lanyon. Functional strain in bone tissue as an objective, and controlling stimulus for adaptive bone remodeling. *J.Biomech*, 20(11-12):1083-93, 1987
- (52) L.E. Lanyon. 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
- (53) C.H.Lin, 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
- (54) E.Lozapone, 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, 1996
- (55) Y.F.Ma, 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
- (56) U. Meyer, 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
- (57) Y. Mikuni-Takayaki. Mechanical responses and signal transduction pathways in stretched osteocytes. *J Bone Miner Metab*, 137(1):57-60, 1999
- (58) M.R. Moalli, 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

-
- (59) M.R.Moalli, 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
- (60) L.Modis, 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
- (61) L.Modis, M.Petko, I.Foldes. Histochemical examination of supporting tissues by means of fluorescence. II. Fluorochromes as an indicator of lamellar bone mineralization. *Acta Morphol Acad Sci Hung*, 17(2):157-66, 1969
- (62) E.R. Morey-Holton and S.B.Arnaud. Spaceflight and calcium metabolism. *Physiologist*, 28(6 Suppl):S9-12, 1985
- (63) J.R.Mosley, 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
- (64) M.T.Mulari, 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
- (65) S.Nagata. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*, 256(1):12-8, Apr. 2000
- (66) J.R.Nefussi, J.M.Sautier, V.Nicolas, N.Forest. How osteoblasts become osteocytes : a decreasing matrix forming process. *J Biol Buccale*, 19(1):75-82, 1991

-
- (67) H.Niederdelmann, B.A.Rahn. Histological studies following osteosynthesis on the canine mandible using the Freiburg tension plate *Fortschr Kiefer Gesichtschir*, 21:307-9, 1976
- (68) M.T.Nyman, 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
- (69) A.Okuda, 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
- (70) S.M.Ott. Bone formation periods studied with triple tetracycline labels in women with postmenopausal osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 8(4):443-50, 1993
- (71) C.Palumbo, S.Palazzini, G.Marotti. Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation. *Bone*, 11(6):401-6, 1990
- (72) Z.Pan, 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
- (73) A.M.Parfitt, 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
- (74) A.M.Parfitt, 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 bisphosphonates. *J Bone Miner Res*, 11(2):150-9, 1996
- (75) A.M.Parfitt. Osteonal and hemi-osteonal remodeling: the spatial and temporal framework for signal traffic in adult human bone. *J Cell Biochem*, 55(3):273-86, 1994
- (76) A.M. Parfitt. Plasma calcium control at quiescent bone surfaces: a new approach to the homeostatic function of bone lining cells. *Bone*, 10(2):87-8, 1989
- (77) A.M.Parfitt. The cellular basis of bone turnover and bone loss: a rebuttal of the osteocytic resorption-bone flow theory. *Clin Orthop*, (127):236-47, 1977
- (78) P.Patterson-Buckendahl, 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
- (79) M.J. Pead, 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.
- (80) A.van der Plas, 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
- (81) B.A.Rahn, S.M.Perren. Alizarin complexon-fluorochrome for bone and dentine labeling. *Experientia*, 28(2):180, Feb. 1972
- (82) B.A.Rahn, S.M.Perren. Calcein blue as a fluorescent label in bone. *Experientia*, 26(5):519-20, May 1970

-
- (83) B.A.Rahn, S.M.Perren. Xylenol orange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labeling of calcifying tissues. *Stain Technol*, 46(3):125-9, May 1971
- (84) B.V.Rahn, 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
- (85) L.G.Raisz, 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
- (86) L.G.Raisz, C.C.Pilbeam, P.M.Fall. Prostaglandins: mechanisms of action and regulation of production in bone. *Osteoporos Int*, 3 Suppl 1:136-40, 1993
- (87) P.A.Revell. Histomorphometry of bone. *J Clin Pathol*, 36(12):1323-31, Dec. 1983
- (88) G.A.Rodan, 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
- (89) R.W.Romberg, 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
- (90) C.T.Rubin, 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
- (91) C.T.Rubin, 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

