

Aus dem Zentrum für Muskel- und Knochenforschung
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Materialeigenschaften der Knochen vor
dem Hintergrund der biologischen Evolution

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Beate Blichmann

aus Schwedt/ Oder

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. D. Felsenberg
2. Prof. Dr. med. H.- Chr. Gunga
3. Prof. Dr. med. F. Jakob

Datum der Promotion: 21.11.2008

Widmung

Diese Arbeit ist meiner Familie und im Besonderen meinem Mann gewidmet.

Danksagung

Herrn Professor Doktor Felsenberg danke ich für die Unterstützung und Betreuung der Arbeit.

Herrn Professor Doktor Rittweger danke ich für die Bereitstellung des Themas, die interessanten Anregungen und für das Heranführen an das wissenschaftliche und experimentelle Arbeiten.

Herrn Privat Dozent Doktor Bäurle, Herrn Dipl. phys. Michaelis, Frau Wrolynski und Frau Bongrazio aus dem Institut für Physiologie danke ich für die freundliche Unterstützung und die interessanten Gespräche.

Herrn Professor Doktor Dietsch und Mitarbeiterinnen danke ich für die freundliche Hilfe bei den Versuchen im Institut für Biochemie.

Herrn Dr. Mutschmann (Exomed) und dem Reptilienzoo Regensburg danke ich für die Überlassung der Tierkadaver.

Inhaltsverzeichnis

<u>I. Einleitung</u>	1
1. Bedeutung der Evolution für das heutige Leben	1
2. Die stammesgeschichtliche Entwicklung der Amphibien, Reptilien und Mammalia	3
3. Lebensräume, Fortbewegung und Ernährung der untersuchten Tiere	4
3.1 Amphibien	4
3.1.1 <i>Rana temporaria</i>	4
3.1.2 <i>Cynops ensicauda</i>	5
3.2 Reptilien	5
3.2.1 <i>Iguana iguana</i>	5
3.2.2 <i>Petrosaurus thalassinus</i>	6
3.2.3 <i>Cyclura cornuta</i>	6
3.2.4 <i>Chameleon melleri</i>	6
3.2.5 <i>Varanus exanthematicus</i>	7
3.2.6 <i>Varanus acanthurus</i>	7
3.2.7 <i>Testudo hermanni</i>	8
3.3 Mammalia	8
3.3.1 <i>Ratus norwegicus</i>	8
3.3.2 <i>Cavia aperea</i>	8
3.3.3 <i>Equus</i>	9
3.3.4 <i>Callithrix jacchus</i>	9
3.3.5 <i>Talpa europeae</i>	9
4. Knochen als Material für die Erforschung der evolutionären Entwicklung der Lebewesen	10

5. Materialeigenschaften der Knochen	13
5.1 Zusammensetzung und Funktion der Knochen	13
5.2 Anatomie der Extremitätenknochen	14
6. Aufgabenstellung	14
<u>II. Material und Methoden</u>	15
1. Material und Materialgewinnung	15
1.1 Voruntersuchungen	15
1.1.1 Alter	15
1.1.2 Körperseitenunterschiede	16
1.1.3 Lagerung	16
1.1.4 Trockengewicht	16
2. Untersuchung der Materialeigenschaften	18
2.1 Dichte	18
2.2 Wassergehalt	19
2.3 Mineralgehalt	19
2.4 Mineralzusammensetzung	20
2.4.1 Calciumkonzentration	21
2.4.2 Phosphatkonzentration	21
2.4.3 Magnesiumkonzentration	22
3. Berechnungsgrundlagen	22
3.1 Seitenfehler	22
3.2 Gefrierfehler	23
3.3 Statistischer Vergleich von Mittelwerten	23

<u>III. Ergebnisse</u>	25
A Methoden	25
1. Proben	25
1.1 Alter	25
1.2 Körperseitenunterschiede	27
1.3 Untersuchung des Einflusses der Lagerung bei -20 °C	29
1.4 Trockengewicht	31
B Ergebnisse	32
1. Dichte der Amphibien-, Reptilien- und Säugetierknochen	32
2. Wassergehalt der Amphibien-, Reptilien- und Säugetierknochen	34
3. Mineralgehalt der Amphibien-, Reptilien- und Säugetierknochen	36
4. Mineralzusammensetzung der Amphibien-, Reptilien- und Säugetierknochen	38
4.1 Calcium	38
4.2 Phosphat	40
4.3 Magnesium	42
4.4 Beziehung zwischen prozentualem Wassergehalt und der Dichte der Knochenproben	44
<u>IV. Diskussion</u>	46
1. Zusammenfassung der Ergebnisse	46
2. Allgemeine Diskussion der Ergebnisse	49
3. Spezielle Diskussion der Ergebnisse	
<u>V. Zusammenfassung</u>	52
<u>VI. Anhang</u>	53
1. Calciumionenbestimmung	53
2. Phosphationenbestimmung	54
3. Magnesiumionenbestimmung	55
<u>VII. Literatur</u>	56

Abbildungsverzeichnis

- Abb. I.1: Entwicklung der Fußknochen beim Pferd
- Abb. II.2: Pyknometer
- Abb. III.1: Die Dichte in g/cm^3 von Femora in Bezug auf das Alter in Monaten der männlichen Ratten.
- Abb. III.2: Der prozentuale Wassergehalt bezogen auf das Trockengewicht der Femora in Bezug auf das Alter in Monaten der männlichen Ratten.
- Abb. III.3: Der prozentuale Mineralgehalt der Femora in Bezug auf das Alter in Monaten der männlichen Ratten.
- Abb. III.4: Abnahme des Knochengewichtes pro Stunde im Trockenofen am Beispiel von vier Rattenproben (75.1-3; 76.1).
- Abb. III.5: Amphibien: Dichte in g/cm^3 der Femora bezogen auf das jeweilige Aschegewicht in mg der Knochen.
- Abb. III.6: Reptilien: Dichte in g/cm^3 der Femora bezogen auf das jeweilige Aschegewicht in mg der Knochen.
- Abb. III.7: Säugetiere: Dichte in g/cm^3 der Femora bezogen auf das jeweilige Aschegewicht in mg der Knochen.
- Abb. III.8: Amphibien: prozentualer Wassergehalt pro mg Trockengewicht der Knochen.
- Abb. III.9: Reptilien: prozentualer Wassergehalt pro mg Trockengewicht der Knochen.
- Abb. III.10: Säugetiere: prozentualer Wassergehalt pro mg Trockengewicht der Knochen.
- Abb. III.11: Amphibien: prozentualer Mineralgehalt pro mg Aschegewicht der Knochen.
- Abb. III.12: Reptilien: prozentualer Mineralgehalt pro mg Aschegewicht der Knochen.
- Abb. III.13: Säugetiere: prozentualer Mineralgehalt pro mg Aschegewicht der Knochen
- Abb. III.14: Amphibien: prozentualer Calciumgehalt am Aschegewicht der Knochen
- Abb. III.15: Reptilien: prozentualer Calciumgehalt am Aschegewicht der Knochen
- Abb. III.16: Säugetiere: prozentualer Calciumgehalt am Aschegewicht der Knochen
- Abb. III.17: Amphibien: prozentualer Phosphatgehalt am Aschegewicht der Knochen
- Abb. III.18: Reptilien: prozentualer Phosphatgehalt am Aschegewicht der Knochen
- Abb. III.19: Säugetiere: prozentualer Phosphatgehalt am Aschegewicht der Knochen
- Abb. III.20: Amphibien: prozentualer Magnesiumgehalt am Aschegewicht der Knochen
- Abb. III.21: Reptilien: prozentualer Magnesiumgehalt am Aschegewicht der Knochen
- Abb. III.22: Säugetiere: prozentualer Magnesiumgehalt am Aschegewicht der Knochen

- Tab. II.1 Untersuchungsexemplare
- Tab. III.1: Vergleich des Wasser- und Mineralgehaltes der linken mit den jeweiligen rechten Femora der männlichen Ratten
- Tab. III.2: Ergebnisse des t- Testes für die Mittelwerte der rechten in Bezug auf die linken Femora der männlichen Ratten.
- Tab. III.3: Vergleich des Wasser- und Mineralgehaltes der nicht gefrorenen mit den jeweiligen gefrorenen Femora der männlichen Ratten.
- Tab. III.4: Ergebnisse des t- Testes für die Mittelwerte der nicht gefrorenen in Bezug auf die gefrorenen Femora der männlichen Ratten.
- Tab. IV.1: Zusammenfassung der Ergebnisse

Abkürzungsverzeichnis

m_{Feucht}	Feuchtgewicht: Masse des frisch präparierten Knochens
m_{Asche}	Aschgewicht: Masse des veraschten Knochen
m_{Trocken}	Trockengewicht: Masse des getrockneten Knochen
ρ_{Probe}	Dichte der Knochen
$\rho_{\text{phys.NaCl-Lösung}}$	Dichte der physiologischen Kochsalzlösung
$m_{\text{Pyknometer}}$	Masse des Pyknometers mit physiologischen Kochsalzlösung
$m_{\text{Pyknometer + Probe}}$	Masse des Pyknometers mit physiologischen Kochsalzlösung und des Knochens
SF- H ₂ O- Gehalt%	Seitenfehler bezogen auf den Wassergehalt der Knochen
SF- Mineral- Gehalt%	Seitenfehler bezogen auf den Mineralgehalt der Knochen
FG	Freiheitsgrad

Glossar

Feuchtgewicht (m_{Feucht}) Masse des frisch präparierten Knochens

Wassergehalt Wasseranteil am Feuchtgewicht des Knochens:

$$\text{H}_2\text{O - Gehalt}[\%] = \left(\frac{m_{\text{Feucht.}} - m_{\text{Trockeng.}}}{m_{\text{Trockeng.}}} \right) \cdot 100\% = \left(\frac{m_{\text{Feucht.}}}{m_{\text{Trockeng.}}} - 1 \right) \cdot 100\%$$

Mineralgehalt Mineralanteil am Trockengewicht des Knochens:

$$\text{Mineralgehalt}[\%] = \left(\frac{m_{\text{Asche}}[\text{mg}]}{m_{\text{Trocken}}[\text{mg}]} \right) \cdot 100\%$$

Aschgewicht (m_{Asche}) Masse des veraschten Knochen

Trockengewicht Masse des getrockneten Knochen

(m_{Trocken})

PBS Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)

I. Einleitung

1. Bedeutung der Evolution für das heutige Leben

Die verschiedensten Wissenschaftszweige forschen mit dem Ziel, den Ursprung, die Entwicklung und Vielfalt des Lebens auf der Erde zu ergründen. Nicht zuletzt um die Neugierde des Menschen zu befriedigen- wie und wohin entwickelt sich das Leben. Bedeutende Zeugnisse reichen von den Schriften der Forscher Alfred Russell Wallace (1823- 1913) und Charles Darwin (1805- 1882) bis zur Entschlüsselung des menschlichen Genoms 2003 und sind damit noch lange nicht beendet.

Die Evolution steht nicht still. Wie eine uns umgebene unsichtbare Kraft ist sie stets bemüht die Entwicklung allen Lebens zu beeinflussen. Trotz aller Bemühungen des homo sapiens zum größten Gestalter der Erde zu werden, findet durch Replikation, Variation und Selektion Evolution langsam aber stetig statt. Wie einst die gigantischen Dinosaurier die Erde beherrschten, sind es nun die Menschen.

Der Mensch hat es gelernt die Umwelt, an seine Bedürfnisse anzupassen. Viele Arten sterben durch den Menschen beschleunigt aus und gleichzeitig gelingt es ihm, neue Arten zu züchten. Das postulierte Prinzip „survival of the fittest“ scheint außer Kraft gesetzt worden zu sein, bzw. eine neue Bedeutung zu erhalten. Was keinem Lebewesen vorher gelang, schafft nun der Mensch- er manipuliert die Evolution zu seinem Nutzen, indem er Flora und Fauna auf maximalen Ertrag züchtet oder durch Genmanipulation nach eigenen Wünschen neu kreiert. Pflanzen werden gegen Schädlinge resistent, Hühner legen mehr Eier, Tomaten und andere Früchte werden größer und optisch schöner. Der moderne Mensch spielt Gott in seinem kleinen Reich und gestaltet seine Umwelt neu. Doch behält er dabei den Überblick? Verändert sich ein Lebewesen, so hat dies auch unmittelbar Auswirkung auf die benachbarten Organismen, die mit ihm zusammenhängen. Konsequenter wäre es nur jegliches Leben auf der Erde neu zu gestalten, zum Wohle des Menschen, dabei dürfte kein Organismus übersehen werden, kein noch so kleiner Mikroorganismus oder Krankheitserreger. Konzentriert sich der Mensch nur auf die ihm bedeuten erscheinenden Organismen, so gibt er der Evolution die Zügel wieder in die Hand. Wo der Mensch versagt wird sie siegen, wo durch den Einsatz der Gentechnik Pflanzen angebaut werden, die gegen bestimmte Schädlinge resistent sind, wird dieser Schädling aussterben oder sich so verändern, daß er die Pflanze wieder angreifen

kann. Stirbt er aus, werden andere den Platz in der freigewordenen ökologischen Nische einnehmen, so wie einst die Säugetiere die Herrschaft über die Erde von den Dinosauriern übernahmen.

Vermutlich kann der Mensch seine Umwelt nicht vollständig beherrschen, wie schwer dies ist weiß jeder, der schon einmal versucht hat die Umwelt in einem Aquarium-einer kleinen, abgeschotteten Welt- im Gleichgewicht zu halten. Jede Veränderung an einer Stelle kann das ganze System zum Kippen bringen. Der Mensch muß sich bewußt machen, wie er die Welt erobert hat- nicht durch die Veränderung seiner Umwelt, sondern durch die Anpassung des Menschen an die ihn umgebene Natur.

Die technische Entwicklung der Menschen verläuft wesentlich schneller als seine evolutionäre Anpassung an die neu gestaltete Umwelt. Der Mensch versucht die Natur zu beherrschen, statt sich von ihr treiben zu lassen. Evolution zuzulassen bedeutet sich in seiner Umwelt zu behaupten und über die Nachkommen sich immer besser anzupassen.

Die Intelligenz des Menschen, seine Möglichkeiten eine ihm unbequeme Welt zu verändern und der medizinisch- technische Fortschritt lassen „survival of the fittest“ nur noch bedingt zu. Die medizinische Forschung sucht nach Mitteln und Wegen, angeborene Unzulänglichkeiten zu lindern und tödliche Krankheiten zu heilen. Der Mensch will nicht mehr so alt werden, bis seine Nachkommen stark genug sind, um zu überleben und selber Nachkommen großzuziehen, nein er will um seiner selbst willen älter werden, um sich möglichst lange gegen das Unvermeidliche zu stemmen. Dies führt auch zu einer wachsenden Bedeutung für die Medizin in vielerlei Hinsicht. Eine drastische Ausbreitung von Allergien, Wohlstandskrankheiten mit degenerativen Wirbelsäulenerkrankungen und Herz- Kreislaufkrankheiten, Osteoporose im Zuge des immer älter werdenden Menschen sind hier nur einige Probleme.

Aber die Evolution existiert. Eine Katastrophe globalen Ausmaßes, sei es durch die Unfähigkeit des Menschen die von ihm veränderte Umwelt zu beherrschen, kosmische Einflüsse oder schlichte Waffengewalt könnte die Menschheit wieder in die Steinzeit zurückkatapultieren oder ihn von der Erde tilgen. Unter extremsten Bedingungen würde sich zeigen, ob einige Menschen an eine „world after tomorrow“ angepaßt sind oder eine andere Spezies die Herrschaft über die Erde übernimmt.

Das Leben auf der Erde hat ohne den Menschen begonnen, wird es- wie die Dinosaurier- ohne ihn enden?

In dieser Arbeit wollten wir uns in diesem Sinne mit der Zusammensetzung des Knochens im Wandel der Zeiten beschäftigen, um zu untersuchen, ob sich seine Eigenschaften im Laufe der Evolution geändert haben.

2. Die stammesgeschichtliche Entwicklung der Amphibien, Reptilien und Säuger

Die Amphibien (griech.: *ἀμφί* [amphi] „auf beiden Seiten“ und *βίος* [bios] „Leben“) sind die stammesgeschichtlich die älteste Klasse der Landwirbeltiere (Tetrapoda). Sie sind die evolutionären Nachfolger der ersten Knochenfische (Osteichthyes), die im Oberdevon vor etwa 374- 360 Millionen Jahren vom Meer aus das Land besiedelten. Im Oberkarbon vor rund 300 Millionen Jahren war diese Tierklasse besonders formenreich und hatte eine Blütezeit als dominierende Landwirbeltiere. Bei den Amphibien sind vor allem Verwandtschaftsverhältnisse zu den Quastenflossern (*Latimeria chalumnae*) und zu den Lungenfischen (*Neoceratodus forsteri*) erkennbar. Beide Gruppen haben eine Reihe von Charakteristika mit den Amphibien gemeinsam, wobei genetische Analysen der Lungenfische eine wesentliche größere genetische Übereinstimmung mit Landwirbeltieren aufweisen als die Quastenflosser. Es gibt heute etwa 3000 Amphibienarten die sich auf drei Ordnungen verteilen (die Froschlurche, Schwanzlurche und Schleichenlurche, bzw. Blindwühlen).

Die Reptilien stammen entwicklungsgeschichtlich von amphibischen Landwirbeltieren ab. Sie lebten mit einigen Ausnahmen als erste Tiergruppe vollständig auf dem Festland, dem sie u.a. durch die Ausbildung von Eiern mit Amnion, durch wechselwarme Körpertemperatur, Lungenatmung, Schuppenhaut, Hornskelett angepasst waren. Erstmals traten Reptilien im Unterkarbon (vor 360- 318 Millionen Jahre) auf [32]. Die Schildkröten stellen wahrscheinlich einen früh abgespaltenen Seitenzweig dar. Zu Beginn des Perm (vor 299 bis 251 Millionen Jahren) gingen die Hauptgruppen (Leipidosaurier, Archosaurier, Sauropterygia, Placodontia und Ichtyosaurier) der Reptilien hervor. Nach der ersten großen Verzweigung im Oberkarbon (vor etwa 300- 318 Millionen Jahren)/ Perm entwickelten sich die Reptilien v.a. im Oberperm (vor etwa 270–251 Millionen Jahren), in der Trias (etwa

251 und 199,6 Millionen Jahren) und in der Malm (etwa vor 161,2 bis 145,5 Millionen Jahren) bis zur Kreide (vor etwa 145- 65 Millionen Jahren). Ende der Kreide starb ein Großteil der Reptilien aus. Im Tertiär (vor etwa 65 – 2,6 Millionen Jahren) folgte schließlich die Entfaltung der Schlangen, Echsen und Krokodile.

Die Säuger entwickelten sich aus den „säugetierähnlichen Reptilien“ (Therapsida). Die ältesten Funde der Säugetiere stammen aus dem oberen Trias (vor etwa 220 Millionen Jahren). Über die Symmetrodonta und die ebenfalls nur fossilen Pantotheria entwickelten sich seit der Oberkreide (vor etwa 100- 65 Millionen Jahre) die Beuteltiere und die Plazentatiere. Die schnelle weitere Entfaltung der Säugetiere setzte erst nach der Wende Kreide/ Tertiär, nach Aussterben der großen Reptilien und der Kontinentalverschiebung ein.

3. Lebensräume, Fortbewegung und Ernährung der untersuchten Tiere

Die Lebensweise der Amphibien und Reptilien ist unter anderem dadurch geprägt, daß es poikilotherme (wechselwarme) Tiere sind. Sie erzeugen die nötige Körperwärme nicht selbst und müssen sie, ihren jeweiligen Bedürfnissen entsprechend, durch Ortswechsel von schattigen zu sonnigen Plätzen oder von kaltem zu wärmeren Wasserbereichen beeinflussen.

3.1 Amphibien

3.1.1 Rana temporaria

Die Grasfrösche (*Rana temporaria*) bevorzugen als Laichgewässer stehende oder langsamfließende Gewässer. Nach dem Abläichen halten sich die Männchen noch einige Zeit im Wasser oder in der Nähe der Laichgewässer auf. Danach bevorzugen sie tagsüber dichte Grasvegetation oder stark verkrautete Wiesen, die bei ihrer Jagd nach Insekten genügend Deckung aber auch Schutz vor Sonneneinstrahlung und Austrocknung bieten. In kühlen Nächten, jedoch auch bei sehr trockenen Wetterperioden suchen sie oftmals wieder die Gewässer auf.

