

**Aus dem Institut für Experimentelle Orthopädie  
und Biomechanik**

**Direktor: Prof. Dr. D.B. Jones**

**des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität  
Marburg**

**Philipps**

---



**Universität**

---

**Marburg**

**Vergleichende Studie unterschiedlicher mechanischer  
Belastungssignale an lebenden und toten Knochen im Kultur-  
und Belastungssystem ZETOS**

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

**Conrad Karl Kluge**

aus Bautzen

Marburg 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am 23.06.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. Rothmund

Referent: Prof. Dr. D.B.Jones

1. Korreferent: PD Dr. Bette

2. Korreferent: PD Dr. Kühne

**Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung und Zielsetzungen .....	4
2	Grundlagen .....	7
2.1	Knochen.....	7
2.2	Knochenzellen .....	9
2.2.1	Osteoblasten .....	9
2.2.2	Osteozyten .....	9
2.2.3	Bone - Lining - Cells .....	11
2.2.4	Osteoklasten .....	11
2.3	Bone Remodeling .....	14
2.4	Knochenstoffwechselmarker .....	16
2.4.1	Alkalische Phosphatase .....	16
2.4.2	Laktatdehydrogenase .....	16
2.4.3	Laktat .....	17
2.4.4	Osteocalcin .....	18
2.4.5	Osteoprotegerin .....	18
2.4.6	Cathepsin K .....	19
2.4.7	pH - Wert .....	20
2.5	Medien in der Zellkultur .....	22
2.6	Polychrome Sequenzmarkierung .....	24
2.7	Das Elastizitätsmodul .....	24
3	Der Zetos – Kultur und Belastungssystem für trabekuläre Knochen .....	26
3.1	Komponenten des Zetos .....	27
3.1.1	Die Belastungseinheit .....	27
3.1.2	Die Kultur- und Belastungskammern .....	29
3.1.3	Elektronik des Zetos .....	30
4	Material und Methoden .....	32
4.1	Präparation der Knochenzylinder .....	32
4.2	Medium – Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM – low glucose).....	35
4.3	Rahmenbedingungen des Experimentes .....	35
4.4	Einteilung der Gruppen und Ablauf des Experimentes .....	37
4.5	Polychrome Sequenzmarkierung .....	38
4.6	Die Belastungssignale .....	39
4.7	Bestimmung der Knochenstoffwechselmarker.....	41
4.7.1	Osteoprotegerin .....	41
4.7.2	Cathepsin-K.....	42
4.7.3	Alkalischen Phosphatase .....	43
4.7.4	Laktat .....	44
4.7.5	Laktatdehydrogenase .....	44
4.7.6	Osteocalcin .....	45
4.7.7	pH-Wert .....	45
4.8	Aufarbeitung der Knochenproben .....	46
4.8.1	Fixation der Knochenpräparate .....	46
4.8.2	Einbettung.....	46
4.8.3	Histologische Schnitte .....	46
5	Ergebnisse.....	48
5.1	Alkalische Phosphatase .....	48
5.2	Laktatdehydrogenase .....	51
5.3	Laktat .....	53
5.4	Osteocalcin .....	55

5.5	Osteoprotegerin .....	57
5.6	Cathepsin K .....	60
5.7	pH-Wert .....	63
5.8	Elastizitätsmodul .....	65
5.9	Histologie .....	66
5.10	Statistik .....	68
5.11	Statistische Auswertung Elastizitätsmodul.....	70
5.11.1	Aufarbeitung der Daten für die statistischen Tests.....	70
5.11.2	Explorative Datenanalyse .....	72
5.11.3	Globaltests .....	73
5.11.4	Mann-Whitney-Test .....	81
6	Diskussion .....	89
7	Zusammenfassung .....	95
8	Abstract.....	97
9	Literaturverzeichnis .....	99
10	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	108
11	Abkürzungsverzeichnis .....	110
12	Verzeichnis der akademischen Lehrer.....	111
13	Danksagung .....	112

## 1 Einleitung und Zielsetzungen

Seit Julius Wolff im Jahre 1892 „Das Gesetz der Transformation der Knochen“ veröffentlichte, ist es die Grundlage für eine Vielzahl an Forschungsarbeiten geworden. Die Kernaussage ist, „daß sich

*‘im Gefolge primärer Abänderungen der Form und Inanspruchnahme oder auch bloss der Inanspruchnahme der Knochen, bestimmte, nach mathematischen Regeln eintretende Umwandlungen der inneren Architektur und ebenso bestimmte, denselben mathematischen Regeln folgende sekundäre Umwandlungen der äußeren Form der betreffenden Knochen vollziehen‘* [4].

Er beschrieb somit als erster den Zusammenhang zwischen auf den Körper einwirkenden Kräften und den aus ihnen resultierenden Veränderung der Knochenmasse und – struktur.

Wird Knochen einer Belastung ausgesetzt, so kommt es zu Deformierungen des Knochens, verbunden mit einer Änderung ( $\Delta L$ ) der ursprünglichen Knochenlänge ( $L_0$ ).

Diese Änderung wird auch als Kompression/ Dehnung bezeichnet. Die relative Änderung  $\Delta L/L_0$  wird in *strain* angegeben. In Abhängigkeit von der Größe der relativen Änderung der Knochenlänge resultiert ein unterschiedliches Verhalten des Knochens. Liegt die Belastung des Knochens unterhalb des physiologischen Normalzustandes ( $< 800 - 1600 \mu\text{strain}$ ) z.B. in der Schwerelosigkeit oder bei bettlägerigen Patienten kommt es zum Knochenabbau. Ist der Knochen Belastungen oberhalb der physiologischen Norm ( $1600 - 4000 \mu\text{strain}$ ) ausgesetzt so kommt es primär zu einer Zunahme der Knochendichte und zu einer Veränderung der Trabekelstruktur. Erst beim Überschreiten eines Grenzwertes von  $4000 \mu\text{strain}$  kommt es zu Mikrofrakturen und beim Überschreiten von  $16000 \mu\text{strain}$  dann auch zu Makrofrakturen [78].

Eine Vielzahl an in vivo und in vitro Modellen wurden entwickelt, um die Veränderungen die durch mechanische Belastungen im Knochenstoffwechsel und in der Knochenstruktur entstehen zu untersuchen. Diese Modelle benutzen Zellkulturen [111,112], Organkulturen [14,88] den Gesamtorganismus [1,17,91,92] oder auch Bioreaktoren [8]. Eine Echtzeitmessung von Kraft und Kompression während der dynamischen Belastung, v.a. bei Frequenzen über 10Hz ist mit diesen Systemen jedoch nicht möglich.

Basierend auf den bisherigen Erkenntnissen entwickelte Prof. D.B. Jones ein Belastungs- und Messsystem in Kombination mit einer Kultur- und Belastungskammer, welches den Namen *Zetos* trägt. In dem Wort *Zetos* werden der griechische Buchstabe ζ (Zeta), der mitunter als Symbol für *strain* ( $\Delta L/L_0$ , relative Kompression, s.o.) verwendet wird, und das altgriechische Wort *os*, welches Knochen bedeutet vereint.

Mit diesem System ist es nun möglich definierte Kompressionen und Kräfte auf Knochenproben in ex vivo Experimenten auszuüben. Eine dynamische Stimulation ist im Frequenzbereich von 0,1 bis 50 HZ bei einer Kompressionsgenauigkeit von  $\pm 0,5 - \pm 1,5 \mu\text{strain}$  durchführbar. Zur dynamischen Stimulation wird ein piezo-elektrischer Aktor (PEA) verwendet, durch den es außerdem möglich ist Echtzeitmessungen von Kraft und Kompression durchzuführen. Des Weiteren kann durch den PEA eine quasi-statische Belastungen appliziert werden, aus der die Steifigkeit der Knochenproben errechnet wird.

Zu den dynamischen Stimulationsmustern, die in der Arbeitsgruppe verwendet werden, gehören auch die Nachahmung von physiologischen Bewegungsabläufen, wie z.B. Laufen, Springen oder Gehen.

In bereits durchgeführten Versuchen wurde u.a. das Verhalten (i.S. von Steifigkeitsänderungen) der Knochenproben bei gleichem Stimulationsmuster mit unterschiedlicher Intensität sowie das Verhalten der Knochenproben bei unterschiedlichem Stimulationsmuster mit gleicher Intensität untersucht.

Die Steifigkeitsänderungen der Knochenproben werden in diesem Experiment herangezogen, um ein neu im *Zetos*-System zur Verfügung stehendes hochpassgefiltertes Stimulationsmuster mit einem bereits vorhandenen Stimulationsmuster zu vergleichen. Erkenntnisse aus einem Vorversuch zu diesen Stimulationsmustern sollen überprüft werden. Gleichzeitig soll die Verwendbarkeit neuer Stoffwechsellmarker testen werden.

Aus den weiteren Einteilungen der Gruppen in diesem Experiment ergeben sich nachfolgende Fragen:

1. Welche Unterschiede gibt es zwischen männlichen und weiblichen Knochenproben bzgl. ihrer Anpassungsreaktion auf die applizierten Stimulationsmuster gemessen in Form der Steifigkeitsänderung?
2. Wie reagieren die Knochenproben auf das hochpassgefilterte bzw. ungefilterte Stimulationsmuster? Gibt es Unterschiede in der Steifigkeitsänderung?
3. Unterscheiden sich die induzierten Steifigkeitsänderungen in lebenden und abgetöteten Knochenproben?
4. Kann das potentielle Knochenwachstum (hervorgerufen durch die Stimulationmuster) durch die polychrome Sequenzmarkierung dokumentiert werden?

In den bisherigen Experimenten kamen zur Mediamanalyse gewebespezifische oder allgemeine Stoffwechselmarker (z.B. alkalische Phosphatase, Laktatdehydrogenase) zum Einsatz. Dieses Spektrum wird um die knochenzellspezifische Marker Osteoprotegerin, Cathepsin K und Osteocalcin, die erstmalig im Zetos-System zum Einsatz kommen, erweitert. Dabei gilt es nicht nur den reinen Nachweis des Vorhandenseins durchzuführen, sondern auch folgende Fragen zu beantworten:

5. Sind die neu verwendeten knochenzellspezifischen Marker geeignet um bone remodeling welches mit dem Kultur- und Belastungssystem Zetos induziert wird zu belegen?
6. Zu welchem Zeitpunkt treten Veränderungen der Markerspiegel auf? Können daraus Bestimmungszeitpunkte für Folgeexperimente abgeleitet werden?

## 2 Grundlagen

### 2.1 Knochen

Knochen gehört zu den festesten Geweben des menschlichen Körpers und ist bis zu einem gewissen Grad stabil gegen Zug, Druck, Biegung und Dehnung. Wird eine kritische Krafteinwirkung plötzlich überschritten, kommt es zur Fraktur. Die biochemische Zusammensetzung und der histologische Aufbau machen diese Eigenschaften verständlicher.

Knochen wird dem Bindegewebe zugeordnet und besteht aus Knochenzellen und Interzellulärsubstanz. Bei den Knochenzellen werden verschiedene Zellen und Zellzustände unterschieden. Die wichtigsten sind: Osteoblasten, Osteoklasten, Osteozyten und Lining-Cells, welche in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben sind.

Die Interzellulärsubstanz, auch Knochengrundgerüst oder Matrix genannt, besteht aus einem organischen (30%) und einem anorganischem (70%) Teil. Dabei sind 95% des organischen Anteils Kollagen Typ I, die restlichen 5% sind nichtkollagene Proteine wie z.B. Osteokalzin, Osteonektin, Sialoprotein und Proteolipid. Der anorganische Teil besteht zu 95% aus Knochen – Hydroxylapatit und zu 5% aus Mg-, Na-, und K- Fluoriden und Chloriden [33].

Jeder Knochen besteht aus einer Substantia compacta (Kortikalis), welche den Knochen umgibt und einer Substantia spongiosa, die im Inneren eine schwammartige Balkenstruktur bildet. Das Verhältnis von Kompakta zu Spongiosa variiert in den einzelnen Knochen deutlich. Histologisch lassen sich zwei Knochengewebe - Geflechtknochen und Lamellenknochen - unterscheiden. Im Geflechtknochen sind die Kollagenfasern und die Knochenzellen unregelmäßig verteilt, im Lamellenknochen hingegen findet man regelmäßige Strukturen. Geflechtknochen ist eine ungeordnete Vorstufe des Lamellenknochens, die bei jeder Knochenneubildung zu finden ist. Der Lamellenknochen besteht nicht nur aus Lamellen, sondern er enthält auch Knochenkanälchen. Lamellen sind dünne Knochenschichten von ca. 3-7 µm Dicke, die klar voneinander abgegrenzt werden können. Sie bestehen aus Kollagenfasern und Osteozyten. Die Kollagenfibrillen bilden aufgrund ihrer spiralförmigen, sich zum Teil überkreuzenden und ineinander übergehenden Anordnung bereits auf lamellärer Ebene ein filigranes Fasergitter. Die Osteozyten findet man in so genannten Knochenhöhlen zentral an oder randständig in den Lamellen. Von diesen Knochenhöhlen gehen strahlenförmig Knochenkanälchen aus, die untereinander



kommunizieren und schließlich in die Zentralkanäle münden. Die Zentralkanäle (Havers – Kanäle) sind Bestandteile eines den Knochen durchziehenden Kanalsystems, welches Blutgefäße und Nerven beinhaltet. Sie verlaufen parallel zur Knochenoberfläche. Gefäße aus dem Periost bzw. Endost finden ihren Weg in den Knochen über die senkrecht zur Oberfläche von innen und außen eintretenden Canales perforantes (Volkmann – Kanäle) welche in die Zentralkanäle münden.

Resultierend aus den oben beschriebenen Eigenschaften des Knochens ergeben sich die Funktionen. Knochen bilden den Ansatz und den Ursprung der Muskulatur. Das Zusammenspiel mehrerer Muskeln und Knochen verbunden durch Gelenke macht es möglich die Gesetze der Mechanik vorteilhaft (im Sinne einer Energieeinsparung bzw. Leistungssteigerung) zu nutzen. Gleichzeitig verleihen die Knochen dem Körper Stabilität und schützen besonders empfindliche Strukturen, wie z.B. das ZNS durch Schädel und Wirbelkanal oder Herz und Lunge durch den knöchernen Thorax. Außerdem hat der Knochen eine wichtige Funktion als Kalziumspeicher im Rahmen der Kalziumhomöostase.

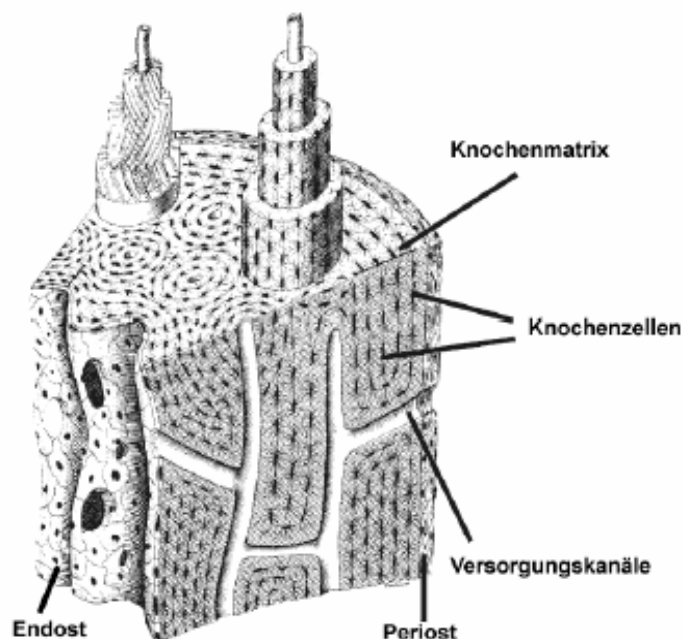


Abbildung 2-1 Aufbau eines Lamellenknochens, Junqueira 1996

## 2.2 Knochenzellen

### 2.2.1 Osteoblasten

Osteoblasten stellen eine heterogene Zellfamilie dar, die von einer Stromazelllinie abstammt, aus der sich auch Adipozyten, Retikulumzellen, Fibroblasten und Chondrozyten differenzieren [75].

Osteoblasten sind kleine, einkernige Zellen, die man an der Oberfläche der Knochenbälkchen findet, wo sie dicht nebeneinander liegen. Über feine zytoplasmatische Fortsätze stehen sie untereinander in Verbindung [26]. Während der Synthesephase sind sie kubisch bis hochprismatisch und enthalten einen exzentrischen Zellkern, ein gut entwickeltes endoplasmatisches Retikulum sowie einen prominenten Golgi-Apparat. Sie produzieren Typ-I-Kollagen und andere Knochenproteine wie z.B. Osteocalcin, Osteonektin, Osteopontin und Sialoprotein. Außerdem sezernieren sie folgende Wachstumsfaktoren; TGF $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ), BMP (Bone morphogenetic protein), PDGF (Platelet derived growth factor), IGF (Insulin-like growth factor), welche in der Knochenmatrix gespeichert werden. Bei der Synthese werden große Mengen alkalischer Phosphatase freigesetzt [33]. Dies ist ein membrangebundenes Ektoenzym, welches die Grundsubstanz auf die Mineralisation vorbereitet. Die Abgabe der Syntheseprodukte erfolgt jeweils dort, wo die Zellen mit der Knochengrundsubstanz in Berührung stehen. Diese von Osteoblasten gebildete noch nicht verkalkte Grundsubstanz bezeichnet man als Osteoid bzw. Vorknochen. Zur Verkalkung des Knochen führen folgende Vorgänge: Es schnüren sich so genannte Matrixbläschen von den Osteoblasten ab und wandern in die Interzellulärsubstanz. Sie bestehen aus Kalziumkomplexen von basischen Proteinen und Phospholipiden, aber enthalten auch alkalische Phosphatase und Pyrophosphatase. In den Matrixvesikeln bilden sich Kalziumphosphatkristalle, welche sich nach Auflösung der Bläschen an Kollagenfibrillen anlagern. Es kommt zur Mineralisation durch Ausbildung intra- und interfibrillärer Kristalle. Dabei wird Kalziumphosphat in Hydroxylapatitkristalle umgewandelt.

### 2.2.2 Osteozyten

Knochenzellen, die vollständig von Matrix umgeben sind, bezeichnet man als Osteozyten. Sie gehen aus Osteoblasten hervor, haben aber eine flache ovale Form mit wenig endoplasmatischem Retikulum und einem kleinen Golgi-Apparat. Dies ist ein Hinweis für

eine gegenüber den Osteoblasten verminderte Syntheseaktivität. Osteozyten sind die häufigsten Zellen im ausgewachsenen Knochen. Es sind circa zehnmal mehr Osteozyten als Osteoblasten im normalen erwachsenen menschlichen Knochen [77].

Osteozyten liegen in den s.g. Knochenhöhlen und ihre filopodienartigen Fortsätze erstrecken sich in den strahlenförmig von der Knochenhöhle ausgehenden Knochenkanälchen. Die Fortsätze dienen dem Stofftransport und stehen über gap junctions untereinander und mit Osteoblasten auf der Knochenoberfläche in Verbindung. Außerdem vergrößern sie die Zelloberfläche, was einen positiven Effekt bzgl. des Stoffaustausches zur Folge hat. So ist ein interzellulärer Fluss von Ionen und kleineren Molekülen über mehrere Zellen hinweg möglich. Funktionell lassen sich Osteozyten in osteoblastische und osteolytische Osteozyten einteilen. Die osteoblastischen Osteozyten haben ihre Hauptfunktion im Aufbau und in der Erhaltung der Grundsubstanz. Dies ist ihnen möglich, da sie die Fähigkeit besitzen Kalziumphosphat in ihrem Zytoplasma zu konzentrieren. Die osteolytischen Osteozyten besitzen die Fähigkeit Grundsubstanz abzubauen und sind somit ein wichtiger Akteur bei der Aufrechterhaltung des Kalziumgleichgewichts im Körper.

Momentan geht man von einer Funktion der Osteozyten in der Mechanotransduktion aus und vermutet sogar, dass sie das Mechanosensingsystem im Knochen sind. Die Funktion desselben auf biophysikalischer und biochemischer Ebene ist jedoch Gegenstand vieler Diskussionen, da beweisende Studien fehlen. Belegt ist, dass Osteozyten viele Signalmoleküle produzieren, z.B. das osteozytenspezifische Sclerostin. Dieses unterdrückt die BMP-stimulierte Knochenbildung, ohne direkten Effekt auf den BMP-Signalweg, sondern indem es den Wnt-Signalweg, welcher für die BMP – stimulierte Osteoblastendifferenzierung nötig ist, inhibiert und somit die Knochenbildungsrate senkt [114]. Kommt es jedoch zu einer vermehrten Belastung des Knochens wird die Sclerostinproduktion gesenkt und die Knochenbildung steigt, da der inhibierende Effekt des Sclerostin vermindert wird [115, 116]. Tiere, die kein Sclerostin bilden, haben ein wesentlich höhere Knochenbildungsrate [vgl. Meyer et al.].<sup>1</sup>

Dass sie Rezeptoren für PTH und PTHrP auf ihrer Oberfläche besitzen, wurde sowohl in *in vitro* Studien, als auch in *in vivo* Studien nachgewiesen. Es konnte sogar ein intracellulärer cAMP- anstieg nach Bindung des PTH an den Rezeptor in den isolierten Osteozyten gezeigt werden [34,80]. Auch die Fähigkeit zur NO – Produktion in Abhängigkeit von mechanischer Belastung wurde mit dem Ergebnis, dass bereits kurz (2-5 min) nach der Applikation von Last ein Anstieg der NO – Produktion stattfand, untersucht [79]. Eine

---

<sup>1</sup> Meyer et al. (Eds.): Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine; D. Jones, Mechanosensing in Bone, the Biophysical Basis, Springer 2008

Veränderung der Glucose-6-phosphat Dehydrogenase Aktivität nach mechanischer Belastung wurde ebenfalls belegt [19].

### 2.2.3 Bone - Lining - Cells

Bone - Lining - Cells sind flache Zellen, die auf der endostalen und trabekulären Oberfläche liegen. Auch sie gehen aus den Osteoblasten hervor. Unter bestimmten Umständen ist es aber möglich, dass sie wieder zu Osteoblasten zurückaktiviert werden [24]. Sie haben wenig Zytoplasma und endoplasmatisches Retikulum und somit weitestgehend ihre Synthesefunktion verloren, aber sie exprimieren Hormonrezeptoren und wahrscheinlich produzieren sie einige Wachstumsfaktoren und Zytokine. Über gap junctions stehen sie untereinander in Verbindung. Mit den Osteozyten sind sie über die Knochenkanälchen verbunden. Zahlenmäßig stellen sie den größten Anteil der Osteoblastenpopulation dar. Ihre Hauptfunktion liegt wahrscheinlich in der interzellulären Signalübertragung innerhalb des Knochens. Neuere Studien beschreiben eine Schlüsselrolle der Bone - Lining - Cells im Bone remodeling, die kurz erläutert werden soll: Nachdem die Osteoklasten die Resorptionslakune verlassen haben, treten Bone – Lining - Cells in diese ein und „reinigen“ sie von zurückgebliebenen Matrixresten. Anschließend legen sie eine Lage Kollagen hinein [31].

### 2.2.4 Osteoklasten

Osteoklasten sind spezifische und hochspezialisierte Zellen aus der Monozyten-Makrophagen-Linie. Sie entstehen durch die Vereinigung mehrerer mononukleärer Monozyten. Dieser Vorgang wird durch M-CFS (macrophage colony-stimulating factor) unterstützt [12]. M-CFS wird in Osteoblasten und Stromazellen gebildet, welche die Produktion unter PTH Einfluss erhöhen. Man findet Osteoklasten auf der endostalen Knochenoberfläche, im Haver'schen System und gelegentlich auf der subperiostalen Oberfläche. Sie sind groß, stark verzweigt und in der Lage Knochengrundsubstanz abzubauen. Sie haben einen großen Zelleib mit mehreren Zellkernen. Bei pathologischen Veränderungen können es bis zu 100 Zellkerne sein, bei normaler Aktivität im Rahmen des physiologischen Remodeling sind es aber meist unter 10 Zellkerne. Die große Zellkernanzahl lässt auf eine hohe Stoffwechselaktivität schließen. Sie enthalten viele pleomorphe Mitochondrien und lysosomale Enzyme. Der aktive Osteoklast hat an seiner

stoffwechselaktiven, der Knochenoberfläche zugewandten Seite eine spezialisierte Zellmembran – den Bürstensaum oder „ruffled border“. Er verschafft der Zelle eine große Kontaktfläche zur Knochenoberfläche. Zwischen dem Bürstensaum und dem Knochen bildet sich dann ein spezielles Milieu aus, welches „sealing-zone“ [97] genannt wird. Es ist reich an Aktinfilamenten, weitestgehend frei von Zellorganellen und umschließt ringförmig den Bürstensaum. Die Aktinfilamente verankern die Zelle während des Resorptionsvorganges auf der Knochenoberfläche. Eine Schlüsselrolle bei diesem Verankerungs- und Anlagerungsprozess des Osteoklasten sowie seiner Aktivierung (Bilden des Bürstensaums) wird den Integrinen zugeschrieben. Dies sind transmembranäre Glykoproteine, die Zell – Zell und Zell – Matrix Interaktionen vermitteln. Gegenstand intensiver Forschung ist dabei das  $\alpha v \beta 3$  – Integrin [73]. Die Knochenresorption erfolgt durch die Synthese proteolytischer Enzyme und HCl in der „sealing-zone“.  $H^+$  - Ionen werden durch die Carboanhydrase II in der Zelle gebildet und mittels einer Ionpumpe aus der Zelle in die „sealing-zone“ gebracht [5]. Dadurch entsteht ein lokaler pH Wert von ca. 4,5 [103]. Die lysosomalen Enzyme (Cathepsin K, Metalloproteinase –1) , die auch aus der Zelle hinaus in die „sealing – zone“ gebracht werden, haben somit ein ideales Milieu um ihre proteolytischen Aktivitäten voll zu entfalten. Die Abbauprodukte dieses Vorgangs werden vom Osteoklasten phagozytiert und an der nicht dem Knochen anliegenden Seite in den Stoffwechselkreislauf abgegeben. Nachdem durch diesen Prozess eine Resorptionslakune (Howship-Lakune) entstanden ist, löst sich der Osteoklast ab und bewegt sich weiter, um an einer anderen Stelle erneut aktiv zu werden. Osteoklasten unterliegen dem Einfluss zahlreicher Stoffe, welche sie stimulieren und zu Aktivität anregen bzw. solche, die sie hemmen und in ihrer Aktivität einschränken [89]. Zu den stimulierenden Stoffen zählt man z.B. die Zytokine wie Interleukin 1 und 6 (IL-1,IL-6) [57], Transforming Growth Factor  $\alpha$  ( $TGF\alpha$ ), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  und  $\beta$  ( $TNF\alpha,\beta$ ), Parathormon (PTH), RANKL, M-CSF und  $1\alpha,25$  Dihydroxyvitamin  $D_3$ . Inhibitoren der Osteoklastenaktivität sind u.a. Calcitonin, Interferon-Gamma ( $IFN-\gamma$ ) [58], Osteoprotegerin (OPG), Interleukin 4 (IL-4) und Transforming Growth Factor  $\beta$  ( $TGF\beta$ ) [41]. Einige resorptionshemmende Stoffe wie Bisphosphonate, Östrogen oder Transforming Growth Factor  $\beta$  können auch die Apoptose des Osteoklasten einleiten [51]. Die Interaktionen einiger dieser Faktoren soll kurz erläutert werden. RANKL wird an der Oberfläche von Präosteoblasten und Stromazellen exprimiert. Es bindet an RANK das sich an der Oberfläche von Osteoklastenvorläuferzellen befindet. RANKL ist entscheidend für die Differenzierung, für die Fusion in multinukleäre Zellen, für die Aktivierung und das

Überleben der Osteoklasten. Verschiedene Zytokine, z.B.  $\text{TNF}\alpha$  und IL-1, fördern die Osteoklastenentstehung direkt durch Stimulation der RANKL-Produktion oder indirekt über eine Stimulierung der M-CSF Produktion, was ebenfalls eine steigende Anzahl an Osteoklasten zur Folge hat. Der Gegenspieler von RANKL ist OPG. Es wird ebenfalls von Osteoblasten produziert und blockiert die Bindung von RANKL an RANK, indem es selbst RANKL bindet. Auch die OPG-Produktion wird durch verschiedene Zytokine, wie z.B.  $\text{TGF}\beta$ , und Hormone, wie z.B. Östrogen gefördert [61].