-
- (92) C.T.Rubin, L.E.Lanyon. Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J Bone Joint Surg Am*, 66(3):397-402, 1984
- (93) C.T. Rubin and L.E.Lanyon. Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. *Calcif Tissue Int*, 37 (4):411-7, 1985
- (94) C.Rubin, 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
- (95) A.Rubinacci, 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
- (96) T.Sahara, K.Hoh, K.Debari, T.Sasaki. Specific biological functions of vacuolar-type H⁺-ATPase and lysosomal cysteine proteinase, cathepsin K, in osteoclasts. *Anat Rec*, 270A(2):152-61, 2003
- (97) M.M.Sandberg. Matrix in cartilage and bone development: current views on the function and regulation of major organic components. *Ann Med*, 23(3):207-17, 1991
- (98) T.Sato, M.H.Hong, C.H.Jin, Y.Ishimi, N.Udagawa, T.Shinki, E.Abe, T.Suda. The specific production of the third component of complement by osteoblastic cells treated with 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *FEBS Lett*, 285(1):21-4, 1991
- (99) M. Schoppet, 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

-
- (100) R.Sgonc, G.Wick. Methods for the detection of apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol*, 105(4):327-32, Dec. 1994
- (101) T.M.Skerry, 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
- (102) H.K.Suzuki, 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
- (103) M.Tagil, P.Aspenberg. Cartilage induction by controlled mechanical stimulation in vivo. *J Orthop Res*, 17(2):200-4, 1999
- (104) R.S.Taichman, S.G.Emerson. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony stimulating factor. *J Exp Med*, 179(5):1677-82, 1994
- (105) R.S.Taichman, 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
- (106) R.S.Taichman, M.J.Reilly, S.G.Emerson. Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. *Blood*, 87(2):518-24, 1996
- (107) S.Tanaka, 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

-
- (108) L.Y.Tang, 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
- (109) J.D. Termine, K.M.Cann. Inhibition of apatite formation by phosphorylated metabolites and macromolecules. *Calcif Tissue Res*, 22(2): 149-57, 1976
- (110) L. Thorwesten. Der Einfluss von Bandagen und Orthesen auf sensormotorische Defizite am oberen Sprunggelenk, *Orthopaedie-Technik* 51, No. 6, page 552ff, 2000
- (111) K.Ueno, 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
- (112) Y.Umemura, 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
- (113) H.K.Vaananen, M.Horton. The osteoblast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci*, 108(Pt8):2729-32, 1995
- (114) D.Vashishth, K.E.Tanner, W.Bonfield. Fatigue of cortical bone under combined axial-torsional loading. *J Orthop Res*, 19(3):414-20, 2001
- (115) M.Weil, 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

-
- (116) F.N.Woodiel, 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
- (117) T.J.Wronski, 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
- (118) T.J.Wronski, E.R.Morey-Holton, W.S.Ju. Skeletal alteration in rats during space flight. *Adv Space Res*, 1(14):135-40, 1981
- (119) A.H.Wyllie. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284(5756):555-6, Apr. 1980
- (120) W.Yao, 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
- (121) C.K.Yeh, 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
- (122) H.Yoshida, 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
- (123) M.Zaidi, 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

- (124) G.Zaman, 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
- (125) J.E.Zerwekh. Bone metabolism. *Semin Nephrol*, 12(2):79-90, 1992
- (126) A.Shiotani, M.Takami, K.Itoh, Y.Shibasaki, T.Sasaki. Regulation of osteoclast differentiation and function by receptor activator of NFkB ligand and osteoprotegerin. *Anat Rec*, 268(2):137-46, 2002
- (127) F.Gori, 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
- (128) N.V.Chandrasekharan, 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
- (129) L.Hessle, 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
- (130) K.A.Johnson, L.Hessle, S.Vaingankar, C.Wenneberg, 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

- (131) G.B.Stroup, 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 selective inhibition of bone resorption in vivo in a nonhuman primate. *J Bone Miner Res*, 16(10):1739-46, 2001
- (132) P.Saftig, E.Hunziker, V.Everts, S.Jones, A.Boyde, O.Wehmeyer, A.Suter, K.v.Figura. Functions of cathepsin in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice. *Adv Exp Med Biol*, 477:293-303, 2000
- (133) Y.Wittrant, 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
- (134) K.D.Ryder, R.L.Duncan. Parathyroid hormone modulates the response of osteoblast-like cells to mechanical stimulation. *Calcif Tissue Int*, 67(3):241-6, 2000
- (135) J.T.Swarthaut, 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
- (136) M.Sabatini, 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
- (137) R.Dunlay, 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
- (138) H.Brown, R.Prescott. *Applied Mixed Models in Medicine*. WILEY, 1999

11 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

12 Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich zunächst bei meiner Familie, die mir den Freiraum für diese Arbeit ermöglichte und deren Unterstützung ich mir immer sicher sein kann.