Die meisten erwachsenen Grasfrösche überwintern in stehenden oder fließenden Gewässern. Oftmals ist das Laichgewässer gleichzeitig auch das Winterdomizil. Die

Tiere halten sich vorwiegend am Teichgrund auf, kommen aber ab und zu zum Luftholen an die Wasseroberfläche. Bevorzugt werden von den Fröschen Fließgewässer, soweit vorhanden, deren Fließgeschwindigkeit so hoch ist, daß sie nicht zufrieren können. Bei einer Wassertemperatur am Teichgrund unter 4°C, reduzieren die Tiere ihren Stoffwechsel und Herzschlag und fallen in einen Zustand fast völliger Bewegungslosigkeit. Sobald die Temperaturen wieder über 4°C ansteigen, werden die Tiere wieder aktiv und nehmen Ortswechsel vor.

Die Frösche sind weit springende Tiere, wie z. B. auch Kängurus oder andere springende Vertebraten, die hohe Sprungleistung erreichen sie durch eine synchronisierte Streckung der Hinterbeine. Das Springen entwickelte sich wahrscheinlich an Ufergebieten, zwischen Land und Wasser und diente als ein effektiver Fluchtmechanismus. Es war zudem nützlich beim Fang von Futter.[20, 29]

3.1.2 Cynops ensicauda

Die Schwertschwanzmolche (*Cynops ensicauda*) kommen auf mehreren süd-japanischen Inseln vor. Es werden stehende Gewässer sowie verkrautete Tümpel, Reisfelder und Bewässerungsgräben bevorzugt. Außerhalb der Fortpflanzungszeit im Frühling gehen die Tiere ab Juni/ Juli teilweise zum Landleben über und verstecken sich dann unter Steinen und Todholz. Ähnlich den Fröschen laichen die Molche in ruhigen Gewässern, während sie sich nicht springend, sondern mit allen vier Gliedmaßen krabbelnd fortbewegend.

Als Nahrungsquelle dient Zooplankton wie z. B. Wasserflöhe oder an Land Insekten, wie z.B. Blattläuse.

3.2 Reptilien

3.2.1 Iguana iguana

Der Lebensraum des grünen Leguans (*Iguana iguana*) befindet sich in Mittelamerika und nördlichem Südamerika. Bevorzugter Wohnort sind Tieflandwälder in der Nähe größerer Gewässer. Sie sind Flachlandbewohner und überschreiten fast nie die Höhengrenze von 1000 Metern über Normalnull.

Der grüne Leguan bewohnt vorwiegend Bäume. Er ist zudem ein guter Schwimmer und kann sich bei Bedrohungen vom Baum ins Wasser fallen lassen und auf diesem Wege entfliehen. Die Männchen verteidigen ihre Reviere mit peitschenartigen Hieben ihres Schwanzes, während die Weibchen vor allem durch Drohverhalten imponieren. Nach der Paarung im Januar bis Dezember legen die Weibchen ihre Eier in selbst gegrabene Erdhöhlen. Im Winter halten sie wie viele andere Reptilien Winterruhe. Die adulten grünen Leguane sind reine Pflanzenfresser [9].

3.2.2 Petrosaurus thalassinus

Der blaue Felsenleguan (*Petrosaurus thalassinus*) ist über weite Teile Mexikos und Kalifornien in felsigen Gebieten und der Halbwüste beheimatet. Er ist ein geschickt kletternder Felsenbewohner und nur selten auf dem Boden. Sie können sich aufgrund ihrer Anatomie sogar kopfüber auf Felsen bewegen. Bei Bedrohungen verstecken sie sich flink in Felsnischen oder imponieren mit Drohverhalten indem sie ihren Kehlsack aufblähen. Zudem können sie ihren Schwanz abwerfen, der dann allmählich wieder nachwächst.

Im Winter halten die Tiere an frostsicheren Plätzen eine mehrmonatige Winterruhe. Die blauen Felsenleguane sind Allesfresser und ernähren sich vorwiegend von Insekten, kleinen Säugetieren und auch pflanzlicher Kost.

3.2.3 Cyclura cornuta

Der Nashornleguan (*Cyclura cornuta*) bewohnt Gegenden auf Hispaniola und anderen karibischen Inseln. Er lebt in der Küstengegend auf trockenen, felsigen Gebieten mit Kakteen und Dornbuschsteppen. Es sind Allesfresser, die sich von neben einer vielseitigen Pflanzenkost auch gelegentlich Insekten und andere Kleintiere verzehren, während die Jungtiere vornehmlich Insekten, Schnecken und andere Wirbellose Tiere bevorzugen [18].

3.2.4 Chameleon melleri

Das Elefantenohrchamäleon ist vorwiegend auf dem afrikanischen Kontinent und angrenzenden Inseln, Madagaskar, auf der arabischen Halbinsel, rund um das

Mittelmeer (mit Ausnahme von Frankreich, der östlichen Adriaküste und einiger Inseln), auf Sri Lanka, der Westküste von Indien um im Süden von Pakistan beheimatet. Sie leben am Boden und auf Bäumen.

Chameleons sind in vielerlei Hinsicht eine besondere Echsengruppe- hier soll lediglich kurz auf die Besonderheiten der Extremitäten eingegangen werden. Ihre Füße haben einen besonderen Aufbau. Die fünf Zehen sind zusammen gewachsen. An den Vorderfüßen zeigen sich je zwei nach außen und drei nach innen, an den Hinterfüßen ist es genau reziprok. Dadurch sind perfekte Greifzangen entstanden, die zusammen mit den Krallen und den Haftlamellen der Geckos ähnlichen Strukturen der Fußunterseiten [48] einen sehr guten Halt selbst an glatter Rinde oder auf dünnen Zweigen gestatten. Chameleons sind Allesfresser, die verschiedene Wirbellose Tiere, Vögel, Frösche, Reptilien und Pflanzen fressen [39].

3.2.5 Varanus exanthematicus

Der Steppenwaran (*Varanus exanthematicus*) ist über die Wüstengebiete Afrikas vom Senegal im Westen bis zum Sudan und Äthiopien im Osten verbreitet. Das Verbreitungsgebiet wird im Norden durch die Sahara und im Süden durch die Regenwaldgebiete begrenzt. Sie leben in kargen Regionen in Erdhöhlen, in baumreichen Gebieten hingegen sind sie auf Bäumen und in Baumhöhlen zu finden. Da diese Warane in der Natur recht scheu sind, findet man sie selten bis nie in der Nähe menschlicher Siedlungen. Häufig ist er in der Nähe von Wasserläufen zu finden, obwohl er kein besonders geschickter Schwimmer ist.

Die carnivore Nahrung besteht in der Hauptsache aus Insekten, bevorzugt aus Wanderheuschrecken, Käfern und deren Larven, Schmetterlingen, Bienen und Wespen. Skorpione, Schnecken und Agameneier stehen ebenfalls auf dem heimatischen Speiseplan. Bei Steppenwaranen, die in Küstennähe leben, fand man auch Krabben in den Mägen untersuchter Tiere [33].

3.2.6 Varanus acanthurus

Die Verbreitung der Stachelschwanzwarane (*Varanus acanthurus*) erstreckt sich auf den Westen, Norden und das Zentrum Australiens, sowie auf einige der Nordküste vorgelagerte Inseln. Sie reicht von Carnarvon im Westen bis nach Mt. Isa im Osten

[19]. Er bewohnt Trockengebiete und steinige Halbwüsten. Tagsüber versteckt er sich in Felsspalten und unter Steinen, wobei er mit Hilfe des seines Schwanzes den Eingang verschließt. Er ernährt sich carnivor unter anderem von Mäusen, kleinen Echsen und Insekten.

3.2.7 Testudo hermanni

Die griechische Landschildkröte ist im europäischen Teil des Mittelmeerraumes beheimatet. Sie bewohnt lichte Kiefern-, Eichen- und Korkeichenwälder, Hecken-, Strauch- und Heidelandschaften, sowie Kulturflächen. Sie sind herbivore, tagaktive Reptilien. In den heißen Sommermonaten aber auch in den Wintermonaten verharren sie in einem Ruhezustand.

3.3 Mammalia

3.3.1 Ratus norwegicus

Das ursprüngliche Verbreitungsgebiet der Wanderratte stammt aus Sibirien und China, ist heute aber weltweit verbreitet. In ihren Ursprungsgebieten ist sie noch völlig frei lebend, während sie in den übrigen Gebieten an die Nähe der Menschen gebunden ist. Ratten leben in Gruppen zusammen. Männchen und Weibchen leben hierbei nicht getrennt. Sozialpartner markieren sich gegenseitig mit Urin, um den Zusammenhalt der Gruppe zu stärken. Es handelt sich um extrem soziale Tiere, welche innerhalb eines hierarchischen Systems kooperieren.

In freier Wildbahn lebt die Wanderratte in einem Erdbau, vorwiegend in der Nähe von fließendem Gewässer mit üppiger Vegetation, die ihr Schutz bietet. Sie geht gerne ins Wasser und kann gut schwimmen und tauchen. Der Erdbau ist meist mit einem gut verzweigten Gangsystem angelegt mit mehreren Nest- und Vorratskammern. Die Wanderratte ist sehr angriffslustig und kampfbereit sogar gegenüber weitaus größeren Tieren, die sie mit ihrem Biß tödlich verletzen kann. Wanderratten sind Allesfresser und dämmerungsaktiv [34].

3.3.2 Cavia aperea

Das gemeine Meerschweinchen ist nahezu in ganz Südamerika verbreitet. Es bewohnt Grasflächen und Gebirgsregionen bis in über 4000 Meter Seehöhe. Meerschweinchen sind dämmerungsaktive, herbivore Tiere, die selbstgegrabene Baue oder Höhlen als Unterschlupf bevorzugen und in kleinen Gruppen von fünf bis zehn Tieren zusammenleben. Da Meerschweinchen nicht sehr gut sehen können, sind Gehör und Geruchssinn extrem gut ausgebildet, um vor Freßfeinden geschützt zu sein.

3.3.3 Equus

Die domestizierten Pferdearten findet man weltweit. Die wildlebenden Formen findet man heute noch in Ost- und Südafrika. Pferde sind herbivore und überwiegend dämmerungs- und nachtaktive Tiere. Normalerweise leben sie in Herden zusammen.

3.3.4 Callithrix jacchus

Die Verbreitung der Weißbüschelaffen (*Callithrix jacchus*) war ursprünglich nur im Gebiet der Nordostküste Brasiliens, zum Schutz der Art wurde er zudem im südöstlichen Brasilien eingeführt, wo er sich wieder prächtig vermehrt. Sie gehören zur Familie der Krallenaffen und sind tagaktiv. Sie bewohnen unterschiedliche Habitate von Waldrändern bis tief im Innern der Wälder. Mit raschen Bewegungen laufen sie über die Äste und können zudem gut springen. Sie leben in Gruppen mit Familienclanstrukturen. Das natürliche Nahrungsangebot von Weißbüschelaffen besteht aus Früchten, Beeren, Nüssen, Insekten, Baumfröschen und sogar Kleinvögeln [53]. Weißbüschelaffen ernähren sich auch von Baumsäften aus Gummi- bzw. Kautschukbäumen. Nach N. Rowe ernähren sich Weißbüschelaffen sogar mehr als alle anderen Marmosetten von Baumsäften. Der Anteil von Baumsäften, bezogen auf die Gesamtfutteraufnahme, liegt bei Weißbüschelaffen bei 15 % [47]. Baumsäfte liefern den Krallenaffen hochwertige Kohlenhydrate und wichtige Mineralstoffe [54].

3.3.5 Talpa europeae

Der europäische Maulwurf ist in Großbritannien, Mittel- und Osteuropa beheimatet. Er bevorzugt gemäßigte Regionen und fehlt in den kühleren Gebieten Eurasiens ebenso wie in der Kaukasusregion und im Mittelmeerraum. Sein Lebensraum sind

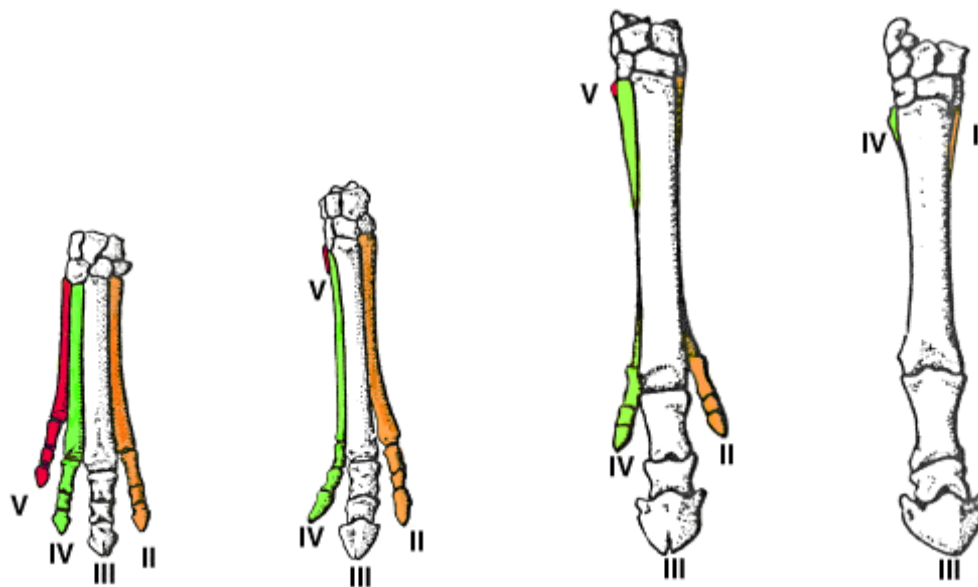
Wiesen, Grasland und Wälder. Die Maulwürfe haben keinen ausgeprägten Tag-Nacht-Rhythmus. Die Aktivität ist in drei Wach- und Schlafphasen aufgeteilt, die Wachphasen sind meist vormittags, nachmittags und gegen Mitternacht mit einer Dauer von jeweils etwa 4 bis 5 Stunden. Während dieser Phasen durchstreifen sie ihre Gänge auf der Suche nach Eßbarem. An die Erdoberfläche kommen Maulwürfe nur, wenn sie durch Nahrungsknappheit oder große Trockenheit gezwungen werden und dann ausschließlich nachts. Sie halten keinen Winterschlaf, sondern sind auch während der kälteren Jahreszeit aktiv. Um in dieser Zeit genug Nahrung zu finden, verlegen sie ihre Aktivitäten in tiefergelegene Bodenschichten und legen Vorräte an. Anatomisch sind sie hervorragend an ihre unterirdische Lebensweise angepasst. Die Vordergliedmaßen sind groß und haben außergewöhnlich kräftige Muskeln. Die Gänge werden mit den Vorderfüßen gegraben. Die losgewühlte Erde wird dabei nicht gleichmäßig, sondern haufenweise mit den Vorderfüßen hochgedrückt. Als Nahrung verpeist er Insekten, die in seine Wohngänge fallen. Vor allem ernährt er sich von Regenwürmern (80-100%), aber auch von Insektenlarven, Tausendfüßern, Käfern und Schnecken [7].

4. Knochen als Material für die Erforschung der evolutionären Entwicklung der Lebewesen

Unzählige körperliche Überreste und Spuren der Aktivität ausgestorbener Organismen gelangten vor über 10.000 Jahren, im Zeitalter des Pleistozäns oder früher, unter die Erde und wurden zu Fossilien. Die Existenz und Untersuchung dieser Fossilien ermöglicht es uns heute Erkenntnisse über ausgestorbene Tier- und Pflanzengruppen, wie zum Beispiel Trilobiten, Samenfarne und Dinosauriern zu erlangen.

Den Ausgrabungen und der Analyse von Knochenfunden, steht hier eine besondere Bedeutung zu. So können anhand der Anatomie und Eigenschaften der Knochen, unter der Beachtung der naturwissenschaftlichen Gesetze der Mechanik, zum Beispiel zuverlässige Aussagen über die Hauptbelastung eines Skeletts und damit darüber gewonnen werden, ob ein Tier vorwiegend im Wasser oder an Land lebte, ob es laufen und springen konnte oder eher einen schwerfälligen Gang hatte [16, 17]. Auch evolutionäre Veränderungen innerhalb einer Gattung, wie zum Beispiel bei den Pferden, konnten belegt werden. Hier wurde bereits von O.C. Marsh (1870) und illustriert durch eine Ausstellung des American Museum of Natural History auf eine

kontinuierliche Evolution der Pferde (Equus) über viele Zwischenstufen, ausgehend vom Eohippus (nun Hyracotherium genannt) im Tertiär hingewiesen. So ist unter anderem zu sehen, wie der zentrale Metacarpalknochen III zunehmend stärker wurde, während die Metacarpalknochen II, IV und V an Bedeutung verloren und beim Pferd von heute praktisch verloren sind (Abb. I.1). Die Reduktion der Knochen führte zu einer Verminderung des Gewichtes der Extremität. Dies verminderte das Drehmoment, so kann sich das Pferd schneller bewegen.



Hyracotherium	Miohippus	Meryhippus	Equus
vor 55- 45 Millionen Jahren	vor 33- 29 Millionen Jahren	vor 17- 11 Millionen Jahren	vor 5 Millionen Jahren

Abb. I.1: Entwicklung der Fußknochen beim Pferd

Enlow, D. H. und Brown, S. O. 1957 [21, 22], sowie Currey, J. D. 1962 [14] forschten an der Histologie von Dinosaurierknochen. Sie zeigten, daß es sich um Lamellenknochen mit sehr guter Vaskularisation handelt, im Gegensatz zu Lamellenknochen von Reptilien und kleinen oder fleischfressenden Säugetieren.

J. D. Currey hielt es für möglich, daß es sich hierbei in gewissem Maße um eine höhere physiologische Spezialisierung der Dinosaurier handelt, als es in lebenden Reptilien zu sehen ist.

Forschung anhand konservierter DNS im Knochen wird wohl aufgrund der Anreicherung von natürlichem radioaktiven Uran nicht möglich sein, da dessen Strahlung in wenigen Millionen Jahren die DNS weitgehend zerstört, so Prof. Pfretschner, Uni Tübingen.

5. Materialeigenschaften der Knochen

5.1 Zusammensetzung und Funktion der Knochen

Knochen sind eine biologische Gewebeform bestehend aus organischer- und anorganischer Substanz. Der organische Anteil (30%) setzt sich zu 95% aus Kollagen Typ I und zu 5% aus Nicht- Kollagen- Proteinen, wie zum Beispiel Osteokalzin, Osteonektin und Knochenproteoglykanen zusammen, während der anorganische Anteil (70%) zu 95 % aus Knochen- Hydroxylapatit und zu 5 % aus Magnesium-, Natrium- und Kalium- Fluoriden und Chloriden besteht.

Knochen- Hydroxylapatit ist kein reines Hydroxylapatit der Summenformel $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, sondern entspricht der Grundstruktur der Knochen und Zähne. Es enthält in seiner chemischen Form einen hohen Anteil an Carbonat (6%) [38], welches den Phosphatanteil ersetzen kann. Neben den Calciumionen sind auch Hydroxylgruppen teilweise durch andere Ionen, wie Strontium für Calcium und Fluor- oder Chloridionen für die Hydroxylgruppe ersetzt. Knochen- Hydroxylapatit nimmt so keine monomorphe Kristallstruktur ein und bekommt seinen einzigartigen Charakter [44]. Aufgrund der sehr geringen Molekülgröße von 30-70 Å besitzen sie eine enorme Oberfläche zwischen ungefähr 100 und 200 m²/g Knochen [28, 41, 43].

Untersuchungen wurden von Biologen, Zahnärzten, Mineralologen, Geologen und vielen anderen durchgeführt. Dieses breite Interesse an den Apatiten kommt nicht zuletzt dadurch zustande, daß der größte Anteil von Calcium und Phosphaten in der Erdkruste vorkommt. Calcium und Phosphat kommen hier in glühendem- und Sedimentgestein nahezu ausschließlich in einer Form von Apatit vor. Apatit leitet sich vom altgriechischem $\acute{\alpha}\pi\alpha\tau\acute{\alpha}\nu$, $\acute{\alpha}\text{patan}$, „täuschen“ ab.

Hydroxylapatit wird als Biomaterial beim Knochenersatz, zum Teil in Kombination mit β -Trikalziumphosphat, oder als bioaktive Beschichtung von Titanimplantaten zur Verbesserung des Knocheneinbaus eingesetzt. Außerdem dient es bei der chromatografischen Trennung von Eiweißstoffen als stationäre Phase in der Säule.

