

Aus der Philipps-Universität Marburg
Abteilung für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie, Histologie
und Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Der ZETOS
Ein Kultur-Belastungssystem
für trabekuläre Knochen

Untersuchung an humanen Knochenzylindern

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Hans-Peter Klapdohr
Gießen 2003

Aus der Philipps-Universität Marburg
Abteilung für Experimentelle Orthopädie und Biomechanik
Betreuer: Prof. Ph.D D. Jones

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie, Histologie
und Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. M. Kressin

Der ZETOS
Ein Kultur-Belastungssystem
für trabekuläre Knochen

Untersuchung an humanen Knochenzylindern

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Hans-Peter Klapdohr
Tierarzt aus Rödermark
Gießen 2003

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Ph.D D. Jones

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. M. Kressin

Tag der mündlichen Prüfung: 05.06.2003

meinen Eltern und meinem Bruder

quis quid agis prudenter agas et respice finem

Inhaltsverzeichnis

1 Einführung	8
1.1 Der ZETOS	11
1.2 Das E-Modul	15
1.2.1 Quasi-Statische-Belastung	15
1.3 Der Knochen	18
1.4 Die Knochenzellen	19
1.4.1 Osteoblasten	19
1.4.2 Osteozyten	20
1.4.3 Bone Lining cells	22
1.4.4 Osteoklasten	22
1.5 Osteoprotegerin (OPG)	25
1.6 Das Remodeling	27
1.7 Die polychrome Sequenzmarkierung	31
1.8 Alkalische Phosphatase	32
1.9 Die Laktat-Dehydrogenase	33
1.10 Apoptose	33
2 Material und Methoden	36
2.1 Herstellung der Knochenzylinder	36
2.1.1 Präparation der Knochenzylinder	36
2.1.2 Aufbereitung der Knochenzylinder	41
2.1.3 Integration der Knochenzylinder in die Kultur-Belastungs-Kammern	42
2.1.4 Anschluss der Kultur-Belastungs-Kammern an das Nährmedium	43
2.2 Versuchsdurchführung	45

2.2.1	Einteilung der Knochenzylinder in die verschiedenen Versuchsgruppen	45
2.2.2	Die Quasi-Statische-Belastung und das Belastungssignal . . .	46
2.2.3	Wechsel des Nährmediums	50
2.2.4	Bestimmung der Alkalischen Phosphatase und Laktat-Dehydrogenase	50
2.2.5	Bestimmung des Osteoprotegerins	52
2.2.6	Durchführung der polychromen Sequenzmarkierung	54
2.3	Histologie	55
2.3.1	Die Alkoholfixation	55
2.3.2	Die alkoholische Dehydrierung und Xylol-Entfettung	55
2.3.3	Die Kunststoffeinbettung	56
2.3.4	Das Schneiden der Präparate	59
2.3.5	Die Entacrylierung	62
2.3.6	Vorbemerkung zu den Färbungen	63
2.3.7	Die Färbung mit Toluidinblau O	63
2.3.8	Die Trichromfärbung nach Goldner	66
2.3.9	Die modifizierte "von-Kossa-Versilberung" nach KRUTSAY . . .	70
2.3.10	Die Färbung mit Alcianblau-PAS	76
2.3.11	Die Doppelfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (H&E)	81
2.3.12	Die Giemsa-Färbung	84
2.3.13	Die Detektion apoptotischer Osteozyten	86
2.4	Auswertung und Statistik	91
3	Ergebnisse	92
3.1	Vorbemerkung	92
3.2	pH-Werte	92
3.3	Alkalische Phosphatase	93

3.4 Laktat-Dehydrogenase	94
3.5 Osteoprotegerin	95
3.6 Scheinbare Steifigkeit der Knochenzylinder (E-Modul)	97
3.7 Osteoid	101
3.8 Polychrome Sequenzmarkierung	102
3.9 Apoptotische Osteozyten	104
4 Diskussion	105
5 Zusammenfassung	109
6 Summary	111
7 Abkürzungsverzeichnis	112
8 Danksagung	137

1 Einführung

Es ist bereits seit mehr als 150 Jahren bekannt, dass die Regulation der Knochenmasse und -struktur durch mechanische Belastungen beeinflusst wird. Infolge einer mechanischen Belastung kommt es zu einer Deformierung der Knochenmatrix und zu einer Änderung der Knochenlänge relativ zu seiner Ausgangslänge. Diese Änderung wird in "strain" angegeben und ist der Quotient aus $\Delta L/L$. Hierbei ist ΔL die Länge, um welche der Knochen komprimiert wird und L die jeweilige Ausgangslänge. Zudem reagiert der Knochen auf Belastung mit einer Zunahme seiner Knochendichte und/oder mit einer Änderung seiner Architektur im Sinne eines Knochenumbaus. Als Resultat wird er widerstandsfähiger gegenüber weiteren Belastungen [67, 98].

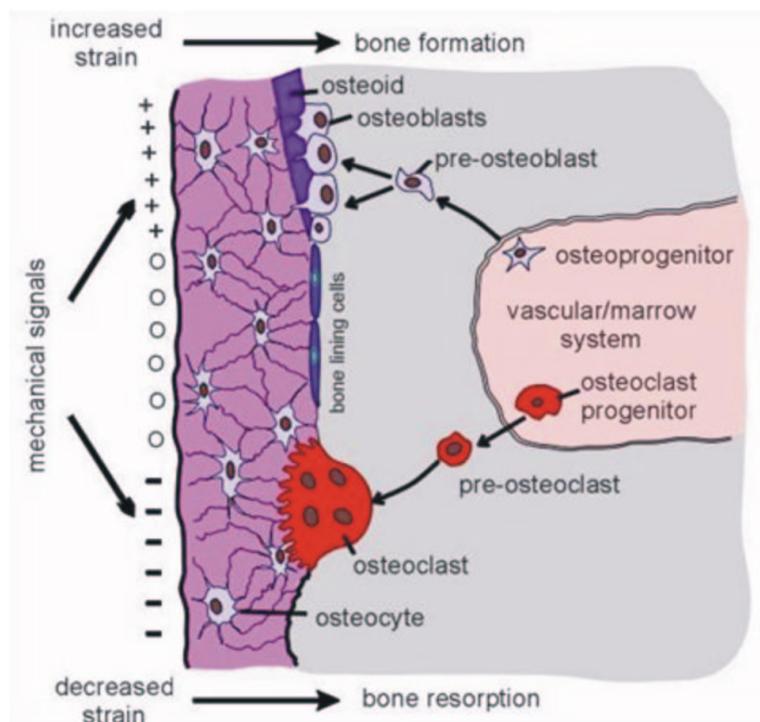


Abbildung 1: Hypothetischer Übertragungsweg mechanischer Signale: Osteozyten als Mechanosensoren leiten Informationen an die Effektorzellen (Osteoblasten, Osteoklasten, Bone Lining cells) weiter. [University Orthopaedics, Southampton, UK]

Verschiedene Studien belegen, dass sowohl eine direkte als auch eine indirekte mechanische Belastung des Knochens eine verstärkte Proliferations- und Differenzierungsleistung der Osteoblasten fördert [90, 8]. Dadurch kommt es zu einer Zunahme der Knochendichte oder aber zu einer Abnahme des altersbedingten Knochenabbaus [68, 19, 37, 81, 109], sofern die mechanische Belastung im physiologischen Bereich liegt. Dies zeigt, dass die Mechanosensitivität von Knochen auf physiologische Belastungsreize zu reagieren mit einer erhöhten Syntheserate von Matrixproteinen und einer erhöhten Mitoserate einhergeht. Somit findet man bei sportlich aktiven Menschen eine erhöhte Knochenmasse [132]. Hingegen zeigen Menschen, die nicht der Schwerkraft ausgesetzt sind und deren Belastung damit unterhalb einer Grenzschwelle liegt, einen Verlust an Knochendichte, der durch eine verminderte Knochenneubildung [76] und eine Abnahme der zur Synthese der Knochenmatrix erforderlichen Proteine [14] bedingt ist. Kommt es im Gegensatz dazu zu Belastungen, die über das physiologische Maß hinausgehen, ist mit einer Degeneration der Knochenstruktur zu rechnen [59].

Für ex vivo Studien an trabekulären Knochen unter definierten Kultur- und Belastungsbedingungen wurde ein präzises mechanisches Belastungs- und Messsystem, kombiniert mit einer Kultur-Belastungs-Kammer entwickelt. Das Belastungssystem kann hierbei in zwei Modi arbeiten. Entweder man lässt eine definierte Kompression oder aber eine definierte Kraft auf einen Knochenzylinder einwirken. Da die beiden Größen auseinander hervorgehen, stellt die jeweils resultierende andere Größe die Unbekannte dar. Zur Zeit können Proben im Frequenzbereich von 0,1 bis 50 Hertz dynamisch stimuliert werden. Die Genauigkeit der Kompression beträgt dabei ± 0.5 bis $\pm 1.5 \mu\text{m}$.

Das System erlaubt akkurate Messungen vielerlei mechanischer Eigenschaften des zu untersuchenden Gewebes. Der piezo-elektrische Aktor kann sowohl Quasi-Statistische-Belastungen als auch eine Vielzahl periodischer Oszillationsmuster erzeugen, während Kraft und Kompression simultan gemessen werden. Kraft und

Kompression werden zur Berechnung der scheinbaren Steifigkeit des Knochens und für dessen physikalische Änderung während seiner Kultivierung verwendet. Das komplette System ist unter dem Namen ZETOS bekannt (United States Patent 6. July, 1998, No: US 6.171.812; Everett L. Smith, David Jones: Combined perfusion and mechanical loading system for explanted bone/ United States Patent 19. March, 2002, No: US 6.357.303 B2; Everett L. Smith, David Jones: Mechanical Testing Device). Es setzt sich aus zwei Wörtern zusammen. Der griechische Buchstabe ζ (Zeta) wird als Symbol für "strain" (relative Kompression) verwendet, während das lateinische Wort "Os" für Knochen steht.

Es wurde eine Vielzahl von in vivo- und in vitro-Modellen entwickelt, um mechanisch induzierte Veränderungen im Knochenmetabolismus und in dessen Morphologie zu untersuchen. Trotz großer Fortschritte ist der Mechanismus, welcher sich hinter der mechanischen Transduktion verbirgt, sowie die Tatsache, welcher Zelltyp (bzw. Zelltypen) hierfür verantwortlich ist, noch nicht restlos aufgeklärt.

Die bisherigen Modelle verwenden Zellkulturen [136, 138], Organkulturen [93, 15] oder betrachten den Gesamtorganismus [1, 99, 95, 16]. Dabei verwenden sie entweder hydraulische Systeme oder eine Vielzahl von Hebeln, Nockenwellen oder Schrauben, um ein Gewebe mechanisch zu stimulieren oder seine physikalischen Eigenschaften zu bewerten [2, 38, 96, 40, 111, 74, 75, 125]. Andere Belastungssysteme verwenden Dehnungsmessstreifen, die an ganzen Knochen oder an Knochenstücken angebracht werden, um anhand einer limitierten Anzahl von Messungen die elastische Kompression einzuschätzen oder zu berechnen. Die verwendeten Systeme sind jedoch größtenteils nicht dazu befähigt, die Amplitude, Richtung, Art und Frequenz zu imitieren, welche in der komplexen Natur der physiologischen Belastung in vivo auftritt. Auch eine engmaschige Kontrolle der Kraft und der Kompression in Form von Echtzeitmessungen während einer dynamischen Belastung ist bei den angesprochenen Systemen, vor allem bei Frequenzen über 10 Hz, nicht möglich.

Daher ist ein präzises und stabiles Belastungssystem notwendig, um eine definierte mechanische Belastung auf Knochenzylinder auszuüben. Es muss zudem gewährleistet sein, dass diese eine große Varianz in ihrer Struktur und ihren physikalischen Eigenschaften aufweisen können.

1.1 Der ZETOS

Das ZETOS-Belastungssystem besteht aus einem Rahmen von Stahlbolzenschrauben, verbunden mit einem Aluminiumgehäuse und jeweils einer oberen und unteren Endplatte aus Stahl. Ein Schraubsystem bewegt die Belastungseinheit, bestehend aus dem Kraftsensor [KISTLER, Schweiz] und dem piezo-elektrischen Aktor (PEA) [Physik Instrumente, Deutschland] nach oben oder nach unten. Durch manuelle Bedienung des Schraubsystems kann eine geringe statische Vorlast auf die Knochenzylinder ausgeübt werden. Dies bringt die Linse des PEA in Kontakt mit der Knochenoberfläche. Das Gerät ist mit Dehnungsmessstreifen versehen, welche ermöglichen, dass präzise Messungen der Ausdehnung des Gerätes ermittelt werden können. Der PEA besteht aus einem Stapel von piezo-Kristallen, welche in einem wasserresistenten Mantel eingebettet sind. Er kann eine Kraft von bis zu 4500 Newton ausüben, wobei das Maximum der PEA-Ausdehnung von der Belastungsapplikation abhängt. Während des dynamischen Arbeitsvorgangs, korreliert die Amplitude der Expansion mit der Frequenz des Arbeitsgangs in Kombination mit der Resonanzfrequenz des PEA. Diese steht wiederum in Verbindung mit der effektiv schwingenden Masse, der Viskoelastizität und Steifigkeit des Knochens.

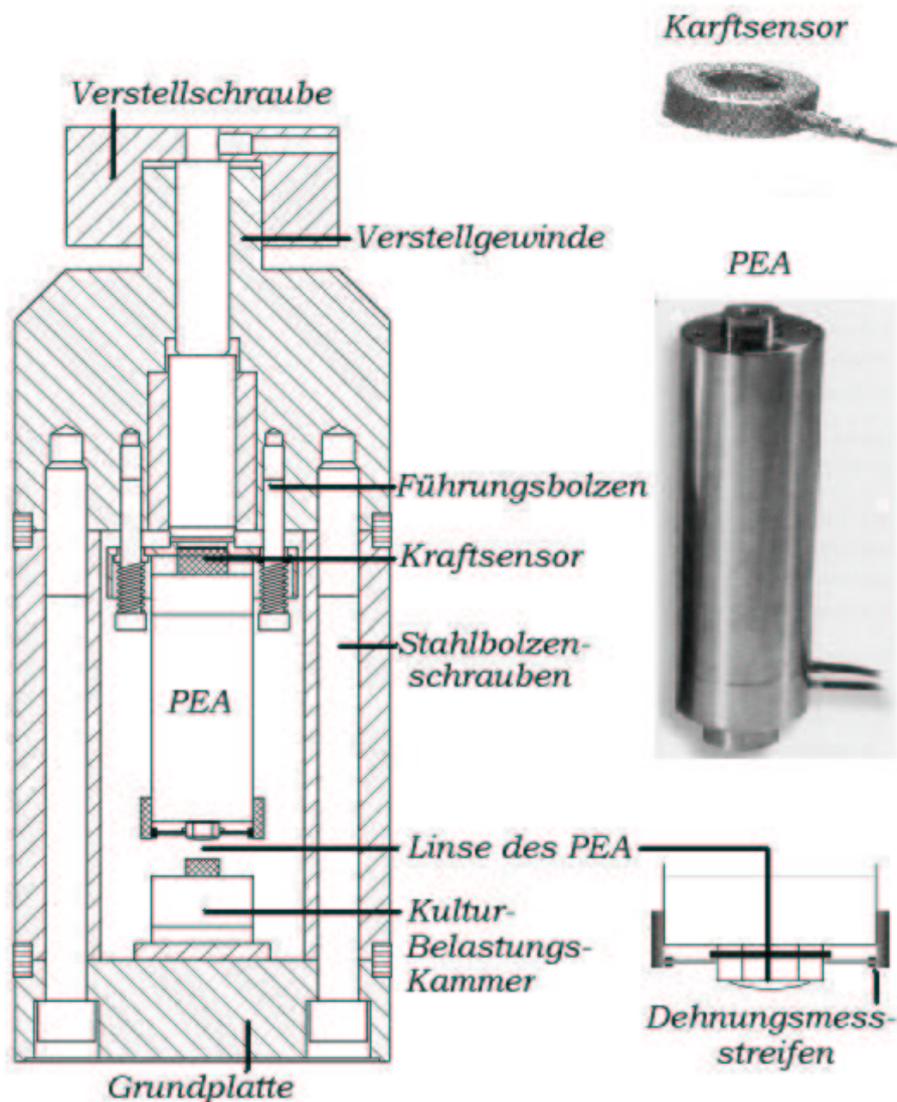


Abbildung 2: Aufbau des ZETOS-Belastungssystems

Die untere Kontaktfläche des PEA ist mit einer Saphir Plan-Konvexen Linse [Victor Kyrburz AG, Schweiz] versehen. Die kugelförmige Natur der Linse erlaubt eine adäquate Adaption an die zu belastende Knochenoberfläche, die möglicherweise nicht zu 100 % planparallel ist und verhindert somit das Auftreten einer Biegelast innerhalb des Kristall-Stempels.

Ein Hochspannungsverstärker [Physik Instrumente, Deutschland], dessen Eingang mit einem Analogausgang der Mikrokontroller-Schaltung verbunden ist, ak-

tiviert den PEA. Zusammen mit einem WINDOWS-Benutzerprogramm (siehe Abb. 3) ist es nun möglich, eine quantifizierte Kraft oder eine quantifizierte Kompression der Knochenzylinder in der Kultur-Belastungs-Kammer zu erreichen.

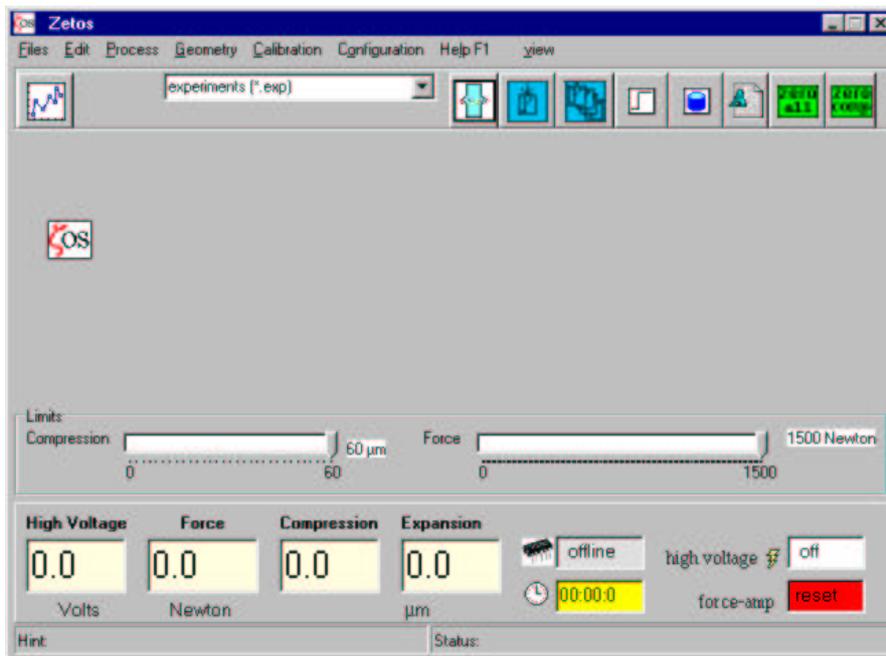


Abbildung 3: Oberfläche des WINDOWS-Benutzerprogramms

Der Mikrokontroller und das damit verbundene Elektronische-System (siehe Abb. 4) sowie die Sensoren arbeiten unabhängig von dem Betriebssystem des PC's. Die Echtzeit-Messdaten der Ausdehnung (Dehnungsmessstreifen) des PEA sowie die auf die Knochenzylinder einwirkende Kraft werden erfasst und anschließend abgespeichert. Das Design der Kultur-Belastungs-Kammer (siehe 2.1.3), in welcher der Belastungskolben (Piston) abgedichtet ist, ist mit einem X-Ring [Basag & Shamban S.A. Crissier, Schweiz] versehen. Er erlaubt eine Anpassung an eine nicht vorhandene Parallelität von bis zu 50 μm , wobei durch die präzise Aufarbeitung der Knochenzylinder mit einer Rauigkeit und Nicht-Parallelität von zirka 7 μm ausgegangen werden muss.

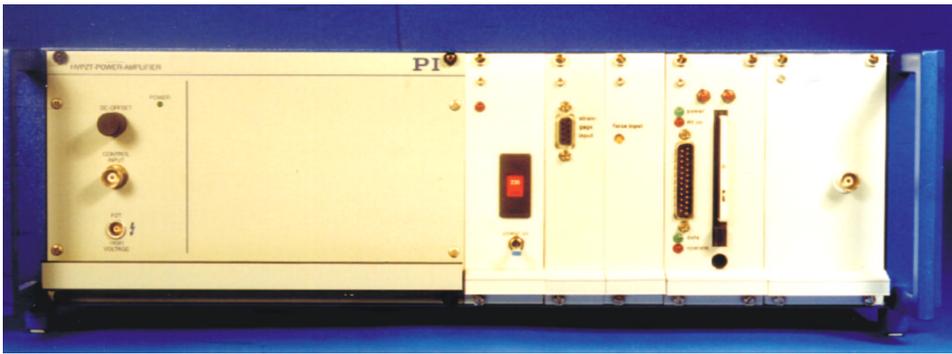


Abbildung 4: Elektronisches-System des ZETOS

Ein Hochspannungs piezo-Aktor-Verstärker [Physik Instrumente, Deutschland], welcher eine Kapazität von 0 bis 1000 Volt aufweist, steuert den PEA. Er besitzt ein eigenes Netzteil und wird über den Mikrokontroller des Elektronischen-Systems ein- und ausgeschaltet.

Der piezo-Kraftsensor [KISTLER] wird für die Messung der Krafteinwirkung auf den Knochen verwendet. Die Kraftantwort des Sensors in Form einer elektrischen Ladung ist linear zu der Größe der Kraft, welche auf den Sensor einwirkt.

Bei einer Quasi-Statistischen-Messung glättet ein Tiefpassfilter die Arbeitsspannung des PEA, um eine dynamische Stimulation zu verhindern. Weiterhin wird der PEA nach der Messung langsam entlastet (10 Sekunden), da auch ein abrupter Rückgang zu einer derartigen Stimulation führen kann (siehe Abb. 5).

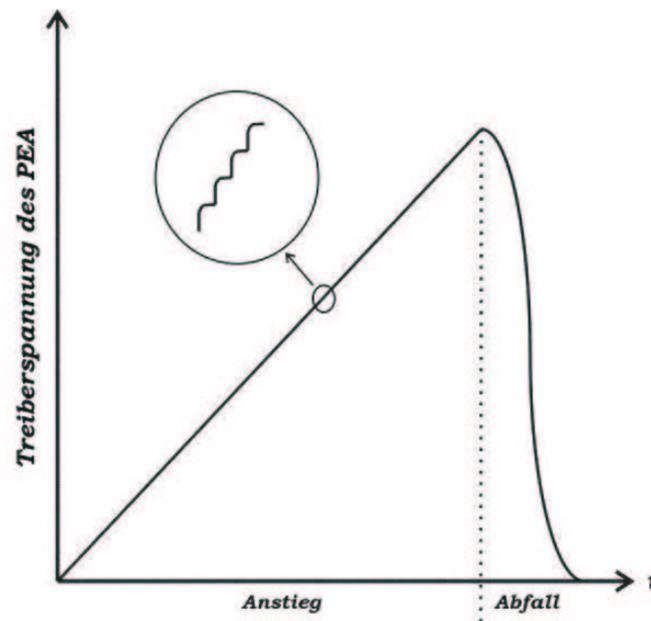


Abbildung 5: Verlauf einer Quasi-Statistischen-Belastung

1.2 Das E-Modul

1.2.1 Quasi-Statistische-Belastung

Um die scheinbare Steifigkeit von Knochen oder Referenzkörpern messen zu können, wird eine Quasi-Statistische-Belastung durchgeführt. Hierbei lässt man über 30 Sekunden (die Zeit ist jedoch prinzipiell frei wählbar) die Kraft langsam in Schritten von 300 bis 1000 Newton ansteigen. Das Maximum der resultierenden Kompression wird zuvor festgelegt, um die Knochenzylinder nicht über die Frakturgrenze hinaus zu belasten (Gefahr von Mikrofrakturen).

Während der Belastung wird die aufgewendete Kraft mit der aus ihr resultierenden Kompression simultan gemessen und die ermittelten Daten elektronisch gesammelt und gespeichert. Um nun die scheinbare Steifigkeit der Knochenzylinder zu berechnen, muss man den reziproken Verlauf der linearen Regressionslinie über ein frei wählbares Kraftintervall auftragen. Dies bedeutet, dass die scheinba-

re Steifigkeit aus der Ausgleichsgeraden der Kompression-Kraft Kurve gewonnen wird. Im Falle eines nicht-linearen Verlaufs wird auf der Kraftachse ein Intervall gewählt, welches wenigstens einen nahezu linearen Verlauf aufweist.

Das Kontrollprogramm des Systems ermittelt nun zunächst die tatsächliche Steifigkeit, welche über das Hook'sche Gesetz definiert ist:

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

s : = Steifigkeit
 f = Kraft
 c = Kompression

Der Vorteil des Systems liegt darin, dass es eine große Anzahl von Daten (zirka 300) $\{f_1, \dots, f_n\}, \{c_1, \dots, c_n\}$ in einem bestimmten Kraftintervall $\{f_1, \dots, f_n\}$ sammelt, anstatt sich lediglich auf die Maximal- und Minimalwerte der Messparameter zu beschränken $(f_{max}, c_{max}), (f_{min}, c_{min})$. Anhand der dadurch entstehenden Kurve kann der gesamte Verlauf der Quasi-Statistischen-Belastung des Knochenzylinders nachvollzogen werden. Die scheinbare Steifigkeit folgt aus der Steigung der Regressionsgeraden über diese Werte. Das Programm errechnet die Steifigkeit in der Maßeinheit eines Elastizitäts-Moduls (Y, Einheit Mega Pascal [MPa] oder Giga Pascal [GPa]), indem es die zylindrischen Parameter (in diesem Fall des Knochens) 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:

$$Y = s \frac{h}{\pi r^2} \qquad \pi r^2 = \text{Stirnflaeche}$$

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

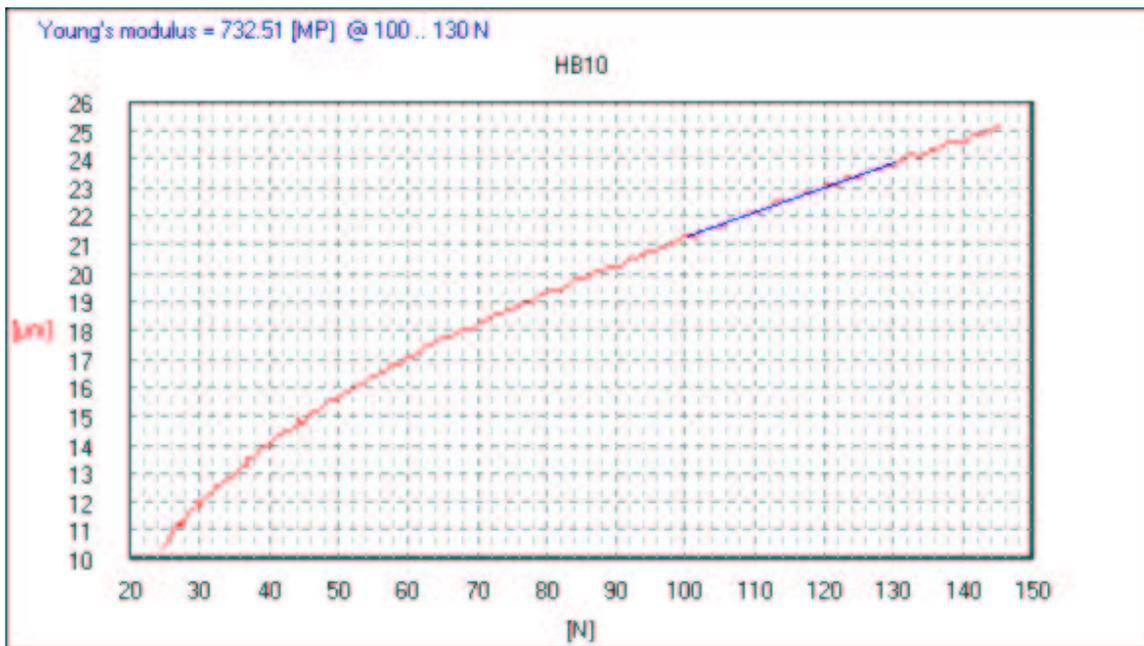


Abbildung 6: Graphische Darstellung der scheinbaren Steifigkeit, wie sie vom Benutzerprogramm errechnet wird

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

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

$$A = \text{Stirnflaeche}$$

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

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

1.3 Der Knochen

Die Knochen und damit das Skelett sind für die Formgebung und Fortbewegung des Körpers eine notwendige Voraussetzung, weshalb man sie in allen höheren Vertebraten vorfindet. Neben ihrer Funktion als Stützorgan dienen sie zusätzlich als Kalziumspeicher.

Beim Knochen handelt es sich um ein hochspezialisiertes und äußerst komplexes Bindegewebe, dessen metabolisch aktive Zellen in einer mit Kalziumsalzen mineralisierten organischen Matrix vorliegen oder ihr anliegen.

95 % der organischen Matrix bestehen aus Kollagen Typ-I, welches für die Zugfestigkeit des Knochens verantwortlich ist. Proteoglykane, welche aus Glykosaminoglykanen (Polysaccharidketten) aufgebaut sind, und eine Vielzahl an "Nichtkollagenen Proteine" bilden die restlichen 5 %.

Auch das Osteokalzin, welches zur Zeit das am besten charakterisierte Knochenprotein ist, sowie weitere "Nichtkollagene Proteine" z.B. Osteopontin, Bone Sialoprotein, Osteonektin usw. sind in der Knochenmatrix vorhanden. Die Ablagerung von Kalziumsalzen und Kristallen, die dem Hydroxylapatit $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ sehr ähnlich sind, erfolgt unter zellulärer Kontrolle. Diese Hydroxylapatite sind in einem Abstand von 60 bis 70 nm längs der Kollagenfibrillen angeordnet und werden durch die umgebende Grundsubstanz stabilisiert. Damit verleihen sie dem Skelett seine Kompressionsfestigkeit, wobei einige Prozente an Elastizität immer aufrechterhalten bleiben. Infolge mechanischer Belastungen kommt es zu ständigen Umbauvorgängen, wodurch die Knochen trajektorieell ausgerichtet werden.

Neben diesen ständig bestehenden mechanischen Belastungen wirken verschiedene Hormone auf den Knochen ein, die unter anderem das Knochenwachstum modulieren und zur Konstanz des Kalzium- Blutspiegels des Individuums beitragen.