### 2.3 Bone Remodeling

Das knöcherner Skelett des Menschen ist ein stoffwechselaktives Organ, welches lebenslang einem kontinuierlichen Umbau unterliegt. Das bone remodeling beschreibt diesen physiologischen Prozess des Knochenabbaus durch Osteoklasten, direkt gefolgt vom Knochenaufbau durch Osteoblasten. Das remodeling ist einerseits nötig, um das Skelett in seiner strukturellen Einheit zu erhalten und es an die gegebenen Bedingungen anzupassen und andererseits um die Aufgabe als Kalziumspeicher für die Kalziumhomöostase zu erfüllen. Das bone remodeling wird als komplexer Kreislauf mit drei stark regulierten Phasen beschrieben: Dies sind die Aktivierungsphase, die Resorptionsphase und die Formationsphase. Dabei sind Knochenabbau und Knochenaufbau sowohl räumlich als auch zeitlich eng miteinander verknüpft. Die anatomische Struktur, bestehend aus Osteoklasten, Osteoblasten, Gefäßen und Knochengewebe bezeichnet man als „basic multicellular unit“ kurz BMU. Zu jeder Zeit unterliegen ca. 20% der trabekulären Knochenoberfläche dem Umbau durch Millionen von BMU's in unterschiedlichen Differenzierungsstadien.

Es ist noch nicht sicher geklärt, wie es zur Formierung neuer BMUs kommt. Man geht davon aus, dass im trabekulären und kortikalen Knochen mechanische Belastung ein Stimulus für die Entstehung neuer BMUs ist [99]. Im kortikalen Knochen wird durch s.g. „microcracks“, welche durch mechanische Belastung entstehen, eine ähnliche Wirkung vermutet [66]. Die Lebensdauer einer BMU ist wesentlich länger, als die einer einzelnen Zelle. Deshalb ist es nötig, dass ständig neue Zellen in die BMU nachkommen.

Die Resorptionsphase beginnt mit der Anlagerung von Osteoklasten an die Knochenoberfläche. Die Anlagerung der Osteoklasten setzt voraus, dass die mineralisierte Knochenoberfläche freigelegt ist. Dies geschieht durch die Ausschüttung proteolytischer Enzyme aus den Bone-lining-Cells. Die Osteoklasten schütten lysosomale Enzyme und  $H^+$ -Ionen in die gebildete „sealing zone“ aus und der Knochen wird abgebaut. Durch den Knochenabbau entstehen auf der trabekulären Knochenoberfläche Höhlen, s.g. Howship-Lakunen. Die auf der kortikalen Knochenoberfläche entstehenden Resorptionslakunen bezeichnet man als „cutting cones“. Die Tiefe dieser Resorptionslakunen hängt auch von der Lebensdauer der aktivierten Osteoklasten ab, sie beträgt ungefähr 12 Tage, je nach Zeitpunkt der Apoptose variiert sie [54].

Die Verzögerungsphase (reversal) ist das Intervall zwischen kompletter Resorption und dem Beginn der Formationsphase. Sie dauert ungefähr 9 Tage. In den Resorptionshöhlen findet man keine Osteoklasten mehr, stattdessen mononukleäre Zellen, die der Markphagenzelllinie angehören könnten. Man geht davon aus, dass diese Wachstumsfaktoren ausschütten und somit die Formationsphase einleiten [86]. Insgesamt ist diese Phase des Bone Remodeling noch weitestgehend unklar.

In der Formationsphase wird die von Osteoklasten geschaffene Resorptionshöhle schrittweise wieder mit Grundsubstanz aufgefüllt. Die Osteoblasten produzieren Osteoid und nach ca. 13 Tagen beginnt die Mineralisation mit einem Fortschritt von ca.  $1\mu\text{m}$  pro Tag. Bis die Resorptionslakune wieder vollständig gefüllt ist, vergehen vier bis fünf Monate. Nicht alle Osteoblasten bleiben bis zum vollständigen Auffüllen aktiv, einige werden zu Bone Lining Cells, andere werden zu Osteozyten.



## 2.4 Knochenstoffwechselmarker

### 2.4.1 Alkalische Phosphatase

Die alkalische Phosphatase im Serum besteht aus vier strukturellen Genotypen, dem Leber-Knochen-Nieren-Typ (gewebeunspezifischer Typ), dem interstinalen Typ, dem plazentalen Typ und der Variante aus den Keimzellen. Das Molekulargewicht liegt bei ca. 100 kD und die Hauptfunktion besteht im Katalysieren der Hydrolyse von Phosphatestern bei einem alkalischen pH-Wert. Die alkalische Phosphatase hat eine Serumhalbwertszeit von 24-48h und wird hauptsächlich über die Leber eliminiert. Sie kommt in Osteoblasten, Hepatozyten, der Niere, Plazenta, Milz, Prostata, den Leukozyten und im Dünndarm vor. Eine besondere Bedeutung haben die Leber-, Knochen-, Nieren-, Typen, dies sind die hauptsächlich im Serum vorkommenden Typen. Ihre Aminosäuresequenz ist identisch, sie unterscheiden sich nur durch die Modifikation nach der posttranslationalen Glykosylierung, was die Unterscheidung zu analytischen Zwecken erschwert.

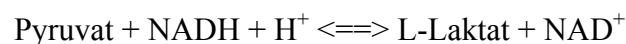
Erhöhungen der alkalischen Phosphatase treten bei Erkrankungen des Skelettsystems auf wie Morbus Paget, Hyperparathyreoidismus, Rachitis und Osteomalazie, bei Frakturen und malignen Tumoren. Sie ist ebenfalls bei allen Formen der Cholestase, besonders beim Verschlußikterus erhöht. Einen starken Aktivitätsanstieg der alkalischen Phosphatase kann man zeitweise bei Kindern und Jugendlichen beobachten. Er wird durch vermehrte Osteoblastentätigkeit infolge beschleunigten Knochenwachstums verursacht. Bei Kindern mit einem Alter von über vier Jahren macht die alkalische Phosphatase des Knochentyps ca. 75-90% der gesamten im Serum gemessenen alkalischen Phosphataseaktivität aus. Nach der Pubertät fällt dieser Anteil auf ca. 50% ab [95]. Im Erwachsenenalter dominiert dann der Leber-Typ. Für die verschiedenen Alterstufen werden deshalb auch unterschiedliche Referenzwerte der klinischen Bewertung zugrunde gelegt.

Die alkalische Phosphatase-Produktion in Osteoblasten beginnt sofort nach dem Ende der Zellproliferation und endet mit Beginn der Matrixmineralisation. Deshalb ist sie als Marker für die Knochenbildungsaktivität für das Experiment geeignet.

### 2.4.2 Laktatdehydrogenase

Die Laktatdehydrogenase dient der Reduktion von Pyruvat zu L-Lactat. Es ist ein tetrameres Enzym, welches in fünf verschiedenen Isoenzymen vorkommt. Die Isoformen unterscheiden sich durch ihre Kinetik bei niedrigen Pyruvatkonzentrationen und ihre

Substratspezifität. Sie bestehen aus vier Untereinheiten, mit einem Molekulargewicht von jeweils etwa 32kD. Die monomeren Untereinheiten liegen in zwei verschiedenen Typen vor, dem Typ H und Typ M, welche beide enzymatisch inaktiv sind. Sie können unter bestimmten Voraussetzungen zu einem Tetramer assoziieren und enzymatisch aktiv werden. Dabei führen die verschiedenen Kombinationen der Untereinheiten zu den verschiedenen Isoformen LDH – I<sub>1-5</sub>, die zum Teil organ- bzw. gewebespezifisch sind. So findet man z.B. in Herzmuskelzellen und Erythrozyten v.a. LDH- I<sub>1</sub> und in der Skelettmuskulatur und in der Leber v.a. LDH-I<sub>5</sub>. Die Isoformen im Serum lassen sich mit Elektrophorese voneinander trennen, was die Einzelbestimmung ermöglicht. Die Verhältnisse der Einzelaktivitäten zueinander ändern sich bei bestimmten Erkrankungen signifikant. Bereits bei Gewebeschäden geringeren Ausmaßes kann es zu einer Erhöhung der LDH Konzentration kommen, da die LDH-Konzentration im Gewebe zwischen 450- und 500-mal höher ist (je nach Gewebe) als im Blut.



### 2.4.3 Laktat

„Laktat ist das Endprodukt des anaeroben Glucosemetabolismus und wird sauerstoffabhängig durch Oxidation im Zitronensäure-Zyklus oder durch Gluconeogenese im Cori-Zyklus weiterverwertet. Laktat ist das Bindeglied zwischen aerobem und anaerobem Stoffwechsel und im Blut erhöht bei inadäquat hohem Anfall oder gestörter Verwertung. [...]Die Laktatkonzentration im Blut reflektiert das Verhältnis der Bildung und des Verbrauchs von Laktat der verschiedenen Organe.“[105]

Laktat ist das Anion der alpha-Hydroxy-Propionsäure (Milchsäure) mit der Formel:



Osteoblasten haben eine hohe aerobe Glykolyserate, da die Glykolyse der Hauptenergielieferant ist. [60] Laktat ist das Hauptendprodukt des Glukosestoffwechsels im Knochen [7,16,35] und somit zur Bestimmung des Energiehaushaltes in Knochenzellen ein geeigneter Parameter.

#### 2.4.4 Osteocalcin

Osteocalcin ist das wichtigste nichtkollagene Protein der Knochenmatrix. Es ist ein knochenspezifisches, Vitamin-K-abhängiges, calciumbindendes Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 5800 D, welches bis zu drei  $\gamma$ -Carboxyglutaminsäurereste enthalten kann. Während der Matrix-Mineralisationsphase wird Osteocalcin von den Osteoblasten synthetisiert. Die Produktion ist vom Vitamin-K abhängig und wird durch Vitamin D<sub>3</sub> stimuliert. Nachdem es aus den Osteoblasten freigesetzt ist, wird es in die Knochenmatrix eingebaut, wie auch in den Blutkreislauf sezerniert. Daraus folgt, dass der Osteocalcin Serum-Spiegel im Zusammenhang mit der Knochenumsatzrate steht. Dies wird besonders deutlich bei verschiedenen Störungen des Knochenstoffwechsels, wie z.B. Osteoporose, primärer und sekundärer Hyperparathyreoidismus oder Morbus Paget. Osteocalcin wird deshalb auch als Knochenumsatz-Marker (bone turnover marker) bezeichnet und angewendet [13]. Im Serum kommt Osteocalcin in verschiedenen Konstitutionen vor. Osteocalcin besteht aus 49 Aminosäuren ist aufgrund einer Proteasenspaltung zwischen Aminosäure 43 und 44 instabil. Es entsteht ein großes Fragment bestehend aus Aminosäure 1 bis 43, welches als N-MID Fragment bezeichnet wird und ein kleines C-terminales Fragment bestehend aus Aminosäure 44 bis 49.

#### 2.4.5 Osteoprotegerin

Osteoprotegerin ist ein Glykoprotein, das im Knochen hauptsächlich von Osteoblasten produziert wird. Es gehört zur Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR) Superfamilie und unterdrückt die Osteoklastengnese. OPG wird nicht nur in Knochen, sondern auch in anderen Geweben, wie z.B. Lunge, Herz, Leber und Niere produziert. Osteoprotegerin hemmt die Osteoklastengnese, indem es RANKL bindet, somit neutralisiert und die Aktivierung von RANK verhindert. Eine Vielzahl von verschiedenen Zytokinen und Hormonen beeinflusst die Produktion von OPG. So konnte nachgewiesen werden, dass TGF- $\beta$  durch die Stimulation von Knochenmarkszellen die Ausschüttung von OPG steigert [43]. Ebenso wird die OPG-Produktion durch Einwirkung von Östrogen [44] und Östradiol [93] auf Osteoblasten gesteigert. Hemmend hingegen wirkt der Einfluss von PTH [68] und Glucokortikoiden [45] auf die Expression von OPG. Eine Studie mit transgenen Mäusen [98], welche eine Überproduktion von OPG hatten, führte bei den Tieren zu einer

Osteopetrose. Dies ist als Nachweis dafür anzusehen, dass OPG die Osteoklastenaktivität hemmt. Im Gegensatz dazu zeigte eine Studie mit Mäusen, welche keine OPG produzierten, dass diese eine Osteoporose entwickelten [10]. Daraus lässt sich schließen, dass die Osteoklastenaktivität nicht gehemmt wurde.

RANK, welches sich auf der Osteoklastenoberfläche befindet, konkurriert mit OPG um die Bindung von RANKL. RANK gehört, wie OPG auch, zur Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Superfamilie. Wenn RANKL an RANK bindet wird damit eine Signalkaskade ausgelöst. Die wichtigsten Schritte sind dabei die Aktivierung von NF-kappa-B Komplex und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1, welcher aus den Untereinheiten c-fos und c-jun besteht. NF-kappa-B und AP-1 wiederum haben eine Schlüsselrolle in der Bildung und Aktivierung der Osteoclasten [27,48,53,90].

RANKL steht für „receptor activator of nuclear factor kappa b ligand“ und wird von Osteoblasten, Knochenmarkszellen, Chondrozyten und von aktivierten T-Lymphozyten produziert. RANKL bindet an RANK („receptor activator of nuclear factor kappa b“)[50] und unterstützt somit die Differenzierung [64] und die Fusion von Osteoklastenvorläuferzellen, die Aktivierung von reifen Osteoklasten [11] und das Überleben [65] der Osteoklasten. Auch RANKL unterliegt der Beeinflussung durch andere Stoffe, wie z.B. PTH, Glucokortikoide und 1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> [62], welche seine Produktion und somit auch den Knochenabbau durch Osteoklasten fördern.

#### 2.4.6 Cathepsin K

Cathepsin K wurde 1995 erstmals von INAOKA et al. beschrieben [52]. Es ist eine, in Osteoklasten hoch exprimierte Cysteinprotease, die zur Familie der endosomalen/lysosomalen Proteasen gehört. Es ist das mengenmäßig am meisten hergestellte Protein der aktiven, resorbierenden Osteoklasten [28] und stellt damit den spezifischsten Marker für die Resorptionsaktivität dar. Cathepsin K hat somit eine Schlüsselrolle sowohl im Umbau als auch der Zerstörung von Knochengewebe. Es wird während der Resorption des Knochens autokatalytisch in die 215 Aminosäure lange aktive Form und ein inaktives Fragment gespalten. Dabei erfolgt die Aktivierung wahrscheinlich bereits intrazellulär, noch vor der Sekretion in die Resorptionslakune [25]. Cathepsin K baut die Kollagenmatrix des Knochens ab, sobald die mineralischen Bestandteile aufgelöst wurden. Hierbei weist es eine höher proteolytische Aktivität bezüglich der Matrixproteine, wie z.B. Kollagen Typ-I und nicht-kollagenen Proteinen (Osteopontin und Osteonection)

auf als anderen Cysteinprotease [104]. Die Aktivität wird wahrscheinlich durch Cystatin C gesteuert, welches ebenfalls in den Howshipschen Lakunen zu finden ist. Man geht davon aus, dass Cathepsin K durch Komplexbildung mit Cystatin C inaktiviert wird, beweisende Ergebnisse liegen jedoch noch nicht vor.

#### 2.4.7 pH - Wert

Der pH-Wert errechnet sich als negativer dekadischer Logarithmus der  $H^+$ -Ionenkonzentration. Daraus folgt: Je mehr  $H^+$  - Ionen vorhanden sind, desto niedriger ist der pH-Wert und umgekehrt. Bei einem pH-Wert von 7 spricht man von neutral, Werte kleiner als 7 bezeichnet man als „sauer“, Werte größer als 7 bezeichnet man als „basisch“.

Im menschlichen Organismus wird versucht den pH-Wert im Blut in engen Grenzen (7,37 – 7,45) konstant zu halten. Durch den ständigen Anfall von sauren Metaboliten ist der Körper gezwungen gegenzuregulieren. Ihm stehen dabei drei Mechanismen zur Verfügung:

1. Pufferung
2. Respiratorische Regulation durch Abatmung von  $CO_2$
3. Renale Regulation bei der Ausscheidung von Wasserstoffionen

Für den Mechanismus der Pufferung stehen dem Organismus zwei extrazelluläre und zwei intrazelluläre Puffersubstanzen zur Verfügung: [42]

Extrazellulär: Bikarbonat ( $HCO_3^-$ )

Plasmaproteine

Intrazellulär: Phosphat ( $HPO_4^{2-}$ )

Hämoglobin

Vergleicht man die Mechanismen des menschlichen Körpers zur pH-Regulation mit den Möglichkeiten eines ex-vivo Experiments, so wird die wichtige Stellung der Pufferung deutlich. In diesem Experiment wird der Mechanismus der Pufferung mit Hilfe von Natriumhydrogenkarbonat ( $NaHCO_3$ ) im Nährmedium umgesetzt. In einer Studie von KAYSINGER und RAMP [60] wurde der Einfluss von extrazellulären pH-Wert-Veränderungen auf die Aktivität von kultivierten menschlichen Osteoblasten untersucht.

Es konnte der gezeigt werden, dass in einem Bereich von pH 7,0 – 7,6 die Aktivität der Osteoblasten mit steigendem pH-Wert zunimmt und das der optimale pH-Wert vermutlich bei pH 7,2 liegt.

## 2.5 Medien in der Zellkultur

Werden Zellen aus einem Organismus entfernt sterben sie ab. Ziel einer Zellkultur ist es, diese Zellen zu „kultivieren“ – am Leben zu erhalten. Darüber hinaus sollen aber auch ihr Wachstum, ihre Proliferationsfähigkeit, ihre Differenzierung und ihre spezifischen Zellfunktionen erhalten bleiben. Dies geschieht mit Hilfe von Nährmedium.

Das Nährmedium hat die Aufgabe, *in vitro* die physiologischen Bedingungen für Zellen nachzustellen bzw. in definierter Form zu verändern. Für physiologische Bedingungen ist zum einen die Zufuhr von nicht selbstsynthetisierbaren Substanzen (Aminosäuren, Salze, Vitamine, Kohlenhydrate) zum anderen die Neutralisierung von Stoffwechsellendprodukten (Laktat) mittels Puffer (i.d.R.  $\text{NaHCO}_3$ ) essenziell. Hinzu kommt der Ersatz des Immunsystems z.B. durch Antibiotika, Antimykotika oder Virustatika. Für ein optimales Wachstum über längere Zeit ist jedoch der Einsatz von Seren notwendig. Es wird menschliches und tierisches Serum verwendet.

Eines des am häufigsten verwendeten Seren ist das fetale Kälberserum (FKS).<sup>2</sup> Das fetale Kälberserum wird aus Blut von Rinderfeten zwischen dem 3. und ca. 7. Trächtigkeitsmonat nach der Schlachtung gewonnen. Wie alle Seren enthält es Hormone, Bindungsproteine, Anheftungsfaktoren, Aminosäuren, anorganische Salze, Elektrolyte, sowie Puffer- und Neutralisationssysteme. Neben diesen „erwünschten“ Bestandteilen kann es aber auch wie alle anderen Seren „unerwünschte“ Komponenten wie, z.B. Bakterien, bakterielle Toxine, Viren, Pilze und Antikörper enthalten. Ein wichtiger Unterschied zu den anderen Seren ist der hohe Fructoseanteil im fetalen Kälberserum.

Schon seit Beginn der Zellkulturforschung Anfang des letzten Jahrhunderts wurden Zellen in verschiedensten Nährmedien gezüchtet. Diese enthielten unterschiedlichste Zusammensetzungen und Zusätze organischer Verbindungen, die chemisch nicht definiert und standardisiert waren. Erst 1955 gelang es Eagle das erste chemisch definierte Medium zu kreieren. Heute ist eines der meistgebrauchten Zellkulturmedien das Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM). Es enthält in der Originalrezeptur 1000mg Glucose pro Liter (low glucose). Eine etablierte Modifikation ist das HEPES gepufferte DMEM in Kombination mit  $\text{NaHCO}_3$ . HEPES wurde 1966 von Good et al. als Puffer eingeführt [38].

---

<sup>2</sup> Es gibt aber auch Serum vom neugeborenen Kälbern, Serum von älteren Kälbern sowie Seren vom Pferd und Schwein.

Die Abkürzung steht für 4- (2- Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure. Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ ) ist essenzieller Nahrungsbestandteil und Puffersubstanz zugleich. Ein weiterer wichtiger Bestandteil eines Mediums ist Glutamin. Glutamin ist meist die wachstumsbegrenzende Aminosäure. Ein Experiment zeigte, dass 98% des Glutamins, aber nur 20-80% der anderen Aminosäuren aus den Medien in 120-Stunden -Kulturen von Mäuse-LS-Zelle verschwanden [39].

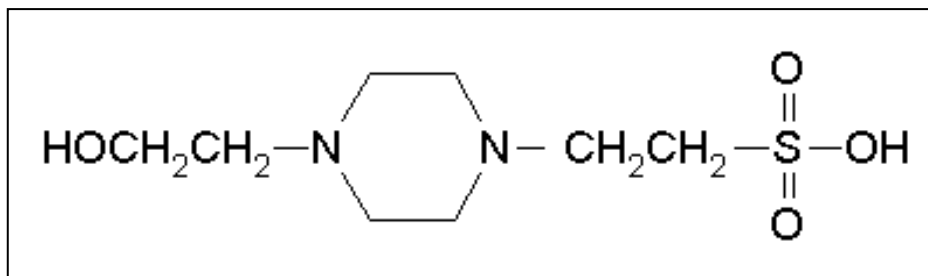


Abb. 2.2 HEPES  $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$



## 2.6 Polychrome Sequenzmarkierung

Die polychrome Sequenzmarkierung ermöglicht die farbkodierte histologische Darstellung von Wachstumsprozessen des Knochens. Dabei werden Chelatkomplexe, welche aus der Reaktion von Fluochromen und Calcium entstehen, in den mineralisierten Knochen eingebaut [83,84,85,101]. Verwendet man unterschiedlich fluoreszierende Farbstoffe im Verlauf eines Experimentes (z. B. Alizarin und Calcein) können aus den entstandenen Banden und den ausgemessenen Distanzen zwischen ihnen, Rückschlüsse bzgl. der Knochenwachstumsgeschwindigkeit gezogen werden.

Bereits in der zweiten Hälfte des letzten Jahrhunderts gab es eine Vielzahl von Forschungsarbeiten, welche sich mit den unterschiedlichen Eigenschaften der zur Verfügung stehenden Farbstoffe beschäftigten [2,82,100,109]. Einer der bekanntesten Vertreter der Fluochrome das Tetrazyklin lagert sich als gelbliche Bande im Knochen, jedoch auch in den wachsenden Zähnen ab [69].

Die in diesem Experiment zur Anwendung kommenden Farbstoffe Calcein und Alizarin werden als grüne (Calcein) bzw. rote (Alizarin) Bande in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar.

## 2.7 Das Elastizitätsmodul

Um die scheinbare Steifigkeit von Knochen oder die Steifigkeit von Referenzkörpern zu bestimmen, wird eine quasi-statische Messung durchgeführt. Dabei wird die Treiberspannung des piezoelektrischen Aktors in kleinen Schritten erhöht, was eine steigende Kraftapplikation auf den Knochenzylinder zur Folge hat. Vor jedem neuen Schritt werden die Werte für Kraft und Expansion aus der Systemelektronik abgefragt und gespeichert. Die quasi-statische Messung dauert 30 bis 60 Sekunden mit einer Schrittfrequenz von 4 Hz (250 ms). Aus den erfassten Werten von Kraft und Expansion (umgerechnet in Kompression) wird die Steifigkeit  $k$  und daraus das Elastizitätsmodul der Knochenprobe errechnet.

Berechnung der Steifigkeit:

Hook'sches Gesetz:  $k = \Delta F / \Delta d$

$k$  = Steifigkeit

$\Delta F$  = Kraftänderung

$\Delta d$  = Kompressionsänderung

Berechnung des Elastizitätsmoduls:

$E = k * (h / A)$

$E$  = Elastizitätsmodul

$k$  = Steifigkeit

$h$  = Höhe des Körpers

$A$  = Stirnfläche des Körpers (bei Zylindern  $\pi r^2$ )

Durch die Berechnung des Elastizitätsmoduls erfährt die Steifigkeit eine Normierung und es entsteht ein Wert, der eine reine Materialkonstante darstellt, die von der Geometrie des Körpers unabhängig ist. Das Elastizitätsmodul hat die Maßeinheit Pascal (Pa), die ermittelten Werte befinden sich jedoch im Megapascal (MPa)- oder Gigapascal (GPa)-Bereich.

### 3 Der Zetos – Kultur und Belastungssystem für trabekuläre Knochen

Das von Prof. D.B. Jones (Marburg) und Prof. E. Smith (Madison, Wisconsin, USA) entwickelte *ex-vivo* System ermöglicht es dreidimensionale Organproben von trabekulären Knochen über einen längeren Zeitraum zu kultivieren und durch mechanische und/oder chemische Stimuli zu beeinflussen. Dabei macht man sich die Tatsache zunutze, dass trabekulärer Knochen hauptsächlich durch Diffusion versorgt wird.

Dieses System arbeitet mit trabekulären Knochenzylindern, welche durch eine spezielle Prozedur unter sterilen Bedingungen hergestellt werden (vgl. Kap. 4.1 Material und Methoden). Sie besitzen einen Durchmesser von 10 mm und eine Höhe von 5 mm und enthalten alle für trabekulären Knochen typischen Zellen. Die Anzahl der Zellen in einem solchen Zylinder kann nicht genau definiert werden, man geht jedoch von einer Zellzahl von ca. 2 Millionen aus. Zu diesen Zellen gehören u.a. Osteoblasten, Osteozyten, Osteoklasten, Bone-lining-Zellen, mesenchymale Vorläuferzellen, Nervenzellen, Bindegewebs- und Fettzellen. Durch dieses System wird es möglich, das Verhalten von verschiedenen Knochenzellen sowie deren Interaktionen untereinander, außerhalb eines lebenden menschlichen oder tierischen Körpers zu studieren.

Weiterhin ist es möglich, auf die Knochenproben unterschiedlichste, definierte Belastungssignale auszuüben, wobei Frequenz und Zykluszahl frei wählbar sind. Die Kompression, die mit einer Genauigkeit von  $\pm 50$  nm appliziert wird, und die dafür aufgewendeten Kräfte werden in Echtzeit aufgezeichnet.

Außerdem ist die Bestimmung verschiedener Eigenschaften der Knochenzylinder möglich, wie z.B. die aktuelle Steifigkeit (Young's-Modulus oder E-Modul), die viskoelastischen Eigenschaften und die Bruchfestigkeit (Strength).

Die Konfigurationen des ZETOS erlauben eine Variation der Frequenz von 0,001 – 1800 Hz und eine maximale Belastung von 4500 N. Kräfte von 4500 N liegen jedoch weit über dem Frakturindex der hier verwendeten Knochenproben, deshalb wurde das System auf eine maximale Belastung von 1500 N, bei einer Kompressionsgenauigkeit von  $\pm 50$  nm kalibriert.

Die in der Arbeitsgruppe etablierte Frequenz liegt bei 1 Hz, was bei einer Belastungsdauer von 5 Minuten 300 Zyklen des Belastungssignals entspricht.

### 3.1 Komponenten des Zetos

#### 3.1.1 Die Belastungseinheit

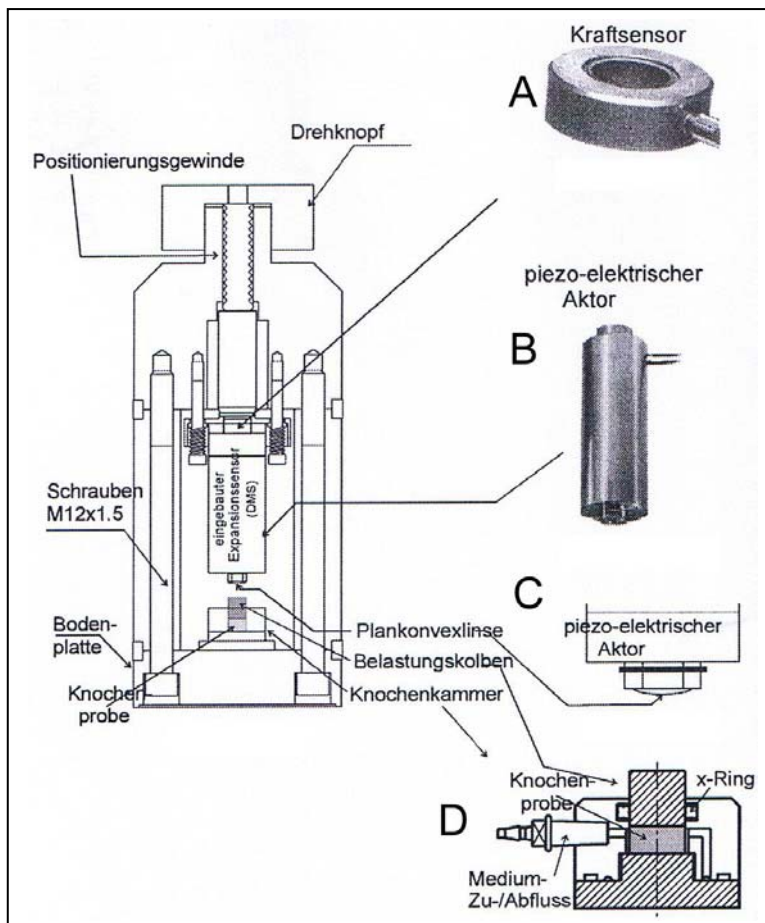


Abbildung 3-1 Bestandteile der Belastungseinheit

A: Piezoelektrischer Kraftsensor (Fa. Kistler)

Durch eine auf den Sensor ausgeübte Kraft kommt es zu einer Deformation. Diese führt zur elastischen Verschiebung der Quarz- und Silizium – Ionen und der von ihnen getragenen Ladungskonzentration. Daraus resultiert eine elektrische Ladung, die sich linear zur Kraft verhält. Diese elektrische Ladung wird gemessen und aus ihr die einwirkende Kraft errechnet.