Die Knochen bilden mit biege-, zug-, druckfesten und elastischen Eigenschaften als Stützelemente das Skelett. Im Rahmen seiner Aufgabe als Calcium- und Phosphatdepot erfüllt der Knochen eine wichtige Funktion zur Calciumhomöostase. Weiterhin stellt der Knochen einen wichtigen Speicher für essentielle Ionen dar wie Magnesium, Kalium und Carbonat. Der Knochen schützt auch vor der Entwicklung

einer systemischen Azidose und unterstützt die Niere und den Respirationstrakt, das Säure- Base- Gleichgewicht aufrechtzuerhalten [23]. Schädel- und Rumpfknochen schützen das ZNS und die Thoraxorgane. Im Knochenmark findet die Blutbildung statt.

Materialprüfungen ergaben, daß Sauropodenknochen einem Körpergewicht von über 100 Tonnen Stabilität verliehen. Die Knochen besitzen die gleiche Elastizität wie Eichenholz und die gleiche Zugfestigkeit wie Kupfer. Die Druckfestigkeit ist etwas höher als die von Sandstein und die Biegefestigkeit ist mit Flußstahl vergleichbar [27].

5.2 Anatomie der Extremitätenknochen

Umgeben sind die Knochen von einer Knochenhaut, dem Periost. Von ihr geht die embryonale Knochenbildung und nach Verletzung auch die Regeneration des Knochens aus (Geflecht- oder Primärknochen). Die Knochen der Extremitäten bestehen aus Lamellenknochen oder Sekundärknochen, diese unterscheiden sich makroskopisch in einer äußeren kompakten Schicht, der Substantia compacta, von einer inneren Schicht mit einem lockeren Maschenwerk aus feinen Knochenbälkchen, der Substantia spongiosa. Die Knochenbälkchen sind entsprechend den statischen Anforderungen verteilt und bilden je nach Zug- und Druckbelastung Spannungslinien. Die verbreiterten Enden der langen Röhrenknochen, die sog. Epiphysen bestehen hauptsächlich aus Spongiosa, die von einer dünnen Schicht aus Substantia compacta überzogen ist, außerdem besitzen die Epiphysen auf den Gelenkflächen hyalinen Knorpel. Der Knochenschaft, die Diaphyse, besteht fast vollständig aus Compacta und etwas Spongiosa an der inneren Oberfläche, welche die Knochenmarkshöhle umgibt. Die Räume zwischen den Trabekeln der Spongiosa und die Markhöhlen in den Diaphysen der Röhrenknochen enthalten das Knochenmark. [36]

6. Aufgabenstellung

Wir stellen uns die Frage, ob sich im Laufe der Evolution die Materialeigenschaften des Knochens geändert haben. Unser Ziel war es die Eigenschaften der Knochen von Lebewesen, die sich stammesgeschichtlich zu unterschiedlichen Zeiten entwickelt haben, zu bestimmen und zu vergleichen, um so eventuell Rückschlüsse auf die Entwicklung des Knochens vornehmen zu können.

II. Material und Methoden

1. Material und Materialgewinnung

Als Untersuchungsexemplare standen uns die Kadaver von 5 Amphibien, 7 Reptilien und 36 Säugetiere, vor allem Ratten zur Verfügung, woraus sich eine Probenanzahl von 144 ergab. 93 der Proben waren Femora, 51 Tibiae. Die Anzahl der Amphibien und Reptilien begrenzte sich vor allem dadurch, daß viele Arten vom Aussterben bedroht sind, bzw. nahe bedroht sind (Tab. 1). Die Amphibien und einen Teil der Reptilien bekamen wir aus dem Institut für veterinärmedizinische Betreuung niederer Wirbeltiere und Exoten, exomed. Der Schwertschwanzmolch war mumifiziert. Die restlichen Reptilien stammen aus dem Reptilienzoo in Regensburg. Die Säugetiere kamen im wesentlichen aus dem Tierstall unseres Institutes, bzw. aus der Roßschlachterei Bredel in Berlin und dem Institut für klinische Pharmakologie.

Bei den vergleichenden Untersuchungen der Materialeigenschaften und der Organeigenschaften entschieden wir uns für die Femora, bzw. Tibiae da diese unter den verschiedenen Spezies in der Anatomie große Ähnlichkeiten aufweisen und eine klare Abgrenzung zwischen den Epi- und Diaphysen erkennen lassen.

Die Präparation der Knochenpräparate erfolgte, nach der Hautentfernung, durch lösen der Muskelgruppen vom distalen zum proximalen Ende der Extremität. Die Epiphysen wurden mit einer Diamantkreissäge (Proxxon, Wildeshausen) abgetrennt. Das Mark wurde mittels Zahnseide entfernt.

1.1 Voruntersuchungen

Die Vorversuche für die Materialeigenschaften der Knochen führten wir an männlichen Ratten durch, um geschlechtsspezifische Einflüsse auszuschließen. Diese stammten alle aus unserem Institut.

1.1.1 Alter

An 17 Exemplaren untersuchten wir, in wie weit das Alter der Tiere die folgenden Untersuchungen beeinflußt. Die Ratten waren im Alter zwischen einem und

viereinhalb Monaten. Sie wurden untersucht auf die Dichte, den Wasser- und Mineralgehalt, sowie auf die Mineralzusammensetzung der Femora.

1.1.2 Körperseitenunterschiede

In einem weiteren ebenso gestalteten Vorversuch mit 30 männlichen Ratten wurden mögliche Seitenunterschiede zwischen rechtem und entsprechendem linken Extremitätenknochen eines Tieres betrachtet.

1.1.3 Untersuchung des Einflusses der Lagerung bei -20 °C

Die Amphibien-, Reptilien- und Weißbüscheläffchenkadaver waren für 1 ½ Monate bis zu 2 ½ Jahren bei -20°C gefroren, um die Verwesung der Tierkadaver zu vermeiden, bevor sie untersucht wurden. Den Einfluß des Gefrierens auf die Materialeigenschaften der Knochen untersuchten wir, indem wir bei einer Versuchsreihe von 24 männlichen Ratten die Extremitätenknochen präparierten und die der linken Seite für mindestens 3 Monate bei -20°C eingefroren, bevor wir die Knocheneigenschaften bestimmten.

1.1.4 Trockengewicht

Die präparierten Knochen wurden auf Petrischalen im Trockenofen bei 90°C für 5 Tage getrocknet. Alle 24 Stunden wurde das Trockengewicht mit der Mikrogrammwaage (Sartorius type 1801) gemessen.

Klasse	Art	Rasse	dt. Bezeichnung	Naturschutz	Geschlecht	Alter/ Monat	Körpergewicht/ g	Anzahl
Amphibien	Rana temporaria	R. t. linum	Grasfrosch	V***		WF****		4
	Cynops ensicauda		Schwertschwanzmolch	nahe bedroht in Japan		WF****		1
Reptilien	Iguana iguana		Grüner Leguan	App. II**		72	1900	1
	Petrosaurus thalassinus		Blauer Felsenleguan		m	180		1
	Cyclura cornuta		Nashornleguan	VU *, App. I**	m	228	6000	1
	Chameleon melleri		Elefantenhornchamäleon	App. II**		WF*		1
	Varanus exanthematicus		Steppenwaran	App. II**		96	910	1
	Varanus acanthurus		Stachelschwanzwaran	App. II**	w	168		1
	Testudo hermanni		griech. Landschildkröte	LR/ nt*, App. II**	m	120	595	1
Mammalia	Ratus norwegicus	Sprague Dawley	norwegische Ratte		m/ w	1,1- 4,4	100- 430	30
	Cavia aperea	C. a. porcellus, Dunkin Harley	Hausmeerschweinchen		m		350/ 400	2
	Equus		Pferd		m			1
	Callithrix jacchus		Weißbüscheläffchen, Mamorset	App. II**	m		330/ 490	2
	Talpa europaea		Maulwurf		m	WF****	41	1

Tab. II.1: Untersuchungsexemplare

*) IUCN: International Union for the Conservation of Nature and Nature Resources heute bekannt als World Conservation Union

LR/ nt: niedriges Risiko/ nahe bedroht

VU: verletzlich, die Arten besitzen ein hohes Risiko auszusterben in mittelfristiger Zukunft

**) CITES: Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora

App. I: enthält Arten, die vom Aussterben bedroht sind. CITES verbietet generell den kommerziellen internationalen Handel dieser Arten. App. II: enthält Arten, die nicht unbedingt jetzt vom Aussterben bedroht sind, aber sie könnten es werden, wenn der Handel nicht scharf kontrolliert wird.

***V: auf der Vorwarnliste in Deutschland nach FFH- Richtlinie

****WF: Wildfang

2. Untersuchung der Materialeigenschaften

2.1 Dichte

Die Dichte der Knochen ermittelten wir mit Pyknometergefäßen unterschiedlicher Größe. Pyknometer sind meist birnenförmige Wägegefäße mit äußerst genau bestimmten Volumen. Sie sind mit einem geschliffenen und durchbohrten Glasstopfen versehen. Das Meßprinzip beruht auf der Verdrängung der im Gefäß befindlichen Flüssigkeit. Zunächst ermittelten wir das Gewicht der frisch präparierten Knochen, nachdem das Mark entfernt wurde, mit einer Mikrogrammwaage (Sartorius type 1801) und bestimmten so das Feuchtgewicht, m_{Feucht} . Die Pyknometergefäße wurden vollständig mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt. Dann wurde das Gewicht des mit NaCl- Lösung gefüllten Pyknometers, $m_{\text{Pyknometer}}$, mit der Waage bestimmt. Nun gaben wir den frisch präparierten Knochen in das gefüllte Pyknometer. Nach aufsetzen des Glasstopfens wurde die aus der Kapillare ausgetretene überschüssige Flüssigkeit, die noch am Gefäß haftete, sorgfältig mit Fliesspapier entfernt. Das Gefäß mit dem Knochen wurde erneut gewogen, $m_{\text{Pyknometer+ Probe}}$.

Für die Dichte, ρ , der Proben gilt:

$$\rho_{\text{Probe}} [\text{g/cm}^3] = \frac{m_{\text{Feucht}} [\text{mg}] \times \rho_{\text{phys. NaCl - Lösung}} [\text{g/cm}^3]}{m_{\text{Pyknometer}} [\text{g}] + m_{\text{Feucht}} [\text{mg}] - m_{\text{Pyknometer + Probe}} [\text{g}]}$$



Abb. II.2: Pyknometer

2.2 Wassergehalt

Nach der Dichtebestimmung wurden die Knochen auf Petrischalen im Trockenofen bei 90°C für mindestens 24 h getrocknet und anschließend das Trockengewicht, m_{Trocken} , gemessen. Die Zeitdauer von einem Tag ergab sich aus einem entsprechenden Vorversuch.

Für die Ermittlung des prozentualen Wassergehaltes der Proben wählten wir als Bezug das Trockengewicht anstatt des Feuchtgewichtes, um größere Schwankungen der Werte zu vermeiden.

Für den prozentualen Wassergehalt der Proben gilt:

$$\text{Wassergehalt}[\%] = \left(\frac{m_{\text{Feucht}}[\text{mg}] - m_{\text{Trocken}}[\text{mg}]}{m_{\text{Trocken}}[\text{mg}]} \right) = \left(\frac{m_{\text{Feucht}}[\text{mg}]}{m_{\text{Trocken}}[\text{mg}]} - 1 \right) \cdot 100\%$$

2.3 Mineralgehalt

Die getrockneten Knochenproben wurden in thermostabilen Glasröhrchen im Muffelofen bei 620 °C für 24 h verascht und anschließend das Gewicht, m_{Asche} , bestimmt.

Der prozentuale Mineralgehalt ergab sich dann als:

$$\text{Mineralgehalt}[\%] = \left(\frac{m_{\text{Asche}}[\text{mg}]}{m_{\text{Trocken}}[\text{mg}]} \right) \cdot 100\%$$

2.4 Mineralzusammensetzung

Die Mineralien Calcium und Magnesium bestimmten wir quantitativ mit dem Verfahren der Flammen- Atom- Absorptions-, bzw. Emissions- Spektroskopie, während Phosphat spektrophotometrisch ermittelt wurde.

Bei der Atom- Absorptions-, bzw. Emissions- Spektroskopie mittels des Perkin Elmer Atomic Absorption Spektrometer 3100 wird die zu analysierende Probe durch Flammen in den Dampfzustand überführt. Bei dem Verfahren der Atomabsorption wird anschließend durch die optisch dünne Atomwolke ein Lichtstrahl geschickt, der der Wellenlänge einer Analysenlinie des nachzuweisenden Elements entspricht. Die Atome absorbieren die charakteristische Wellenlänge, dies entspricht Übergängen aus ihrem Grundzustand in angeregte Energiezustände. Die Elementkonzentration in der Atomdampf Wolke ist der gemessenen Absorption proportional, dagegen werden bei der Atomemission die Atome durch die thermische Energie der Flamme in einen angeregten, instabilen Zustand überführt. Die Atome kehren spontan wieder in ihren Grundzustand zurück und senden dabei Licht einer diskreten Wellenlänge aus. Die Intensität der ausgesandten Wellenlänge ist proportional zur Anzahl der angeregten Atome [5].

Mit dem Lambda 2 UV/ VIS Spektrophotometer von Perkin Elmer wird die Messung der Lichtabsorption des zu analysierenden Stoffes in einer Küvette in Abhängigkeit von der entsprechenden Wellenlänge durchgeführt. Ein von einer VIS-Lampe ausgesandeter Lichtstrahl wird über einen Monochromator (Prisma oder Gitter) geleitet, so daß Licht nur einer Wellenlänge, in unserem Fall 720 nm, entsteht. Durch einen halbdurchlässigen Spiegel wird der Lichtstrahl in 2 kohärente Strahlen aufgespalten, von denen der eine über die Leerwertlösung und der andere über die Analyseprobe geleitet wird. Beide Strahlen werden jeweils hinter den Küvetten von Detektoren erfaßt, die die Extinktion der Lösung erfassen. Der Lichtstrahl erfährt beim Durchdringen der Küvette einen Intensitätsverlust, der dadurch zustande kommt, daß durch die von ihm gelieferte Energie die Elektronen in dem zu untersuchenden Molekül in ein höheres Energieniveau springen. Der gemessene Intensitätsverlust muß um den Faktor korrigiert werden, um den er in der Blindlösung hervorgerufen wird.

Bei beiden Geräten werden zunächst Standardlösungen definierter Konzentration eingelesen, anhand derer die unbekanntes Elementkonzentrationen computergestützt bestimmt werden.

Für die Ermittlung der jeweiligen Mineralkonzentrationen im Aschegewicht der Proben verwendeten wir elektrolytfreie Plastikgefäße und Einmalpipetten. Glashaltige Materialien waren mit PBS oder konzentrierter Salzsäure gespült, um einen Eintrag von Elektrolyten in die Probenlösungen zu vermeiden.

Die veraschten Knochen wurden in 5 ml 10%iger HCl - Lösung aufgelöst und im Verhältnis 1: 101 mit Aqua bidest. verdünnt.

2.4.1 Calciumkonzentration

In den Proben ist Phosphat enthalten, das die Eigenschaft besitzt sich mit den Ionen der Erdalkalimetalle zu binden und so die atomabsorptionsspektrometrische Bestimmung zu stören. Um eine vollständige Dissoziation der Calciumionen vom Phosphat zu erreichen, wurden der Probe, sowie den Standardlösungen, ca. 1%iges Lanthanchloridlösung im Überschuß zugesetzt. Es bildete sich schwerlösliches Lanthanphosphat. Die Calciumkonzentration der Proben wurde dann aus den Reaktionsgefäßen mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie bei einer Wellenlänge von 422,7 nm bestimmt.

2.4.2 Phosphatkonzentration

(mod. nach C. H. Fiske & Y. Subbarow (1929))

Das Prinzip der Phosphatbestimmung beruht darauf, daß sich Phosphat mit Ammoniummolybdat zu Ammoniumphosphomolybdat verbindet, welches sich zu Molybdänblau reduzieren läßt. Die Extinktion dieses blauen Farbstoffes wird am Photometer gegen eine Leerwertprobe, bei einer Wellenlänge von 720 nm gemessen. Das Meßgerät wird mit einer Standardreihe von 3 Standards einer PO_4^{3-} - Lösung kalibriert [24].

2.4.3 Magnesiumkonzentration

Für die Bestimmung der Magnesiumkonzentration wurde die Probe nach der Lanthanchloridzugabe, stärker mit Aqua bidest. verdünnt und anschließend bei einer Wellenlänge von 285,2 nm im Atomabsorbtionsspektrometer bestimmt.

3. Berechnungsgrundlagen

3.1 Seitenfehler

Um den prozentualen Seitenfehler des Wassergehaltes zu bestimmen, haben wir das Trockengewicht eines rechten und entsprechenden linken Knochens mit seinem jeweiligen Feuchtgewicht ins Verhältnis gesetzt und beide Werte multipliziert.

$$\text{Seitenfehler (SF) H}_2\text{O – Gehalt(\%)} = \left| \left(\left(\frac{m_{\text{Trockeng.re}} [\text{mg}]}{m_{\text{Feuchtg.re}} [\text{mg}]} \right) \cdot \left(\frac{m_{\text{Trockeng.li}} [\text{mg}]}{m_{\text{Feuchtg.li}} [\text{mg}]} \right) \right) \cdot 100\% \right|$$

Zur Bestimmung des prozentualen Seitenfehlers des Mineralgehaltes, setzten wir das Aschegewicht eines rechten und entsprechenden linken Knochens mit seinem jeweiligem Trockengewicht ins Verhältnis und multiplizierten beide Werte.

Seitenfehler (SF) Mineral – Gehalt(\%):

$$\left| \left(\left(\frac{m_{\text{Aschg.re}} [\text{mg}]}{m_{\text{Trockeng.re}} [\text{mg}]} \right) \cdot \left(\frac{m_{\text{Aschg.li}} [\text{mg}]}{m_{\text{Trockeng.li}} [\text{mg}]} \right) \right) \cdot 100\% \right|$$

3.2 Gefrierfehler

Der Wassergehalt, bzw. Mineralgehalt der gefrorenen und nicht gefrorenen Knochen wurde ins Verhältnis gesetzt, um den Gefrierfehler zu bestimmen.

$$\text{Gefrierfehler H}_2\text{O – Gehalt: } 1 - \frac{\text{Wassergehalt}[\text{mg}]_{\text{gefroreneFemora}}}{\text{Wassergehalt}[\text{mg}]_{\text{nichtgefroreneFemora}}}$$

$$\text{Gefrierfehler Mineral – Gehalt: } 1 - \frac{\text{Mineralgehalt}[\text{mg}]_{\text{gefroreneFemora}}}{\text{Mineralgehalt}[\text{mg}]_{\text{nichtgefroreneFemora}}}$$

3.3 Statistischer Vergleich von Mittelwerten

Die Ergebnisse der Materialeigenschaften Dichte, Wasser- und Mineralgehalt bei der Untersuchung der Körperseitenunterschiede und des Einflusses der Lagerung bei minus 20°C auf die Proben testeten wir mit Hilfe des t- Testes für 2 unverbundene Stichproben auf statistisch signifikante Unterschiede. Die Werte der rechten Extremitätenknochen, bzw. der Tiefgefrorenen ergaben die mit x_1, x_2, \dots, x_{n_1} bezeichnete Stichprobe und die Werte der linken Extremitätenknochen, bzw. entsprechender nicht tiefgefrorener Knochen ergaben die mit y_1, y_2, \dots, y_{n_2} bezeichneten Stichprobe. Unsere Nullhypothese H_0 besagte, daß die Mittelwerte x , bzw. y der jeweiligen Materialeigenschaft der einen Stichprobe die der anderen entsprachen[6].

Prüfgröße:

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\sqrt{\frac{s^2}{n_1} + \frac{s^2}{n_2}}},$$

wobei die gepoolte Varianz s^2 sich aus den Werten beider Stichproben wie folgt errechnet:

$$s^2 = \frac{(n_1 - 1)s_1^2 + (n_2 - 1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \text{ mit}$$

$$s_1 = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n_1 - 1}}, \text{ bzw. } s_2 = \sqrt{\frac{\sum(y_i - \bar{y})^2}{n_2 - 1}}.$$

Die Nullhypothese wurde abgelehnt, falls $|t| > t_{n_1+n_2-2; 1-\alpha}$ [10].

III. Ergebnisse

A Methoden

1. Proben

1.1 Alter

Die Untersuchung der 17 männlichen Ratten im Alter zwischen 32 und 133 Tagen hinsichtlich der Materialeigenschaften Dichte in g/cm^3 , prozentualer Wasser- und Mineralgehalt des Knochens, sowie der prozentuale Calcium- Magnesium- und Phosphationengehalt im veraschten Knochen ergaben folgende Ergebnisse.