1.4 Die Knochenzellen

Der Knochen besteht aus vier verschiedenen Zelltypen. Hierbei befinden sich Osteoblasten, Osteoklasten und Bone Lining cells an der Knochenoberfläche, während die Osteozyten in der mineralisierten Matrix lokalisiert sind.

Osteoblasten, Osteozyten und Bone Lining cells entstammen lokalen Osteoprogenitorzellen (mesenchymale Vorläuferzellen) [112, 113, 114], wohingegen sich Osteoklasten aus der Fusion von mononukleären Vorläuferzellen [21, 52] hämatopoetischer Gewebe (wahrscheinlich granulocyte and macrophage colony-forming cells "CFU-GM") entwickeln.

1.4.1 Osteoblasten

Osteoblasten entwickeln sich aus multipotenten, mesenchymalen Stammzellen, die sich alternativ auch in Chondroblasten, Fibroblasten, Adipozyten und Myoblasten weiterentwickeln können [4]. Es handelt sich um vollständig differenzierte, kubische, stark Alkalische-Phosphatase-Positive Zellen, welche für die Produktion der Knochenmatrix verantwortlich sind. Sie sezernieren hauptsächlich Kollagen Typ-I aber auch die "Nichtkollagene Proteine" der Matrix. Hierzu zählen unter anderem Proteoglykane, Osteokalzin, Osteopontin, Osteonektin, Fibronektin, Bone Sialoprotein, Interleukine, Wachstumsfaktoren, Prostaglandine, Hormonrezeptoren und weitere. Eine Vielzahl der "Nichtkollagenen Proteine" konnte bereits isoliert werden [102], eine definitive Funktion wurde ihnen bis heute jedoch nicht zugewiesen. Als typische Protein-Produzenten besitzen die Osteoblasten einen prominenten Golgiapparat und ein gut ausgebildetes rauhes Endoplasmatisches Retikulum.

Die Mineralisierung der Knochenmatrix wird von den Osteoblasten reguliert, wobei allerdings der oder die dazugehörigen Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Sie beginnt in den Matrixvesikeln, welche an der Plasmamembran

der Osteoblasten knospen. Die Weiterentwicklung erfolgt dann von der Zelloberfläche weg in Richtung der bereits mineralisierten Matrix.

Dieser Prozess ist identisch mit der bereits gut dokumentierten Rolle von Matrixvesikeln bei der Knorpel-Mineralisierung [49]. Dem Kollagen ist hierbei eine zentrale Bedeutung zuzuschreiben, da es zumindest als Matrize für den Beginn und die Ausbreitung der Mineralisierung verantwortlich ist.

Unterhalb der Osteoblastenoberfläche verbleibt immer eine Schicht nicht mineralisierter Knochenmatrix, welche ungeordnete Kollagenfibrillen enthält und als Osteoid bezeichnet wird.

Die Ablagerung der Matrix ist normalerweise zur Knochenoberfläche hin gerichtet. In regelmäßigen Abständen kommt es jedoch zu einer Generalisierung, wobei sich die Osteoblasten mit der Knochenmatrix umgeben, sodass eine weitere Schicht an Osteozyten entsteht. Eine spätere Ablagerung von Mineralien in die organische Matrix machen diese impermeabel. Vor dieser Mineralisierung bilden die Osteozyten eine Vielzahl zytoplasmatischer Verbindungen mit angrenzenden Zellen aus, um sich eine metabolische Lebensader zu sichern.

1.4.2 Osteozyten

Osteozyten entstehen durch Transformation von Osteoblasten. Im menschlichen Knochen ist ihre Anzahl 10mal größer, als die der Osteoblasten [85]. Damit stellen sie die größte Fraktion der Knochenzellen dar.

Bei diesem Zelltyp handelt es sich um sternförmige oder dendritische, postmitotische [124], mature Osteoblasten [80, 84], die in dem Lakuno-Kanalikulären-Netzwerk des Knochens eingeschlossen sind. Während der Transformierung zum Osteozyten verlieren die Zellen die Charakterzüge eines Osteoblasten und gewinnen die für Osteozyten spezifische Merkmale, einschließlich ihrer typischen Morphologie. Osteozyten können unterschiedliche Aktivitäten aufweisen. Sie sind entweder in der Lage Matrix zu synthetisieren oder sie zu einem geringen Anteil zu

resorbieren. Damit dienen sie der Erhaltung der organischen Knochenmatrix bzw. beteiligen sich an der biochemischen Regulation der Knochenmasse und Struktur. Die funktionelle Aktivität der Osteozyten kann anhand ihrer Struktur einfach festgestellt werden. Zellen, die Matrix produzieren, besitzen die für Osteoblasten charakteristischen Zellorganellen, während osteolytisch aktive Osteozyten lysosomale Vakuolen und weitere typische Charakterzüge phagozytierender Zellen aufweisen. Um einen jeden Osteozyten inklusive seiner filopodialen Zellausläufer findet man eine dünne Schicht nicht mineralisierter Matrix, die reich an Kollagenfibrillen und Proteoglykanen [53] ist. Die Zellausläufer bilden sich innerhalb der Kanalikuli (nicht mineralisierte Matrix) der Knochenmatrix aus, um mit Zellausläufern benachbarter Zellen in Form von gap junctions [56, 22] in Kontakt zu treten. Sie verbinden aber nicht nur benachbarte Osteozyten miteinander, sondern stellen auch Verbindungen mit der inneren und äußeren Oberfläche des Knochens, einschließlich dort lokalisierter Zellen, und mit in der Matrix gelegenen Blutgefäßen her. Dadurch werden die Zellen mit Nährstoffen und Sauerstoff versorgt und können ihrerseits angefallene Metabolite abgeben, denn eine Diffusion durch die mineralisierte Knochenmatrix ist limitiert.

Die Produktion von Osteokalzin und Osteonektin ist vermutlich mitverantwortlich bei der Regulation der Kalzifizierung der Matrix. Osteopontin, Fibronektin und Kollagen Typ-I haben wahrscheinlich einen Einfluss auf die Befestigung der Osteozyten zu der sie umgebenden Knochenmatrix. Damit haben sie die Möglichkeit, ihre eigene Adhäsion und damit ihre Sensitivität für Stress-Signale zu regulieren.

Im Prinzip könnten alle Zellen des Knochens in den Mechanismus der Mechanotransduktion involviert sein, doch viele Argumente sprechen für den Osteozyten als Mechanosensor par excellence [18, 12]. Dies wird durch verschiedene Studien belegt [97, 99, 108, 90, 66].

Die direkt am Osteoid gelegenen Osteozyten stehen mit den Bone Lining cells und den Osteoblasten in Kontakt. Hierdurch können zelluläre bzw. chemische

Signale an die genannten Zellen weitergegeben werden. Dieser Vorgang wird durch eine Stress-Belastung der Osteozyten induziert.

Die Belastung eines Knochens führt unter anderem zu einer Änderung des hydrostatischen Drucks, zu einer direkten Belastung der Zellen, zu einem durch einen Flüssigkeitsfluss induzierten “shear stress” und zum Aufbau eines elektrischen Feldes, welches durch die den Flüssigkeitsfluss begleitenden elektrokinetischen Effekte ausgelöst wird. Der interstitielle Flüssigkeitsfluss ist vermutlich der durch Stress bedingte Faktor, welcher die Knochenzelle über die mechanische Belastung informiert. Hiervon ausgehend fungiert das poröse Lakuno-Kanalikuläre-System als Mediator der Mechanotransduktion und die Osteozyten als Mechanosensoren.

1.4.3 Bone Lining cells

Bone Lining cells sind begrenzende, flache, langgezogene, inaktive Zellen, die an der Oberfläche des Osteoids und an mineralisierten Knochenoberflächen anzutreffen sind. Aufgrund ihrer Inaktivität besitzen sie nur wenige zytoplasmatische Organellen. Es wird spekuliert, dass sie Vorläufer von Osteoblasten darstellen könnten.

Sie dienen als Barriere für Kalzium-Ionen [86], erhalten ein spezielles Knocheninternes Milieu [100] und spielen eine Schlüsselrolle in der Lokalisierung und Initiierung des Knochenumbaus [139].

1.4.4 Osteoklasten

Osteoklasten sind vielkernige und mobile Riesenzellen, die Knochen resorbieren. Typischerweise sind weiterhin eine stark Tartrat-Resistente-Alkalische-Phosphatase-Aktivität und eine große Anzahl Kalzitonin-Rezeptoren vorhanden.

In wachsenden Knochen werden sie für den Prozess des “Modeling” (ungekop-

pelte Funktion von Osteoblasten und Osteoklasten) gebraucht, in Adulten sind sie mitverantwortlich für das "Remodeling" (gekoppelte Funktion von Osteoklasten und Osteoblasten).

Wenn es für die Aufrechterhaltung der Kalzium-Homöostase des Körpers notwendig ist, kann es zu einer exzessiven Resorption kommen, die über das normale "Remodeling" hinausgeht, um dem Körper genügend Kalzium zu Verfügung zu stellen. Aktive Osteoklasten, welche polar orientiert sind, findet man typischerweise in Lakunen des resorbierten Knochens. Die Zellkerne sind an der von der Knochenoberfläche abgewandten Seite lokalisiert und durch Zytoskelett-Proteine untereinander verbunden [129].

Die ringförmige Aussenzone (basolaterale Zelloberfläche) der Osteoklasten stellt ein Mikrofilament-reiches und Zellorganellen-freies Areal dar und wird als "clear zone" bezeichnet. Von dieser umgeben findet man das apikale Plasmalemm, welches zentral zum Knochen gelegen ist und durch die rasante Fusion säurehaltiger intrazellulärer Vesikel entsteht. Es besitzt eine spezifische, häufig verzweigte Resorptionsstruktur in Form eines Bürstensaums und wird als "ruffled border" bezeichnet.

Mit Hilfe von Podosomen heften sich die Osteoklasten an die extrazelluläre Matrix an. Der Vitronektin Rezeptor (avb3 Integrin) ist der bedeutendste Integrin-Typ in den Podosomen der Osteoklasten, da er die Aktinfilamente des Zytoskeletts mit den Proteinen der extrazellulären Matrix verbindet.

Es ist evident, dass der Abbau des Kollagens und anderer Knochenmatrix-Proteine in der extrazellulären Resorptionslakune stattfindet. Der einzige Zustand, bei dem mineralisierter Knochen, welcher hauptsächlich aus kristallinem Hydroxylapatit besteht, aufgelöst werden kann, ist ein saurer pH. 1984 demonstrierten FALLON et al., dass in den Resorptionslakunen ein saures Milieu vorliegt. Die Ansäuerung wird hierbei durch eine V-Protonen-ATPase erreicht [5, 7, 123] und verläuft in zwei Phasen. Zu Beginn des Resorptionsprozesses fusionieren die säu-

rehaltigen Vesikel, wodurch die "ruffled border" entsteht und es folglich schnell zur Ausbildung eines schmalen säurehaltigen Kompartements zwischen der Zellmembran und der Knochenoberfläche kommt. Es wird vermutet, dass die Aufrechterhaltung der Azidität der Resorptionslakunen entweder durch die kontinuierliche Fusion neuer säurehaltiger Vesikel oder durch das Ausschleusen von Protonen gewährleistet wird. Am wahrscheinlichsten ist, dass beide Prozesse dafür verantwortlich sind. Ob auch ein Na/ H -Antiporter [42] oder weitere Strukturen in den Prozess involviert sind, bleibt abzuwarten.

Nachdem die Hydroxylapatit-Kristalle (minerale-Phase) aufgeschlossen sind, wird die organische Matrix abgebaut. Hierfür sind eine Reihe proteolytischer Enzyme verantwortlich, wobei vor allem den lysosomalen Zystein-Proteinasen (Kathepsin B, D, L, K, O, S) und Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) eine besondere Bedeutung zukommt.

MMP-1 wird von Osteoblasten produziert und sezerniert und ist verantwortlich für den Abbau des Osteoids oberhalb der mineralisierten Matrix. Die Entfernung des Osteoids ist ein notwendiger Schritt für die weitere Tätigkeit der Osteoklasten. Anschließend erfolgt die Produktion von MMPs sowie von lysosomalen Zystein-Proteinasen durch die Osteoklasten selbst, wobei dem Kathepsin B die größte kollagenolytische Aktivität zugeschrieben wird. Eine wichtige, wenn auch noch nicht vollständig geklärte Rolle kommt dem Kathepsin E zu. Es ist entweder für den Abbau der Matrix, für die Erneuerung der "ruffled border" oder für den Prozess des Anheftens und Trennens der "ruffled border" von der Knochenmatrix wichtig.

Proteinfilamente und zahlreiche Mikrotubuli und Intermediärfilamente verleihen den Osteoklasten die Fähigkeit, sich zu polarisieren, spezifische Bewegungen zu koordinieren und sich an die Knochenmatrix zu binden. Osteoklasten lösen sich nach der Knochenresorption von der Knochenoberfläche, heften an anderer Stelle am Knochen wieder an und beginnen dort erneut mit dem Knochenabbau oder aber es kommt zum Zelltod. Pro Zeiteinheit bauen sie bis zu drei mal mehr

Knochenmatrix ab als von Osteoblasten aufgebaut wird.

Beim Differenzierungsprozess der Osteoklasten-Vorläuferzellen in Osteoklasten, spielen "Osteoblastische Zellen" durch Zell-zu-Zell-Interaktionen eine zentrale Rolle, denn sie sind die Zielzellen osteotrophischer Hormone und Zytokine. Hierzu zählen unter anderem das Parathormon (PTH), 1α -25-dihydroxyvitamin D_3 , Interleukin- 1β (IL- 1β), IL-6, IL-11 und der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) [115, 117, 121, 122, 47]. Weiterhin produzieren "Osteoblastische Zellen" lösliche Faktoren wie z.B. M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) [137, 118] und Komplement C3 (reguliert durch 1α -25-dihydroxyvitamin D_3) [104, 50, 58], welches die Entwicklung der Osteoklasten reguliert. M-CSF spielt aber nicht nur eine wichtige Rolle in der Proliferation und Differenzierung der Osteoklasten-Vorläuferzellen, sondern ist auch essentiell für die Migration, Chemotaxis [34] und für das Überleben reifer Osteoklasten [57].

Das Netzwerk aus Osteoprotegerin (OPG), RANK (Receptor activator of NF- κ B) und RANKL (Osteoclast differentiation factor = ODF; Osteoprotegerin ligand = OPGL), welches die Osteoklastengnese und die Osteoblasten/ Osteoklasten Interaktion moduliert, ist erst seit wenigen Jahren bekannt.

1.5 Osteoprotegerin (OPG)

Osteoprotegerin, auch Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) genannt, ist ein Glykoprotein, welches 1997 als ein Angehöriger der Tumornekrosefaktor-Rezeptor Superfamilie identifiziert (TNF-R) wurde [107, 134].

Es handelt sich um einen löslichen Rezeptor, der von verschiedenen Geweben gebildet wird und als "decoy receptor" die Interaktion zwischen RANK und RANKL [135] und damit die Schritte der Rekrutierung, Proliferation und Aktivierung der Osteoklasten blockiert. Die daraus resultierenden biologischen Effekte von OPG stellen das Gegenteil derer von RANKL dar, welches die Osteoklastentätigkeit för-

dert. Weiterhin ist OPG in der Lage, TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) zu binden und so die durch diesen Liganden induzierte Apoptose zu unterbinden.

Somit wirkt OPG als potenter Inhibitor des Knochenabbaus [107, 134, 120, 73]. Tierversuche an transgenen Mäusen haben gezeigt, dass es bei einer Überexpression von OPG zu einer Osteopetrose kommt und dass das Glykoprotein zudem vor einem konsekutiven Knochenverlust nach einer Ovarioektomie schützt.

Die Expression und Regulation von OPG wird durch verschiedene Zytokine, Peptide, Hormone und Medikamente beeinflusst. Sowohl Zytokine wie TNF- α , Interleukin-1 α (IL-1 α), IL-18, TGF- β (transforming growth factor- β), BMP (bone morphogenetic proteins) als auch Steroidhormone wie z.B. das Östradiol-17 β steigern die mRNA-Expression von OPG [10, 127, 71, 116, 128, 17, 101, 46]. Auch mechanische Kräfte, die auf die Knochenoberfläche einwirken stimulieren die OPG Expression [62]. Hingegen verursachen Glukokortikoide, das Zyklosporin A, Parathormon (PTH), PGE₂ und FGF (fibroblast growth factor) eine Suppression der OPG-Produktion [126, 45, 48, 82, 11, 79].

RANK (Receptor activator of NF- κ B) wird an der Oberfläche von Zellen der Osteoklastenlinie (Vorläuferzellen und reife Osteoklasten), der entsprechende Ligand RANKL (Osteoclast differentiation factor = ODF; Osteoprotegerin ligand = OPGL) an der Oberfläche von Präosteoblasten expremiert [110]. Bei einem aktiven Remodeling ist RANKL immer anzutreffen [65]. Neben den Präosteoblasten produzieren aber auch aktivierte T-Zellen RANKL.

Verschiedene Zytokine wie z.B. IL-1, IL-6, IL-11, TNF- α aber auch Glukokortikoide und PTH [63] modulieren die Expression von RANKL. Durch Bindung von RANKL an seinen spezifischen Rezeptor RANK [3, 78, 51, 77, 39] wird dieser stimuliert. Infolge einer dadurch intrazellulär ausgelösten Signalkaskade [94] kommt es zu einer Osteoklastenformation, -fusion, -differenzierung [65, 134, 72] und -aktivierung [65, 35, 13]. Zum anderen wird die Apoptose [35] der Osteoklasten gehemmt. Dies führt zu einer progressiven Knochenresorption und damit zum

Knochenabbau [65, 64].

Folglich nimmt das Zytokinnetzwerk aus RANKL, OPG (beides parakrine Mediatoren) und RANK eine Schlüsselrolle in der Regulation des Knochenmetabolismus und der Osteoklasten-Biologie ein.

1.6 Das Remodeling

Unter dem Remodeling versteht man den Knochenumbau, welcher durch das gekoppelte Zusammenwirken von Osteoklasten und Osteoblasten entsteht. Dieser Mechanismus tritt als Reaktion auf ein gewisses Maß an Verformung (strain) am Knochen in Erscheinung. Nach FROST [32] beträgt diese 1500 bis 3000 μ strain.

Jeder Knochen nimmt auf ihn einwirkende externe Kräfte oder Stimuli wahr, reagiert auf sie und passt sich den unterschiedlichen Gegebenheiten an. Eine wesentliche Eigenschaft des Remodeling ist, dass es multifokal am Knochen auftritt und dabei eine Gruppe verschiedener Zellen rekrutiert. Etwa 20 % der spongiösen Knochenoberfläche befindet sich zu jeder Zeit im Remodeling.

An verschiedenen Stellen des Knochengewebes entstehen kleinste zelluläre Struktureinheiten, die BMUs (basic metabolic units), welche für das Remodeling verantwortlich sind. Dies ist dadurch gegeben, dass sie aus verschiedenen Zelltypen, unter anderem aus Osteoblasten und Osteoklasten bestehen. Je nachdem, welche dieser Zellarten dominiert, kann das Remodeling potentiell zu einer Erhöhung oder zur Erniedrigung des Knochenvolumens führen.

In trabekulären Knochen liegen die BMUs entlang der Knochenoberfläche, welche mit Bone Lining cells gesäumt ist. Möglicherweise dienen Bone Lining cells, die durch Osteozyten, welche nach einer mechanischen Belastung IGF-I exprimieren, aktiviert werden, zur Neubildung der BMUs. Sie können aber auch selbständig auf mechanische Kräfte reagieren. Dabei nehmen lokale und zirkulierende Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren Einfluss auf die Formierung einer BMU.

Das Remodeling basiert letztendlich auf einem Prozess, der stets nach dem selben Prinzip abläuft: Organisierung der BMU, Aktivierung von Osteoklasten und Osteoblasten, Resorption von altem Knochen, Formierung einer neuen Knochenmatrix und Mineralisierung. Über die Lebensdauer einer BMU und wie deren Entwicklung kontrolliert wird, ist sehr wenig bekannt. Fest steht, dass innerhalb der BMU kontinuierlich neue Zellen gebildet werden müssen, um diesen Entwicklungsprozess zu sichern, da die Lebensdauer individueller Zellen unter der der BMU liegt.

Die Organisierung einer BMU beginnt mit deren Erschaffung. Hierzu müssen sich zunächst initial Zellen ansammeln, welche eine neue BMU bilden sollen. Dafür müssen jedoch genügend Vorläuferzellen verfügbar sein. Hierbei spielen eine große Anzahl von Hormonen und Zytokinen eine zentrale Rolle.

Eine BMU kann sich an jeder Stelle der Knochenoberfläche bilden [88]. Es ist wichtig, zwischen der Erschaffung und der Aktivierung einer BMU zu differenzieren. Die Erschaffung geschieht nur einmal an einer untätigen Oberfläche oder in Nachbarschaft einer Mikrofraktur. Die Aktivierung ist ein kontinuierlicher Prozess, welcher an der vordersten Front (Schnittkante) einer BMU stattfindet. Als Voraussetzung dafür, dass sich eine BMU ausbreiten kann, muss zunächst auch die noch nicht in den Prozess involvierte Knochenoberfläche aktiviert werden. Die Front einer BMU schreitet zirka 10 μm pro Tag fort.

Die Aktivierung der Knochenoberfläche beginnt mit den bereits oben erwähnten Bone Lining cells. Wenn diese Hormonen unterworfen werden, verändern sie ihre Form von flachen epithelähnlichen Zellen zu runden Zellen, und machen dabei einen Teil der Kollagenmatrix zugänglich. Weiterhin sondern sie Kollagenasen ab, um das Knochenmineral zu entblößen. Das beim Kollagenabbau entstehende Hydroxyprolin kann als qualitativer und quantitativer biochemischer Marker für die stattfindende Knochenresorption verwendet werden.

Bei der durch die Aktivierung der Bone Lining cells induzierten Rekrutierung

der Osteoklasten spielen systemische Hormone, Wachstumsfaktoren, Interleukine und Zytokine eine wesentliche Rolle, indem sie den Vorläufer-Zell-Pool erweitern.

Bei der Resorption unterscheidet man zwischen zwei Phasen. Die erste dauert zirka 8 Tage und verläuft damit äußerst schnell. Sie wird von multinukleären Osteoklasten getragen. Dann folgt die zweite langsamere Phase, die zirka 34 Tage andauert [24], bei der auch mononukleäre Zellen beteiligt sind.

Multinukleäre Osteoklasten sind für zirka 12 Tage aktiv [89] und unterliegen dann einer Apoptose. Dieser Prozess wird möglicherweise durch TGF- β eingeleitet. Die durch Apoptose untergehenden Zellen findet man an der Verbindungsstelle zwischen resorbierender Oberfläche und deren Umkehrfläche. Dies lässt vermuten, dass dieser Prozess auch in der Signalwirkung zur Bildung neuer Osteoklasten eine Rolle spielt.

Osteoklasten sondern Zytokine wie z.B. Interleukin-6 ab, welches als Signal für eine neue Osteoklastentätigkeit dient. An der Knochenoberfläche bilden aktive Osteoklasten eine Resorptionslakune (Howship-Lakune) oder dehnen sich über einen Bereich aus [41, 54, 87]. Die Tiefe der Resorptionslakune ist von der Lebensdauer der aktiven Osteoklasten und deren Neurekrutierung abhängig. Wenn sich die Howship-Lakune durch den gesamten Trabekel zieht, ist es möglich, dass ein Teil des Trabekel isoliert wird. Das dabei entstehende Fragment verliert die Fähigkeit, auf mechanische Kräfte zu reagieren und besitzt keine strukturelle Funktion mehr. Solche Fragmente sind letztendlich Opfer einer schnellen Resorption und können vollständig verschwinden [20, 41, 55], wodurch der Verlust an Knochenmasse erhöht wird.

Während der Resorption werden knochenabhängige Wachstumsfaktoren freigesetzt. Dazu zählen z.B. TGF- β , IGF und FGF, welche durch frühere Generationen von Osteoblasten in der Knochenmatrix hinterlegt wurden. Daher handelt es sich um einen autokrinen Mechanismus. Einige Faktoren, wie z.B. TGF- β , werden wahrscheinlich durch das saure Milieu aktiviert, welches durch die Protonense-

ekretion der Osteoklasten entsteht.

Die bei diesem Schritt freiwerdenden Wachstumsfaktoren sind wichtig für die Rekrutierung der Osteoblasten. Je mehr Knochen resorbiert wird, desto mehr Wachstumsfaktoren werden frei. Diese Tatsache ist vermutlich beteiligt an der gekoppelten Funktion zwischen Knochenresorption und Knochenformation.

Nachdem die maximale Tiefe (bis zu 70 μm) der Howship-Lakune erreicht ist, folgt eine Umkehrphase, die zirka 9 Tage andauert [24]. Während dieser Phase nähern sich die Osteoblasten dem Boden der Lakune an. Darauf beginnt eine Gruppe von Osteoblasten mit der Produktion von Osteoid. In vivo beginnt das Osteoid nach zirka 13 Tagen mit einer Rate von 1 μm pro Tag zu mineralisieren. Die Osteoblasten produzieren solange Osteoid bis die Lakune vollständig oder annähernd aufgefüllt ist. Dieser Prozess dauert bei einem gesunden Individuum 124 bis 168 Tage [24].

Die neuen Osteoblasten am Boden der Höhle sind plump und vigorös, besitzen einen großen Nukleus und produzieren eine dicke Schicht an Osteoid. Mit Abnahme der Osteoid-Produktion flachen die Osteoblasten ab und wandeln sich zu untätigen Bone Lining cells um. Einige der Osteoblasten entwickeln sich zu Osteozyten und werden damit Bestandteil des neu formierten Knochens. Benachbarte Osteoblasten sind immer gleichaltrig; man findet nie gleichzeitig plumpe und flache Zellen. Neu rekrutierte Osteoblasten schließen sich demnach nicht der Gruppe von Osteoblasten an, welche bereits mit dem Auffüllen der Resorptionslakune begonnen haben sondern lagern sich am Rand einer BMU an.

Die Dichte der Osteoblasten am Entstehungsort der BMU variiert. Wenn die Zellen sich gruppieren, werden sie größer und begrenzter. Als Kollektiv können sie mehr Osteoid bilden als einzelne Zellen.

Ein Großteil der Physiologie des Remodelings wurde mit Hilfe von Tetrazyklin markierten Knochenbiopsien ermittelt. Vor allem die Erkenntnisse von FROST und PARAFITT [30, 31, 89] haben hierzu beigetragen.

Ein hoher Prozentsatz (40-60 %) der Osteoid-Oberfläche verbindet sich jedoch nicht mit dem Fluochrom Tetrazyklin. Ursache hierfür könnte sein, dass das neu gebildete Osteoid noch nicht mineralisiert ist. Dies trifft aber nur für 7 % [83] des Tetrazyklin freien Osteoids zu. Auch terminales Osteoid, welches am Ende der Formation persistiert, mineralisiert zu langsam, um gemessen zu werden. Eine weitere Möglichkeit für die nicht stattfindende Markierung durch das Tetrazyklin, besteht in einer diskontinuierlichen Bildung des Osteoids [29]. Studien an Menschen und Tieren unterstützen diese Hypothese. Die Mineralisierung beginnt zirka 13 Tage nachdem das Osteoid entstanden ist. Im Normalfall ist die Rate der Osteoid-Produktion gleich der Mineralisierungsrate.

Auch andere biochemische Marker wie etwa die Knochen-Spezifische-Alkalische-Phosphatase können für den Nachweis einer Knochenneubildung herangezogen werden.

1.7 Die polychrome Sequenzmarkierung

Die polychrome Sequenzmarkierung ist ein Verfahren, mit dem sich dynamische Umbauvorgänge am Knochen darstellen lassen. Anders als bei radiologischen Verfahren, die immer nur eine isolierte Momentaufnahme wiedergeben können, gestattet die polychrome Sequenzmarkierung Ort, Zeitpunkt und Umfang von knöchernen Umbauprozessen histologisch sichtbar zu machen. Die Fluochrome bilden mit dem Kalzium Chelatkomplexe (MILCH 1958; MODIS 1969), die sich hauptsächlich entlang der Mineralisationsfronten einlagern (SUZUKI u. MATHEWS 1966; RAHN u. PERREN 1971 und 1972; MODIS 1996).

Bei der Sequenzmarkierung werden unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe in definierten Zeitabständen verabreicht, sodass in der Farbabfolge der zeitliche Verlauf der Mineralisation kodiert ist. Durch die unterschiedlich gefärbten Banden ist eine Differenzierung zwischen den einzelnen neugebildeten Knochenabschnit-

ten möglich. Auf diese Weise können Rückschlüsse auf die Dynamik der Knochenneubildung gezogen werden. Hierfür eignen sich z.B. Stoffe, wie die Farben Kalzeingrün und Xylenorange und das Antibiotikum Tetrazyklin, die keine lokale oder generelle Toxizität besitzen, welche Einfluss auf die Knochenbildung ausüben könnte. Sie werden außerdem nicht durch die Fixierung und die Einbettung in Methylmethacrylat verändert.

1958 hat MILCH als Erster beschrieben, dass sich Tetrazyklin im lebenden Knochen ablagert. Bei mikroskopischer Betrachtung eines Hartschliffes unter ultraviolettem Licht stellt sich an Stellen der Knochenneubildung eine gelbe Farb-
bande dar. RAHN und PERREN führten 1971 und 1972 das sich orange darstellende Xylenorange und den roten Alizarinkomplex ein. Das 1966 von SUZUKI und MATHEWS entdeckte Kalzein zeigt eine leuchtend grüne Bande.

1.8 Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase ist ein ubiquitär vorkommendes, membrangebundenes Plasmaenzym, das in unterschiedlichem Maße von vielen Zellen produziert wird. Besonders hohe Aktivitäten werden jedoch in Präosteoblasten und Osteoblasten des Knochens und in osteoblastenähnlichen Zellen *in vitro* gefunden [25]. Die alkalische Phosphatase dient als ein Marker für osteoinduktive Zellen [131].

Darüber hinaus korrelieren die Werte für die alkalische Phosphatase mit der histomorphometrisch bestimmten Rate der Knochenbildung. Die alkalische Phosphatase kann damit als biochemischer Index für die osteoblastische Aktivität während des appositionellen Knochenwachstums herangezogen werden [69, 130]. Da die Höhe der osteoblastischen Aktivität von der osteoinduktiven Potenz der mechanischen Belastung beeinflusst wird [43], lassen sich aus der Bestimmung der alkalischen Phosphatase Rückschlüsse auf den Grad an mechanischer Belastung, die auf den Knochen ausgeübt wird, ziehen. Das Enzym wurde in einer Vielzahl von

Arbeiten zur belastungsinduzierten Osteoneogenese verwendet und hat sich zu dem am häufigsten genutzten biochemischen Marker etabliert [9, 91, 74, 119, 70].