B: Piezoelektrischer Aktor (Fa. Physik Instrumente )

Er besteht aus polykristallinen ferroelektrischen Keramiken mit großem Piezo-Effekt. Entsprechend einer angelegten Spannung dehnen sich die piezokeramischen Platten aus und es entstehen Kräfte, die letztendlich auf den Knochenzylinder wirken. Er ist das Kernstück für die mechanische Stimulation.

C: Plankonvexlinse aus Saphir

Sie stellt den unteren Anschluss des piezoelektrischen Aktors auf den Belastungskolben da. Dabei drückt die gewölbte Seite der Linse auf den Belastungskolben und dieser wiederum auf den Knochenzylinder. Durch diese Linse ist es möglich Unparallelitäten im System bis zu einem gewissen Grad auszugleichen, ohne dass es zu Schäden am piezoelektrischen Aktor kommt.

D: Knochenkammer, nach oben mit dem Belastungskolben (Piston) abgeschlossen

Ebenfalls in der Abbildung zu sehen ist ein Positionierungsgewinde mit Drehknopf. Mit diesem ist es möglich, den Kraftsensor und den piezoelektrischen Aktor auf die Knochenkammer zu senken und eine Kraft- „Vorspannung“ zu erzeugen. Somit können vor Beginn der Messung alle Kontaktflächen des Systems zusammengebracht werden. In Abbildung 3-2 sieht man die Bestückungsluke der Belastungseinheit. Durch diese werden die Knochenkammern bis zu einem definierten Anschlag eingeführt, wo sie dann zentriert positioniert sind.



Abbildung 3-2 Zetos

### 3.1.2 Die Kultur- und Belastungskammern

Sie ermöglichen es zum einen die Knochenproben über einen längeren Zeitraum zu kultivieren und zum anderen die Proben einer mechanischen Stimulation zu unterziehen. Die Kammern sind über einen Zu- und Abfluss mit dem Mediumreservoir verbunden. Zum Transport des Mediums wird eine Rollenpumpe eingesetzt. Mit Hilfe dieser Pumpe wird eine kontinuierliche Perfusion der Knochenzylinder mit Nährmedium erreicht. Direkt auf dem Knochenzylinder befindet sich der Belastungskolben. Durch Aktivierung des piezoelektrischen Aktors wird der Belastungskolben auf den Knochenzylinder gedrückt und eine mechanische Stimulation der Knochenzellen erreicht. Der Belastungskolben und der Boden der Kultur- und Belastungskammer haben einen speziellen Schliff, um eine möglichst hohe Parallelität und Feinheit der Oberflächen innerhalb der Kammer zu gewährleisten. Je besser die Parallelität der Oberflächen umso gleichmäßiger ist die Kraftübertragung auf die gesamte Knochenoberfläche.

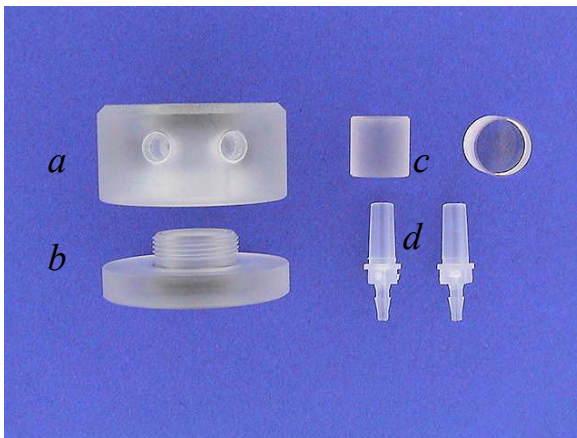


Abbildung 3-4 Perfusions- und Belastungskammer

a: Kammergehäuse, b: Kammerboden,  
c: Belastungspiston, d: Konnektoren

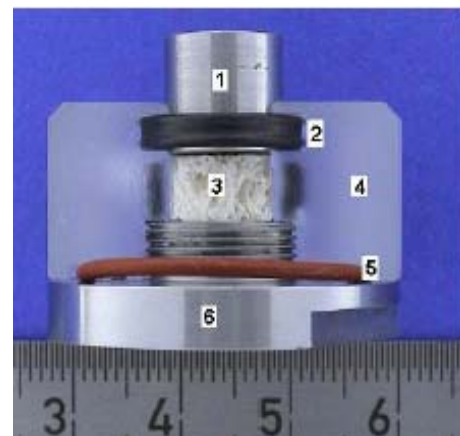


Abbildung 3-3

Aufbau der Knochenkammer im Längsschnitt

1: Belastungskolben zur Krafteinleitung,  
2: X-Ring, 3: Knochenscheibe, 4: Kunststoffgehäuse,  
5: O-Ring, 6: Knochenkammerboden

### 3.1.3 Elektronik des Zetos

Sie stellt das Verbindungsstück zwischen Belastungseinheit und PC dar. Sie besteht aus einer Vielzahl elektronischer Einzelteile. Einige seien kurz erwähnt:

#### Hochspannungsverstärker

Dieser Verstärker betreibt den piezoelektrischen Aktor mit einer Spannung zwischen 0 – 1000 V.

#### Expansionsverstärker

Dieser Verstärker erhält Signale von der Wheatstone-Brücke, die im Piezo-Aktor zur Expansionsmessung eingebaut ist und von der die Kompression gemessen wird.

#### Ladungsverstärker

Der Ladungsverstärker empfängt und verarbeitet Signale des Piezo-Kraftsensors, der als Antwort auf die auf ihn eingebrachte Kraft eine elektrische Ladung erzeugt, die linear zur Kraft ist.

#### Mikrocontroller

Der Microcontroller steuert die Stromversorgung des Hochspannungsverstärkers, des Datentransfers und des Ladungsverstärkers. Außerdem verfügt er über parallele Schnittstelle für die Datenübertragung von und zum PC sowie einen Speicher.

#### Filterkarte

Die Filterkarte enthält zwei einstellbare Tiefpassfilter mit exakt gleicher Übertragungsfunktion für die Signale Kraft und Expansion.

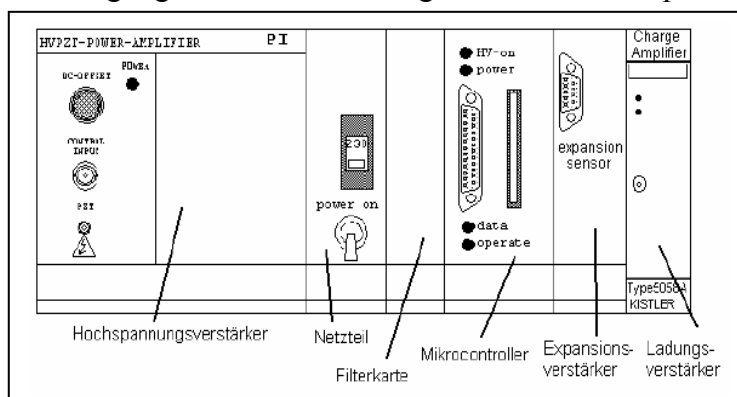


Abbildung 3-5 Elektronik

Die Steuerung des Zetos erfolgt mit Hilfe des Programms ZETOS.EXE. Diese wurde von Dr. E. Bröckmann im Rahmen seiner Dissertation entwickelt. Es ermöglicht die Einstellung verschiedener Parameter, wie z.B. Kompression, Vorlast, Länge der Belastung, Frequenz und Belastungssignal. Neben der Auswahl an vordefinierten Belastungssignalen ermöglicht es auch die Kreation von neuen Signalen. Die dabei aufgewendete Kraft und die Kompression werden in Echtzeit gemessen und aufgezeichnet.<sup>3</sup>

---

<sup>3</sup> Für ausführlichere Informationen verweise ich auf die Dissertation von E.Bröckmann: „*Bestimmung elastischer und viskoelastischer Kenngrößen von Knochenproben unter Langzeitkultur-Bedingungen mit einem neuartigen softwaregesteuerten elektro-mechanischen Belastungs- und Messsystem*“ Marburg 2004



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Präparation der Knochenzylinder

Das verwendete Knochenmaterial für den Versuch stammt aus humanen Hüftköpfen. Diese fallen an, wenn Patienten mit Coxarthrose eine Totalendoprothese des Hüftgelenkes erhalten. Für diesen Versuch stehen ein weiblicher (74 Jahre alt) und ein männlicher Hüftkopf (72 Jahre alt) zur Verfügung. Die Hüftköpfe werden unter sterilen Bedingungen präpariert.

Das Zuschneiden der Hüftköpfe erfolgt mit einer histologischen Diamantbandsäge. Die Hüftköpfe werden zunächst in 7 bis 8 mm dicke Scheiben geschnitten. Mit Hilfe eines diamantbeschichteten Zylinderbohrers werden dann aus den Knochenscheiben Zylinder mit einem Durchmesser von 10 mm gebohrt. Anschließend werden die Knochenzylinder in eine speziellen Vorrichtung eingespannt, mit der es möglich ist die Dicke der Zylinder auf 5 mm zu zuschneiden, bei gleichzeitiger Optimierung der Oberflächenplanparallelität. Während aller Säge- und Bohrvorgänge werden Sägeband, Bohrer und Knochen kontinuierlich mit 0,9 % NaCl – Lösung gekühlt, um einen thermisch induzierten Zelltod der Knochenzellen zu verhindern.

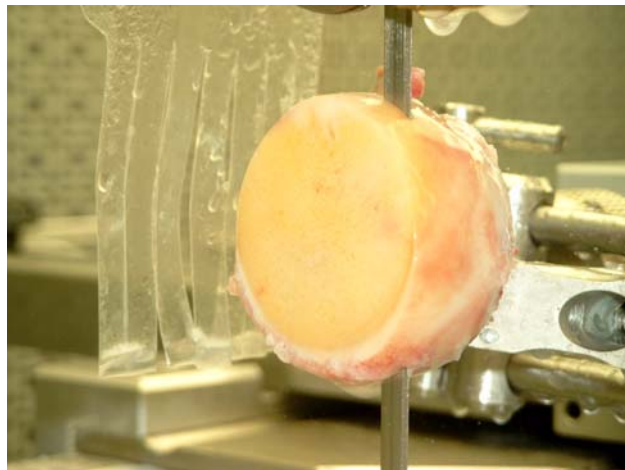


Abbildung 4-1 Hüftkopf

Im gesamten Präparationsvorgang kommt es erfahrungsgemäß zur Einlagerung von Bohr- und Sägestaub in die oberflächliche trabekuläre Knochenstruktur. Um diesen Bohr – und Sägestaub möglichst gut aus den Zylindern zu entfernen, hat sich eine Waschprozedur in drei Schritten nach folgendem Muster bewährt:

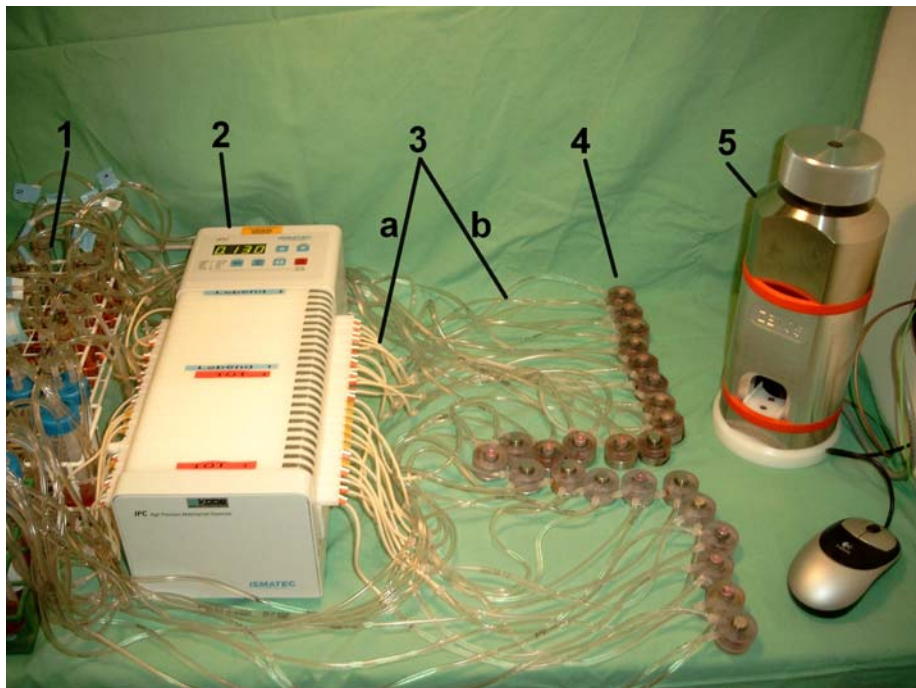
Waschgang	Dauer	Waschlösung
1	10 min	Earle's Salt Solution (BIOCHROM AG) Zusammensetzung in mg/l NaCl 6800 KCl 400
2	10 min	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O 140 MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 200 CaCl <sub>2</sub> 200 Glucose 1000 Phenolrot 10 NaHCO <sub>3</sub> 2200  (laut Produktinformation der Firma BIOCHROM AG)
3	20 min	Earle's Salt Solution mit Antibiotika + Antimykotika: 500 000 IE Penicillin/Streptomycin (BIOCHROM AG) 4 ml Amphotericin B (SIGMA) pro Liter Earle's Salt Solution

**Tab. 4-1 Waschprozedur Knochenzylinder**

### Integration der Knochenzylinder in das Kultur- und Belastungssystem Zetos

Nach der Waschprozedur werden die Knochenzylinder unter dem Abzug in die sterilen Knochenkammern eingebaut. Danach erfolgt der Anschluss an die Pumpe.

In der Mitte des zuführenden Schlauches ist ein flexibleres Pumpenstück zwischengeschaltet, welches in die Rollenpumpe eingespannt wird. Mit einer bogenförmigen Klemme wird der Schlauch über revolvertförmig angeordnete Walzen gespannt. Durch die Rotation dieser Walzen kommt es zur intermittierenden Kompression des Schlauches. Aus dieser resultiert ein Mediumfluss im gesamten System. Durch eine stufenlose Steuerung der Walzenrotationsgeschwindigkeit lässt sich der Mediumfluss frei einstellen. Es wird eine Flussrate von 7ml pro Stunde verwendet.



**Abbildung 4-2 Systemkomponenten**

1. Mediumreservoir: - Rundbodengläser ( Klarglas ); Art.Nr. 3301953
2. Pumpe: - Ismatec®; Rollpumpe
3. Schlauchsystem: - a) Pumpenstück: Pharmed®; Lot No. 2205086  
- b) Verbindungsstücke: Tygon® Masterflex® 6419-13
4. Perfusions- und Belastungskammer
5. ZETOS®

#### 4.2 Medium – Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM – low glucose)

Zur Versorgung der Knochenzylinder wird folgende Mediumrezeptur verwendet:

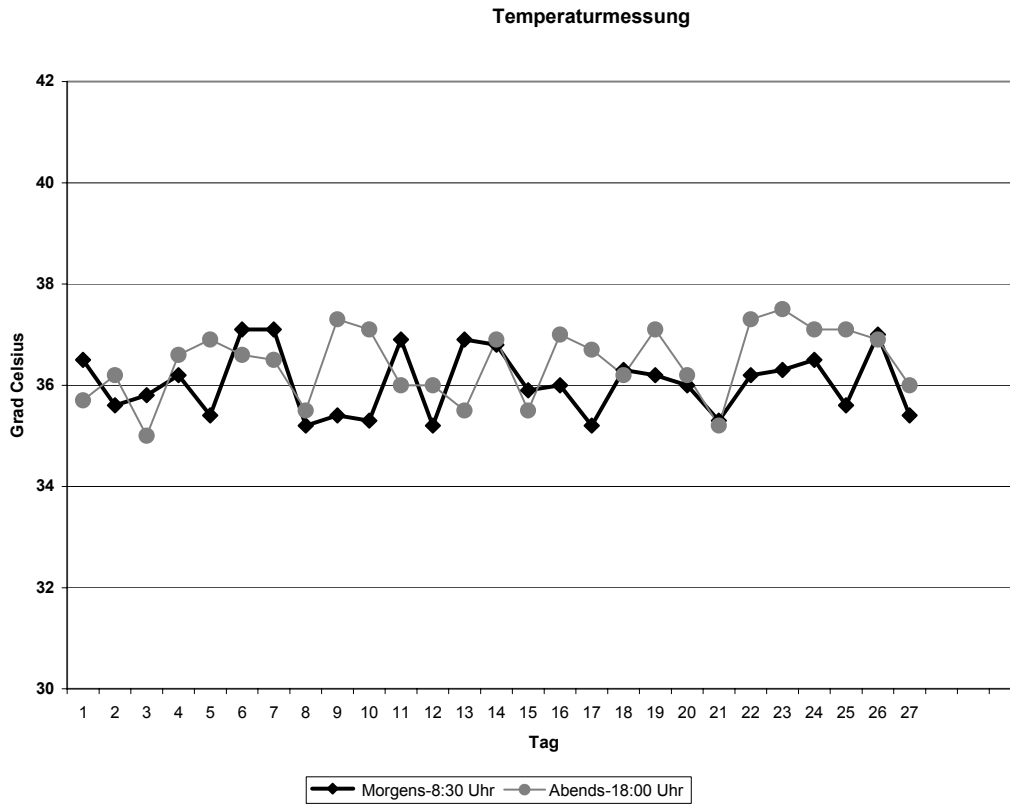
Mediumzusammensetzung pro Liter:

Menge	Stoff	Hersteller
9,99g	DMEM – low glucose	Gibco
3,5g	Fructose	Gibco
10 ml	L- Glutamin	Gibco
10 mg	L-Ascorbic Acid Phosphate Magnesium Salt n' Hydrate	WAKO
0,12g	Sodium Hydrogen Carbonat	Merck 6329
2,16 g	beta – Glycerophosphate	Sigma G-9891
2,383g	HEPES	Sigma H-3375
50.000 IU	Penicillin	PAA P11- 010
37.500 IU	Streptomycin	PAA P11- 010
100 ml	FCS – 615 B	BIOCHROM KG

Tab. 4-2 Mediumzusammensetzung

#### 4.3 Rahmenbedingungen des Experimentes

Das Experiment mit all seinen technischen Komponenten findet in einem Raum statt, der während der gesamten Zeit auf einer Temperatur von 37°C gehalten wird (siehe Grafik 4-1). Die Versorgung der Knochenzylinder erfolgt mit dem bereits erwähnten DMEM – low glucose Medium, welches mit einer Flussrate von 7ml pro Stunde durch das System gepumpt wird. In jedem Mediumreservoir befinden sich 7ml. Alle 48 Stunden wird das Medium gewechselt, um eine Übersäuerung durch Stoffwechselprodukte im System zu vermeiden. Um einen Referenzwert für die anschließende Mediumanalyse zu haben, wird eine Nullprobe mitgeführt. Dabei handelte es sich um ein mit 7 ml Medium gefülltes Reagenzglas, welches ebenfalls jeweils 48 Stunden im Warmraum steht.



**Abbildung 4-3 Temperatur im Messraum**

#### 4.4 Einteilung der Gruppen und Ablauf des Experimentes

Das Experiment beinhaltet insgesamt 30 Knochenproben, die in fünf Gruppen eingeteilt werden. Die folgende Tabelle zeigt im Überblick die Einteilung der Gruppen.

GRUPPE	Probennr.:	1 Geschlecht	Zustand	Prozedur
I	Bone 1-3	weiblich	lebend	Jump 3000 + E-Modul
	Bone 4-6	männlich	lebend	Jump 3000 + E-Modul
II	Bone 7-9	weiblich	lebend	High pass + E-Modul
	Bone 10-12	männlich	lebend	High pass + E-Modul
III	Bone 13-15	weiblich	tot	Jump 3000 + E-Modul
	Bone 16-18	männlich	tot	Jump 3000 + E-Modul
IV	Bone 19-21	weiblich	tot	High pass + E-Modul
	Bone 22-24	männlich	tot	High pass + E-Modul
V	Bone 25-27	weiblich	lebend	E-Modul
	Bone 28-30	männlich	lebend	E-Modul

**Tab. 4-3 Einteilung der Gruppen**

Gruppe I und II beinhalten die lebenden Knochenproben.

Gruppe I wird täglich 5min mit einer Frequenz von 1 Hz mit dem Signal „Jumping 3000“ belastet. Im Anschluss daran erfolgt die Steifigkeitsmessung. Gruppe II wird mit gleicher Zeit und Frequenz täglich mit dem Signal „Jumping high pass“ belastet. Im Anschluss erfolgt ebenfalls die Steifigkeitsmessung.

Gruppe III und IV beinhalten die toten Knochenproben.

Zur Abtötung wird 0,9% KCl – Lösung verwendet, die initial über 96 Stunden die Systeme perfundiert. Sie wird nach 48 Stunden einmal gewechselt. Im Anschluss daran werden

beide Gruppen mit dem gleichen Medium (DMEM – low glucose) wie die restlichen Gruppen versorgt. Gruppe III wird analog zu Gruppe I belastet, d.h. täglich 5 min mit einer Frequenz von 1Hz und dem Signal „Jumping 3000“. Im Anschluss erfolgt die Steifigkeitsmessung. Gruppe IV wird analog zur Gruppe II mit dem Signal „Jumping high pass“ bei gleicher Dauer und Frequenz belastet. Eine Steifigkeitsmessung schließt sich an.

Gruppe V dient als Kontrollgruppe und umfasst lebende Knochenproben. Diese werden nicht belastet! Es finden nur intermittierende Steifigkeitsmessungen statt.

Die erste Belastungsprozedur und Steifigkeitsmessung wird bei allen Knochenproben nach einer 48-stündigen Ruhephase nach der Präparation durchgeführt. Bei allen Knochenproben findet alle 48 Stunden ein Mediumwechsel statt. Aus dem verbrauchten Medium werden jeweils Proben von 2 ml für spätere Analysen entnommen und bei – 80°C tiefgefroren. Außerdem wird der pH – Wert des verbrauchten Mediums von jeder Knochenprobe gemessen.

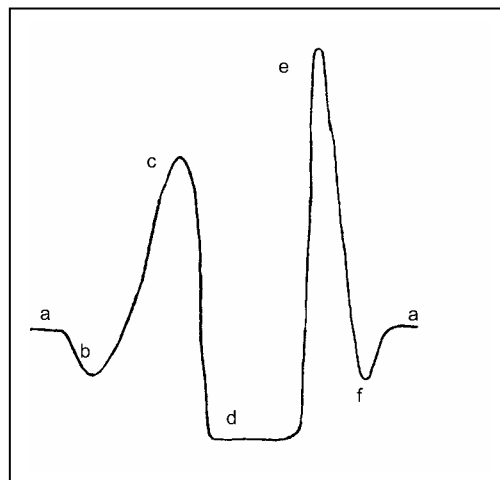
#### **4.5 Polychrome Sequenzmarkierung**

Für die Polychrome Sequenzmarkierung wird am 9. Versuchstag Calcein (Sigma C-0875) mit einer Konzentration von 30 µg/ 1 ml Medium hinzugegeben. Nach 16 Stunden wird das calceinhaltige Medium durch frisches ersetzt. Am 20. Versuchstag wird Alizarin Complexon (ICN Biomedicals Inc. Cat.No:195027) mit einer Konzentration von 45 µg/ 1 ml Medium hinzugegeben. Auch hier wird nach 16 Stunden das Medium durch frisches ersetzt.

#### 4.6 Die Belastungssignale

In diesem Experiment sollen zwei unterschiedliche Belastungssignale hinsichtlich ihrer Potenz bezüglich der Stimulation des Knochenaufbaus, hier in Form der Steifigkeit gemessen, miteinander verglichen werden.

Das erste Signal simuliert physiologisches Springen („Jumping“-Signal) und stellt sich graphisch wie folgt dar:



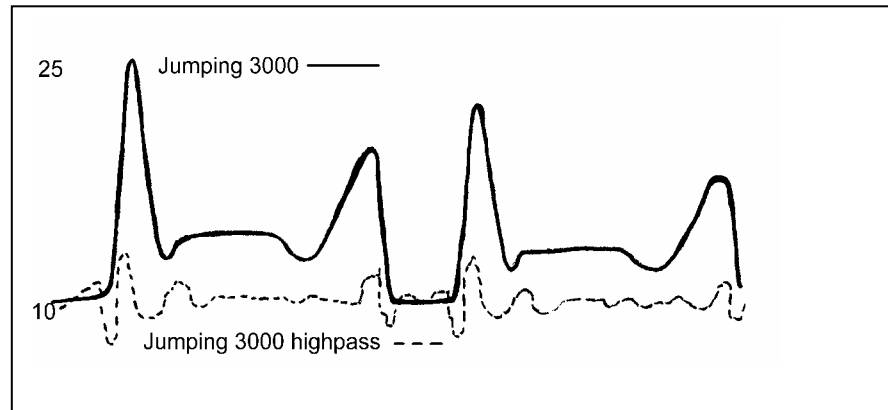
**Abbildung 4-4 „Jumping“-Belastungssignal**

**a: Fuß auf dem Boden; b: Schwungholen; c: Absprung; d: Flug in der Luft e: Landung; f: Nachfedern**

Das in Abb. 4-3 dargestellte „Jumping“-Belastungssignal, aufgenommen als Kraft-Signale, wurde in das Zetos-System implementiert und hochpass gefiltert. Die Hochpassfilterung des „Jumping“-Belastungssignals erfolgte mittels der eingebauten Filterkarte in der Zetos-Elektronikeinheit. Der Hochpassfilter dämpft die tiefen Frequenzen bis zu einer Grenzfrequenz, wobei die Dämpfung durch die Filter-Ordnung angegeben wird. Frequenzen oberhalb der Grenzfrequenz passieren den Filter ungedämpft. Der in diesem Experiment verwendete Hochpassfilter ist ein Filter 20-ter Ordnung.

Aus der Filterung des „Jumping“-Belastungssignals resultierte das zweite Belastungssignal „Jumping highpass“. In der Abb. 4-4 ist es im Vergleich zum „nativen“ Jumping-Signal abgebildet.





**Abbildung 4-5 „Jumping“-Belastungssignal**  
**schwarz: ungefiltert Spektren der „Jumping“-Signale**  
**schwarz gestrichelt: hochpass gefiltert**

Jedes Signal wurde jeweils auf 12 Knochenproben täglich mit einer Frequenz von 1 Hz für 5 Minuten als Kompression appliziert. Um eine möglichst hohe Reproduzierbarkeit der durchgeführten Messung zu erlangen, werden durch Anlegen einer manuell gesteuerten Vorlast alle im System sich berührenden Oberflächen in Kontakt gebracht. Dies bezieht sich nicht nur auf die Kontaktflächen zwischen Belastungskammer und Zetos, sondern auch auf die Berührungsfläche zwischen Knochenmaterial und Belastungstempel. Es sollen somit die präparationsbedingten Oberflächenrauigkeiten der Knochenproben ausgeglichen werden.

Für den gesamten Versuch ergeben sich  $n = 26$  Belastungstage. Die Knochenexplantate werden somit 26-mal für jeweils 5 Minuten bei einer Frequenz von 1Hz je nach Belastungsgruppe mit der „Jumping 3000“- oder mit der „Jumping 3000 highpass“-Sequenz belastet.

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

Jeder dynamischen Belastung schließt sich eine Messung der scheinbaren Steifigkeit der Probe an.

#### 4.7 Bestimmung der Knochenstoffwechselmarker

Die Erneuerung des Nährmediums erfolgt in einem Zyklus von 48 Stunden. Der dabei gewonnene Mediumsüberstand wird bezüglich folgender Konzentration analysiert:

1. Osteoprotegerin OPG
2. Cathepsin K
3. Alkalische Phosphatase
4. Laktat
5. LDH
6. Osteocalcin
7. pH-Wert

##### 4.7.1 Osteoprotegerin

Für die Bestimmung der Osteoprotegerinkonzentration werden ausgesuchte, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorene Mediumüberstände aufgetaut und direkt mittels des Human Osteoprotegerin ELISA Kit der Firma BioVendor® analysiert.