Es zeigte sich, daß die Knochen junger Tiere, die noch nicht ausgewachsen waren, bis zum Alter von 3 Monaten an Dichte zunahm, von $1,49 \text{ g/cm}^3$ mit einem Monat bis zu $1,94 \text{ g/cm}^3$ mit viereinhalb Monaten, wobei die Dichtezunahme der Knochen ab dem dritten Lebensmonat annähernd gleich blieb.

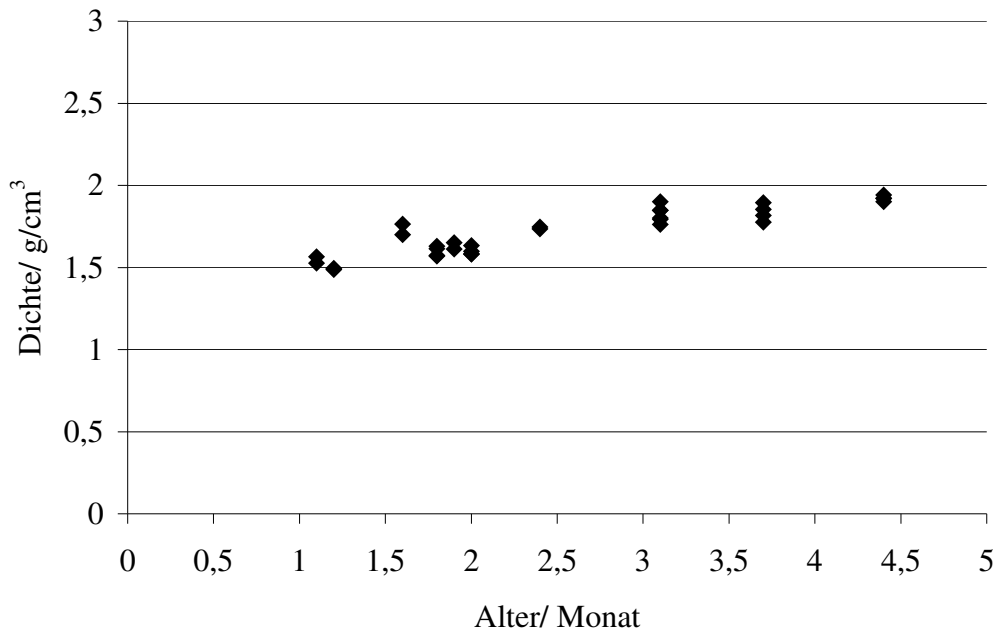


Abb. III.1: Die Dichte in g/cm^3 von Femora in Bezug auf das Alter in Monaten der männlichen Ratten.

In Bezug auf den Wassergehalt zeigte sich eine exponentielle Abnahme bei einem Regressionskoeffizienten r^2 von 0,76, während der Mineralgehalt in den Knochen, ähnlich der Knochendichte, bis zum dritten Lebensmonat anstieg von ca. 64% des Knochens auf 73 %, und dann annähernd gleich blieb.

Für die weiteren Untersuchungen entschlossen wir uns, aufgrund der Ergebnisse dieser Vorversuche, ausgewachsene Tiere ab dem dritten Lebensmonat zu wählen.

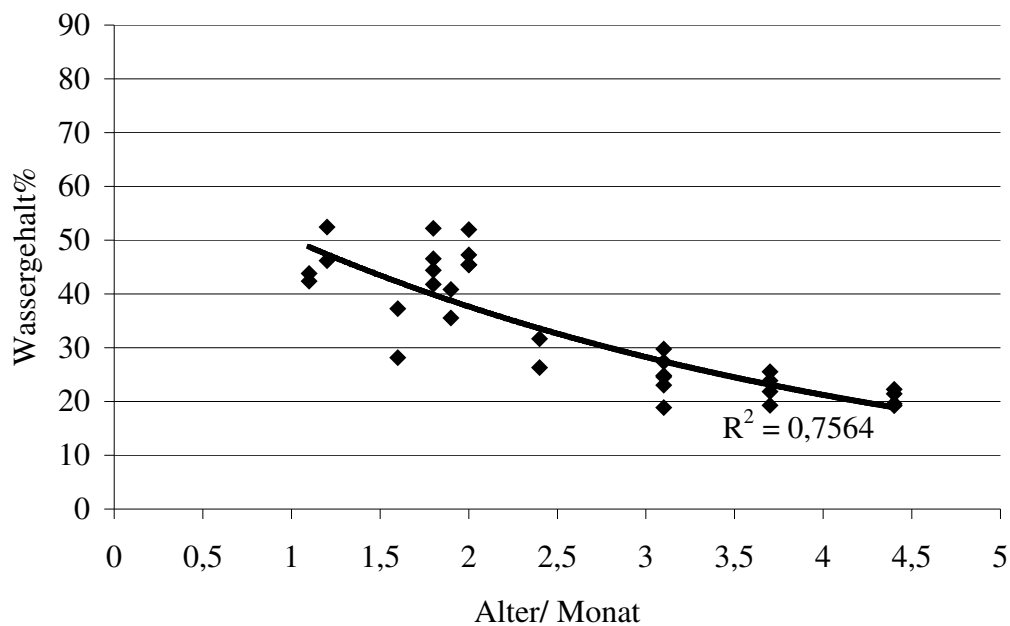


Abb. III.2: Der prozentuale Wassergehalt bezogen auf das Trockengewicht der Femora in Bezug auf das Alter in Monaten der männlichen Ratten.

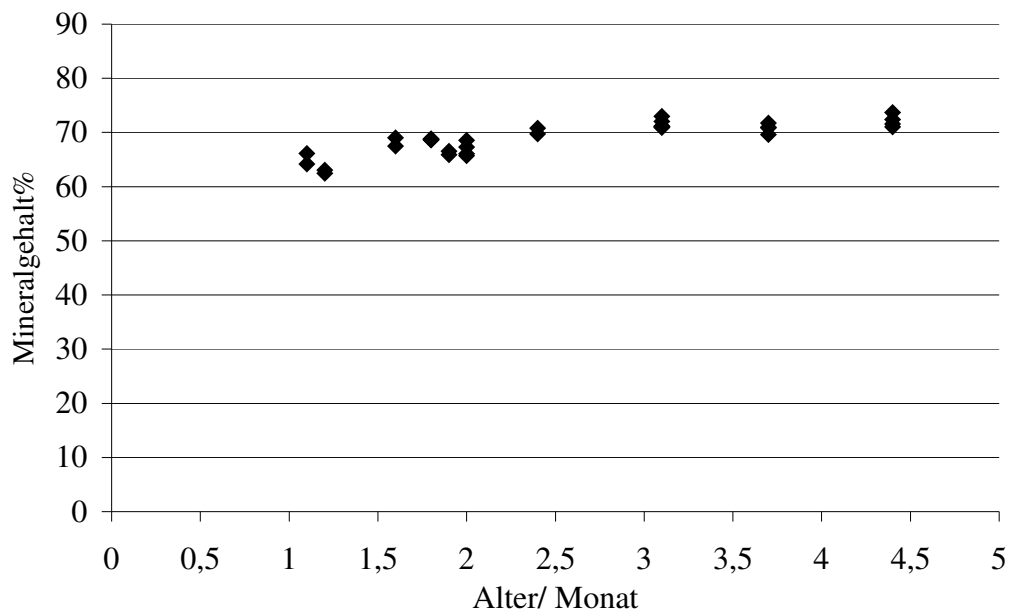


Abb. III.3: Der prozentuale Mineralgehalt der Femora in Bezug auf das Alter in Monaten der männlichen Ratten.

1.2 Körperseitenunterschiede

Bei Betrachtung der Materialeigenschaften eines rechten Femur in Bezug auf den jeweiligen linken eines Tieres zeigte sich, wie in der Tabelle Seitenvergleiche zusammengefaßt, daß die Schwankungen beim Wassergehalt mit bis zu 5,25 % größer waren, als beim Mineralgehalt mit maximal 2,62 %. Die mittlere prozentuale Abweichung beträgt beim Wassergehalt 2,12 % und beim Mineralgehalt 0,756 %.

ID re	ID li	m _{Feuchtg.re} [mg]	m _{Feuchtg.li} [mg]	m _{Trockeng.re} [mg]	m _{Trockeng.li} [mg]	m _{Aschg.re} [mg]	m _{Aschg.li} [mg]	SF- H2O- Gehalt%	SF- Mineral- Gehalt%
102.1	102.4	216,3	194,8	164,3	154,2	114,54	109,13	3,20	1,06
102.2	102.5	178,1	157,1	139,2	124,8	96,95	86,51	1,28	0,33
102.3	102.6	83,9	82,7	66,8	66,2	46,85	45,82	0,43	0,92
103.1	103.4	431,3	377	352,8	315,3	250,61	225,65	1,83	0,53
103.2	103.5	383,2	355,9	314,8	294,2	219,51	206,6	0,51	0,49
103.3	103.6	142	194,2	115,8	157,6	81,61	110,82	0,40	0,16
115.1	115.4	72,2	83,4	50	56,9	34,34	39,09	1,03	0,02
115.2	115.5	76,1	86,4	56,6	60,6	38,94	41,32	4,24	0,61
115.3	115.6	43,2	37,5	30	26,7	20,57	18,33	1,76	0,09
116.1	116.4	137,1	174,3	93,1	114,7	63,83	77,17	2,10	1,28
116.2	116.5	148,4	138	101,9	99,4	69,69	68,01	3,36	0,03
116.3	116.6	57,4	58	40,5	41,8	28,1	29,02	1,51	0,04
81.1	81.4	273,2	293,4	224,2	246	158,83	176,49	1,78	0,90
81.2	81.5	260,6	252,8	212,4	205,2	146,82	142,54	0,33	0,34
81.3	81.6	129	140,2	106,5	115,3	74,09	81,06	0,32	0,74
82.1	82.4	216,4	179,4	172,4	144,8	120,04	102,73	1,05	1,32
82.2	82.5	199,2	156,4	143,4	120,8	94,46	82,74	5,25	2,62
82.3	82.6	111,3	132,3	85	99	58,3	66,88	1,54	1,03
83.1	83.4	78,2	57,9	51,3	39,6	32,34	24,73	2,79	0,59
83.2	83.5	57,7	55,5	43,6	41,4	28,04	26,75	0,97	0,30
83.3	83.6	28,7	27,5	19,8	19,3	12,62	12,02	1,19	1,46
84.1	84.4	143	138	105,5	98	70,22	64,59	2,76	0,65
84.2	84.5	158,9	134,1	119,9	105,1	79,24	69,94	2,92	0,46
84.3	84.6	60,6	70,9	46,2	52,2	31,1	34,54	2,61	1,15
85.1	85.4	129,2	162,4	100,8	118,3	69,56	79,82	5,17	1,54
85.2	85.5	133,1	152,3	105,7	115,8	71,92	78,1	3,38	0,60
85.3	85.6	66,4	73,1	49,8	54,3	33,61	36,27	0,72	0,69
86.1	86.4	184,5	173,2	126,9	119,1	83,41	78,69	0,02	0,34
86.2	86.5	157,1	149,9	106,6	108,5	72,11	71,83	4,53	1,44
86.3	86.6	68,9	51,3	49,3	39,1	33,51	26,21	4,67	0,94

Tab. III.1: Vergleich des Wasser- und Mineralgehaltes der linken mit den jeweiligen rechten Femora der männlichen Ratten

Für die Dichte, den Wassergehalt und den Mineralgehalt der rechten und linken Femora der Rattenknochen errechneten wir den Mittelwert und testeten ihn vergleichend mit Hilfe des t- Testes, um festzustellen, ob die Mittelwerte der einen Seite die der anderen entsprechen. Bei einem Freiheitsgrad von 58 lagen die errechneten t- Werte innerhalb der Grenzen die die t- Tabelle vorgibt, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5 % ($p= 0,05$). Unsere Nullhypothese, die Mittelwerte der entsprechenden Materialeigenschaft beider Seiten entsprechen einander, konnte in allen drei Fällen beibehalten werden.

	Dichte	Wassergehalt	Mineralgehalt
s_1	0,11	9,42	2,04
s_2	0,12	9,13	2,37
s^2	0,01	89,08	4,88
t	-0,26	0,32	0,24

Tab. III.2: Ergebnisse des t- Testes für die Mittelwerte der rechten in Bezug auf die linken Femora der männlichen Ratten. Grenzen bei FG von 58 für t: $2,0017 > t > -2,0017$ mit $p= 0,05$.

1.3 Untersuchung des Einflusses der Lagerung bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$

Analog zu den Betrachtungen der Materialeigenschaften zwischen rechtem und linkem Femur eines Tieres siehe 1.2 verglichen wir nun die frischen, nicht tiefgefrorenen, rechten Femora in Bezug auf die jeweiligen gefrorenen linken Femora der Ratten.

Die Tabelle III.3 zeigt die prozentualen Unterschiede des Wasser- und Mineralgehaltes. Die Schwankungen liegen jeweils unter 1 %.

ID gefroren	ID nicht gefroren	Wassergehalt [mg] _{gef.}	Wassergehalt [mg] _{n,gef.}	Wassergehalt [mg] _{gef.}	Mineralgehalt [mg] _{gef.}	Mineralgehalt [mg] _{n,gef.}	Gefrierfehler: Wassergehalt	Gefrierfehler: Mineralgehalt
100.3	100.1	0,20	0,23	0,73	0,72	0,15	-0,01	
68.4	68.1	0,18	0,16	0,73	0,74	-0,11	0,02	
68.5	68.2	0,19	0,14	0,72	0,73	-0,30	0,01	
68.6	68.3	0,18	0,14	0,71	0,74	-0,32	0,04	
72.4	72.1	0,20	0,22	0,72	0,71	0,11	0,00	
72.5	72.2	0,19	0,24	0,71	0,71	0,22	-0,01	
72.6	72.3	0,20	0,24	0,72	0,71	0,17	-0,01	
75.4	75.1	0,36	0,44	0,69	0,68	0,19	-0,02	
75.5	75.2	0,34	0,49	0,68	0,66	0,31	-0,04	
75.6	75.3	0,43	0,48	0,67	0,68	0,11	0,02	
76.4	76.1	0,40	0,42	0,70	0,67	0,05	-0,04	
76.5	76.2	0,30	0,47	0,68	0,66	0,37	-0,02	
76.6	76.3	0,33	0,39	0,69	0,69	0,16	0,00	
89.3	89.1	0,44	0,42	0,64	0,66	-0,03	0,03	
90.3	90.1	0,42	0,52	0,69	0,69	0,20	0,00	
91.3	91.1	0,23	0,25	0,71	0,71	0,07	0,00	
92.3	92.1	0,19	0,30	0,72	0,71	0,36	-0,02	
93.3	93.1	0,27	0,25	0,71	0,73	-0,12	0,03	
94.3	94.1	0,19	0,21	0,72	0,74	0,10	0,02	
95.3	95.1	0,41	0,35	0,64	0,64	-0,18	-0,01	
96.3	96.1	0,33	0,42	0,69	0,69	0,23	-0,01	
97.3	97.1	0,26	0,33	0,71	0,70	0,22	-0,01	
98.3	98.1	0,45	0,42	0,68	0,70	-0,07	0,03	
99.3	99.1	0,32	0,32	0,70	0,70	0,02	0,00	

Tab. III.3: Vergleich des Wasser- und Mineralgehaltes der nicht gefrorenen mit den jeweiligen gefrorenen Femora der männlichen Ratten.

Für die Materialeigenschaften Dichte, Wassergehalt und Mineralgehalt der nicht gefrorenen und gefrorenen Femora der Ratten errechneten wir, wie beim Seitenvergleich, den Mittelwert und testeten ihn vergleichend mit Hilfe des t- Testes, um festzustellen, ob die Mittelwerte der einen nicht gefrorenen Seite, die der anderen Gefrorenen entsprechen. Bei einem Freiheitsgrad von 46 lagen die errechneten t- Werte innerhalb der Grenzen die die t- Tabelle vorgibt, bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit kleiner 5 % ($p= 0,05$). Unsere Nullhypothese, die Mittelwerte der entsprechenden Materialeigenschaft, ob nicht gefroren oder gefroren gelagerte Femora, entsprechen einander, konnte in allen drei Fällen beibehalten werden.

	Dichte	Wassergehalt	Mineralgehalt
s_1	0,19	9,72	2,41
s_2	0,18	11,80	2,83
s^2	0,03	116,95	2,91
t	0,18	-1,173	0,08

Tab. III.4: Ergebnisse des t- Testes für die Mittelwerte der nicht gefrorenen in Bezug auf die gefrorenen Femora der männlichen Ratten. Grenzen bei FG von 46 für t: $2,015 > t > - 2,015$ mit $p= 0,05$.

1.4 Trockengewicht

Bei der wiederholten Messung des Trockengewichtes zeigte sich, daß es bereits nach 24 Stunden es zu keiner signifikanten Gewichtsabnahme der Knochen mehr kam.

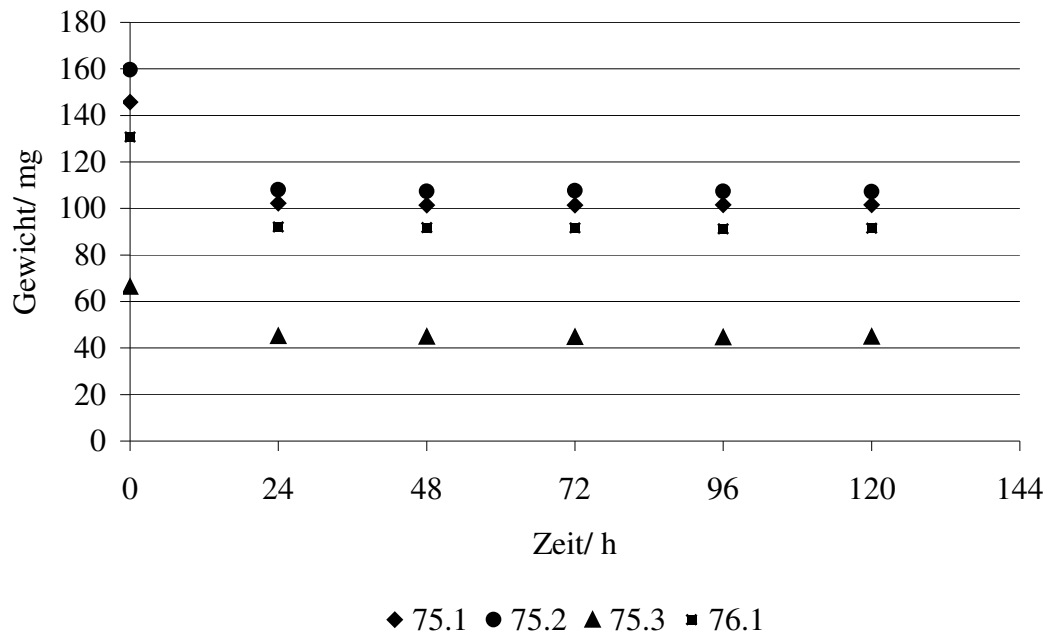


Abb. III.4: Abnahme des Knochengewichtes pro Stunde im Trockenofen am Beispiel von vier Rattenproben (75.1-3; 76.1).

B Ergebnisse

1. Dichte der Amphibien-, Reptilien- und Säugetierknochen

Die Dichte der Femora der Amphibien beträgt zwischen $1,09 \text{ g/cm}^3$ und $1,37 \text{ g/cm}^3$. Bei den Reptilienknochen ist sie zwischen $1,41 \text{ g/cm}^3$ und $1,94 \text{ g/cm}^3$ und bei den Säugetierknochen zwischen $1,72$ und $2,08 \text{ g/cm}^3$. Im Vergleich zu den Säugetier- und Reptilienproben haben die Amphibienproben die geringste Knochendichte. Bei den Reptilien haben die Knochenproben des Stachelschwanzwarans eine höhere Dichte, während die Knochenproben des Felsenleguans, des Chamäleons und der Schildkröte im unteren Dichtebereich liegen. Die Dichtewerte der Säuger sind relativ gleich verteilt zwischen den Arten. Die Abbildungen III.5-7 geben einen graphischen Überblick über die Ergebnisse.