1.9 Die Laktat-Dehydrogenase

Die Laktat-Dehydrogenase (LDH) ist ein zytoplasmatisches Enzym und Bestandteil aller Gewebe. Bei bereits geringen Organschäden kann sie vermehrt ins Plasma übertreten und ist bei vielen pathologischen Zuständen erhöht. Da die Konzentration der LDH im Gewebe etwa 500fach höher ist als im Plasma, führt bereits ein Gewebeschaden von geringem Ausmaß zur Aktivitätserhöhung im Serum. Somit liegt der Schwerpunkt der Gesamt-LDH in der Erkennung von Gewebeschäden geringen Ausmaßes.

1.10 Apoptose

Unter Apoptose versteht man den von der Zelle selbst ausgelösten aktiven Zelltod. Man spricht in diesem Zusammenhang auch vom "programmiertem Zelltod". FLEMMING konnte im Jahre 1885 erstmalig diesen physiologisch bedeutsamen Prozess an Säugetierfollikeln beobachten [27]. In den darauf folgenden Jahrzehnten wurden noch etliche entsprechende Beobachtungen gemacht, doch erst 1972 konnte KERR et al. [60] mit Hilfe seiner Experimente an Rattenlebern das Verschwinden von Zellen beweisen. Ein Jahr später bezeichnete er diesen Vorgang als Apoptose [61]. Der Begriff Apoptose setzt sich aus zwei griechischen Worten zusammen; zum einem aus apo (ab, los) und zum anderen aus ptosis (Senkung). Sinnbildlich soll dieser Vorgang das Abfallen von welken Blättern symbolisieren.

Unter physiologischen Bedingungen stellt die Apoptose den Gegenspieler der Proliferation dar und spielt vor allem während der Embryonalentwicklung eine herausragende Rolle. So führt sie beispielsweise zum Einschmelzen der Schwimmhäute zwischen den Fingern des menschlichen Embryos oder auch zur Rückbil-

derung des Schwanzes von Kaulquappen während ihrer Metamorphose zum Frosch.

Heute unterteilt man den energieabhängigen Verlauf der Apoptose in drei Phasen [103]: In der ersten Phase, der sogenannten Einleitungsphase, kann die zelluläre Apoptose durch zwei verschiedene Mechanismen ausgelöst werden. Man unterscheidet zwischen einer Aktivierung durch die in der Zellmembran vorhandenen Todesrezeptoren und einer Aktivierung des mitochondrialen Pfades.

In einer sich anschließenden Effektorphase führen beide dieser Mechanismen dazu, dass eine Kaspasekaskade in Gang gesetzt wird, die sich selbst amplifiziert. Diese Kaspasekaskade setzt ihrerseits spezifische Endonukleasen in Gang.

Zu den typischen Anzeichen der Apoptose kommt es erst in einem dritten Abschnitt, der Degradationsphase. Diese beinhaltet die eindeutigen morphologischen Veränderungen und die internukleosomale Fragmentierung der DNA. Der komplette Ablauf dauert in vivo 6 bis 24 Stunden, wobei die Dauer vom Zelltyp abhängig ist [36].

Die morphologischen Kennzeichen einer Apoptose sind Zellschrumpfung, Erhöhung der Zytoplasmadichte und Chromatinkondensation [106]. Hierbei lagert sich das Chromatin, welches aus DNA und gebundenen Proteinen (Histone) besteht, von innen an die intakte Kernmembran an. Im weiteren Verlauf löst sich die Zelle aus ihrer Umgebung und ihr Kern bricht auseinander (Karyorrhexis). Letztendlich zerfällt die Zelle selbst in eine Vielzahl kleiner apoptotischer Körperchen (apoptotic bodies). Diese apoptotic bodies sind membranumhüllt und bestehen aus dicht gepackten Zellorganellen und Kernbruchstücken. Im Gegensatz zur Nekrose zeigen die Mitochondrien und die Zellmembran kaum Veränderungen.

Ein sehr frühes Ereignis der Apoptose ist die Fragmentierung der DNA durch endogene DNAsen. Hierbei entstehen charakteristische DNA-Bruchstücke mit 180 bis 200 bp (base pairs) [133]. Durch die Assoziation der core-DNA mit den Histonmolekülen erhalten die Bruchstücke ihre Stabilität. Im Gegensatz dazu erfolgt bei der Nekrose die DNA-Verdauung zufallsbedingt ("random-digest") infolge einer Ak-

tivierung nicht spezifischer Proteasen.

Die bei der DNA-Fragmentierung entstehenden Nukleosomen-Monomere und -Multimere lassen sich als typische DNA-Leiter auf einem Agarose-Gel darstellen [133]. Hierzu muss die DNA aus dem zu untersuchenden Gewebe isoliert und elektrophoretisch aufgetrennt werden. Besteht die zu untersuchende Probe hauptsächlich aus nekrotischem Material, so zeigt sich auf dem Agarose-Gel ein sogenanntes "Schmiermuster". Diese Methode erlaubt eine eindeutige Abgrenzung zwischen Nekrose und Apoptose. Es wird jedoch relativ viel Material benötigt, das Ergebnis ist nicht quantifizierbar und in Mischgewebe ist eine Bestimmung der apoptotischen Zellpopulationen nicht möglich [44].

Infolgedessen hat sich die TUNEL-Technik als Methode der Wahl durchgesetzt. Bei diesem Verfahren werden die Gewebeschnitte entsprechend dem unter 2.3.13 beschriebenen Protokoll behandelt.

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung der Knochenzylinder

2.1.1 Präparation der Knochenzylinder

In diesem Experiment dienen die Femurköpfe zweier gesunder Patienten (männlich, 45 bis 63 Jahre alt) mit einer Coxarthrose als Knochenspender. Im Rahmen einer totalen Hüftgelenkersatzoperation (Hüft-TEP) werden nach Durchführung der Femurosteotomie die standardisierten Knochenzylinder steril aus den Femurköpfen gewonnen.

Entfernung des erkrankten Gelenkkopfes



Abbildung 7: Schematische Darstellung der Femurosteotomie

Direkt nach Entnahme des Femurkopfes wird dieser unter sterilen Bedingungen in ein Gefäß mit isotonischer Lösung (Natriumchlorid-Lösung 0.9 %) eingelegt und in das Labor gebracht. Alle sich anschließenden Prozeduren erfolgen weiterhin unter sterilen Bedingungen.

Unter einer Sterilwerkbank wird der Hüftkopf in einer eigens hierfür entwickelten speziellen Halterung eingespannt. Mit Hilfe dieser Halterung ist es möglich, den Femurkopf beliebig zu einem Diamantsägeblatt auszurichten und Knochenscheiben mit einer Planparallelität von $\pm 2 \mu\text{m}$ herzustellen. Das Diamantsägeblatt sowie die Halterung für den Knochen sind Bestandteil einer Diamantbandsäge der Firma Exakt Apparatebau GmbH.

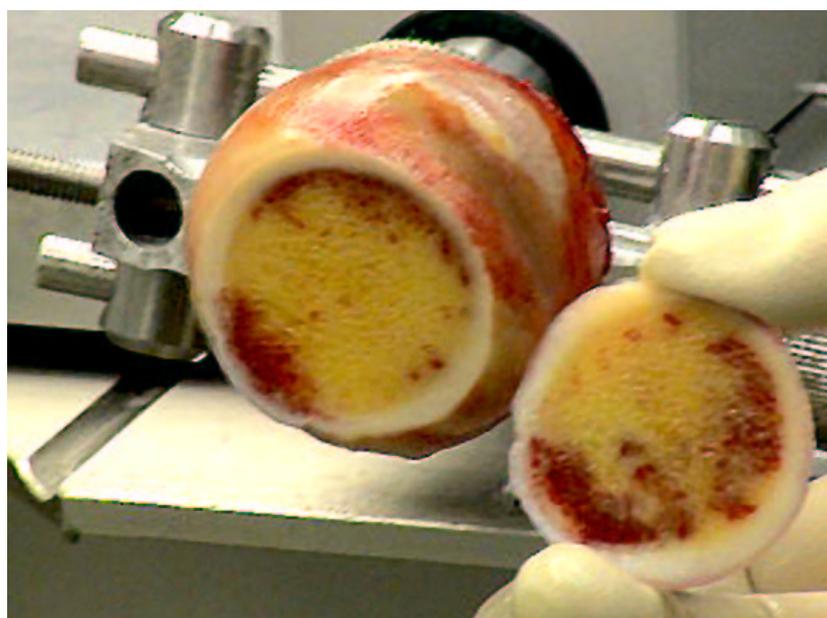


Abbildung 8: In die Halterung eingespannter und angeschnittener Femurkopf

Unter Verwendung der Bandsäge wird der Femurkopf in 8 mm dicke Scheiben gesägt. Während des Sägevorgangs wird der Knochen permanent mit auf 4°C gekühlter, steriler isotonischer Kochsalzlösung gespült. Das Spülen ist notwendig, um größere Irritationen des Knochens durch die entstehende Wärme und den Bohrstaub zu verhindern. Weiterhin werden die Explantate vor dem Austrocknen geschützt. Die einzelnen gewonnenen Knochenscheiben werden bis zu ihrer weiteren Bearbeitung in Petrischalen aufbewahrt, welche mit Phosphat-gepufferter physiologischer Kochsalzlösung (PBS) gefüllt sind. Jede Knochenscheibe erhält

hierbei eine eigene Petrischale. Für die PBS-Lösung werden 9,55 g PBS Dulbecco (Biochrom KG) in 1 Liter Aqua bidest. gelöst und für ca. 20 min autoklaviert.

Während des nächsten Arbeitsschritts werden aus den gewonnenen Knochen-scheiben die Knochenzylinder ausgebohrt. Hierfür werden die Knochenscheiben in einer speziell entwickelten Haltevorrichtung fixiert, welche mit einer Feinfräse mit Kreutztisch (Proxxon GmbH) verbunden ist. Aus den fixierten Knochen-scheiben werden anschließend mit Hilfe eines diamantbesetzten Innenlochbohrers Knochenzylinder mit einem exakten Durchmesser von 10 mm ausgebohrt.



Abbildung 9: Diamantbesetzter Innenlochbohrer

Dabei ist darauf zu achten, dass nur die makroskopisch und röntgenologisch unauffälligen spongiösen Anteile Verwendung finden. Die Präparate werden auch hierbei wieder mit gekühlter, steriler isotonischer Kochsalzlösung gespült. Nach jedem Bohrvorgang wird der Bohrer aus dem Bohrfutter gelöst und die ausgebohrten Knochenzylinder mit einem speziell entwickelten Probenextraktor aus dem Innenlochbohrer entnommen. Bis zum nächsten Arbeitsschritt werden die Knochenzylinder einzeln in mit PBS gefüllten Zentrifugenröhrchen 50 ml (Sarstedt) aufbewahrt.

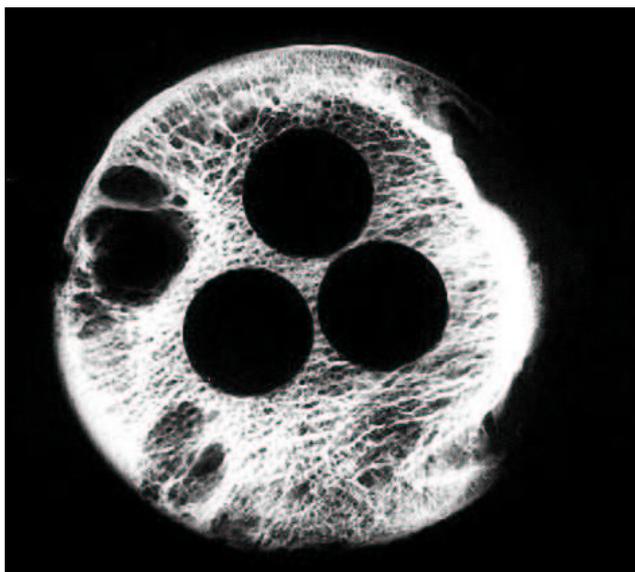


Abbildung 10: Röntgenologische (25 KV; 16 mAs) Darstellung einer Knochenscheibe. Die für die Präparation der Knochenzylinder verwendeten Bereiche erscheinen unauffällig



Abbildung 11: Makroskopische Darstellung der röntgenologisch unauffälligen Knochenscheibe

Während des Bohrvorgangs entstehen im oberen und unteren Anteil der Knochenzylinder leicht ausgefranzte Ränder. In diesem Bereich genügt das Gewebe nicht mehr den Anforderungen unserer Kulturbedingungen und wird verworfen. Hierfür werden die Knochenzylinder in eine Halterung für die oben genannte Diamantbandsäge eingesetzt und die ausgefranzten Ränder unter Spülung entfernt. Die entstehenden Knochenzylinder besitzen nun eine Höhe von 5 mm und weisen makroskopisch keine und mikroskopisch vernachlässigbare Schäden an den Schnittflächen auf.

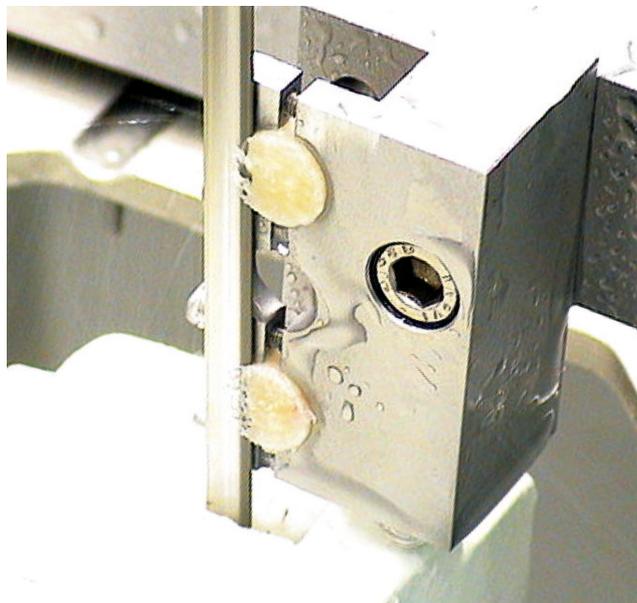


Abbildung 12: Zwei in eine Spezialhalterung eingespannte Knochenzylinder (Höhe von 8 mm) beim Schneidvorgang auf 5 mm

Damit ist die Präparation beendet; man erhält homogene, spongiöse Knochenzylinder mit einer Höhe von 5 mm und einem Durchmesser von 10 mm. Die Anzahl der Knochenzylinder, welche aus einem Femurkopf hergestellt werden können, variiert beträchtlich. In unserem Fall konnten aus den beiden Femurköpfen insgesamt 24 Knochenzylinder präpariert werden.

Zur eindeutigen und dauerhaften Identifikation bezüglich der Herkunft der Prä-

parate, werden die einzelnen Knochenscheiben digital fotografiert und gespeichert sowie die Knochenzylinder fortlaufend nummeriert (siehe Abbildungen 10 und 11). So erhält beispielsweise der erste Knochenzylinder aus der ersten Knochenscheibe den Buchstaben A (für die erste Scheibe) und die Nummer 1 (für den ersten Knochenzylinder). Diese Knochenzylinder-spezifische Identifikationskennung wird ebenfalls auf allen verwendeten Utensilien einschließlich der Kultur-Belastungs-Kammer angebracht und dient bei allen weiteren Untersuchungen zur sicheren Erkennung.

2.1.2 Aufbereitung der Knochenzylinder

Im Anschluss an die Präparation müssen die Knochenzylinder gewaschen werden, bevor sie in die Kultur-Belastungs-Kammern integriert werden können. Die Waschprozedur dient dazu, den noch vorhandenen Bohrstaub und potentielle Infektionserreger auszuwaschen bzw. unschädlich zu machen.

In einem ersten Waschschrift werden die sich in PBS befindlichen Knochenzylinder in mit 25 ml Earles-Medium gefüllte Zentrifugenröhrchen 50 ml umgesetzt. Für das Earles-Waschmedium werden 100 ml Earles Salt Solution 10x (Biochrom KG) und 7,5 ml Natriumhydrogenkarbonat 6% ig (Merck) mit Aqua bidest. auf 1000 ml aufgefüllt. Um die Waschprozedur zu intensivieren, werden die Zentrifugenröhrchen mit den Knochenzylindern für 10 min bei 25 Umdrehungen pro Minute in einen Rotator (Heidolph; "Reax2") eingespannt.

Im Anschluss wird das gebrauchte Waschmedium abgekippt und die Waschprozedur wiederholt, sodass die Knochenzylinder insgesamt 20 min in dem Earles Medium gewaschen werden.

Für einen dritten Waschgang werden die Zylinder in neue Zentrifugenröhrchen umgesetzt und dem oben verwendeten Earles Waschmedium zusätzlich 2 mg Amphotericin B (Sigma), 250000 IE Penicillin mit 250000 IE Streptomycin (PAA Laboratories GmbH) sowie 100 mg Gentamycin (Sigma) zugefügt. Der sich anschlie-

ßende Waschvorgang beträgt 20 min bei 25 Umdrehungen pro Minute.

Nach diesem letzten Waschschrift können die Explantate in die Kultur-Belastungs-Kammern integriert werden.

2.1.3 Integration der Knochenzylinder in die Kultur-Belastungs-Kammern

Die aufbereiteten Explantate werden im folgenden Schritt in die sterilen Kammer-systeme integriert. Eine Kultur-Belastungs-Kammer besteht hierbei aus einem Boden (T. Pohl Universität Marburg), einem Körper (T. Pohl Universität Marburg), zwei Saphir-Kolben (sogenannte Piston), einem Quad-Ring (Busak und Shamban S.A.), einem O-Ring \varnothing 13 mm x 1 mm, einem O-Ring \varnothing 19,5 mm x 1,78 mm und einem O-Ring \varnothing 100 mm x 2 mm (alle O-Ringe von C. Otto Gehrrens Gummi und Riemenwerke GmbH & Co.KG). Sowohl der Körper als auch der Boden werden aus Polykarbonat angefertigt.

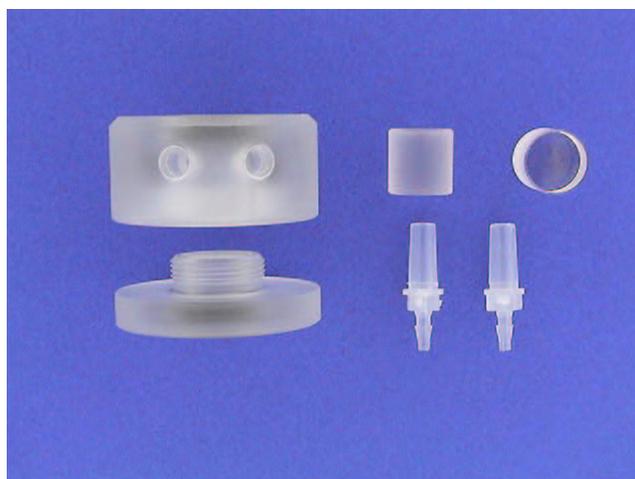


Abbildung 13: Körper, Boden, beide Saphir-Kolben und Luer-Konnektoren-männlich der Kultur-Belastungs-Kammer

Zunächst wird einer der beiden Piston in den Boden der Kultur-Belastungs-Kammer eingesetzt. Daraufhin wird ein Hohlzylinder in das gleiche Gewinde des

Körpers geschraubt, mit dem später der Kammerboden fixiert wird. Auf das obere Ende des Hohlzylinders wird der zweite Piston aufgesetzt und in den Zylinder eingebracht. Anschließend wird der Knochenzylinder nachgeschoben. Sowohl der Piston als auch das Explantat werden mit Hilfe eines Pushers in der Kammer positioniert. Zuletzt wird der Körper der Kammer mit dem Boden handfest verschraubt.



Abbildung 14: Sogenannter Pusher für die Platzierung der Knochenzylinder innerhalb der Kultur-Belastungs-Kammer

2.1.4 Anschluss der Kultur-Belastungs-Kammern an das Nährmedium

Als Nährmedium für die Knochenzylinder werden 13,38 g Dulbeccos modified Eagle Medium (Gibco), 0,37 g Natriumhydrogenkarbonat (Merck), 2,383 g HEPES (Sigma), 1,08 g β -Glycerophosphat (Sigma), 10 mg Vitamin C (Wako), 5,866 mg L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH) und 25000 IE Penicillin mit 25000 IE Streptomycin (PAA Laboratories GmbH) in Aqua bidest. gelöst und auf 900 ml aufgefüllt. Anschließend wird das Nährmedium auf pH 7,25 eingestellt und 100 ml fetales Kälberserum (Biochrom) hinzugefügt.

Da es sich bei dem verwendeten System um einen geschlossenen Kreislauf handelt, werden pro Kultur-Belastungs-Kammer folgende Gegenstände benötigt:

Kultur-Belastungs-Kammer	T. Pohl Universität Marburg
Rundbodenglas 100x16,0/ 1,2 mm	Kobe
Reservoirstopfen	T. Pohl Universität Marburg
Tygon-Schlauch ca. 7 cm (2x)	Novodirekt
Tygon-Schlauch ca. 25 cm (2x)	Novodirekt
Tygon-Schlauch ca. 90 cm	Novodirekt
Pharmed-Pumpenschlauch	Novodirekt
Luer-Konnektor-männlich (4x)	Novodirekt
Verbinder aus PP gerade (2x)	Novodirekt

Als Pumpe dient eine 24 Kanal Kassettenpumpe der Firma Ismatec.

Nach dem Zusammenbau des Schlauchsystems wird die Kultur-Belastungs-Kammer in den Kreislauf integriert und 6 ml des Nährmediums in das Rundbodenglas vorgelegt. Die nun für den Versuch vorbereiteten und in sich geschlossenen Systeme werden in einen Versuchsraum gebracht und dort an die Rollpumpe angeschlossen.

In dem abgedunkelten und auf 37° C aufgewärmten Versuchsraum befindet sich neben den Explantaten der ZETOS. Um eine Infektion der Explantate zu verhindern, darf der Raum nur mit Schutzkleidung betreten werden. Die Elektronische Steuerung des ZETOS sowie der notwendige PC befinden sich in einem benachbarten Raum.



Abbildung 15: Überblick über die Kultur-Belastungs-Kammern mit Nährmedium-kreislauf

2.2 Versuchsdurchführung

2.2.1 Einteilung der Knochenzylinder in die verschiedenen Versuchsgruppen

Die aus der Präparation gewonnenen $n=24$ Knochenzylinder werden randomisiert in drei Gruppen mit $n=8$ Explantaten aufgeteilt.

Gruppe 1:

Die Knochenzylinder der Gruppe 1 dienen als Kontrollproben. Jeden vierten Tag werden zwei aufeinanderfolgende Quasi-Statische-Belastungen mit Messung der scheinbaren Steifigkeit, dem sogenannten E-Modul, durchgeführt.

Gruppe 2:

Die Knochenzylinder der Gruppe 2 werden täglich mit einer Frequenz von 1 Hz für 300 Zyklen belastet. Als Belastungssignal wird eine "Jumping-Sequenz" mit 1000 μ strain verwendet. Weiterhin wird sowohl vor als auch nach der dynamischen Belastung das E-Modul gemessen.

Gruppe 3:

Die Knochenzylinder der Gruppe 3 werden täglich mit einer Frequenz von 1 Hz für 300 Zyklen belastet. Als Belastungssignal wird eine "Jumping-Sequenz" mit 3000 μ strain verwendet. Weiterhin wird sowohl vor als auch nach der dynamischen Belastung das E-Modul gemessen.

Die Durchflussrate des Nährmediums in dem geschlossenen Kreislauf kann mit der verwendeten 24 Kanal Kassettenpumpe beliebig variiert werden. Im vorliegenden Fall wird die durchschnittliche Flussrate auf 7 ml in der Stunde eingestellt. In Vorversuchen wurde gezeigt, dass diese Flussrate nicht zu einer Belastung der Knochenexplantate in Form von Scherkräften führt, sie jedoch genügend mit Nährmedium versorgt werden.

Die weitere Prozedur verläuft bei allen drei Versuchsgruppen identisch.

2.2.2 Die Quasi-Statische-Belastung und das Belastungssignal

Die Quasi-Statische-Belastung und die Belastung mit der "Jumping-Sequenz" erfolgen erst ab dem zweiten Versuchstag. Der erste Tag nach der Präparation der Knochenzylinder gilt als Ruhetag. Für die Quasi-Statische-Belastung wird zunächst manuell eine Vorlast von 5 Newton auf die Explantate ausgeübt. Anschließend übernimmt der PEA die definierte Kompression der Knochenzylinder von maximal 10 μ m.

Damit setzt sich die Vorlast aus zwei Anteilen zusammen:

$$5 \text{ Newton (manuell)} + X \text{ Newton (PEA)} = \text{Vorlast von } 10 \mu\text{m bzw. } 2000 \mu\text{strain}$$

Hierdurch wird gewährleistet, dass jeder Knochenzylinder mit der gleichen Vorlast belastet wird. Würde die Vorlast nur in einer definierten Anzahl von Newton ausgeübt werden, so wäre die Kompression der Knochenzylinder mit hoher Grundsteifigkeit kleiner als die von Knochenzylindern mit niedriger Grundsteifigkeit.

Um jedoch die Explantate einer Gruppe oder die Versuchsgruppen untereinander vergleichen zu können, müssen die Knochenzylinder einer Gruppe mit der gleichen Anzahl von μstrain belastet werden. Aufgrund zahlreicher Vorversuche kann davon ausgegangen werden, dass eine Vorlast von 2000 μstrain nur zu einem geringen Anteil auf den Knochen selbst einwirkt. Der größere Teil wird für die sichere Kontaktierung des PEA mit dem Belastungskolben (Piston) und für die Glättung von Rauigkeiten auf der Explantatoberfläche benötigt.

Bei der sich nun anschließenden Quasi-Statischen-Belastung mit Messung des E-Moduls werden die Knochenzylinder um weitere 15 μm komprimiert und die Messdaten für die Auswertung elektronisch gespeichert. Insgesamt ergeben sich über den Versuchszeitraum $n=21$ Messungen pro Knochenzylinder. Die ermittelten E-Modul Werte des zweiten Versuchstages gehen nicht in die statistische Auswertung ein, da die bisher unbelasteten Explantate noch nicht in ihrer endgültigen Position in der Kultur-Belastungs-Kammer vorliegen.

Bei dem verwendeten Belastungssignal handelt es sich um eine “Jumping-Sequenz” mit einer relativen Kompression von 1000 μ strain respektive 3000 μ strain. Auch hier werden die Knochenzylinder zunächst (analog zu der Quasi-Statistischen Belastung) mit der beschriebenen Vorlast und anschließend mit der “Jumping-Sequenz” belastet. Die Sequenz selbst stellt sich wie in Abbildung 16 dar.

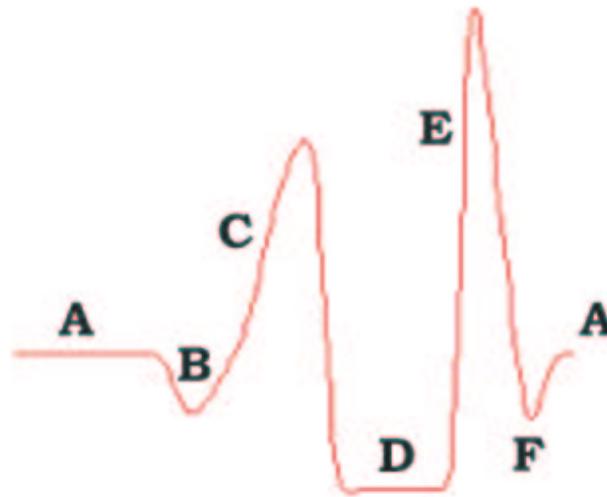


Abbildung 16: Jumping-Sequenz: (A) Stand, (B) Schwungholen, (C) Absprung, (D) Flug in der Luft, (E) Landung, (F) Nachfedern

Abbildung 17 zeigt die Oberfläche des WINDOWS-Benutzerprogramms, mit dessen Hilfe es möglich ist, ein Belastungssignal zu kreieren. Dabei können neben der “Jumping-Sequenz” auch andere Sequenzen ausgewählt werden. Zudem werden alle Modalitäten, unter anderem die Stärke des Signals eingestellt. Eine ähnliche Oberfläche des Benutzerprogramms findet sich auch für die Quasi-Statistische-Belastung.

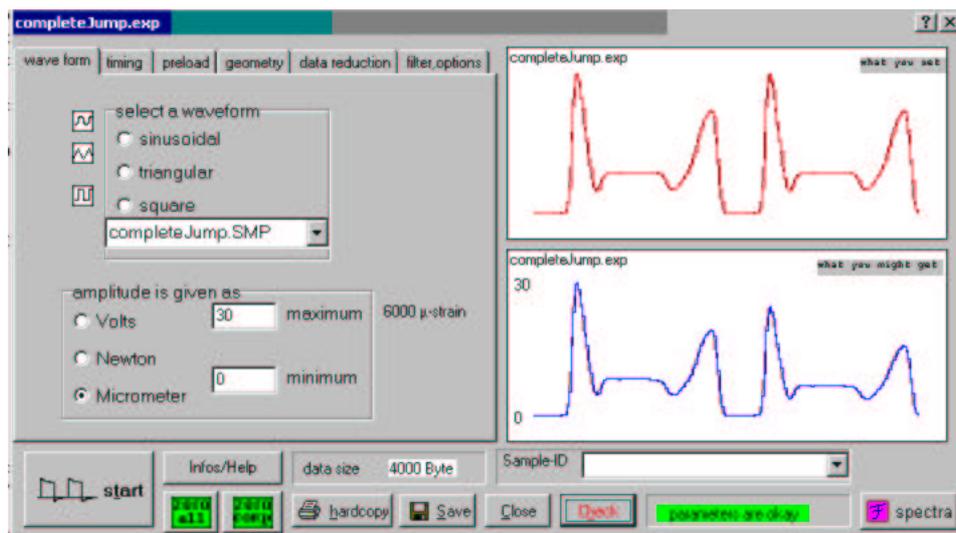


Abbildung 17: Oberfläche des WINDOWS-Benutzerprogramms zum Einstellen der Belastungssequenz (hier Jumping-Sequenz)

Während der Belastung speichert das Benutzerprogramm alle erhobenen Messdaten (siehe Abb. 18).



Abbildung 18: Oberfläche des WINDOWS-Benutzerprogramms nach erfolgter Belastung. Auf der Zeitachse findet man simultan die Jumping-Sequenz mit ihrer daraus resultierenden Kompression des Knochenzylinders, die hierfür aufgewendete Kraft in Newton und die scheinbare Steifigkeit des Knochens in MPa

2.2.3 Wechsel des Nährmediums

Der Wechsel des Nährmediums erfolgt alle 24 Stunden jeweils nach der Belastung der Knochenzylinder. Hierbei wird zunächst die Kassettenpumpe kurzfristig angehalten, damit keine Luft in das System gelangt und der Reservoirstopfen von dem jeweiligen Reagenzglas entfernt. Danach wird sofort ein neues Reagenzglas, in welchem 6 ml des nicht verbrauchten Nährmediums vorgelegt sind, an das System angeschlossen. Sind alle 24 Reagenzgläser ausgetauscht, wird die Kassettenpumpe wieder in Betrieb genommen.