Die Erstellung dieser Arbeit wäre ohne die Hilfe und Unterstützung vieler Personen und Institute nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. David B. Jones für die Überlassung des spannenden Themas, seine immer kompetente Beratung und die freundliche Betreuung in seiner Abteilung.

Herzlichen Dank auch an unsere Laborchefin Frau Marita Kratz, die jederzeit und immer freundlich, wenn nötig auch bis 5 Uhr morgens, mit Rat und Tat zur Seite stand und durch ihre konstruktive Kritik im positivsten Sinne sehr zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Auch möchte ich mich bei ihr für die wertvollen Hinweise zur Abfassung der Arbeit und ihr anschließendes Korrekturlesen bedanken.

Vielen Dank an die Herren Eckhardt Bröckmann und Torsten Pohl für die Unterstützung und Aufklärung in allen technischen und physikalischen Fragen.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Herrn Weng Tan für seine zuverlässige Hilfe und bei allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik für die gute Teamarbeit.

Besonderer Dank auch an meine beiden Mitstreiter und Freunde Herrn Sebastian Wunsch und Herrn Dr. Hans-Peter Klappdohr für die allseits zuverlässige und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich beim Institut für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik der Philipps-Universität, sowie dem Institut für Pathologie der Philipps-Universität und dort besonders bei Frau Lehnhardt für ihre Hilfestellung und Beratung in vielen histologischen Fragen.

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

Ausserdem möchte ich mich bei Frau Eve Ulrich für ihr geduldiges Korrekturlesen der vorgelegten Arbeit bedanken.

Index

- Abbildungsverzeichnis, 137
- Abkürzungsverzeichnis, 135
- Auswertung und Ergebnisse, 112
- Danksagung, 159
- Diskussion der Ergebnisse, 124
- Einführung, 6
- Firmenverzeichnis, 157
- Literaturverzeichnis, 140
- Material und Methoden, 41
- Summary, 133
- Zielsetzung und Fragestellungen, 40
- Zusammenfassung, 131

Verzeichnis der akademischen Lehrer:

Meine akademischen Lehrer an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel waren die Damen und Herren:

Busse, Gerber, Gronow, Häbler, Havsteen, Illert, Jänig, Krisch, Kümmel, Kurz, Lange, Lemke, Lucius, Lüllmann-Rauch, Malyusz, Paulsen, Rose-John, Schauer, Schmidtmayer, Schünke, Shaw, Sievers, Tillmann, Wittke, Wolf

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

Arnold, Barth, Baum, Becker, Bien, Christiansen, Czubayko, Engel, Gotzen, Grimm, Griss, Gudermann, Happle, Hellinger, Hesse, Hofmann, Jones, Joseph, Jungclas, Kern, Kienapfel, Klenk, Klose, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroh, Kroll, Lange, Lengsfeld, Lohoff, Lorenz, Maier, Maisch, Max, Mennel, Moll, Moosdorf, Müller, Mutters, Neubauer, Oertel, Pfeiffer, Remschmidt, Renz, Rothmund, Schäfer, Schlenzka, Schmidt, Schnabel, Sekundo, Seyberth, Simon, Stief, Stiletto, Vogelmeier, Vohland, Wagner, Werner, Wilke, Wirth, Wulf, Zielke

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 zweier verschiedener Belastungssignale an bovinen Knochenzylindern.*“ im Medizinischen Zentrum für Operative Medizin I / 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 Ergebnisse der vorgelegten Arbeit enthält, befindet sich in Vorbereitung.

Marburg, 10.02.2005