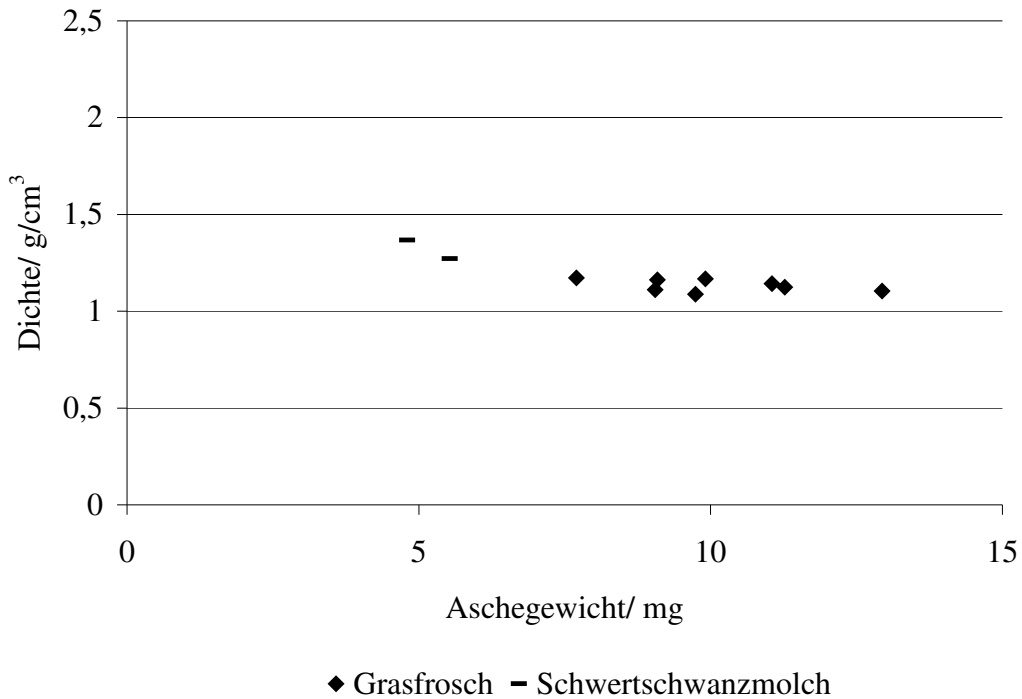


Abb. III.5: Amphibien: Dichte in g/cm³ der Femora bezogen auf das jeweilige Aschegewicht in mg der Knochen.

(Schwertschwanzmolch mumifiziert)

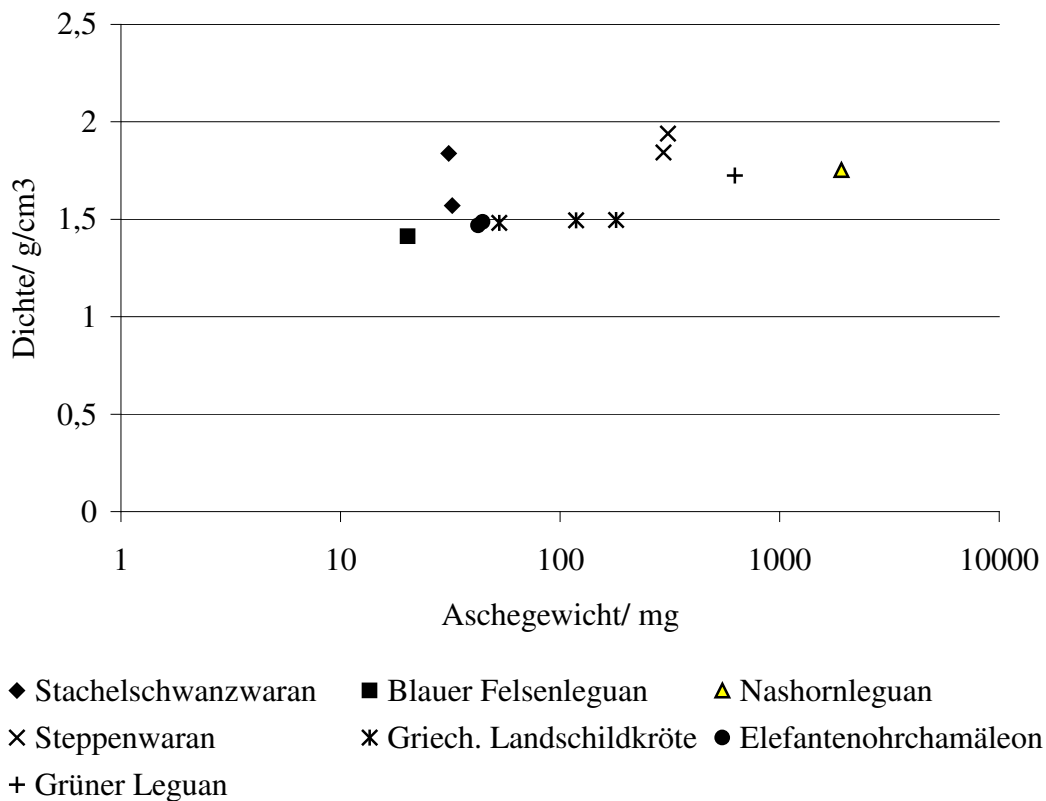
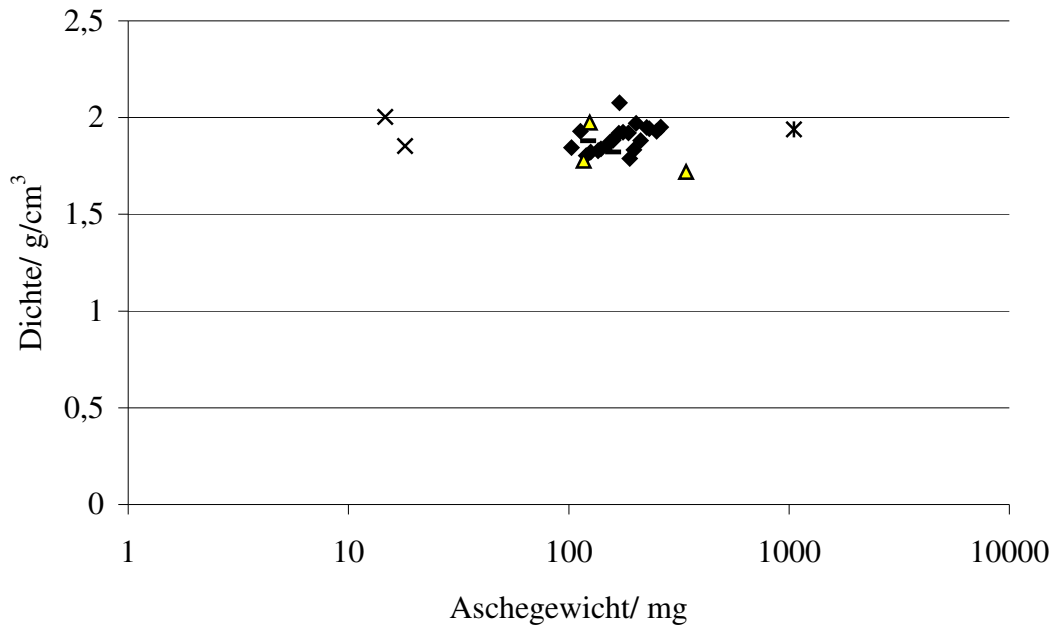


Abb. III.6: Reptilien: Dichte in g/cm³ der Femora bezogen auf das jeweilige Aschegewicht in mg der Knochen.



◆ Ratten – Meerschweinchen ▲ Weißbüscheläffchen × Maulwurf * Pferd

Abb. III.7: Säugetiere: Dichte der Knochen bezogen auf das jeweilige Aschegewicht der Knochen.

(Pferd: Kortikalis des Oberschenkelknochens)

2. Wassergehalt der Amphibien-, Reptilien- und Säugetierknochen

Bei der Bestimmung des Wassergehaltes im frisch präparierten Knochen, ermittelten wir bei den Grasfroschknochen die höchsten Werte von ca. 63 %- 79 % Wasser pro mg Trockengewicht. Die Proben des Molches sind mit einem Wassergehalt von ca. 20% deutlich niedriger. Bei den Reptilienproben ist der Wassergehalt der Knochen zwischen 17%- 59 %. Die Proben der Warane liegen mit einem Wassergehalt um 20% im unteren Bereich, während die griechische Landschildkröte, das Elefantenohrchamäleon und der blaue Felsenleguan einen höheren Wassergehalt von 45 %- 60% in Bezug auf das Trockengewicht der Knochen haben. Bei den Säugetierproben sind die Werte zwischen 12%- 40%.

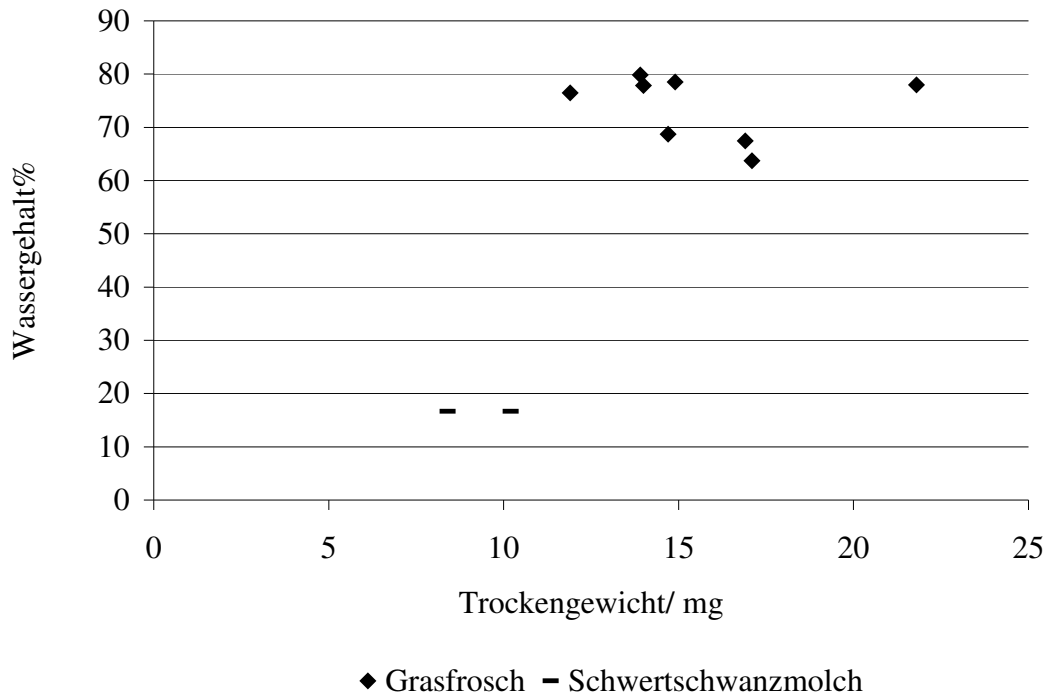


Abb. III.8: Amphibien: prozentualer Wassergehalt im frisch präparierten Knochen pro mg Trockengewicht der Knochen.

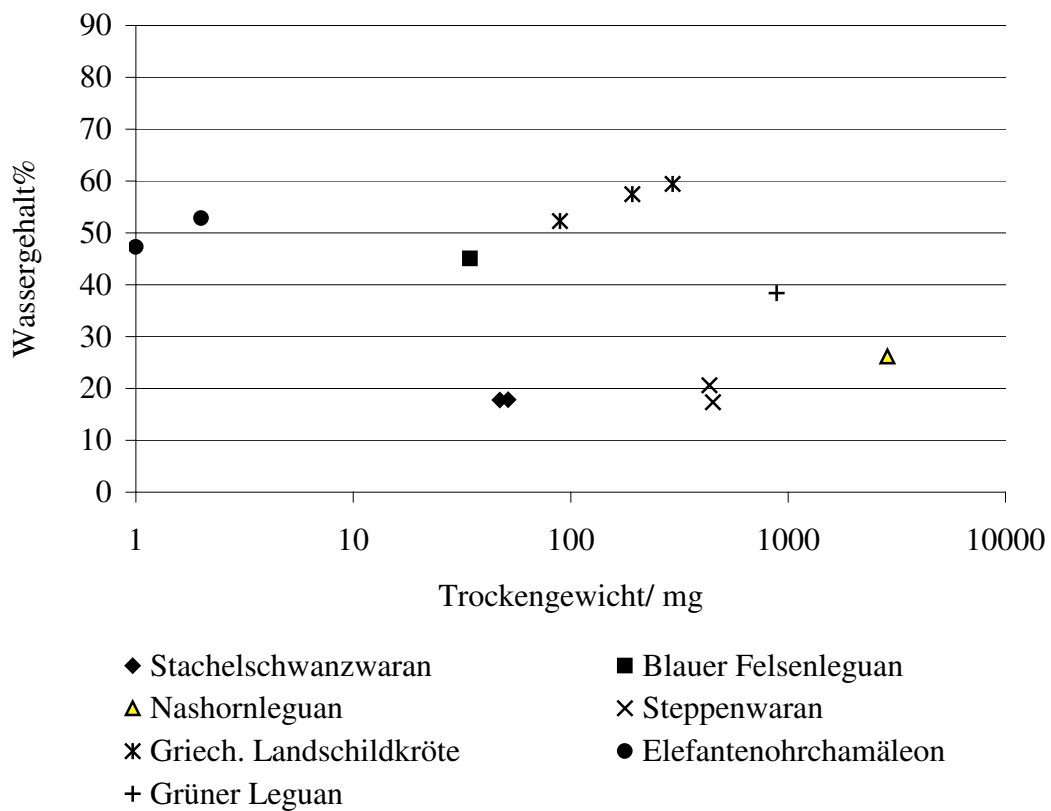
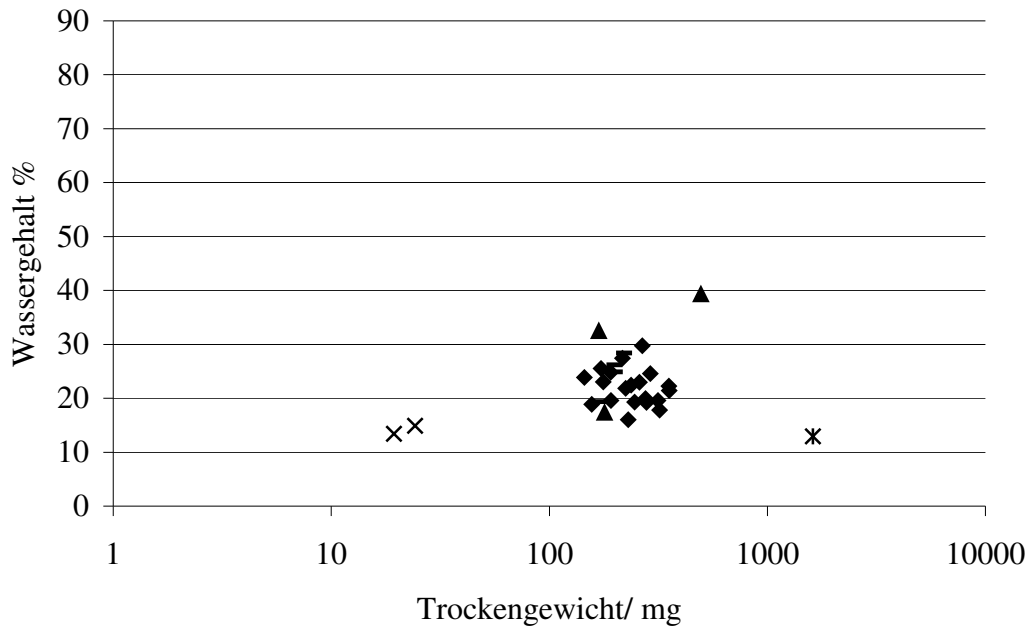


Abb. III.9: Reptilien: prozentualer Wassergehalt im frisch präparierten Knochen pro mg Trockengewicht der Knochen.



◆ Ratten – Meerschweinchen ▲ Weißbüscheläffchen × Maulwurf * Pferd

Abb. III.10: Säugetiere: prozentualer Wassergehalt pro mg Trockengewicht der Knochen.

(Pferd: Kortikalis des Oberschenkelknochens)

3. Mineralgehalt der Amphibien-, Reptilien- und Säugetierknochen

Der prozentuale Mineralgehalt am veraschten Knochen ist bei allen Tieren zwischen 55 % und 75 %. Bei den Proben der Amphibien- und Reptilienknochen sind die Werte mit 55 % bis 70 % zum Teil etwas niedriger als bei den Säugetierproben mit Werten zwischen 65 % und 75 %.

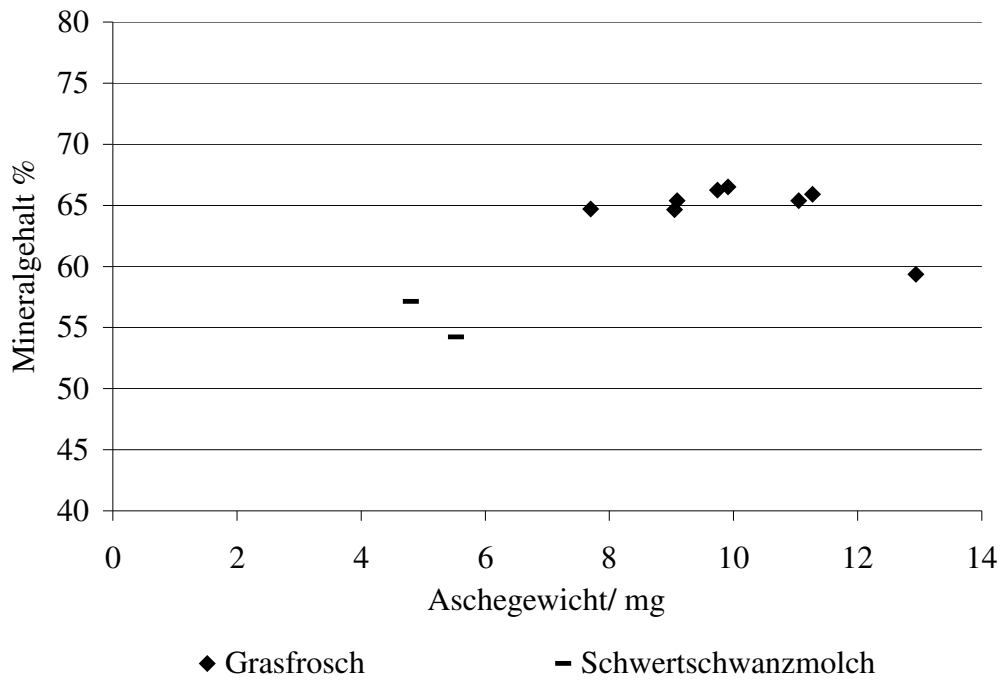


Abb. III.11: Amphibien: prozentualer Mineralgehalt pro mg Aschegewicht der Knochen.