Aus dem verbrauchten Nährmedium werden je 1 ml Medium für die Bestimmung der alkalischen Phosphatase, der Laktat-Dehydrogenase und des Osteoprotegerins in Mikroröhren 2 ml mit Verschluss (Sarstedt) pipettiert. Die Proben werden bis zu ihrer Messung entweder kurzfristig bei 4° C oder längerfristig bei -80° C gelagert. Abschließend erfolgt die Bestimmung des pH-Wertes in dem verbrauchten Medium mit einem pH-Meter der Firma inoLab.

2.2.4 Bestimmung der Alkalischen Phosphatase und Laktat-Dehydrogenase

Die alkalische Phosphatase (AP) und die Laktat-Dehydrogenase (LDH) werden täglich, exklusive dem ersten Tag nach der Präparation und den Tagen nach der polychromen Sequenzmarkierung, im Zentrallabor der Philipps-Universität Marburg an einem Hitachi 917 gemessen. Über den gesamten Versuchszeitraum ergeben sich pro Knochenzylinder n=21 Bestimmungen der AP und LDH.

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

Als Testprinzip dient ein Farb-Test nach einer standardisierten Methode. Der zu untersuchenden Probe wird zunächst ein Puffer hinzugefügt. Anschließend erfolgt der Start der Reaktion auf die Zugabe eines Puffer/ Substrat-Gemisches hin:



Bei der Reaktion wird das p-Nitrophenylphosphat in Gegenwart von Magnesium-Ionen durch Phosphatasen in Phosphat und p-Nitrophenol gespalten. Das dabei freigesetzte p-Nitrophenol ist proportional der AP-Aktivität und wird photometrisch gemessen.

WACKER et al. beschrieben 1956 eine Methode der LDH-Bestimmung mit Laktat als Substrat und Nikotinamidadenindinukleotid (NAD) als Koenzym. Die hier angewendete Methode entspricht ebenfalls der "Optimierten Standard-Methode" nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie 1972.

Als Testprinzip dient ein UV-Test nach einer standardisierten Methode. Der zu untersuchenden Probe wird zunächst ein Gemisch aus Puffer und Pyruvat hinzugefügt. Durch die anschließende Zugabe des NADH kommt es zum Start der Reaktion:



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

Bei jeder Bestimmung wird als "0-Probe" nicht verbrauchtes und 24 Stunden im Versuchsraum belassenes Nährmedium verwendet. Nach Subtraktion der "0-Probe" von den jeweils ermittelten Werten, erhält man die tatsächlichen Aktivitäten der alkalischen Phosphatase und der Laktat-Dehydrogenase der vergangenen 24 Stunden. Da die alkalische Phosphatase im vorliegenden Versuch nur durch Zellen der Osteoblasten-Linie produziert werden kann, sind die ermittelten Werte

mit der Knochen-AP gleichzusetzen.

2.2.5 Bestimmung des Osteoprotegerins

Die Osteoprotegerin-Bestimmung aus dem verbrauchten Nährmedium erfolgt alle vier Tage, beginnend mit dem vierten Tag nach Versuchsbeginn. So ergeben sich pro Knochenzylinder n=6 Bestimmungen.

Verwendet wird der Osteoprotegerin ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbant Assay) der Firma immun Diagnostik. Hierbei misst der Sandwich-Enzymimmunoassay das Osteoprotegerin direkt in der biologischen Flüssigkeit. Verwendet werden zwei spezifische Antikörper gegen Osteoprotegerin, von denen einer an die Mikrotiterplatte gebunden (Bindeantikörper), der zweite mit Biotin markiert ist (Detektionsantikörper).

Im ersten Schritt wird die Probe und der biotinylierte Antikörper gegen Osteoprotegerin in die Mikrotiterplatte überführt; es bildet sich ein "Sandwich", in dem das gebundene Osteoprotegerin zwischen dem Bindeantikörper (auf der Platte) und dem Detektionsantikörper (biotinyliert) eingefasst ist. Nach einem Waschvorgang, der nicht spezifisch gebundenes Material entfernt, wird über ein Streptavidin-Peroxidase/ TMB-System das OPG schließlich quantifiziert. Nach Zugabe einer Stoplösung wechselt die Farbe des Indikators von blau nach gelb. Die Farbentwicklung ist dabei proportional zur nachgewiesenen Analytmenge (Probe bzw. Standard). Eine Standardkurve, aus der die Konzentrationen ermittelt werden können, wird erstellt.

Die Bestimmungen werden in der Mikrotiterplatte in Dreifachwerten durchgeführt.

Pipettierschema:

1. 100 μl Assaypuffer in jede Vertiefung pipettieren.
2. 50 μl Standard und Proben in Dreifachwerten pipettieren.
3. 50 μl 2. Antikörper in jede Vertiefung pipettieren. Vorsichtig mischen.
4. Über Nacht (18-24 Stunden) bei 4° C inkubieren.
5. Den Inhalt der Platte verwerfen und 5x mit je 300 μl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
6. 200 μl Konjugat in jede Vertiefung pipettieren.
7. 1 Stunde bei Raumtemperatur (18-26° C) inkubieren.
8. Den Inhalt der Platte verwerfen und 5x mit je 300 μl Waschpuffer waschen. Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschgang auf Saugpapier ausschlagen.
9. 200 μl TMB-Substratlösung pro Vertiefung pipettieren.
10. 15-20 Minuten (entsprechend der Farbdifferenzierung) bei Raumtemperatur inkubieren.
11. 50 μl Stopplösung pro Vertiefung zusetzen und kurz mischen.
12. Sofortige Messung der Extinktion im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm.

2.2.6 Durchführung der polychromen Sequenzmarkierung

Die polychrome Sequenzmarkierung erfolgt am 9. und am 18. Tag nach Versuchsbeginn. Zunächst findet das Tetrazyklin Verwendung, dann das Alizarin Complexone. Die Fluochrome werden dem Nährmedium ohne FCS (fetales Kälberserum) zugesetzt und für 4 Stunden an das Kreislaufsystem angeschlossen.

Anschließend werden die Knochenzylinder mit ihren Systemen zweimal für jeweils 45 Minuten mit Nährmedium ohne FCS gespült. Nach dem zweiten Spülvorgang werden die Kultur-Belastungs-Kammern wieder an das eigentliche Nährmedium mit FCS angeschlossen.

Herstellung der Tetrazyklin-Lösung:

1. 30 mg Tetrazyklin (Sigma) in 10 ml Aqua ad injektabile (Braun) lösen.
2. 8,90 ml Nährmedium ohne FCS in ein Rundbodenglas vorlegen.
3. Dem vorgelegten Nährmedium 90 μ l Tetrazyklin-Lösung zugeben.

Herstellung der Alizarin Complexone-Lösung:

1. 30 mg Alizarin Complexone (ICN Biomedicals Inc.) in 10 ml Natriumchlorid-Lösung 0,9% ig (Braun) lösen.
2. pH-Wert auf 6,8 einstellen.
3. 8,90 ml Nährmedium ohne FCS in ein Rundbodenglas vorlegen.
4. Dem vorgelegten Nährmedium 135 μ l Alizarin Complexone-Lösung zugeben.

2.3 Histologie

2.3.1 Die Alkoholfixation

Nach dem Ausbau der Präparate aus den Kultur-Belastungs-Kammern werden die Explantate in flüssigkeitsdurchlässige Kunststoffkörbchen (Tissue-Tek Uni-Cassets, Firma Miles, Naperville, Irland) eingesetzt. Um weiterhin eine korrekte Identifizierung der Explantate zu gewährleisten, wird jedes Kunststoffkörbchen beschriftet. Nach Vorgabe der Firma Kulzer erfolgt anschließend die Äthanolstufenfixierung bei 4° C unter ständiger Bewegung:

1. 40% iges Äthanol für ca. 2-3 Stunden, maximal für 10 Stunden.
2. 70% iges Äthanol für 7 Tage, wobei das Äthanol täglich zu wechseln ist.

2.3.2 Die alkoholische Dehydrierung und Xylol-Entfettung

Nach der Fixierung werden die Präparate weiterhin in Bechergläsern unter ständiger Bewegung mittels eines Magnetrührers in sechs Tagen bei 4° C durch eine aufsteigende Alkohldreie dehydriert. Folgende Dehydrierungsintermedien finden hierbei Verwendung:

1. 80% iges Äthanol
2. 90% iges Äthanol
3. zweimalig 96% iges Äthanol
4. zweimalig absolutes Äthanol

(jeweils für 24 Stunden)

Eine längere Verweildauer in einem der Intermedien stellt kein Problem dar, doch sollte kein Schritt ausgelassen werden.

Unentbehrlich ist die anschließende Entfettung der Proben. Zu diesem Zweck werden die Knochenzylinder für 48 Stunden bei Raumtemperatur in Xylol eingelegt, wobei das Xylol alle 12 Stunden gewechselt werden muss.

2.3.3 Die Kunststoffeinbettung

Voraussetzung für die Histologie nicht entkalkter Knochen ist deren Einbettung in Kunststoff. Die Kunststoffeinbettung bietet gegenüber der einheitlich beschriebenen entkalkten Knochenhistologie mit Paraffineinbettung erhebliche Vorteile. So findet man eine gute Gewebserhaltung und nur geringfügige Schrumpfungen, außerdem bleibt die Darstellung mineralisierter Bestandteile erhalten. Die Nachteile der nicht entkalkten Knochenhistologie liegen in erster Linie in deren Aufbereitung. So ist der zeitliche Aufwand bis zur Fertigstellung des histologischen Präparats höher, die finanzielle Belastung durch Chemikalien und deren Entsorgung größer, und es muss ein histologisches Speziallabor zur Verfügung stehen.

1941 führte PUCKET das Metacrylat als Gewebseeinbettmedium in die Histologie ein. Als Folge des neuen Einbettmediums mussten bessere Mikrotome entwickelt werden, mit denen der Kunststoffblock geschnitten werden konnte. Mit der Entwicklung des Sägemikrotoms im Jahre 1949 wurde dieser Notwendigkeit Rechnung getragen.

Aufgrund der hohen Härte des Metacrylats konnten jedoch nur histologische Knochenschnitte von zirka 25 μm hergestellt werden. 1958 verbesserten HIRSCH und BOELLAARD die Methode nachhaltig, indem sie dem Metacrylat einen Weichmacher, das sogenannte Polyethylenglykol, zusetzten. Heute findet das Nonylphenol-Polyglykol-Ätheracetat als Weichmacher Verwendung. Seither ist der Einsatz von normalen Mikrotomen mit Hartstahlmessern und Schnittdicken im einstelligen Mikrometerbereich möglich.

Nach zahlreichen Vorversuchen haben wir uns entschlossen, nicht das von der Firma Kulzer propagierte Technovit 9100Neu zu verwenden, sondern die Proben in Anlehnung an das "alte" Technovit 9100 einzubetten. Die positiven Effekte des Technovit 9100Neu in Bezug auf die Enzym- und Immunhistochemie sind für uns nicht nachvollziehbar.

Die Infiltrationslösung hat dabei folgende Zusammensetzung (G/ G%)

1. Basislösung 94 %
2. Weichmacher 5 %
3. Aktivator 1 %

Als Basislösung verwenden wir die nicht entstabilisierte Basislösung (Kunststoff auf Methylmethacrylat-Basis) des Technovit 9100Neu. "Nicht entstabilisiert" bedeutet, dass das zur Vermeidung der vorzeitigen Polymerisation zugesetzte Hydrochinon, entgegen anderen Empfehlungen, nicht über eine Chromatographiesäule mit Aluminiumoxid entfernt wird. Da die Präparate durch das Xylol an Lipophilen gewinnen, können sie durch das ebenfalls nicht polare und demnach lipophile Methylmethacrylat gut infiltriert werden.

Das ebenfalls aus dem Set des Technovit 9100Neu stammende Benzoylperoxid fungiert als Katalysator, der in diesem Fall die Aufgabe hat, die zur Polymerisation notwendige Aktivierungsenergie zu minimieren. Folglich wird es auch als Aktivator bezeichnet.

Als Weichmacher verwenden wir das Dibutylphthalat der Firma Merck.

Um eventuelle Rückstände der Fixierung aus den Explantaten zu lösen und zudem eine verbesserte Infiltration des Gewebes zu erreichen, werden die Präparate im Vakuum infiltriert. Um einer vorzeitigen Polymerisation vorzubeugen, muss die Infiltration bei 3 bis 5° C stattfinden. Die Infiltrationsdauer beträgt 7 Tage.

Für die Polymerisation werden Rollrandschnappdeckelgläser mit Polyschnappdeckel (ScherfGlas) mit einer dem Präparat entsprechenden Etikettierung vorbe-

reitet (mit Bleistift beschriftetes Filterpapier), in welche anschließend die Präparate und Etiketten eingelegt werden.

Die Rollrandschnappdeckelgläser werden zu zirka zwei Drittel mit der Einbettlösung gefüllt und das Präparat sowie das jeweilige Etikett eingelassen. Dieser Überschuss an Kunststoff ist notwendig, da mit einer zirka 15% igen Polymerisationsschrumpfung zu rechnen ist und ein Kunststoffsockel zur Einspannung in das Mikrotom benötigt wird. Die verwendete Einbettlösung hat hierbei die gleiche Zusammensetzung wie die Infiltrationslösung. Die bestückten Rollrandschnappdeckelgläser werden anschließend mit den Polyschnappdeckeln verschlossen und, zur Ableitung der Polymerisationswärme, aufrecht in eine flache, wassergefüllte Schale gestellt. Die Polymerisationszeit bei Raumtemperatur beträgt zirka 48 Stunden. Nach abgeschlossener Polymerisation werden die Rollrandschnappdeckelgläser mit einem Hammer zerschlagen.



Abbildung 19: Rollrandschnappdeckelgläser in einer wassergefüllten Schale

2.3.4 Das Schneiden der Präparate

Vor der Bearbeitung der Präparate mit dem Mikrotom wird der überschüssige Kunststoff mit einer Bandsäge abgetragen. Hierdurch kommt es zu einer Optimierung der zu schneidenden Fläche und die Abnutzung der Hartstahlmesser kann möglichst gering gehalten werden.

Zunächst müssen jedoch die verwendeten Objektgläser (Menzel-Gläser) mit einer Chromalaun-Gelatine-Lösung beschichtet werden, um die Haftung des Präparates auf dem Objektglas während der Entacrylierung und des Färbevorgangs zu gewährleisten.

Herstellung der Chromalaun-Gelatine-Lösung:

1. 4,5 g weiße Blatt-Gelatine werden in 1 Liter Aqua dest. unter ständigem Rühren und unter Wärmezufuhr (die Lösung darf nicht kochen) aufgelöst.
2. Filtrieren der Lösung.
3. Der filtrierte Lösung werden 38,5 ml einer 4% igen Chromalaunlösung (4 g Kaliumbrom(III)Sulfat auf 100 ml Aqua dest.) hinzugesetzt.
4. Lösung mit ein paar Tropfen eines Emulgators vermischen.

Herstellung der mit Chromalaun-Gelatine beschichteten Objektgläser:

1.	Objektgläser in 2% iger Salzsäure anätzen	5-10 Minuten
2.	Spülen in Aqua dest.	
3.	Einstellen der Objektgläser in 3% ige Natronlauge	5 Minuten
4.	Spülen in Aqua dest.	
5.	Einstellen der Objektgläser in die Chromalaun-Gelatine-Lösung	wenige Minuten
6.	Trocknen der Objektgläser	

Die histologischen Schnitte werden mit einem Hartschnittmikrotom der Firma Reichert-Jung hergestellt. Dabei sind Schnittgeschwindigkeit und Schnittdicke frei wählbar.

Zunächst wird ein Hartstahlmesser (Reichert-Jung) im Anstellwinkel der Position 0 eingespannt. Anschließend erfolgt die Fixierung des Kunststoffsockels des jeweiligen Präparates auf der dafür vorgesehenen Verankerung des Schlittens. Die so installierten Präparate werden mit einem Abhub von 15 μm und einer hohen Geschwindigkeit vorgeschritten bis man in das Zentrum des Knochens vorgedrungen ist. Die eigentlichen Schnitte werden mit einer Geschwindigkeit von 3 Schnitten pro Minute unter Verwendung der Schneidflüssigkeit der Firma WIV in einer Dicke von 2 bis 6 μm erstellt. Die Schneidflüssigkeit wird während des Schneidvorganges in reichlicher Menge mit einem feinem Pinsel vorsichtig auf die entstehenden Präparate aufgetragen, so dass diese quasi vom Messer abschwimmen. Dies gewährleistet, dass sie sich nicht einrollen. Die auf die Oberkante des Messers gezogenen Präparate werden anschließend mit einer Splitterpinzette im gestreckten Zustand vom Messer abgehoben und auf ein mit 70% igem Äthanol

benetztes Objektglas gelegt. Die Schnitte werden nochmals mit 70% igem Äthanol beträufelt, wodurch es zu einer Streckung der Präparate kommt. Nach diesem Arbeitsschritt wird auf das gestreckte, nasse Präparat eine dünne Polyethylenfolie (Kulzer) aufgelegt. Der Alkohol, der zwischen Präparat und Folie verbleibt, wird mit Hilfe zweier Tupfer ausgestrichen. Abschließend werden die Objektgläser, welche durch kleine Löschpapierstreifen voneinander getrennt sind, in einer selbst konstruierten Presse für Objektgläser gestapelt und für 48 Stunden bei 50° C unter handfestem Druck im Brutschrank getrocknet.

Nach dem Trocknen können sowohl das Löschpapier als auch die Polyethylenfolien vorsichtig entfernt werden, sodass die Präparate bereit für die Entacrylierung sind.

Belässt man die Folie auf den getrockneten Objektgläsern, lassen sich die Präparate über einen langen Zeitraum unbeschadet aufbewahren.

2.3.5 Die Entacrylierung

Die Entacrylierung oder auch Entplastinierung der Präparate erfolgt unmittelbar vor ihrer histologischen Färbung. Eine histologische Färbung ohne vorheriges Entfernen des Einbettmediums, wie sie von der Firma Kulzer beschrieben wird, führte bei uns zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen. Nach Beginn des Entacrylierungsvorgangs müssen die Präparate gefärbt und versiegelt werden. Für die fluoreszenzmikroskopische Auswertung werden sie lediglich versiegelt.

Der Entplastinierungsvorgang stellt sich wie folgt dar:

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

Das verwendete 2-Methoxyethylacetat wird als fertige Gebrauchslösung bei der Firma Merck bezogen und dient der Entplastinierung. Die sich anschließende absteigende Alkoholreihe wird zur Rehydrierung der Präparate durchgeführt, um sie auf die wässrigen Färbelösungen vorzubereiten. Das zweimalige kurze Spülen in Aqua dest. dient ebenfalls der Hydratisierung der Schnitte. Ein etwas längeres Verweilen der Präparate in Aqua dest. führt unserer Erfahrung nach nicht zu einer Beeinträchtigung der histologischen Ergebnisse.

2.3.6 Vorbemerkung zu den Färbungen

Bei den gängigen Färbevorschriften, die in einschlägiger histologischer Literatur nachgelesen werden können, wird meist von der Paraffineinbettung ausgegangen. In der Regel werden die Hartgewebe wie Knochen und Zähne hierbei nicht extra berücksichtigt. Vor allem die Vorschriften, die für die nicht entkalkte Knochenhistologie existieren, sind oft widersprüchlich oder sie sind auf sehr spezifische Problemstellungen zugeschnitten. Letztendlich musste jede Färbevorschrift durch eine große Anzahl von Testläufen zu einer für uns akzeptablen Fassung heranreifen.

2.3.7 Die Färbung mit Toluidinblau O

Die Toluidinblau O Färbung sticht durch ihre einfache und schnelle Durchführbarkeit bei guter Zellfärbung hervor. Obwohl nur ein Farbstoff verwendet wird, ist eine gute Gewebdifferenzierung infolge metachromatischer Farbeffekte möglich. Durch Differenzierung in 70% igem und absolutem Äthanol können die metachromatischen Farbeffekte infolge einer unterschiedlich starken Entfärbung der einzelnen Gewebearten noch ausdrucksvoller dargestellt werden.

In der Färbung stellt sich mineralisierte Hartgewebematrix ungefärbt bis blaßblau, Zellen und Weichgewebe in unterschiedlichen Blautönen, Knorpelmatrix und Mastzellgranula metachromatisch rot-violett und verkalkte Knorpelmatrix dunkelblau dar. Nach REVELL [92] ist die Mineralisationsgrenze in Form einer gekörnten violetten Linie erkennbar.

Herstellung der Färbelösung:

1. 0,3 g Toluidinblau O
2. 2,5 g Natriumkarbonat
3. 100 ml Aqua dest.

Das Toluidinblau O sowie das Natriumkarbonat werden in 100 ml Aqua dest. mittels eines Magnetrührers gelöst und die entstandene Färbelösung vor ihrem Gebrauch zweimal filtriert.

Färbevorschrift:

1.	Entplasten in 2-Methoxyethylacetat	dreimal 20 Minuten
2.	Absteigende Alkoholreihe	
3.	Spülen in Aqua dest.	zweimal 3 Minuten
4.	Toluidin O Lösung	10 Minuten
5.	Spülen in Aqua dest.	
6.	Differenzieren in 70% igem Äthanol	
7.	Differenzieren in absolutem Äthanol	
8.	Dehydratisieren in Xylol	zweimal 5 Minuten
9.	Eindecken mit Entellan	

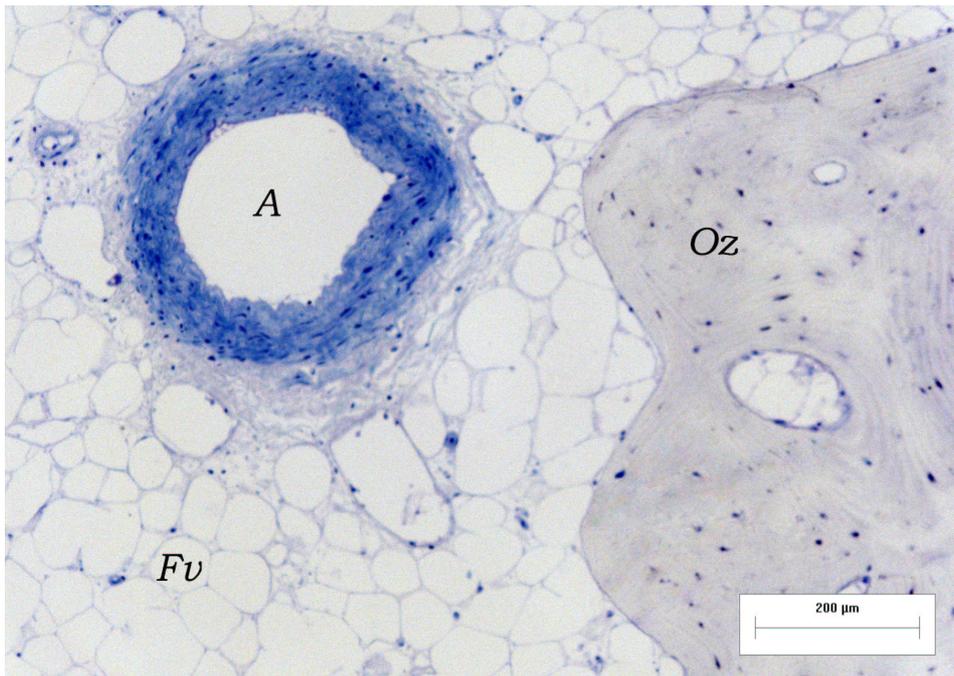


Abbildung 20: Übersichtsfärbung mit Toluidin O: (A) Arterie, (Fv) Fettvakuolen, (Oz) Osteozyten

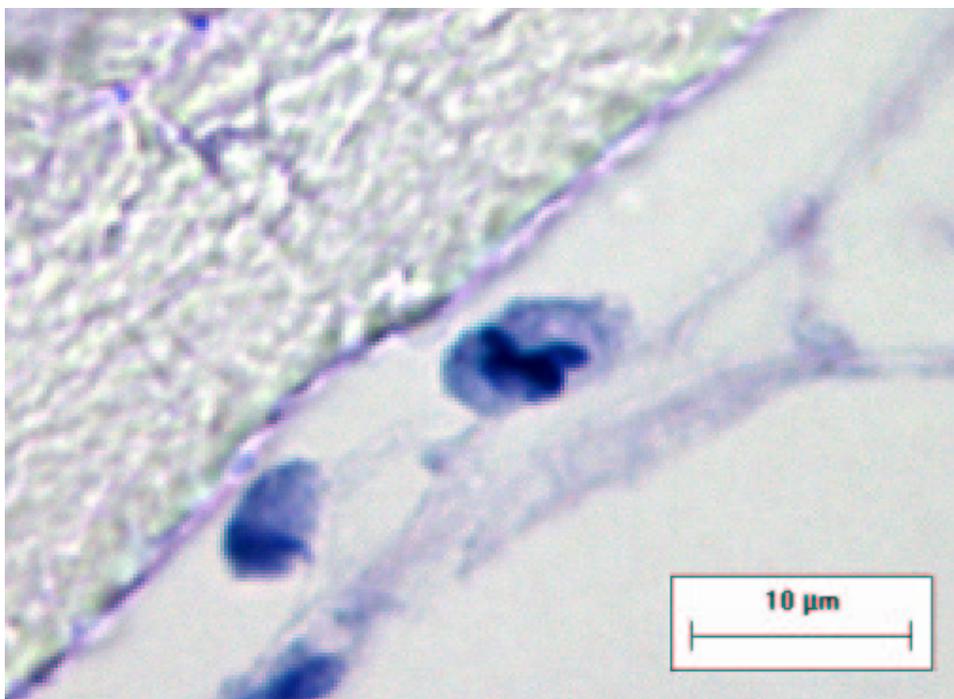


Abbildung 21: Mitotische Zelle

2.3.8 Die Trichromfärbung nach Goldner

Die Masson-Goldner-Färbung ist eine der vielen Trichromfärbungen und gilt heute als Standardfärbung für die Knochenmorphometrie, da neben guter Zellfärbung mineralisierte und nicht-mineralisierte Knochenmatrix farblich klar unterschieden werden können.

In den gefärbten Präparaten stellt sich mineralisiertes Knochengewebe und Kollagen leuchtend grün, verkalkte Knorpelmatrix hellgrün, Osteoid rot, Zellkerne blau-schwarz und das Zytoplasma rötlich-braun dar.

Herstellung der Färbelösungen:

Weigerts Eisenhämatoxylin

Stammlösung: Hämatoxylinlösung

1. 1 g Hämatoxylin
2. 100 ml 96% iges Äthanol

Das Hämatoxylin wird im Äthanol gelöst und muss vor der Anwendung zirka eine Woche reifen. Eventuell ist es notwendig das Äthanol zum Lösen des Hämatoxylins etwas zu erwärmen.

Stammlösung: Eisenchloridlösung

1. 1,5 g Eisen(III)chlorid wasserfrei
2. 100 ml Aqua dest.
3. 1 ml konzentrierte Salzsäure

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

Färbelösung:

Für die Färbelösung werden die beiden Stammlösungen im Verhältnis 50:50 unmittelbar vor dem Gebrauch gemischt.

Säurefuchsin-Ponceau

1. 0,2 g Ponceau de Xylidine
2. 0,1 g Säurefuchsin
3. 100 ml Aqua dest.
4. 0,6 ml Eisessig

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

Phosphormolybdänsäure-Orange G

1. 3-4 g Phosphormolybdänsäure
2. 100 ml Aqua dest.
3. 2 g Orange G

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

Lichtgrün

1. 0,1-0,2 g Lichtgrün
2. 100 ml Aqua dest.
3. 0,2 ml Eisessig

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

Färbevorschrift:

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

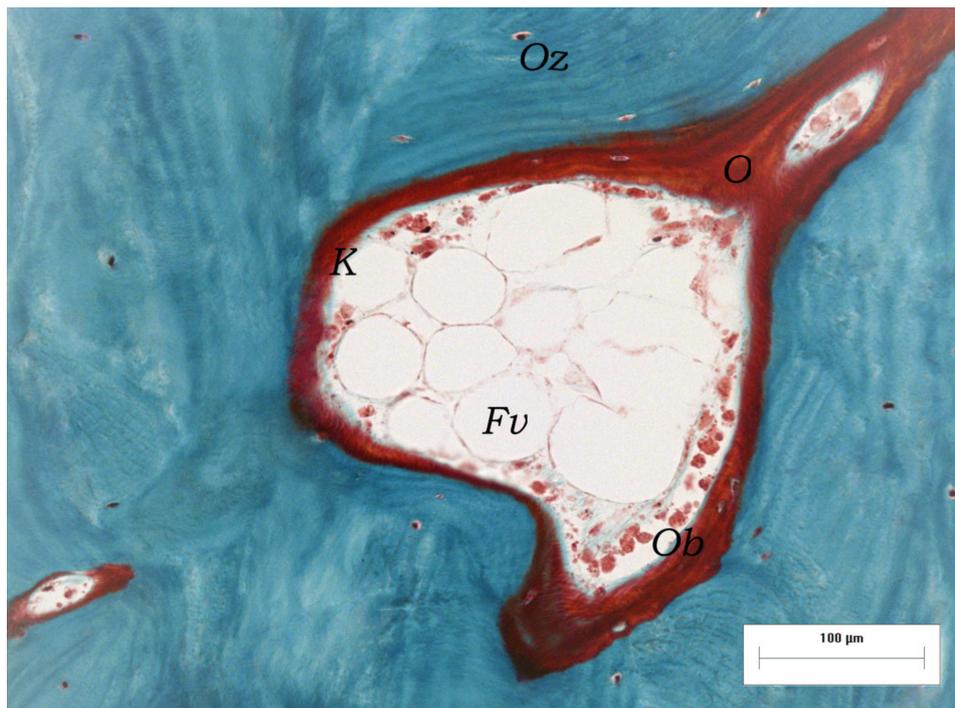


Abbildung 22: Übersichtsfärbung mit Masson-Goldner: (Oz) Osteozyten, (Ob) Osteoblasten, (O) Osteoid, (K) Kollagen, (Fv) Fettvakuolen

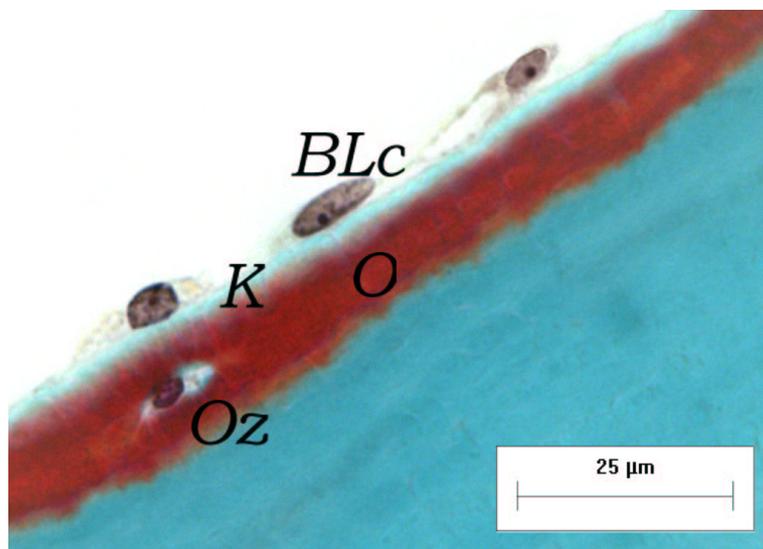


Abbildung 23: Bone Lining cells (BLC) säumen das Osteoid (O): (K) Kollagen, (Oz) neu entstandener Osteozyt der sich noch nicht in der mineralisierten Matrix befindet

2.3.9 Die modifizierte "von-Kossa-Versilberung" nach KRUTSAY

Die ursprüngliche "von-Kossa-Versilberung" der Kalziumsalze wurde 1963 von KRUTSAY modifiziert und wird seither auch für Kunstharzeingebettete Hartmikrotomschnitte empfohlen. Die auf einem Ionenaustausch beruhende Versilberung detektiert selektiv alle mineralisierten (v.a. kalziumphosphathaltige) Gewebsanteile und ergibt infolgedessen sehr kontrastreiche Bilder. Strukturelle Unterschiede wie lamelläre oder geflechtartige Kollagenfibrillenordnung werden jedoch überdeckt.