1. Jeweils  $100\mu\text{l}$  der verschiedenen Proben werden in die Vertiefungen der 96-er Titerplatte gegeben. Des Weiteren werden die verdünnten Standards sowie die Qualitätskontrollen in die dafür vorgesehenen Vertiefungen pipettiert. Die Verteilung der einzelnen Proben wird schriftlich festgehalten.
2. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wird die Titerplatte dreimal mit der vorbereiteten Waschlösung gewaschen. Dabei werden jeweils  $350\mu\text{l}$  pro Vertiefung und Waschgang benutzt.
3. Jeweils  $100\mu\text{l}$  der Anti-Osteoprotegerin- Antikörper-Lösung werden hinzugegeben. Eine Inkubationszeit von einer Stunde schließt sich an.
4. Es folgt ein erneuter Waschgang analog zu 2. und es werden  $100\mu\text{l}$  der Konjugatlösung hinzugefügt.
5. Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit wird ein erneuter Waschgang analog zu 2. durchgeführt.
6. Es werden  $100\mu\text{l}$  Substrat-Lösung hinzugefügt und nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten wird die Farbreaktion mit Hilfe der Stopp-Lösung angehalten.

7. Die Proben werden im Photometer bei einer Wellenlänge von 450nm analysiert. Danach wird mit Hilfe der gemessenen Absorptionswerte der mitgelieferten Standardkonzentrationen eine Standardkurve berechnet. Aus dieser kann die Konzentration der einzelnen Proben errechnet werden.

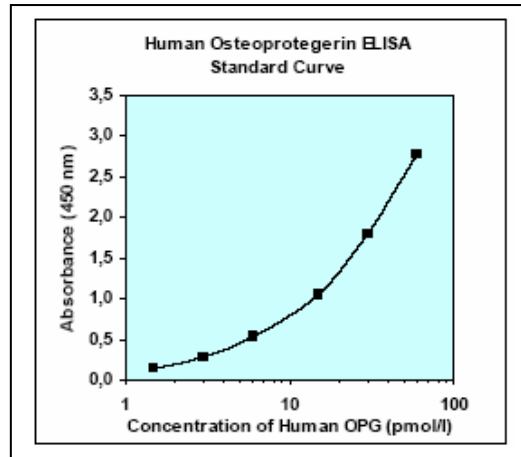


Abbildung 4-6 Standardkurve(BioVendor®) Human Osteoprotegerin ELISA Kit

#### 4.7.2 Cathepsin-K

Zur Mediumüberstandsanalyse hinsichtlich der Cathepsin K Konzentration wird der ELISA der Firma Biomedica verwendet. Auch hierfür werden ausgesuchte, bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefrorene Proben aufgetaut und sofort analysiert.

1. Es werden jeweils  $50\mu\text{l}$  der Proben, der Standardkonzentrationen und der Kontrollkonzentration auf die Mikrotiterplatte pipettiert und die Verteilung schriftlich festgehalten.
2. In jede Vertiefung werden  $200\mu\text{l}$  der Konjugatlösung (Anti-Cathepsin-K) pipettiert
3. Es folgt eine 24-stündige Inkubationszeit bei Raumtemperatur
4. Der Inhalt der Vertiefungen wird verworfen, es folgen fünf Waschgänge mit jeweils  $300\mu\text{l}$  Waschlösung.

5. In jede Vertiefung werden 200µl Substrat-Lösung pipettiert. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit werden 50µl Stopplösung zum Anhalten der Farbreaktion hinzugefügt.
6. Die Extinktionsmessung erfolgt im Photometer bei einer Wellenlänge von 450nm.
7. Anhand der für die Standardkonzentrationen ermittelten Extinktionswerte wird eine Standardkurve erstellt. Die Konzentrationen der jeweiligen Proben lassen sich aus dieser Kurve ableiten.

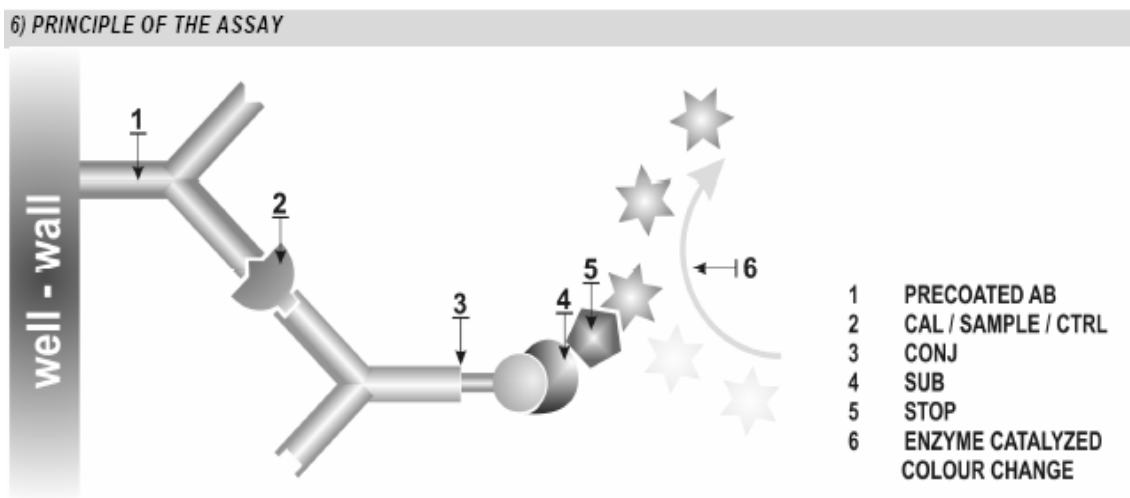


Abbildung 4-7 Funktionsweise des Cathepsin K ELISA (Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG)

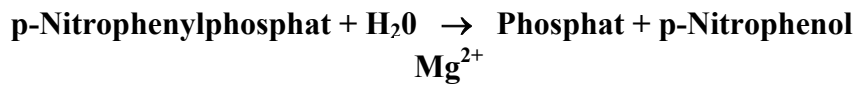
Für die Konzentrationsbestimmungen der Alkalischen Phosphatase, des Laktats und der Laktatdehydrogenase werden je 1000µl Mediumüberstand in so genannte Einhänggefäße pipettiert und anschließend im Zentrallabor der Universität Marburg an einem Hitachi 917 gemessen. Ist eine sofortige Analyse der Probe nicht möglich, werden diese bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und zu einem späteren Zeitpunkt analysiert.

Die zur Analyse notwendigen Reagenzien sind bei der Firma Roche Diagnostics GmbH zu beziehen.

#### 4.7.3 Alkalischen Phosphatase

Laut Herstellerangaben wird die „Optimierte Standardmethode“<sup>4</sup> verwendet. Dabei handelt es sich um einen Farbttest, bei dem folgende Reaktion abläuft:

<sup>4</sup> Nach der Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie

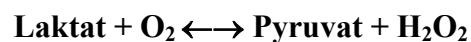
**AP**

In Gegenwart von Magnesiumionen wird p-Nitrophenylphosphat durch Phosphatasen in Phosphat und p-Nitrophenol gespalten. Das dabei entstehende p-Nitrophenol wird photometrisch gemessen und ist proportional zur AP-Aktivität.[20]

## 4.7.4 Laktat

Die Bestimmung der Laktatkonzentration erfolgt mit den Reagenzien der Firma Roche Diagnostics GmbH nach folgendem Testprinzip:

Laktat wird durch Laktatoxidase zu Pyruvat oxidiert.



Das entstehende Wasserstoffperoxid wird mit Peroxidase zu einem Farbstoff umgesetzt.



Die Intensität der gebildeten Farbe ist proportional zur Laktatkonzentration.[21]

## 4.7.5 Laktatdehydrogenase

Die Laktatdehydrogenase wird ebenfalls mit der „Optimierten Standardmethode“<sup>5</sup> bestimmt. Diese Standardmethode verwendet folgendes Testprinzip:

Durch die Laktatdehydrogenase wird die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat katalysiert. Gleichzeitig wird NADH zu NAD oxidiert. Die Geschwindigkeit der NADH-Abnahme ist dabei direkt proportional zur Laktatdehydrogenasekonzentration; sie wird photometrisch gemessen [22].

<sup>5</sup> Nach der Empfehlung der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie

## LDH



### 4.7.6 Osteocalcin

Die Bestimmung des Osteocalcins erfolgt nach einem Sandwichprinzip mit den Reagenzien der Firma Roche Diagnostics GmbH an einem Roche Immunoassay Analysenautomaten im Zentrallabor der Uniklinik Marburg.

Der Test beinhaltet mehrere Schritte:

„1. Inkubation: 20µl Probe, ein biotinylierter monoklonaler N-MID Osteocalcin spezifischer Antikörper und ein mit Ruthenium-Komplex<sup>a</sup> markierter monoklonaler N-MID Osteocalcin spezifischer Antikörper bilden einen Sandwich-Komplex.

2. Inkubation: Nach Zugabe von Streptavidin beschichteten Mikropartikeln wird der Komplex über Biotin- Streptavidin Wechselwirkung an die Festphase gebunden.

Das Reaktionsgemisch wird in die Messzelle überführt, wo die Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf die Oberfläche der Elektrode fixiert werden. Danach werden mit ProCell die ungebundenen Substanzen entfernt. Durch Anlegen einer Spannung wird die Chemilumineszenzemission induziert und mit dem Photomultiplier gemessen.

Die Ergebnisse werden anhand einer Kalibrationskurve ermittelt. Diese wird durch eine 2-Punkt Kalibration und eine über den Reagenzbarcode mitgelieferte Masterkurve generiert.“[23]

### 4.7.7 pH-Wert

Nachdem die Gefäße für das Zentrallabor und die Einfriergefäße befüllt sind, wird im restlichen noch vorhandenen Mediumüberstand mittels pH-Meter der pH-Wert gemessen und schriftlich festgehalten.

## 4.8 Aufarbeitung der Knochenproben

### 4.8.1 Fixation der Knochenpräparate

Nach Beendigung des Experimentes werden die einzelnen Knochenproben aus den Kultur- und Belastungskammern entnommen und in flüssigkeitsdurchlässige Kunststoffkästchen umgelagert. Danach werden sie durch eine aufsteigende Alkoholreihe und Xylol entwässert.

Aufsteigende Alkoholreihe:

1. Ethanol 70 %
2. Ethanol 80 %
3. Ethanol 90 %
4. Ethanol 96 %
5. Ethanol 100 %
6. Xylol

### 4.8.2 Einbettung

Im Anschluss an die Entwässerung der Knochenproben mittels Alkohol und Xylol erfolgt die Einbettung in Technovit® 9100 New (Kulzer). Die Knochenproben werden aus den Aufbewahrungskästchen genommen und in zylindrische Behälter gestellt. Anschließend werden die Behälter mit der Polymerisationslösung aufgefüllt und im Exsikkator bei 800 MBar evakuiert, um eine möglichst blasenfreie Einbettung der Präparate zu erreichen. Danach werden die Behälter luftdicht verschlossen. Die Polymerisation des Technovits dauert ca. 48 Stunden bei -15°C.

### 4.8.3 Histologische Schnitte

Die histologischen Dünnschnitte werden mit dem Hartschnittmikrotom „Polycut E“ der Firma Reichert-Jung® hergestellt. Als Schneidflüssigkeit dient 30%iger Alkohol. Die Schnittdicke beträgt 5 µm. Die angefertigten Schnitte werden auf die Objektträger gelegt und mit 60%igem Alkohol glattgestreckt. Es folgt die Abdeckung mit einer

Polyethylenfolie und das Einspannen der Objektträger in eine Presse. Anschließend erfolgt die Trocknung in einem Brutschrank bei 50 °C für 48 Stunden.

Nach der Trocknung werden die Präparate mittels Entellan® neu (Merck; Cat.No. 107961) und Deckgläschen eingedeckt. Für die durchgeführte Fluoreszenzmikroskopie ist eine vorherige Entacrylierung nicht erforderlich.



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Alkalische Phosphatase

Die Bestimmung der Konzentration der alkalischen Phosphatase erfolgt bei allen Proben jeweils aus dem Nährmediumüberstand. Folgende Fragen sollen durch die Bestimmung beantwortet werden:

1. Wie hoch sind die Konzentrationen der alkalischen Phosphatase in den einzelnen Gruppen?
2. Unterscheiden sich die Konzentrationen der Gruppen untereinander?
3. Welche Aussagen bezüglich der Osteoblastenaktivität können getroffen werden?

Die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmungen sind in folgender Abbildung dargestellt. Es handelt sich dabei um die Mittelwerte der Konzentrationen der Gruppen I, II, III, IV und V sowie um die Konzentration der mitgeführten Nullprobe.

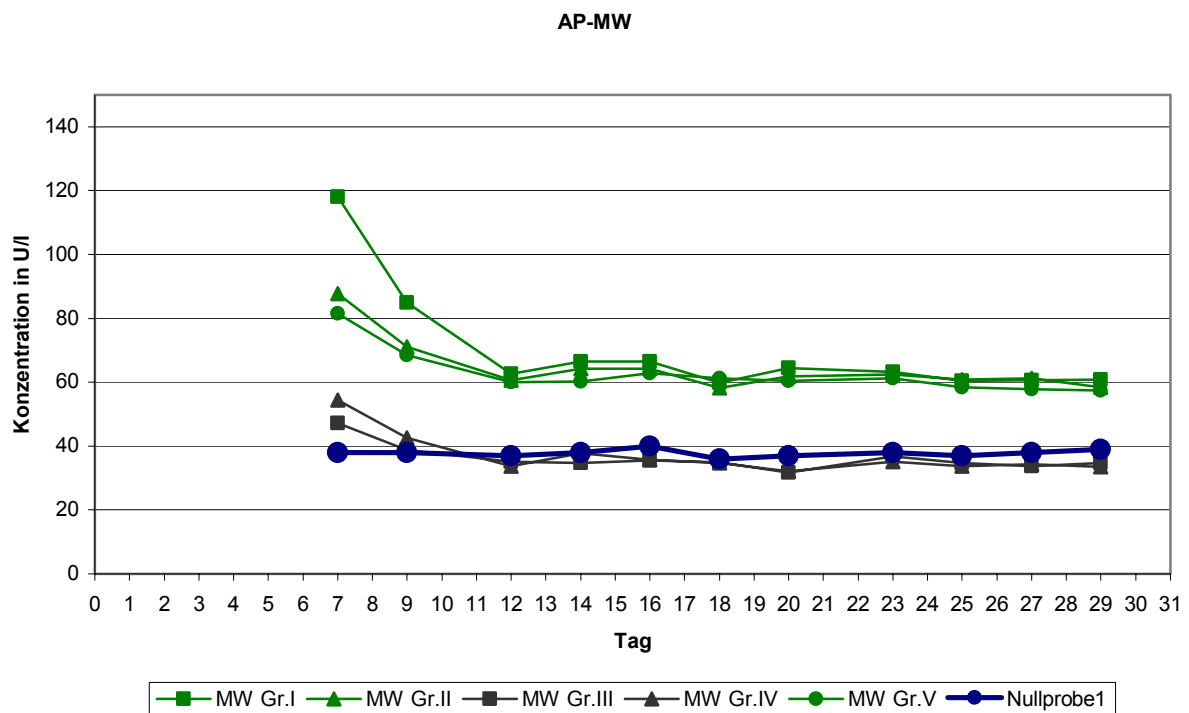


Abbildung 5-1 Mittelwerte der AP-Konzentration der Gruppen I-V, Nullprobe

In Abbildung 5-1 ist auf der X-Achse der zeitliche Verlauf (Tag des Experimentes) dokumentiert. Auf der Y-Achse ist die Konzentration der Alkalischen Phosphatase in U/l angegeben.

In den Gruppen I, II und V werden während der ersten Versuchstage Konzentrationswerte im Bereich von 80 bis 120 mg/dl gemessen. Im weiteren Verlauf liegen die Werte in einem Konzentrationsbereich von ca. 60 mg/dl. Die hohen Anfangswerte entstehen präparationsbedingt durch das Sägen und Ausbohren der Knochenplättchen. Dabei werden Knochenzellen verletzt und zerstört. Aus den verletzten und zerstörten Zellen gelangen Knochenstoffwechsellmarker in die Zirkulation des Nährmediums. Hinzu kommt eine erhöhte Osteoblastenaktivität aufgrund der ausgelösten Reparaturmechanismen, ähnlich wie bei der Frakturheilung eines Knochens.

Einen ähnlichen Verlauf der Konzentrationswerte sieht man bei den Gruppen III und IV. Nach anfänglich geringfügig höheren Werten, kommt es im Verlauf zu einer Gruppierung der Mittelwerte der Konzentrationen in einem Bereich von ca. 40 mg/dl. Ebenfalls in diesem Bereich (40mg/dl) liegt die Konzentration der Nullprobe.

Es resultiert somit ein deutlicher Konzentrationsunterschied von ca. 20mg/dl zwischen den Gruppen I, II, V einerseits und III, IV sowie der mitgeführten Nullprobe andererseits.

Ausgehend von den Markereigenschaften der alkalischen Phosphatase ergibt sich für die Gruppen III und IV somit keine Knochenbildungsaktivität, bzw. eine so gering über der Nullprobe liegende Aktivität, dass diese höchstwahrscheinlich auf natürliche Schwankungen der Messung zurückzuführen ist. Es ist also mittels KCl-Lösung gelungen, die Osteoblasten der Knochenproben zu töten. Eine Zunahme der Steifigkeit in den Gruppen III und IV, basierend auf der Aktivität der Osteoblasten (d.h. durch Knochenaufbau) ist somit ausgeschlossen.

Für die Gruppen I, II und V hingegen ist eine Knochenbildungsaktivität nachweisbar, da die gemessenen Konzentrationen im Verlauf ca. 20mg/dl über den Konzentrationen der Nullprobe liegen. Die Osteoblastenaktivität in den Gruppen I, II und V kann somit in einen kausalen Zusammenhang mit der Steifigkeitszunahme der Knochenproben gebracht werden. Andere Faktoren, die zur Steifigkeitszunahme führen können, sind jedoch nicht ausgeschlossen.

Ein Unterschied zwischen lebenden und toten Knochenproben bezüglich ihrer Osteoblastenaktivität ist nachgewiesen.

Fraglich ist die Osteoblastenaktivität der Knochenproben der Kontrollgruppe (Gruppe V), welche ebenfalls im Bereich der Konzentrationen der Gruppen I und II liegt und somit eindeutig die Aktivität der Osteoblasten belegt. Der Grund für diese Aktivität liegt vermutlich in den durch die Steifigkeitsmessungen applizierten Belastungssignalen auf die Knochenproben.

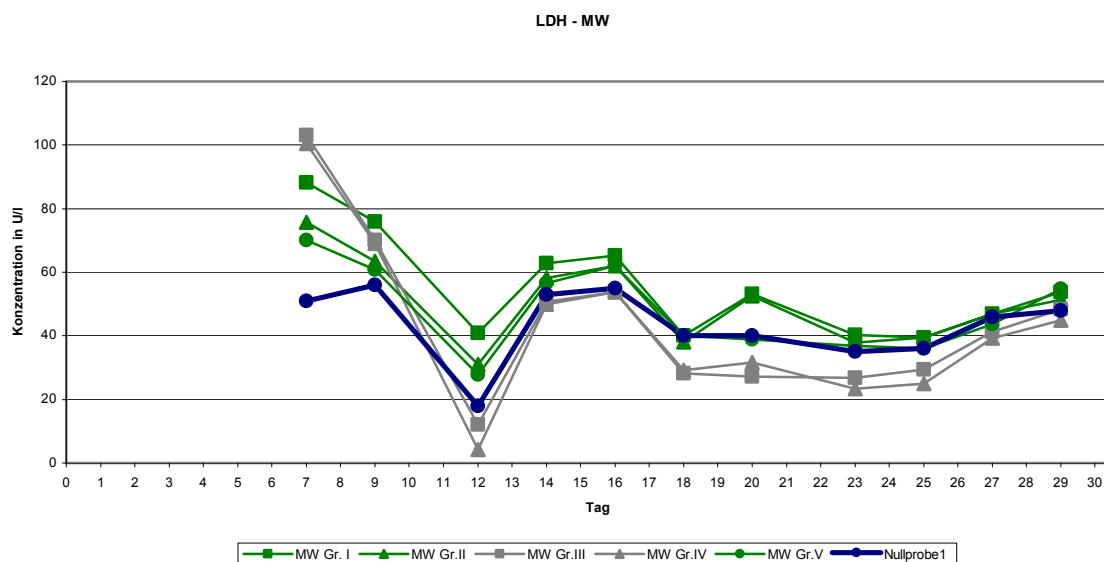
Es ist wichtig an dieser Stelle zwischen Osteoblastenaktivität, Steifigkeitszunahme und Knochenumsatz zu differenzieren. Eine hohe Osteoblastenaktivität zieht nicht zwangsweise eine Steigerung der Knochensteifigkeit nach sich, sie kann auch nur zur Kompensation einer gesteigerten Osteoklastenaktivität dienen, welche ihren Ausgang in einer verminderten Belastung der Knochenzellen hat.

## 5.2 Laktatdehydrogenase

Die Analyse der Nährmediumüberstände bezüglich der Laktatdehydrogenasekonzentration soll der Beantwortung folgender Fragen dienen:

1. Wie groß sind die LDH-Konzentrationen in den einzelnen Gruppen?
2. Unterscheiden sich die Konzentrationen der Gruppen untereinander?
3. Können Aussagen über Zellschädigung getroffen werden?

Die Ergebnisse der Analyse sind in der folgenden Abbildung dargestellt. Die Darstellung der Konzentrationen erfolgt durch die errechneten Mittelwerte der Gruppen I, II, III, IV und V. Außerdem sind die Konzentrationen der mitgeführten Nullprobe dargestellt.



**Abbildung 5-2 Mittelwerte der Laktatdehydrogenasekonzentrationen der Gruppen I-V, Nullprobe**

Die initial hohen Konzentrationen der LDH in allen Gruppen sind auf die präparationsbedingte Schädigung und Zerstörung der Zellen zurückzuführen. Die im weiteren Verlauf sichtbaren Schwankungen deuten auf messungsbedingte Varianzen hin, da sie in allen Gruppen und auch in der mitgeführten Nullprobe zu finden sind.

Grund für die deutlich höheren Anfangskonzentrationen der Gruppe III und IV (103,3 U/l bzw. 100,5 U/l) ist die Abtötung der Zellen mit KCl-Lösung. Bedingt durch den

Zelluntergang wird in diesen Gruppen zusätzlich Laktatdehydrogenase freigesetzt. Ab dem 12. Tag liegen die Laktatdehydrogenasekonzentrationen der Gruppen III und IV unter den Konzentrationen der Nullprobe. Folglich findet kein physiologischer Knochenab- und aufbau mit Zelluntergängen statt. Die Knochenproben der Gruppe III und IV sind tot.

Die Konzentrationsverläufe der Gruppen I, II und V stellen sich sehr ähnlich dar und liegen in der Mehrzahl der Messtage auf einem Niveau über der Nullprobe. Dies spiegelt den ständigen natürlichen Knochenzellumsatz mit Auf- und Abbau von Knochenmaterial wider. Es ist keine isolierte Erhöhung der Laktatdehydrogenasekonzentration einer einzelnen Gruppe ersichtlich. Dies lässt auf die Vitalität der Knochenproben der Gruppen I, II und V im gesamten Experiment schließen. Es ist kein über den physiologischen Bereich hinausgehender Zelluntergang nachweisbar.

### 5.3 Laktat

Mit Hilfe der Laktatmessung sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie hoch sind die Laktatkonzentrationen in den einzelnen Gruppen?
2. Unterscheiden sich die Konzentrationen der Gruppen untereinander?
3. Welche Aussagen bezüglich der Stoffwechselaktivität der Osteoblasten können getroffen werden?
4. Gibt es Auswirkungen auf die Laktatkonzentration durch die polychrome Sequenzmarkierung?

In folgender Abbildung sind die Ergebnisse der Konzentrationsbestimmungen dargestellt. Es werden die Mittelwerte der Konzentrationen der Gruppen I, II, III, IV und V sowie die Konzentrationen der mitgeführten Nullprobe gezeigt.

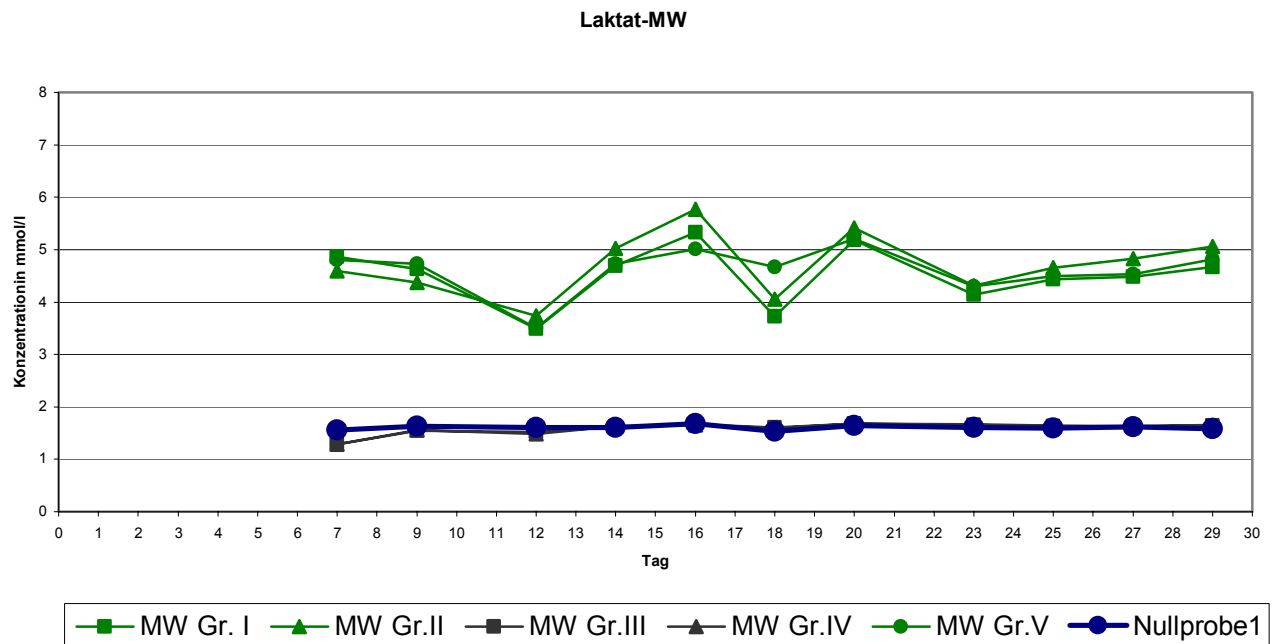


Abbildung 5-3 Mittelwerte der Laktatkonzentrationen in den Gruppen I-V, Nullprobe

In der Abbildung 5-3 ist auf der X-Achse der Verlauf des Experimentes durch den Tag beschrieben. Auf der Y-Achse ist die Konzentration des Laktates in mmol/l abgetragen.

Die Gruppen I, II und V fallen durch ihren ähnlichen Verlauf im Bereich zwischen ca. 3 mg/dl und 6mg/dl unmittelbar auf. Sie unterscheiden sich somit deutlich vom Konzentrationsverlauf der Nullprobe und es gibt eine mit Hilfe der Laktatkonzentration nachweisbare Stoffwechselaktivität. Der Mittelwert der Anfangskonzentrationen entspricht in allen drei Gruppen annähernd dem Mittelwert der Endkonzentrationen, d.h. die Stoffwechselaktivität war zu Beginn und zum Ende des Experimentes annähernd gleich. Besondere Beachtung soll dem durch „Spitzen“ und „Täler“ gekennzeichneten Verlauf zukommen. Da diese nur in den Gruppen auftreten, welche lebende Zellen enthalten und nicht in den Gruppen mit den toten Knochenzellen (Gruppe III und IV), unterstreichen sie den Nachweis einer Stoffwechselaktivität in den Gruppen I, II und V. Dem ersten sichtbaren Tiefpunkt am 12. Tag geht unmittelbar am 9. Tag der erste Schritt der polychromen Sequenzmarkierung mit Calcein voraus. Am 16. und am 20. Tag sind zwei Spitzen erkennbar, welche durch dazwischenliegende, niedrigere Konzentrationen in allen Gruppen konfiguriert werden. Für dieses „Tal“ ist kein äußerer Einfluss bekannt. Der zweite Schritt der polychromen Sequenzmarkierung mit Alizarin erfolgt am 20. Tag und wird wiederum durch eine nachfolgend abnehmende Laktatkonzentration (23.Tag) in allen drei Gruppen (I, II, V) gekennzeichnet. Beide Substanzen der polychrome Sequenzmarkierung (Calcein und Alizarin) haben wahrscheinlich in den verwendeten Konzentrationen einen geringen stoffwechselsuppressiven Effekt auf die Osteoblasten.