(Schwertschwanzmolch mumifiziert)

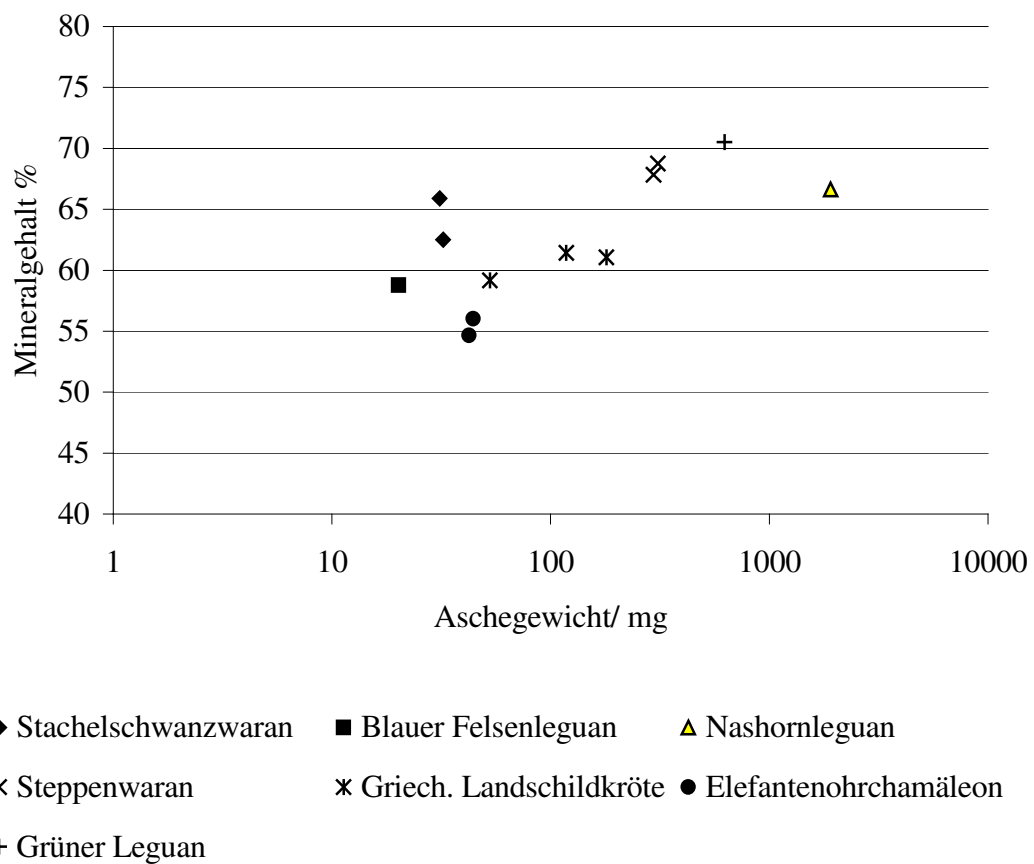
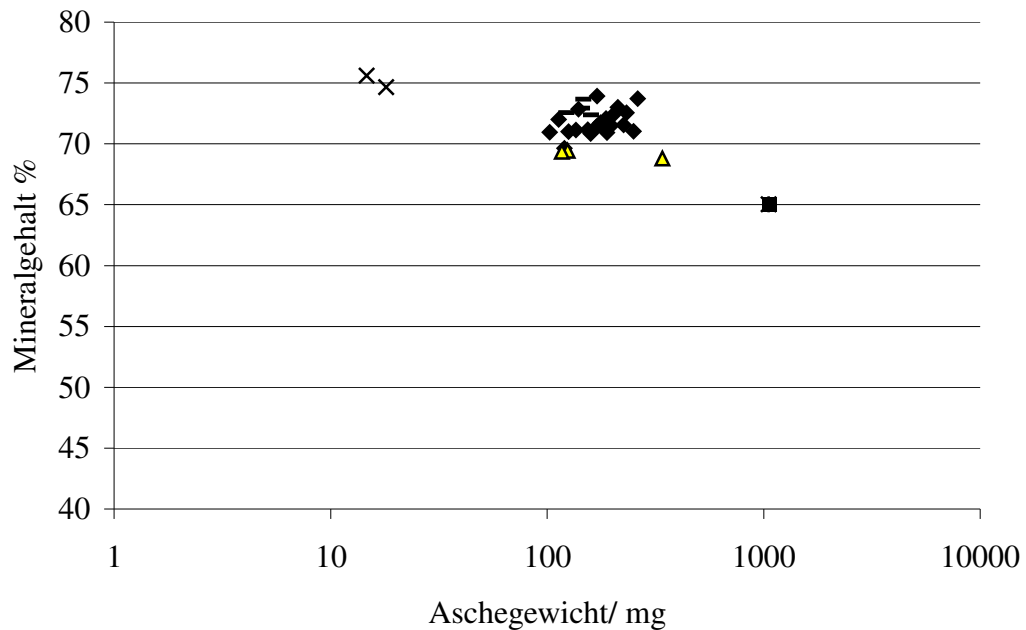


Abb. III.12: Reptilien: prozentualer Mineralgehalt pro mg Aschegewicht der Knochen.



◆ Ratten - Meerschweinchen ▲ Weißbüscheläffchen × Maulwurf ■ Pferd

Abb. III.13: Säugetiere: prozentualer Mineralgehalt pro mg Aschegewicht der Knochen

(Pferd: Kortikalis des Oberschenkelknochens)

4. Mineralzusammensetzung der Amphibien-, Reptilien- und Säugetierknochen

4.1 Calcium

Der Calciumanteil am Aschegewicht der Knochenproben liegt bei den Amphibien zwischen 28 %- 58 %, wobei die Proben des Schwertschwanzmolches einen höheren Calciumgehalt mit 58 % und 54 % aufzeigen. Der Calciumanteil der Grasfroschknochen liegt bei allen Werten bis auf einen zwischen 40 %- 49 %. Bei den Reptilienknochen sind die Unterschiede des Calciumgehaltes am geringsten, sie liegen zwischen 30 % und 39 %, während die Messung bei den Säugetierknochen Werte zwischen 22 %- 41 % ergibt. Die Knochenprobe des Maulwurfs enthält den höchsten Calciumgehalt mit 41%, die Knochenprobe des Weißbüscheläffchen mit 22% den niedrigsten.

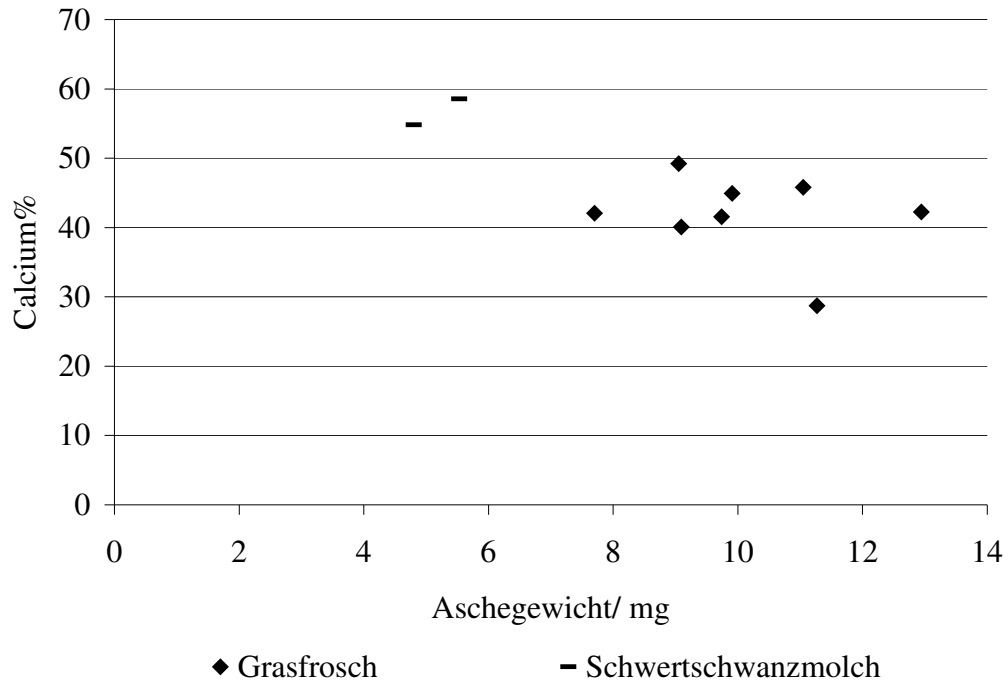


Abb. III.14: Amphibien: prozentualer Calciumgehalt am Aschegewicht in mg der Knochen

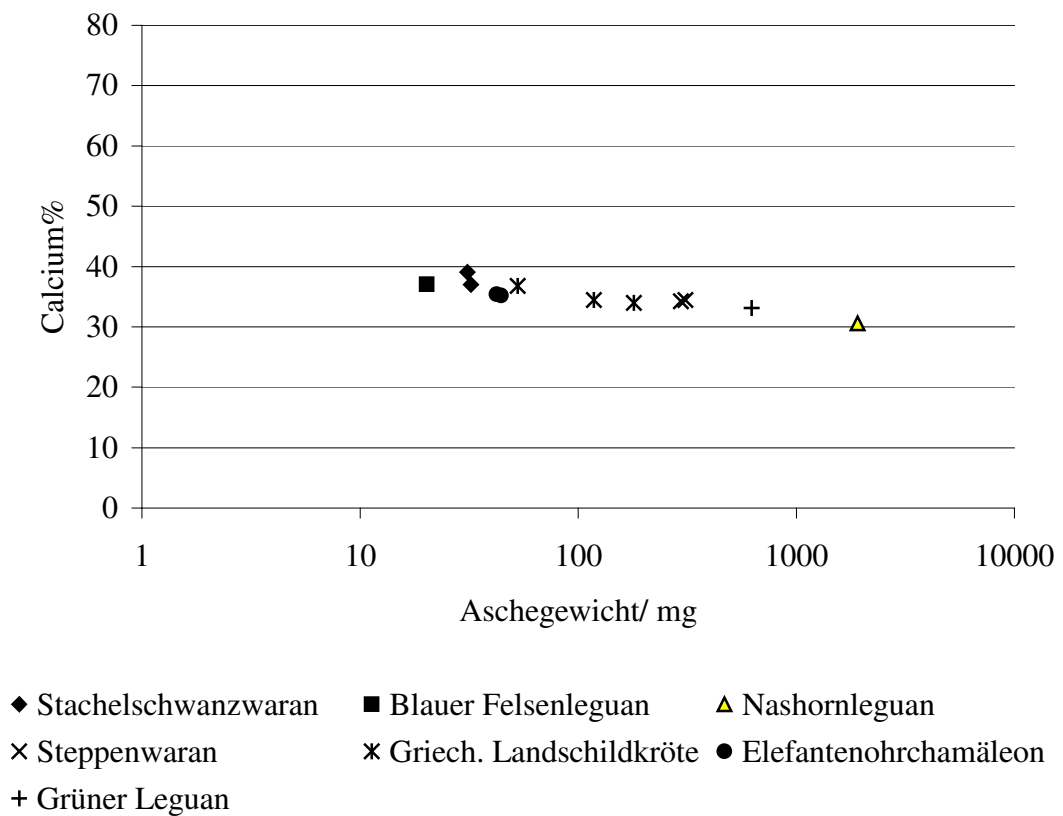


Abb. III.15: Reptilien: prozentualer Calciumgehalt am Aschegewicht in mg der Knochen

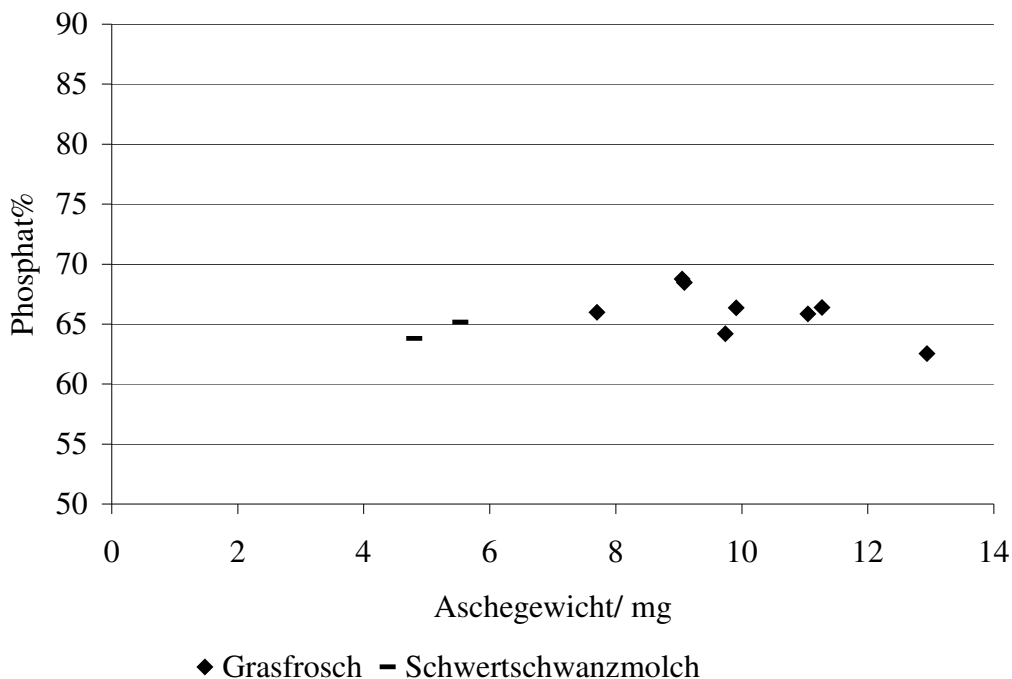


Abb. III.17: Amphibien: prozentualer Phosphatgehalt am Aschegewicht der Knochen

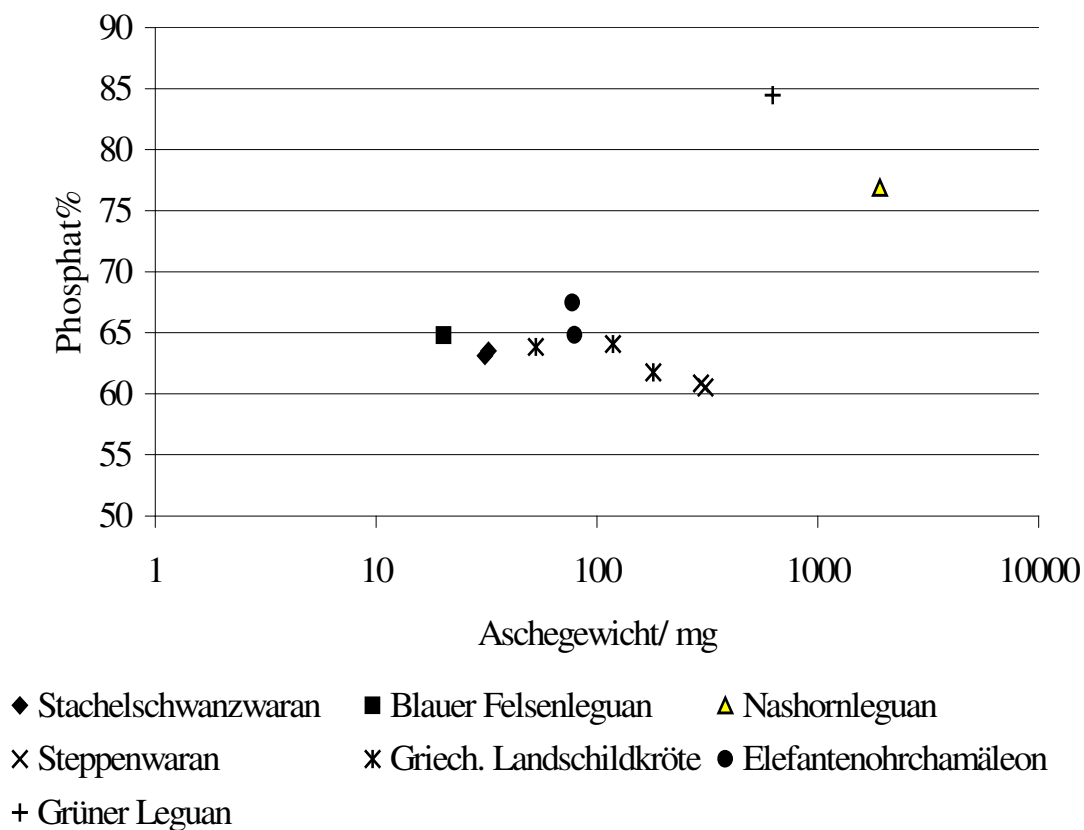


Abb. III.18: Reptilien: prozentualer Phosphatgehalt am Aschegewicht der Knochen

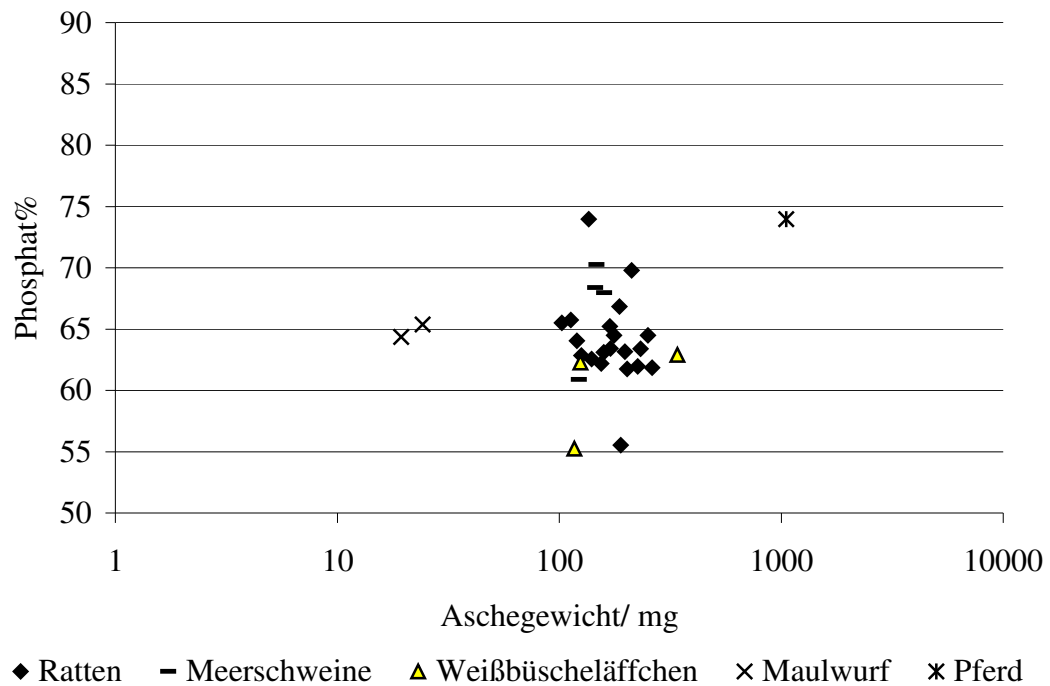


Abb. III.19: Säugetiere: prozentualer Phosphatgehalt am Aschegewicht der Knochen

4.3 Magnesium

Der Magnesiumgehalt der Amphibienproben liegt zwischen 0,21% und 0,46 % und ist somit geringer als bei den Reptilien- und Säugetierproben. Bei den Reptilienproben liegen die Werte zwischen 0,52% und 1,08% und bei den Säugetierproben zwischen 0,41 % und 1,19%. Die größte Streuung der Magnesiumwerte ermittelten wir bei den Säugern. Die Meerschweinchenknochen zeigten den größten Gehalt an Magnesium, während die Kortikalis des Pferdes den geringsten Gehalt aufwies.