Für die automatische Bildanalyse ist die "von-Kossa-Färbung" in Bezug auf die histomorphometrische Vermessung an verkalkter Substanz nicht zu überbieten.

Im einzelnen wird mineralisiertes Gewebe tiefschwarz und die Mineralisationsfronten granuliert dargestellt. Die Anfärbung der übrigen Strukturen richtet sich nach der verwendeten Gegenfärbung. In unserem Fall finden zum einen das Kernechtrot und zum anderen die Farbstoffe der Trichrom-Goldner-Färbung (siehe 2.3.8) Verwendung. In der Kernechtrot-Färbung stellen sich die Kerne dunkelrot, Zytoplasma, Osteoid und Weichgewebe hellrot dar. Die verwendeten Farbstoffe der Trichrom-Goldner-Färbung färben das Osteoid rot, Zellkerne blau-schwarz und das Zytoplasma rötlich-braun.

Herstellung der Färbelösungen:

5% ige Sibernitrat-Lösung

1. 10 g Sibernitrat
2. 200 ml Aqua dest.

Das Sibernitrat wird im Aqua dest. gelöst und die Lösung lichtgeschützt aufbewahrt.

Natriumkarbonat-Formaldehyd-Lösung

1. 10 g Natriumkarbonat
2. 50 ml 37% ige Formaldehydlösung (wasserfrei)
3. 150 ml Aqua dest.

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

Natriumthiosulfatlösung

1. 7 g Natriumthiosulfat
2. 133 ml Aqua dest.

Das Natriumthiosulfat wird im Aqua dest. gelöst.

Kernechtrot-Färbelösung

1. 0,2 g Kernechtrot
2. 200 ml 5% ige wässrige Aluminiumsulfatlösung

Die Aluminiumsulfatlösung wird zum Kochen gebracht und das Kernechtrot eingerührt. Diese Lösung wird für weitere 10 Minuten gekocht und nach dem Erkalten filtriert.

Färbevorschrift:

1.	Entplasten in 2-Methoxyethylacetat	dreimal 20 Minuten
2.	Absteigende Alkoholreihe	
3.	Spülen in Aqua dest.	zweimal 3 Minuten
4.	Einstellen in die Silbernitratlösung	30 Minuten
5.	Spülen in Aqua dest.	dreimal
6.	Reduzieren in Natriumkarbonat-Formaldehyd	8 Minuten
7.	Spülen in Aqua dest.	10 Minuten
8.	Fixieren in Natriumthiosulfat	5 Minuten
9.	Spülen in Leitungswasser	15 Minuten

Gegenfärbung mit Kernechtrot:

10.	In Aqua dest. wässern	
11.	Einstellen in das Kernechtrot	45 Minuten
12.	Spülen in Aqua dest.	
11.	Aufsteigende Alkoholreihe	
12.	Dehydratisieren in Xylol	zweimal 5 Minuten
13.	Eindecken mit Entellan	

Gegenfärbung mit Farbstoffen der Trichrom-Goldner-Färbung:

10.	Weigerts Eisenhämatoxylin	10 Minuten
11.	Bläuen in Leitungswasser	10 Minuten
12.	Färben in Säurefuchsin-Ponceau	7 Minuten
13.	Abspülen mit 1% iger Essigsäure	
14.	Differenzieren in Phosphormolybdänsäure-Orange G	7 Minuten
15.	Abspülen mit 1% iger Essigsäure	
16.	Aufsteigende Alkohltreihe	
17.	Dehydratisieren in Xylol	zweimal 5 Minuten
18.	Eindecken mit Entellan	

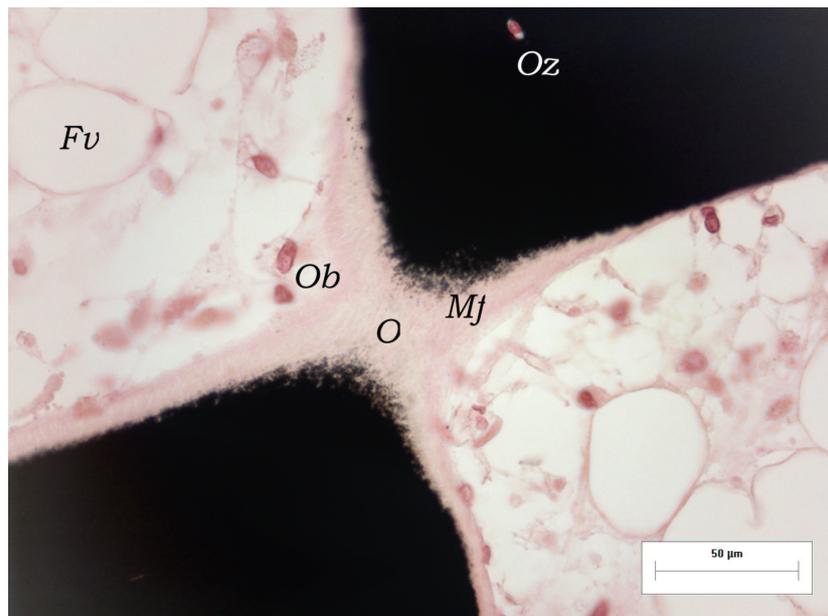


Abbildung 24: Gegenfärbung mit Kernechtrot; Osteoid-Brücke (O), die zwei Trabekel miteinander verbindet: (Mf) Mineralisationsfront, (Ob) Osteoblasten, (Oz) Osteozyt, (Fv) Fettvakuolen

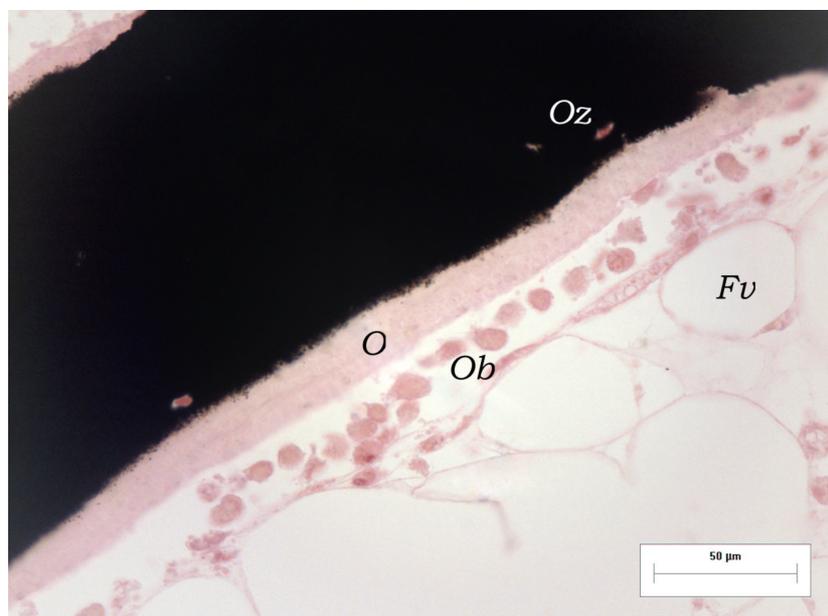


Abbildung 25: Gegenfärbung mit Kernechtrot; Osteoblasten (Ob) säumen das Osteoid (O): (Oz) Osteozyten, (Fv) Fettvakuolen

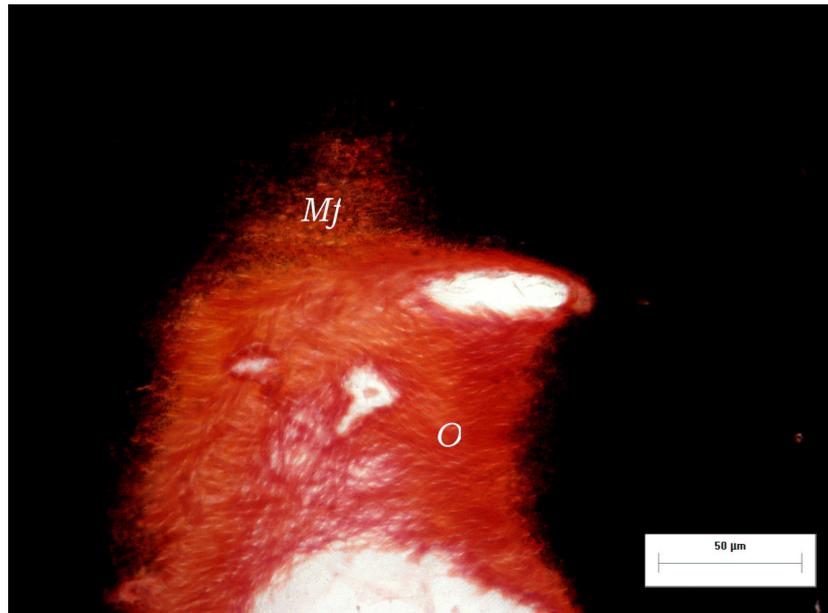


Abbildung 26: Gegenfärbung mit Farben der Masson-Goldner-Färbung; Struktur des Osteoids (O) mit seiner Mineralisationsfront (Mf)

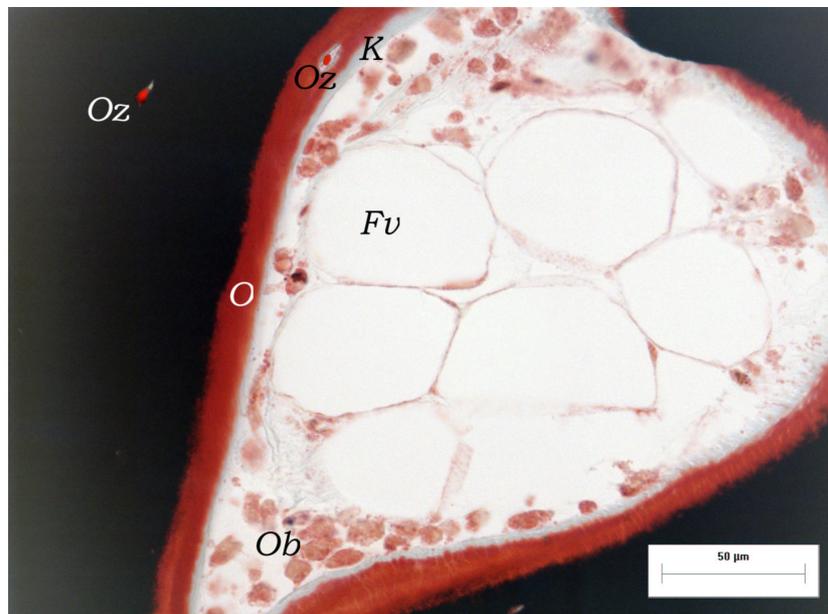


Abbildung 27: Gegenfärbung mit Farben der Masson-Goldner-Färbung; (Oz) Osteozyten, (Ob) Osteoblasten, (O) Osteoid, (K) Kollagen, (Fv) Fettvakuolen

2.3.10 Die Färbung mit Alcianblau-PAS

Mit Hilfe dieser Farbstoffkombination ist es möglich, saure Glykosaminoglykane und neutrale Polysaccharide zu differenzieren. Die PAS-Reaktion basiert darauf, dass durch die verwendete Perjodsäure bestimmte, hauptsächlich in Polysacchariden vorkommende, Atomgruppen zunächst aufgespalten und daraufhin zu Aldehyden oxidiert werden. Die anschließende Detektion der gebildeten Aldehyde mit fuchsin-schwefliger Säure (Schiff'sches Reagenz) führt zu einer deutlichen Rotfärbung.

Die PAS-Reaktion umfasst den Nachweis von Polysacchariden, neutralen Glykosaminoglykanen, Muco- und Glykoproteinen, Glykolipiden, ungesättigten Fetten und Phospholipiden. Es besteht jedoch nicht die Möglichkeit, genau zwischen diesen Stoffen zu differenzieren.

In den gefärbten Präparaten stellt sich Osteoid blassrosa, mineralisiertes Gewebe blassrötlich, saure Glykosaminoglykane blaugrün, Zellkerne blau und sowohl Glykogen als auch Glykoproteine dunkel purpurrot dar.

Herstellung der Färbelösungen:

Alcianblaulösung

1. 1 g Alcianblau
2. 100 ml 3% ige Essigsäure

Das Alcianblau wird in Essigsäure gelöst.

0,5% ige Perjodsäure

1. 10 ml 0,2 M Natriumazetatlösung
2. 0,8 g Perjodsäure
3. 20 ml Aqua dest.
4. 70 ml absolutes Äthanol

Für die 0,2 M Natriumazetatlösung werden 0,272 g Natriumazetat in 10 ml Aqua dest. gelöst.

Die Perjodsäure wird in Aqua dest. gelöst und die Natriumazetatlösung zuge-
setzt. Abschließend mischt man diese Lösung mit dem Äthanol. Die Aufbewahrung
der Färbelösung erfolgt lichtgeschützt in einer braunen Glasflasche. Sobald sich
das Reagenz braun verfärbt, muss es verworfen werden.

Schiff'sches Reagenz:

Stammlösung I

1. 5 g Pararosanilin
2. 150 ml 1 N Salzsäure

Das Pararosanilin wird in der Salzsäure gelöst.

Stammlösung II

1. 5 g Natriumdisulfit
2. 850 ml Aqua dest.

Das Natriumdisulfit wird im Aqua dest. gelöst.

Färbelösung:

Für die Färbelösung werden beide Stammlösungen im Verhältnis 50:50 gemischt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wird die Lösung mit 3 g Aktivkohle versetzt und vor der abschließenden Filtration für 2 Minuten geschüttelt.

Hämalaun

1. 2,5 g Hämatoxylin
2. 0,5 g Natriumjodat
3. 125 g Aluminiumkaliumsulfat
4. 2500 ml Aqua dest.
5. 125 g Chloralhydrat
6. 2,5 g Zitronensäure

Das Hämatoxylin, Natriumjodat und Aluminiumkaliumsulfat werden über Nacht im Aqua dest. gelöst. Am nächsten Tag wird das Chloralhydrat und die Zitronensäure hinzugefügt. Diese Lösung wird 5 Minuten aufgekocht und abschließend filtriert.

Färbevorschrift:

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

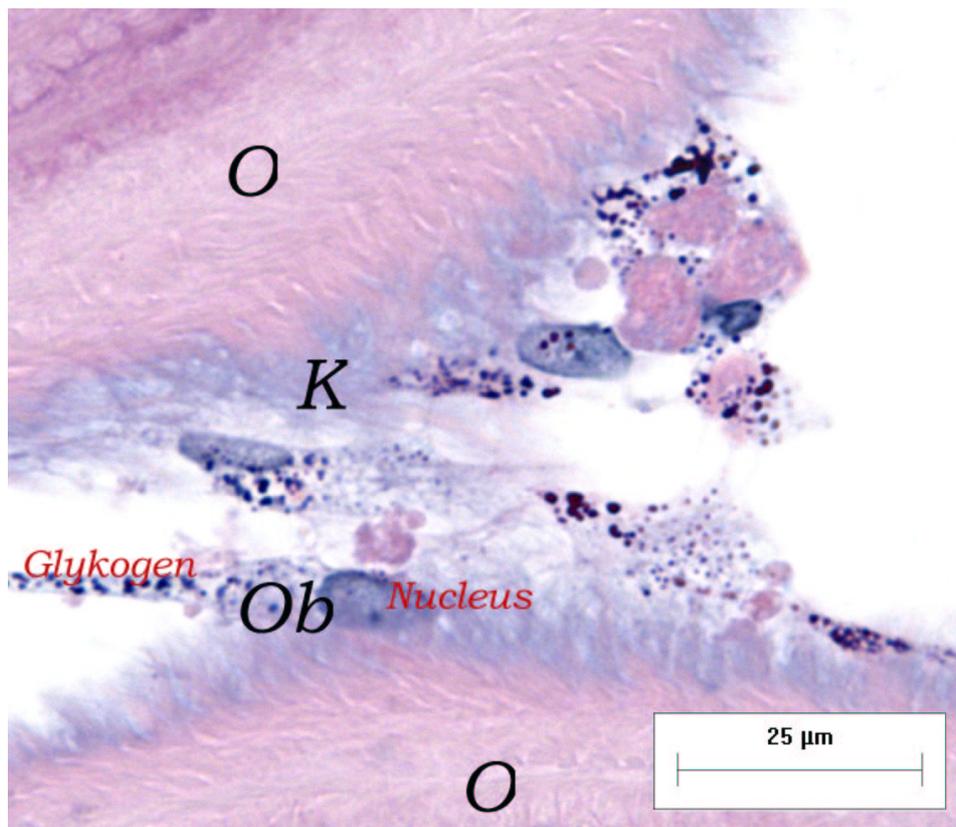


Abbildung 28: Zwei sich gegenüberliegende Trabekel sind im Begriff zu verschmelzen: (O) Osteoid, (K) Kollagen, (Ob) Osteoblasten

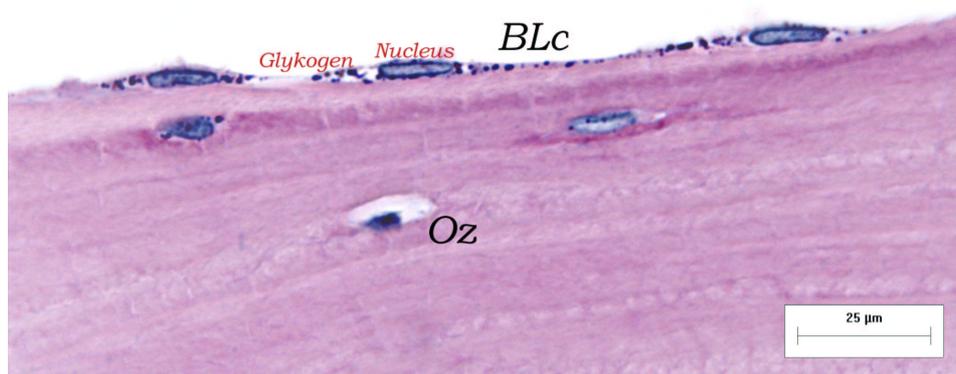


Abbildung 29: Bone Lining cells (BLc) säumen den Knochen: (Oz) Osteozyten

2.3.11 Die Doppelfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (H&E)

Die H&E Färbung ist eine routinemäßig sehr einfach und rasch durchzuführende Übersichtsfärbung. Die Zellkerne werden blau, alles übrige in verschiedenen Tonabstufungen rot gefärbt.

Herstellung der Färbelösungen:

Hämalaun

1. 2,5 g Hämatoxylin
2. 0,5 g Natriumjodat
3. 125 g Aluminiumkaliumsulfat
4. 2500 ml Aqua dest.
5. 125 g Chloralhydrat
6. 2,5 g Zitronensäure

Das Hämatoxylin, Natriumjodat und Aluminiumkaliumsulfat werden über Nacht im Aqua dest. gelöst. Am nächsten Tag wird das Chloralhydrat und die Zitronensäure hinzugefügt. Diese Lösung wird 5 Minuten aufgekocht und abschließend filtriert.

Eosin

1. 1 ml Certstain Eosin G (gelblich)
2. 100 ml 70% iges Äthanol

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

Färbevorschrift:

1.	Entplasten in 2-Methoxyethylacetat	dreimal 20 Minuten
2.	Absteigende Alkoholreihe	
3.	Spülen in Aqua dest.	zweimal 3 Minuten
4.	Einstellen in Hämalaun	30 Minuten
5.	Bläuen in Leitungswasser	10 Minuten
6.	Einstellen in Eosin	5 Minuten
7.	Auswaschen in Wasser	
8.	Aufsteigende Alkoholreihe	
9.	Dehydratisieren in Xylol	zweimal 5 Minuten
10.	Eindecken mit Entellan	

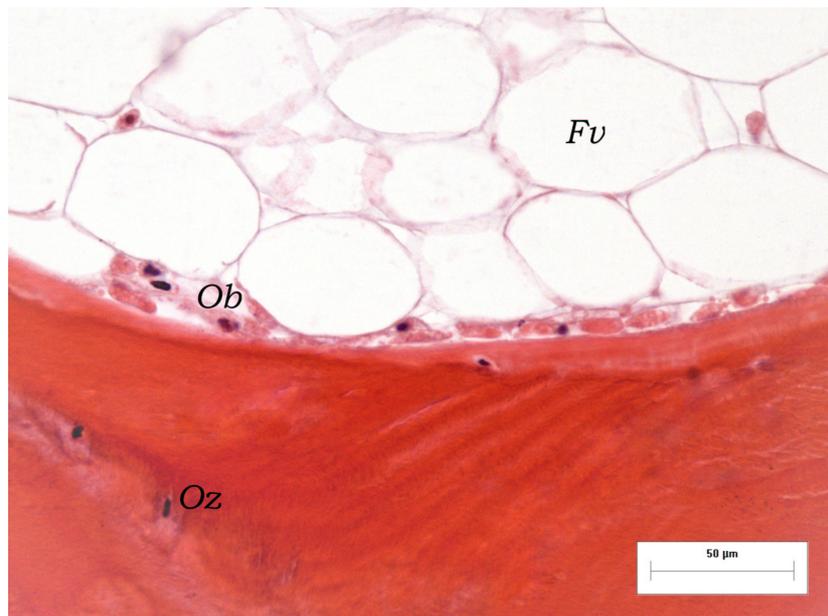


Abbildung 30: Übersichtsfärbung mit H&E: (Oz) Osteozyten, (Ob) Osteoblasten, (Fv) Fettvakuolen

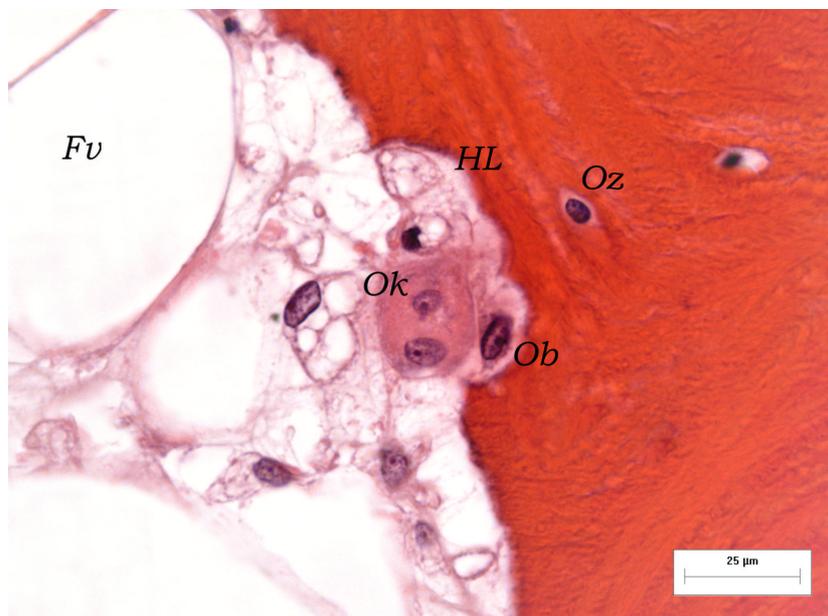


Abbildung 31: Osteoklast (Ok) und Osteoblast (Ob) in einer Howship-Lakune (HL): (Oz) Osteozyt, (Fv) Fettvakuolen

2.3.12 Die Giemsa-Färbung

Die Giemsa-Färbung ist einfach und schnell durchzuführen. Sie liefert einen guten Farbkontrast zwischen Zellen und der Interzellulärsubstanz der Weich- und Hartgewebe.

In den gefärbten Präparaten wird mineralisierte Matrix rosa bis zartrosa, Kollagen rosa, Osteoid blassblau sowie Zellen und Zellkerne unterschiedlich blau angefärbt.

Herstellung der Färbelösung:

1. 40 ml käufliche Giemsa-Lösung
2. 160 ml abgekochtes Aqua dest.

Die Giemsa-Lösung wird mit dem Aqua dest. verdünnt und ist stets frisch vor der Verwendung anzusetzen.

Färbevorschrift:

1.	Entplasten in 2-Methoxyethylacetat	dreimal 20 Minuten
2.	Absteigende Alkoholreihe	
3.	Spülen in Aqua dest.	zweimal 3 Minuten
4.	Einstellen in Giemsa	30 Minuten
5.	Differenzieren in 0,1% iger Essigsäure	
6.	Differenzieren in 70% igem Äthanol	
7.	Differenzieren in 96% igem Äthanol	
8.	Dehydratisieren in Xylol	zweimal 5 Minuten
9.	Eindecken mit Entellan	

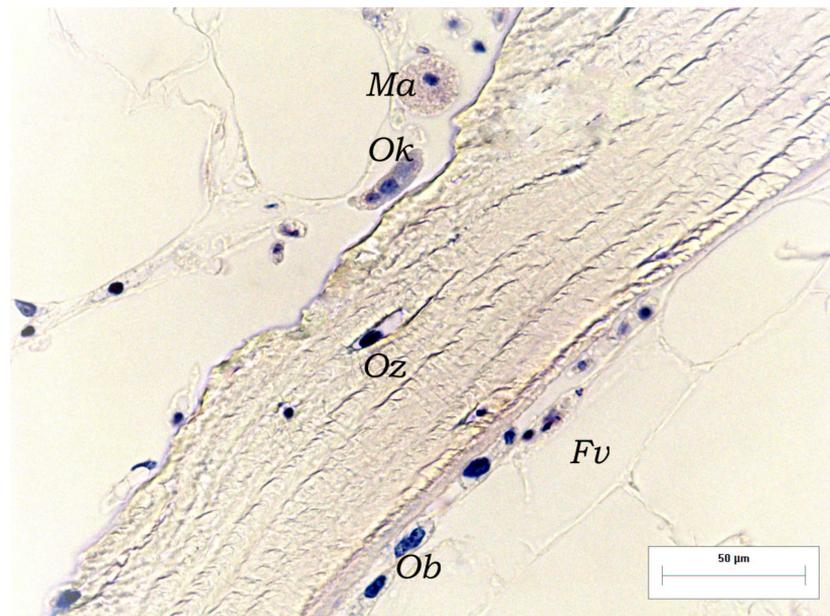


Abbildung 32: Übersichtsfärbung mit Giemsa; Die rechte Seite des Trabekels zeigt im Gegensatz zur Linken eine Auflagerung von Osteoid: (Ma) Makrophage, (Ok) Osteoklast, (Ob) Osteoblasten, (Oz) Osteozyten, (Fv) Fettvakuolen

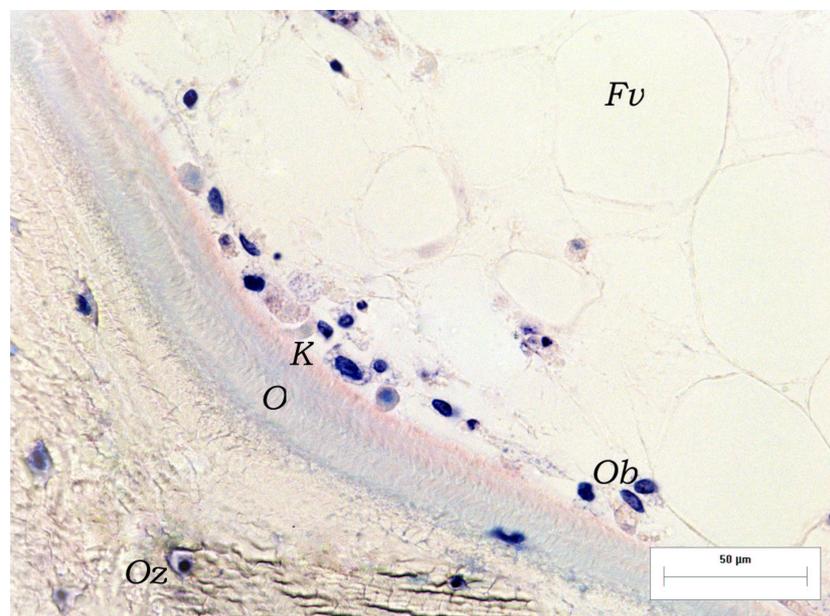


Abbildung 33: Mit Osteoid (O) besetzter Trabekel: (K) Kollagen, (Ob) Osteoblasten, (Oz) Osteozyten, (Fv) Fettvakuolen

2.3.13 Die Detektion apoptotischer Osteozyten

Die Detektion apoptotischer Osteozyten erfolgt mit dem ApopTag *In Situ Oligo Ligation Kit* der Firma Intergen Company.

Weil in sterbenden Zellen die DNA durch spezifische Mechanismen abgebaut wird, findet man in apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschiedliche jedoch jeweils spezifische Typen von DNA-Enden. Die Färbung dieser exponierten DNA-Enden *in situ* kann durch mehrere enzymvermittelte Reaktionen geschehen. Mit dem verwendeten Kit ist es nun möglich, den exakten Typ von DNA-Ende zu bestimmen und zu markieren, der in apoptotischen Zellen auftritt.

Der ApopTag *In Situ Oligo Ligation Kit* verbindet den Einsatz der DNA-Ligase in Kombination mit markierten Oligonukleotiden, um speziell nur doppelsträngige, stumpf-endende DNA zu detektieren. Diese stumpf-endende DNA findet man weitaus häufiger in apoptotischen als in nekrotischen Zellen.