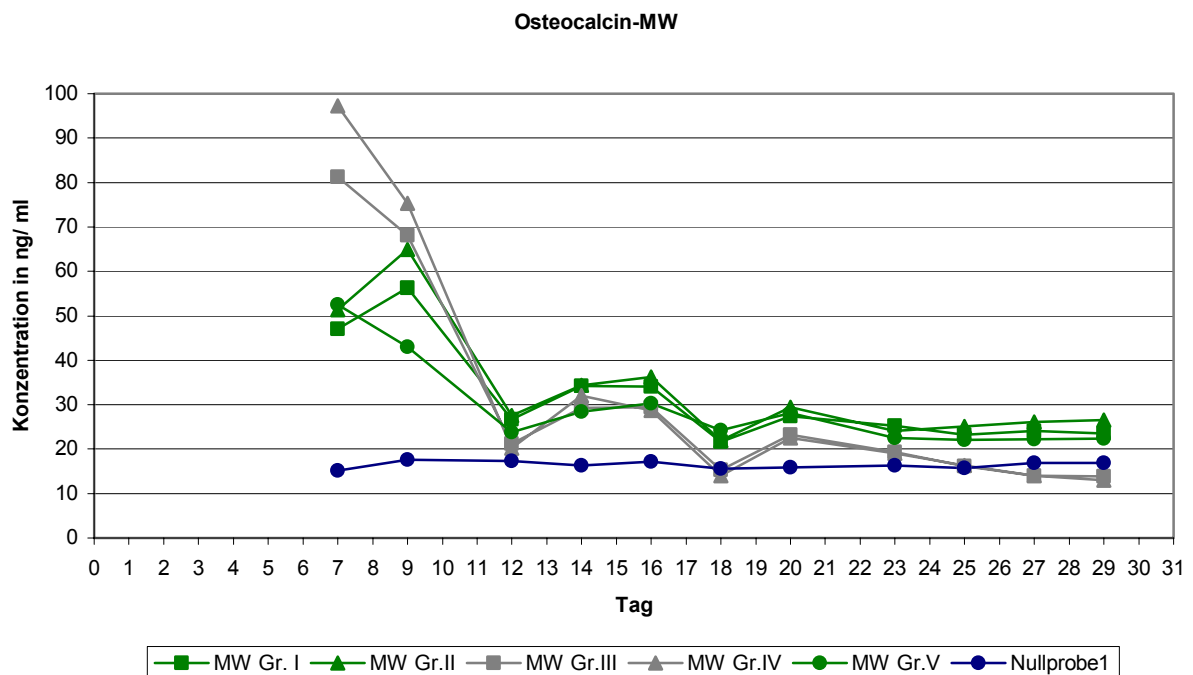
Die Gruppen III und IV zeigen einen wesentlich konstanteren Verlauf. Auch hier liegen die Mittelwerte der Anfangs- und Endkonzentration auf ähnlichem Niveau. In ihrem gesamten Verlauf gruppieren sich die Mittelwerte der Laktatkonzentrationen der Gruppen III und IV um den Konzentrationsverlauf der mitgeführten Nullprobe im Bereich von ca. 1,6 mg/dl. Die mitgeführte Nullprobe hatte keinen Kontakt zu den Knochenproben, da sie nicht an das System angeschlossen war. Daraus folgt, dass in den Knochenproben der Gruppe III und IV keine mit Hilfe der Laktatkonzentration bestimmbare Stoffwechselaktivität stattfand. Die Knochenzellen waren nicht stoffwechselaktiv, d.h. sie waren in den genannten Gruppen tot.

## 5.4 Osteocalcin

Mit der Messung der Osteocalcinkonzentration als Marker für den Knochenumsatz sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Wie groß sind die Osteocalcinkonzentrationen in den einzelnen Gruppen?
2. Unterscheiden sich die Konzentrationen der Gruppen untereinander?
3. Welche Aussagen bezüglich des Knochenumsatzes können getroffen werden?

Die Mittelwerte der Konzentrationen der Gruppen I, II, III, IV, V und die Konzentrationen der Nullprobe sind in der folgenden Abbildung dargestellt.



**Abbildung 5-4 Mittelwerte der Osteocalcinkonzentration der Gruppen I- V, Nullprobe**

In der Abbildung 5-4 ist auf der X-Achse durch den Tag der zeitliche Verlauf dokumentiert. Auf der Y-Achse ist die Osteocalcinkonzentration in ng/ml angegeben.

Die anfänglich hohen Konzentrationen in allen Gruppen lassen vermuten, dass es sich um Osteocalcin handelt, welches durch präparationsbedingte Schädigung der Knochenmatrix



frei wird. Hinzu kommt eine durch Reparationsvorgänge erhöhte Osteoblastenaktivität, welche ebenfalls zur erhöhten Osteocalcinkonzentration beiträgt.

Am 12. Tag erreicht die Osteocalcinkonzentration einen Tiefpunkt in allen Gruppen. Dieser ist wahrscheinlich, wie in der Beschreibung der Laktatkonzentrationen bereits ausgeführt, auf den ersten Schritt der polychromen Sequenzmarkierung mit Calcein am 9. Tag zurückzuführen.

Danach erkennt man eine zunehmende Stabilisierung der Konzentrationen in allen Gruppen im Verlauf. Ab dem 18. Tag liegen die Osteocalcinkonzentration der Gruppen I, II und V in einem Bereich zwischen 20 und 30 ng/ml. Die Mittelwerte der Osteocalcinkonzentrationen der Gruppen III und IV sind im zeitlichen Verlauf partiell ebenfalls in einem Bereich über denen der Nullprobenkonzentration zu finden, überschreiten aber ab dem 18. Tag nicht mehr die Konzentrationen der Gruppen I, II und V. Die Osteocalcinkonzentration der Nullprobe liegt bei Werten um 16 ng/ml.

Die Knochenumsatzrate ist in den Gruppen I, II und V höher als in den Gruppen III und IV. Die Osteocalcinkonzentration der Gruppen I, II und V spiegelt sowohl den Anteil, der durch aktivierte Osteoblasten entsteht als auch den durch physiologischen Matrixabbau freiwerdenden Osteocalcinanteil wider. Dass die Osteocalcinkonzentrationen in den Gruppen III und IV sich über dem Niveau der mitgeführten Nullprobe befinden, ließe ebenfalls auf Knochenumsatzaktivität schließen; jedoch wird die Osteocalcinkonzentration in den Gruppen III und IV vermutlich durch die aus untergegangener Knochenmatrix freigesetzten Osteocalcinfragmente gestellt und nicht durch die Osteocalcinproduktion aktivierter Osteoblasten (vgl. Kapitel 5.1).

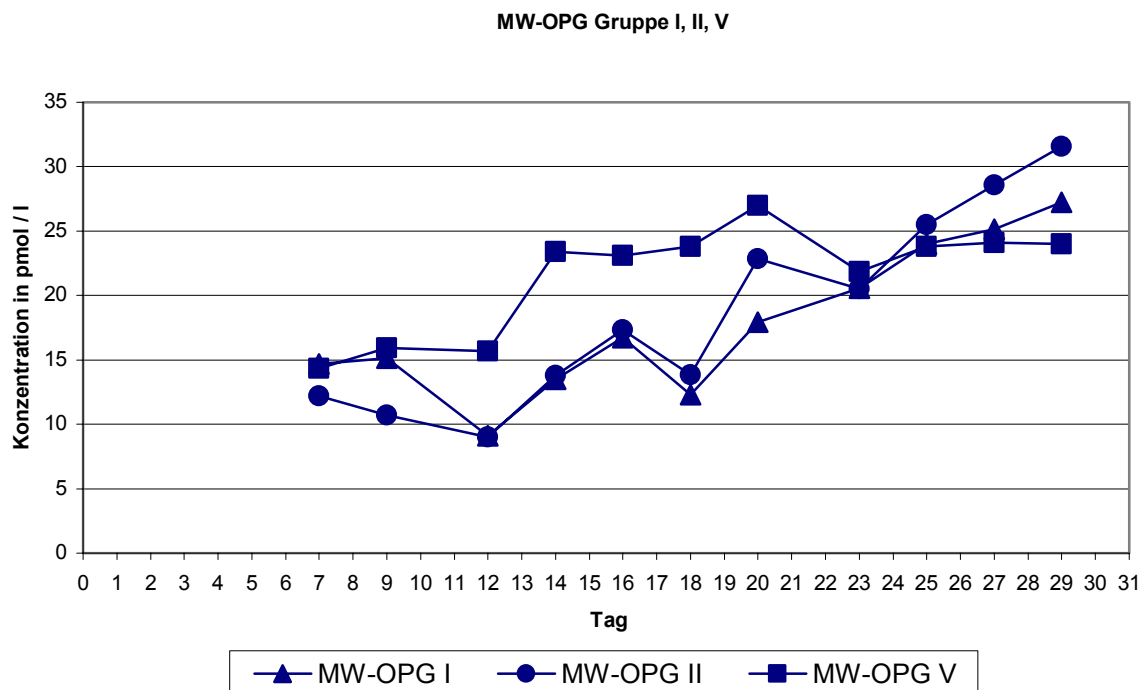
## 5.5 Osteoprotegerin

Die Bestimmung der OPG- Konzentration kann aufgrund der hohen Kosten für die OPG-ELISA-Kits nur an einigen Proben exemplarisch durchgeführt werden.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Ist OPG im Nährmediumüberstand überhaupt nachweisbar?
2. Zeigen sich Änderungen der Osteoprotegerinkonzentration im Verlauf?

Die ermittelten Daten werden in folgender Abbildung dargestellt. Es ist zu beachten, dass es sich dabei um die Mittelwerte der Konzentrationen der Gruppen I, II und V handelt. Diese werden in Gruppe I aus den Konzentrationen von drei Knochenproben (Bone 1,4,6) und in Gruppe II (Bone 7,9,10,12) und V (Bone 25,27,29,30) jeweils aus den Konzentrationen von vier Knochenproben berechnet. Die Analyse der Proben aus den Gruppen III und IV kann kein OPG nachweisen. Auf eine Darstellung wird deshalb verzichtet.



**Abbildung 5-5 Mittelwerte der OPG-Konzentrationen der Gruppen I, II und V**

In der Abbildung 5-5 ist auf der X-Achse der zeitliche Verlauf durch den Tag des Experimentes dokumentiert. Auf der Y-Achse ist die Osteoprotegerinkonzentration in pmol / l angegeben.

In Gruppe I beträgt der Mittelwert der Anfangskonzentrationen 14,7 pmol/l und der Mittelwert der Endkonzentrationen 27,2 pmol/l. Dies entspricht einer absoluten Zunahme von 12,5 pmol/l und einer relativen Zunahme von 85%.

In Gruppe II beträgt der Mittelwert der Anfangskonzentrationen 12,2 pmol/l und der Mittelwert der Endkonzentrationen 31,6 pmol/l. Dies entspricht einer absoluten Zunahme von 19,4 pmol/l und einer relativen Zunahme von 159%.

In Gruppe V beträgt der Mittelwert der Anfangskonzentrationen 14,3 pmol/l und der Mittelwert der Endkonzentrationen 24,0 pmol/l. Dies entspricht einer absoluten Zunahme von 9,7 pmol/l und einer relativen Zunahme von 67,8%.

Die Mittelwerte der Ausgangs- und Endkonzentrationen der einzelnen Gruppen sowie die absolute und die relative Zunahme der Mittelwerte der Gruppen sind in folgender Tabelle noch einmal zusammengefasst:

Gruppe	MW- Anfangskonzentration [pmol/l]	MW- Endkonzentration [pmol/l]	Absolute Zunahme [pmol/l]	Relative Zunahme in %
I	14,7	27,2	12,5	85,0
II	12,2	31,6	19,4	159,0
V	14,3	24,0	9,7	67,8

**Tab. 5-1 OPG-Konzentrationen der Gruppen I, II und V**

Die geringste Anfangskonzentration und gleichzeitig die höchste Endkonzentration findet man in Gruppe II. Daraus resultieren die größte absolute Konzentrationssteigerung von 19,4 pmol/l und die größte relative Konzentrationszunahme mit 159,0%.

Die größte Anfangskonzentration findet man in Gruppe I (14,7 pmol/l), mit einer absoluten Konzentrationszunahme von 12,5 pmol/l resultiert eine Endkonzentration von 27,2 pmol/l, was einer relativen Zunahme von 85% entspricht.

Die kleinste absolute und relative Zunahme findet sich mit 9,7 pmol/l bzw. 67,8% in Gruppe V.

In jeder Gruppe liegt eine Steigerung der Mittelwerte der Osteoprotegerinkonzentrationen um mindestens 67,8% vor. Die Anfangs- und Endkonzentrationen der Mittelwerte befinden sich in allen drei Gruppen in ähnlichen Größenordnungen.

In den Gruppen I, II und V findet eine zunehmende Hemmung der Osteoklastengenesse statt, was sich in einem Überwiegen des osteoblastischen Knochenaufbaus und somit in einer Zunahme der Knochensteifigkeit äußert.

Die stärkste Zunahme der OPG-Konzentration findet sich in Gruppe II mit 159 % (jumping 3000, high pass), gefolgt von Gruppe I mit 85 % (jumping 3000) und Gruppe V (Kontrolle) mit 67,8%. Es liegt nahe davon auszugehen, dass das Belastungssignal in Gruppe II ein besonders potenter Stimulus für die OPG-Produktion der Osteoblasten ist. Es muss jedoch erneut auf die geringe Anzahl der bestimmten OPG-Konzentrationen pro Gruppe hingewiesen werden, was wiederum eine kritische Bewertung der Aussagekraft der Daten erfordert.

## 5.6 Cathepsin K

Aufgrund des hohen Kostenaufwandes für den zur Analyse benötigten *Enzym Linked Immuno Sorbent Assay* kann auch dieser nur an einigen Proben exemplarisch durchgeführt werden. Analog zur OPG-Analyse sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Ist Cathepsin K im Nährmediumüberstand überhaupt nachweisbar?
2. Zeigen sich Änderungen der Cathepsin K Konzentration im Verlauf?

Die Daten werden in folgender Abbildung dargestellt. Es ist zu beachten, dass es sich dabei um die Mittelwerte der Konzentrationen Gruppen I, II und V handelt. Da diese Mittelwerte jeweils nur aus den Konzentrationen von zwei Proben berechnet sind, muss hier auf die eingeschränkte Aussagekraft hingewiesen werden. Die Analysen der Proben der Gruppen III und IV können kein Cathepsin K nachweisen und kommen deshalb hier nicht zur Darstellung.

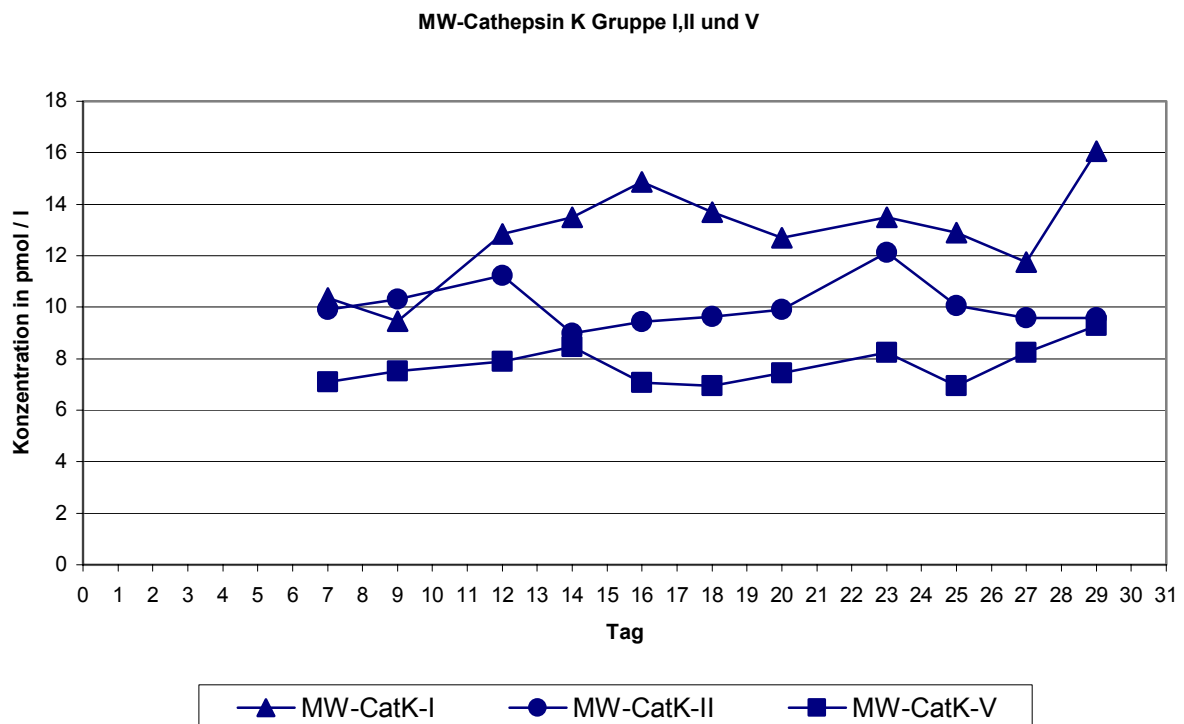


Abbildung 5-6 Mittelwerte der Cathepsin K-Konzentrationen der Gruppen I, II und V

In der Abbildung 5-6 ist auf der X-Achse der zeitliche Verlauf durch den Tag des Experimentes dokumentiert. Auf der Y-Achse ist die Cathepsin K – Konzentration in pmol / l angegeben.

In Gruppe I beträgt der Mittelwert der Anfangskonzentrationen 10,4 pmol/l und der Mittelwert der Endkonzentrationen 16,1 pmol/l. Dies entspricht einer absoluten Zunahme von 5,7 pmol/l und einer relativen Zunahme von 54,8%.

In Gruppe II beträgt der Mittelwert der Anfangskonzentrationen 9,9 pmol/l und der Mittelwert der Endkonzentrationen 9,6 pmol/l. Dies entspricht einer absoluten Änderung von -0,3 pmol/l und einer relativen Änderung von -3,0%.

In Gruppe V beträgt der Mittelwert der Anfangskonzentrationen 7,1 pmol/l und der Mittelwert der Endkonzentrationen 9,3 pmol/l. Dies entspricht einer absoluten Zunahme von 2,2 pmol/l und einer relativen Zunahme von 31,0%.

Die Mittelwerte der Ausgangs- und Endkonzentrationen der einzelnen Gruppen sowie die absolute und die relative Zunahme der Mittelwerte der Gruppen sind in folgender Tabelle noch einmal zusammengefasst:

Gruppe	MW- Anfangskonzentration [pmol/l]	MW- Endkonzentration [pmol/l]	Absolute Änderung [pmol/l]	Relative Änderung in %
I	10,4	16,1	5,7	54,8
II	9,9	9,6	-0,3	-3,0
V	7,1	9,3	2,2	31,0

**Tab. 5-2 Cathepsin K-Konzentrationen der Gruppen I, II und V**

Den geringsten Mittelwert der Anfangskonzentrationen findet man in Gruppe V mit 7,1 pmol/l. Ebenfalls in Gruppe V findet man die geringste Endkonzentration mit 9,3 pmol/l.

Die größte Anfangs- und Endkonzentration zeigt sich in Gruppe I mit 10,4 pmol/l bzw. 16,1 pmol/l. Die daraus resultierende absolute und relative Änderung mit 5,7 pmol/l bzw. 54,8% ist die größte der hier gezeigten Daten.

Eine Sonderstellung nimmt Gruppe II ein. In dieser erfolgte keine positive Änderung der Konzentrationen, sondern eine negative. Sie ist mit einer absoluten und relativen Änderung von -0,3 pmol/l bzw. -3,0% jedoch sehr gering.

Es muss hier noch einmal darauf hingewiesen werden, dass sich alle genannten Mittelwertkonzentrationen nur aus zwei Probenkonzentrationen pro Gruppe errechnen und ihre Aussagekraft somit sehr eingeschränkt ist.

In den Gruppen I und V kam es zu einer Zunahme der Cathepsin K Konzentration im Verlauf des Experimentes. In Gruppe I zeigt sich eine relative Änderung von 54,8 % und in Gruppe V eine relative Änderung von 31.0%. In beiden Gruppen erhöhte sich im Verlauf des Experimentes die Resorptionsaktivität der Osteoklasten.

In Gruppe II hingegen kam es zu einer Abnahme der Cathepsin K Konzentration um 3 %. Ob es sich hierbei tatsächlich um eine Abnahme oder um eine messungsbedingte Schwankung im Toleranzbereich handelt, bleibt offen. Aufgrund der geringen Datenmenge sind Messfehler jedoch wahrscheinlicher. Sicher hingegen ist eine Osteoklastenaktivität in Gruppe II, welche durch das Vorhandensein von Cathepsin K nachgewiesen wurde.

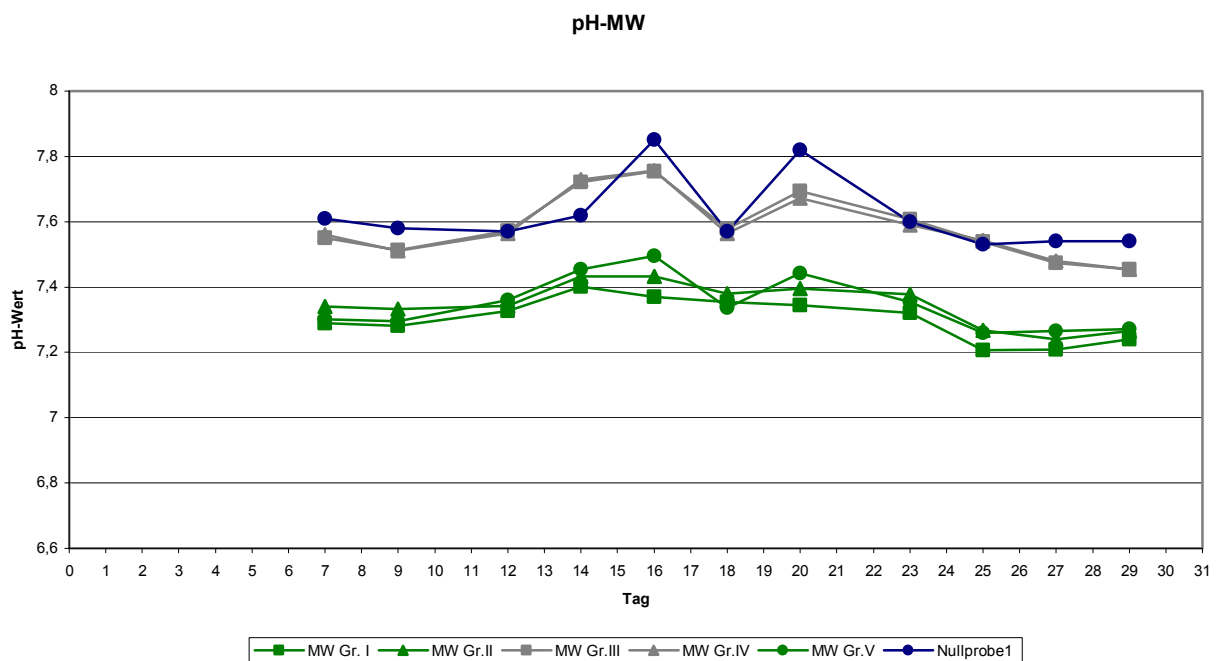
## 5.7 pH-Wert

Das verwendete Nährmedium (Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM – low glucose)) wird bei der Zusammenstellung auf einen pH-Wert von 7,25 eingestellt und mit diesem in das System eingebracht.

In einem 48-stündigen Zyklus wird das Medium gewechselt und der pH-Wert des Mediumüberstandes gemessen. Mit Hilfe der Messung sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Zeigen sich Änderungen der pH- Werte im Verlauf des Experimentes?
2. Unterscheiden sich die pH- Werte der Gruppen untereinander?

Die gemessenen pH- Werte sind im folgenden Diagramm abgebildet. Es handelt sich dabei jeweils um die Mittelwerte der einzelnen Gruppen, sowie die pH-Werte der Nullprobe.



**Abbildung 5-7 Mittelwerte der pH- Werte der Gruppen I-V, Nullprobe**

In der Abbildung 5-7 wird auf der X-Achse der zeitliche Verlauf den Tag des Experimentes beschrieben. Auf der Y-Achse ist der pH-Wert abgetragen.

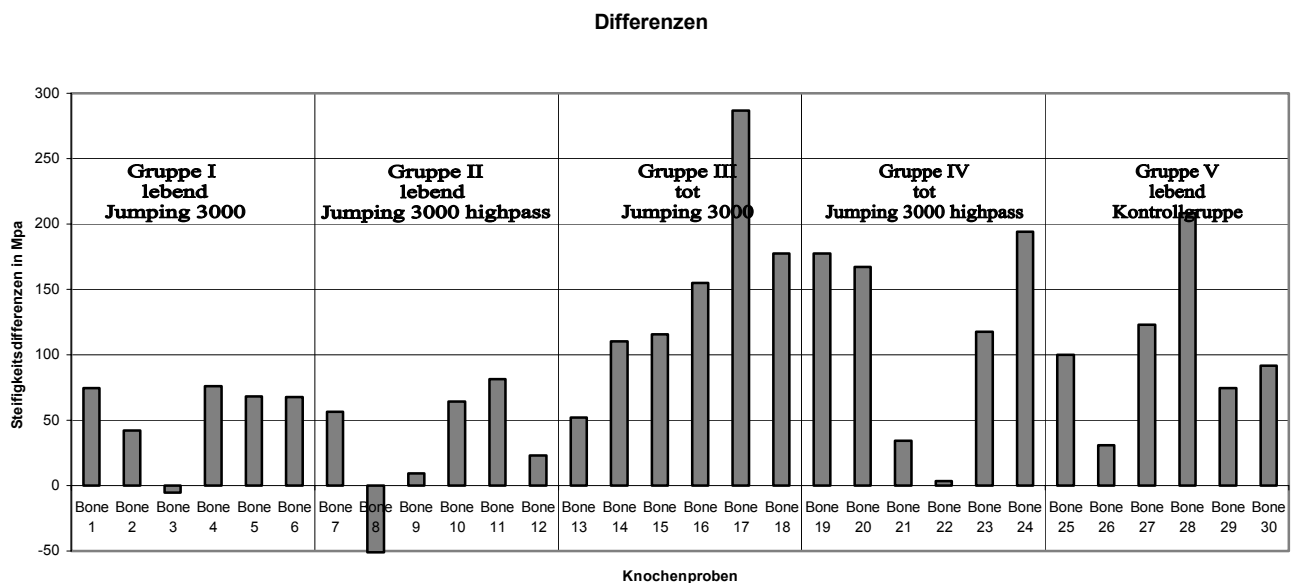
Die pH-Werte der Gruppen I, II und V liegen im gesamten Verlauf in in dem für die Osteoblastenaktivität optimalen Bereich von 7,2 bis 7,5. [60]. Die Pufferkapazität des Nährmediums war somit angemessen dosiert.



Die Werte der Gruppen III und IV liegen im gesamten Verlauf in einem Bereich von 7,45 bis 7,75. Die Werte der Nullprobe liegen im gesamten Verlauf in einem Bereich von 7,53 bis 7,85. In den Gruppen III und IV, wo vermutlich keine Stoffwechselaktivität vorlag, wurde die Pufferungskapazität des Nährmediums nicht ausgeschöpft und führte somit zu den gezeigten pH-Werten, welche sich im Verlauf um die pH-Werte der mitgeführten Nullprobe gruppierten.

## 5.8 Elastizitätsmodul

Im folgenden Diagramm sind die Steifigkeitsänderungen der einzelnen Knochenproben in Form von Differenzen angegeben. Diese Differenzen werden, in Vorbereitung auf die statistische Aufarbeitung der Ergebnisse, aus den Mittelwerten der in den ersten und letzten fünf Messtagen ermittelten Werte einer jeden Knochenprobe errechnet.



**Abbildung 5-8 Steifigkeitsdifferenzen der Knochenproben**

Die Differenzen der Gruppe I und II liegen überwiegend im Bereich von 50 bis 100 MPa.

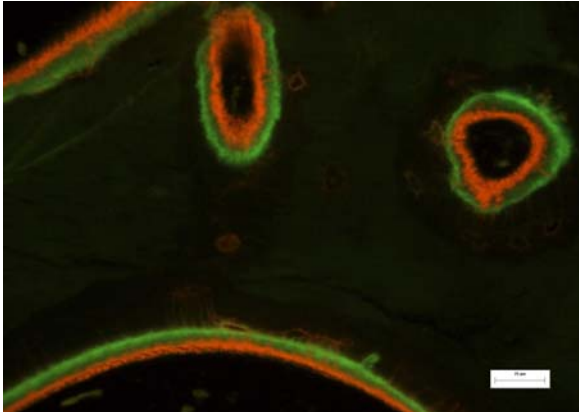
Die Differenzen der Gruppe III und IV finden sich hauptsächlich in einer Größenordnung zwischen 100 und 200 MPa.

Für die Differenzen der Gruppe V sind keine vorherrschenden Größenbereiche ersichtlich.

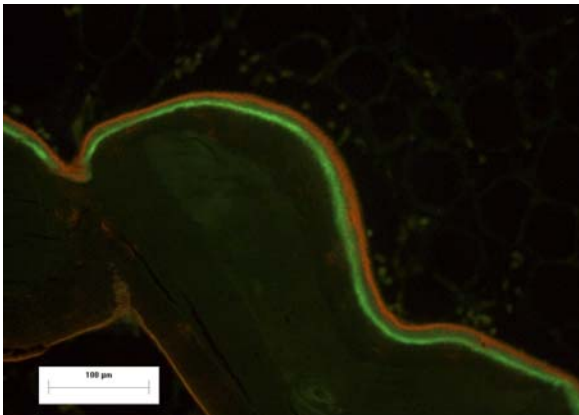
Bereits in dieser Übersicht deutet sich eine Inhomogenität der Messwerte an. Die weitere Analyse der Daten ist im Kapitel 5.10 Statistik dargestellt.

## 5.9 Histologie

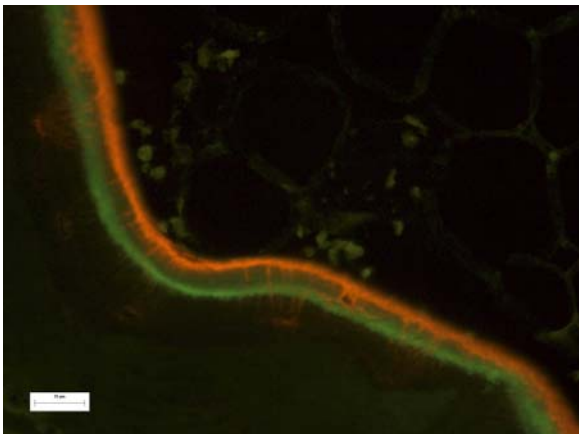
Die im Rahmen der Aufarbeitung der Knochenzylinder entstandenen histologischen Präparate werden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops ausgewertet. Ziel ist die exemplarische Visualisierung des Knochenwachstums durch die polychrome Sequenzmarkierung.



**Abbildung 5-9 spongiöser Knochen; Bone 6**  
40x fach, Fluoreszenzmikroskop



**Abbildung 5-10 spongiöser Knochen; Bone 6**  
20x fach, Fluoreszenzmikroskop



**Abbildung 5-11 spongiöser Knochen; Bone 6**  
40x fach, Fluoreszenzmikroskop

In den Abbildungen 5-9, 5-10 und 5-11 sind histologische Präparate eines spongiösen Knochenzylinders (Bone 6) zu sehen, in 20facher bzw. 40facher Vergrößerung. Die grüne Bande entsteht durch die Zugabe von Calcein am 9. Tag des Experimentes. Die rote Bande entsteht durch die Zugabe von Alizarin am 20. Tag des Experimentes. (vgl. 2.6 und 4.5)

Durch die Zugabe von Fluochromen am 9. und 20. Tag entstehen durch die Reaktion mit Calcium Chelatkomplexe, welche in den mineralisierten Knochen eingebaut werden. Es entstehen so genannte *Doppelbanden*, wie in Abbildung 5-9, 5-10 und 5-11 zu sehen. Die Dicke einer *Doppelbande* entspricht in diesem Experiment dem Knochenwachstum von 11 Tagen.

Der histologische Nachweis des Knochenwachstums ist somit gelungen. Da dies jedoch nicht Schwerpunkt der Arbeit ist, wird auf eine detaillierte Auswertung im Sinne einer systematischen Ausmessung der Bandendifferenzen verzichtet.

## 5.10 Statistik

Die statistische Auswertung der Elastizitätsmodule wurde durch das Institut für Epidemiologie und Biometrie der Philipps-Universität Marburg unterstützt und durchgeführt.<sup>6</sup> Auf Empfehlung des Instituts für Epidemiologie und Biometrie wurde nur das Elastizitätsmodul (Steifigkeitszunahme) ausgewertet. Eine statistische Auswertung der Knochenstoffwechsellmarker wurde aufgrund der geringen Datenmenge nicht empfohlen.

Folgende statistische Testverfahren kamen dabei zur Anwendung:

### ANOVA Oneway

ANOVA Oneway ist ein Mittelwertvergleich. Mit ihm lässt sich die Frage beantworten, ob auftretende Mittelwertunterschiede durch zufällige Schwankungen erklärbar sind, oder nicht. Lassen sie sich nicht durch zufällige Schwankungen erklären, spricht man von überzufälligen oder signifikanten Unterschieden. Vergleicht man Mittelwerte von Stichproben untereinander, so setzt man voraus, dass diese aus Stichproben mit normalverteilten Werten stammen. ANOVA dient dem Vergleich von mehr als zwei unabhängigen Stichproben.

Zur Berechnung müssen abhängige Variablen und Faktoren definiert werden.

### Univariate Varianzanalyse (Allgemeines lineares Modell)

Die Varianzanalyse untersucht den Einfluss von einer oder mehreren unabhängigen Variablen auf eine abhängige Variable.

### Nichtparametrische Tests

Nichtparametrische Tests werden überall dort angewandt, wo keine parametrische Verteilungsfunktion unterstellt werden soll. Da bei ihnen nicht die Messwerte selbst, sondern deren Rangplätze verarbeitet werden, sind sie auch unempfindlich gegen Ausreißer.

### U-Test nach Mann und Whitney

---

<sup>6</sup> Nach initialer Beratung durch Herrn Professor Schäfer und Herrn Scherag erfolgte in weiteren Terminen gemeinsam mit Herrn Scherag die Auswertung.

Er dient dem nichtparametrischen Vergleich zweier unabhängiger Stichproben, basierend auf einer gemeinsamen Rangreihe der Werte beider Stichproben.

#### H-Test nach Kruskal und Wallis

Der H-Test nach Kruskal und Wallis ist eine Ausweitung des U-Testes von Mann und Whitney beim Vorliegen von mehr als zwei unabhängigen Stichproben. Auch er basiert auf einer gemeinsamen Rangreihe der Werte aller Stichproben.

### 5.11 Statistische Auswertung Elastizitätsmodul

Ziel der statistischen Auswertung des Elastizitätsmoduls ist der Vergleich der Steifigkeitszunahmen der verschiedenen Gruppen. Dafür sind jedoch zunächst folgende vorbereitende Schritte notwendig:

1. Aufarbeitung der Daten für die statistischen Tests
2. Explorative Datenanalyse zur Auswahl geeigneter Tests
3. Globalstest zur Schaffung einer Grundlage für den Vergleich der einzelnen Gruppen
4. Vergleich der Steifigkeitsdifferenzen der einzelnen Gruppen mittels Mann-Whitney-Test

#### 5.11.1 Aufarbeitung der Daten für die statistischen Tests

Aufgrund der Heterogenität der gewonnenen Daten werden vorbereitend für die statistischen Tests Mittelwerte und Differenzen gebildet. Für jede Knochenprobe wird der Mittelwert der letzten fünf Messtage errechnet und von diesem der Mittelwert der ersten fünf Messtage abgezogen. Folgende Tabelle entsteht:

		Bone 1	Bone 2	Bone 3	Bone 4	Bone 5	Bone 6
Mittelwert 22.-26.Wert		323,7428	200,938	14,5016	917,6778	584,8382	145,8306
Mittelwert 1.-5.Wert		249,2998	158,7738	19,7084	841,614	516,5	78,1522
Differenz		74,443	42,1642	-5,2068	76,0638	68,3382	67,6784
		Bone 7	Bone 8	Bone 9	Bone 10	Bone 11	Bone 12
Mittelwert 22.-26.Wert		317,5528	502,927	312,0286	247,0098	237,4232	75,757
Mittelwert 1.-5.Wert		261,3934	553,8744	302,5218	183,0146	156,0328	52,5234
Differenz		56,1594	-50,9474	9,5068	63,9952	81,3904	23,2336
		Bone 13	Bone 14	Bone 15	Bone 16	Bone 17	Bone 18
Mittelwert 22.-26.Wert		259,4044	519,3614	301,8452	391,8744	954,8678	533,8752
Mittelwert 1.-5.Wert		207,2296	408,8576	186,2952	237,1678	667,8956	356,2936
Differenz		52,1748	110,5038	115,55	154,7066	286,9722	177,5816
		Bone 19	Bone 20	Bone 21	Bone 22	Bone 23	Bone 24
Mittelwert 22.-26.Wert		371,6932	392,4192	171,4188	25,5436	660,2024	537,0678
Mittelwert 1.-5.Wert		194,1002	225,4478	136,977	21,9092	542,7766	343,1274
Differenz		177,593	166,9714	34,4418	3,6344	117,4258	193,9404
		Bone 25	Bone 26	Bone 27	Bone 28	Bone 29	Bone 30
Mittelwert 22.-26.Wert		394,1895	168,365	255,1135	615,9695	479,3655	412,7015
Mittelwert 1.-5.Wert		294,406667	137,68	131,862667	407,775	405,058667	321,181
Differenz		99,7828333	30,685	123,250833	208,1945	74,3068333	91,5205

Tab. 5-3 Differenzen der Mittelwerte der Steifigkeiten der Knochenproben

Im Anschluss erfolgt eine tabellarische Zuordnung zu Person (0 = weiblich, 1 = männlich) und die für die nichtparametrischen Tests notwendige Rangreihe wird gebildet:

Bone	Gruppe	Differenzen	Person	Rang
1	I	74,443	0	15
2	I	42,1642	0	8
3	I	-5,2068	0	2
4	I	76,0638	1	16
5	I	68,3382	1	13
6	I	67,6784	1	12
7	II	56,1594	0	10
8	II	-50,9474	0	1
9	II	9,5068	0	4
10	II	63,9952	1	11
11	II	81,3904	1	17
12	II	23,2336	1	5
13	III	52,1748	0	9
14	III	110,5038	0	20
15	III	115,55	0	21
16	III	154,7066	1	24
17	III	286,9722	1	30
18	III	177,5816	1	26
19	IV	177,593	0	27
20	IV	166,9714	0	25
21	IV	34,4418	0	7
22	IV	3,6344	1	3
23	IV	117,4258	1	22
24	IV	193,9404	1	28
25	V	99,7828333	0	19
26	V	30,685	0	6
27	V	123,250833	0	23
28	V	208,1945	1	29
29	V	74,3068333	1	14
30	V	91,5205	1	18

Tab. 5-4 Rangreihe der Differenzen der Knochenproben



## 5.11.2 Explorative Datenanalyse

Es folgt die explorative Datenanalyse und die Darstellung der dazugehörigen Boxplots:

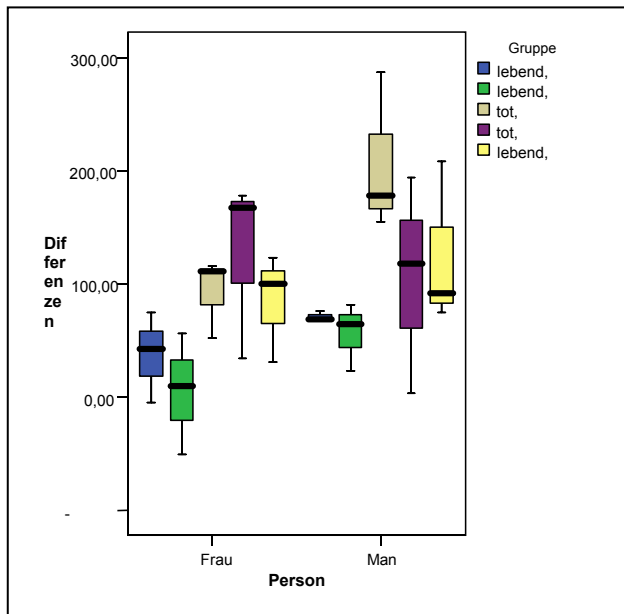


Abbildung 5-12 Boxplot

In dieser Abbildung sind die Differenzen von Frau und Mann, getrennt nach den jeweiligen Gruppen in Boxplots dargestellt.

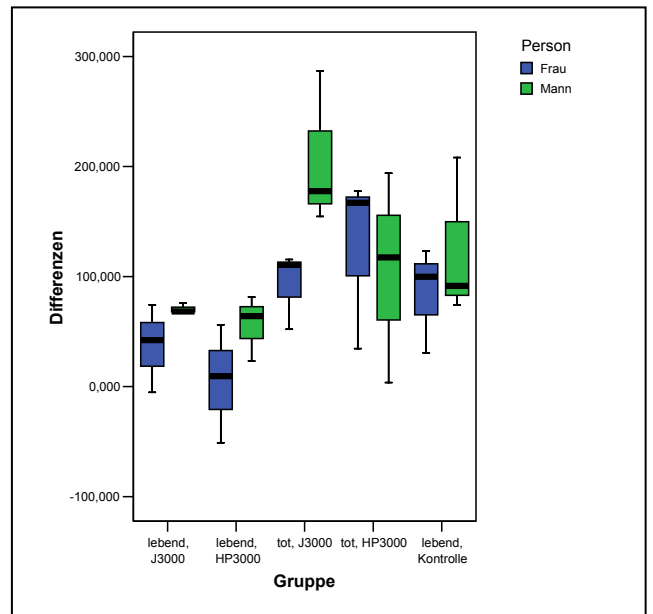
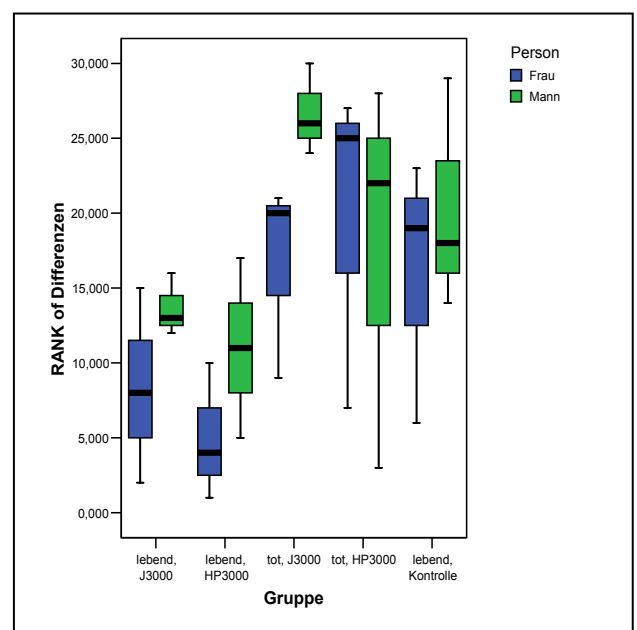


Abbildung 5-13 Boxplot

In dieser Abbildung sind die Differenzen der jeweiligen Gruppen, getrennt nach Frau und Mann in Boxplots dargestellt.

Abbildung 5-14 Boxplot

Analog zur vorherigen Abbildung werden hier die Ränge der Differenzen der jeweiligen Gruppen, getrennt nach Frau und Mann in Boxplots dargestellt. Basis für diese Abbildung sind nicht mehr die Absolutwerte der Differenzen, sondern deren Rang in der gebildeten Rangreihenfolge. (vgl. S.68)



### 5.11.3 Globaltests

Nach der explorativen Datenanalyse werden Globaltests durchgeführt, um den Einfluss der Größen: Gruppe, Person, Differenzen untereinander beurteilen zu können. Es muss zunächst geklärt werden, ob die Zugehörigkeit zu einer Gruppe Einfluss auf die Steifigkeitsänderung hat, oder ob die Einteilung in lebend und tote Knochenproben ohne Einfluss ist. Außerdem soll der Einfluss des Faktors Person, welcher die Differenzierung männliche und weibliche Knochenprobe beinhaltet, auf die Steifigkeitsänderung geklärt werden.

#### I. ANOVA oneway

Mit dem Wissen um die nicht vorhandene Normalverteilung der Daten wird unter der Annahme der Normalverteilung der Daten der ANOVA Test durchgeführt.

Die Personeneffekte werden in diesem Test nicht berücksichtigt.

Variable: Differenzen

Faktor: Gruppe

Nullhypothese: Die Mittelwerte der Differenzen der Gruppen I – V unterscheiden nicht von einander.

#### ONEWAY ANOVA

Differenzen

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	55527.908	4	13881.977	3.552	.020
Innerhalb der Gruppen	97700.667	25	3908.027		
Gesamt	153228.575	29			

**Tab. 5-5 Oneway ANOVA**

$$p = 0,020 < 0,05$$

Die Nullhypothese kann zum Konfidenzniveau von 95% verworfen werden.

#### **Ergebnis ANOVA oneway:**

Es gibt mindestens zwei Gruppen deren Mittelwerte der Differenzen unterschiedlich sind, d.h. nicht alle Gruppen haben den gleichen Mittelwert.

## II. Univariate Varianzanalyse (allgemeines lineares Modell)

Feste Faktoren: Gruppe (fünffach abgestuft)  
 Person (zweifach abgestuft)

Abhängige Variable: Differenzen

Nullhypothese: Die Faktoren Person und Gruppe haben keinen Einfluss auf die Differenzen.

**Zwischensubjektfaktoren**

	Wertelabel	N
Gruppe	1 lebend, J3000	6
	2 lebend, HP3000	6
	3 tot, J3000	6
	4 tot, HP3000	6
	5 lebend, Kontrolle	6
Person	0 Frau	15
	1 Mann	15

**Tab. 5-6 Univariate Varianzanalyse - Zwischensubjektfaktoren**

**Tests der Zwischensubjekteffekte**

Abhängige Variable: Differenzen

Quelle	Quadratsumme vom Typ III	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Korrigiertes Modell	83643.583	9	9293.731	2.671	.032
Konstanter Term	247712.547	1	247712.547	71.197	.000
Gruppe	55527.908	4	13881.977	3.990	.015
Person	14166.211	1	14166.211	4.072	.057
Gruppe * Person	13949.464	4	3487.366	1.002	.430
Fehler	69584.992	20	3479.250		
Gesamt	400941.122	30			
Korrigierte Gesamtvariation	153228.575	29			

**Tab. 5-7 Univariate Varianzanalyse – Tests der Zwischensubjekteffekte**

- a)  $p_{\text{Gruppe}} = 0,015 < 0,05$   
Die Nullhypothese kann zum Konfidenzniveau von 95% verworfen werden.
- b)  $p_{\text{Person}} = 0,057 > 0,05$   
Die Nullhypothese kann zum Konfidenzniveau von 95% nicht verworfen werden.
- c)  $p_{\text{Gruppe*Person}} = 0,43 > 0,05$   
Die Nullhypothese kann zum Konfidenzniveau von 95% nicht verworfen werden.

### **Ergebnis der Univariaten Varianzanalyse:**

- a) Ein signifikanter Einfluss des Faktors Gruppe auf die Differenzen kann nachgewiesen werden. Der Faktor „Gruppe“ ist die Qualität (lebend/tot) und das applizierte Signal der Gruppe. Diese Eigenschaften haben einen signifikanten Einfluss auf die Differenzen der Steifigkeiten. Würde es kein signifikanten Einfluss des Faktors Gruppe auf die Differenzen geben, dann wäre eine Unterteilung in Gruppen nicht erforderlich und es würde keinen Unterschied zwischen lebend und toten Knochenproben bezüglich ihrer Steifigkeitsänderungen geben.
- b) Der Faktor Person hat tendenziell einen Einfluss auf die Differenzen, er erreicht jedoch keine Signifikanz zum 95%-Niveau. Der Faktor „Person“ beschreibt die Eigenschaft männlich und weiblich. Da diese geschlechtliche Zuordnung nur tendenziell einen Einfluss auf die Differenzen hat, dieser jedoch nicht signifikant ist, wird in der weiteren Datenauswertung auf eine Unterteilung in männlich und weiblich innerhalb einer Gruppe verzichtet.
- c) Für die Wechselwirkung zwischen Person und Gruppe kann kein signifikanter Einfluss auf die Differenzen nachgewiesen werden, d.h. die Zugehörigkeit einer weiblichen oder männlichen Probe zu einer bestimmten Gruppe hat keinen Einfluss auf die Differenzen. Damit wird die o.g. Aufhebung der Unterteilung in männlich und weiblich innerhalb einer Gruppe bestätigt.

## III. Kruskal – Wallis –Test

Testvariable: Differenzen

Gruppenvariable: Gruppe

Nullhypothese: Die Differenzen der Gruppen I – V unterscheiden sich nicht von einander.

## Ränge

	Gruppe	N	Mittlerer Rang
Differenzen	lebend, J3000	6	11.00
	lebend, HP3000	6	8.00
	tot, J3000	6	21.67
	tot, HP3000	6	18.67
	lebend, Kontrolle	6	18.17
	Gesamt	30	

Tab. 5-8 Kruskal – Wallis –Test, Ränge

## Statistik für Test

			Differenzen
Chi-Quadrat			10.194
df			4
Asymptotische Signifikanz			.037
Monte-Carlo-Signifikanz	Signifikanz		.025
	99%-Konfidenzintervall	Untergrenze	.021
		Obergrenze	.029

Tab. 5-9 Kruskal – Wallis - Test

$$p = 0.037 < 0,05$$

Die Nullhypothese kann zum Konfidenzniveau von 95% verworfen werden.

**Ergebnis Kruskal – Wallis –Test:**

Es kann ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der Differenzen nachgewiesen werden.

## IV. ANOVA oneway

Mit dem Wissen um die nicht vorhandene Normalverteilung der Daten wird unter der Annahme der Normalverteilung der Daten der ANOVA Test durchgeführt.

Die Gruppeneffekte werden in diesem Test nicht berücksichtigt.

Variable: Differenzen

Faktor: Person

Nullhypothese: Die Differenzen der zwei Personentypen unterscheiden sich nicht.

**ONEWAY ANOVA**

Differenzen

	Quadratsumme	df	Mittel der Quadrate	F	Signifikanz
Zwischen den Gruppen	14166.211	1	14166.211	2.852	.102
Innerhalb der Gruppen	139062.364	28	4966.513		
Gesamt	153228.575	29			

**Tab. 5-10 Oneway ANOVA**

$$p = 0,102 > 0,05$$

Die Nullhypothese kann zum Konfidenzniveau von 95% nicht verworfen werden.

**Ergebnis ANOVA oneway:**

Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Differenzen der beiden Personentypen nachgewiesen werden, d.h. es gibt keinen Unterschied zwischen den Steifigkeitsänderungen der männlichen und weiblichen Knochenproben.

## V. Mann-Whitney-Test

Testvariable: Differenzen

Gruppenvariable: Person

Nullhypothese: Die Differenzen der zwei Personentypen unterscheiden sich nicht.

**Ränge**

	Person	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Differenze	Frau	15	13.13	197.00
n	Mann	15	17.87	268.00
	Gesamt	30		

Tab. 5-11 Mann - Whitney –Test, Ränge

**Statistik für Test**

	Differenzen
Mann-Whitney-U	77.000
Wilcoxon-W	197.000
Z	-1.472
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	.141
Exakte Signifikanz [2*(1- seitig Sig.)]	.148
Exakte Signifikanz (2- seitig)	.148
Exakte Signifikanz (1- seitig)	.074
Punkt-Wahrscheinlichkeit	.006

Tab. 5-12 Mann – Whitney – Test

p = 0,148 &gt; 0,05

Die Nullhypothese kann zum Konfidenzniveau von 95% nicht verworfen werden.

**Ergebnis Mann-Whitney-Test:**

Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Differenzen der beiden Personentypen nachgewiesen werden, d.h. auch mit diesem Test ist kein Unterschied zwischen den Steifigkeitsänderungen der männlichen und weiblichen Knochenproben nachweisbar.

**Zusammenfassung Globaltests I.–V.:**

I. ANOVA oneway

Ein signifikanter Unterschied bezüglich der Differenzen der einzelnen Gruppen kann nachgewiesen werden.

II. Univariate Varianzanalyse (allgemeines lineares Modell)

Ein signifikanter Einfluss des Faktors Gruppe auf die Differenzen kann nachgewiesen werden.

Der Faktor Person hat tendenziell einen Einfluss auf die Differenzen, er erreicht jedoch keine Signifikanz.

Für die Wechselwirkung zwischen Person und Gruppe (die Zugehörigkeit einer Person zu einer bestimmten Gruppe) kann kein signifikanter Einfluss auf die Differenzen nachgewiesen werden. (vgl. S. 75)

III. Kruskal – Wallis –Test

Es kann ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich der Differenzen nachgewiesen werden

IV. ANOVA oneway

Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Differenzen der zwei Personentypen nachgewiesen werden.

V. Mann-Whitney-Test

Es kann kein signifikanter Unterschied zwischen den Differenzen der zwei Personentypen nachgewiesen werden.

Mit den unter I., II. und III. aufgeführten Test konnte somit belegt werden, dass sich die einzelnen Gruppen bzgl. ihrer Differenzen unterscheiden, d.h. die Unterteilung in lebend



und tote Knochenprobe, sowie die verschiedenen Belastungssignale führen zu signifikant verschiedenen Steifigkeitsänderungen. Eine weiterführende Auswertung wie in 5.11.4 durchgeführt ist somit zulässig. Ein signifikanter Unterschied der Steifigkeitsänderungen in Abhängigkeit vom Faktor Personen (männlich, weiblich) kann mit den unter II., IV. und V. aufgeführten Tests nicht nachgewiesen werden. Es ist somit belegt, dass die Steifigkeitsänderungen geschlechtsunabhängig sind. Auf eine weitere Differenzierung zwischen männlich und weiblich wird deshalb im Folgenden verzichtet.

## 5.11.4 Mann-Whitney-Test

Im Anschluss werden mit dem Mann-Whitney-Test die einzelnen Gruppen bezüglich ihrer Differenzen untereinander gegeneinander getestet.

A.

Testvariable: Differenzen

Gruppenvariable: Lebend 3000, Lebend 3000 highpass

Nullhypothese: Die Gruppen I ( lebend 3000) und II(lebend 3000 highpass) unterscheiden sich nicht bezüglich der Differenzen.

**Ränge**

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Differenzen	lebend, J3000	6	7.50	45.00
	lebend, HP3000	6	5.50	33.00
	Gesamt	12		

**Tab. 5-13 Mann-Whitney-Test, Ränge; Differenzen; lebend 3000 – lebend 3000 highpass**

**Statistik für Test**

	Differenzen
Mann-Whitney-U	12.000
Wilcoxon-W	33.000
Z	-.961
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	.337
Exakte Signifikanz [2*(1- seitig Sig.)]	.394
Exakte Signifikanz (2- seitig)	.394
Exakte Signifikanz (1- seitig)	.197
Punkt-Wahrscheinlichkeit	.042

**Tab. 5-14 Mann-Whitney-Test, Differenzen; lebend 3000 – lebend 3000 highpass**

$p = 0,394 > 0,05$

Die Nullhypothese kann zum Konfidenzniveau von 95% nicht verworfen werden.

Ergebnis:

Es kann **kein** signifikanter Unterschied zwischen den Differenzen der Gruppe I und II nachgewiesen werden. Somit ist für die lebenden Knochenproben kein Unterschied zwischen den Belastungssignalen nachweisbar. Das „Jumping“- Signal und das hochpassgefilterte „Jumping“ – Signal führen zu Steifigkeitsänderungen, die sich nicht signifikant voneinander unterscheiden. Auf eine Differenzierung der lebenden Gruppen I und II bezüglich ihres Belastungssignals wird deshalb im Folgenden verzichtet.

### **B.**

Testvariable: Differenzen

Gruppenvariable: tot J3000, tot J3000 highpass

Nullhypothese: Die Gruppen III (tot J3000) und IV (tot J3000 highpass) unterscheiden sich bezüglich der Differenzen nicht.

#### **Ränge**

	Gruppe	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Differenzen	tot, J3000	6	6.67	40.00
	tot, HP3000	6	6.33	38.00
	Gesamt	12		

**Tab. 5-15 Mann-Whitney-Test, Ränge; Differenzen; tot J3000 – J3000 highpass**

#### **Statistik für Test**

	Differenzen
Mann-Whitney-U	17.000
Wilcoxon-W	38.000
Z	-.160
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	.873
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	.937
Exakte Signifikanz (2-seitig)	.937
Exakte Signifikanz (1-seitig)	.469
Punkt-Wahrscheinlichkeit	.060

**Tab. 5-16 Mann-Whitney-Test; Differenzen; tot J3000 – J3000 highpass**

$p = 0,937 > 0,05$

Die Nullhypothese kann zum Konfidenzniveau von 95% nicht verworfen werden.

Ergebnis:

Es kann **kein** signifikanter Unterschied zwischen den Differenzen der Gruppe III und IV nachgewiesen werden. Es findet sich somit, wie bei Test A, eine Steifigkeitsänderung unabhängig von einer Filterung des Signals statt. Auf eine Differenzierung der toten Gruppen III und IV bezüglich ihres Belastungssignals wird deshalb im Folgenden verzichtet.

Aus der Erkenntnis, dass zwischen beiden lebenden Gruppen und beiden toten Gruppen trotz unterschiedlichem Belastungssignal kein signifikanter Unterschied der Steifigkeitsänderungen nachweisbar ist, werden diese jeweils zu einer Gruppe zusammengefasst und im Folgenden mit – **lebend** – bzw. - **tot** - bezeichnet.

**C.**

Testvariable: Differenzen

Gruppenvariable: lebend, tot

Nullhypothese: Die Gruppen *lebend* und *tot* unterscheiden sich nicht bezüglich der Differenzen.

**Ränge**

	Neu	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Differenze	lebend	12	8.58	103.00
n	tot	12	16.42	197.00
	Gesamt	24		

**Tab. 5-17 Mann-Whitney-Test, Ränge; Differenzen; lebend – tot**

**Statistik für Test**

	Differenzen
Mann-Whitney-U	25.000
Wilcoxon-W	103.000
Z	-2.714
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	.007
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	.006
Exakte Signifikanz (2-seitig)	.006
Exakte Signifikanz (1-seitig)	.003
Punkt-Wahrscheinlichkeit	.001

**Tab. 5-18 Mann-Whitney-Test; Differenzen; lebend – tot**

$p = 0,006 < 0,05$

Die Nullhypothese kann zum Konfidenzniveau von 95% verworfen werden.

Ergebnis:

Es kann ein signifikanter Unterschied zwischen den Differenzen der Gruppe *lebend* und der Gruppe *tot* nachgewiesen werden. Die Unterteilung in lebend und tot ist somit für signifikante Unterschiede in der Steifigkeitsänderung verantwortlich.

**D.**

Testvariable: Differenzen

Gruppenvariable: lebend, Kontrollgruppe

Nullhypothese: Die Gruppe *lebend* und die Kontrollgruppe (V) unterscheiden sich bezüglich der Differenzen nicht.

**Ränge**

	Neu	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Differenzen	lebend	12	7.42	89.00
	Kontrolle	6	13.67	82.00
	Gesamt	18		

**Tab. 5-19 Mann-Whitney-Test, Ränge; Differenzen; lebend – Kontrollgruppe**

**Statistik für Test**

	Differenzen
Mann-Whitney-U	11.000
Wilcoxon-W	89.000
Z	-2.341
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	.019
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	.018
Exakte Signifikanz (2-seitig)	.018
Exakte Signifikanz (1-seitig)	.009
Punkt-Wahrscheinlichkeit	.002

**Tab. 5-20 Mann-Whitney-Test; Differenzen; lebend – Kontrollgruppe**

$p = 0,018 < 0,05$

Die Nullhypothese kann zum Konfidenzniveau von 95% verworfen werden.

Ergebnis:

Es kann ein signifikanter Unterschied zwischen den Differenzen der Gruppe *lebend* und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Somit ist ein Unterschied der Steifigkeitsänderung der *lebenden* Knochen im Vergleich zur Kontrollgruppe, hervorgerufen durch das Belastungssignal, belegt.

**E.**

Testvariable: Differenzen

Gruppenvariable: tot, Kontrollgruppe

Nullhypothese: Die Gruppe *tot* und die Kontrollgruppe (V) unterscheiden sich bezüglich der Differenzen nicht.

**Ränge**

	Neu	N	Mittlerer Rang	Rangsumme
Differenzen	tot	12	10.25	123.00
	Kontrolle	6	8.00	48.00
	Gesamt	18		

**Tab. 5-21 Mann-Whitney-Test, Ränge; Differenzen; tot – Kontrollgruppe**

**Statistik für Test**

	Differenzen
Mann-Whitney-U	27.000
Wilcoxon-W	48.000
Z	-.843
Asymptotische Signifikanz (2-seitig)	.399
Exakte Signifikanz [2*(1-seitig Sig.)]	.437
<b>Exakte Signifikanz (2-seitig)</b>	<b>.437</b>
Exakte Signifikanz (1-seitig)	.219
Punkt-Wahrscheinlichkeit	.026

**Tab. 5-22 Mann-Whitney-Test; Differenzen; tot – Kontrollgruppe**

$p = 0,437 > 0,05$

Die Nullhypothese kann zum Konfidenzniveau von 95% nicht verworfen werden.

Ergebnis:

Es kann **kein** signifikanter Unterschied zwischen den Differenzen der Gruppe *tot* und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Steifigkeitsänderungen in der Gruppe *tot* und in der Kontrollgruppe unterscheiden sich nicht.

**Zusammenfassung A.-E.:**

Testvariable	Test	Gruppenvariable		p
Differenzen	A	lebend J3000	lebend J3000 hp	0,394
	B	tot J300	tot J3000 hp	0,937
	C	lebend	tot	<b>0,006</b>
	D	lebend	Kontrolle	<b>0,018</b>
	E	tot	Kontrolle	0,437

**Tab. 5-23 Zusammenfassung Mann-Whitney-Test; Differenzen; Gruppenvariable; p-Wert**

Mit Hilfe der unter A und B aufgeführten Mann-Whitney-Tests konnte nachgewiesen werden, dass es keinen signifikanten Unterschied der Steifigkeitsänderungen in Abhängigkeit vom Belastungssignal gibt. Sowohl in den Versuchgruppen mit lebenden Knochenproben (Gruppe I und II), als auch in den Versuchgruppen mit den toten Knochenproben (Gruppe III und IV) gab es keine Unterschied in den Steifigkeitsänderungen obwohl jeweils zwei verschiedene Belastungssignale („Jumping“ und „Jumping highpass“) appliziert wurden. Beide Belastungssignale führen somit in den Knochenproben zu einer gleich starken Reizantwort (Steifigkeitsänderung). Dies bestätigt die Annahme, dass allein die höherfrequenten Spektralanteile eines dynamischen Stimulationssignals (hier am Beispiel von „Jumping“) können bone-remodeling auslösen.

Mit dem Test C konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den lebenden und toten Knochenproben bezüglich ihrer Steifigkeitsänderungen nachgewiesen werden. Dies erscheint zunächst trivial, da eine tote Knochenprobe keine zelluläre Antwort in Form einer Steifigkeitszunahme liefern kann. Es ist jedoch der umgekehrte Sachverhalt, der zu diesem Ergebnis führt. Wie bereits in Abbildung 5-8 in Form von Differenzen der Mittelwerte der Steifigkeiten der ersten und letzten fünf Messtage abgebildet, sind die Steifigkeitszunahme (Differenzen) in der subsummierten Gruppe *tot* größer als in der subsummierten Gruppe *lebend*.



Mit dem Test D konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den lebenden Knochenproben und den Knochenproben der Kontrollgruppe bezüglich ihrer Steifigkeitsänderungen nachgewiesen werden. Dieser beruht jedoch ebenfalls auf einer größeren Steifigkeitszunahme der Kontrollgruppe im Vergleich zur subsummierten Gruppe *lebend*.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den toten Knochenproben und der Kontrollgruppe konnte mit dem Test E nicht nachgewiesen werden. Die Knochenproben dieser Gruppen unterscheiden sich nicht in ihrer Steifigkeitsänderung.

## 6 Diskussion

In diesem Experiment ist es gelungen 30 Knochenproben über einen Zeitraum von 29 Tagen im Zetos-System zu kultivieren. Es gab keinen Ausfall einer Knochenprobe aufgrund von Infektion oder Absterben. Die Vitalität und Aktivität der lebenden Knochenproben konnte über den gesamten Versuchszeitraum mittels der verwendeten Stoffwechsellmarker – Alkalische Phosphatase, Laktat, Laktatdehydrogenase und pH- Wert – dokumentiert werden. Für die abgetöteten Knochenproben des Experimentes konnten die Avitalität und die nicht mehr vorhandene Stoffwechselaktivität mit den o.g. Stoffwechsellmarkern belegt werden.

Ziel der angefertigten Arbeit war es unter anderem herauszufinden, ob es einen Unterschied in der Steifigkeitsänderung, hervorgerufen durch die Applikation eines Belastungssignals, zwischen männlichen und weiblichen Knochenproben gibt. Mittels statistischer Auswertung der gemessenen Steifigkeitsänderungen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Knochenproben nachgewiesen werden. Außerdem war dieser Nachweis unabhängig von den verschiedenen applizierten Belastungssignalen und vom Zustand der Knochenproben – lebend oder tot. Erwartet hätte man eigentlich einen Unterschied, basierend auf einer geringeren Steifigkeitsänderung der weiblichen Knochenproben (74 Jahre alt), hervorgerufen durch eine geringe trabekuläre Knochendichte des älteren weiblichen Knochens, wie von KHOSLA und RIGGS beschrieben [117, 118]. Für Folgeexperimente wäre eine Knochendichtemessung der Proben vor dem Einbau in das Zetos-System und nach Beendigung des Experimentes empfehlenswert; im Idealfall in Kombination mit einer computertomographischen Untersuchung zum anschließendem Vergleich der trabekulären Strukturen.

Außerdem wurden im Experiment zwei verschiedene Belastungssignale appliziert, zum einen das s.g. Jumping-Signal, welches dem physiologischen Springen entspricht, und zum anderen die hochpassgefilterte Variation des Jumping-Signals. In einem vorangegangenen Experiment, welches in der Arbeitsgruppe Professor Jones von Dr. rer. nat. Bröckmann im Rahmen seiner Dissertation mit denselben Belastungssignalen durchgeführt wurde, fand sich kein Unterschied zwischen den Belastungssignalen. Diese Ergebnisse konnten mit der statistischen Auswertung der Steifigkeitsänderungen dieses Experimentes bestätigt werden. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen dem „nativen“ und dem „hochpass“-

gefilterten Signal bezüglich ihrer Reizantwort, gemessen in der Steifigkeitsänderung der Knochenproben, nachweisbar. Somit ist weiterhin davon auszugehen, dass allein die höherfrequenten Spektralanteile eines dynamischen Stimulationssignals bone-remodeling auslösen können. Für folgende Experimente wäre der Nachweis dieses Effektes bei anderen Belastungssignalen denkbar.

Unabhängig von der Art des Belastungssignals erbrachte die statistische Auswertung der Steifigkeitsänderung als weiteres Ergebnis einen Unterschied zwischen den Gruppen *lebend* und *tot*, hervorgerufen durch eine größere Steifigkeitsänderung in der Gruppe *tot*. Hierfür gibt es folgende mögliche Erklärungen:

Die Zellen der Knochenproben der Gruppe *tot* waren auch nach mehrtägiger Perfusion mit KCl-Lösung noch vital und somit zur beschriebenen Steifigkeitszunahme fähig. Mit den im Kapitel Ergebnis dargestellten Parametern konnte jedoch für die Gruppe *tot* (Gruppe III und IV) **keine** Osteoblastenaktivität (alkalische Phosphatase), **keine** Stoffwechselaktivität (Laktat), **keine** Hemmung der Osteoklastengengese (OPG) und **keine** Resorptionsaktivität (Cathepsin K) nachgewiesen werden. Eine Steifigkeitszunahme aufgrund von Vitalität ist somit ausgeschlossen.

Eine weitere mögliche Erklärung ist eine Steifigkeitszunahme der Gruppe *tot*, hervorgerufen durch eine Anlagerung von Calciumionen aus dem Nährmedium an die Oberfläche des spongiösen Knochenmaterials. Ein Nachweis hierfür wäre eine Calciumbestimmung im Nährmedium vor und nach dem Einsatz im Zetos-System. Man würde dann im verbrauchten Nährmedium eine geringe Calciumkonzentration erwarten und ggf. weitere Untersuchungen anschließen, wie z.B. die histologische Aufarbeitung.

Die Zellen der Knochenproben der Gruppe *tot* waren avital und aufgrund der mechanischen Belastung kam es zu Frakturen in der trabekulären Struktur der spongiösen Knochenzylinder und bei fehlenden Reparaturmechanismen somit zu einer fortschreitenden Kompression und Steifigkeitszunahme (vergleichbar mit einem Strohhaufen und einem gepressten Strohhallen). Die Steifigkeitszunahme in der Gruppe *tot* ist also nicht als biologische Antwort im Sinne von bone-remodeling auf das Belastungssignal zu verstehen, sondern als ein mechanischer Vorgang bei dem die Kompression des Knochens eine Zunahme der Steifigkeit zur Folge hatte. In der orthopädischen und unfallchirurgischen Klinik findet sich eine solche Kompression z.B. bei osteoporotischen Sinterungsfrakturen im Bereich der Wirbelsäule. Für einen Nachweis der Kompression der Knochenproben wäre eine exakte Höhenmessung oder eine

computertomographische Untersuchung der Knochenzylinder zu Beginn und nach Beendigung des Experimentes nötig.

Auch im Vergleich der subsummierten Gruppe *lebend* mit der Kontrollgruppe zeigt einen signifikanten Unterschied, jedoch basierend auf einer größeren Steifigkeitsänderung in der Kontrollgruppe. Zur Erklärung dieses Ergebnisses ergeben sich folgende Möglichkeiten: Allein die durch die Steifigkeitsmessung applizierte Kraft auf die Knochenzylinder der Kontrollgruppe ruft eine zelluläre Reaktion im Sinne einer Osteoblastenaktivierung und eine daraus resultierende Steifigkeitszunahme hervor. Eine Stimulation der Knochenaktivität aufgrund der durchgeführten Steifigkeitsmessungen wurde bereits in vorangegangenen Experimenten diskutiert, daraufhin wurde die Messprozedur des Zetos elektrotechnisch so optimiert, dass eine Stimulation weitestgehend auszuschließen ist.

Aufgrund fehlender täglicher Belastung in der Kontrollgruppe kommt es zum Überwiegen der osteoklastischen Aktivität im Knochen und somit zur erhöhten Fragilität, was sich sekundär durch eine erhöhte Komprimierbarkeit und somit in größeren Steifigkeitszunahmen äußert [78]. Ein Überwiegen der osteoklastischen Aktivität konnte jedoch durch die Bestimmung des Cathepsin K, des Osteocalcins und des Osteoprotegerins ausgeschlossen werden.

Die Nährmediumsrezeptur verursacht aufgrund ihres Fructoseanteils potenziell eine vermehrte Osteoblastenaktivität in der Kontrollgruppe, auch ohne Applikation von Belastungssignalen. Hierfür wurde ein weiteres Experiment durchgeführt, in dem sechs Knochenzylinder mit einem fructosefreien Medium und sechs Knochenzylinder einem fructosehaltigen Medium perfundiert wurden. Es erfolgte keine Stimulation der Knochenproben, es wurden nur Steifigkeitsmessungen durchgeführt. Eine anabole Wirkung des Mediums mit Fructose war nicht eindeutig nachweisbar.

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist eine Überlastung der Gruppe *lebend* mit dem Belastungssignal und daraus resultierenden Mikrofrakturen, sodass das mögliche „remodeling-Potenzial“ durch die erforderlichen Reparationsvorgänge aufgebraucht wird und somit eine geringere Steifigkeitsänderung resultiert.

Im weiteren Vergleich der Steifigkeitsänderungen der Knochenproben kann kein signifikanter Unterschied zwischen der subsummierten Gruppe *tot* und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Es zeigt sich also ein ähnliches Verhalten zwischen belasteten toten Knochenproben (Gruppe III und IV) und nicht belasteten lebenden Knochenproben

(Kontrollgruppe). Wie bereits oben beschrieben gibt es verschiedene mögliche Erklärungen für die Steifigkeitszunahmen in diesen Gruppen. Für die Gruppe tot ist eine Steifigkeitszunahme aufgrund von progredienter Kompression sehr wahrscheinlich. Für die Kontrollgruppe ist eine Stimulation allein durch die Steifigkeitsmessungen nicht auszuschließen. Eine Bestätigung oder Verwerfung der möglichen Erklärungen ist nur durch weitere Experimente möglich, da es noch keine vergleichbaren Studien mit dem Zetos-System gibt.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die exemplarische Visualisierung des Knochenwachstums mittels der polychromen Sequenzmarkierung. In der histologischen Aufarbeitung der Knochenproben konnte in einigen angefertigten Schnitten eine so genannte *Doppelbande* dargestellt werden. Im Rahmen der durchgeführten Analyse der Stoffwechsellmarker zeigte sich ein kurzfristiges Absinken der Konzentration des Laktats, jeweils nach Zugabe der Farbstoffe (Calcein 9. Tag, Alizarin 20.Tag). Es lässt sich bei den verwendeten Konzentration der Farbstoffe (Calcein 30 $\mu$ g/ml; Alizarin 45  $\mu$ g/l) ein zumindest stoffwechselsuppressiver Effekt in diesem Experiment vermuten. GELSLEICHTER konnte eine toxische Wirkung von Calcein in Abhängigkeit von der Dosis im Versuch mit dem Atlantischen Ammenhai belegen [119]. MORAN hingegen konnte in einer Studie mit Gastropoden keine toxische oder wachstumshemmende Wirkung von Calcein nachweisen [120]. Da die polychrome Sequenzmarkierung im Experiment, abgesehen von einem vermutlichen gering stoffwechselsuppressiven Effekt, keinen weiteren Einfluss auf den Verlauf hatte, und es nicht zur Abtötung von lebenden Knochenproben kam, ist von einer angemessenen Konzentration und Applikationsdauer der Farbstoffe auszugehen.

Erstmalig wurden in diesem Versuchsaufbau die Knochenstoffwechsellmarker Osteoprotegerin, Cathepsin K und Osteocalcin verwendet und konnten in allen getesteten lebenden Knochenproben (Gruppe I, II und Kontrollgruppe) nachgewiesen werden. In den abgetöteten Knochenproben war Osteocalcin nachweisbar, Osteoprotegerin und Cathepsin K waren nicht nachweisbar.

Den größten Anstieg der Osteoprotegerinkonzentration und somit die größte Osteoklastengenesehemmung fand sich in der Gruppe, in der das hochpass gefilterte Belastungssignal appliziert wurde. Die gewonnenen Daten deuten daraufhin, dass das hochpass gefilterte Sprungsignal (Gruppe II) zu einer stärkeren Osteoprotegerinproduktion

und somit zur stärkeren Hemmung der Osteoklastengnese führt als das ungefilterte Sprungsignal. Durch die Konzentrationsbestimmung des Cathepsin- K in der Gruppe II, welche im Verlauf des Experimentes keine Zunahme zeigte, konnte diese Osteoklastenhemmung belegt werden.

In der Gruppe I (ungefiltertes Belastungssignal) und der Kontrollgruppe finden sich für Osteoprotegerin und für Cathepsin K Konzentrationsanstiege im Verlauf des Experimentes, welche den Vorgang des belastungsinduzierten bone-remodeling gut beschreiben. Die Hemmung der Osteoklastengnese durch von Osteoblasten produziertes Osteoprotegerin und gleichzeitig Nachweis osteoklastischer Aktivität mittels Cathepsin K. Die erstmalig verwendeten Knochenstoffwechselmarker Osteoprotegerin und Cathepsin K sind somit geeignet, um belastungsinduzierte bone-remodeling im Zetos-System zu belegen.

Das neu verwendete, und in allen Gruppen nachweisbare, Osteocalcin scheint für den Nachweis osteoblastischer Aktivität in diesem Experiment nur bedingt geeignet, da auch in den toten Knochenproben Konzentrationen oberhalb der Nullprobe nachweisbar waren. Es handelt sich dabei aber vermutlich um Osteocalcinfragmente, die aus abgestorbener Knochenmatrix frei werden. Eine osteoblastische Aktivität der toten Knochenproben konnte mittels Bestimmung der Alkalischen Phosphatase sicher ausgeschlossen werden. Für nachfolgende Experimente zum belastungsinduzierten bone-remodeling im Zetos-System scheint zur Bestimmung der Osteoblastenaktivität die Alkalische Phosphatase zu genügen.

Im Hinblick auf die Frage nach dem Zeitpunkt der Bestimmung der Knochenstoffwechselmarker erscheinen Messungen vor dem 9. Tag des Experimentes aufgrund der starken Streuung der ermittelten Werte, verursacht durch die Präparation der Knochenzylinder, nicht sinnvoll, da diese nicht zu verwertbaren Aussagen führen. Im Verlauf sollte die Bestimmung der Stoffwechselmarker jeweils vor und nach einer polychromen Sequenzmarkierung (falls diese durchgeführt wird) erfolgen, um mögliche stoffwechselsuppressive Effekte aufzudecken.

Mit diesem Experiment wurde somit die Leistungsfähigkeit des ZETOS-Systems demonstriert und hinsichtlich des Unterschiedes zwischen männlichen und weiblichen Knochenproben, der hochpass- und ungefilterten Stimulationsmuster, lebender und abgetöteter Knochenproben sowie der neuen knochenzellspezifischen Marker und deren

Bestimmungszeitpunkte untersucht. Die Grundlage für weiterführende Versuche wurde geschaffen.

## 7 Zusammenfassung

In diesem Versuch wurden 30 trabekuläre, humane Knochenzylinder über einen Zeitraum von 29 Tagen kultiviert und an 26 Tagen belastet. Das Belastungssignal entsprach dem physiologischen Springen und wurde in ungefilterter Form und in gefilterter Form auf die Knochenproben appliziert. Die Knochenzylinder wurden per Randomisierung in 5 Gruppen mit je 6 Proben eingeteilt, mit einer weiteren Unterteilung in jeweils 3 männliche und 3 weibliche Proben. In zwei Gruppen erfolgte die Abtötung der Knochenzylinder mittels KCl-Lösung. Einer Kontrollgruppe wurden 4 Belastungsgruppen mit den Unterteilungen lebend und ungefiltertes Signal, lebend und gefiltertes Signal, tot und ungefiltertes Signal sowie tot und gefiltertes Signal gegenübergestellt. Das Belastungssignal wurde täglich mit 300 Zyklen bei einer Frequenz von 1Hz, mit einer Intensität von  $3000\mu\text{strain}$  auf die Knochenproben appliziert. Nach der eigentlichen Belastung wurde die Steifigkeit (E-Modul) der Knochenzylinder bestimmt. In der Kontrollgruppe wurde diese alle 48 Stunden bestimmt. Bei den regelmäßigen Wechseln des Nährmediums (alle 48 Stunden) wurde dieses sowohl auf Knochenstoffwechselmarker als auch auf knochenzellspezifische Marker untersucht. Die Vitalität und Aktivität der lebenden Knochenproben wurde über den gesamten Versuchszeitraum mittels der verwendeten Stoffwechselmarker – Alkalische Phosphatase, Laktat, Laktatdehydrogenase und pH- Wert – dokumentiert. Für die abgetöteten Knochenproben des Experimentes konnten die Avitalität und die nicht mehr vorhandene Stoffwechselaktivität ebenfalls mit den o.g. Stoffwechselmarkern belegt werden.

Mittels statistischer Auswertung der gemessenen Steifigkeitsänderungen konnte kein signifikanter Unterschied zwischen männlichen und weiblichen Knochenproben nachgewiesen werden, sodass in der weiteren Auswertung auf eine Differenzierung verzichtet wurde. Im Anschluss wurden die Steifigkeitszunahmen der einzelnen Gruppen untereinander verglichen. Hierbei zeigte sich, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen den zwei verschiedenen Belastungssignalen gibt. Ergebnisse aus vorangegangenen Experimenten der Arbeitsgruppe von Professor Jones konnten somit bestätigt werden und es ist weiterhin davon auszugehen, dass im Zetos-System allein die höherfrequenten Spektralanteile eines dynamischen Stimulationssignals (hier am Beispiel von „Jumping“) bone-remodeling auslösen können. Da die Belastungssignale keinen signifikanten Unterschied in der Steifigkeitsänderung erbrachten, erfolgte eine Subsummierung der Gruppen in *lebend* und *tot*. Beim Vergleich der Kontrollgruppe mit



den Gruppen *lebend* und *tot* fanden sich signifikante Unterschiede bezüglich der Steifigkeitsänderungen, jedoch basierend auf den größeren Steifigkeitsänderungen in der Gruppe *tot*. Vermutlich liegt in der Gruppe *tot* eine Steifigkeitsänderung, verursacht durch mechanische Kompression und passive Hyperkalzifizierung vor. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Steifigkeitsänderung der Kontrollgruppe und der Gruppe *tot* konnte nicht nachgewiesen werden. Für die Kontrollgruppe ist eine Steifigkeitszunahme durch die bei der Messprozedur applizierten Kräfte nicht gänzlich auszuschließen. Der nachgewiesene signifikante Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe *lebend* resultiert aus einer größeren Steifigkeitsänderung in der Kontrollgruppe. Eine eindeutige Erklärung dieses Ergebnisses gelingt nicht, sodass zur Klärung weitere Experimente mit dem Zetos-System erforderlich sind. Durch die polychrome Sequenzmarkierung mit Calcein und Alizarin während des Experimentes konnte in der histologischen Aufarbeitung der Knochenproben in einigen angefertigten Schnitten eine sogenannte *Doppelbande* dargestellt und somit der Nachweis für belastungsinduziertes Knochenwachstum erbracht werden. Erstmals wurden in diesem Versuchsaufbau die zellspezifischen Marker Osteoprotegerin und Cathepsin K analysiert, durch die eine belastungsinduzierte Aktivität der Osteoblasten und Osteoklasten in den lebenden Gruppen, nicht aber in den toten Gruppen nachwiesen werden konnte. Die gewonnenen Daten deuten daraufhin, dass das hochpass-gefilterte Sprungsignal zu einer stärkeren Osteoprotegerinproduktion führt als das ungefilterte Sprungsignal. Außerdem wird durch die gemessenen Osteoprotegerin- und Cathepsin-K-Konzentrationen belegt, dass diese Knochenstoffwechselmarker geeignet sind, um bone-remodeling im Zetos-System zu dokumentieren. Mit diesem Experiment wurde somit die Leistungsfähigkeit des ZETOS-Systems demonstriert und hinsichtlich des Unterschiedes zwischen männlichen und weiblichen Knochenproben, der hochpass- und ungefilterten Stimulationsmuster, lebender und abgetöteter Knochenproben sowie der neuen knochenzellspezifischen Marker und deren Bestimmungszeitpunkte untersucht. Die Grundlage für weiterführende Versuche wurde geschaffen.

## 8 Abstract

In this experiment 30 trabecular human bone cores were cultivated over a period of 29 days and loaded during 26 days. The mechanical load-signal corresponded to that of physiological jumping and was applied in a unfiltered as well as filtered form onto the bone samples.

The bone cores were randomly divided into five groups with six samples each and a further subdivision into three male and three female samples. Two groups were terminated using potassium chloride solution. A control-group was contrasted to four load-groups with the following subdivisions: live and unfiltered signal, live and filtered signal, dead and unfiltered signal and dead and filtered signal. The load signal was applied onto the bone samples with 300 cycles, with a frequency of 1 Hz and an intensity of 3000  $\mu$ strain daily. The stiffness (e-module) of each bone core was determined after the actual exposure to the mechanical load while the control-group was only measured every 48 hours.

In addition the cultivating medium was exchanged and analysed to bone metabolism as well as to bone cell-specific markers on a 48hour basis.

Vitality as well as the activity of the live bone samples were documented via the metabolic markers, alkaline phosphatase, lactate, lactate dehydrogenase and pH-value, during the entire experiment period. By means of above mentioned metabolic markers the non-existent metabolic activity and vitality could be substantiated.

The statistical analysis didn't show any discrepancy between male and female samples, therefore sexual-differentiation was discontinued. Afterwards the increase of stiffness among the other groups was compared. As there was no significant difference between the load-signals, the preceding results of Prof. Jones' work groups' experiments were reconfirmed and leads to act on the assumption that in the Zeto-system only the higher frequented spectral components of a dynamic stimulation signal (in this case by the example of "jumping") can trigger bone-remodeling. Based on the fact that there was no deviation as to the increase of stiffness, the groups were subsumed into *alive* and *dead*.

The comparison of the control-groups to those of *alive* and *dead* delivered significant differences in the increase of stiffness, while showing the most excessive within the *dead* group, most likely caused by mechanical compression and passive hyper-calification concerning the latter. A significant difference concerning an increase of stiffness between the **control** and the **dead** group could not be verified. The gain of stiffness in the control group to be caused by the load applied during the measurement procedure cannot be fully

disproved. The verified significant difference between the *control* and the *alive* group results from the larger amount of stiffness found in the *control* group.

Further experiments in the Zetos system are required to establish a definite clarification of this result. Due to the polychrome sequence indication using Calcein and Alizarin, a so called “*Doppelbande*” was detected within some of the bone transections produced, during histological rehabilitation. Hence, this substantiated proof for load induced bone growth.

For the first time the cell specific markers Osteoprotegerin und Cathepsin K were analysed in the setup of this experiment and proved a load induced activity of osteoblasts and osteoclasts in the *alive*, though not in the *dead* groups.

The data gained from this experiment lead to assume that the highpass-filtered jump signal entails an enlarged production of Osteoprotegerin as opposed to the unfiltered jump signal. Furthermore the adequacy of bone metabolism markers, to be efficient to document bone remodeling in the Zetos system, could be supported by the osteoprotegerin and cathepsin-K concentration measured.

Conclusively this experiment surveyed the effectiveness of the Zetos system in regards to the differences between male and female bone samples as well as highpass-filtered and unfiltered stimulation exemplars, alive and dead specimen and moreover the new bonecell specific markers and their term of determination.

Hereby, the basis for further studies has been provided.

## 9 Literaturverzeichnis

- 1 Akhter, M.P., D.M.Cullen, R.R.Recker. *Bone adaptation response to sham and bending stimuli in mice.* J Clin Densitom, 5(2):207-16, 2002
- 2 Arron J.E., Makins N.B., Francis R.M., Peacock M. *Staining of the calcification front in human bone using contrasting fluorochromes in vitro* J Histochemistry and Cytochemistry Vol.32 (12) pp 1251-1261, 1984
- 3 Advani S. *Dexamethasone suppresses in vivo levels of bone collagen synthesis in neonatal mice;* Bone Vol.20 No.1 (1)1997:41-46
- 4 Bernhard M.: *Mit ihm beginnt die eigenständige Orthopädie. Der Arzt Julius Wolff (1836-1902).* Berlinische Monatsschrift, 1997, 2: 79-83
- 5 Blair HC, Teitelbaum SL, *Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump.* Science. 1989 Aug 25;245(4920):855-7.
- 6 Bono C.M., Einhorn T.A. *Overview of osteoporosis: pathophysiology and determinants of bone strength,* Eur Spine J (2003) 12 (Suppl.2):S90-S96
- 7 Borle AB, Nichols N, Nichols G (1960) *Metabolic studies of bone in vitro I. Normal bone.* J Biol Chem 235:1206-1210
- 8 Botchwey EA, Pollack SR, Levine EM, Laurencin CT (2001) *Bone tissue engineering in a rotating bioreactor using a microcarrier matrix system.* J Biomed Mater Res 55: 242-253
- 9 Boyle W.J., *Osteoclast differentiation and activation,* Nature Vol.423, 2003, 337-342
- 10 Bucay N, Sarosi I, Dunstan CR, et al. 1998 *Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification.* Genes Dev. 12:1260–1268
- 11 Burgess TL, Qian Y, *The ligand for osteoprotegerin (OPGL) directly activates mature osteoclasts.* J Cell Biol. 1999 May 3;145(3):527-38
- 12 Chambers T.J., *Regulation of the differentiation and function of osteoclasts,* J Pathol 2000; 192: 4-13.
- 13 Chen JT, Hosoda K, *Serum N-terminal osteocalcin is a good indicator for estimating responders to hormone replacement therapy in postmenopausal women.* J Bone Miner Res. (1996) Nov.;11(11): 1784-92
- 14 Cheng, M.Z., G.Zaman, S.C.Rawlinson, R.F.Suswillo, L.E.Lanyon. *Mechanical loading and sex hormone interactions in organ cultures of rat ulna.* PG – 502- 11. J Bone Miner Res, 11(4), 1996
- 15 Christenson R.H., *Biochemical markers of bone metabolism: an overview,* Clinical Biochemistry, Vol 30, (12) 1997, 573-593

- 16 Cohn DV, Forscher BK (1962): *Aerobic metabolism of glucose by bone*. J Biol Chem 237: 615-618
- 17 Chow, J.W., A.J.Wilson, T.J.Chambers, S.W.Fox. *Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats*. PG – 1760-7. J Bone Miner Res, 13(11), 1998
- 18 Dai R.C. et al., *Microcracks: an alternative index for evaluating bone biomechanical quality*, J Bone Miner Metab (2004) 22: 215-223
- 19 Dallas, S. L., Zaman, G., Pead, M. J., *Early strain-related changes in cultured embryonic chick tibiotarsi parallel those associated with adaptive modeling in vivo*. J. Bone Miner. Res. Vol.8, No.3 (1993) 251–259
- 20 *Datenblatt ALP-Kit*, 1999 - 05, Roche Diagnostics GmbH
- 21 *Datenblatt Laktat-Kit*, 2003 -10, Roche Diagnostics GmbH
- 22 *Datenblatt LDH-Kit*, 2000 - 10, Roche Diagnostics GmbH
- 23 *Datenblatt N-MID Osteocalcin-Kit*, 2003 - 07, Roche Diagnostics GmbH
- 24 Dobnig, H., Turner, R.T., 1995. *Evidence that intermittent treatment with parathyroid hormone increases bone formation in adult rats by activation of bone lining cells*. Endocrinology 136, 3632–3638
- 25 Dodds R.A., *Human Osteoclast Cathepsin K is processed intracellularly prior to attachment and bone resorption*, J Bone and Mineral Research Vol 16. Number 3, 2001
- 26 Doty SB *Morphological evidence of gap junctions between cells*. Calcif Tissue Int 33: 509-512 (1981)
- 27 Dougall, Glaccum, *RANK is essential for osteoclast and lymph node development*, Genes Dev. Vol. 13, No. 18, pp. 2412-2424, September 15, 1999
- 28 Drake F.H., Dodds R.A., *Cathepsin K, but not cathepsins B, L, or S, is abundantly expressed in human osteoclasts*, Journal of biological chemistry (1996) Vol.271, No. 21 pp.12511-12516
- 29 Dunham J. , *Aerobic glycolysis of bone and cartilage: the possible involvement of fatty acid oxidation*, Cell Biochemistry and Function, 1983 Vol. 1 168-172
- 30 El Haj AJ, *Cellular responses to mechanical loading in vitro*, J Bone Miner Res. 1990 Sep;5(9):923-32

- 31 Everts V., *The Bone Lining Cell: Its Role in Cleaning Howship's Lacunae and Initiating Bone Formation*, . J. Bone Miner. Res January 2002, Volume 17, Number 1 - 77
- 32 Felix R., Neumann W.F., Fleisch H., *Aerobic glycolysis in bone: lactic acid production by rat calvaria cells in culture*, Am J Physiol Cell Physiol Vol. 234: C51-C55, 1978
- 33 Felsenreich, *Struktur und Funktion des Knochens*, Pharmazie in unserer Zeit 30.Jahrgang 2001, Nr.6
- 34 Fermor, B., and Skerry, T. M. (1995) *PTH/PTHrP receptor expression on osteoblasts and osteocytes but not resorbing bone surfaces in growing rats*. J. Bone Miner. Res. 10, 1935–1943
- 35 Flanagan B, Nichols G (1964): *Metabolic studies of bone in vitro V. Glucose metabolism and collagen biosynthesis*. J Biol Chem 239:1261-1265
- 36 Fyhrie D.P., Vashishth D. ; *Bone stiffness predicts strength similarly for human vertebral cancellous bone in compression and for cortical bone in tension*, Bone Vol 26 No.2 (2)2000:169-173
- 37 Gerber I., Gwynn I. *Influence of cell isolation, cell culture density, and cell nutrition on differentiation of rat calvarial osteoblast-like cells in vitro*; European Cells and Materials Vol 2. 2001: 10-20
- 38 Good, N.E. et al.: *Hydrogen in buffers and biological research*. Biochemistry ,5. 467-477.1966
- 39 Griffiths,J.B. and Pirt, G.J. : *The uptake of amino acids by mouse cells (strain LS) during growth in batch culture and chemostat culture: the influence of cell growth rate*. Proc. R. Soc. Biol. 168 , 421-438. 1967
- 40 Harter L.V., Hruska K.A., Duncan R.L., *Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormon regulation*, Endocrinology Vol 136 No.2 528-535,1995
- 41 Heino TJ, Hentunen TA, Vaananen HK., *Osteocytes inhibit osteoclastic bone resorption through transforming growth factor-beta: enhancement by estrogen.*, J Cell Biochem. 2002;85(1):185-97
- 42 Herold G., *Innere Medizin* 2005,
- 43 Hiroyuki Takai, Masahiro Kanematsu, *Transforming Growth Factor- $\beta$  Stimulates the Production of Osteoprotegerin/Osteoclastogenesis Inhibitory*

- Factor by Bone Marrow Stromal Cells*, J Biol Chem, Vol. 273, Issue 42, 27091-27096, October 16, 1998
- 44 Hofbauer LC, Khosla S, *Estrogen stimulates gene expression and protein production of osteoprotegerin in human osteoblastic cells*. Endocrinology. 1999 Sep;140(9):4367-70
- 45 Hofbauer LC, Gori F, *Stimulation of osteoprotegerin ligand and inhibition of osteoprotegerin production by glucocorticoids in human osteoblastic lineage cells: potential paracrine mechanisms of glucocorticoid-induced osteoporosis*. Endocrinology. 1999 Oct;140(10):4382-9
- 46 Hofbauer LC, *Serum measurement of osteoprotegerin – clinical relevance and potential applications*, European Journal of Endocrinology (2001) 145, 681-683
- 47 Hofbauer LC, *Osteoprotegerin ligand and Osteoprotegerin: novel implications for osteoclast biology and bone metabolism*, European Journal of Endocrinology (1999) 141, 195-210
- 48 Holstead Jones D, Y-Y Kong, *Role of RANKL and RANK in bone loss and arthritis*, Ann Rheum Dis 2002;61(Suppl II):ii32–ii39
- 49 Horwood N.J. Elliott J. *Osteotropic agents regulate the expression of osteoclast differentiation factor and osteoprotegerin in osteoblastic stromal cells*. Endocrinology Vol. 139 No.11 4743-4746, 1998
- 50 Hsu H, Lacey DL, *Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Mar 30;96(7):3540-5
- 51 Hughes DE, Dai A, *Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta.*, Nat Med. 1996 Oct;2(10):1132-6.
- 52 Inaoka T, (1995) *Molecular cloning of human cDNA for cathepsin K: novel cystein protease predominantly expressed in bone*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 206: 89-96
- 53 Ji Li, Ildiko Sarosi, *RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism*, Proc Natl Acad Sci Vol. 97, Issue 4, 1566-1571, February 15, 2000
- 54 Jilka R.L., *Biology of the Basic Multicellular Unit and the pathophysiology of osteoporosis*, Med Pediatr Oncol 2003; 41: 182-185
- 55 Jones DB et al., *Development of a mechanical testing and loading system for trabecular bone studies for long term culture*, European Cells and Materials Vol.5 (2003) 48-60

- 56 Jones DB et al., *A trabecular bone and marrow bioreactor*, European Cells and Materials Vol. 1 Suppl. 2, 2001, 53
- 57 Kamolmatyakul S, Chen W, *IL-1alpha stimulates cathepsin K expression in osteoclasts via the tyrosine kinase-NF-kappaB pathway.*, J Dent Res. 2004 Oct;83(10):791-6
- 58 Kamolmatyakul S, Chen W, Li YP., *Interferon-gamma down-regulates gene expression of cathepsin K in osteoclasts and inhibits osteoclast formation.*, J Dent Res. 2001 Jan;80(1):351-5.
- 59 Kawaguchi H., *Anabolic effects of 3,3', 5-Triiodothyronine and Triiodothyroacetic acid in cultured neonatal mouse parietal bones*, Endocrinology Vol. 135 No.3 971-976 1994
- 60 Kaysinger K, Ramp WK (1998): *Extracellular pH modulates the activity of cultured human osteoblasts*. J Cell Biochemistry 68: 83-89
- 61 Khosla, Minireview: *The OPG/RANKL/RANK System*, Endocrinology (2001)142(12):5050–5055
- 62 Kitazawa R, Kitazawa S, Maeda S 1999 *Promotor structure of mouseRANKL/TRANCE/OPGL/ODF gene*. Biochim Biophys Acta 1445:134–141
- 63 Kuznetsov S.A., *Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro*, British Journal of Haematology 1997, 97. 561-570
- 64 Lacey DL, Timms E, *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation*. Cell. 1998 Apr 17;93(2):165-76
- 65 Lacey DL, Tan H-L, *Osteoprotegerin ligand is essential for osteoclast survival in vitro and in vivo*. J Bone Miner Res. 14(Suppl 1):1182
- 66 Lee T.C., Staines A., *Bone adaption to load: microdamage as a stimulus for bone remodelling*, J.Anat. (2002) 201, pp437-446
- 67 Lee T.C., *Detecting microdamage in bone*, J. Anat.(2003),pp161-172
- 68 Lee SK, Lorenzo JA, *Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation*. Endocrinology. 1999 Aug;140(8):3552-61
- 69 Lüllmann H., Mohr K., Wehling M. *Pharmakologie und Toxikologie* 15. Auflage S.435 Georg Thieme Verlag 2003



- 70 Manolagas SC, Jilka RL, *Bone marrow, cytokines, and bone remodeling. Emerging insights into the pathophysiology of osteoporosis.* N Engl J Med. 1995 Feb 2; 332(5):305-11
- 71 Mizuno E., *Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/ osteoprotegerin,* Biochemical and Biophysical research communications 247, 610-615 (1998)
- 72 Mundy G.R., Martin T.J., *Physiology and Pharmacology of Bone,* Springer-Verlag
- 73 Nakamura, Pilkington, *Role of  $\alpha\beta 3$  integrin in osteoclast migration and formation of the sealing zone,* Journal of Cell Science 112, 3985-3993 (1999)
- 74 Noble, Reeve *Osteocyte function, osteocyte death and bone fracture resistance,* Molecular and Cellular Endocrinology 159 (2000) 7–1
- 75 Owen M.: *Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stroma system.* Peck W.A., ed., Bone and Mineral Research, Annual 3 ( Elsevier: Amsterdam) (1985), 1-26
- 76 Pacifici R., Editorial: *Cytokines, estrogen, and postmenopausal osteoporosis – the second decade,* Endocrinology Vol 139 No.6 , 2659-2661, 1998
- 77 Parfitt AM (1990) *Bone-forming cells in clinical conditions.* Hall BK (ed.) The Osteoblast and the Osteocyte. Telford Press, London pp. 351-429
- 78 Pfeifer M. , W. Pollähne, B. Begerow, H.W. Minne *Was den Knochen härter macht (ohne ihn umzubringen ...) Prävention der Osteoporose und Rehabilitation – von der Theorie zur Praxis.* 50-55 Orthopädie & Rheuma 2-2004
- 79 Pitsillides, A.A., Rawlinson, S.C.F., Lanyon, L.E., 1995. *Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re)modelling.* FASEB J. 9, 1614–1622.
- 80 Plas Van der, A., Aarden, Nijweide, P. J. (1994), *Characteristics and properties of osteocytes in culture.* J. Bone Miner. Res. 9, 1697–1704
- 81 Price JS, Oyajobi BO, Russell RG. *The cell biology of bone growth.* Eur J Clin Nutr. 1994 Feb;48 Suppl 1: S131-49
- 82 Puchtler H., Meloan S.N., Terry M.S. *On the history and mechanism of alizarin and alizarin red s stains for calcium* J Histochemistry and Cytochemistry Vol.17 (2):110-124 1969
- 83 Rahn, B.A., S.M.Perren. *Xylenol orange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labeling of calcifying tissues.* Stain Technol. , 46(3):125-9, May 1971

- 84 Rahn, B.A., S.M.Perren. *Alizarin complexon-fluorochrome for bone and dentine labeling*. *Experientia*, 28(2):180, Feb. 1972
- 85 Rahn, B.A, S.M.Perren. *Calcein blue as a fluorescent label in bone*. *Experientia*,26(5):519-20, May 1970
- 86 Raisz L.G., *Physiology and Pathophysiology of bone remodeling*, *Clinical Chemistry* 1999, 45:8(B) 1353-1358
- 87 Rawlinson SCF et al., *Calvarial and limb bone cells in organ and monolayer culture do not show the same early responses to dynamic mechanical strain*, *J Bone and Miner Res*, Vol 10, No. 8, 1225-12332 1995
- 88 Rodan, G. A., T.Mensi, A.Harvey. *A quantitative method for the application of compressive forces to bone in tissue culture*. PG – 125-31. *Calcif Tissue Res*, 18(2), 1975
- 89 Roodman G. David, *Cell biology of the osteoclast*, *Experimental Hematology* 27 (1999) 1229-1241
- 90 Ross F. Patrick, *RANKing the importance of measles virus in Paget's disease*, *J Clin Invest*, March 2000, Volume 105, Number 5, 555-558
- 91 Rubin, C., A.S.Turner, R.Muller, E.Mitra, K.McLeod, W.Lin, Y.X. Qin. *Quantity and quality of trabecular bone in the femur are enhanced by a strongly anabolic, noninvasive mechanical intervention*. PG – 349-57. *J Bone Miner Res*, 17(2), 2002
- 92 Rubin, C.T., L.E.Lanyon. Kappa Delta Award Paper. *Osteoregulatory nature of mechanical stimuli: function as a determinant for adaptive remodeling in bone*.PG – 300-10. *J Orthop res*, 5(2), 1987
- 93 Saika M, Inoue D, *17beta-estradiol stimulates expression of osteoprotegerin by a mouse stromal cell line, ST-2, via estrogen receptor-alpha*. *Endocrinology*. 2001 Jun;142(6):2205-12
- 94 Sakou T., *Bone morphogenetic proteins: from basic studies to clinical approaches*, *Bone* Vol. 22 No.6. June 1998:591-603
- 95 Schoenau E., Rauch F., *Biochemical Measurements of Bone Metabolism in Childhood and Adolescence*, *J Lab Med* 2003; 27(1/2):32-42
- 96 Scholz-Ahrens K.E., Schrezenmeir J., *Inulin, oligofructose and mineral metabolism – experimental data and mechanism*, *British Journal of Nutrition* (2002), 87, Suppl. 2, S179-S186

- 97 Silver I.A., Murrills R.J., *Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts*. Exp Cell Res. 1988 Apr;175(2):266-76
- 98 Simonet WS, Lacey DL, *Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density*. Cell. 1997 Apr 18;89(2):309-19
- 99 Smit TH, Burger EH., *Is BMU-coupling a strain-regulated phenomenon? A finite element analysis*. J Bone Miner Res. 2000 Feb;15(2):301-7.
- 100 Solheim T. *Pluricolor fluorescent labeling of mineralizing tissue* Scand. J. Dent. Res. 1974; 82: 19-27
- 101 Suzuki, H.K., A.Mathews. *Two-color fluorescent labeling of mineralizing tissues with tetracycline and 2,4-bis[N,N'-di-(carbomethyl)aminomethyl] fluorescein*. Stain Technol, 41(1):57-60, Jan. 1966
- 102 Taniguchi T. et al., *Changes of serum levels of osteocalcin, alkaline Phosphatase, IGF-I and IGF-binding protein-3 during fracture healing*, Int. J Care Injured 34 (2003) 477-479
- 103 Teitelbaum Steven L., *Bone resorption by osteoclasts*, Science, Vol 289, Issue 5484, 1504-15-08, 1 September 2000
- 104 Tetsuya Goto, *Cathepsins in the osteoclast*, J Electron Microscopy 52(6):551-558 (2003)
- 105 Thomas L., *Labor und Diagnose*, 6.Auflage, 2005, S.38, TH-Books Verlagsgesell.mbH Frankfurt/M
- 106 Turner CH, *Biomechanics of bone: determinants of skeletal fragility and bone quality*, Osteoporos Int. (2002) 13:97-104
- 107 Vaes G., *On the mechanisms of bone resorption*, The Journal of cell biology Vol.39, 1968, 676-697
- 108 Vajda E.G., Bloebaum R.D., *Age-related hypermineralization in the femal proximal human femur*, The anatomical record 255: 202-211 (1999)
- 109 Villmann H. *The in vivo staining of bone with alizarin red s* J. Anat. (1969), 105, 3, pp. 533-545
- 110 Yasuda et al., *Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/ osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL*, Proc. Natl. Acad. Sci. Vol. 95, pp. 3597-3602, 1998 Cell Biology

- 111 Yeh, C.K., G.A.Rodan. *Tensile forces enhance prostaglandine E synthesis in osteoblastic cells grown on collagen ribbons*. PG – S67-71. Calcif Tissue Int, 36 Suppl 1, 1984
- 112 Zaman, G., R.F.Suswillo, M.Z.Cheng, I.A.Tavares, L.E.Lanyon. *Early responses to dynamic strain change and prostaglandins in bone-derived cells in culture*. J Bone Miner Res, 12(5):769-77, May 1997
- 113 Skerry TM, Bitensky L, Chayen J, Lanyon LEJ. *Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading in vivo*. Bone Miner Res (5):783-788 1989
- 114 van Bezooijen RL et al, *Wnt but not BMP signaling is involved in the inhibitory action of sclerostin on BMP-stimulated bone formation*. J Bone Miner Res. 2007 Jan;22(1):19-28. )
- 115 Robling et al, *Mechanical Stimulation of Bone in Vivo Reduces Osteocyte Expression of Sost/Sclerostin*, J Biol Chem VOL. 283, NO. 9, pp. 5866–5875, February 29, 2008
- 116 Robling et al, *Mechanical stimulation in vivo reduces osteocyte expression of sclerostin*, J Musculoskelet Neuronal Interact 2006; 6(4):354
- 117 Khosla S et al, 2006 *Effects of sex and age on bone microstructure at the ultradistal radius: A population-based noninvasive in vivo assessment*. J Bone Miner Res 21:124–131
- 118 Riggs BL, 2004 *Population-based study of age and sex differences in bone volumetric density, size, geometry, and structure at different skeletal sites*. J Bone Miner Res 19:1945–1954.
- 119 Gelsleichter J, *Use of Calcein as a Fluorescent Marker for Elasmobranch Vertebral Cartilage*, Transactions of the American Fisheries Society 1997; 126: 862-865)
- 120 Moran A L; *Calcein as a marker in experimental studies newly-hatched gastropods*, Marine Biology, Volume 137, Numbers 5-6 / Dezember 2000, 893-898

## 10 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 2-1 Aufbau eines Lamellenknochens, Junqueira 1996.....	8
Abbildung 3-1 Bestandteile der Belastungseinheit .....	27
Abbildung 3-2 Zetos.....	28
Abbildung 4-1 Hüftkopf.....	32
Abbildung 4-2 Systemkomponenten .....	34
Abbildung 4-3 Temperatur im Messraum .....	36
Abbildung 4-4 „Jumping“-Belastungssignal.....	39
Abbildung 4-5 „Jumping“-Belastungssignal.....	40
Abbildung 4-6 Standardkurve(BioVendor®) Human Osteoprotegerin ELISA Kit.....	42
Abbildung 4-7 Funktionsweise des Cathepsin K ELISA (Biomedica Medizinprodukte GmbH& Co KG) .....	43
Abbildung 5-1 Mittelwerte der AP-Konzentration der Gruppen I-V, Nullprobe.....	48
Abbildung 5-2 Mittelwerte der Laktatdehydrogenasekonzentrationen der Gruppen I-V, Nullprobe.....	51
Abbildung 5-3 Mittelwerte der Laktatkonzentrationen in den Gruppen I-V, Nullprobe ....	53
Abbildung 5-4 Mittelwerte der Osteocalcinkonzentration der Gruppen I- V, Nullprobe ...	55
Abbildung 5-5 Mittelwerte der OPG-Konzentrationen der Gruppen I, II und V .....	57
Abbildung 5-6 Mittelwerte der Cathepsin K-Konzentrationen der Gruppen I, II und V ....	60
Abbildung 5-7 Mittelwerte der pH- Werte der Gruppen I-V, Nullprobe .....	63
Abbildung 5-8 Steifigkeitsdifferenzen der Knochenproben.....	65
Abbildung 5-9 spongiöser Knochen; Bone 6 .....	66
Abbildung 5-10 spongiöser Knochen; Bone 6 .....	66
Abbildung 5-11 spongiöser Knochen; Bone 6 .....	66
Abbildung 6-1 Boxplot.....	72
Abbildung 6-2 Boxplot.....	73
Abbildung 6-3 Boxplot.....	72
Tab. 4-1 Waschprozedur Knochenzylinder .....	33
Tab. 4-2 Mediumzusammensetzung.....	35
Tab. 4-3 Einteilung der Gruppen.....	37
Tab. 5-1 OPG-Konzentrationen der Gruppen I, II und V.....	58
Tab. 5-2 Cathepsin K-Konzentrationen der Gruppen I, II und V.....	61
Tab. 5-3 Differenzen der Mittelwerte der Steifigkeiten der Knochenproben.....	70
Tab. 5-4 Rangreihe der Differenzen der Knochenproben .....	71
Tab. 5-6 Oneway ANOVA .....	73
Tab. 5-7 Univariate Varianzanalyse - Zwischensubjektfaktoren .....	74
Tab. 5-8 Univariate Varianzanalyse – Tests der Zwischensubjekteffekte .....	74
Tab. 5-9 Kruskal – Wallis –Test, Ränge .....	76
Tab. 5-10 Kruskal – Wallis - Test .....	76
Tab. 5-11 Oneway ANOVA.....	77
Tab. 5-12 Mann - Whitney –Test, Ränge.....	78
Tab. 5-13 Mann – Whitney – Test.....	78
Tab. 5-14 Mann-Whitney-Test, Ränge; Differenzen; lebend 3000 – lebend 3000 highpass .....	81
Tab. 5-15 Mann-Whitney-Test, Differenzen; lebend 3000 – lebend 3000 highpass .....	81
Tab. 5-16 Mann-Whitney-Test, Ränge; Differenzen; tot J3000 – J3000 highpass .....	82
Tab. 5-17 Mann-Whitney-Test; Differenzen; tot J3000 – J3000 highpass .....	82
Tab. 5-18 Mann-Whitney-Test, Ränge; Differenzen; lebend – tot.....	84

Tab. 5-19 Mann-Whitney-Test; Differenzen; lebend – tot.....	84
Tab. 5-20 Mann-Whitney-Test, Ränge; Differenzen; lebend – Kontrollgruppe .....	85
Tab. 5-21 Mann-Whitney-Test; Differenzen; lebend – Kontrollgruppe .....	85
Tab. 5-22 Mann-Whitney-Test, Ränge; Differenzen; tot – Kontrollgruppe.....	86
Tab. 5-23 Mann-Whitney-Test; Differenzen; tot – Kontrollgruppe.....	86
Tab. 5-24 Zusammenfassung Mann-Whitney-Test; Differenzen; Gruppenvariable; p-Wert .....	87

## 11 Abkürzungsverzeichnis

AP -	Alkalische Phosphatase
Aqua bidest -	zweifach destilliertes Wasser
BMP -	Bone Morphogenic Proteins
BMU -	Bone Multicellular Unit
CFU-GM -	Granulocyte and Macrophage Colony-forming Units
DMEM -	Dulbecco's Mod. Eagle Medium
DNA -	Desoxyribonukleinsäure
E-Modul -	Elastizitäts-Modul
FCS -	Fetal Calf Serum
FGF -	Fibroblast Growth Factor
Hz -	Hertz
IGF I / II -	Insulin-like Growth Factor I / II
LDH -	Laktatdehydrogenase
M-CSF -	Macrophage Colony Stimulating Factor
N -	Newton
OPG -	Osteoprotegerin
Pa -	Pascal (M_Mega, G_Giga)
PEA -	Piezo Elektrischer Aktor
PBS -	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PEA -	Piezo Elektrical Aktor
PC -	Personal Computer
PG -	Prostaglandin
PTH -	Parathormon
RANK -	Receptor activator of nuclear factor kappa b
RANKL -	Receptor activator of nuclear factor kappa b ligand
STH -	Somatotropes Hormon
TGF- $\beta$ -	Transforming Growth Factor $\beta$
TNF -	Tumor Nekrose Faktor
U (/dl) -	Units (/dl)
V -	Volt
Zetos -	Perfusions- und Belastungssystem

## **12 Verzeichnis der akademischen Lehrer**

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

Arnold, Becker, Bien, Cetin, Grimm, Griss, Hofmann, Jones, Joseph, Klose, Lang, Lange, Lengsfeld, Lorenz, Maier, Maisch, Neubauer, Oertel, Rothmund, Röhm, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Stiletto, Vogelmeier, Wagner, Wilke, Wirth, Zielke



### **13 Danksagung**

Mein Dank gilt allen Menschen, die in den letzten Jahren zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. David B. Jones für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und für die Möglichkeit, diese Arbeit zu erstellen.

Frau Marita Kratz für die Einführung in die Laborarbeit und die kontinuierliche Betreuung und Beratung während der gesamten Entstehung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Bröckmann für die Einweisung in das System Zetos und die physikalischen Erläuterungen.

Herrn Weng Tan für seine Hilfe und Einführung in die Arbeit mit der Zellkultur.

Herrn Professor Schäfer und Herrn Scherag vom Institut für Medizinische Biometrie und Statistik für die Beratung und Unterstützung bei der Auswertung der Daten.

Mein Dank gilt auch meiner Familie, besonders meinen Eltern und meiner Frau, die mich während meines Studiums und bei der Erstellung dieser Arbeit immer unterstützt haben.