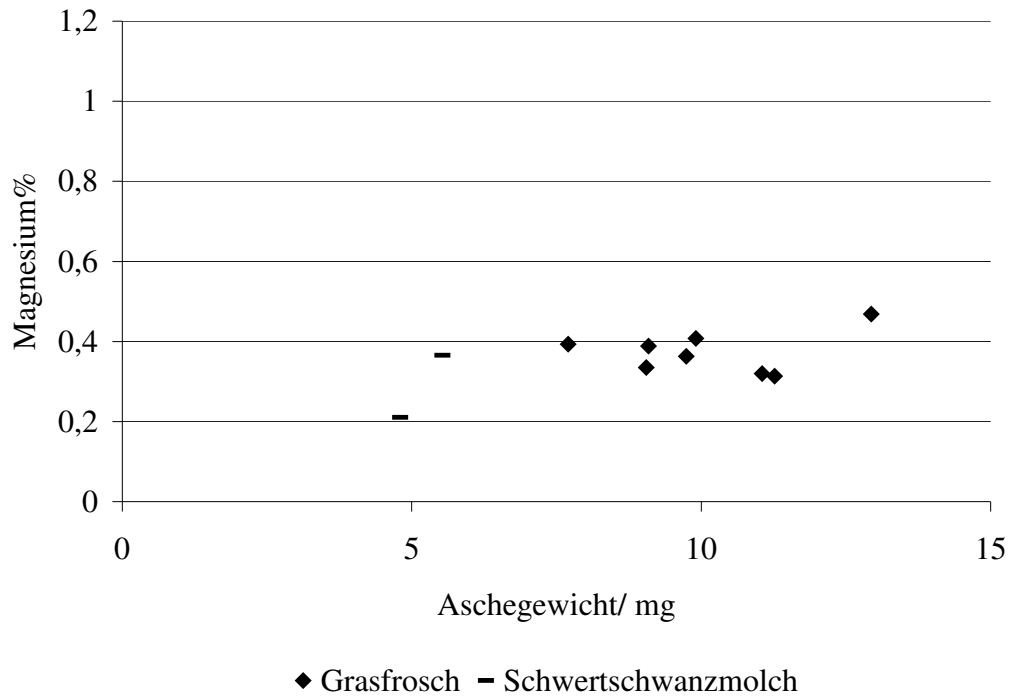


Abb. III.20: Amphibien: prozentualer Magnesiumgehalt am Aschegewicht der Knochen

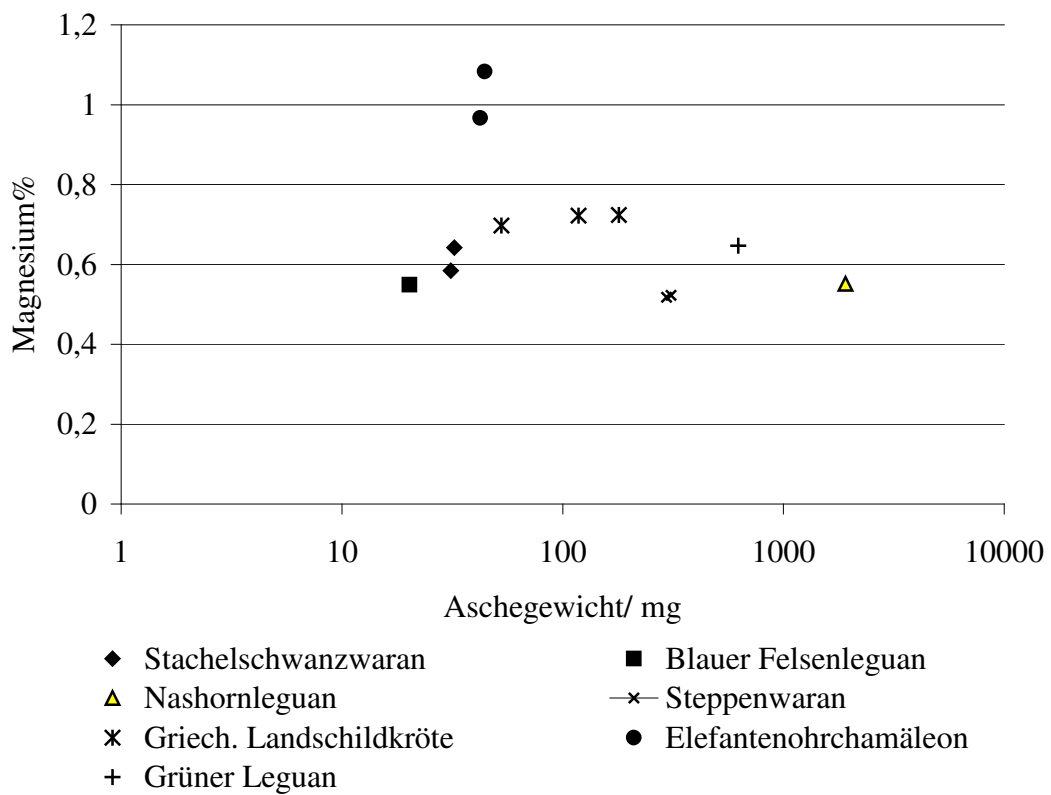


Abb. III.21: Reptilien: prozentualer Magnesiumgehalt am Aschegewicht der Knochen

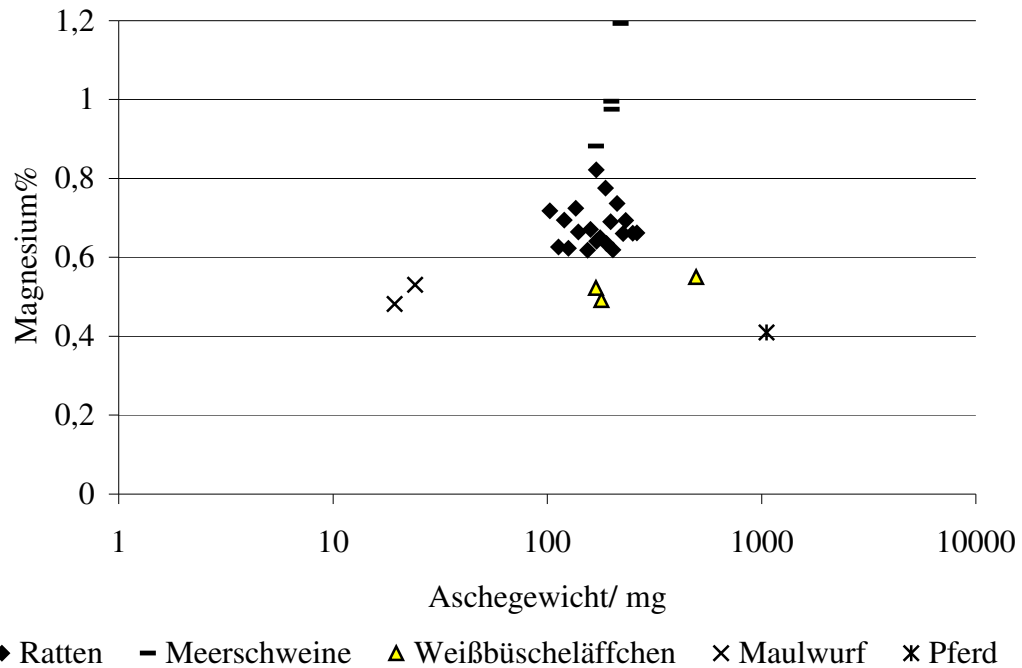


Abb. III.22: Säugetiere: prozentualer Magnesiumgehalt am Aschegewicht der Knochen

4.4 Beziehung zwischen prozentualem Wassergehalt und der Dichte der Knochenproben

Beim Vergleich der Ergebnisse des Wassergehalts und der jeweiligen Dichte der Knochenprobe fanden wir ein Abhängigkeitsverhältnis. Mit steigendem Wassergehalt sinkt die Dichte. Dies ist hier für die Reptilien- und Säugerproben graphisch dargestellt, wobei es bei den Amphibien aufgrund der geringen Probenzahl nicht zu verdeutlichen ist. Der Schwertschwanzmolch ist aufgrund seines mumifizierten Zustandes nicht zu verwenden.

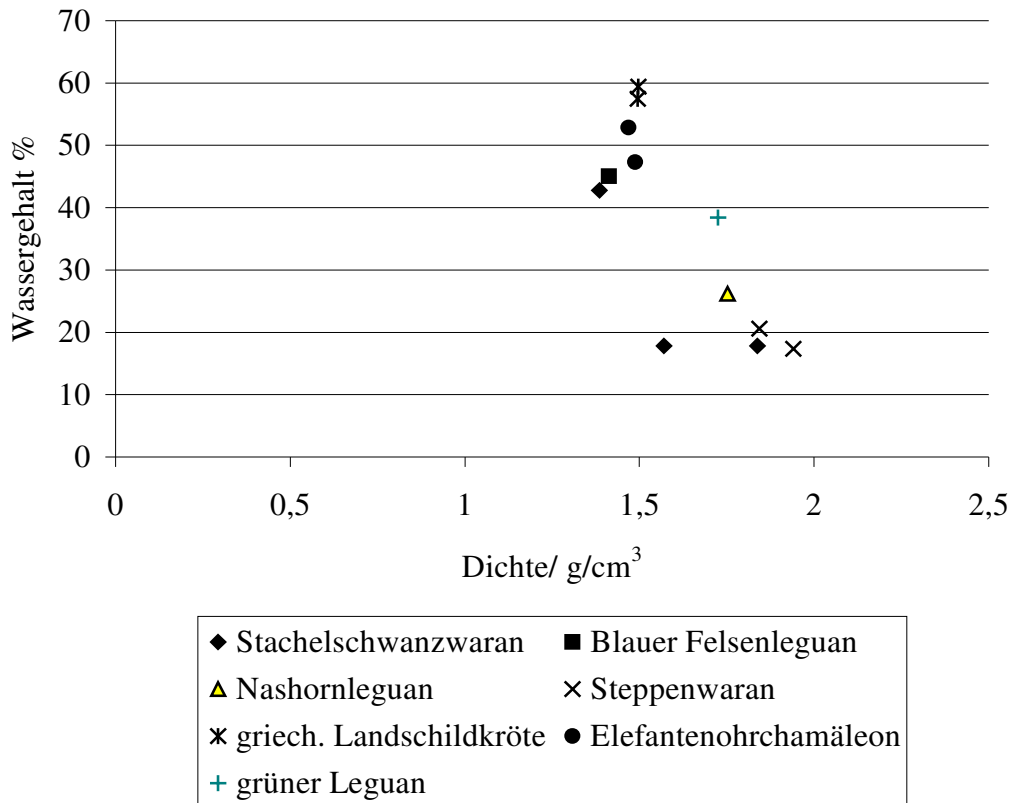


Abb. III.23: Beziehung zwischen Dichte in g/cm³ und prozentualem Wassergehalt der Reptilienproben

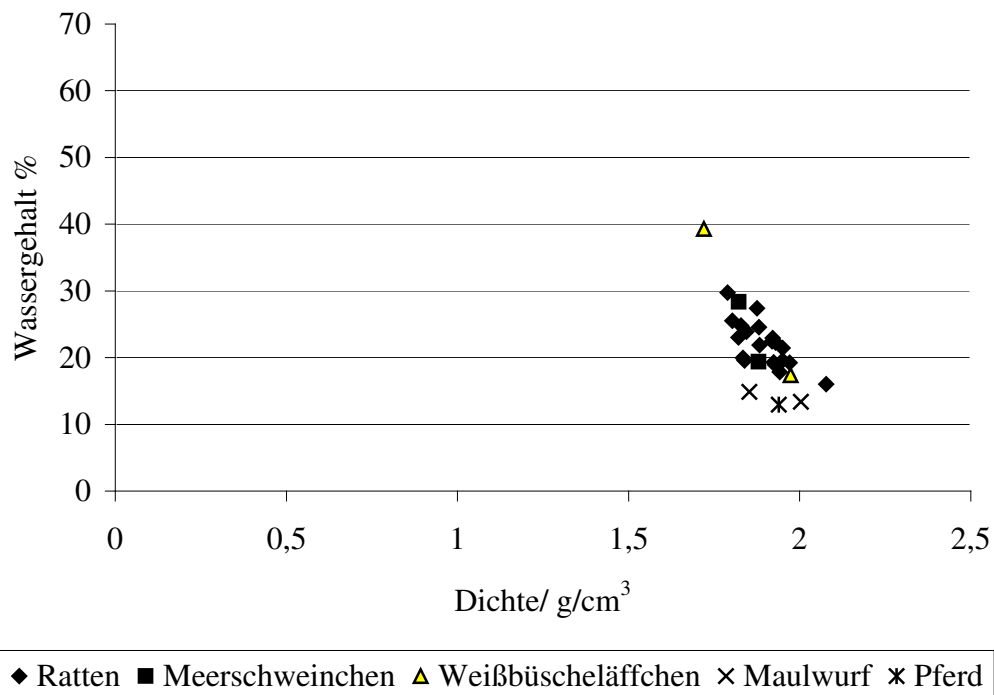


Abb. III.24: Beziehung zwischen Dichte in g/cm³ und prozentualem Wassergehalt der Säugetierproben

IV. Diskussion

1. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß

- die Dichte der untersuchten Knochen von den Amphibien zu den Reptilien bis zu den Säugern zunimmt
- der Wassergehalt der Säuger Knochen ist deutlich niedriger als der der Amphibien- und Reptilienknochen
- die Knochen der Säuger einen höheren Mineralanteil aufweisen, als die der Amphibien und Reptilien
- der Calcium und Phosphatanteil großen Schwankungen unterworfen ist, die keinen Rückschluß auf die Gattung zulassen
- der Magnesiumanteil bei den Reptilien- und Säuger Knochen deutlich höher ist, als bei den Amphibienknochen

In der Tabelle IV.1 sind die Ergebnisse zusammenfassend dargestellt.

	Amphibien	Reptilien	Säuger
Dichte g/cm^3	1,09 - 1,37	1,41 - 1,94	1,72 - 2,08
Wassergehalt %	16,67 - 79,86	17,34 - 59,44	12,95 - 39,29
Mineralgehalt %	54,22 - 66,51	54,66 - 70,52	65,04 - 75,62
Calcium %	28,74 - 58,56	30,59 - 39,05	22,28 - 41,67
Phosphat %	62,54 - 68,75	60,52 - 84,44	55,25 - 73,98
Magnesium %	0,21 - 0,46	0,52 - 1,08	0,41 - 1,19

Tab. IV.1: Zusammenfassung der Ergebnisse

2. Allgemeine Diskussion der Ergebnisse

Bei unseren Analysen der Reptilien- und Säugetierproben wurde deutlich, daß mit steigender Dichte der prozentuale Wassergehalt der Knochenproben proportional sinkt. Bei den Amphibien ist dies erwartungsgemäß nicht so zu verdeutlichen, da es sich bei dem Schwertschwanzmolch um ein mumifiziertes Tier handelte und somit der gemessene Wassergehalt nicht zu vergleichen ist mit dem der anderen Tiere. Die Werte sind hier nur der Vollständigkeit halber mit aufgezeigt.

Das Abhängigkeitsverhältnis zwischen dem Wassergehalt und der Dichte der Tierproben läßt sich dadurch erklären, daß Hydroxylapatit eine theoretische Dichte von $3,1 \text{ g/cm}^3$ besitzt und eine praktische von $3,0 \text{ g/cm}^3$. Die theoretische Dichte basiert auf der chemischen Formel von Hydroxylapatit $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Durch Substitution und unvollständige Kristallgitterstruktur reduziert sich die Dichte auf $3,0 \text{ g/cm}^3$. Die Dichte von Wasser beträgt $1,0 \text{ g/cm}^3$ [46].

Einen weiteren Aspekt, den Wassergehalt der Knochenproben zu bewerten, zeigten P. A. Timmins und J. C. Wall auf [52]. Sie stellten dar, daß mit zunehmender Knochenmineralisation größere Kristalle gebildet werden mit geringerem Oberflächen pro Volumen- Verhältnis und somit proportional weniger Mineral gebundenes Wasser. Der Wassergehalt sinke im Alter mit zunehmender Knochenmineralisation. Dies deckt sich mit unseren Ergebnissen. Die Säuger haben die höchste Knochendichte und den niedrigsten Wasseranteil.

Mit den Untersuchungen des Wassergehaltes wurde in der Literatur zunehmend die Frage gestellt nach der Lokalisation des Wassers im Knochen. 1977 beschrieben Timmins und Wall fünf mögliche Orte (1. mit den Mineralien assoziiertes Wasser, 2. Wasser an der Oberfläche der Kollagenfasern, 3. Wasser innerhalb der Kollagenfasern, 4. Wasser an den Gefäßwänden, 5. Wasser in einigem Abstand von den Gefäßwänden).

Bereits fast 20 Jahre zuvor beschrieben J. W. Agna, H.C. Knowles und G. Alverson Untersuchungen des Wassergehaltes an normalen menschlichem Knochen [1]. Sie trockneten die zerkleinerten Knochen bei 105°C für 96 Stunden. In Ihrer Studie scheint es, daß der Wassergehalt sich signifikant positiv zu Stickstoff und negativ zu Calcium verhält. Eine Abhängigkeit zwischen dem Wassergehalt und dem Calciumgehalt können wir in unserer Arbeit nicht aufzeigen. W. F Neuman und M. W. Neuman stellten dar, daß ein beträchtlicher Teil des Wassergehaltes aus der Hydratationshülle stammt. Das Wasser, bestimmt bei 105°C , bestehe eher vorwiegend aus zellulärem und interstitiellem Wasser als dem Wasser von der Hydratationshülle, wie anhand von synthetischem Apatit und Kalbsknochen gezeigt wurde [40, 42].

Die Untersuchung von Materialeigenschaften wie Calciumgehalt, aber auch Elastizitätsmodul, Biegefestigkeit und Porosität von Knochen unterschiedlicher Arten wurden bereits in einigen Studien durchgeführt [11, 12, 13]. Es konnte gezeigt werden, daß im Allgemeinen die Reptilienknochen nicht minderwertiger seien als die

Säugetier- und Vogelknochen. Zudem fand J. D. Currey große Unterschiede in den Materialeigenschaften der einzelnen Arten. Seine Untersuchungen des Calciumgehaltes der Knochen ergaben für die Säugetiere den höchsten und niedrigsten Calciumgehalt, während die Reptilienknochen eher weniger Calcium als die langen Knochen von Vögeln und Säugetieren hatten. In seinen Studien variierten die Calciumwerte zwischen 174 und 309 mg/g, bzw. 17,4 bis 30,9%.

E. Hayek [31], der sich 1967 mit der Mineralsubstanz der Knochen beschäftigte, zitierte dagegen Calciumwerte für menschlichen Knochen von 35,5 und 36,7% von anerkannten Autoren (Leuthard und Elliot). Der prozentuale Phosphatgehalt lag bei 50,1 und 52,4% in dieser Studie.

In der Arbeit von R. A. Robinson war das prozentuale Gewicht von Phosphor und Calcium in trockenen fett- freien Knochenproben 18%, beziehungsweise 38%, obgleich die Proben von sehr porösen oder sehr kompakten Knochen stammten [45].

In der vorliegenden Arbeit liegen die Werte der Säugetierknochen beim Calciumgehalt zwischen 22,28 - 41,67%, und beim Phosphatgehalt zwischen 55,25 - 73,98%.

J. D. Currey untersuchte neben den Materialeigenschaften, wie auch schon D. H. Enlow und S. O. Brown [11, 12], die Histologie von fossilen Knochen. Er meint, wenn wir Kenntnis von der Beziehung zwischen der Histologie von neuzeitlichen Knochen und ihren mechanischen Eigenschaften hätten, und wenn die Histologie fossiler Knochen ähnlich der neuzeitlichen sei, dann wären wir in einer guten Lage, um Rückschlüsse über die mechanischen Eigenschaften fossiler Knochen zu machen. Es zeigte sich jedoch, daß die Untersuchungen fossiler Knochen noch nicht vollständig genug sind, um sie sicher zu belegen [13]. Seine Untersuchungen an Knochen vom Sauropod Dinosaurier ergaben, daß diese eine äußerst gute Gefäßversorgung innerhalb der Knochen besaßen, wie sie nur bei großen, hochentwickelten Pflanzenfressern vorkommen, aber nicht bei primitiven Reptilien und bei kleinen oder fleischfressenden Säugetieren.

Leider konnten wir diesbezüglich begonnene Untersuchungen, mittels dreidimensionaler Aufnahmen unserer Knochenproben mit dem Lasermikroskop von Leica, nicht mehr beenden und auswerten.

3. Spezielle Diskussion der Ergebnisse

Betrachtet man die Ergebnisse der angestellten Untersuchungen, stellt man sich unweigerlich die Frage, wie lassen sich diese Unterschiede in den Daten erklären? Bei der Klärung dieser Frage wird man schnell feststellen, daß es sich hierbei um ein sehr komplexes Zusammenspiel zwischen den äußeren Einflüssen der Lebewesen, wie z. B. Klima, Lebensraum, Ernährung und Verhalten, aber auch intrinsischen Einflüssen, wie z. B. endokrinologische Veränderungen während der Ruhephasen im Sommer oder im Winter bei extremen Temperaturen handelt.

Bei Betrachtung der Dichte der Froschknochenproben fanden wir geringere Werte als für die Reptilien- und Säugerknochenproben. Dagegen ist es doch gerade der Oberschenkelknochen der Frösche der funktionell für die springende Fortbewegung besonderen Ansprüchen gerecht wird. Nach dem Wolff- Roux- Gesetz aus dem 19. Jahrhundert und der Weiterführung durch das Utah Paradigma von 1960 von H. Frost [25] würde man demnach aufgrund der hohen funktionellen Beanspruchung eine besonders ausgeprägte Knochenstruktur erwarten. Eine zu hohe Knochendichte würde dagegen die Sprungeigenschaften beim Fluchtversuch oder der Nahrungserbeutung negativ beeinflussen, so daß sich hier ein evolutionäres Gleichgewicht entwickelt hat. Bei den Molchen ist die Knochendichte etwas höher, obwohl sie sich nicht springend sondern laufend und schwimmend fortbewegen.

Einen weiteren interessanten Aspekt stellt der Zeitraum dar in dem gleichwarme Tiere Winterruhe oder Winterschlaf, bzw. wechselwarme Tiere Winterstarre oder Sommerruhe abhalten. Die Sommerruhe schützt die Tiere vor Überhitzung, Nahrungs- oder Wassermangel. Ähnlich der Winterruhe minimiert sich der Stoffwechsel der Tiere, jedoch wird nicht die Körpertemperatur abgesenkt.

In diesen Phasen der Immobilität wäre ein drastischer Knochenabbau zu erwarten. In klinischen Studien wurde ein Knochenabbau in menschlichen Wirbelkörpern von 2% pro Woche bei längerer Bettruhe nach Wirbelsäulenoperationen nachgewiesen [30]. Bereits 1985 konnten durch Untersuchungen an Ratten nach einem siebentägigen Weltraumflug mit dem Biosatelliten „Cosmos- 1667“ Atrophie der Muskulatur sowie Osteoporose der hinteren Extremitäten nachgewiesen werden [26].