Der histochemische Nachweis dieser spezifischen Enden verringert das Auftreten falsch-positiver Ergebnisse bei der Färbung und erhöht somit das Maß an Genauigkeit, zwischen Apoptose und Nekrose unterscheiden zu können.

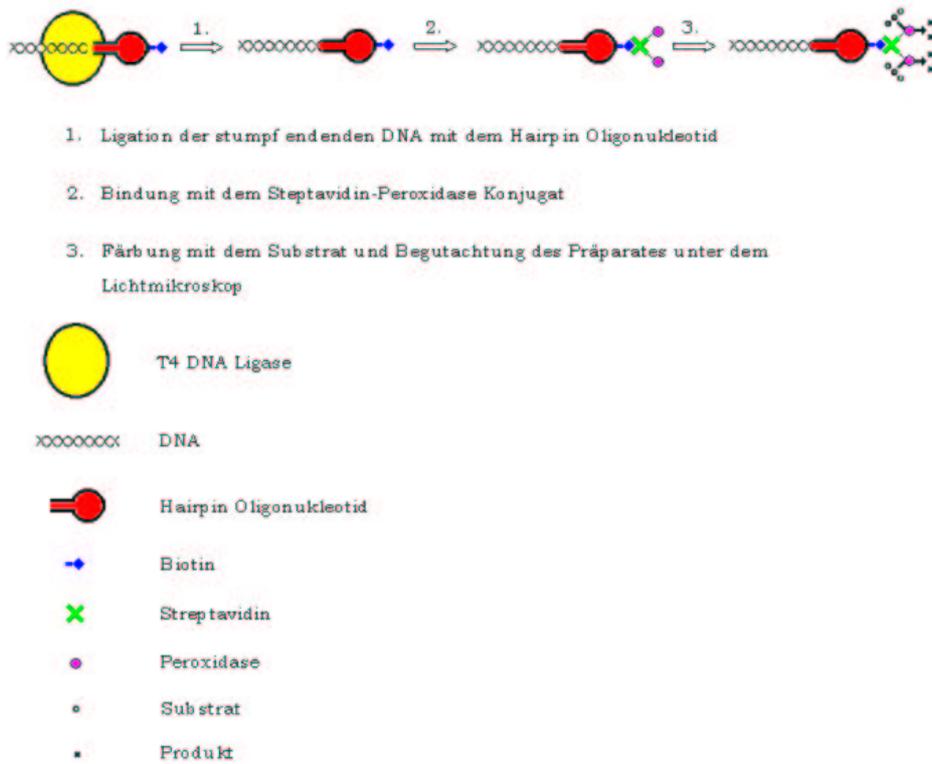


Abbildung 34: Nachweisverfahren des ApoptTag *In Situ Oligo Ligation Kit* zur Detektion apoptotischer Zellen

Handhabung des In Situ Oligo Ligation Kit:

Entacrylierung

1.	Entplasten in 2-Methoxyethylacetat	dreimal 20 Minuten
2.	Absteigende Alkoholreihe	
3.	Spülen in Aqua dest.	zweimal 3 Minuten
4.	Spülen in PBS	5 Minuten

3% ige Wasserstoffperoxid-Lösung

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

5.	Einstellen in Wasserstoffperoxid	5 Minuten
6.	Spülen mit PBS	
7.	Waschen mit Aqua dest.	zweimal 2 Minuten

Proteinase K (100 μ l/ Objektglas)

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

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

Äquilibrations-Puffer

11.	Auftragen des Äquilibrations-Puffer	in feuchter Kammer 30 Minuten
12.	Spülen mit PBS	

Oligonukleotid-Ligase Lösung (60 μ l/ Objektglas)

Je nach Fragestellung werden pro Objektglas 45 μ l Oligo A- oder Oligo B-Lösung mit 6 μ l T₄ DNA Ligase Enzym vermischt.

Bei der Negativ-Kontrolle verwendet man anstatt der T₄ DNA Ligase den Äquilibrations-Puffer. Die Positiv-Kontrollen (im Kit enthalten) werden analog mit den zu detektierenden Präparaten behandelt.

13.	Auftragen der Oligonukleotid-Ligase Lösung	in feuchter Kammer 10 bis 16 Stunden
14.	Spülen mit PBS	
15.	Waschen mit Aqua dest.	dreimal 10 Minuten

Streptavidin-Peroxidase (60 μ l/ Objektglas)

16.	Auftragen der Streptavidin-Peroxidase	in feuchter Kammer 30 Minuten
17.	Spülen mit PBS	
18.	Waschen mit PBS	dreimal 5 Minuten

Peroxidase Substrat (75 μ l/ Objektglas)

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

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

Gegenfärbung mit Hämalaun (Herstellung der Hämalaun-Lösung siehe 2.3.11)

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

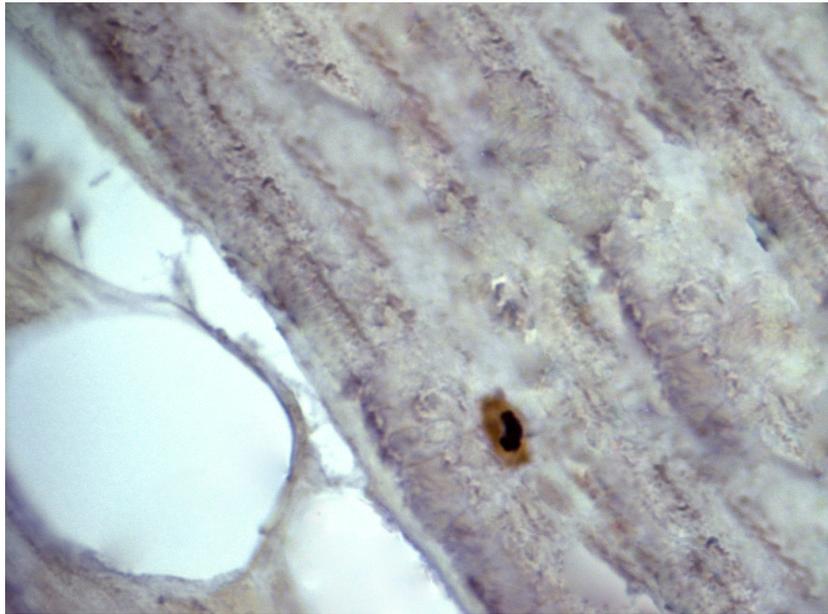


Abbildung 35: Als "apoptose-positiv" detektierter Osteozyt. Man erkennt deutlich die durch das DAB verursachte braune Färbung der Zelle

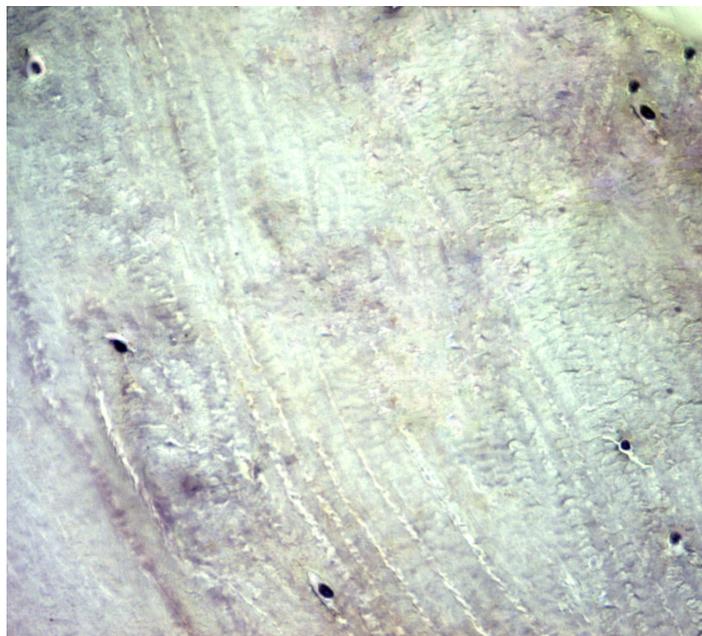


Abbildung 36: Vitale Osteozyten

2.4 Auswertung und Statistik

Die Datenaufbereitung, Auswertung und graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte unter Zuhilfenahme des Programms Microcal Origin, wobei alle Ergebnisse als Mittelwerte mit zugehörigen Standardfehlern dargestellt wurden. Die statistischen Auswertungen wurden unter Verwendung des Statistikprogrammpakets BMPD/Dynamic, Release 7.0, auf den Rechnern der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

Zur statistischen Prüfung des Gruppen- und Zeiteinflusses auf Signifikanz wurde eine einfaktorielle bzw. zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor Zeit durchgeführt. Aufgrund einer proportionalen Abhängigkeit der Standardabweichung vom arithmetischen Mittelwert und einer andeutungsweise rechtsschiefen Verteilung wurde die Variable "E-Modul" zuvor logarithmisch transformiert.

Die Untersuchung der Zusammenhänge erfolgte mit Hilfe von Korrelations- bzw. Regressionsanalysen unter Angabe des Korrelationskoeffizienten (r) und der Regressionsgeraden ($y = m * x + b$).

Bei der Bewertung der statistischen Signifikanzen wurde das Signifikanzniveau $\alpha = 0.05$ zugrunde gelegt, d. h. Ergebnisse mit $p \leq 0.05$ wurden als statistisch signifikant angesehen. Zusätzlich wird der exakte p-Wert angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Vorbemerkung

Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung des ZETOS als Kultur-Belastungssystem für trabekuläre Knochen. Aus diesem Grund spiegelt der Material- und Methoden-Teil einen erheblichen Anteil der Ergebnisse wieder. Ein besonderes Augenmerk liegt hierbei auf der Histologie nicht entkalkter Knochen.

3.2 pH-Werte

Der pH-Wert im verbrauchten Medium eines jeden Knochenzylinders wurde täglich bestimmt (siehe 2.2.3). Somit liegen pro Knochenzylinder n=24 Bestimmungen zur Auswertung vor.

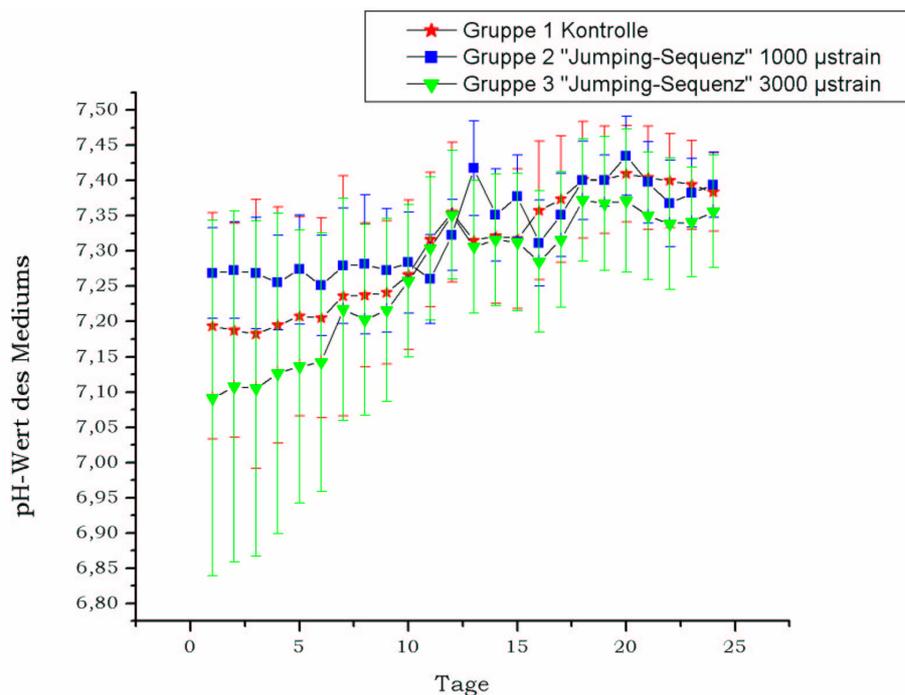


Abbildung 37: Arithmetische Mittelwerte der pH-Werte über die Zeit mit ihren Standardabweichungen

Abbildung 37 stellt den Verlauf der pH-Werte über die Zeit dar. Eine Erklärung der tendenziell zum Anfang niedrigeren pH-Werte ist die präparationsbedingte Zellschädigung im Randbereich der Knochenzylinder. Diese These wird vom Verlauf der alkalischen Phosphatase (siehe 3.3) und Laktat-Dehydrogenase (siehe 3.4) gestützt.

Ein von uns gewählter Toleranzbereich von pH 7.10 bis 7.50 wurde im Mittel weder über- noch unterschritten, sodass das verwendete Nährmedium (siehe 2.1.4) hinsichtlich seiner Pufferkapazität als geeignet bezeichnet werden kann.

3.3 Alkalische Phosphatase

Für die alkalische Phosphatase ergaben sich pro Knochenzylinder n=21 Bestimmungen (siehe 2.2.4).

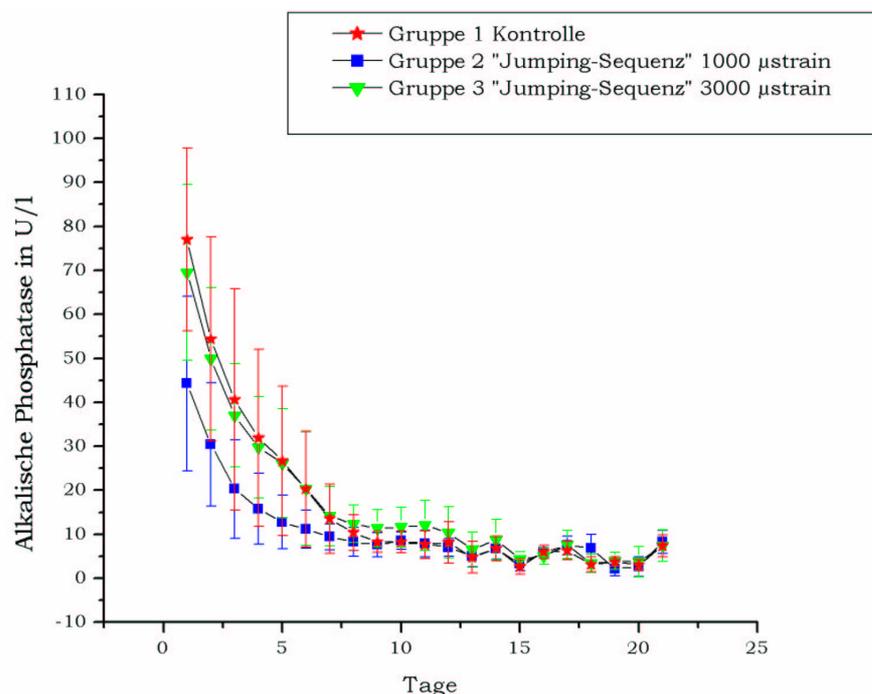


Abbildung 38: Arithmetische Mittelwerte der alkalischen Phosphatase über die Zeit mit ihren Standardabweichungen

Abbildung 38 stellt eine Verlaufsbeobachtung der alkalischen Phosphatase über den Versuchszeitraum dar. Hierbei zeigen alle drei Gruppen einen nahezu identischen Verlauf. Die zum Anfang höhere Aktivität der AP und ihr anschließender Abfall auf ein Basisniveau ist durch die präparationsbedingte Zellschädigung zu erklären. Der Kurvenverlauf des Versuchs lässt sich somit mit dem nach einer Fraktur oder Osteotomie vergleichen. Die hier verwendete Präparation der Knochenzylinder lässt sich ansatzweise mit einer Osteotomie vergleichen.

3.4 Laktat-Dehydrogenase

Analog zu der alkalischen Phosphatase, ergaben sich auch für die Laktat-Dehydrogenase pro Knochenzylinder n=21 Bestimmungen (siehe 2.2.4).

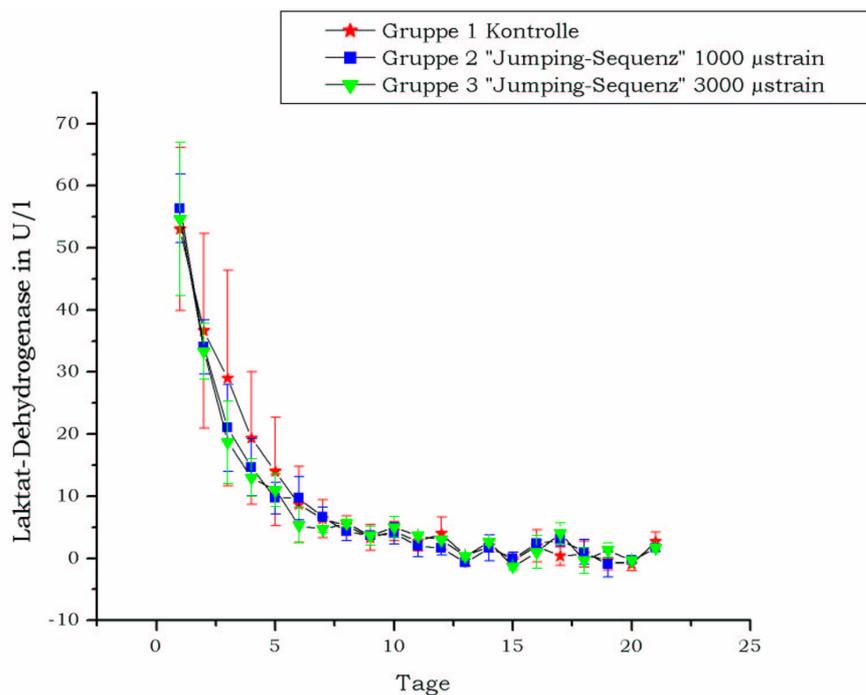


Abbildung 39: Arithmetische Mittelwerte der Laktat-Dehydrogenase über die Zeit mit ihren Standardabweichungen

Abbildung 39 zeigt den Verlauf der Laktat-Dehydrogenase über die Zeit. Wie auch schon beim Graphen der alkalischen Phosphatase erkennbar, zeigen alle drei Versuchsgruppen einen gleichen Verlauf. Die zu Versuchsbeginn hohen Werte der Laktat-Dehydrogenase sind auf die, infolge der Präparation entstandenen, Zellschädigungen zurückzuführen. Ein sich anschließender Verlauf nahe Null, ist ein Indiz dafür, dass es zu keinen weiteren Zellschädigungen (z.B. Nekrose) kam. Dies wird durch die histologischen Ergebnisse untermauert, die ein intaktes Knochengewebe zeigen.

3.5 Osteoprotegerin

Das Osteoprotegerin (OPG) wurde alle vier Tage aus dem verbrauchten Medium eines jeden Knochenzylinders bestimmt (siehe 2.2.5). Damit ergaben sich pro Knochenzylinder $n=6$ Bestimmungen.

Zur statistischen Prüfung auf Signifikanz wurde mit den einmalig gemessenen Werten von Osteoid und Osteoprotegerin eine einfaktorielle Varianzanalyse (Welch-Test; Variante der ANOVA, die unterschiedliche Standardabweichungen zwischen den Gruppen zulässt), mit anschließendem paarweisen Gruppenvergleich durchgeführt. Ein zuvor durchgeführter Levene's Test (Test auf Unterschiede bezüglich der Standardabweichungen) ergab statistisch signifikante Streuungsunterschiede ($p = 0.02$). Der abschließende Welch-Test war knapp nicht signifikant ($p = 0.055$).

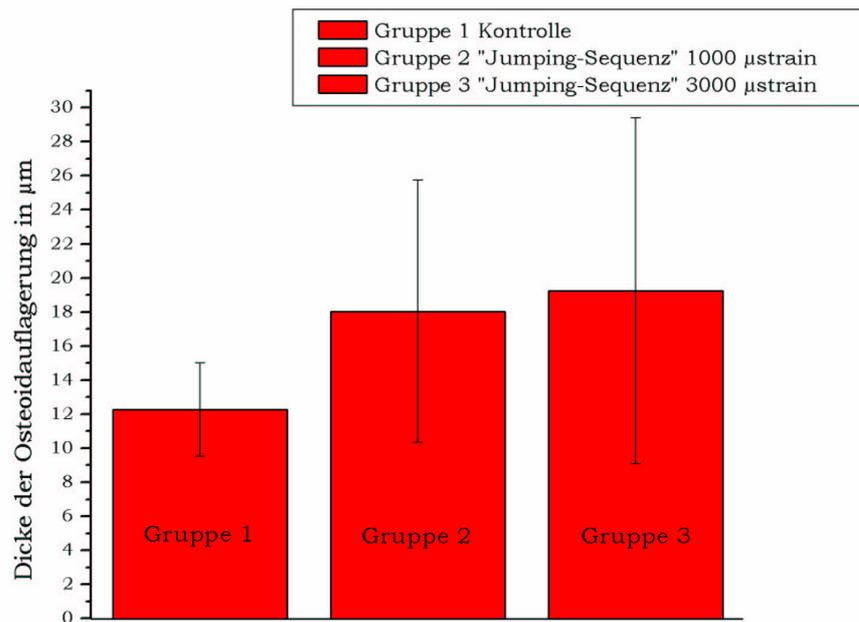


Abbildung 40: Vergleich der einmalig gemessenen Werte Osteoid mit Gruppenvergleich (arithmetische Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen)

Betrachtet man Abbildung 40 ist der knapp nicht signifikante Gruppenunterschied in den Osteoidauflagerungen dennoch deutlich ersichtlich. Die Kontrollgruppe siedelt sich eindeutig unterhalb der beiden Belastungsgruppen an, wobei Gruppe 2 und Gruppe 3 in ihren arithmetischen Mittelwerten eng beieinander liegen.

Bei der Untersuchung der Zusammenhänge der beiden quantitativen Merkmale Osteoid und OPG mit Hilfe von Korrelations- bzw. Regressionsanalysen ergibt sich mit einem Korrelationskoeffizienten (r) von 0.973 eine deutliche Abhängigkeit der Osteoidauflagerung von den OPG-Werten (siehe Abb. 41).

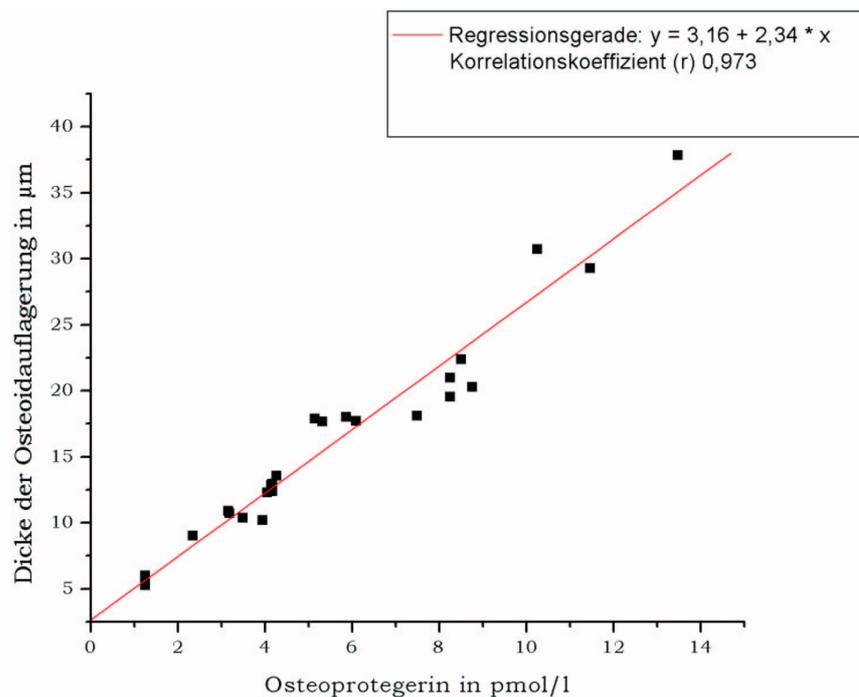


Abbildung 41: Abhängigkeit der Osteoidauflagerung vom produzierten Osteoprotegerin

Bringt man die beiden Ergebnisse, knapp signifikanter Gruppenunterschied bei der Osteoidauflagerung und die deutliche Korrelation dieser mit Osteoprotegerin, auf einen Nenner, ist die mechanische Belastung der Knochenzylinder als auslösender Mechanismus zu verstehen.

3.6 Scheinbare Steifigkeit der Knochenzylinder (E-Modul)

Für das E-Modul eines jeden Knochenzylinders ergaben sich $n=21$ Bestimmungen (siehe 2.2.2).

Die Abweichung der scheinbaren Steifigkeit von der ersten zur zweiten Quasi-Statistischen-Belastung beträgt als relativer arithmetischer Mittelwert 17.92 % mit einer Standardabweichung von ± 0.875 . Diese Abweichung bleibt über den Versuchszeitraum konstant und wird als "viskoelastischer-Effekt" der Knochenzylinder

der angesehen. Er ist jedoch bei der Erhebung der scheinbaren Steifigkeit unerwünscht, da dieser Effekt die zu ermittelnden E-Modul-Werte stark verfälscht und es zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen kommt. Daher sind nur die E-Modul Datensätze der zweiten Quasi-Statistischen-Belastung zu verwenden. Die Rekonstitution des "viskoelastischen-Effekts" nach einer Belastung der Knochenzylinder beträgt zirka eine Stunde.

Abbildung 42 zeigt die Zunahme des E-Moduls, wobei die absoluten MPa-Werte der Knochenzylinder über die Zeit aufgetragen sind. Stellt man die absoluten MPa-Werte prozentual dar, wie in Abbildung 43, so kann der Verlauf verdeutlicht werden.

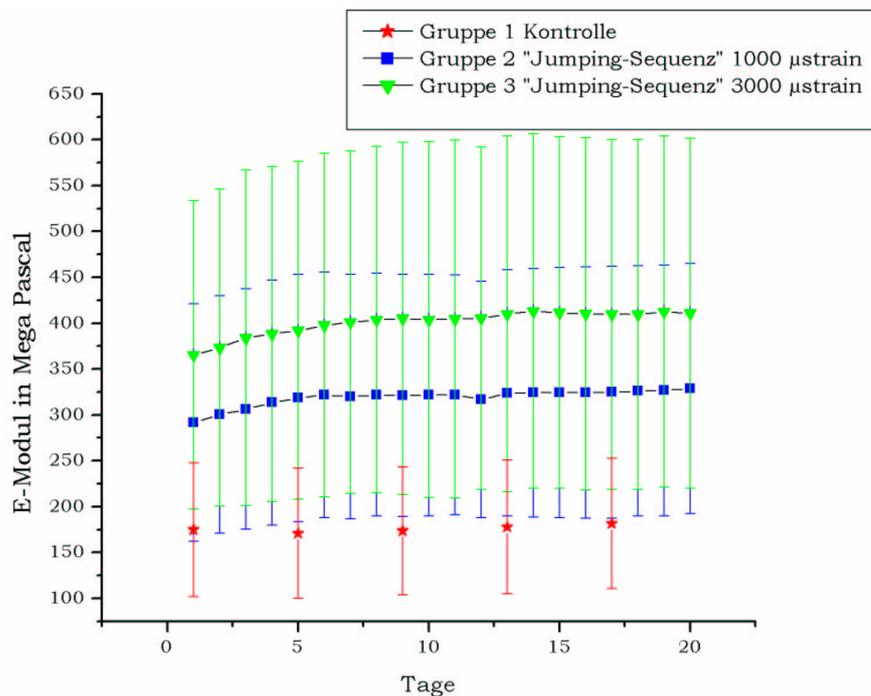


Abbildung 42: Verlauf des E-Moduls angegeben als arithmetische Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen

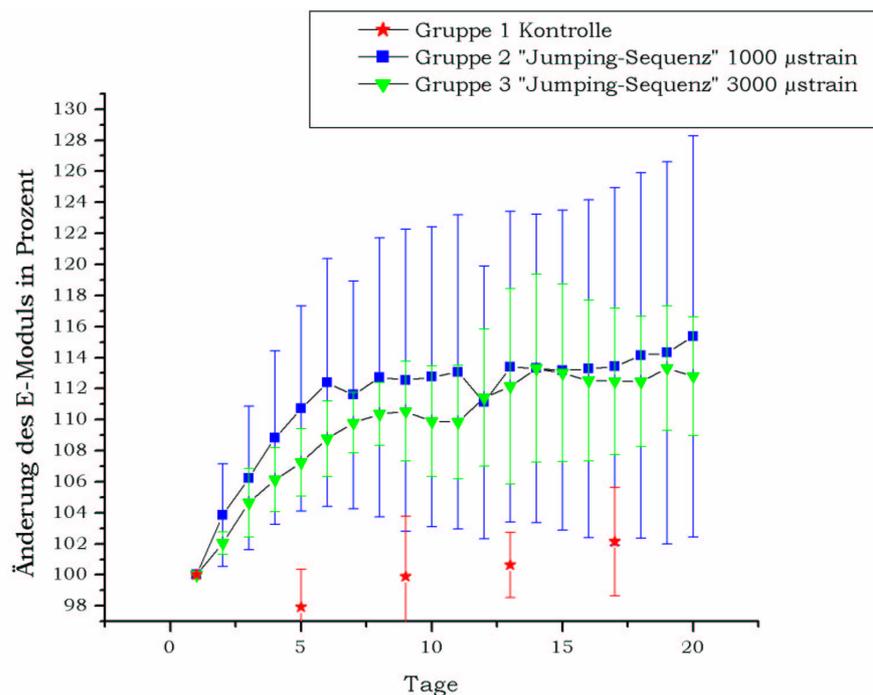


Abbildung 43: Veränderung der relativen E-Modul-Werte (arithmetische Mittelwerte) mit ihren Standardabweichungen

Über den gesamten Versuchszeitraum kommt es in den beiden Belastungsgruppen 2 und 3 zu einer Zunahme der scheinbaren Steifigkeit. In der Kontrollgruppe zeigt sich zunächst eine leichte Abnahme des E-Moduls, gefolgt von einem Anstieg, welcher jedoch weit unterhalb dem der Belastungsgruppen liegt.

Zur statistischen Prüfung des Gruppen- und Zeiteinflusses auf Signifikanz wurde nach einer logarithmischen Transformierung des E-Modul Datensatzes (siehe 2.4) eine zweifaktorielle Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor Zeit durchgeführt.

Beim Vergleich der drei Versuchsgruppen zu den Zeitpunkten 1,5,9,13 und 17 zeigt sich ein signifikant globaler Gruppeneffekt mit $p = 0.008$ und ein hoch signifikant globaler Zeiteffekt mit $p < 0.0001$. Weiterhin ist die Wechselwirkung zwischen Zeit und Gruppe mit $p = 0.0002$ hoch signifikant (siehe Abb. 44).

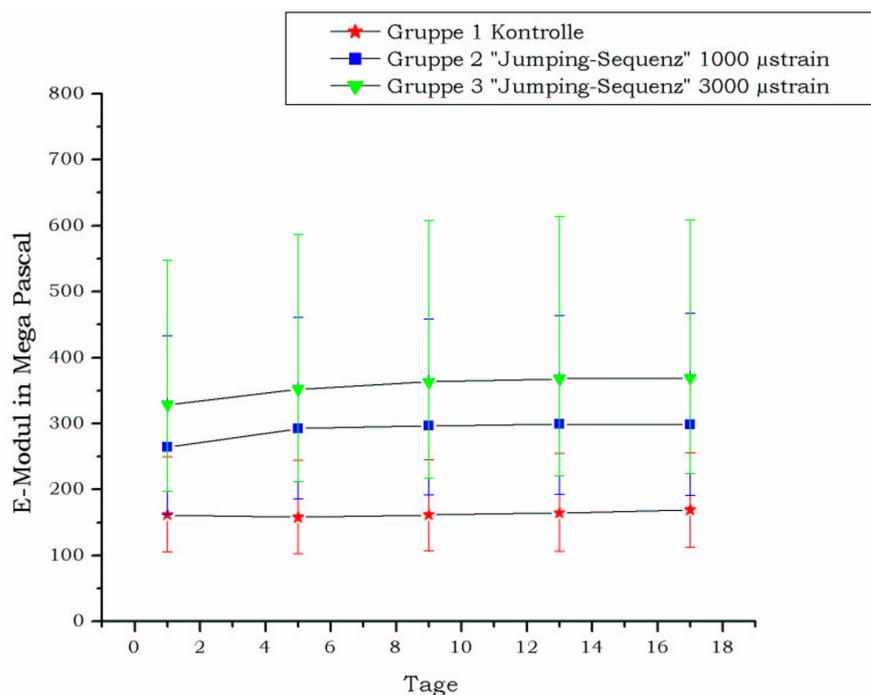


Abbildung 44: Veränderung des E-Moduls über die Zeit (geometrische Mittelwerte mit ihren Streufaktoren)

Vergleicht man die beiden Belastungsgruppen über die Zeit miteinander, so sind mit Ausnahme eines hoch signifikant globalen Zeiteffektes ($p < 0.0001$) keine Unterschiede nachweisbar (siehe Abb. 45).

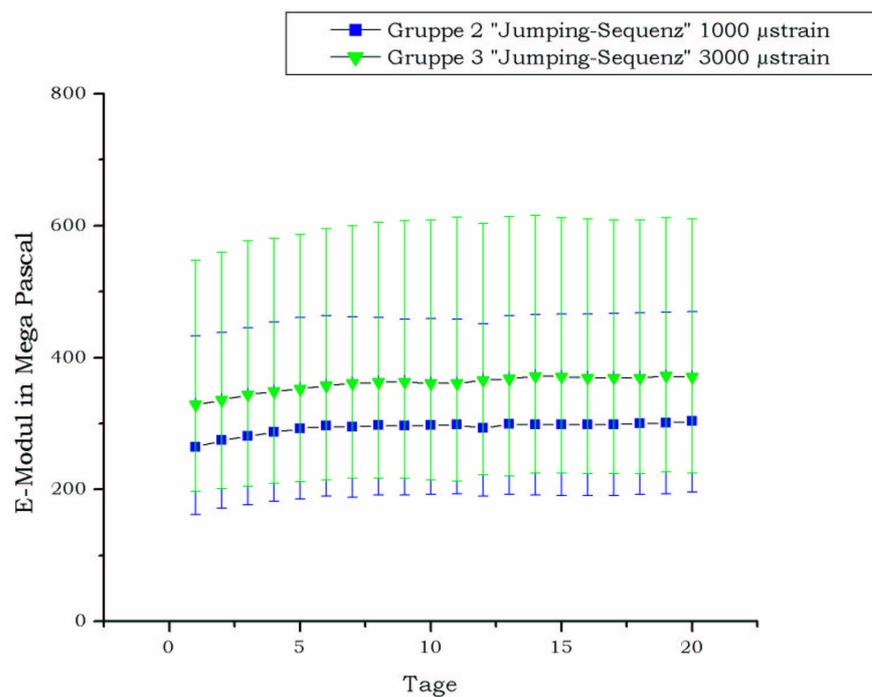


Abbildung 45: Veränderung des E-Moduls der beiden Belastungsgruppen über die Zeit (geometrische Mittelwerte mit ihren Streufaktoren)

Als Resümee findet sich eine durch die Belastung der Knochenzylinder mit dem ZETOS verursachte hoch signifikante Zeit- und Gruppen-Wechselwirkung zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Belastungsgruppen.

3.7 Osteoid

Das arithmetische Mittel der Schichtdicke des Osteoids eines jeden Knochenzylinders wurde unter Zuhilfenahme des Programms ImageProPlus ermittelt.

Zunächst wurden von jedem Explantat nach Masson-Goldner gefärbte, histologische Präparate hergestellt (siehe 2.3.8). In diesen gefärbten Präparaten wurden anschließend jeweils acht Gesichtsfelder (100fache Vergrößerung) ausgewertet. Hierfür wurde die Schichtdicke des Osteoids manuell unter Verwendung des Programms ImageProPlus bestimmt. Aus allen Bestimmungen eines jeweiligen Prä-

parates wurde das arithmetische Mittel gebildet. Die arithmetischen Mittelwerte dienten zu statistischen Prüfungen, die bereits im Kapitel 3.5 behandelt wurden.

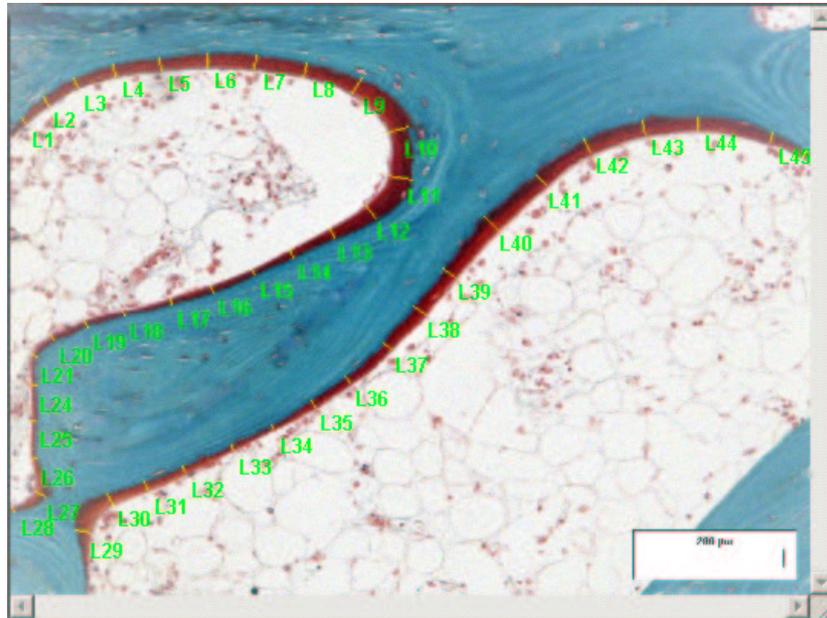


Abbildung 46: Nach Masson-Goldner gefärbtes und anschließend ausgewertetes Präparat

3.8 Polychrome Sequenzmarkierung

Bei der polychromen Sequenzmarkierung kann eine Tetracyclin-Bande nur vereinzelt nachgewiesen werden. Hingegen ist die Bande (Label) des Alizarin-Complexone konstant nachweisbar. Infolgedessen wird davon Abstand genommen, die Mineralisationsrate zu bestimmen.

Ein in den meisten Fällen sichtbarer Aufbau an Osteoid oberhalb der Alizarin-Complexone-Bande spricht für einen stetigen Prozess. Die Schichtdicke des oberhalb der Alizarin-Complexone-Bande befindlichen Osteoids entspricht annähernd der Schichtdicke, welche in den nach Masson-Goldner gefärbten Präparaten nachgewiesen werden konnte (siehe 3.7).

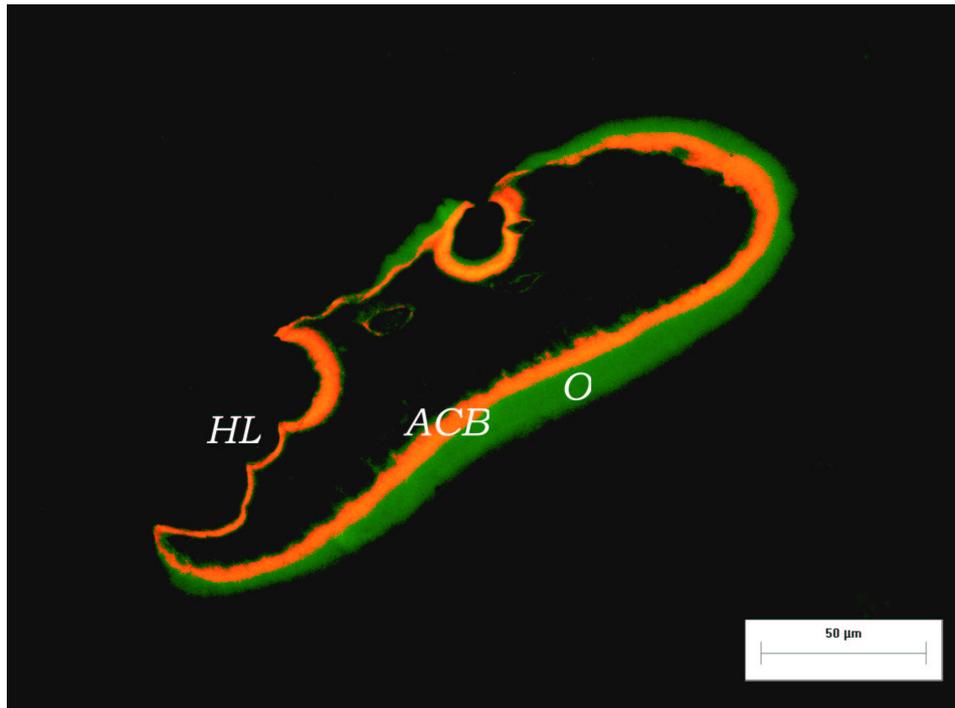


Abbildung 47: Nur einfach markierter Trabekel; Deutlich ist die zum Teil weitere Auflagerung von Osteoid (O) oberhalb der Alizarin-Complexone-Bande (ACB) erkennbar: (HL) Howship-Lakune

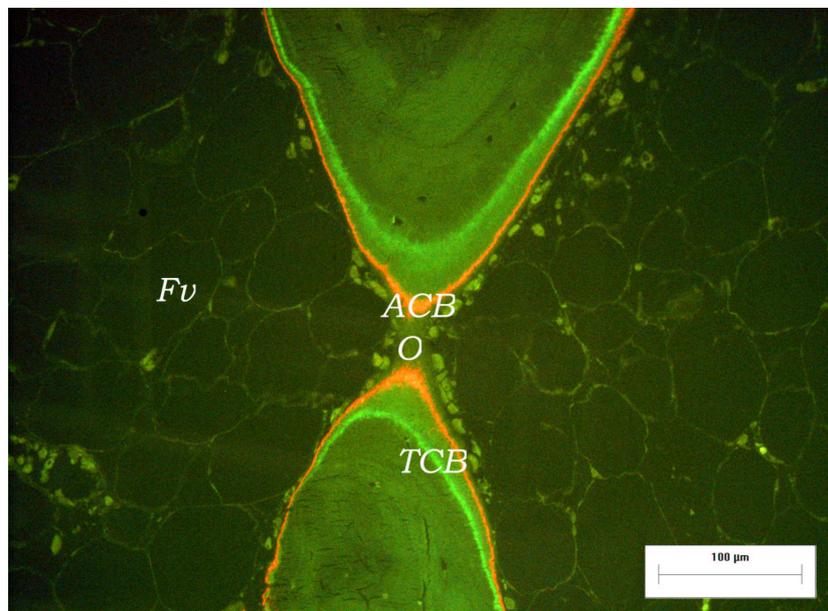


Abbildung 48: Doppel-Label; Deutlich erkennbar ist sowohl die Tetrazyklin-Bande (TCB) als auch die Alizarin-Complexone-Bande (ACB): (O) Osteoid, (Fv) Fettvakuolen

3.9 Apoptotische Osteozyten

Da nur ein kleiner Prozentsatz der Präparate auf apoptotische Osteozyten untersucht wurde (Methodik siehe 2.3.13), soll hier nur eine Tendenz angegeben werden. Insgesamt detektierte das verwendete Kit nur sehr wenige Osteozyten als "apoptose-positiv". In der Kontrollgruppe sind jedoch tendenziell mehr Osteozyten in den Apoptoseprozess involviert als in den beiden Belastungsgruppen.

4 Diskussion

Mit dem ZETOS als Belastungseinheit und den dazugehörigen Kultur-Belastungskammern ist es erstmalig gelungen, trabekuläre Knochen über mehrere Wochen zu kultivieren und sie gleichzeitig mit natürlich vorkommenden Belastungsmustern zu stimulieren. Die Belastungsmuster imitieren dabei alle physiologisch auftretenden Aspekte einer mechanischen Stimulation. Somit kann der Einfluss mechanischer Belastungssignale und der von Pharmaka auf trabekuläre Knochen unter kontrollierten und definierten Versuchsbedingungen erforscht werden.

Im Hinblick auf die ausgearbeiteten Ergebnisse kann von einem voll funktionsfähigen System ausgegangen werden, da die zu untersuchenden Präparate mit physiologischen Reaktionen auf die mechanische Belastung reagieren. Wie bereits in der Einleitung angeführt (siehe 1), verursachen mechanische Belastungen, die in einem physiologischen Bereich liegen, eine Zunahme der Knochenmasse, wodurch der Knochen widerstandsfähiger wird. Dieser Effekt lässt sich an der zunehmenden scheinbaren Steifigkeit der Knochenzylinder in den Belastungsgruppen 2 und 3 und der histologisch nachweisbaren Auflagerung von Osteoid verifizieren. Der leichte Anstieg des E-Moduls in der Kontrollgruppe beruht aller Wahrscheinlichkeit nach auf der notwendigen (siehe 3.6) sich wiederholenden Quasi-Statistischen-Belastung.

In vorangegangenen Versuchen, bei denen keine zweite Quasi-Statistische-Belastung an den Messtagen erfolgte, konnte dieser Anstieg nicht beobachtet werden. Um in folgenden Versuchen die durch die Ermittlung des E-Moduls bedingte Zunahme der scheinbaren Steifigkeit zu umgehen, sollte die Kompression von 15 μm auf 10 μm reduziert werden (siehe 2.2.2).

Die nicht signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Belastungsgruppen lassen sich damit erklären, dass beide Stimuli in einem physiologischen Bereich oberhalb der für das appositionelle Knochenwachstum verantwortlichen Reiz-

schwelle liegen [28, 33]. Für eine Prüfung auf Signifikanz sind mindestens $n=40$ Präparate pro Belastungsgruppe notwendig, da nur kleine Unterschiede zwischen den beiden Belastungsgruppen vorliegen. Die hier zur Verfügung stehenden $n=8$ Proben je Versuchsgruppe erlauben daher keine adäquate Prüfung auf Signifikanz. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass dynamische Belastungen oberhalb von $5000 \mu\text{strain}$ zu einer Abnahme des E-Moduls führen (siehe 1). Diese Belastung stellte sich als unphysiologisch hoch dar, was histologisch in Form vereinzelter "Mikrofrakturen" bestätigt werden konnte. Weiterhin zeigten Kontrollgruppen, bei denen über den gesamten Versuchszeitraum nur drei Messungen der scheinbaren Steifigkeit durchgeführt wurden, einen Abfall des E-Moduls. Die mechanischen Stimuli der Quasi-Statistischen-Belastungen waren demnach nicht ausreichend, um einen Verlust an Knochenmasse zu verhindern (siehe 1).

Dass die Zunahme der scheinbaren Steifigkeit eine physiologische Reaktion auf die Belastung darstellt und kein "viskoelastischer-Effekt" ist, wird durch das appositionelle Knochenwachstum verdeutlicht. Dies ist an den Osteoidauflagerungen und den Ergebnissen der polychromen Sequenzmarkierung (siehe 3.5,3.7 und 3.8) erkennbar. Die erstmalig in dieser Arbeit beschriebene Korrelation zwischen Osteoprotegerin und Osteoidauflagerung untermauert diese Darstellung (siehe 3.5).

Aufgrund der histologischen Ergebnisse kann auf eine adäquate Versorgung der Knochenzylinder mit dem verwendeten Nährmedium geschlossen werden. Es zeigen sich weder im Randbereich noch im Zentrum Anzeichen einer Nekrose oder Hypoxie (ein zu geringer Sauerstoff-Partialdruck führte bei Vorversuchen zu einer knorpeligen Umbildung im Zentrum des Knochenzylinders). Auch die nur sehr vereinzelt als "apoptose-positiv" detektierten Osteozyten sowie stattfindende Mitosen sprechen für eine ausreichende Versorgung des Knochens. Das histologisch in der Alcianblau-PAS Färbung detektierte Glykogen der Zellen, ist ebenso ein Hinweis auf eine suffizient stattfindende Ernährung.

Der Verlauf der alkalischen Phosphatase (AP) und der Laktat-Dehydrogenase (LDH) über die Zeit verdeutlichen das Bestehen eines funktionsfähigen Systems (siehe 3.3 und 3.4). Würde man eine Zellschädigung infolge einer Unterversorgung erwarten, wäre die LDH erhöht. Dies ist jedoch mit Ausnahme der zunächst präparationsbedingten Zellschädigung nicht der Fall. Für zukünftige Versuche ist anzuraten, Bone Sialoprotein, Osteonektin und Osteopontin aus dem verbrauchten Medium mittels ELISA zu bestimmen. Hierbei handelt es sich um die drei am häufigsten vorkommenden "Nichtkollagene Proteine" der extrazellulären Matrix des Knochens, welche die Mineralisation regulieren [26, 23, 6, 105]. Auch eine Bestimmung des Receptor activator of NF- κ Liganden sollte in Betracht gezogen werden.

In Bezug auf die Histologie, sollten in nachfolgenden Versuchen die fixierten Knochenzylinder mit einer Diamantbandsäge längs geteilt werden. Eine der beiden Hälften wird nach dem oben beschriebenen Verfahren (siehe 2.3) und die andere nach Entkalkung in Paraffin eingebettet. Somit können die Vorteile der nicht entkalkten Knochenhistologie genutzt und immunhistochemische Färbungen an den paraffineingebetteten Schnitten durchgeführt werden. Hierfür ausschlaggebend ist, dass die von uns durchgeführten immunhistochemischen Färbungen der mit Kunststoff eingebetteten Präparate zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen führten. Eine Ausnahme bildete das verwendete *ApopTag In Situ Oligo Ligation Kit*, welches den Einsatz der DNA-Ligase in Kombination mit markierten Oligonukleotiden verbindet, um apoptotische Zellen zu detektieren. Dagegen gehört die Immunhistochemie paraffineingebetteter Präparate heute zur alltäglichen Routinediagnostik.

Die Detektion "apoptose-positiver" Osteozyten sollte in der vorliegenden Arbeit nur methodisch untersucht werden (siehe 2.3.13). Die Untersuchung mechanischer Einflüsse auf die Apoptose von Osteozyten sollte Inhalt einer weiteren Arbeit sein. Die im Ergebnisteil aufgezeigten Tendenzen jedoch, entsprechen unseren Er-

wartungen (siehe 3.9). So findet man in Knochen, die "geringen" mechanischen Belastungen ausgesetzt werden, einen prozentual höheren Anteil an "apoptose-positiven" Osteozyten [70] als in "höher" belasteten Knochen.

Die möglichen Ursachen der nur inkonstant vorkommenden Tetrazyklin-Bande wurden bereits unter 1.6 behandelt. Für folgende Versuche sollte die erste Markierung einige Tage später und mit einem anderen Fluochrom z.B. Xylenorange erfolgen. Auch eine Doppelmarkierung mit Alizarin-Complexone sollte nach unseren Erfahrungen, trotz der nachgesagten Toxizität des Fluochroms, in Betracht gezogen werden, da es die besten Ergebnisse zeigte. Eine weitere Auflagerung von Osteoid oberhalb der Alizarin-Complexone Bande spricht dafür, dass bei der von uns verwendeten Konzentration die toxische Eigenschaft als gering eingestuft werden kann (siehe 3.8).

Für die Zukunft soll ein ZETOS in Form einer automatisierten Miniatur zur Erforschung der Auswirkung von Schwerelosigkeit auf Knochen in der internationalen Raumstation ISS zum Einsatz kommen.

5 Zusammenfassung

Mit dem ZETOS als Kultur-Belastungssystem ist es gelungen, trabekuläre Knochenzylinder über mehrere Wochen zu kultivieren und sie gleichzeitig mechanisch zu stimulieren. Das System kann hierbei die Komplexität imitieren, welche bei einer mechanischen Belastung in vivo auftritt. Dies war anderen Systemen bisher nicht gelungen.

Im Zuge durchgeführter Quasi-Statistischer-Belastungen können Veränderungen der physikalischen Eigenschaft der Knochenzylinder bestimmt werden. Quasi-Statistische-Belastungen dienen der Ermittlung der scheinbaren Steifigkeit, welche in der Maßeinheit eines Elastizitäts-Moduls (E-Modul) wiedergegeben wird. Änderungen im E-Modul erlauben Rückschlüsse auf die Effekte mechanischer Belastungen oder von Pharmaka. Die Zunahme der scheinbaren Steifigkeit ist die von uns histologisch belegte Folge eines appositionellen Knochenwachstums. Damit es jedoch zu einem appositionellen Knochenwachstum kommt, muss der mechanische Stimulus oberhalb einer Grenzschwelle und innerhalb eines physiologischen Bereiches liegen, da es anderweitig zu einem Verlust an Knochendichte kommt bzw. mit einer Degeneration der Knochenstruktur zu rechnen ist.

Zwischen einer unbelasteten Kontrollgruppe und zwei mit 1000 μ strain respektive 3000 μ strain belasteten Versuchsgruppen (verwendet wurde eine "Jumping-Sequenz") zeigten sich, nach einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholungen im Faktor Zeit, signifikant globale Gruppen- ($p = 0.008$) und Zeiteffekte ($p < 0.0001$), sowie eine hoch signifikante Wechselwirkung zwischen Zeit und Gruppe ($p = 0.0002$).

Eine durchgeführte einfaktorielle Varianzanalyse mit den einmalig gemessenen Werten von Osteoid und Osteoprotegerin ergab statistisch signifikante Streuungsunterschiede ($p = 0.02$), wohingegen ein abschließender Welch-Test mit $p = 0.055$ knapp nicht signifikant war.

Bei der Untersuchung der Zusammenhänge dieser beiden Merkmale mit Hilfe von Korrelations- bzw. Regressionsanalysen, konnte mit einem Korrelationskoeffizienten (r) von 0.973 eine deutliche Abhängigkeit der Osteoidauflagerung von Osteoprotegerin nachgewiesen werden.

6 Summary

The ZETOS is used for mechanical loading of bone cores. It facilitates the cultivation and defined mechanical stimulation of the trabecular bone cores over several weeks simultaneously. The complex behavior of mechanical forces in vivo can be first time mimicked by this system.

Changes of physical properties of the bone cores can be investigated during quasi-static-loadings. Apparent stiffness is declared in dimension units of the Youngs-Modulus and can be measured using quasi-static-loads. Conclusions can be drawn due to the rearrangement of trabecular bone and thus changes of the Youngs-Modulus in respect to the influence of mechanical loading and pharmaceutical reagents. Increase of apparent stiffness is proved to be caused by appositional bone growth. To induce appositional bone growth the level of mechanical loading has to exceed a certain threshold. Furthermore amplitude of mechanical stimulation has to remain within a physiological range, otherwise a decrease in bone mass and thus a degeneration of trabecular bone structure can occur.

Two-way ANOVA of an unloaded control group and two groups which has been loaded by 1000 μ strain and 3000 μ strain (a "Jumping-Signal" was used) respectively was performed examining the time-factor by experiment repetition. In conclusion significant global groups ($p=0.008$), time effects ($p<0.0001$) and highly significant interaction between time and group (0.0002) were observed.

One-way ANOVA of singular measured characteristics of osteoid and osteoprotegerine results in differences of variance which exhibit statistical significance, whereas a Welch-Test was not significant subsequently.

Investigation on coherences between these two characteristics by correlation- and regression analysis show an explicit correlation between osteoprotegerin and the thickness of the osteoid surface.

7 Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of Variance
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
ATP	Adenosin-Triphosphat
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BMU	Basic Metabolic Unit
bp	base pairs
CFU-GM	Colony Forming Unit-Granulocyte/ Macrophage
DAB	Diaminobenzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbant Assay
E-Modul	Elastizitäts-Modul
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast Growth Factor
GPa	Giga Pascal
H	Proton
H&E	Hämalaun-Eosin
Hz	Hertz
IGF	Insulin-Like Growth Factor
IL	Interleukin
ISS	International Space Station
KV	Kilo Volt
LDH	Laktat-Dehydrogenase
mAS	milli Ampere Sekunden
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor

7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

MMP	Matrix-Metalloproteinase
MPa	Mega Pascal
N	Newton
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
Na/ H-Antiporter	Natrium/ Protonen-Antiporter
OCIF	Osteoclastogenesis Inhibitory Factor
ODF	Osteoclast Differentiation Factor
OPG	Osteoprotegerin
OPGL	Osteoprotegerin-Ligand
PAS-Reaktion	Perjodsäure-Schiff-Reaktion
PBS	Phosphat gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PC	Personal Computer
PEA	piezo-elektrische-Aktor
PTH	Parathormon
RANK	Receptor Aktivator of NF- κ B
RANKL	Receptor Aktivator of NF- κ B Ligand
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TGF	Transforming Growth Faktor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing-ligand
TUNEL	Terminal Deoxynucleotidyl Tranferase-mediated dUTP Nick End-Labeling
V	Volt

Literatur

- [1] M.P. Akhter, D.M. Cullen, and R.R. Recker. Bone adaptation response to sham and bending stimuli in mice. *J Clin Densitom*, 5(2):207–16, 2002.
- [2] T. Albrektsson, A.R. Eriksson, M. Jacobsson, P. Kalebo, K.G. Strid, and 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.
- [3] D.M. Anderson, E. Maraskovsky, W.L. Billingsley, W.C. Dougall, M.E. Tometsko, E.R. Roux, M.C. Teepe, R.F. DuBose, D. Cosman, and L. Galibert. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390(6656):175–9, 1997.
- [4] J.E. Aubin, F. Liu, L. Malaval, and A.K. Gupta. Osteoblast and chondroblast differentiation. *Bone*, 17(2 Suppl):77S–83S, 1995.
- [5] P.J. Bekker and 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] A. Bellahcene and V. Castronovo. Expression of bone matrix proteins in human breast cancer: potential roles in microcalcification formation and in the genesis of bone metastases. *Bull Cancer*, 84(1):17–24, 1997.
- [7] H.C. Blair, S.L. Teitelbaum, R. Ghiselli, and S. Gluck. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science*, 245(4920):855–7, 1989.
- [8] M.D. Boppart, D.B. Kimmel, J.A. Yee, and D.M. Cullen. Time course of osteoblast appearance after in vivo mechanical loading. *Bone*, 23(5):409–15, 1998.

- [9] M. Bouvier. Variation in alkaline-phosphatase activity with changing load on the mandibular condylar cartilage in the rat. *Arch Oral Biol*, 32(9):671–5, 1987.
- [10] H. Brandstrom, T. Bjorkman, and O. Ljunggren. Regulation of osteoprotegerin secretion from primary cultures of human bone marrow stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 280(3):831–5, 2001.
- [11] H. Brandstrom, K.B. Jonsson, C. Ohlsson, O. Vidal, S. Ljunghall, and O. Ljunggren. Regulation of osteoprotegerin mRNA levels by prostaglandin E2 in human bone marrow stroma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 247(2):338–41, 1998.
- [12] E.H. Burger and J. Klein-Nulend. Mechanotransduction in bone—role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J*, 13 Suppl:S101–12, 1999.
- [13] T.L. Burgess, Y. Qian, S. Kaufman, B.D. Ring, G. Van, C. Capparelli, M. Kelley, H. Hsu, W.J. Boyle, C.R. Dunstan, S. Hu, and D.L. Lacey. The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts. *J Cell Biol*, 145(3):527–38, 1999.
- [14] A. Caillot-Augusseau, M.H. Lafage-Proust, C. Soler, J. Pernod, F. Dubois, and 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.
- [15] M.Z. Cheng, G. Zaman, S.C. Rawlinson, R.F. Suswillo, and 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.

- [16] J.W. Chow, A.J. Wilson, T.J. Chambers, and 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.
- [17] P. Collin-Osdoby, L. Rothe, F. Anderson, M. Nelson, W. Maloney, and P. Osdoby. Receptor activator of NF-kappa B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J Biol Chem*, 276(23):20659-72, 2001.
- [18] S.C. Cowin, L. Moss-Salentijn, and M.L. Moss. Candidates for the mechanosensory system in bone. *J Biomech Eng*, 113(2):191-7, 1991.
- [19] G.P. Dalsky, K.S. Stocke, A.A. Ehsani, E. Slatopolsky, W.C. Lee, and S.J. Birge, Jr. Weight-bearing exercise training and lumbar bone mineral content in postmenopausal women. *Ann Intern Med*, 108(6):824-8, 1988.
- [20] D.W. Dempster, E. Shane, W. Horbert, and 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.
- [21] M. Dexter and T. Allen. Haematopoiesis. Multi-talented stem cells? *Nature*, 360(6406):709-10, 1992.
- [22] S.B. Doty. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int*, 33(5):509-12, 1981.
- [23] T.A. Einhorn. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop*, (355 Suppl):S7-21, 1998.
- [24] E.F. Eriksen, H.J. Gundersen, F. Melsen, and L. Mosekilde. Reconstruction of the formative site in iliac trabecular bone in 20 normal individuals em-

- ploying a kinetic model for matrix and mineral apposition. *Metab Bone Dis Relat Res*, 5(5):243–52, 1984.
- [25] J.R. Farley, J.L. Ivey, and D.J. Baylink. Human skeletal alkaline phosphatase. Kinetic studies including pH dependence and inhibition by theophylline. *J Biol Chem*, 255(10):4680–6, 1980.
- [26] W.J. Fassbender, T. Ruf, H.E. Kaiser, and H. Stracke. Serum levels of immunoreactive bone sialoprotein in osteoporosis: positive relations to established biochemical parameters of bone turnover. *In Vivo*, 14(5):619–24, 2000.
- [27] Flemming W. Ueber die Bildung von Richtfiguren in Saeuethiereiern beim Uebergang Graaf'scher Follikel. S 221-244. *Arch Anat EntwGesch.*, 1885.
- [28] M.R. Forwood and C.H. Turner. Skeletal adaptations to mechanical usage: results from tibial loading studies in rats. *Bone*, 17(4 Suppl):197S–205S, 1995.
- [29] H. M. Frost. Resting seams: On and off in lamellar bone forming centers. *Metab. Bone Dis. Rel. Res.* 2S, 167-170, 1980.
- [30] H.M. Frost. Tetracycline-based histological analysis of bone remodeling. *Calcif Tissue Res*, 3(3):211–37, 1969.
- [31] H.M. Frost. Some ABCs of skeletal pathophysiology. I: Introduction to the series. *Calcif Tissue Int*, 45(1):1–3, 1989.
- [32] 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.
- [33] H.M. Frost. The role of changes in mechanical usage set points in the pathogenesis of osteoporosis. *J Bone Miner Res*, 7(3):253–61, 1992.

- [34] K. Fuller, J.M. Owens, C.J. Jagger, A. Wilson, R. Moss, and T.J. Chambers. Macrophage colony-stimulating factor stimulates survival and chemotactic behavior in isolated osteoclasts. *J Exp Med*, 178(5):1733–44, 1993.
- [35] K. Fuller, B. Wong, S. Fox, Y. Choi, and T.J. Chambers. TRANCE is necessary and sufficient for osteoblast-mediated activation of bone resorption in osteoclasts. *J Exp Med*, 188(5):997–1001, 1998.
- [36] Y. Gavrieli, Y. Sherman, and 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.
- [37] P.B. Gleeson, E.J. Protas, A.D. LeBlanc, V.S. Schneider, and H.J. Evans. Effects of weight lifting on bone mineral density in premenopausal women. *J Bone Miner Res*, 5(2):153–8, 1990.
- [38] S.A. Goldstein, L.S. Matthews, J.L. Kuhn, and S.J. Hollister. Trabecular bone remodeling: an experimental model. *J Biomech*, 24 Suppl 1:135–50, 1991.
- [39] E.A. Green and R.A. Flavell. TRANCE-RANK, a new signal pathway involved in lymphocyte development and T cell activation. *J Exp Med*, 189(7):1017–20, 1999.
- [40] R.E. Guldberg, N.J. Caldwell, X.E. Guo, R.W. Goulet, S.J. Hollister, and S.A. Goldstein. Mechanical stimulation of tissue repair in the hydraulic bone chamber. *J Bone Miner Res*, 12(8):1295–302, 1997.
- [41] M. Hahn, M. Vogel, M. Amling, H. Ritzel, and G. Delling. Microcallus formations of the cancellous bone: a quantitative analysis of the human spine. *J Bone Miner Res*, 10(9):1410–6, 1995.

- [42] T.J. Hall, M. Schaeublin, and T.J. Chambers. Na⁺/H⁺-antiporter activity is essential for the induction, but not the maintenance of osteoclastic bone resorption and cytoplasmic spreading. *Biochem Biophys Res Commun*, 188(3):1097–103, 1992.
- [43] L.V. Harter, K.A. Hruska, and R.L. Duncan. Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation. *Endocrinology*, 136(2):528–35, 1995.
- [44] A. Haunstetter and S. Izumo. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res*, 82(11):1111–29, 1998.
- [45] L.C. Hofbauer, F. Gori, B.L. Riggs, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, T.C. Spelsberg, and S. Khosla. Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis. *Endocrinology*, 140(10):4382–9, 1999.
- [46] L.C. Hofbauer, S. Khosla, C.R. Dunstan, D.L. Lacey, T.C. Spelsberg, and B.L. Riggs. Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells. *Endocrinology*, 140(9):4367–70, 1999.
- [47] L.C. Hofbauer, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, T.C. Spelsberg, B.L. Riggs, and S. Khosla. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*, 25(3):255–9, 1999.
- [48] L.C. Hofbauer, C. Shui, B.L. Riggs, C.R. Dunstan, T.C. Spelsberg, T. O'Brien, and S. Khosla. Effects of immunosuppressants on receptor activator of NF-kappaB ligand and osteoprotegerin production by human osteoblastic

- and coronary artery smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 280(1):334–9, 2001.
- [49] H.J. Hohling, R.H. Barckhaus, E.R. Krefting, P. Quint, and J. Althoff. Quantitative electron microscopy of the early stages of cartilage mineralization. *Metab.Bone Dis.Relat.Res.*, (2):113–29, 1978.
- [50] M.H. Hong, C.H. Jin, T. Sato, Y. Ishimi, E. Abe, and T. Suda. Transcriptional regulation of the production of the third component of complement (C3) by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 in mouse marrow-derived stromal cells (ST2) and primary osteoblastic cells. *Endocrinology*, 129(5):2774–9, 1991.
- [51] H. Hsu, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, I. Solovyev, A. Colombero, E. Timms, H.L. Tan, G. Elliott, M.J. Kelley, I. Sarosi, L. Wang, X.Z. Xia, R. Elliott, L. Chiu, T. Black, S. Scully, C. Capparelli, S. Morony, G. Shimamoto, M.B. Bass, and W.J. Boyle. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(7):3540–5, 1999.
- [52] S. Huang and L.W. Terstappen. Formation of haematopoietic microenvironment and haematopoietic stem cells from single human bone marrow stem cells. *Nature*, 368(6472):664, 1994.
- [53] S.S. Jande. Fine structural study of osteocytes and their surrounding bone matrix with respect to their age in young chicks. *J Ultrastruct Res*, 37(3):279–300, 1971.
- [54] J.A. Jayasinghe, S.J. Jones, and A. Boyde. Scanning electron microscopy of human lumbar vertebral trabecular bone surfaces. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 422(1):25–34, 1993.

- [55] J.A. Jayasinghe, S.J. Jones, and A. Boyde. Scanning electron microscopy of human lumbar vertebral trabecular bone surfaces. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*, 422(1):25–34, 1993.
- [56] B.G. Jeansonne, F.F. Feagin, R.W. McMinn, R.L. Shoemaker, and W.S. Rehm. Cell-to-cell communication of osteoblasts. *J Dent Res*, 58(4):1415–23, 1979.
- [57] E. Jimi, T. Shuto, and T. Koga. Macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 alpha maintain the survival of osteoclast-like cells. *Endocrinology*, 136(2):808–11, 1995.
- [58] C.H. Jin, T. Shinki, M.H. Hong, T. Sato, A. Yamaguchi, T. Ikeda, S. Yoshiki, E. Abe, and T. Suda. 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 regulates in vivo production of the third component of complement (C3) in bone. *Endocrinology*, 131(5):2468–75, 1992.
- [59] D. Jones, G. Leivseth, and J. Tenbosch. Mechano-reception in osteoblast-like cells. *Biochem Cell Biol*, 73(7-8):525–34, 1995.
- [60] J.F. Kerr. Shrinkage necrosis: a distinct mode of cellular death. *J Pathol*, 105(1):13–20, 1971.
- [61] J.F. Kerr, A.H. Wyllie, and A.R. Currie. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4):239–57, 1972.
- [62] Y. Kobayashi, F. Hashimoto, H. Miyamoto, K. Kanaoka, Y. Miyazaki-Kawashita, T. Nakashima, M. Shibata, K. Kobayashi, Y. Kato, and H. Sakai. Force-induced osteoclast apoptosis in vivo is accompanied by elevation in transforming growth factor beta and osteoprotegerin expression. *J Bone Miner Res*, 15(10):1924–34, 2000.

- [63] Y.Y. Kong, W.J. Boyle, and J.M. Penninger. Osteoprotegerin ligand: a regulator of immune responses and bone physiology. *Immunol Today*, 21(10):495–502, 2000.
- [64] Y.Y. Kong, U. Feige, I. Sarosi, B. Bolon, A. Tafuri, S. Morony, C. Capparelli, J. Li, R. Elliott, S. McCabe, T. Wong, G. Campagnuolo, E. Moran, E.R. Bogoch, G. Van, L.T. Nguyen, P.S. Ohashi, D.L. Lacey, E. Fish, W.J. Boyle, and J.M. Penninger. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. *Nature*, 402(6759):304–9, 1999.
- [65] D.L. Lacey, E. Timms, H.L. Tan, M.J. Kelley, C.R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, A. Colombero, G. Elliott, S. Scully, H. Hsu, J. Sullivan, N. Hawkins, E. Davy, C. Capparelli, A. Eli, Y.X. Qian, S. Kaufman, I. Sarosi, V. Shalhoub, G. Senaldi, J. Guo, J. Delaney, and W.J. Boyle. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93(2):165–76, 1998.
- [66] L.E. Lanyon. Functional strain as a determinant for bone remodeling. *Calcif Tissue Int*, 36 Suppl 1:S56–61, 1984.
- [67] L.E. Lanyon. Control of bone architecture by functional load bearing. *J Bone Miner Res*, 7 Suppl 2:S369–75, 1992.
- [68] 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*, 18(1 Suppl):37S–43S, 1996.
- [69] S. Ljunghall and E. Lindh. Assessment of bone turnover with biochemical markers. *J Intern Med*, 225(4):219–20, 1989.

- [70] E. Lozupone, C. Palumbo, A. Favia, M. Ferretti, S. Palazzini, and F.P. Cantatore. Intermittent compressive load stimulates osteogenesis and improves osteocyte viability in bones cultured in vitro". *Clin Rheumatol*, 15(6):563–72, 1996.
- [71] C. Makiishi-Shimobayashi, T. Tsujimura, T. Iwasaki, N. Yamada, A. Sugi-hara, H. Okamura, S. Hayashi, and N. Terada. Interleukin-18 up-regulates osteoprotegerin expression in stromal/osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 281(2):361–6, 2001.
- [72] K. Matsuzaki, N. Udagawa, N. Takahashi, K. Yamaguchi, H. Yasuda, N. Shi-ma, T. Morinaga, Y. Toyama, Y. Yabe, K. Higashio, and T. Suda. Osteoclast differentiation factor (ODF) induces osteoclast-like cell formation in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun*, 246(1):199–204, 1998.
- [73] A. Miyamoto, T. Kunisada, H. Hemmi, T. Yamane, H. Yasuda, K. Miyake, H. Yamazaki, and S.I. Hayashi. Establishment and characterization of an immortal macrophage-like cell line inducible to differentiate to osteoclasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 242(3):703–9, 1998.
- [74] M.R. Moalli, N.J. Caldwell, P.V. Patil, and 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.
- [75] M.R. Moalli, S. Wang, N.J. Caldwell, P.V. Patil, and 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.
- [76] E.R. Morey-Holton and S.B. Arnaud. Spaceflight and calcium metabolism. *Physiologist*, 28(6 Suppl):S9–12, 1985.

- [77] D.E. Myers, F.M. Collier, C. Minkin, H. Wang, W.R. Holloway, M. Malakellis, and G.C. Nicholson. Expression of functional RANK on mature rat and human osteoclasts. *FEBS Lett*, 463(3):295–300, 1999.
- [78] N. Nakagawa, M. Kinoshita, K. Yamaguchi, N. Shima, H. Yasuda, K. Yano, T. Morinaga, and K. Higashio. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 253(2):395–400, 1998.
- [79] N. Nakagawa, H. Yasuda, K. Yano, S. Mochizuki, N. Kobayashi, H. Fujimoto, N. Shima, T. Morinaga, D. Chikazu, H. Kawaguchi, and K. Higashio. Basic fibroblast growth factor induces osteoclast formation by reciprocally regulating the production of osteoclast differentiation factor and osteoclastogenesis inhibitory factor in mouse osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 265(1):158–63, 1999.
- [80] J.R. Nefussi, J.M. Sautier, V. Nicolas, and N. Forest. How osteoblasts become osteocytes: a decreasing matrix forming process. *J Biol Buccale*, 19(1):75–82, 1991.
- [81] M. Notelovitz, D. Martin, R. Tesar, F.Y. Khan, C. Probart, C. Fields, and L. McKenzie. Estrogen therapy and variable-resistance weight training increase bone mineral in surgically menopausal women. *J Bone Miner Res*, 6(6):583–90, 1991.
- [82] J.E. Onyia, R.R. Miles, X. Yang, D.L. Halladay, J. Hale, A. Glasebrook, D. McClure, G. Seno, L. Churgay, S. Chandrasekhar, and T.J. Martin. In vivo demonstration that human parathyroid hormone 1-38 inhibits the expression of osteoprotegerin in bone with the kinetics of an immediate early gene. *J Bone Miner Res*, 15(5):863–71, 2000.

- [83] 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.
- [84] C. Palumbo, S. Palazzini, and G. Marotti. Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation. *Bone*, 11(6):401–6, 1990.
- [85] 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.
- [86] 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.
- [87] 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.
- [88] A.M. Parfitt, M.K. Drezner, F.H. Glorieux, J.A. Kanis, H. Malluche, P.J. Meunier, S.M. Ott, and 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.
- [89] A.M. Parfitt, G.R. Mundy, G.D. Roodman, D.E. Hughes, and 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.
- [90] 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.

- [91] D.M. Raab-Cullen, M.A. Thiede, D.N. Petersen, D.B. Kimmel, and R.R. Recker. Mechanical loading stimulates rapid changes in periosteal gene expression. *Calcif Tissue Int*, 55(6):473–8, 1994.
- [92] P.A. Revell. Histomorphometry of bone. *J Clin Pathol*, 36(12):1323–31, 1983.
- [93] G.A. Rodan, T. Mensi, and 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.
- [94] F.P. Ross. RANKing the importance of measles virus in Paget's disease. *J Clin Invest*, 105(5):555–8, 2000.
- [95] C. Rubin, A.S. Turner, R. Muller, E. Mittra, K. McLeod, W. Lin, and 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.
- [96] C.T. Rubin, T.S. Gross, K.J. McLeod, and S.D. Bain. Morphologic stages in lamellar bone formation stimulated by a potent mechanical stimulus. *J Bone Miner Res*, 10(3):488–95, 1995.
- [97] C.T. Rubin and L.E. Lanyon. Regulation of bone formation by applied dynamic loads. *J Bone Joint Surg Am*, 66(3):397–402, 1984.
- [98] C.T. Rubin and L.E. Lanyon. Regulation of bone mass by mechanical strain magnitude. *Calcif Tissue Int*, 37(4):411–7, 1985.
- [99] C.T. Rubin and 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.
- [100] A. Rubinacci, M. Covini, C. Bisogni, I. Villa, M. Galli, C. Palumbo, M. Ferretti, M.A. Muglia, and 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.
- [101] M. Saika, D. Inoue, S. Kido, and T. Matsumoto. 17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha. *Endocrinology*, 142(6):2205–12, 2001.
- [102] 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.
- [103] A. Saraste and K. Pulkki. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*, 45(3):528–37, 2000.
- [104] T. Sato, M.H. Hong, C.H. Jin, Y. Ishimi, N. Udagawa, T. Shinki, E. Abe, and T. Suda. The specific production of the third component of complement by osteoblastic cells treated with 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *FEBS Lett*, 285(1):21–4, 1991.
- [105] M.J. Seibel, H.W. Woitge, M. Pecherstorfer, M. Karmatschek, E. Horn, H. Ludwig, F.P. Armbruster, and R. Ziegler. Serum immunoreactive bone sialoprotein as a new marker of bone turnover in metabolic and malignant bone disease. *J Clin Endocrinol Metab*, 81(9):3289–94, 1996.
- [106] R. Sgonc and G. Wick. Methods for the detection of apoptosis. *Int Arch Allergy Immunol*, 105(4):327–32, 1994.
- [107] W.S. Simonet, D.L. Lacey, C.R. Dunstan, M. Kelley, M.S. Chang, R. Luthy, H.Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H.L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T.M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, W.J.

- Boyle, and et al. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89(2):309–19, 1997.
- [108] T.M. Skerry, L. Bitensky, J. Chayen, and 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.
- [109] E.L. Smith, C. Gilligan, M. McAdam, C.P. Ensign, and P.E. Smith. Deterring bone loss by exercise intervention in premenopausal and postmenopausal women. *Calcif Tissue Int*, 44(5):312–21, 1989.
- [110] T. Suda, N. Takahashi, N. Udagawa, E. Jimi, M.T. Gillespie, and T.J. Martin. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*, 20(3):345–57, 1999.
- [111] M. Tagil and P. Aspenberg. Cartilage induction by controlled mechanical stimulation in vivo. *J Orthop Res*, 17(2):200–4, 1999.
- [112] R.S. Taichman and S.G. Emerson. Human osteoblasts support hematopoiesis through the production of granulocyte colony-stimulating factor. *J Exp Med*, 179(5):1677–82, 1994.
- [113] R.S. Taichman and 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.
- [114] R.S. Taichman, M.J. Reilly, and S.G. Emerson. Human osteoblasts support human hematopoietic progenitor cells in vitro bone marrow cultures. *Blood*, 87(2):518–24, 1996.

- [115] N. Takahashi, T. Akatsu, N. Udagawa, T. Sasaki, A. Yamaguchi, J.M. Moseley, T.J. Martin, and T. Suda. Osteoblastic cells are involved in osteoclast formation. *Endocrinology*, 123(5):2600–2, 1988.
- [116] H. Takai, M. Kanematsu, K. Yano, E. Tsuda, K. Higashio, K. Ikeda, K. Watanabe, and Y. Yamada. Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem*, 273(42):27091–6, 1998.
- [117] T. Tamura, N. Udagawa, N. Takahashi, C. Miyaura, S. Tanaka, Y. Yamada, Y. Koishihara, Y. Ohsugi, K. Kumaki, T. Taga, and et al. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(24):11924–8, 1993.
- [118] S. Tanaka, N. Takahashi, N. Udagawa, T. Tamura, T. Akatsu, E.R. Stanley, T. Kurokawa, and T. Suda. Macrophage colony-stimulating factor is indispensable for both proliferation and differentiation of osteoclast progenitors. *J Clin Invest*, 91(1):257–63, 1993.
- [119] G.P. Thomas and A.J. el Haj. Bone marrow stromal cells are load responsive in vitro. *Calcif Tissue Int*, 58(2):101–8, 1996.
- [120] E. Tsuda, M. Goto, S. Mochizuki, K. Yano, F. Kobayashi, T. Morinaga, and K. Higashio. Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 234(1):137–42, 1997.
- [121] N. Udagawa, N. Takahashi, T. Akatsu, T. Sasaki, A. Yamaguchi, H. Kodama, T.J. Martin, and T. Suda. The bone marrow-derived stromal cell lines MC3T3-G2/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in co-cultures with mouse spleen cells. *Endocrinology*, 125(4):1805–13, 1989.

- [122] N. Udagawa, N. Takahashi, T. Akatsu, H. Tanaka, T. Sasaki, T. Nishihara, T. Koga, T.J. Martin, and T. Suda. Origin of osteoclasts: mature monocytes and macrophages are capable of differentiating into osteoclasts under a suitable microenvironment prepared by bone marrow-derived stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(18):7260–4, 1990.
- [123] H.K. Vaananen and M. Horton. The osteoclast clear zone is a specialized cell-extracellular matrix adhesion structure. *J Cell Sci*, 108 (Pt 8):2729–32, 1995.
- [124] A. van der Plas, E.M. Aarden, J.H. Feijen, A.H. de Boer, A. Wiltink, M.J. Alblas, L. de Leij, and P.J. Nijweide. Characteristics and properties of osteocytes in culture. *J Bone Miner Res*, 9(11):1697–704, 1994.
- [125] D. Vashishth, K.E. Tanner, and W. Bonfield. Fatigue of cortical bone under combined axial-torsional loading. *J Orthop Res*, 19(3):414–20, 2001.
- [126] N.O. Vidal, H. Brandstrom, K.B. Jonsson, and C. Ohlsson. Osteoprotegerin mRNA is expressed in primary human osteoblast-like cells: down-regulation by glucocorticoids. *J Endocrinol*, 159(1):191–5, 1998.
- [127] O.N. Vidal, K. Sjogren, B.I. Eriksson, O. Ljunggren, and C. Ohlsson. Osteoprotegerin mRNA is increased by interleukin-1 alpha in the human osteosarcoma cell line MG-63 and in human osteoblast-like cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 248(3):696–700, 1998.
- [128] M. Wan, X. Shi, X. Feng, and X. Cao. Transcriptional mechanisms of bone morphogenetic protein-induced osteoprotegerin gene expression. *J Biol Chem*, 276(13):10119–25, 2001.
- [129] H. Watanabe, T. Yanagisawa, and J. Sasaki. Cytoskeletal architecture of rat calvarial osteoclasts: microfilaments, and intermediate filaments,

- and nuclear matrix as demonstrated by detergent perfusion. *Anat Rec*, 243(2):165–74, 1995.
- [130] M. Weinreb, D. Shinar, and G.A. Rodan. Different pattern of alkaline phosphatase, osteopontin, and osteocalcin expression in developing rat bone visualized by in situ hybridization. *J Bone Miner Res*, 5(8):831–42, 1990.
- [131] K.H. Wlodarski and A.H. Reddi. Alkaline phosphatase as a marker of osteoinductive cells. *Calcif Tissue Int*, 39(6):382–5, 1986.
- [132] T.J. Wronski, E.R. Morey-Holton, S.B. Doty, A.C. Maese, and C.C. Walsh. Histomorphometric analysis of rat skeleton following spaceflight. *Am J Physiol*, 252(2 Pt 2):R252–5, 1987.
- [133] A.H. Wyllie. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature*, 284(5756):555–6, 1980.
- [134] H. Yasuda, N. Shima, N. Nakagawa, S.I. Mochizuki, K. Yano, N. Fujise, Y. Sato, M. Goto, K. Yamaguchi, M. Kuriyama, T. Kanno, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, and K. Higashio. Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*, 139(3):1329–37, 1998.
- [135] H. Yasuda, N. Shima, N. Nakagawa, K. Yamaguchi, M. Kinosaki, S. Mochizuki, A. Tomoyasu, K. Yano, M. Goto, A. Murakami, E. Tsuda, T. Morinaga, K. Higashio, N. Udagawa, N. Takahashi, and T. Suda. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(7):3597–602, 1998.

-
- [136] C.K. Yeh and G.A. Rodan. Tensile forces enhance prostaglandin E synthesis in osteoblastic cells grown on collagen ribbons. PG - S67-71. *Calcif Tissue Int*, 36 Suppl 1, 1984.
- [137] H. Yoshida, S. Hayashi, T. Kunisada, M. Ogawa, S. Nishikawa, H. Okamura, T. Sudo, L.D. Shultz, and S. Nishikawa. The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. *Nature*, 345(6274):442-4, 1990.
- [138] G. Zaman, R.F. Suswillo, M.Z. Cheng, I.A. Tavares, and L.E. Lanyon. Early responses to dynamic strain change and prostaglandins in bone-derived cells in culture. PG - 769-77. *J Bone Miner Res*, 12(5), 1997.
- [139] J.E. Zerwekh. Bone metabolism. *Semin Nephrol*, 12(2):79-90, 1992.

Abbildungsverzeichnis

1	Hypothetischer Übertragungsweg mechanischer Signale: Osteozyten als Mechanosensoren leiten Informationen an die Effektorzellen (Osteoblasten, Osteoklasten, Bone Lining cells) weiter. [University Orthopaedics, Southampton, UK]	8
2	Aufbau des ZETOS-Belastungssystems	12
3	Oberfläche des WINDOWS-Benutzerprogramms	13
4	Elektronisches-System des ZETOS	14
5	Verlauf einer Quasi-Statistischen-Belastung	15
6	Graphische Darstellung der scheinbaren Steifigkeit, wie sie vom Benutzerprogramm errechnet wird	17
7	Schematische Darstellung der Femurosteotomie	36
8	In die Halterung eingespannter und angeschnittener Femurkopf . . .	37
9	Diamantbesetzter Innenlochbohrer	38
10	Röntgenologische (25 KV; 16 mAs) Darstellung einer Knochenscheibe. Die für die Präparation der Knochenzylinder verwendeten Bereiche erscheinen unauffällig	39
11	Makroskopische Darstellung der röntgenologisch unauffälligen Knochenscheibe	39
12	Zwei in eine Spezialhalterung eingespannte Knochenzylinder (Höhe von 8 mm) beim Schneidvorgang auf 5 mm	40
13	Körper, Boden, beide Saphir-Kolben und Luer-Konnektoren-männlich der Kultur-Belastungs-Kammer	42
14	Sogenannter Pusher für die Platzierung der Knochenzylinder innerhalb der Kultur-Belastungs-Kammer	43
15	Überblick über die Kultur-Belastungs-Kammern mit Nährmediumkreislauf	45

16	Jumping-Sequenz: (A) Stand, (B) Schwungholen, (C) Absprung, (D) Flug in der Luft, (E) Landung, (F) Nachfedern	48
17	Oberfläche des WINDOWS-Benutzerprogramms zum Einstellen der Belastungssequenz (hier Jumping-Sequenz)	49
18	Oberfläche des WINDOWS-Benutzerprogramms nach erfolgter Belastung. Auf der Zeitachse findet man simultan die Jumping-Sequenz mit ihrer daraus resultierenden Kompression des Knochenzylinders, die hierfür aufgewendete Kraft in Newton und die scheinbare Steifigkeit des Knochens in MPa	49
19	Rollrandschnappdeckelgläser in einer wassergefüllten Schale	58
20	Übersichtsfärbung mit Toluidin O: (A) Arterie, (Fv) Fettvakuolen, (Oz) Osteozyten	65
21	Mitotische Zelle	65
22	Übersichtsfärbung mit Masson-Goldner: (Oz) Osteozyten, (Ob) Osteoblasten, (O) Osteoid, (K) Kollagen, (Fv) Fettvakuolen	69
23	Bone Lining cells (BLc) säumen das Osteoid (O): (K) Kollagen, (Oz) neu entstandener Osteozyt der sich noch nicht in der mineralisierten Matrix befindet	69
24	Gegenfärbung mit Kernechtrot; Osteoid-Brücke (O), die zwei Trabekel miteinander verbindet: (Mf) Mineralisationsfront, (Ob) Osteoblasten, (Oz) Osteozyt, (Fv) Fettvakuolen	74
25	Gegenfärbung mit Kernechtrot; Osteoblasten (Ob) säumen das Osteoid (O): (Oz) Osteozyten, (Fv) Fettvakuolen	74
26	Gegenfärbung mit Farben der Masson-Goldner-Färbung; Struktur des Osteoids (O) mit seiner Mineralisationsfront (Mf)	75
27	Gegenfärbung mit Farben der Masson-Goldner-Färbung; (Oz) Osteozyten, (Ob) Osteoblasten, (O) Osteoid, (K) Kollagen, (Fv) Fettvakuolen	75

28	Zwei sich gegenüberliegende Trabekel sind im Begriff zu verschmelzen: (O) Osteoid, (K) Kollagen, (Ob) Osteoblasten	80
29	Bone Lining cells (BLc) säumen den Knochen: (Oz) Osteozyten	80
30	Übersichtsfärbung mit H&E: (Oz) Osteozyten, (Ob) Osteoblasten, (Fv) Fettvakuolen	83
31	Osteoklast (Ok) und Osteoblast (Ob) in einer Howship-Lakune (HL): (Oz) Osteozyt, (Fv) Fettvakuolen	83
32	Übersichtsfärbung mit Giemsa; Die rechte Seite des Trabekels zeigt im Gegensatz zur Linken eine Auflagerung von Osteoid: (Ma) Makrophage, (Ok) Osteoklast, (Ob) Osteoblasten, (Oz) Osteozyten, (Fv) Fettvakuolen	85
33	Mit Osteoid (O) besetzter Trabekel: (K) Kollagen, (Ob) Osteoblasten, (Oz) Osteozyten, (Fv) Fettvakuolen	85
34	Nachweisverfahren des ApoptTag <i>In Situ Oligo Ligation Kit</i> zur Detektion apoptotischer Zellen	87
35	Als "apoptose-positiv" detektierter Osteozyt. Man erkennt deutlich die durch das DAB verursachte braune Färbung der Zelle	90
36	Vitale Osteozyten	90
37	Arithmetische Mittelwerte der pH-Werte über die Zeit mit ihren Standardabweichungen	92
38	Arithmetische Mittelwerte der alkalischen Phosphatase über die Zeit mit ihren Standardabweichungen	93
39	Arithmetische Mittelwerte der Laktat-Dehydrogenase über die Zeit mit ihren Standardabweichungen	94
40	Vergleich der einmalig gemessenen Werte Osteoid mit Gruppenvergleich (arithmetische Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen) .	96
41	Abhängigkeit der Osteoidauflagerung vom produzierten Osteoprotegerin	97

42	Verlauf des E-Moduls angegeben als arithmetische Mittelwerte mit ihren Standardabweichungen	98
43	Veränderung der relativen E-Modul-Werte (arithmetische Mittelwerte) mit ihren Standardabweichungen	99
44	Veränderung des E-Moduls über die Zeit (geometrische Mittelwerte mit ihren Streufaktoren)	100
45	Veränderung des E-Moduls der beiden Belastungsgruppen über die Zeit (geometrische Mittelwerte mit ihren Streufaktoren)	101
46	Nach Masson-Goldner gefärbtes und anschließend ausgewertetes Präparat	102
47	Nur einfach markierter Trabekel; Deutlich ist die zum Teil weitere Auflagerung von Osteoid (O) oberhalb der Alizarin-Complexone-Bande (ACB) erkennbar: (HL) Howship-Lakune	103
48	Doppel-Label; Deutlich erkennbar ist sowohl die Tetrazyklin-Bande (TCB) als auch die Alizarin-Complexone-Bande (ACB): (O) Osteoid, (Fv) Fettvakuolen	103

8 Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die zu einem erfolgreichen Gelingen der Dissertation beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt folgenden Personen:

- Herrn Professor Ph.D. David Jones für die Überlassung des interessanten Themas, sowie als äußerst kompetenter und hilfsbereiter, immer freundlicher Berichterstatter
- Frau Professor Dr. Monika Kressin für die spontane Bereitschaft, die Arbeit von Seiten des veterinärmedizinischen Fachbereichs der Justus-Liebig-Universität Gießen zu betreuen
- Frau Marita Kratz für ihre allezeit herzliche medizinisch-technische Unterstützung
- Herrn Torsten Pohl und Eckhard Bröckmann für die physikalisch-technische Unterstützung
- Dem Institut für Pathologie der Philipps-Universität Marburg
- Der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik der Philipps-Universität Marburg
- Der Klinik für Innere Medizin, Schwerpunkt Gastroenterologie/ Endokrinologie und Stoffwechsel der Philipps-Universität Marburg
- Der Arbeitsgruppe Biomathematik und Datenverarbeitung des Fachbereichs Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen
- Bei allen Mitarbeitern und Doktoranden der Abteilung für die Bereitschaft, mich zu unterstützen und für die hervorragende Teamarbeit in freundschaftlicher Atmosphäre

- Sami Curtze für die Einführung in die geheimen Sphären von Linux und Peter Richterich für die Einführung in die große Welt der Bildbearbeitungsprogramme
- Den geduldigen Korrektoren Cornelia Hübler und Susanne Klett
- Meinen Eltern für die liebevolle Begleitung in den letzten 28 Jahren und meinem Bruder für die vielen schönen Stunden
- Meinem Freundes- und Bekanntenkreis für die fortwährende moralische und soziale Prägung während der letzten Jahre, sowie für die vielen schönen Erinnerungen