2003 untersuchte N. J. Hudson die langen hinteren Extremitätenknochen der grüngestreiften Frösche *Cyclurana alboguttata* bezüglich der mechanischen

Eigenschaften nach dreimonatiger und neunmonatiger Ruhephase und erhielt erstaunliche Ergebnisse. Es zeigte sich, daß nach neun Monaten der Ruhe die Anatomie und Biegebruchfestigkeit der Froschknochen unverändert geblieben waren. Dies wurde als ein Hinweis auf fehlende Immobilitätsosteoporose gewertet [35].

Sommerruhephasen sind nicht nur bei Fröschen, sondern auch bei der von uns ebenfalls untersuchten griechischen Landschildkröten zu finden.

Weitere Studien wurden an Säugetieren durchgeführt, um die Knocheneigenschaften während des Winterschlafs zu untersuchen. S. W. Donahue und Kollegen [15] sahen den Bären als ein exzellentes Modell für die Untersuchung der Immobilitätsosteoporose des Menschen, da er ein natürlich auftretendes Tiermodell sei. Bären und Menschen hätten eine ähnliche Skelettmorphologie der unteren Extremität und Bären gehen plantigrade wie Menschen. Es zeigte sich in den Untersuchungen, daß der Schwarzbär (*Ursus americanus*) keine Immobilitätsosteoporose während des Winterschlafes entwickelt, die Aktivität der Osteoblasten blieb erhalten. Das Knochenvolumen, der Mineralgehalt, die Porosität und Biegefestigkeit waren nicht beeinflußt durch den jährlichen Nichtgebrauch während des Winterschlafes. Es konnte eine Zunahme der Biegebruchfestigkeit der kortikalen Knochen mit dem Alter der winterschlafhaltenden Schwarzbären ohne signifikante Änderungen der Porosität nachgewiesen werden.

An Goldhamstern untersuchten B. Steinberg und Kollegen den Einfluß von Kältestreß und Winterschlaf auf den Knochen. Sie nutzten histometrische Analysen und konnten ebenfalls keinen fortschreitenden Knochenabbau nachweisen. Die histometrischen Analysen der Querschnitte zeigte, daß der Knochendurchmesser nach 83 Tagen extremer Kälte und nach 7 Tagen Winterschlaf zunahm, aber signifikant abnahm nach 69 Tagen Kältestreß und nach 21 Tagen Winterschlaf. Eine Osteoporose erwies sich, obwohl die Anzahl der Osteone pro Einheit zunahm während des Winterschlafes [50].

Diese Erkenntnisse stellen die Notwendigkeit fortführender spezieller Untersuchung des Knochenstoffwechsels, wie wir ihn beim Menschen bereits größtenteils kennen, dar, insbesondere da Reptilien durch Hornschuppen und -Schilde oder viele Säugetiere durch Ihr Fell kein Vitamin D über die Haut aktivieren können.

H. M. Bruce und A. S. Parkes konnten mit Analysen der Knocheneigenschaften bei bestimmter Diät am Krallenfrosch *Xenopus laevis* nachweisen, daß hier ein relativ höherer Vitamin D Gehalt der Nahrung von entscheidenderer Bedeutung ist, als bei kleineren Säugetieren, wie Ratten, Mäusen und Hamstern [8].

Ein weiterer zu beachtender Aspekt bei der Betrachtung der unterschiedlichen Tiere und ihrer Knocheneigenschaften stellt neben dem Verhalten der Tiere ihre Ernährung dar. Ein schlüssiger Einfluß der Nahrung, ob vegetarisch oder nicht, ist bisher nicht nachgewiesen. Den Menschen betreffend konnte in einem Review aktueller Studien von 2006 nachgewiesen werden, daß Veganer eine geringere Knochendichte haben als Nicht- Veganer [49], während Studien über vegetarische und nicht- vegetarische Ernährung diesbezüglich, bei proteinreicher vegetarischer Nahrung, keinen Zusammenhang darstellen konnte [3, 51].

Bei den in Gefangenschaft lebenden grünen Leguanen zählt die nahrungsbedingte Osteodystrophie zu den häufigsten Erkrankungen. M. P. Anderson und C. C. Capen untersuchten die Nahrungszusammensetzung bezüglich Calcium und Phosphat näher. Sie konnten feststellen, daß ein Mißverhältnis von Calcium und Phosphat in der Nahrung entscheidend zu einer Osteodystrophie beiträgt. So erkrankten die Tiere mit einem Calcium- und Phosphatmangel in der Nahrung an Hypocalciämie, Tetanie, Osteoporose mit Osteomalazie und pathologischen Frakturen, während eine Calciummangelernährung mit adäquatem Phosphatanteil zu einer fortschreitenden Hypocalciämie und schwerwiegender Osteoporose mit pathologischen Frakturen führte [2, 3]. Diese Erkenntnisse führten zur allgemeinen Empfehlung einer bewußten Zusammenstellung und ständigen Kontrolle der Diät von Leguanen in privaten und öffentlichen Terrarien. So wurden die Bestandteile von Pflanzen bezüglich der Mineralien, aber auch deren Proteingehalt untersucht und den Empfehlungen beigelegt [37]. Der grüne Leguan aus unserer Arbeit stammte aus dem Reptilienzoo in Regensburg in dem professionelle Pfleger die Diät der Tiere zusammenstellen.

Die geringe Zahl der uns zur Verfügung gestandenen Proben und das zum Teil nicht dokumentierte Alter der Tiere läßt eine statistische Bewertung unserer Ergebnisse nur bedingt zu.

V. Zusammenfassung

Wie entwickelten sich die Knochen im Laufe der Evolution?

In der vorliegenden Arbeit konnte durch die Untersuchung der Materialeigenschaften Dichte, Wassergehalt, Mineralgehalt und der Mineralzusammensetzung von Calcium, Phosphat und Magnesium der Femora ein Vergleich zwischen Amphibien, Reptilien und Säugetieren angestellt werden.

Ein Zusammenhang konnte zwischen der Dichte und dem prozentualen Wassergehalt der Reptilien- und Säugetierproben aufgezeigt werden. Mit zunehmender Dichte der Knochenproben sinkt der Wassergehalt proportional.

Unsere Untersuchungen ergaben eine ansteigende Dichte der Femora von den Amphibien über die Reptilien zu den Säugern.

Die Analyse der Mineralzusammensetzung der Proben ergab bei den untersuchten Säugetierknochen im Durchschnitt etwas höhere Werte. Der Calciumgehalt ist bei den Amphibienproben deutlich höher als bei den Reptilien- und Säugetierproben. In der Analyse des Phosphatanteiles zeigte sich eine starke Streuung bei den Reptilien- und Säugetierproben im Vergleich zu den Amphibienproben. Der Magnesiumgehalt der Knochenproben ist bei den Amphibien deutlich geringer als bei Reptilien und Säugetieren, die vergleichbare Werte aufweisen. Bei den Säugetierproben ergaben die Messungen auffällige Abweichungen zwischen den Arten.

Gehäuft zeigte sich sowohl eine starke Variation der Materialeigenschaften der Femora zwischen Amphibien, Reptilien und Säugetieren, als auch innerhalb einer Klasse. Die größte Variabilität in den Analysen fanden wir für den Wassergehalt der Tierknochen.

Eine evolutionäre Tendenz der Entwicklung der Knochenstruktur bezüglich der untersuchten Materialeigenschaften läßt sich nach unseren Ergebnissen noch nicht sicher nachweisen. Die gewonnenen Daten stellen einen Teil für weiterführende Untersuchungen dar.

VI. Anhang

1. Calciumbestimmung

Um eine Ausfällung von Calcium mit Phosphat zu verhindern wurde der Ansatz mit Lanthanlösung verdünnt.

Lösungen und Reagenzien

1) Standardlösungen

- a) 0,1 mmol Ca^{2+} / 1% LaCl
- b) 0,2 mmol Ca^{2+} / 1% LaCl
- c) 0,4 mmol Ca^{2+} / 1% LaCl

2) Lanthanlösung (mind. 1%)

8,8 g LaCl_3 werden in 25 ml $\text{HCl}_{\text{konz.}}$ gelöst und anschließend in eine geeignete Plastikflasche mit 500 ml Aqua bidest. gefüllt.

3) Verdünnung der Probe A

25 μl Probe A + 2,5 ml Aqua bidest. (1:101) (ergibt Probe B)

4) Ansatz in Eppendorf- Reaktionsgefäßen

100 μl Probe B + 900 μl Lanthanlösung (1:10)

2. Phosphatbestimmung

(mod. nach C. H. Fiske & Y. Subbarow (1929))

Lösungen und Reagenzien

1) Molybdat- Reagenz

27,2 ml konz. H₂SO₄ zu 70 ml Aqua bidest. geben, abkühlen lassen. Eine Lösung von 5 g Ammoniummolybdat in 100 ml Aqua bidest. zugeben und auf 200 ml mit Aqua bidest. auffüllen.

2) Reduktionsreagenz

5,30 g Na₂S₂O₅ in 40 ml Aqua bidest. 0,1 g 1- Amino- 2- hydroxynaphtalinsulfonsäure- 4 in einem kleinen Mörser mit der Lösung sehr sorgfältig in eine braune Flasche filtrieren, anschließend im Kühlschrank aufbewahren.

3) Phosphat- Stammlösung

10 mM = 10 µmol/ ml = 136 mg KH₂PO₄ in 100 ml Aqua bidest.

Eichlösungen:

- a) 50nmol/ ml KH₂PO₄ : 0,1 ml Stammlösung/ 20 ml Aqua bidest.
- b) 100nmol/ ml KH₂PO₄ : 0,2 ml Stammlösung/ 20 ml Aqua bidest.
- c) 200nmol/ ml KH₂PO₄ : 0,4 ml Stammlösung/ 20 ml Aqua bidest.
- d) 300nmol/ ml KH₂PO₄ : 0,6 ml Stammlösung/ 20 ml Aqua bidest.
- e) 400nmol/ ml KH₂PO₄ : 0,8 ml Stammlösung/ 20 ml Aqua bidest.
- f) 500nmol/ ml KH₂PO₄ : 1,0 ml Stammlösung/ 20 ml Aqua bidest.

Aufbewahren bei + 4°C

4) Probe

Knochenverdünnung 1:101 mit Aqua bidest.

5) Ansatz

0,5 ml Probe, bzw. Stammlösung +
0,7 ml Aqua bidest. + Molybdat- Reagenz im Verhältnis von 4,6: 1
+ 0,1 ml Reduktionsreagenz

3. Magnesiumbestimmung

Ansatz

100 µl Probe

+ 100 µl LaCl₃ 1%ig

+ 800 µl Aqua bidest.

Standards:

0,1 µg/ ml Mg²⁺

0,2 µg/ ml Mg²⁺

0,5 µg/ ml Mg²⁺

Leerwert:

1% LaCl- Lsg.

285,2 nm

VII. Literatur

- 1 Agna, J. W., Knowles, H. C. Jr. and Alverson, G.: The mineral content of normal human bone. *J. of clin. invest.* 37 (10), 1357- 61, Oct. 1958
- 2 Anderson, M.P., Cape, C.C.: Fine Structural Changes of bone Cells in Experimental Nutritional osteodystrophy of Green Iguanas. *Virchows Arch. B Cell Pathol.*, 21 (3), 229-47, Sept. 1976
- 3 Anderson, M.P., Cape, C.C.: Nutritional Osteodystrophy in Captive Green Iguanas. *Virchows Arch. B Cell Pathol.*, 20 (3), 169- 84, Apr. 1976
- 4 Appleby, P., Roddam, A., Allen, N., Key, T.: Comparative fracture risk in vegetarians and nonvegetarians in EPIC-Oxford. *Eur. J. clin. Nutr.* 61 (12), 1400-6, 2007
- 5 Beaty, R. D., Kerber, J. D.: Concepts, Instrumentation and Technigues in Atomic Absorbtion Spectrophotometry. The Perkin- Elmer Corporation, Norwalk, CT, U.S.A., 1993
- 6 Bortz, J: Statistik für Sozialwissenschaften, 4. Auflage; Springer; Berlin, Heidelberg, New York; 1993
- 7 Brehm, A.: Insektenfresser. Brehm`s Thierleben. Säugethiere 1. Safari bei Ullstein Taschenbuchverlag 1980
- 8 Bruce, H. M., Parkes, A. S.: Rickets and Ostoporosis in *Xenopus laevis*. *J. Endokrinol.*, 7 (1), 64- 81, 1950
- 9 Burghardt, G. M. and Rand, A. S.: Iguanas of the world: Their Behavior, Ecology, and Conservation, Noyes Puvlications, Park Ridge, New Jersey, USA 1982
- 10 CIBA- GEIGY AG, Basel (Hrsg.): Wissenschaftliche Tabellen Geigy, Teilband Statistik. 8. Auflage, Basel, 1985
- 11 Currey, J. D.: Mechanical properties of nacre and highly mineralized bone. *Proc. R. Soc. Lond. B* 268, 107- 111, 2001
- 12 Currey, J. D.: The design of mineralised hard tissues for their mechanical functions. *J. of experimental biology* 202, 3285-3294, 1999
- 13 Currey, J. D.: The evolution of the mechanical properties of the amniote bone. *J. of biomechanics* 20, 1035- 1044, 1987
- 14 Currey, J. D.: The histology of the bone of a prosauropod dinosaur. Vol. 5, Part 2, London: Palaeontology Association, June 1962
- 15 Donahue, S.W., McGee M.E., Vaughan M.R., Robbins C.T.: Hibernating bears as a model preventing disuse osteoporosis. *J. Biomech.*, 39(8), 1480-8, 2006

- 16 Ebel, K.: Biomechanics of the vertebral column and implications for the lifestyle of dinosaurs and certain pelyco- saurs. - Freiburger Forschungshefte C 490, 27-50, Freiberg 2000
- 17 Ebel, K.: Hydrostatics of fossil ectococheleate cephalopods and its significance for the reconstruction of their lifestyle. - Paläontologische Zeitschrift, 73(3/4), 277-288; Stuttgart, 1999
- 18 Egnatios- Beene, J.:Cyclura cornuata (On-line). Animal Diversity Web, July 04, 2005
- 19 Eidenmüller, Bernd: Warane. Lebensweise - Pflege – Zucht. Herpeton; 2. Auflage, August 2003
- 20 Emerson, S. B.: Jumping and leaping. In Functional Vertebrate Morphology. Belknap Press, Cambridge, 58-72, 1985
- 21 Enlow, D.H. und Brown, S. O.: A comparative histological study of fossil and recent bone tissue. Part 3. Texas J. Sci. 10, 187- 230, 1958
- 22 Enlow, D.H. und Brown, S. O.: A comparative histological study of fossil and recent bone tissue. Part 2. Texas J. Sci. 9, 186- 214, 1957
- 23 Felsenberg, D.: Struktur und Funktion des Knochens. Pharmazie in unserer Zeit. 30. Jahrg. Nr. 6, 488-494, 2001
- 24 Fiske, C. H., Subbarow, Y.: The Colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66, 375- 400, 1925
- 25 Frost, H.: The Utah Paradigm of Skeletal Physiology Vol. I and II, ISMNI, 1960
- 26 Gazenko, O. G., Ilyin, E. A.: Investigations onboard the biosatellite Cosmos- 1667. Adv. Space Res. 6 (12), 101-6, 1986
- 27 Gordon, J. E., Strukturen unter Stress. Mechanische Belastbarkeit in Natur und Technik. Spektrum Akad. Verl., 169- 172, 1989
- 28 Green, J.: The Physicochemical Structure of Bone: Cellular and Noncellular Elements. Miner Elektrolyte Metab. 20(1-2), 7-15, 1994
- 29 Handrigan, G. R. und Wassersug, R. J.: The anuran Bauplan: a review of the adaptive, developmental, and genetic underpinnings of frog an tadpole morphology. Biol. Rev. 82, 1-25, 2007
- 30 Hanssen, T., Roos, B. and Nachemson, A.: Development of osteopenia in the fourth lumbar vertebra during prolonged bed rest after operation for scoliosis. Acta Orthop. Scand. 46, 621- 630, 1975
- 31 Hayek, E.: Die Mineralsubstanz der Knochen. Klin. Wschr. 45 Jahrg. Heft 17, 857-863, 1967

- 32 Howard J. Falcon-Lang, Michael J. Benton and Matthew Stimson.: Ecology of early reptiles inferred from Lower Pennsylvanian trackways. *Journal of the Geological Society*, London, 164; 1-6, 2007
- 33 <http://www.agamen.de/reptilien/waran/steppen1.html> (aufgerufen am 03.04.2008)
- 34 <http://www.Das-Tierlexikon.de> (aufgerufen am 28.03.2008)
- 35 Hudson, N. J., Bennett, M. B., Franklin, C. E.: Effect of aestivation on long bone mechanical properties in the green- striped burrowing frog, *Cyclorana alboguttata*. *The Journal of Experimental Biology*, 207, 475- 482, 2004
- 36 Junqueira, L.C, Carneiro, J., Kelley, R.O.: *Histologie*. 5. Auflage, Berlin: Springer, 2002
- 37 Köhler, G.: *Der Grüne Leguan. Biologie Pflege Zucht Erkrankungen*. Herpeteon, Verlag Elke Köhler, Offenbach, 1998
- 38 Löffler, G und Petrides, P.: *Biochemie und Pathobiochemie*. 6. Auflage, Berlin: Springer, 1998
- 39 Lutzmann, Nicolà: *Untersuchungen zur Ökologie der Chamäleonfauna der Masoala-Halbinsel, Nord- Ost Madagaskar*. Dissertationsschrift zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 2006
- 40 Neuman, W. F. and Neuman, M. W.: Emerging concepts of the structure and metabolic functions of bone. *Amer. J. Med.* 22, 123- 31, 1957
- 41 Neuman, W. F. und Neuman, M. W.: *The chemical dynamics of bone mineral*. Chicago, The University of Chicago Press, 39- 54, 1958
- 42 Neuman, W. F., Toribara, T.Y. and Mulryan, B. J: *The surface chemistry of bone*. VII. The hydration shell. *J. Amer.chem. Soc.*75, 4239, 1953
- 43 Posner, A. S.:*The mineral of bone*. *Clinical orthopedics and related research*. 200, 87-99, 1985
- 44 Robey, P.G.: *Vertebrate mineralized matrix proteins: structure and function*. *Connect tissue res* 35(1-4), 131-6, 1996
- 45 Robinson, R. A. und Elliot, S. R. : *The water content of bone*. I. The mass of water, inorganic crystals, organic matrix and “CO₂” space components in a unit volume of dog bone. *J. bone joint Surg.* 39A, 167- 188, 1957
- 46 Robinson, R. A. : *Bone Tissue : Composition an Function*. *Johns Hopkins medical Journal*. 145 (1), 10-24, 1979
- 47 Rowe, N.: *Marmosets and Tamarins– Callithricidae*. J. Goodall u. R. A. Mittermeier

- (Hrsg.): The Pictorial Guide to the Living Primates. Pegonias Press, East Hampton, New York, 59–80
- 48 Schleich, H.- H., Kästle, W.: Hautstrukturen als Kletteranpassungen bei Chameleo und Cophotis (Reptilia: Sauria: Chamaeleonidae: Agamidae). Salamandra Frankfurt a. M. 15(2), 95-100, 1982
- 49 Smith, A. M.: Veganism and Osteoporosis: a review of the current literature. Int. J. Nurs Pract, 12 (5), 302-6, 2006
- 50 Steinberg, B., Singh, I.J., Mitchell, O.G.: The effect of cold- streß. Hibernation, and prolonged inactivity on bone dynamics in the golden hamster, *Mesocricetus auratus*. J. Morphol., 167 (1), 43- 51, 1981
- 51 Thrope, D.L., Knutsen, S.F., Lawrence Beeson, W., Rajaram, S, Fraser, G.E.: Effects of meat consumption and vegetarian diet on risk of wrist fracture over 25 years in a cohort of peri- and postmenopausal women. Public Health Nutr., 1-9, 9. Aug. 2007
- 52 Timmins, P. A. und Wall, J. C.: Bone water. Calcified tissue research. 31, 1-5, May 1977
- 53 Wendt, H.: Springtamarine und Krallenäffchen. Grzimeks Tierleben. Weltbildverlag, Augsburg, Bd. 10, 348-378
- 54 Wolters, J. u. Immelmann, K.: Krallenaffen. Grzimeks Enzyklopädie. Kindler Verlag, München, Bd. 2, 183– 205

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version nicht veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Beate Blichmann, erkläre, daß ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: Materialeigenschaften von Knochen vor dem Hintergrund der biologischen Evolution selbst verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfaßt und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift