

Aus dem
Institut für Tierpathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin
und dem
Julius Wolff Institut, Charité-Universitätsmedizin Berlin

**Analyse der Auswirkungen mechanischer Stimulation auf die enchondrale
Knochenentwicklung in einem in vitro Organkulturmodell muriner fetaler
Metatarsalknochen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Salome Iphigenie Sigrist
Tierärztin
aus Hadamar

Berlin 2011

Journal-Nr.: 3489

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Achim Gruber
Zweiter Gutachter: Prof. Dr.-Ing. G. N. Duda
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. J. Plendl

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice, metatarsus, in vitro, organ culture, ossification, bone formation,
mechanical stimulation

Tag der Promotion: 25.07.2011

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86387-059-1

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2011

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2011

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	STAND DES WISSENS	4
2.1	Knochen	4
2.1.1	Aufbau der Röhrenknochen	4
2.2	Knochenentstehung	5
2.2.1	Desmale Ossifikation (Osteogenesis desmalis)	5
2.2.2	Chondrale Ossifikation (Osteogenesis cartilaginea)	5
2.3	Knochenheilung	6
2.3.1	Direkte Frakturheilung	7
2.3.2	Indirekte Frakturheilung	7
2.4	Enchondrale Osteogenese und enchondrale Ossifikation während der Frakturheilung vergleichend	9
2.5	Einwirkung von Biomechanik auf die Knochenphysiologie	10
2.5.1	Einwirkung von Biomechanik auf die fetale enchondrale Ossifikation	11
2.6	Organkulturmodell	13
2.7	Arbeitshypothese	15
3	MATERIAL UND METHODEN	16
3.1	Versuchstiere	16
3.2	Probengewinnung	16
3.2.1	Entnahme der Feten	16
3.2.2	Präparation	17
3.3	Gruppeneinteilung	18
3.4	Durchführung der mechanischen Stimulation	20
3.4.1	Organkultur	20
3.4.2	Mechanische Stimulation	22
3.5	Histologische Aufbereitung	25
3.5.1	Fixieren und Entwässern	25
3.5.2	Einbetten in Paraffin	26
3.5.3	Anfertigen von Gewebeschnitten	26
3.5.4	Färbungen	27
3.6	Auswertung	29
3.6.1	Deskriptive Beurteilung	29
3.6.2	Histomorphometrische Auswertung	29
3.6.3	Statistik	32

4	ERGEBNISSE	33
4.1	Deskriptive Histologie	33
4.1.1	Präparate 16,5 dpc	33
4.1.2	Präparate 17,5 dpc	34
4.1.3	Ausbildung einer primären Markhöhle	38
4.1.4	Anzahl der periostalen Durchbrüche	38
4.2	Histomorphometrie	39
4.2.1	Hauptversuch	39
4.2.2	Folgeversuch	44
4.3	Zusammenfassung der Ergebnisse	46
5	DISKUSSION	47
5.1	Organkulturmodell	47
5.2	Diskussion von Material und Methoden	48
5.2.1	Versuchsaufbau	48
5.2.2	Präparation	49
5.2.3	Organkultur und mechanische Stimulation	49
5.2.4	Histologische Aufarbeitung	53
5.2.5	Histomorphometrie	53
5.3	Diskussion der Ergebnisse	54
5.3.1	Deskriptive Histologie	54
5.3.2	Histomorphometrie	57
5.4	Schlussfolgerung	60
6	ZUSAMMENFASSUNG	62
7	SUMMARY	64
8	LITERATUR	65
	ANHANG: Statistische Ergebnisse	70
	DANKSAGUNG	80
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	81

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillata
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
ca.	circa
DIC	Digital Image Correlation
dpc	days post conceptionem (Tage nach der Befruchtung)
E	Strain (Kraft der Biegung)
Fa.	Firma
ICF	Intermittent Compressive Force (intermittierende Druckkraft)
MPa	Megapascal
Mt	metatarsal
MT	Metatarsus respective Metatarsalia (Mittelfußknochen)
p	probability of error (Irrtumswahrscheinlichkeit)
PBS	Phosphat Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
pc	post conceptionem
ROI	Region Of Interest
Tab.	Tabelle
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Der Prozess der Knochenbildung beginnt während der fetalen Entwicklung, setzt sich in Wachstum und Umbau während des gesamten Lebens fort und wird im Falle einer Verletzung als Frakturheilung wieder eingeleitet. Knochen übernimmt im Körper zwei wesentliche Aufgaben, eine Stütz- und eine Stoffwechselfunktion.

Während der fetalen Osteogenese (Knochenbildung) entsteht Knochen auf zweierlei Art. Die Bildung kann entweder direkt aus dem mesenchymalen Bindegewebe (desmale Ossifikation) erfolgen, zum Beispiel an einzelnen Deckknochen des Schädels, der Knochenmanschette der Röhrenknochen und bei der Frakturheilung. Oder aber Knochen entsteht indirekt über ein Vorläufergerüst aus Knorpelzellen (enchondrale Ossifikation), das abgebaut und durch Knochen ersetzt wird (Liebich, 1999). Die enchondrale Ossifikation findet während der fetalen Knochenbildung an den meisten Knochen des Skeletts und während der Frakturheilung statt.

Im Gegensatz zur Heilung von weichen Geweben, die überwiegend durch Narbenbildung repariert werden, heilt Knochen durch die Produktion von neuem Knochen und kann somit als Regeneration im Sinne einer vollständigen strukturellen und funktionellen Wiederherstellung angesehen werden (Braun and Ruter, 1996; McKibbin, 1978). Die Knochenheilung erfolgt entweder auf direktem Wege bei rigider Fixation und einem Frakturspalt unter einem Millimeter oder auf indirektem Wege bei größerem Frakturspalt und vermehrter Bewegung der Frakturenden (Remedios, 1999).

Heilt also der frakturierte Knochen auf indirektem Wege unter Ausbildung eines Knorpelgerüsts (enchondrale Ossifikation), ist die Knochenheilung in vielen Punkten mit der enchondralen Ossifikation während der fetalen Osteogenese vergleichbar (Gerstenfeld et al., 2003). Neuere Daten weisen darauf hin, dass die regenerative Kapazität von adultem Knochen auf einer Wiedereinführung der molekularen Abläufe basiert, die während der fetalen Entwicklung die Osteogenese steuern (Sandberg et al., 1993; Vortkamp et al., 1998). Der Prozess der Knorpelzellproliferation, -hypertrophie und -mineralisierung erfolgt in nahezu gleicher Weise während fetaler Entwicklung und Frakturheilung (Ferguson et al., 1999; Gerstenfeld et al., 2003). Diese Gemeinsamkeiten ermöglichen es, die fetalen Knochenanlagen von Mäusen in Organkultur als vergleichbares Untersuchungsobjekt zur Frakturheilung herzunehmen und von den erhaltenen Ergebnissen Rückschlüsse auf Auswirkungen auf den postpartalen Knochen zu ziehen.

Einer der wichtigsten Faktoren für die erfolgreiche Frakturheilung ist neben der Größe des Frakturspalts die Bewegung im Frakturgebiet (Willenegger et al., 1971). Nachdem man zunächst der Annahme war, dass bei der Versorgung eine direkte Knochenvereinigung erstrebenswert ist, weiß man heute, dass diese bis zur Ausheilung extrem lange benötigt und zu Abbau von Knochensubstanz und Osteoporose führen kann (Remedios, 1999). Inwieweit schon während der Embryogenese biomechanische Kräfte die Differenzierungsprozesse innerhalb der enchondralen Ossifikation beeinflussen, ist unklar. Unterbindet man jedoch die muskuläre Aktivität der Feten, resultiert dies in Knochen mit reduziertem Durchmesser und kortikaler Verdickung, also verminderter Osteogenese (Hosseini and Hogg, 1991). Diese Knochen weisen außerdem Anzeichen von Osteoporose auf und neigen zu Frakturen (Rodriguez et al., 1988). Abgeleitet von diesen Ergebnissen liegt die Überlegung nah, dass ein bestimmtes Maß an biomechanischer Einwirkung die Knochenbildung zu unterstützen und zu verstärken vermag. Aus verschiedenen Untersuchungen ist bekannt, dass hydrostatischer Druck oder Luftdruck (Burger et al., 1992; Klein-Nulend et al., 1987a; van't Veen et al., 1995), zyklische Dehnung von Zellen (Kaspar et al., 2000a; Kaspar et al., 2000b), sowie niedrig gepulster Ultraschall (Korstjens et al., 2004) die enchondrale Ossifikation beeinflussen.

Wie bei der Frakturheilung ist das mechanische Umfeld auch für die Homöostase und die Regeneration des adulten Skelettsystems sehr wichtig (Frost, 2003). Knochen werden ständig durch Bewegung und Kräfte mechanisch belastet (Frost, 2000). Die mechanische Einwirkung auf die enchondrale Ossifikation auf zellulärer Ebene soll deshalb in dieser Studie untersucht werden. Das Organkulturmodell mit den langen Röhrenknochen der Metatarsalia der Maus eignet sich aufgrund der Vergleichbarkeit von Knochenentwicklung als Bestandteil des Knochenheilungsprozesses sehr gut (Ferguson et al., 1999; Gerstenfeld et al., 2003). Die verwendeten Feten befinden sich in ihrer Entwicklung *in utero* 17,5 Tage nach Befruchtung (days post conceptionem, dpc). Zu diesem Zeitpunkt beginnt sowohl die Kalzifizierung des Knorpels in der Diaphyse (Kaufmann, 1992), als auch die Eigenbewegung der Feten im Uterus (Burger et al., 1991; Platzter, 1978). Die mechanische Kraft in dieser Studie wird mittels Dreipunktbiegung auf die Knochenanlagen im Versuchsaufbau übertragen, um eine möglichst natürliche, dem Muskelzug der plantaren Muskeln entsprechende Stimulation zu erreichen. Zu diesem Zweck wurde eine Testeinheit konstruiert, die es ermöglicht, die mechanische Stimulation in Form von zyklischen Biegungen auf die *in vitro* Organkultur auszuüben. Um abschätzen zu können, welche Stimulationsfrequenzen welche Effekte erzielen, werden Versuche mit unterschiedlicher Anzahl an Biegungen pro Tag durchgeführt. Um die Effekte der Belastung zu analysieren, werden histologische und histomorphometrische Untersuchungen durchgeführt

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob mechanische Stimulation, in der beschriebenen Form appliziert, zu einer Veränderung in der Knochenentwicklung führt. Die erwartete Steigerung der Osteogenese sollte anhand der Parameter von verlängertem periostalem Knochensaum, vermehrter Kalzifizierung und verstärkter Hypertrophie des Knorpelgewebes festgestellt werden.

2 Stand des Wissens

Die enchondrale Ossifikation erfolgt während der Frakturheilung größtenteils analog zur enchondralen Osteogenese während der fetalen Entwicklung. Daraus resultiert eine Vergleichbarkeit der Entwicklung von fetalen Knochenanlagen in Organkultur mit den Abläufen der enchondralen Ossifikation, die während der Knochenheilung stattfinden. Die Einwirkung von kontrolliert ausgeübten mechanischen Kräften kann im Organkulturmodell auf Zellebene studiert werden, und die potentielle Auswirkung dieser Kräfte auf die fetale enchondrale Ossifikation erlaubt Rückschlüsse auf die Auswirkung von mechanischer Belastung während der enchondralen Ossifikation in der Frakturheilung.

2.1 Knochen

Knochengewebe ist ein essentieller Bestandteil des Körpers und erfüllt vielfältige Aufgaben. Die Knochen dienen als strukturelles Gerüst dem Ansatz von Muskeln und Sehnen und ermöglichen auf diese Weise eine aufrechte Haltung und Bewegung. Sie unterstützen und schützen weiche Gewebe und innere Organe und dienen dem Körper als Speicher für Kalzium und Phosphat. Im Laufe des Lebens befindet sich das Knochengewebe in ständigem An-, Ab- und Umbauvorgängen. Diese gewährleisten, dass Knochen trotz seiner Härte wachsen, sich an variierende Belastungen anpassen und auf eventuelle Verletzungen mit Regeneration reagieren kann (Remedios, 1999)

2.1.1 Aufbau der Röhrenknochen

Lange Knochen, die als Röhrenknochen bezeichnet werden, finden sich hauptsächlich an den Gliedmaßen. Sie zeigen einen charakteristischen Aufbau, bestehend aus einem Schaft und den mit Knorpel überzogenen Epiphysen an beiden Enden. Dazwischen liegt die Metaphyse, die während der Knochenentwicklung das Längenwachstum des Knochens generiert (Bucher, 1997). Im Inneren des Schafts liegt die Markhöhle, die vom Endost ausgekleidet ist und die je nach Alter oder Zustand des Individuums rotes Knochenmark oder Fettmark enthält (Budras et al., 2000). Die Epiphysen und die Diaphyse unterscheiden sich auch in der Knochenstruktur: die Substantia compacta (kompakte Knochensubstanz) ist vor allem im Bereich des Schaftes ausgeprägt, während die Substantia spongiosa (schwammartige Knochensubstanz) vermehrt in den Epiphysen zu finden ist. Der Knochen wird vom Periost (Knochen- oder Beinhaut) umhüllt, welches zweischichtig aufgebaut ist und aus Stratum fibrosum im äußeren und Stratum osteogenicum im inneren Bereich besteht (Bucher, 1997).

2.2 Knochenentstehung

2.1.1 Desmale Ossifikation (Osteogenesis desmalis)

Die desmale Ossifikation wird auch primäre oder direkte Knochenentwicklung genannt und beginnt in den primären Ossifikationszentren. Diese befinden sich in einzelnen Knochen des Schädels und den Knochenmanschetten der Röhrenknochen. Desmale Ossifikation findet außerdem während der Frakturheilung statt.

Mesenchymzellen (embryonale Bindegewebszellen) die mit eingesprossenen Blutkapillaren in das Gewebe gelangen, wandeln sich über teilungsaktive Vorläuferzellen zu Osteoblasten (Knochenbildungszellen) um. Diese synthetisieren Kollagenfasern und Osteoid und mauern sich schrittweise in eine unverkalkte Knochenmatrix ein (Liebich, 1999) und werden zu Osteozyten (Knochenzellen). Die entstandenen primären Knochenbälkchen aus Geflechtknochengewebe werden durch die Einlagerungen von Kalziumionen und organischem Phosphat zur Matrix ossea mineralisiert. Osteoblasten gewährleisten den weiteren Knochenumbau bei dem primärer Geflechtknochen in sekundären Knochen umgewandelt wird und Wachstum erfolgt (Budras et al., 2000). Lediglich einige Partien des Schädel- und Gesichtknochens sowie die Knochenbereiche, in die größere Bänder und Sehnen einstrahlen, bleiben zeitlebens als Geflechtknochen erhalten (Bucher, 1997).

2.2.2 Chondrale Ossifikation (Osteogenesis cartilaginea)

Bei der chondralen Ossifikation, auch sekundäre oder indirekte Knochenentwicklung genannt, wird ein knorpelig vorgeformtes Primordialskelett durch Knochengewebe ersetzt. Der Knorpel ist gleichzeitig Platzhalter und Grundlage für das Längenwachstum des Knochens und beendet diese Funktion erst mit dem Schluss der Epiphysenfuge. Die chondrale Ossifikation erfolgt an den Knochen des Rumpfes, den langen Röhrenknochen der Gliedmaßen und an der Schädelbasis (Budras et al., 2000). Sie verläuft in zwei Differenzierungsschritten und beginnt mit der perichondralen Ossifikation. Die perichondrale Ossifikation erfolgt nur im Bereich des Diaphysenschafts indem unterhalb des Perichondriums (Knorpelhaut), das nach der Knochenbildung zum Periost (Knochenhaut) wird, eine gürtelförmige Knochenmanschette nach dem Prinzip der desmalen Ossifikation entwickelt wird. Diese Manschette umschließt das knorpelige Primordialskelett, das aus Chondrozyten (Knorpelzellen) besteht, die hyalinen Knorpel bilden. Die knöchernen Manschette und die in die Interzellulärsubstanz eingelagerten Kalksalze erschweren die Ernährung der Chondrozyten per Diffusion. Dies führt zu Hypertrophie, Degeneration und letztendlich zum Absterben dieser Zellen (Liebich, 1999). Nun beginnt die enchondrale

Ossifikation. Die Interzellulärsubstanz tritt im Verhältnis zu den großblasigen Chondrozyten in den Hintergrund (Bucher, 1997). Um die enchondrale Ossifikation zu koordinieren ist es nötig, dass hypertrophe Chondrozyten funktionell verbunden sind, um Osteoblasten, Gefäßzellen und Osteoklasten zu rekrutieren (Gerstenfeld and Shapiro, 1996). Durch die Knochenmanschette sprießen Blutkapillaren ein und führen Chondroblasten (Knorpelfresszellen) mit sich, die die verkalkte Knorpelmatrix abbauen. In den so entstandenen Raum, die primäre Markhöhle, dringen weitere Blutkapillaren und Bindegewebe ein, das sich später als hämoretikuläres Gewebe zum roten Knochenmark umwandelt. Die Reste der verkalkten Grundsubstanz bilden ein Gerüst, an dem sich Osteoblasten anlagern und sich unter Bildung von Knochenmatrix in primäre Knochenbälkchen einmauern. Dem primären Verknöcherungskern in der zentralen Diaphyse folgen etwas später zwei sekundäre Verknöcherungskerne in den Epiphysen. Auf beiden Seiten des Knochens liegen zwischen Diaphyse und Epiphyse die sogenannten Metaphysen oder Wachstumszonen. Diese enthalten bis zum Abschluss des Längenwachstums des Knochens in der Reservezone nicht mineralisierte Knorpelzellen (Bucher, 1997). Diese Zellen proliferieren und liegen dann in Reihen geordnet in der Zone des Säulenknorpels. Die Knorpelzellen vergrößern sich blasenartig in gleichnamiger Zone und die Interzellulärsubstanz wird auf schmale Spangen reduziert, welche zu verkalken beginnen. In der Eröffnungszone werden sie durch Chondroblasten zerstört und in der Verknöcherungszone durch primäres Knochengewebe ersetzt, das allmählich in den definitiven Lamellenknochen umgebaut wird (Liebich, 1999).

2.3 Knochenheilung

Die Frakturheilung führt im Gegensatz zu Heilung von Muskel- oder Bindegewebe, die unter Bildung von Narbengewebe heilen, zur vollständigen strukturellen und funktionellen Wiederherstellung des Knochens (Braun and Ruter, 1996; Perren, 1992). Die Neubildung des Knochengewebes rekapituliert einige Aspekte der fetalen Knochenentwicklung in Form von desmaler und/oder enchondraler Ossifikation (Ferguson et al., 1999; Gerstenfeld et al., 2003). Die Art der Knochenheilung ist im Wesentlichen von der Größe des Frakturspalts und der Bewegung im Frakturgebiet abhängig. Ist der Frakturspalt groß und/oder herrscht viel Bewegung im Frakturgebiet, regeneriert sich das Gewebe indirekt oder sekundär.

2.3.1 Direkte Frakturheilung

Besteht ein direkter Kontakt der Frakturrenden und außerdem eine ausreichende Stabilität sowie eine intakte Vaskularisation, so vollzieht sich die Heilung direkt oder primär (Remedios, 1999). Die direkte Frakturheilung verläuft ohne radiologisch sichtbare Kallusbildung. Die Zellen überbrücken den Frakturspalt ohne Bildung eines knorpeligen Vorläufergerüsts. Durch Osteoklastenaktivität entstehen sogenannte „cutting cones“, quer zur Frakturlinie gerichteten Lakunen auf beiden Seiten des Frakturspalts, in die das benachbarte Knochenfragment einwachsen kann. Es kommt zu einer Verzahnung, die von Osteoblasten mit Lamellenknochen aufgefüllt wird (Rahn et al., 1971). Die Spaltheilung zählt ebenfalls zur direkten Frakturheilung und erfolgt, wenn der Frakturspalt kleiner als einen Millimeter ist. Dabei dringen Blutgefäße aus dem Knochenmark rechtwinklig zur Frakturlinie in den Frakturspalt ein und ermöglichen den mitgeführten Osteoblasten, ebenfalls direkt Lamellenknochen zu produzieren (Remedios, 1999).

2.3.2 Indirekte Frakturheilung

Fehlt der Kontakt zwischen den Frakturrenden über eine Strecke von über einen halben Millimeter, und/oder besteht keine ausreichende Stabilität zwischen den Fragmenten, vollzieht sich die Knochenheilung nach dem indirekten oder sekundären Muster (Einhorn, 1998; Klaushofer and Peterlik, 1994). Der Heilungsverlauf wird im Allgemeinen anhand histologischer Befunde beschrieben und gliedert sich in vier Phasen: Entzündungsphase, Phase des weichen Kallus oder Granulationsphase, Phase des harten Kallus und Remodeling-Phase (Brighton, 1984; Cruess and Dumont, 1975). Die Phasen gehen fließend ineinander über und verlaufen zum Teil parallel.

Entzündungsphase: Sie beginnt direkt nach Auftreten der Fraktur und besteht in etwa für zwei bis drei Tage nach der Verletzung (Braun and Ruter, 1996). Durch die Schädigung des umliegenden weichen Gewebes, Zerreißen der Gefäße und Untergang von Periost und Osteozyten wird eine inflammatorische Reaktion in Gang gesetzt (Cruess and Dumont, 1975): Es kommt zur Ausschüttung von Zytokinen und zur Entstehung eines Hämatoms, das die Einwanderung von Leukozyten unterstützt (McKibbin, 1978). Osteoklasten und mesenchymale Stammzellen beginnen mit dem Prozess von Resorption und Beseitigung von totem Knochen (Remedios, 1999).

Phase des weichen Kallus: Die Phase des weichen Kallus umfasst einen Zeitraum von zwei (Braun and Ruter, 1996) bis drei Wochen (Brighton, 1984) und endet, wenn die Fraktarenden über Bindegewebe oder Knorpel verbunden sind (Brighton, 1984). Da Knorpel nicht so stark an die Anwesenheit von Blutgefäßen gebunden ist, tritt er vor allem in Bereichen mit erhöhter Beweglichkeit auf, zum Beispiel in der Umgebung des Frakturspaltes. Die hier auftretenden Kräfte würden die neu entstandenen Blutgefäße und Knochen trabekel immer wieder zerstören (Simmons, 1985). Knorpel stellt also das geeignete Material zur Überbrückung des Frakturspaltes dar, bis dieser durch die Einlagerung von Kalksalzen die benötigte Steifigkeit für die Blutversorgung erhält (McKibbin, 1978).

Phase des harten Kallus: Die Mineralisierung markiert den Beginn der Phase des harten Kallus, die etwa drei bis vier Monate dauert (Braun and Ruter, 1996). Es kommt zur Ausbildung einer diaphysären Knochenmanschette nach dem desmalen Prinzip der Ossifikation, welche nach und nach die Fraktur stabilisiert (Bucher, 1997). Unter dem Periost und in den Bereichen zwischen den frakturierten Kortizes entsteht, üblicherweise über den Umweg von enchondraler Ossifikation, Lamellenknochen (Brighton, 1984; Willenegger et al., 1971). Dabei wird Osteoid an das Gerüst aus mineralisiertem Knorpel angelagert und sowohl das faserige Bindegewebe als auch der Faserknorpel werden schrittweise zu Geflechtknochen umgebaut. Dieser verbindet jetzt die Fraktarenden. Das Frakturgebiet unterscheidet sich in seiner Struktur jedoch noch von der des originalen Knochens (Remedios, 1999).

Remodeling: Die Phase des Remodeling beginnt sobald der Frakturspalt von knöchernem Kallus vollständig überbrückt ist. Der aus mineralisiertem Knorpel entstandene Geflechtknochen wird nun in Lamellenknochen umgewandelt (Rahn et al., 1971). Der Wiederaufbau der originalen Knochenstruktur verläuft sehr langsam und kann beim Menschen sechs bis neun Jahre nach dem Trauma dauern (Wendeberg, 1961).

2.4 Enchondrale Osteogenese während der Ontogenese und enchondrale Ossifikation während der Frakturheilung vergleichend

Die ontogenetische Entwicklung eines Lebewesens ist durch eine Serie von Schritten charakterisiert, die nach der Befruchtung der Keimzelle anlaufen und die während Differenzierung, Wachstum und Entwicklung von spezialisierten Geweben und Organen beendet werden. Die Entwicklungsprozesse sind gewöhnlich mit dem Erreichen der adulten Körpergröße terminiert, jedoch können einige Abläufe in spezifischen Geweben reinitiiert werden (Gerstenfeld et al., 2003). Die Heilung von Frakturen ist ein solch regenerativer Prozess (Ferguson et al., 1999; Vorkamp et al., 1998). Wie in der embryonalen Entwicklung ist die Frakturheilung von aufeinander abgestimmten Interaktionen abhängig, die zwischen verschiedenen benachbarten Geweben koordiniert werden müssen (Gerstenfeld et al., 2003). Während der indirekten Frakturheilung werden die Schritte der fetalen enchondralen Ossifikation in ähnlicher Weise rekapituliert. Der erste Schritt der Osteogenese besteht in der Kondensation von mesenchymale Zellen, die in ihrer Anordnung das spätere Skelett widerspiegeln (Hall and Miyake, 1992). Ein vergleichbarer Prozess tritt in den frühen Stadien der Frakturheilung auf (Hiltunen et al., 1993), in dem mesenchymale Zellen das Frakturgebiet infiltrieren und sich entweder zu Chondro- oder Osteoblasten entwickeln. Hier kommt während der Frakturheilung das mechanische Umfeld ins Spiel, denn bei viel Bewegung im Frakturbereich wird kartilaginöser Kallus produziert, während bei stabilisierten Fraktursegmenten direkte Knochenformation erfolgt. Die mesenchymalen Zellen müssen die unterschiedlichen Bedingungen also „wahrnehmen“. Dazu existieren mehrere Hypothesen, reichend von Mechanorezeption der Zellen (Wang et al., 1993) über Wahrnehmung von pH-Wert-Änderungen (Brighton and Hunt, 1997) bis hin zur Überlegung, dass bei guter Vaskularisierung desmal Knochen geformt und bei mäßiger Blutversorgung zunächst Knorpel gebildet wird (Ferguson et al., 1999). Es kann ebenfalls gezeigt werden, dass bei Einwirkung von Biege- und Scherkräften im defekten Knochen eine verstärkte Ausbildung von Knorpel anstelle von Knochengewebe stattfindet (Cullinane et al., 2002). Chondrozyten entwickeln sich während der Frakturheilung vom proliferativen ins hypertrophe Stadium in nahezu gleicher Weise wie während der fetalen enchondralen Ossifikation (Ferguson et al., 1999). Diese Umwandlung setzt eine präzise Koordination zwischen Reifung der Chondrozyten und dem Remodeling der extrazellulären Matrix voraus (Gerstenfeld et al., 2003). Der Mehrheit der hypertrophen Chondrozyten ist ein vorprogrammierter Zelltod bestimmt, der wiederum von einem Umbau der zellulären Matrix und der hierauf folgenden Bildung von neuem Knochen begleitet ist (Gerber et al., 1999). Letztendlich wird die Osteogenese mit dem Umbau von Knorpel zu Knochen abgeschlossen. Während der Frakturheilung wird analog zur Osteogenese Geflechtknochen entlang des Gerüst des

knorpeligen Kallus gebildet (Ferguson et al., 1999), der später zu Lamellenknochen umgebaut wird.

2.5 Einwirkung von Biomechanik auf die Knochenphysiologie

Bereits 1892 stellten Julius Wolff und Kollegen fest, dass mechanische Belastung die Knochenarchitektur eines Lebewesens beeinflusst. Allerdings waren die verantwortlichen Mechanismen unbekannt, und es gab auch keine klinische Verwendung für diese Erkenntnis. Heute weiß man, dass dieser Effekt, der die Knochenarchitektur und damit die Knochenstärke kontrolliert, über ein negatives Feedback-System auf Gewebeebene funktioniert, das Mechanostat genannt wird (Frost, 2003). Ein oberer und ein unterer Grenzwert regulieren die biologischen Mechanismen, die aktiviert werden, um die Kraft eines Knochens zu verstärken oder zu minimieren. Durch Formation und Resorption kann die Knochenstärke zunehmen (Frost, 2000) oder im sogenannten „disuse-mode“ Stärke reduziert werden, indem Knochensubstanz markhöhlennah abgebaut wird (Frost, 2002). Die Muskelkraft ist die hauptsächlich auf den Knochen einwirkende Belastung und beeinflusst somit maßgeblich die Knochenstärke und damit auch die Knochenheilung (Frost, 2004). Weiterhin postuliert Frost in den „Utah paradigm“, (2003) die er einführte und zuletzt 2003 modifizierte, dass die Belastung von Knochen zur Generierung von Signalen führt, die von einigen Zellen gelesen und von denselben oder anderen Zellen beantwortet werden können (Marotti, 2000; Skerry, 2002). Die Belastung oder Verformung von Knochen wird mit der Einheit μE , Microstrain, angegeben, wobei 1000 μE 0,1% Längenänderung des Knochens entsprechen. Bei Werten von 50-100 μE wird Knochengewebe abgebaut, zwischen 1000-1500 μE erfolgt ein Modeling im Sinne eines Knochenaufbaus, ab 3000 μE häufen sich Mikroschädigungen am Knochen und bei ungefähr 25000 μE frakturiert der Knochen bei gesunden, jungen, ausgewachsenen Säugetieren (Frost, 2004). Die Produktion des initialen Kallus hängt möglicherweise stark von biochemischen Faktoren ab. Die Eigenschaften aber, die der mineralisierte Kallus besitzen muss, um die Remodeling-Phase auszulösen, sind nach wie vor unbekannt. Klar ist jedoch, dass kleinere Belastungen sich positiv auf das Modeling auswirken und es eventuell sogar beschleunigen kann (Blenman et al., 1989; Buckwalter and Grodzinsky, 1999). Ohne diese mechanischen Einwirkungen wird möglicherweise Kallussubstanz abgebaut während das Remodeling ausbleibt und somit die Knochenheilung verzögert wird oder sogar gänzlich versagt (Frost, 1983). Die Kraft der mechanischen Einwirkung, bei der natürlicherweise eine Stärkung und ein Aufbau von Knochen stattfindet, liegt bei 100 bis 2000 μE (Meyer et al., 1999).

Mechanotransduktion ist der Prozess, bei dem mechanische Energie in elektrische und/oder biochemische Signale umgewandelt wird. Die beteiligten Mechanismen, mit denen die Zellen

des Knochens auf das veränderte mechanische Umfeld reagieren, sind längst nicht vollständig geklärt und noch immer Gegenstand zahlreicher Studien. Viele Untersuchungen identifizierten die Osteozyten als wichtigste mechanosensorische Zellen des Knochens (Kaspar et al., 2000b; Klein-Nulend et al., 1995; McGarry et al., 2005), zwischen denen die Information über interstitielle Flüssigkeitsbewegung übermittelt werden (Burger et al., 2003).

2.5.1 Einwirkung von Biomechanik auf die fetale enchondrale Ossifikation

Da biomechanische Belastungen Knochen postnatal beeinflussen, ist davon auszugehen, dass sie sich auch auf fetales Knochengewebe auswirken. Die enchondrale Ossifikation *in utero* erfolgt nach einem genetisch verankerten Schema, nach dem die einzelnen Entwicklungsstadien ablaufen. Dazu gehören die Proliferation und Hypertrophie der Chondrozyten, die Mineralisierung und Resorption der Knorpelmatrix und abschließend die Knochenformation (Tanck et al., 2000). Die Mineralisierung der Matrix wird durch eine Kombination aus genetischen, biologischen und biomechanischen Faktoren beeinflusst (Carter et al., 1991) und biomechanische Kräfte können die Knochenmorphogenese beginnend ab dem Prozess der enchondralen Ossifikation beeinflussen (Wong and Carter, 1990a).

So führt eine chemisch induzierte Paralyse der gesamten Muskulatur in Hühnerembryonen zu reduzierter Proliferation der Chondrozyten, zu einem geringeren Ausmaß der proliferativen Zone und zu verminderter Anzahl proliferativer Zellen (Germiller and Goldstein, 1997). Hosseini und Kollegen (1991) stellen in einem ähnlichen Versuch fest, dass außerdem die Gesamtlänge einiger Knochen und die Länge der Diaphyse reduziert sind. Der Zeitpunkt des Einsetzens der Ossifikation in den einzelnen Knochen oder ihr Ablauf ist nicht betroffen. In menschlichen immobilisierten Embryonen ohne Muskelbewegung können keine Längenunterschiede der Knochen festgestellt werden, jedoch zeigt sich Osteopenie (Minderung der Knochendichte) und eine Neigung zu Frakturen. Dies sind alles Anzeichen von Osteoporose (Rodriguez et al., 1988). Die Muskeltätigkeit führt zur Formung und Ausbildung der Mineralisierungsfront in den primären Ossifikationszentren von fetalen Metatarsalknochenanlagen von Mäusefeten *in vivo*. Das Fehlen dieser Muskeltätigkeit *in vitro* resultiert in einer geringeren Mineralisationsrate in der Peripherie der Knochen und bestätigt, dass Störungen in der Muskelentwicklung sehr wahrscheinlich auch Störungen in der Mineralisierung des Knochens nach sich ziehen (Tanck et al., 2000). Auch fetale Knochenanlagen in Schwerelosigkeit erfahren Modulation im Sinne von geringerer Mineralisation und verstärkter Resorption von Gewebe (Van Loon et al., 1995). Roelofsen und Kollegen (1995) weisen nach, dass es bei fehlenden mechanischen Stimuli auf fetale

Knochen zum Verlust der knochenspezifischen Genexpression kommt und dass mechanische Belastung wichtig für den Erhalt der differenzierten Knochenzellpopulation ist.

Diese Beobachtungen legen nahe, dass im Umkehrschluss eine verstärkte biomechanische Belastung zu einer verstärkten Knochenbildung führen kann. Es wurden zahlreiche Untersuchungen zur Beeinflussung der enchondralen Ossifikation mit unterschiedlich wirkenden biomechanischen Kräften durchgeführt.

Da klinische Studien eine beschleunigte Knochenheilung bei der Anwendung von niedrig gepulstem Ultraschall zeigen, wurden diese Auswirkungen auf Zellebene genauer untersucht. Die kalzifizierte Zone von metatarsalen Knochenanlagen stellt sich nach Anwendung von Ultraschall über sieben Tagen signifikant grösser dar als bei nicht behandelten Kontrollen (Nolte et al., 2001). Die Gesamtlänge und -breite des Knochens ist unverändert, so dass sich daraus schließen lässt, dass kein Effekt auf die Zellproliferation der Chondrozyten besteht. Beeinflusst werden die hypertrophen Chondrozyten, die die kalzifizierte Matrix synthetisieren und die Osteoblasten, die den periostalen Knochensaum produzieren. Weitere Untersuchungen mit niedrig gepulstem Ultraschall kommen zu vergleichbaren Ergebnissen und sehen außerdem eine gesteigerte Anlagerung von kalzifiziertem Knorpel im Randbereich der hypertrophen Zone im Vergleich zur ihrer Mitte (Korstjens et al., 2004). Die Kalzifizierung kann ebenfalls durch intermittierende oder kontinuierliche Druckkraft beeinflusst werden, wobei die intermittierende Druckkraft (Intermittent Compressive Force, ICF) einen deutlich stärkeren knochenbildenden Effekt auslöst (Coprav et al., 1985b). Die ICF wird durch eine Erhöhung des Drucks der Gasphase oberhalb des Kulturmediums, in dem die beprobten metatarsalen Knochenanlagen lagern, erzeugt und führt zu einer Längenzunahme der kalzifizierten Knorpelzone um das Doppelte (Klein-Nulend et al., 1986). Es wird auch eine Verlängerung des periostalen Knochensaums gesehen, der das kalzifizierte Gewebe umgibt. Hypertrophe Chondrozyten reagieren direkt auf ICF mit einer verstärkten Mineralisation der Matrix, die osteoklastische Knochenresorption hingegen wird gehemmt (Burger et al., 1989; Klein-Nulend et al., 1990). So wie ICF anabole Effekte auf den Metabolismus der Mineralisierung hat, wirkt sich kontinuierlicher Druck katabol auf das Gewebe aus (Burger et al., 1992; Wong and Carter, 1990b). Lediglich Klein-Nulend und Kollegen (1986) sehen eine vermehrte Kalzifizierung unter kontinuierlichem Druck, die jedoch bedeutend geringer ausfällt als bei ICF. Bei der Verwendung von hydrostatischem Druck anstelle von Luftdruck bleibt die Tendenz der Ergebnisse ähnlich. Es erfolgte eine Längenzunahme der hypertrophen Knorpelzone und eine verstärkte Mineralisierung, jedoch veränderte sich in dieser Studie die Länge des periostalen Knochensaums nicht (van't Veen et al., 1995). Es kann ebenfalls während dieser Untersuchung bestätigt werden, dass ICF als Scherbelastung die Formation von

enchondralem Knochen beschleunigt, diese jedoch von kontinuierlichem Druck gehemmt wird (Carter et al., 1987; Wong and Carter, 1990b).

2.6 Organkulturmodell

Organkultur: In vitro Organkulturmodelle von fetalen murinen Metatarsalknochen werden in vielen Untersuchungen genutzt, um die Auswirkung verschiedener Typen biomechanischer Stimulation auf den Prozess der enchondralen Ossifikation zu ermitteln (Klein-Nulend et al., 1993; Korstjens et al., 2004; Nolte et al., 2001; van't Veen et al., 1995). Die Entwicklung der Röhrenknochen beinhaltet verschiedene zelluläre Vorgänge, wie Proliferation und Hypertrophie der Chondrozyten, als auch Mineralisation der Matrix und Ausbildung des periostalen Knochensaums. Jeder dieser Entwicklungsabläufe kann potentiell anders auf die Beeinflussung reagieren (Trepczik et al., 2007). Die Entwicklung der Knochenanlagen schreitet schnell voran: innerhalb eines Tages mineralisiert ein Viertel der metatarsalen Knochenlänge (Burger et al., 1992; Tanck et al., 2000; Van Loon et al., 1995), was zu deutlich messbaren Veränderungen innerhalb eines kurzen Untersuchungszeitraums führt. Das mechanische Umfeld ist bedeutsam für Unterhalt und Regeneration des adulten Skelettsystems. Die enchondrale Ossifikation während der Frakturheilung wird als Rekapitulation derer Vorgänge beschrieben, die während der fetalen Entwicklung an Röhrenknochen auftreten (Ferguson et al., 1999; Gerstenfeld et al., 2003). Das Organkulturmodell bietet aufgrund seiner Größe gute Möglichkeiten, die Auswirkungen von mechanischer Stimulation auf der Ebene von Geweben und Zellen zu studieren (Burger et al., 1991). Die Metatarsalknochen werden deshalb gewählt, weil ein „en-bloc“ Präparat angefertigt werden kann, bei dem der zu untersuchende dritte Metatarsalknochen geschützt zwischen den anderen beiden liegt. Somit können Verletzungen der empfindlichen Organanlage während der Präparation und des weiteren Handlings vermieden werden.

Entwicklungszeitpunkt der Feten: Die Ossifikationszentren treten in der mittleren Region des knorpeligen Primordialskeletts der Metatarsalia auf, sind am Tag 17,5 post conception erstmals zu erkennen und stellen sich ab dem Tag 18,5 pc deutlich dar. Da die einzelnen Metatarsalia sich zum Zeitpunkt von 17,5 dpc in unterschiedlichen Entwicklungsstadien befinden, wird zur Auswertung jeweils nur der dritte Metatarsus herangezogen. In den MT drei und vier sind an Tag 17,5 pc bereits die ersten Anzeichen von Verknöcherungskernen sichtbar, während in den übrigen noch keine Mineralisation stattfindet (Kaufmann, 1992). Zum Zeitpunkt des Einsetzens der Ossifikation beginnt der Fetus seine Hintergliedmaßen zu bewegen, was auf muskuläre Aktivität in den Beinen hinweist (Burger et al., 1991; Platzer, 1978). Da die Muskelaktivität gleichzeitig mit dem Beginn der Mineralisierung auftritt, lässt

auf einen Zusammenhang zwischen Mineralisierungsprozess und mechanischer Belastung schließen (Tanck et al., 2004).

Art der mechanischen Biegung: Die Muskulatur des fetalen Fußes führt *in utero* eine Bewegung in Form eines kurzen Zuckens aus, in der auf die Flexion eine Extension und daraufhin eine Ruhephase folgt. Die Sehnen der Flexor-Muskeln auf der plantaren (fußsohlenwärtigen) Seite verlaufen in einer Sehnenscheide, die jeweils am proximalen und distalen Ende der Metatarsalia befestigt ist (Tanck et al., 2004). Die Art der mechanischen Stimulation in dieser Arbeit ist darauf ausgelegt, den natürlichen Muskelzug zu imitieren. Gemäß der anatomischen Position der Muskulatur der Fußsohle werden die Metatarsalknochen mit der plantaren Seite auf die sich biegende Unterlage gelegt. Eine Drei-Punkt-Biegung wird gewählt, da bei dieser, wie bei der natürlichen Muskelbewegung, eine Abwärtsbiegung der proximalen und distalen Knochenenden entsteht. Die Metatarsalknochenpräparate liegen während der Versuche einem Titanchip auf. Durch die Biegung dieses Chips an zwei Seiten wird das Präparat entlang seiner longitudinalen Achse mit den proximalen und distalen Enden abwärts gebogen, während die Mitte des Knochens unbewegt bleibt. Diese Bewegung imitiert in gewissem Grad die natürliche Belastung der Knochenanlage, die durch Verkürzung der Muskeln bei Anspannung auftritt. Da die Biegung indirekt über eine Unterlage übertragen wird, resultierte eine homogene Kraftverteilung ohne Kompression auf die aufliegenden Knochenanlagen.

Kraft der Biegung: Die Kraft der Biegung beträgt 1000 μE . Es ist bekannt, dass bei auf den Knochen einwirkenden Kräften von 1000 μE ein physiologischer Aufbau von Substanz im Sinne einer Stärkung stattfindet, wie er auch postnatal durch Belastung und Training stattfindet (Frost, 2004). Desweiteren wird in anderen Studien mit diesem Wert gearbeitet, in denen ein Aufbau von Knochenmatrix festgestellt werden kann (Kaspar et al., 2000a; Kaspar et al., 2000b; McGarry et al., 2005). Die Vorversuche zu dieser Arbeit finden ebenfalls mit 1000 μE statt, und die resultierenden Daten zeigen Veränderungen, die auf einen vermehrten Knochenaufbau hindeuten.

2.7 Arbeitshypothese

Das Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss einer kontrollierten mechanischen Belastung auf die Knorpel- und Knochendifferenzierung in der frühen Entwicklungsphase der Röhrenknochen zu untersuchen. Im Vergleich zu den in anderen Studien verwendeten Formen der Stimulation, zum Beispiel Luft- und Flüssigkeitsdruck oder Ultraschall (Klein-Nulend et al., 1987b; Korstjens et al., 2004; Nolte et al., 2001; van't Veen et al., 1995), sollten die applizierten Kräfte in dieser Arbeit den natürlichen Zug der plantaren Muskulatur auf die Metatarsalknochen imitieren.

In Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien (Klein-Nulend et al., 1987b; Korstjens et al., 2004; Nolte et al., 2001; van't Veen et al., 1995) wurde die Hypothese aufgestellt, dass die mechanische Biegung nicht die Länge der gesamten Knochenanlage verändern, aber zu einer Steigerung der Knochenformation im Sinne einer vermehrten Kalzifizierung der Diaphyse und einem verlängerten periostalen Saum führen würde. Da der Kalzifizierung von Knorpel in der Regel eine Hypertrophie des Knorpelgewebes vorausgeht, wurde außerdem eine Vergrößerung der hypertrophen Zone erwartet.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die verwendeten Versuchstiere waren 27 C57BL/6 Wildtyp Mäuse im Alter von 10-16 Wochen, aufgezogen von der Harlan-Winkelmann GmbH in Borchon, Deutschland. Die Anzeige über die Tötung der Tiere erfolgte beim Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGeTSi) und wurde unter der Nummer T0052/06 geführt. Die Verpaarung erfolgte in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin, CBF, Berlin. Die Muttermäuse befanden sich zum Zeitpunkt der Tötung 17,5 und 16,5 Tage nach der Befruchtung (days post conceptionem, dpc). Die verwendeten Feten, deren Geschlecht nicht bestimmt wurde, waren entsprechend 17,5 und 16,5 Tage alt. Von jedem Muttertier wurde jeweils nur ein Fetus den Versuchen zugeführt, um mögliche verwandtschaftliche Abhängigkeiten in der körperlichen Entwicklung oder in der Ausprägung der Organe zu vermeiden, die die Ergebnisse beeinflussen könnten. Lediglich für die Folgeversuche, die der Überprüfung des Versuchsaufbaus dienten, wurden Feten von gleichen Muttermäusen genutzt, deren Ergebnisse aber keinen Eingang in die Auswertung des Hauptversuchs fanden.

3.2 Probengewinnung

3.2.1 Entnahme der Feten

Die Tötung der trächtigen Tiere erfolgt mittels zervikaler Dislokation. Die Tiere wurden unverzüglich in ein semisteriles Umfeld verbracht und zur Entnahme der Feten vorbereitet. Eine Desinfektion der gesamten Bauchseite mit 70%igem Ethanol erfolgte an dem sich in Rückenlage befindlichen Tier. Nach kurzer Einwirkzeit wurde die Bauchhaut über der Mitte des Abdomens per Scherenschlag eröffnet. Das verwendete chirurgische Besteck bestand aus einer anatomischen Pinzette und einer Präparierschere nach Metzenbaum. Der ausgeführte Schnitt wurde ohne die abdominalen Organe zu verletzen maximal erweitert, so dass er cranial (kopfwärts) bis an das Sternum und caudal (schwanzwärts) bis zur Regio pubis (Schambeinregion) reichte. Seitlich unterhalb der Rippenbögen wurden Entlastungsschnitte angebracht. Der durch das fortgeschrittene Stadium der Trächtigkeit stark vergrößerte Uterus (Gebärmutter) mit seinen ausgebildeten Fruchtpullen lag dem Darmkonvolut schleifenförmig auf. Der murine Uterus ist vom Typ Uterus bicornis (zweihörniger Uterus), bei dem die Uterushörner in den Corpus (Uteruskörper) münden, der wiederum caudal von der Cervix (Muttermund) begrenzt wird. Die Einnistung der Embryonen

erfolgt perlschnurartig in beiden Uterushörnern, wobei jeder Embryo von einer eigenen Plazenta (Mutterkuchen) versorgt wird, die der Innenseite der Krümmung des Uterus anliegt. Mit Hilfe der Pinzette, die zwischen den Ampullen griff um die Feten zu schonen, wurde er vorgelagert und angehoben. Die Abtrennung des Uterus wurde mit der Schere an der cranialen Aufhängung unterhalb der Ovarien (Eierstöcke) und caudal im Bereich der Zervix vorgenommen. Das gesamte Organ mit den enthaltenen Feten wurde in eine temperierte 0,1% PBS (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,4) Lösung in einer sterilen Petrischale (6 cm Falcon®, Becton Dickinson Labware, USA) überführt. Nach Wechsel des Instrumentariums wurde direkt mit der Präparation der Knochenanlagen begonnen.

3.2.2. Präparation

Zur Herstellung der fetalen Metatarsalknochenpräparate wurden ausschließlich zwei Pinzetten (original Dumont # 55, 11 cm/ 0,05 mm/ 0,02 mm) genutzt, da das fetale Gewebe sehr weich ist und bereits durch Ausübung von Druck und Zug zertrennt werden kann. Unter Zuhilfenahme der Pinzettenspitzen wurde die Uteruswand einer Fruchtpulle an der Rückenkrümmung des Fetus eingerissen und aufgetrennt. Der Fetus wurde aus dem Organ vorgelagert und von der noch anhängenden Plazenta befreit. Die rechte und linke Hinterextremität wurde knapp oberhalb des Tarsalgelenks mittels Druck der Pinzettenschenkel zertrennt und die abgesetzten Gliedmaßen in eine weitere Petrischale, ebenfalls mit sterilem temperierten PBS befüllt, überführt. Diese wurde unter ein Stereomikroskop (LEICA MZ6, Okular 16x/ Objektiv 0,63x) verbracht und zunächst die rechte distale Hintergliedmaße eingestellt. Man greift das Objekt mit der Pinzette der rechten Hand, so dass die plantare Seite nach unten weist. Indem die Spitzen beider Pinzettenschenkel der linken Hand leicht geöffnet durch Haut und Knorpel des Tarsalgelenks gestochen und auf den Boden der Petrischale gedrückt wurden, erreichte man eine gute Fixation. Der distale Teil des Fußes wies nach rechts. Mit der freien Pinzette der rechten Hand wurde nun wie folgt präpariert: die Haut des Fußes wurde proximal eingestochen und nach distal abgezogen, desweiteren wurde behutsam das Muskulatur- und Bindegewebe entfernt, das den MT (Metatarsalia) dorsal auflag. Dann wurde der MT I in Längsrichtung abgetrennt, ebenso die Phalangen im Gelenkspalt distal der MT abgesetzt. Haut, Bindegewebe und Muskulatur der plantaren Seite wurden entfernt, um dann die MT-Knochen II bis V als zusammenhängendes Stück im Gelenkspalt vom Tarsalgelenk zu lösen. Man erhielt ein Blockpräparat, bestehend aus den MT II-V und dem dazwischenliegenden intermetatarsalen Bindegewebe. So wurde gewährleistet, dass der später zu untersuchende MT III geschützt zwischen den anderen Knochen lag und bei der Präparation sein Periost nicht verletzt wurde. Das Präparat wurde dann auf einen vorbereiteten Nitrozellulosefilter mit 14 mm Durchmesser, 180 µm Dicke und 0,8 µm Porengröße (AA BP 02500, Millipore,

Deutschland), der ebenfalls in steril temperiertem PBS gelagert wurde, transferiert und mittig auf diesem platziert. Der Filter samt aufliegendem MT-Block wurde in eine zwölf Well Kulturschale (BD Falcon®, Becton Dickinson Labware, USA), ebenfalls beschickt mit PBS, überführt und bei 37,0° Celsius gelagert. Mit dem linken hinteren Fuß wurde auf gleiche Weise verfahren.

3.3 Gruppeneinteilung

Die mechanische Stimulation der fetalen Metatarsalknochenanlagen fand in drei experimentellen Gruppen statt, wobei sich diese in Alter der Feten, Art der Lagerung der Kontrollgruppen und Frequenz der Stimulation pro Tag unterschieden.

In der ersten Gruppe wurden MTs, die 17,5 Tage post conception gewonnen wurden, in drei Untergruppen geteilt. Diese unterschieden sich in der Häufigkeit der Stimulation pro Tag: zweimal, viermal und zwölfmal täglich über eine Dauer von 20 Minuten (*Tab. 1*). Die Gruppe eins repräsentierte den Hauptversuch, eine Gruppengröße von mindestens neun Proben wurde aufgrund der statistischen Aussagekraft gewählt. Die Gesamtdauer der Organkultur betrug sieben Tage, während sechs Tagen erfolgte die mechanische Stimulation.

Die zusätzlichen Gruppen zwei und drei dienten zur Überprüfung einiger Versuchsbedingungen. Zum einen sollte eine mögliche Interaktion der Organkulturen untereinander über die Luft überprüft werden, zum anderen sollte das Alter der Feten von 16,5 und 17,5 dpc hinsichtlich ihrer histologischen Ausprägungen verglichen werden. Mit geänderten Lagerungsbedingungen der Kontrollen in Gruppe zwei a und zwei b wurde je eine Untergruppe zweimal täglich und eine zweite Untergruppe zwölfmal täglich über 20 Minuten stimuliert, wobei die Kontrollen der Gruppe zwei a in einer separaten Kulturschale im selben Inkubator, und die der Gruppe zwei b in einer separaten Kulturschale in einem anderen Inkubator gelagert wurden. Die Gruppengröße betrug jeweils sechs Proben (*Tab. 2a* und *b*). Die Stimulation in Gruppe drei fand mit fetalen MT 16,5 dpc in zwei Untergruppen statt. Bei einer Gruppengröße von neun Proben wurde eine Gruppe zweimal täglich, die andere zwölfmal täglich über 20 Minuten stimuliert (*Tab. 3*).

Parameter/ Untergruppen	a	b	c
Tage der Stimulation	6	6	6
Frequenz der Stimulation/Tag	2x	4x	12x
Dauer der Stimulation	20 min (alle Gruppen)		
Kraft der Biegung	1000 μ E (alle Gruppen)		
Frequenz der Biegung	1 Hz (alle Gruppen)		

Tab. 1 Stimulationsparameter Gruppe 1, MT 17,5 dpc

Parameter/Untergruppen	a	c
Tage der Stimulation	6	6
Frequenz der Stimulation / Tag	2	12

Tab. 2a Stimulationsparameter Gruppe 2a, MT 17,5 dpc, ausgelagerte Kontrollgruppen

Parameter/Untergruppen	a	c
Tage der Stimulation	6	6
Frequenz der Stimulation / Tag	2	12

Tab. 2b Stimulationsparameter Gruppe 2b, MT 17,5 dpc, ausgelagerte Kontrollgruppen

Parameter/Untergruppen	a	c
Tage der Stimulation	6	6
Frequenz der Stimulation / Tag	2	12

Tab. 3 Stimulationsparameter Gruppe 3, MT 16,5 dpc

Die verwendete Kraft der Biegung ist per Definition gleich Längenänderung geteilt durch Länge. 1000 μ E oder 1000 Microstrain bedeutet eine 0,1 prozentige Längenänderung von Knochen.

3.4 Durchführung der mechanischen Stimulation

3.4.1 Organkultur

Die weiteren Arbeiten mit den Präparaten und das Anlegen der Organkulturen erfolgten im keimarmen Klima einer „sterile bench“ (belüftete Sicherheitswerkbank). Sobald drei Paare, bestehend aus je einem rechten und linken MT-Block eines Fetus, präpariert waren, wurden diese in eine sterile Testanordnung verbracht, die Stimulationseinheit (siehe *Abb. 1*). Diese Stimulationseinheit wurde speziell konstruiert (Charité-Universitätsmedizin Berlin (CVK)), um eine mechanische Biegung des MT-Blockpräparates zu ermöglichen. Der jeweils rechte MT-Block wurde dem Versuch unterzogen, der linke diente als nicht stimulierte Kontrolle.

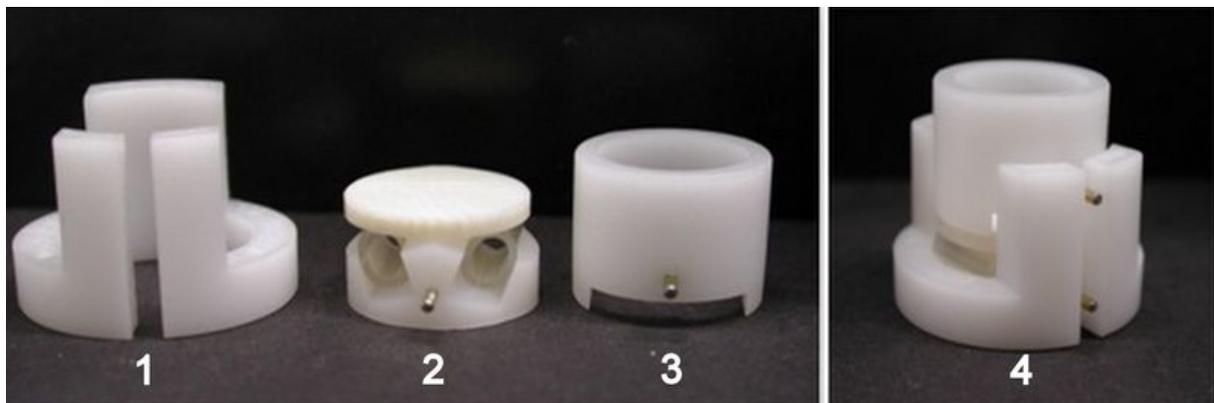


Abb. 1 Aufbau der Stimulationseinheit:

1. Basis mit Führschiene
2. Bodenplatte mit flexiblen Röhrchen, darauf der Chip
3. Ringförmige Ummantelung
4. Zusammengesetzte Einheit

Alle Bestandteile der Einheit wurden vor Gebrauch autoklaviert. Die Einheiten lagerten je in einer Vertiefung einer zwölf Well Kulturschale (siehe *Abb. 2*), pro Schale konnten drei Versuchsanordnungen untergebracht werden. Die Basis mit der Ummantelung wurde für die Stimulation in die zweite, zehnte und zwölfte Vertiefung (von oben links fortlaufend gezählt) der zwölf Well Kulturschale verbracht, die für die Kontrollen in die fünfte, siebte und neunte Vertiefung.

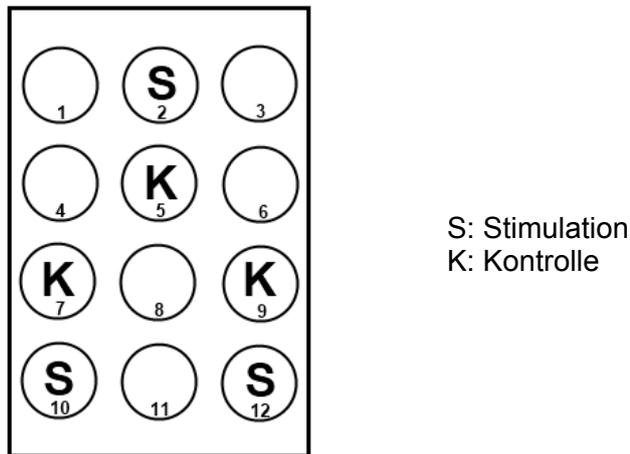


Abb. 2 Versuchsanordnung in der zwölf Well Kulturschale

Diese Vertiefungen wurden mit zwei Millilitern standardisiertem flüssigem Kulturmedium, α -MEM (Minimum Essential Medium F0915, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) versetzt mit 0,1% bovinem Serumalbumin (BSA, Fluka 05488, Sigma, Deutschland), 0,6 mM L-Ascorbinsäure (A89605, Sigma, Deutschland), 1,37 mM L-Glutamin (1680146, ICN Biomedicals, USA), 1mM β -Glycerolphosphat-Mg (G-9891, Sigma, Deutschland) und 1x antibiotisch/antimykotischer Lösung (Gibco-BRL No. 15240-096, Life Technologies, USA) beschickt, das die Präparate später komplett bedeckte. Dem Kulturmedium war zusätzlich Phenol-Rot beigelegt, das als pH-Indikator eine visuelle Überwachung des pH-Werts gestattete. Das auf dem Filter ruhende Präparat wurde der PBS Lösung entnommen und auf den Chip in der vorbereiteten Einheit verbracht. Die MT wurden genau zentral auf dem Titan-Chip gelagert, wobei die Längsachse der Präparate exakt im rechten Winkel zum Grat der Biegespitze ausgerichtet sein musste. Es wurde zunächst eine Kultivierung über 24 Stunden ohne mechanische Beeinflussung durchgeführt. Die mechanische Stimulation erfolgte über einen Zeitraum von sechs Tagen, so dass eine Gesamtdauer von sieben Tagen Organkultur erreicht wurde.

Um die Kontrollpräparate unter exakt gleichen Bedingungen wie die Stimulationpräparate zu lagern, befanden sie sich ebenfalls in einer Stimulationseinheit. In Gruppe eins wurden die Kontrollen in derselben zwölf Well Kulturschale in unmittelbarer Nähe des zu stimulierenden Präparats gelagert (siehe Abb. 2). In der Gruppe zwei a wurden alle Kontrollen in einer separaten zwölf Well Kulturschale, getrennt von den zu stimulierenden MTs jedoch im gleichen Inkubator, gelagert. Die Kontrollen der Gruppe zwei b, ebenfalls in einer separaten zwölf Well Kulturschale, wurden außerhalb dieses Geräts, das die stimulierten MT enthielt, inkubiert. Beide Gruppen, zwei a und b, lagerten ebenfalls in einer Stimulationseinheit. Die Versuchsanordnung der Gruppe drei erfolgte wie in Gruppe eins.

Kultiviert wurden die Platten in einem Hubtisch, der sich seinerseits in einem befeuchteten Klima eines Inkubators mit 5% CO₂ bei 37° Celsius befand. Die Blockpräparate konnten unter diesen Bedingungen mindestens sieben Tage erhalten werden, ohne dass sich Veränderungen in der Zellintegration zeigten. Das Kulturmedium wurde während dieser Zeit nicht gewechselt, da vermutet wurde, dass die Zellen Mediatoren in die Flüssigkeit sezernieren, welche unter Umständen andere Zellen beeinflussen. Um Interaktionen der Zellen der Knochenanlagen zuzulassen, verblieben die Organkulturen im gleichen Medium.

3.4.2 Mechanischen Stimulation

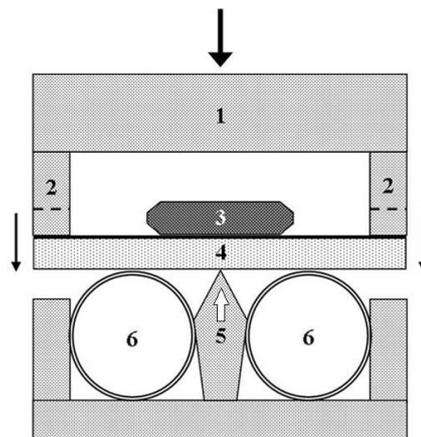


Abb. 3 Stimulationseinheit

Schematische Darstellung einer Stimulationseinheit und der erfolgten Kraftübertragung:

1. ringförmige Ummantelung, auf die Kraft in Pfeilrichtung ausgeübt wird
2. Seitenteil, das der Kraftübertragung dient (Pfeile), (gestrichelten Linien: langes Seitenteil genutzt für Stimulation, kurzes, nicht dem Chip aufliegendes, für die Kontrollpräparate)
3. Organkultur auf dem Filter (schwarze Linie)
4. Titan-Chip
5. Biegespitze (weißer Pfeil: Widerstand der Biegespitze)
6. zwei flexible Plastikröhrchen

Die Kraft, die der Hubtisch über den Deckel der zwölf Well Kulturschale ausübt, wird von der ringförmigen Ummantelung und deren Seitenteilen mit Hilfe der Biegespitze, die den mittleren Teil des Chips unbeweglich hält, auf den Titan-Chip übertragen. Die gesamte Konstruktion ruht auf einer Basis mit Führungsschiene, die verhindert, dass sich die Ummantelung und die Bodenplatte mit dem Chip gegeneinander verschieben.

Die Art und Richtung der Biegung sollte immer unter möglichst gleichen Umständen stattfinden. Damit die MT-Knochen gleichmäßig gebogen werden konnten, war eine durchgehende Anheftung der Präparate auf dem Filter nötig. Um das zu gewährleisten, wurden die Präparate am ersten Tag nach Präparation ohne Bewegung in der Zellkultur belassen, so dass es zu einer Verbindung des Präparats mit dem Filter kam. Wurde nun der Titan-Chip, auf dem der Filter aufliegt, gemeinsam mit dem Filter gebogen, fand auch eine Biegung der Knochenanlagen statt. Die ausgeführte Biegung war eine Dreipunktbiegung: das in der Mitte des Chips aufliegende Präparat ruhte auf einem quer angeordneten Grat, der Biegespitze, und bei Krafteinwirkung auf die vor und hinter dem Grat liegenden Seiten des Chips wurden nur die Seiten heruntergebogen. Die Mitte der MT blieb also stabil, während das proximale und distale Ende abwärts gebogen wurde. Daher waren die korrekte Platzierung des Präparats im rechten Winkel zur Biegespitze, und die Zentrierung des MT-Blocks von entscheidender Bedeutung. Die Kraft, erzeugt von einem Hubtisch, komprimiert die zwölf Well Kulturschale, deren Deckel der ringförmigen Ummantelung der drei Stimulationseinheiten aufliegt. Die Seitenteile versetzten den Titan-Chip in Bewegung und somit auch die Knochenanlagen (siehe *Abb. 4*). Eine Aussparung in dem kraftübertragenden Seitenteil der Ummantelung sorgte dafür, dass nach Auflegen des Deckels der Kulturplatte eine Biegung der Kontrollpräparate ausblieb.

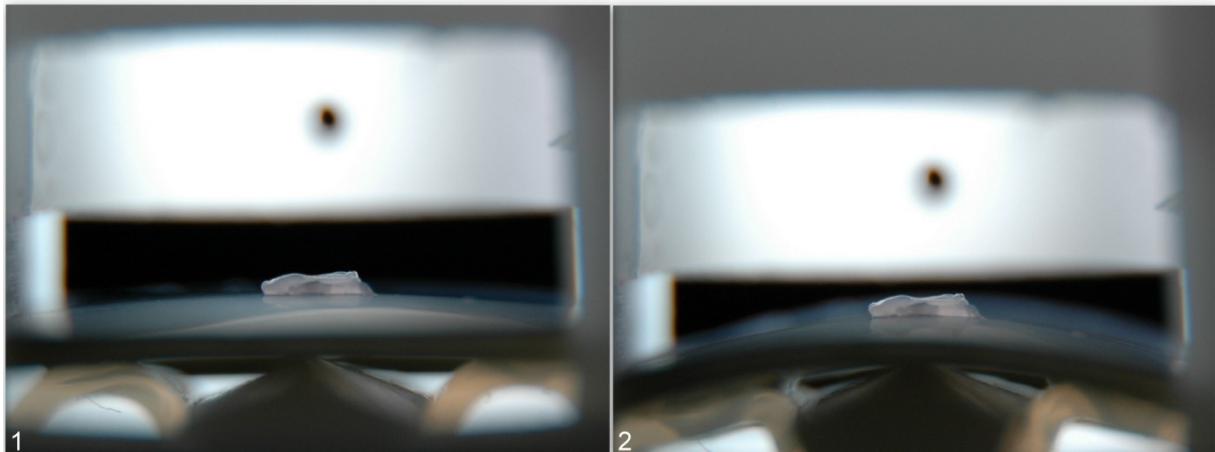


Abb. 4 Knochenanlagen in Stimulationseinheit

1. Das Präparat ruht auf dem Titanchip ohne Krafteinwirkung.
2. Das Präparat wird gebogen, indem auf die Seiten des Titanchips von oben Kraft ausgeübt wird.

Der verwendete Hubtisch dient zur mechanischen Stimulation von Zell- und Gewebekulturen auf verschiedenen Materialien, unter anderem Titan. Das System besteht aus drei Komponenten: dem Hubtisch, der in einem Brutschrank gelagert werden kann, der Steuereinheit und der Software auf dem zugehörigen Computer, der genaue Einstellungen und Überwachung ermöglicht. Mit dem Hubtisch kann eine Schwingung von 0,1 bis 1 Hertz (Genauigkeit der eingestellten Frequenz $\pm 0,004$ Hz) mit einem unveränderlichen Hub von 500 μm (Spitze-Spitze) über eine maximale einstellbare gesamte Stimulationsdauer von sieben Tagen mit bis zu zwölf Wiederholungen pro Tag gefahren werden. Die Software ist in der Lage, die Messwerte der Kraft während des Versuches zu speichern und anschließend die Messdaten in einem Diagramm darzustellen.

Die mit den Präparaten beschickten Kulturplatten wurden in den Slot des Hubtisches verbracht. Wie oben beschrieben, wurde zunächst eine eintägige Kultur ohne Stimulation durchgeführt, um den MT-Blöcken die Anheftung an den Nitrozellulosefilter zu ermöglichen. Am zweiten Tag begann die mechanische Stimulation, die während sechs Tagen je nach Untergruppe zweimal, viermal oder zwölfmal täglich 20 Minuten lang mit einer Kraft von 1000 μE erfolgte. Um diese Kraftübertragung zu gewährleisten, wurde mit einer Instron Materialtestmaschine die ausgeübte Kraft auf den Titanchip überprüft. Die Übertragung der Kraft der Biegung auf das Organkulturpräparat wurde mittels hochauflösenden Fotos nachgewiesen. Auf diesen konnte erstens gesehen werden, dass die Knochenanlagen mit dem Chip einen kompletten Stimulationszyklus gebogen wurden, und zweitens eine Analyse der Fotos mit Digital Image Correlation (DIC) erfolgte. Dabei wurde die Größenordnung der Biegekraft am Metatarsalpräparat selbst geprüft, indem die Längenänderung der Knochenanlagen mit einem digitalen „Extensometer“ (Vic2D, Correlated Solutions, West Columbia, USA) anhand der Position von Markerpunkten an den Enden der Metatarsalia bestimmt wurde. Der Mittelwert von fünf Messungen zeigte jeweils eine ungefähre Längenabweichung von 0,1% zwischen Biegung und Ruhezustand, was gemessen an Knochen der Größenordnung von 1000 μE entspricht. Während des Kultivierungszeitraumes wurden die Kulturen adspektorisch überwacht und die Parameter der Biegungen über die Software des Hubtisches kontrolliert. Die Kulturen wurden nicht herausgenommen oder auf sonstige Art bewegt oder manipuliert. Das verwendete Kulturmedium wurde über die gesamten sieben Tage belassen.

3.5 Histologische Aufbereitung

3.5.1 Fixieren und Entwässern

Die Probenaufbereitung beginnt mit der Fixierung des Materials. Dadurch werden Stoffwechselprozesse unterbrochen und postmortale Zerfallserscheinungen gestoppt. Die Fixierungsdauer ist abhängig von der Objektbeschaffenheit und seiner Größe und erfolgte direkt im Anschluss an die Kultur. Die Präparate wurden aufgrund ihrer geringen Größe auf den Nitrozellulosefiltern belassen und einzeln in Gewebekassetten (Bio-Net-Kassette, Firma R. Langenbrink, Teningen, Deutschland) verbracht. Die Fixierung der Objekte erfolgte in 4% PFA (Paraformaldehyd, Merck 100405100) 1x PBS (Verhältnis von 1:10 von PBS zu Aqua destillata), welche dazu in Färbeküvetten gelagert und für eineinhalb Stunden bei 37° Celsius inkubiert wurden. Darauf folgte eine Spülung mit PBS, die zweimal jeweils zehn Minuten lang auf einem Schüttler durchgeführt wurde. Wegen der geringen Größe der Proben (ca. 1,5 x 1,2 x 0,3mm) und dem somit sehr kleinen Anteil an mineralisiertem Gewebe wurde keine Entkalkifizierung durchgeführt. Aufgrund der hydrophoben Eigenschaften des späteren Einbettmaterials Paraffin musste das Probenmaterial im Vorfeld entwässert werden. Um Schrumpfung oder Zerreißen der fetalen Knochenanlagen zu vermeiden, erfolgte die Entwässerung stufenweise von schwach zu hochprozentigem Ethanol. Dieser Prozess führt zu einer gewünschten Verdichtung und Verhärtung des Gewebes und wurde ebenfalls auf dem Schüttler durchgeführt, um eine optimale Durchmischung zu gewährleisten. Schließlich wurde eine Entfettung des Gewebes in Xylol vorgenommen. Das Xylol verdrängt den Alkohol aus dem Gewebe und mischt sich mit dem nachfolgenden Einbettstoff, dem Paraffin, das seinerseits das Xylol vollständig ersetzt.

1. 2x 30 min 70% Ethanol (Herbeta Arzneimittel, Berlin, Deutschland)
2. 2x 30 min 80% Ethanol
3. 2x 30 min 96% Ethanol
4. 2x 30 min 100% Ethanol
5. 2x 20 min Xylol (Xylene®, J.T. Baker, Deventer, Niederlande)

3.5.2 Einbetten in Paraffin

Um das Paraffin (Paraplast Plus Tissue Embedding Medium, Tyco Healthcare, Mansfield, USA) in flüssigem Zustand verarbeiten zu können, muss es bei 60° Celsius geschmolzen und gelagert werden. Aus dem Xylool wurden die Gewebekassetten in flüssiges Paraffin aus dem Paraffinbad (Leica EG 1120, Leica Mikrosystems, Nussloch GmbH, Deutschland) umgesetzt, welches nach eineinhalb Stunden erneuert wurde. Zur Einbettung in auf 60 C° temperierte metallene Gussformen wurde etwas flüssiges Paraffin vorgelegt, der Filter mit dem anhaftenden MT-Präparat in Längsrichtung der Knochenanlagen positioniert und nach kurzer Kühlung auf der Kühlplatte (Leica EG 1130, Leica Mikrosystems, Nussloch GmbH, Deutschland) mit Paraffin aufgefüllt. Das Vorlegen einer etwa ein bis zwei Millimeter dicken vorgehärteten Schicht Paraffins diente dem Schutz des fragilen Präparates und schaffte eine Vorlaufstrecke, die für die Einstellung am Mikrotom nötig war. Der Boden der Gewebekassette diente zur Stabilisierung des Blocks und wurde noch vor dem Abkühlen des Paraffins eingesetzt. Nachdem der Block komplett durchgehärtet war, wurden die Metallformen entfernt.

3.5.3 Anfertigen von Gewebeschnitten

Zunächst wurden die einzelnen Paraffinblöcke auf die Größe von einem Quadratzentimeter beschnitten, um das Schnittpräparat so klein wie möglich zu halten. Paraffin hat die Eigenschaft sich bei höheren Temperaturen auszudehnen, was zu einer Reduzierung der Schneidfähigkeit der Knochenanlagen führt. Die Blöcke wurden deshalb vor und während des Schneidevorgangs auf einem Eisblock gekühlt. Das Einspannen der Paraffinblöcke in das verwendete Rotationsmikrotom (Leica RM 2125, Leica Mikrosystems, Nussloch GmbH, Deutschland) erfolgte mit Schnittebene des Blocks parallel zum Schneidmesser. Gegebenenfalls erfolgten Feinkorrekturen am Mikrotom. Die gewünschte Schnittebene war die größtmögliche Ausdehnung des MT III. Die Schnitte wurden dann in Serie mit einer Schichtdicke von fünf Mikrometern angefertigt und die gewonnenen Paraffinscheiben zunächst schwimmend auf Wasser gelagert, dort vereinzelt und soweit möglich geebnet. Mit Hilfe eines feinen Haarpinsels wurden sie auf Objektträger gezogen und in 45° Celsius temperiertem Wasser (Leica HI 1210, Leica Mikrosystems, Nussloch GmbH, Deutschland) geglättet. Da die Dicke der Knochenanlagen in dem Paraffinblock insgesamt nur etwa einen Millimeter betrug und lediglich Schnitte aus deren Mitte zur Auswertung gelangen konnten, ergab sich eine maximale Anzahl von 15-20 verwendbaren Schnitten. Die Objektträger mit den Paraffinschnitten wurden im Inkubator bei 36° Celsius über 24 Stunden getrocknet, um die Haftung am Objektträger zu erhöhen.

3.5.4 Färbungen

Für den Färbeprozess wurden die Schnitte in Färbeschiffchen gelagert und jeweils nach kurzem Abtropfen von einer Küvette in die nächste befördert. Nach Auswaschen des Paraffins diente die absteigende Alkoholreihe der Rehydrierung der Präparate, um sie aufnahmefähig für die zur Färbung verwendeten Chemikalien zu machen.

Trichromfärbung nach Masson-Goldner

Diese Färbung dient zur Überprüfung der Vitalität und Integrität der Zellen und zur Differenzierung der Gewebe. Zellkerne färben sich schwarz, das Zytoplasma färbt sich ziegelrot, Bindegewebe und saure Mucossubstanzen stellen sich grün dar und Osteoid wird rot angefärbt.

Verwendetes Färbeschema:

1. Schnitte entparaffinieren 2x 10 min in Xylol und je 2 min in 100-96-80-70% absteigende Alkoholreihe und dann in Aqua dest. bringen
2. 3 min Färben in Weigert's Eisenhämatoxylin (Merck, 4302 und 3943)
3. 10 min Wässern in Leitungswasser
4. 5 min Färben in Säurefuchsin-Ponceau (Chroma 2C149)
5. Spülen in 1% Essigsäure
6. Differenzieren unter Sichtkontrolle in Phosphormolybdänsäure-Orange-G (Merck 1.00532 und Sigma O-3756)
7. Spülen in 1% Essigsäure
8. 5 min Färben in Lichtgrün (Chroma 1B211)
9. Spülen in 1% Essigsäure
10. Entwässern je 2 min in aufsteigender Alkoholreihe
11. Entfetten 2x über 10 min in Xylol
12. Eindecken in Vitro-Clut® (Einschlussmittel für mikroskopische Technik, R. Langenbrink, Emmendingen, Deutschland)

Safranin-Orange/von Kossa-Färbung

Diese Färbung dient der Darstellung von mineralisiertem Gewebe. Mineralisierter Knochen und Knorpel werden schwarz, nicht mineralisierte Gewebe werden in verschiedenen Rottönen dargestellt, wobei hyaliner Knorpel intensiv rot sichtbar wird.

Verwendetes Färbeschema:

1. Schnitte entparaffinieren 2x 10 min in Xylol und je 2 min in 100-96-80-70% absteigende Alkoholreihe und dann in Aqua dest. bringen
2. 5 min Färben in 3% wässriger Silbernitratlösung (Merck 1512)
3. 3x kurz in Aqua dest. spülen
4. 2 min reduzieren in Natriumformaldehydlösung
5. 10 min wässern in Leitungswasser
6. 5 min in 5% Natriumthiosulfat (Merck 6516)
7. 10 min wässern in Leitungswasser
8. Kurz in Aqua dest. spülen
9. 6 min Färben in Safranin Orange (Merck 1382)
10. Entwässern je 2 min in aufsteigender Alkoholreihe
11. Entfetten 2x über 10 min in Xylol
12. Eindecken in Vitro-Clut®

Zum Abschluss des Färbeprozesses wurden die Präparate wieder entwässert, zur Konservierung in Xylol gebettet und unter Deckglas und Klebstoff (Vitro-Clut®) luftdicht versiegelt.

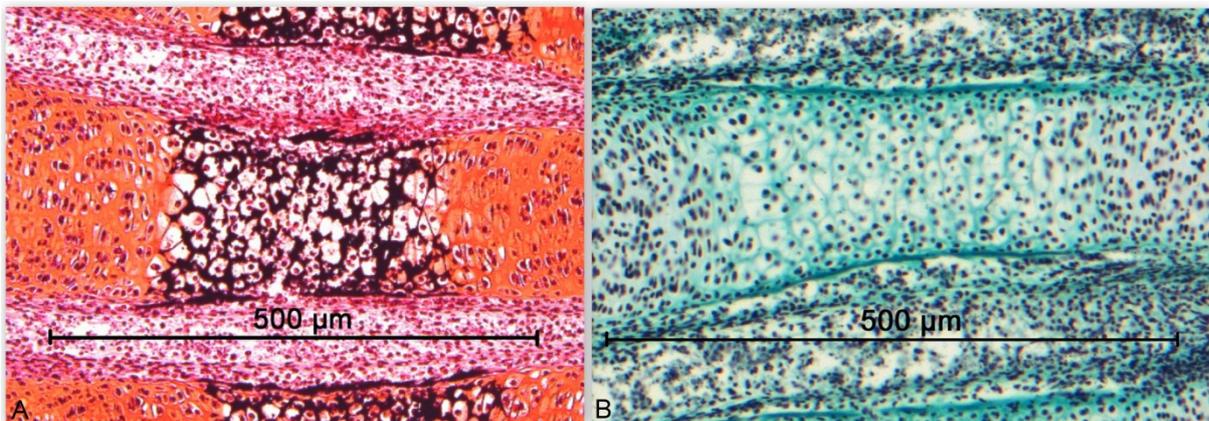


Abb. 5 Verwendete Färbungen

Präparate der MTII-IV gefärbt nach **A Safranin-Orange/von Kossa** zur Darstellung des mineralisierten Gewebes und nach **B Masson-Goldner Trichrom** zur Gewebedifferenzierung

3.6 Auswertung

3.6.1 Deskriptive Beurteilung

Die histologischen Schnitte der Metatarsalia II-V wurden in der Masson-Goldner Trichrom-Färbung in aufsteigender Größe durchgemustert und nach Vitalität und Zellintegrität beurteilt. Ebenfalls Beachtung fanden Form und Ausdehnung des angeschnittenen Knochens, die Verteilung der Gewebetypen und deren Anfärbung. In der Safranin Orange/von Kossa-Färbung wurde der Grad der Mineralisierung beurteilt.

3.6.2 Histomorphometrische Auswertung

Für die weitere Auswertung wurden die Präparate digitalisiert. Über ein computergestütztes Mikroskop (Zeiss, Axio Lab. A1, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland) mit Digitalkameraanschluss wurden die Schnitte in verschiedenen Vergrößerungen fotografiert; 50fach zur Beurteilung der gesamten Metatarsalia und 100fach zur Beurteilung einzelner Zellen. Der zu beurteilende MT III wurde waagrecht positioniert, das distale Ende des Knochens zeigte zum linken Bildrand. Ebenso wurde der Aufnahme ein digitaler Maßstabsbalken eingefügt, um die Längenmessung vornehmen zu können.

Die digitale Analyse erfolgte mit Hilfe eines Makros, einem den Messzwecken angepasstem Computerprogramm (KS Run 400 Version 3.0 Carl Zeiss Vision, GmbH Eching, Deutschland). Mit dessen Hilfe ließen sich Längen- und Flächenmessungen sowie die qualitative Erfassung einzelner Gewebearten durchführen. Pro Tier gelangte ein Safranin Orange/von Kossa gefärbtes Präparat zur Auswertung.

Nach dem Laden des zu untersuchenden Bildes führte das Makro den Untersucher durch die zuvor festgelegten Messungen. Zunächst wurde die Gesamtlänge des MT III in der 50fachen Vergrößerung bestimmt. Anhand des mit dem Foto aufgenommenen Maßstabs kalibrierte man den Bildausschnitt des Makros und führte dann die Längenmessung durch. Alle weiteren Messungen fanden in der 100fachen Vergrößerung nach erneuter Kalibrierung statt. Zunächst wurde die ROI, die Region Of Interest, festgelegt. Nur innerhalb der ROI fanden alle weiteren Messungen statt. Die ROI umfasste bereits kalzifizierte und hypertrophe Knorpelbereiche des MT III, sowie den periostalen Saum. Manuell wurde eine Umrandung um diese Zonen gezeichnet. Die ROI wurde in der Länge und an drei Stellen in der Breite vermessen. Die Differenzierung der kalzifizierten und hypertrophen Zone erfolgte ohne Erfassung des periostalen Saums. Da die kalzifizierte Zone durch die verwendete Färbung schwarz dargestellt war, gelang die Differenzierung gut. Die hypertrophe Zone beinhaltete im

Vergleich größere, noch nicht kalzifizierte Knorpelzellen, die distal und proximal des kalzifizierten Bereichs lagen. Beide Bereiche wurden manuell umfahren. Somit ergab sich als einzige noch nicht markierte Fläche der periostale Saum, der vom Computer errechnet wurde. Das Programm führte den Untersucher nun durch eine Reihe von Längen- und Breitenmessungen an den bereits eingezeichneten Zonen. Diese fanden an definierten Stellen statt, die die Reproduzierbarkeit erleichterten. Durchbrüche im periostalen Saum wurden gesondert aufgenommen, da diese in Anzahl und Ausdehnung innerhalb der Präparate stark variierten. Des Weiteren gab es die Möglichkeit, Artefakte in den histologischen Schnittbildern von der Erfassung in den Messungen auszuschließen. Sie wurden manuell umfahren und als Void gekennzeichnet. Mittig der kalzifizierten Zone befanden sich zum Teil Lakunen; Bereiche, die im Zuge des Knochenumbaus aufgelöst wurden und die ebenfalls gesondert angegeben wurden. Die Segmentierung der unterschiedlichen Gewebetypen erfolgte durch den Computer, konnte aber vom Anwender beeinflusst werden. Es wurden standardisierte Farbwerte für kalzifiziertes Gewebe vorgegeben, die durch Korrektur dieser Farbwerte, bis hin zur manuellen Markierung einzelner Pixel, angepasst werden konnten. Aus den eingegeben Daten errechnete der Computer die Flächen für die jeweiligen zugehörigen Bereiche.

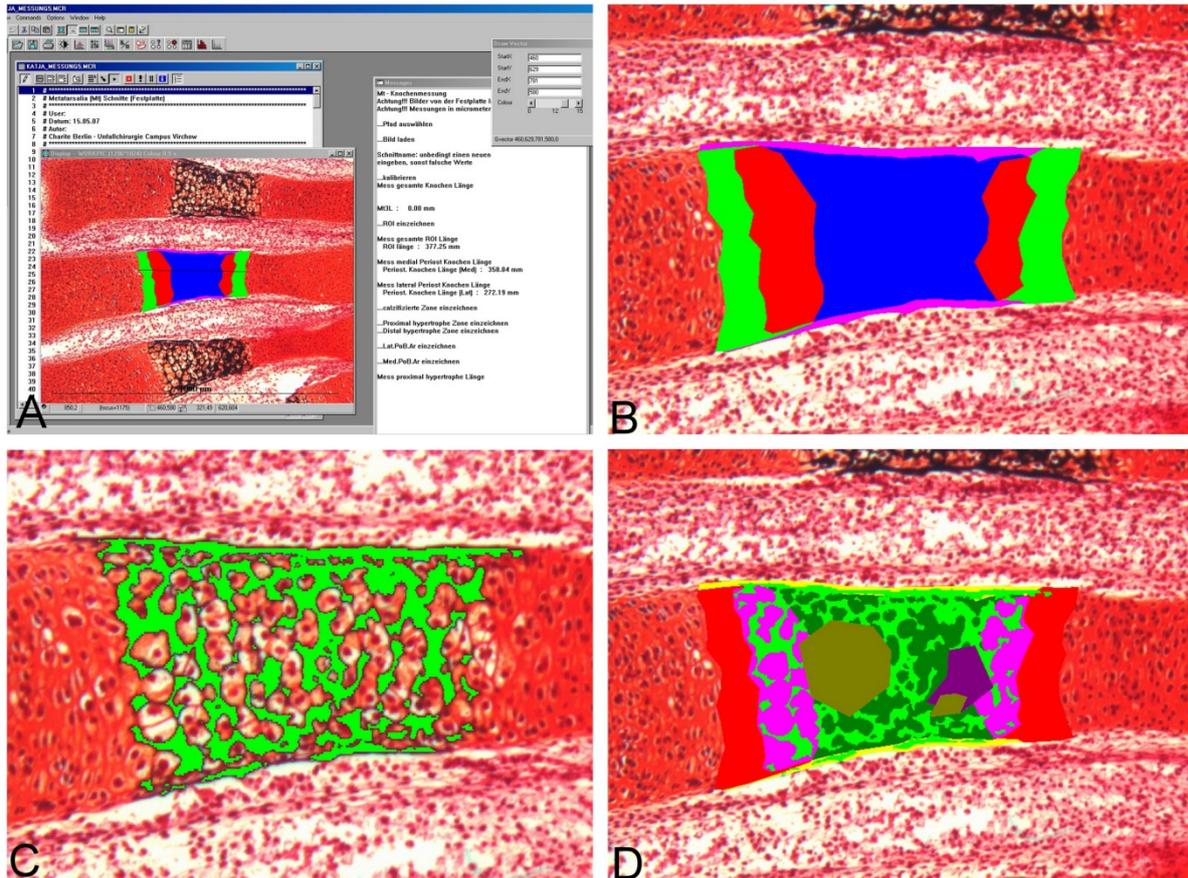


Abb. 6 Schritte der histomorphometrischen Bildanalyse

A: Übersicht des Computerprogramms: Schnittbild, Anweisungen und Zeichentool geöffnet

B: Ausschnitt aus Schnittbild: eingezeichnete Untersuchungsregion (ROI, Region Of Interest) bestehend aus unterschiedlichen Bereichen mit farblicher Hinterlegung; grün: hypertrophe Zone, rot: hypertrophe kalzifizierte Zone, blau: kalzifizierte Zone, violett: periostaler Knochensaum

C: Segmentierung des kalzifizierten Bereichs

D: Abschlussbild: alle zu differenzierenden Bereiche sind farblich unterlegt; rot: hypertrophe Zone, violett: kalzifizierte hypertrophe Zone, dunkelgrün: kalzifizierte Zone, hellgrün: kalzifiziertes Material, gelb: nichtkalzifizierter periostaler Saum, olivgrün: Lakunen, lila: Void

Parameterdefinition:

Aufgeführt werden alle Parameter, die mittels der computergestützten Analyse bestimmt wurden und in die statistische Auswertung eingingen. Die Angaben erfolgen in μm^2 , wenn nicht gesondert angegeben.

1. Länge des gesamten Metatarsus III in μm
2. Länge der Region Of Interest
3. Länge des medialen (inneren) und lateralen (äußeren) periostalen Saums
4. Fläche der kalzifizierten Zone in μm^2
5. Fläche der kalzifizierte und mineralisierte Zone
6. Fläche der proximalen (körpernahen) und distalen (körperfernen) hypertrophen Zone
7. Fläche der Markhöhle innerhalb der kalzifizierten Zone
8. Länge des medialen und lateralen periostalen Knochensaums in μm
9. Länge der Summe aller Knochendurchbrüche des medialen und lateralen Knochensaums
10. Prozentualer Anteil der Durchbrüche am medialen und lateralen periostalen Knochensaum (nachträglich errechneter Wert)

3.6.3 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS 17.0. Die voneinander abhängigen Daten wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für zwei verbundene Stichproben verglichen. Die von einander abhängigen Daten umfassten die rechten und linken Metatarsalia jeweils eines Fetus. Zu den voneinander unabhängigen Daten zählten die Werte von verschiedenen Tieren, die mittels des Mann-Whitney-Tests analysiert wurden. Innerhalb der Untergruppen 1a-c aus dem Hauptversuch wurden die Stimulationspräparate mit den zusammengehörigen Kontrollen per Wilcoxon-Test verglichen. Dieser Test fand auch bei den beiden Folgegruppen 2a und b Anwendung; ebenfalls beim Vergleich von Stimulation mit Kontrolle. Um ausschließlich die Ergebnisse der Stimulationspräparate der Gruppen eins, zwei a und b zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney-Test genutzt, da diese Proben von verschiedenen Feten stammten, also voneinander unabhängig waren. Ebenso wurde mit dem Vergleich der Kontrollen der einzelnen Gruppen untereinander verfahren. Die Ergebnisse der Längenmessungen am periostalen Saum wurden gesondert für die verbundenen Stimulations- und Kontrollpaare mittels Wilcoxon-Test analysiert. Die Signifikanz der Unterschiede wurde für alle Vergleiche bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter fünf Prozent angenommen, das Signifikanzniveau also bei $p=0,05$ festgelegt. Für alle Daten wurden die Häufigkeiten Minimum, Maximum und die Perzentile 25, 50 und 75 errechnet.

4 Ergebnisse

Aus den drei Untergruppen gingen jeweils alle 18 Präparate (zweimal neun, je die zusammengehörigen Stimulations- und Kontrollpräparate von einem Fetus) nach sieben Tagen Organkultur in die Auswertung ein. Die Kulturmedien, die mit einem pH-Wert-Indikator zur visuellen Kontrolle versehen waren, zeigten keinen Farbumschlag von rot nach gelb. Es konnte angenommen werden, dass im Medium noch ausreichend Nährstoffe enthalten waren und sich nicht zu viele Stoffwechselendprodukte angereichert hatten. Die MT-Präparate zeigten bei makroskopischer Betrachtung ein gesundes normales Aussehen. Alle Präparate waren für die Dauer des Versuchs an den Nitrozellulosefiltern haften geblieben. Es kam in keinem Fall zu einer Ablösung des Organs von der Auflage.

4.1 Deskriptive Histologie

4.1.1 Präparate 16,5 dpc

Nachdem die Präparate 16,5 dpc mit Safranin-Orange/von Kossa angefärbt waren, stellte sich heraus, dass in den meisten Präparaten kaum eine Mineralisierung stattgefunden hatte. Die Diaphyse wies zumeist keine oder nur eine sehr kleine kalzifizierte Zone mit wenig Mineralisierung auf. Es war nicht möglich die MT 16,5 dpc mit den für die MT 17,5 dpc gesetzten Kriterien auszuwerten. Auch das für die Messungen verwendete Macro eignete sich nicht zur Auswertung, da diese zum großen Teil auf den Vergleichen der Mineralisierung in den Präparaten beruhte. Die Präparate 16,5 dpc gingen aus diesen Gründen nicht in die Auswertung ein.

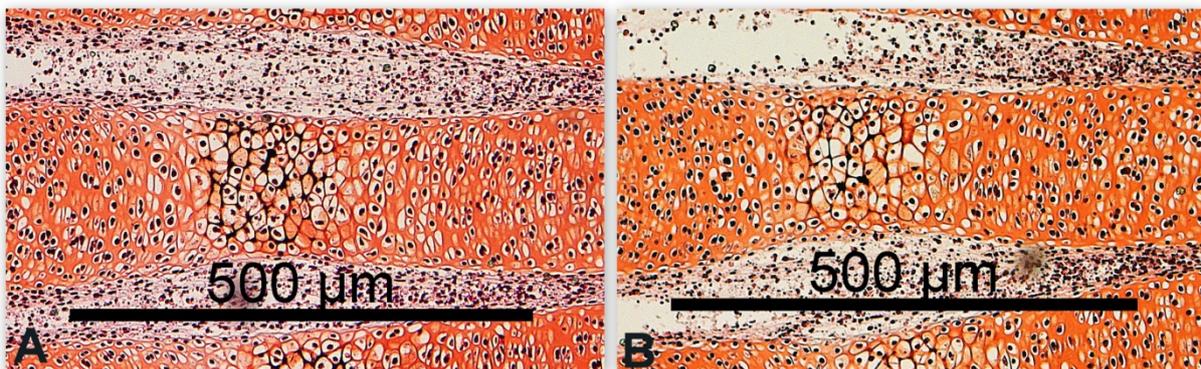


Abb. 7 MT-Block 16,5 dpc

geringe Mineralisierung und im Verbund liegende Chondrozyten; der periostale Saum ist noch nicht verknöchert,
A linker MT, Stimulation, **B** rechter MT, Kontrolle

4.1.2 Präparate 17,5 dpc

Nach histologischer Aufbereitung der Präparate wurden sie zunächst in der Masson-Goldner Trichrom Färbung in 50facher Vergrößerung begutachtet. Diese Färbung gewährte eine Übersicht über Morphologie und Vitalität der Metatarsalknochenanlagen. Bei allen Präparaten lagen die drei Knochenanlagen im Verbund nebeneinander, sie wiesen keine Defekte oder Krümmungen auf (siehe *Abb. 7A*), die Zellintegrität war intakt. Die Zellkerne wurden durch Eisenhämatoxylin dunkelbraun angefärbt, das Bindegewebe und die im Knorpel eingelagerten sauren Mukosubstanzen (Glycosaminoglycane) stellten sich grün dar.

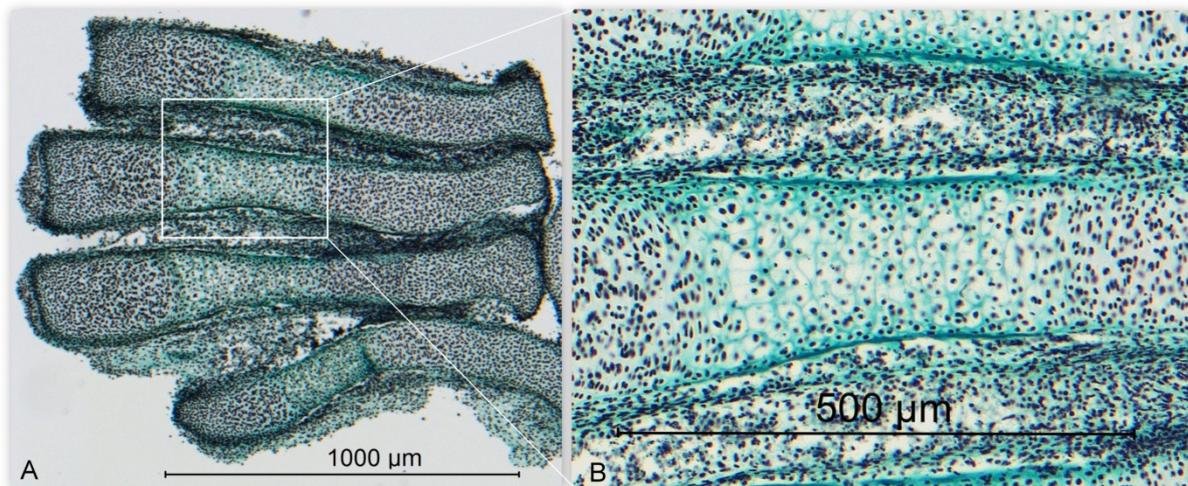


Abb. 8 linker MT-Block, Masson Goldner-Trichrom Färbung zur Vitalitätsbeurteilung.

A zeigt die Übersicht über das Blockpräparat mit den Metatarsalia II-V (MT V am unteren Bildrand), **B** zeigt den in **A** markierten Ausschnitt der Zone des hypertrophen und zum Teil mineralisierten Knorpels

Um die Orientierung am Präparat zu erleichtern, wurden bei allen Schnitten die Knochenanlagen waagrecht ausgerichtet, wobei das distale Ende der rechten und linken Metatarsalia immer zum linken Bildrand wies. Anhand der Lage des oft noch vorhandenen MT V ließ sich somit auch ohne Beschriftung rechts von links unterscheiden: im Präparat der rechten Metatarsalknochenanlagen lag der MT V am oberen Bildrand, im linken entsprechend am unteren Bildrand (siehe *Abb. 7A*). Der MT V war meistens deutlich kleiner ausgeprägt und dadurch leicht zu identifizieren. Da sich die einzelnen Entwicklungszonen der Zellen in den Knochenanlagen mittels Safranin-Orange/von Kossa Färbung hinsichtlich ihrer Mineralisierung besser beurteilen lassen, erfolgte eine nähere Begutachtung und Beschreibung in dieser Färbung.

Die Metatarsalknochenanlagen ließen sich in zwei jeweils distal und proximal gelegene Epiphysen und die dazwischen liegende Diaphyse unterteilen. Die Knochenanlage beinhaltete Chondrozyten in ruhender, proliferierender und hypertropher Form, wobei die hypertrophen Zellen in kalzifizierter Matrix in der Mitte der Diaphyse lagen. Die gesamte Knochenanlage war von Perichondrium, der Knorpelhaut, umgeben. Dem Epiphysenknorpel folgten zur Knochenmitte hin Chondrozyten im hypertrophen Stadium. Weiter im Zentrum der Diaphyse liegend fand eine Mineralisierung dieser hypertrophen Zellen statt und markierte die kalzifizierte Zone (siehe *Abb. 8*). Hypertrophe Chondrozyten stellten sich im Gegensatz zu den abgeflachten Knorpelzellen der Epiphysen als große runde Zellen dar. In der Safranin-Orange/von Kossa-Färbung sah man deutlich die Unterteilung in mineralisiertes und nicht-mineralisiertes Gewebe, da die nicht-kalzifizierten Bereiche rot, die kalzifizierten Bereiche schwarz angefärbt waren. Nach sieben Tagen Organkultur lagen die Chondrozyten in der hypertrophen Zone größtenteils eingebettet in kalzifizierte Matrix.

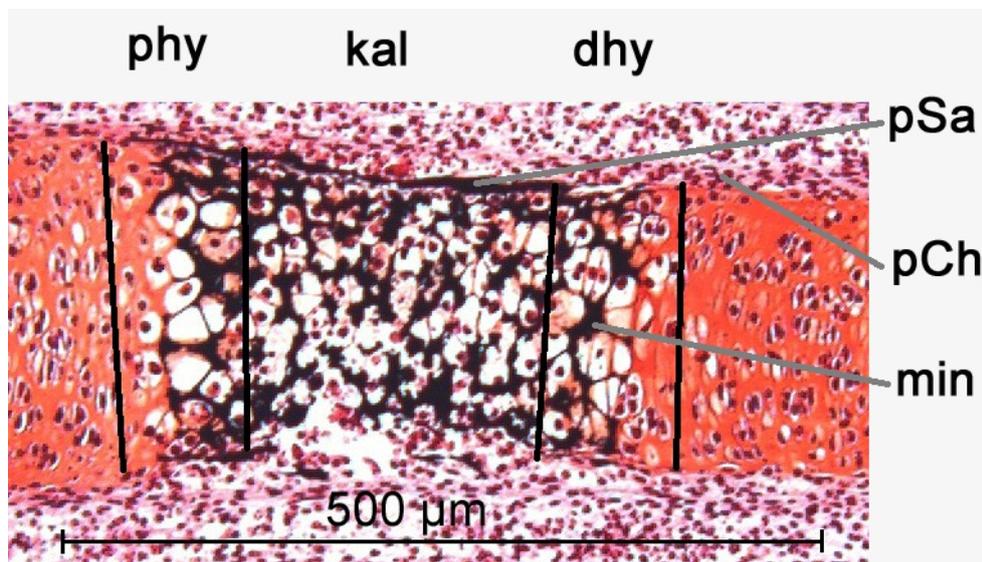


Abb. 9 Ausschnitt aus MT III, Safranin-Orange/von Kossa

Die rot angefärbten Knorpelzellen im rechten und linken Bildrand sind umgeben vom Perichondrium (**pCh**) und vergrößern sich zur Mitte der Knochenanlage hin zu großblasigen hypertrophen Chondrozyten. In der hier als proximal und distal markierten hypertrophen Zone (**phy** und **dhy**) liegen sie noch unverkalkt vor, während sie in der kalzifizierten Zone (**kal**) von mineralisierter Matrix (**min**) umgeben sind. Nahezu die gesamte hypertrophe und in jedem Fall die kalzifizierte hypertrophe Zone ist medial und lateral von mineralisiertem periostalen Knochensaum (**pSa**) umgeben.

Die Betrachtung der Präparate in 50facher und 100facher Vergrößerung zeigte keinen Unterschied zwischen den Stimulations- und den Kontrollgruppen und wies auch zwischen den einzelnen Gruppen mit unterschiedlicher Stimulationsfrequenz keine sichtbaren Differenzen auf.

Jedoch ließen sich zwischen den einzelnen, nicht zusammengehörigen MT-Paaren zum Teil große Unterschiede erkennen. Die Länge der kalzifizierten Diaphyse, der Grad der Mineralisierung und das Auftreten von primären Markhöhlen variierten sehr stark. Das Vorhandensein dieser Merkmale korrelierte nahezu immer in zusammengehörigen Paaren (siehe *Abb. 9*). So war bei einigen Paaren eine kalzifizierte Zone, bestehend aus im Verbund liegenden Chondrozyten und umgeben von einem intakten Periost, sichtbar. Bei anderen Paaren waren Teile der Zellen und der mineralisierten Interzellulärsubstanz abgebaut und hin und wieder wurde der gesamte Raum des kalzifizierten Zylinders von der primären Markhöhle beherrscht. Bei diesen Präparaten ließen sich in Verbindung mit Ausbildung der Markhöhle ein oder mehrere Durchbrüche im Periost erkennen. Es ließ sich ebenfalls beobachten, dass die kalzifizierte Zone in Metatarsalia mit großer Markhöhle länger war.

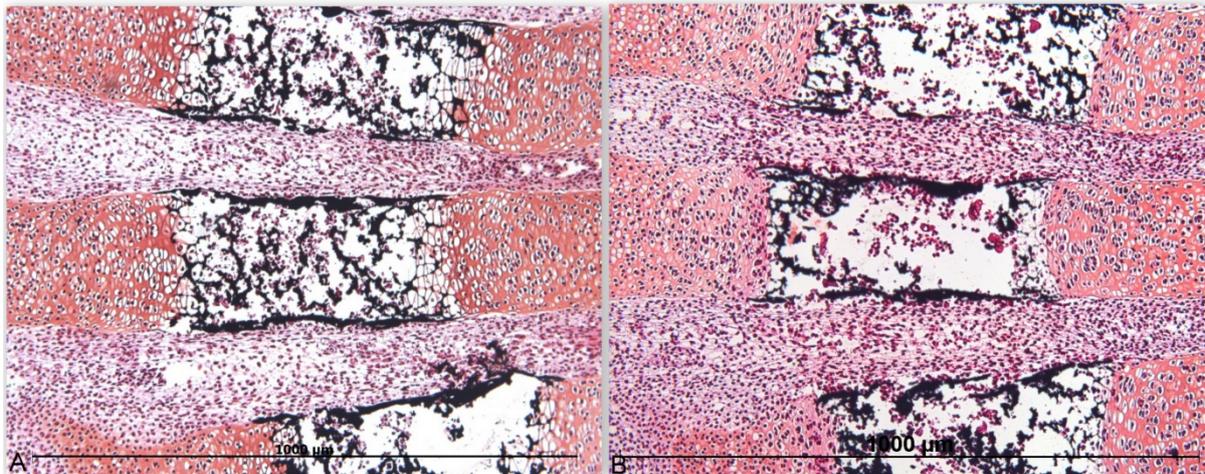


Abb. 9 Mt-Block 17,5 dcp

große mineralisierte Zone mit ausgeprägtem periostalen Saum und primärer Markhöhle übereinstimmend in linker und rechter Gliedmaße eines Fetus, **A** linker MT, Stimulation, **B** rechter MT, Kontrolle

In der Mehrheit der Präparate waren in der kalzifizierten Zone bereits mehr oder weniger große Exkavationen sichtbar (*Abb.10*), die auf den Beginn der Formierung der primären Markhöhle hindeuten. Die Struktur des Knorpels war innerhalb dieser Markhöhlen zusammengebrochen und es zeigten sich nunmehr Reste des mineralisierten Gerüsts der Interzellulärsubstanz. Den kalzifizierten Bereich umgab ein dünner periostaler Knochensaum, der ebenfalls mineralisiert war und sich schwarz anfärbte. Der periostale Saum reichte in der Regel von der proximalen bis zur distalen hypertrophen Zone. In einigen Präparaten fand sich ein durchgehender Saum, während in anderen ein oder mehrere Durchbrüche (*Abb.11*) dieses Knochensaums auffielen.

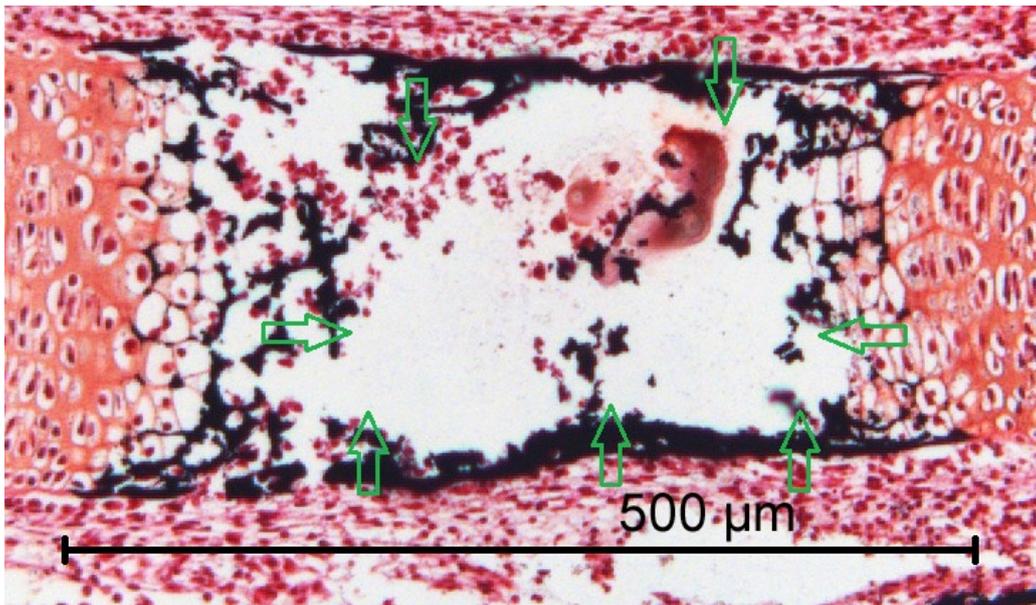


Abb. 10 Ausbildung einer primären Markhöhle

Die grünen Pfeile markieren den äußeren Umriss der primären Markhöhle. Distal und proximal der hypertrophen Zone fand die Kalzifizierung der hypertrophen Chondrozyten statt, während mittig nur noch gerüstartige mineralisierte Strukturen und Zellrümmen übrig waren.

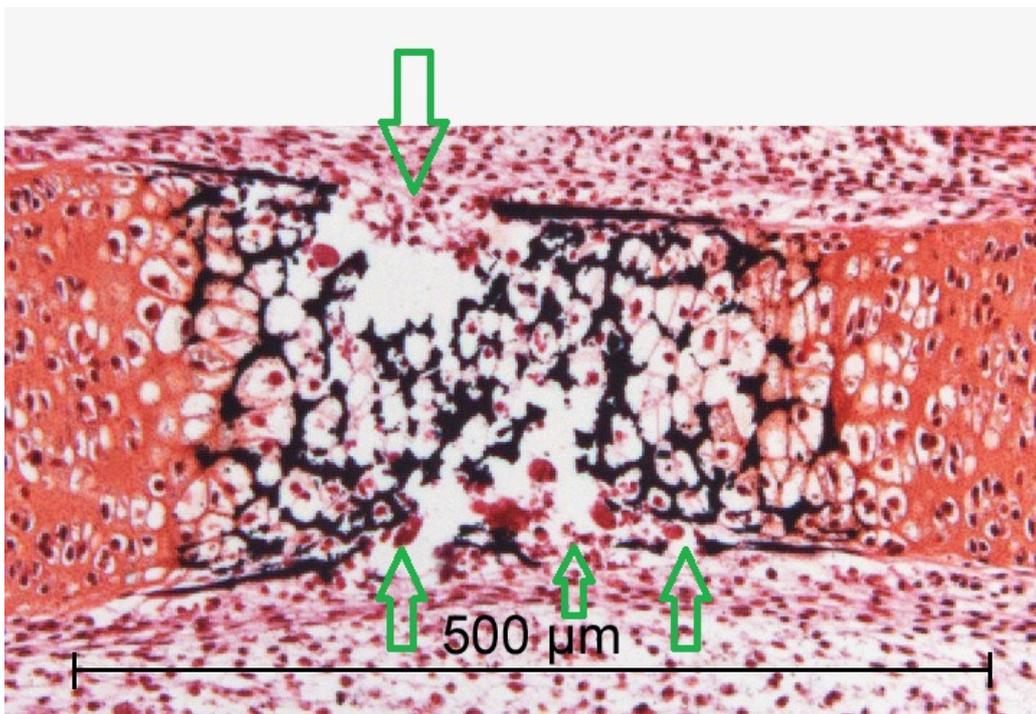


Abb. 11 Ausbildung von Durchbrüchen im periostalen Knochensaum

Die grünen Pfeile markieren je einen Durchbruch im periostalen Knochensaum. Zum Teil gingen die Ausprägungen der Durchbrüche mit Bildung einer Exkavation in der kalzifizierten Zone einher.

4.1.3 Ausbildung einer primären Markhöhle

Von insgesamt 102 Präparaten, von denen jeweils die Hälfte zur stimulierten Gruppe und die andere Hälfte zur Kontrollgruppe gehörten, wiesen 71 Präparate Anzeichen einer beginnenden Markhöhlenbildung auf. Das kalzifizierte Material der Diaphyse war in unterschiedlich großen Anteilen bereits durch Resorption von Chondroklasten entfernt worden, allerdings konnte keine Einsprossung von Kapillaren beobachtet werden, was der fehlenden Durchblutung der *in vitro* Kultivierung geschuldet war. Wie in Tabelle 4 dargestellt, wurden in der Kontrollgruppe 32 beginnende Markhöhlen gesehen, in der Stimulationsgruppe 39. Bei zehn von insgesamt 51 zusammengehörigen Paaren trat eine Markhöhlenbildung gleichzeitig im rechten und linken Fußanteil auf.

	Anzahl gesamt	Markhöhle ausgebildet
Präparate insgesamt	102	71
Kontrollgruppe	51	32
Stimulationsgruppe	51	39

Tab. 4 Anzahl der ausgebildeten Markhöhlen

4.1.4 Anzahl der periostalen Durchbrüche

Der periostale Knochensaum verlief in den histologischen Gewebeschnitten lateral und medial der Diaphyse. Entsprechend konnten Durchbrüche im Knochensaum auf beiden Seiten der Knochenanlage entstehen, die zum Teil sehr stark in ihrer Länge variierten, worauf in der histomorphometrischen Auswertung, Kapitel 4.2.1 und 4.2.2, noch näher eingegangen wird. Im medialen Periost der Kontrollgruppe zeigten sich 34 Durchbrüche, in der Stimulationsgruppe 36. Im lateralen Periost der Kontrollgruppe waren 39 Durchbrüche sichtbar, in der Stimulationsgruppe 45. Insgesamt konnten also medial 70 und lateral 84 Durchbrüche für beide Gruppen gesehen werden, wie Tabelle 5 zeigt. Drei zusammengehörige rechte und linke Präparate von 51 Paaren wiesen gar keine Durchbrüche auf.

	Anzahl gesamt	Periostaler Durchbruch lateral	Periostaler Durchbruch medial
Präparate insgesamt	102	84	70
Kontrollgruppe	51	39	34
Stimulationsgruppe	51	45	36

Tab. 5 Anzahl der Durchbrüche im periostalen Knochensaum

4.2 Histomorphometrie

In die histomorphometrische Untersuchung gingen zunächst 27 Tiere aus dem Hauptversuch mit je einem rechten und einem linken MT-Block ein. Die Gruppengröße betrug jeweils neun Probenpaare bestehend aus Stimulations- und Kontrollpräparat, die Gruppeneinteilung entsprach der Stimulationshäufigkeit (2x, 4x bzw. 12x pro Tag). Alle Messungen, bis auf die Messung der Gesamtlänge des MT, erfolgten innerhalb der festgelegten und in Kapitel 3.6.2 erläuterten ROI und ausschließlich am MT III. Da aufgrund der Gruppengröße und des durchgeführten Kolmogorov-Smirnov-Anpassungstests eine Normalverteilung für die meisten der auszuwertenden Daten ausgeschlossen werden konnte, wurde im Folgenden der Median (25/75 Prozentquartil) bestimmt und es wurde mit nicht-parametrischen Tests gearbeitet.

4.2.1 Hauptversuch

Zunächst wurden die Stimulationen mit den dazugehörigen Kontrollen verglichen, um die direkte Auswirkung der mechanischen Stimulation zu zeigen. Da in drei Untergruppen von zwei, vier und zwölf Stimulationseinheiten pro Tag gearbeitet wurde, erfolgten die Vergleiche innerhalb der einzelnen Untergruppen. Die erhobenen Daten stammen von folgenden Parametern: zwei Längen- und fünf Flächenmessungen. Diese sind im einzelnen die Länge des MT III und der ROI und die Flächen der kalzifizierten Zone, der kalzifizierten und mineralisierten Zone, der proximalen und distalen hypertrophen Zone und die Fläche der Markhöhle in der kalzifizierten Zone.

Vergleich von Stimulations- und Kontrollpräparaten:

Häufigkeit der Stimulation zweimal täglich (Untergruppe 1a): Bei der Betrachtung der Daten fiel nur eine sehr geringe Differenz zwischen den Ergebnissen von Stimulation und Kontrolle auf. Die Mediane der gemessenen Parameter unterschieden sich kaum. Auch die Verteilung der zahlenmäßig größeren Ergebnisse erscheint zufällig und konnte nicht einer Fraktion (Stimulation oder Kontrolle) zugeordnet werden. Die berechneten Signifikanzen lagen in

allen Fällen über einem Wert von $p=0,05$. Die Werte lassen sich im einzelnen der Tabelle sechs entnehmen.

Parameter	Stimulation		Kontrolle		p
	Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge des MT3 in μm	1521	1323 - 1753	1627	1496 - 1814	0,678
Länge der ROI in μm	436	359 - 559	435	395 - 531	0,441
Fläche der kalzifizierten Zone in $10^3 \mu\text{m}^2$	54,8	46,2 - 85,3	60,2	51,6 - 85,4	0,110
Fläche der kalzifizierten und mineralisierten Zone in $10^3 \mu\text{m}^2$	19,7	11,4 - 23,2	16,4	12,5 - 21,7	0,767
Fläche der proximal hypertrophen Zone in $10^3 \mu\text{m}^2$	15,4	14,1 - 23,3	16,6	14,7 - 20,9	0,859
Fläche der distal hypertrophen Zone in $10^3 \mu\text{m}^2$	21,3	19,2 - 23,9	19,4	18,2 - 22,9	0,859
Fläche der kalzifizierten Markhöhle in $10^3 \mu\text{m}^2$	8	3,7 - 24,8	2,7	0 - 46,5	0,674

Tab. 6 Ergebnisse der Untergruppe 1a, Frequenz der Stimulation zweimal täglich

Häufigkeit der Stimulation viermal täglich (Untergruppe 1b): Bei einem Vergleich der erhobenen Daten für eine Stimulationsfrequenz von viermal am Tag fällt auf, dass die Werte der Stimulations- und der Kontrollgruppe nicht weit auseinander liegen. Zwischen den einzelnen Medianen sind kaum Größenunterschiede zu erkennen, wie der Tabelle 7 zu entnehmen ist. Lediglich bei der Größe der Markhöhle im kalzifizierten Gebiet ließ sich in der Stimulation ein deutlicher Unterschied zu der Kontrolle erkennen. Die Größe der Markhöhle im kalzifizierten Gebiet war mit $63 \mu\text{m}^2$ in der Stimulationsgruppe tendenziell größer als in der Kontrollgruppe, bei der die Markhöhle nur $16 \mu\text{m}^2$ betrug ($p=0,069$).

Parameter	Stimulation		Kontrolle		p
	Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge des MT3 in μm	1579	1389-1626	1538	1245-1671	0,859
Länge der ROI in μm	414	334-517	486	327-519	0,260
Fläche der kalzifizierten Zone in $10^3 \mu\text{m}^2$	72,9	44,6 - 90,7	72,7	38,8 – 84,8	0,314
Fläche der kalzifizierten und mineralisierten Zone in $10^3 \mu\text{m}^2$	17,4	15,3 – 22,2	16,6	12,3 – 22,8	0,953
Fläche der proximal hypertrophen Zone in $10^3 \mu\text{m}^2$	15,9	12,6 – 17,3	15,8	10,9 – 22,3	0,314
Fläche der distal hypertrophen Zone in $10^3 \mu\text{m}^2$	18,9	15,4 – 23,2	19,8	18,4 – 23,3	0,374
Fläche der kalzifizierten Markhöhle in $10^3 \mu\text{m}^2$	62,7	1,7 – 67,3	15,5	0,5 – 62,8	0,069

Tab. 7 Ergebnisse der Untergruppe 1b, Frequenz der Stimulation viermal täglich

Häufigkeit der Stimulation zwölfmal täglich (Untergruppe 1c): Auch bei zwölfmaliger Stimulation fanden sich keine signifikanten Unterschiede in Länge oder Größe der gemessenen Bereiche. Die Fläche der kalzifizierten Zone war in der stimulierten Gruppe tendenziell größer als in der Kontrollgruppe ($p=0,051$). Die einzelnen Werte können der Tabelle 8 entnommen werden.

Parameter	Stimulation		Kontrolle		p
	Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge des MT3 in μm	1643	1609-1720	1652	1598-1835	0,594
Länge der ROI in μm	425	403-474	416	358-474	0,594
Fläche der kalzifizierten Zone in $10^3 \mu\text{m}^2$	55,8	47,1 – 65,9	55,5	46,8 – 79,4	0,051
Fläche der kalzifizierten und mineralisierten Zone in $10^3 \mu\text{m}^2$	28,2	17,3 - 30,2	20,7	15,5 – 25,9	0,173
Fläche der proximal hypertrophen Zone in $10^3 \mu\text{m}^2$	13,6	11,3 - 16,5	14,9	10,7 – 16,6	0,441
Fläche der distal hypertrophen Zone in $10^3 \mu\text{m}^2$	21,8	15,8 - 24,0	18,5	14,8 – 22,3	0,678
Fläche der kalzifizierten Markhöhle in $10^3 \mu\text{m}^2$	1,0	0,3 - 24,9	3,5	0 – 27,2	0,263

Tab. 8 Ergebnisse der Untergruppe 1c, Frequenz der Stimulation zwölfmal täglich

Messungen am periostalen Saum

Die Längenmessungen am periostalen Knochensaum wurden medial und lateral am MT III durchgeführt und beinhalteten folgende Werte: Länge des medialen und lateralen Periosts, Länge der medialen und lateralen periostalen Durchbrüche und die prozentualen Anteile der Durchbrüche am medialen und lateralen Periost. Messpunkte für die Länge des periostalen Saums waren jeweils der Beginn und Abschluss der kalzifizierten Strukturen desselben. Zusätzlich wurden die gesehenen Durchbrüche darin und deren Länge bestimmt. Für die statistische Auswertung wurden die Längen der einzelnen Durchbrüche der medialen und lateralen Messung addiert und nur die Summe in die Auswertung einbezogen. Zusätzlich wurde diese Summe in ein prozentuales Verhältnis zur Gesamtlänge des Periosts gesetzt, so dass der Anteil der Durchbrüche vom Knochensaum bestimmt werden konnte. Die Messergebnisse aller drei Untergruppen (1a-c), abzulesen in Tabelle 9 und dort benannt als 2x für Untergruppe 1a, 4x für 1b und 12x für 1c, wurden vergleichend für Stimulations- und Kontrollparameter ausgewertet. Die Werte für alle Parameter unterschieden sich nicht signifikant. In der Untergruppe 1a (2x) waren die Durchbrüche des medialen periostalen Saums in der Stimulationsgruppe mit 34 μm tendenziell größer als in der Kontrollgruppe mit 0 μm ($p=0,069$). Eine Verlängerung des medialen Periosts der Stimulationspräparate konnte ebenfalls gesehen werden, allerdings war auch dieser Wert nicht signifikant ($p=0,051$).

Parameter	Häufigkeit der Stimulation	Stimulation		Kontrolle		p
		Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge des medialen Periosts in μm	2x	370	311 - 450	352	307 - 486	0,859
	4x	405	268 - 498	434	267 - 493	0,214
	12x	381	319 - 432	361	339 - 475	0,051
Länge des lateralen Periosts in μm	2x	325	266 - 437	325	256 - 422	0,767
	4x	376	241 - 467	383	199 - 464	0,214
	12x	347	290 - 391	312	300 - 443	0,260
Länge der medialen periostalen Durchbrüche in μm	2x	34	15 - 66	0	0 - 47	0,069
	4x	24	0 - 64	46	0 - 146	0,735
	12x	30	7 - 130	34	0 - 96	0,859
Länge der lateralen periostalen Durchbrüche in μm	2x	66	27 - 96	36	0 - 101	0,067
	4x	104	42 - 154	81	27 - 224	0,889
	12x	42	0 - 105	88	0 - 114	0,575
Prozentualer Anteil der Durchbrüche am medialen Periost	2x	8	4 - 21	0	0 - 10	0,093
	4x	8	0 - 15	13	0 - 30	0,735
	12x	8	2 - 26	11	0 - 19	0,767
Prozentualer Anteil der Durchbrüche am lateralen Periost	2x	22	7 - 37	10	0 - 36	0,678
	4x	30	11 - 44	34	6 - 62	0,674
	12x	12	0 - 24	23	0 - 29	0,674

Tab. 9 Messungen am periostalen Knochensaum

Vergleiche zwischen den unterschiedlichen Stimulationsfrequenzen

Mit den Parametern Länge des MT III und der ROI und Flächen der kalzifizierten, der mineralisierten und kalzifizierten, der proximalen und distalen hypertrophen Zone wurden die stimulierten Präparate der Untergruppe 1a bis c untereinander verglichen. Das heißt, die Untergruppen mit zwei- vier- oder zwölf Stimulationseinheiten am Tag wurden zueinander in Bezug gesetzt, um den Einfluss der Stimulation auf die evaluierten Parameter zu ermitteln. Da mithilfe des verwendeten Tests immer nur zwei Gruppen miteinander verglichen werden konnten, wurden zunächst Untergruppe 1a mit b, dann 1b mit c und schließlich 1a mit c verglichen. Die ermittelten Mediane und Perzentile für die Stimulationen sind in Tabelle sechs bis acht dargestellt. Es ergaben sich auch bei dieser Berechnung nur geringe Größenunterschiede zwischen den einzelnen Längen und Flächen innerhalb der unterschiedlichen Stimulationsgruppen. Die Länge des MT III der Untergruppe 1c war mit 1643 μm nach Bonferroni-Holm-Korrektur tendenziell größer als die von Untergruppe 1b mit 1579 μm ($p=0,04$) und die Fläche der proximal hypertrophen Zone von Untergruppe 1a war mit 15,4 μm tendenziell größer als in Untergruppe 1c mit 13,6 μm ($p=0,63$).

4.2.2 Folgeversuche

Da in den Hauptversuchen keine signifikanten Größenunterschiede zwischen Stimulation und Kontrolle festzustellen waren, wurden die Versuchsbedingungen wie in Kapitel 3.4.1. beschrieben variiert. Damit sollten Interaktionen zwischen den stimulierten Präparaten und den Kontrollpräparaten in der selben Kulturschale über die Luft ausgeschlossen werden, aber auch eventuelle Einflüsse der Stimulation über die Bodenplatte der Kulturschale auf die nicht-stimulierten Kontrollen ausgenommen werden. Die Folgeversuche fanden nur in einer Gruppengröße von 6 Probenpaaren statt. Da zwischen den verschiedenen Stimulationsgruppen keine Unterschiede gefunden wurden, wurden die Folgeversuche auf die höchsten und niedrigsten Stimulationsintervalle (zweimal und zwölfmal am Tag) beschränkt.

Vergleiche der Kontrollen des Hauptversuchs mit denen der Folgeversuche

Die bestimmten Parameter waren die gleichen wie die im Hauptversuch: Länge des MT III und der ROI und Flächen der kalzifizierten, der mineralisierten und kalzifizierten, der proximalen und distalen hypertrophen Zone. Die Kontrollen der drei Untergruppen des Hauptversuchs wurden zusammengefasst und zunächst mit dem Folgeversuch 2a und dann mit 2b verglichen. Der MT III war im Folgeversuch 2a mit 1679 μm signifikant ($p=0,031$) länger als in der Kontrollgruppe des Hauptversuchs mit 1572 μm . Tendenzuell war dies auch bei Folgeversuch 2b erkennbar (Kontrolle des Folgeversuchs 2b 1648 μm , Kontrolle des Hauptversuchs 1572 μm , $p=0,052$). Die Fläche der kalzifizierten und mineralisierten Zone

war mit 20684 μm^2 im Hauptversuch tendenziell grösser als in beiden Folgeversuchen (2a 16292 μm^2 und 2b 15513 μm^2). Diese Unterschiede waren ebenfalls nicht signifikant ($p=0,091$ bei 2a und $p=0,086$ bei 2b). Alle anderen verglichenen Werte waren gleich in Größen- und Längenverteilung. Auch die Kontrollen des zunächst zusammengefassten Hauptversuchs wurden nochmals in den jeweiligen Untergruppen verglichen. Bei der Gegenüberstellung von Untergruppe 1a mit 1b zeigten sich keine Unterschiede. In Untergruppe 1c war die Länge des MT III mit 1652 μm tendenziell größer als in Untergruppe 1b mit 1538 μm ($p=0,056$). Zwischen Untergruppe 1a und 1c war die Fläche der proximal hypertrophen Zone der Untergruppe 1a mit 16609 μm^2 signifikant größer als die der Untergruppe 1c mit 14915 μm^2 ($p=0,006$).

Messungen am periostalen Saum

In den Untersuchungen zu Länge und Durchbrüchen des periostalen Knochensaums wurden ebenfalls die gleichen Parameter wie im Hauptversuch bestimmt: Länge des medialen und lateralen Periosts, Länge der medialen und lateralen periostalen Durchbrüche und die prozentualen Anteile der Durchbrüche am medialen und lateralen Periost. Innerhalb des Folgeversuchs 2a gab es bei zweimaliger und bei zwölfmaliger Stimulation am Tag keine Tendenzen oder signifikante Unterschiede der Werte zum Hauptversuch. Bei dem Folgeversuch 2b bei zweimaliger und zwölfmaligen Stimulation täglich verhielt es sich ebenso.

Sonstige Berechnungen im Folgeversuch

Der Vollständigkeit halber wurden auch für die Folgeversuche a und b die Vergleiche zwischen Stimulations- und Kontrollpaar durchgeführt sowie die Vergleiche der Stimulation von unterschiedlicher Stimulationshäufigkeit am Tag untereinander.

Beim Vergleich zwischen Stimulationen und Kontrollen war innerhalb der Gruppe 2a mit einem Intervall von zwölf Biegezyklen täglich die Länge der ROI mit 398 μm in der Stimulationsgruppe signifikant größer als in der Kontrollgruppe, bei der sie nur 358 μm betrug ($p=0,046$). Ebenfalls stellte sich die Fläche der kalzifizierten Zone der Stimulationen mit 53598 μm^2 signifikant größer dar als bei den Kontrollen mit 46784 μm^2 ($p=0,028$). Auch der mediale und laterale periostale Saum waren in der Stimulationsgruppe signifikant größer mit 359 μm medial und 339 μm lateral verglichen mit den Kontrollen 317 μm medial und 273 μm lateral ($p=0,043$ medial und $0,043$ lateral). Bei zwei Biegezyklen pro Tag fanden sich keine signifikanten Unterschiede der Ergebnisse. In der Gruppe 2b konnte bei zwölf Biegeintervallen täglich lediglich ein signifikanter Unterschied in der Länge des MT III gesehen werden, der mit 1701 μm in der Kontrollgruppe grösser war als in der Stimulationsgruppe mit 1556 μm ($p=0,028$).

Bei zweimaligen Biegeintervallen täglich war die Länge des lateralen Periosts bei den stimulierten Präparaten signifikant größer mit 342 μm zu 309 μm in den Kontrollen ($p=0,028$). Ebenfalls signifikant größer war die Länge der lateralen periostalen Durchbrüche der Kontrolle mit 88 μm zu 37 μm der Stimulation ($p=0,043$). Der prozentuale Anteil der Durchbrüche am lateralen Periost war in der Kontrollgruppe signifikant grösser mit 25% zu 9% ($p=0,043$).

Die Vergleiche der Stimulationen zeigten nur in Gruppe 2a eine signifikant größere Fläche der distalen hypertrophen Zone bei zweimaligen Stimulationsintervallen täglich von 23339 μm^2 zu 17464 μm^2 bei zwölfmaligen Intervallen ($p=0,004$).

Da in den Folgeversuchen die Feten zum Teil von den gleichen Muttermäusen wie die Feten des Hauptversuchs stammen, können gewisse verwandtschaftliche Abhängigkeiten nicht ausgeschlossen werden und die Ergebnisse dieses Versuchs darum nur mit Vorsicht interpretiert werden.

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei der deskriptiven Betrachtung der histologischen Präparate wurden keine Unterschiede zwischen den stimulierten Präparaten und den dazu gehörigen Kontrollen gesehen. Jedoch ließen sich zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den Präparaten der verschiedenen Feten bezüglich der Kalzifizierung, der Größe der kalzifizierten Diaphyse und der Ausprägung der primären Markhöhle sehen. Die Verteilung der Markhöhlen und der periostalen Knochendurchbrüche zeigten zwar ein erhöhtes Auftreten innerhalb der Stimulationen, dieser Unterschied erwies sich aber nicht als signifikant. Es gab keine offensichtlichen Differenzen zwischen den einzelnen Stimulationsgruppen von zwei- vier- und zwölfmal am Tag.

Die histomorphometrischen Analysen entsprachen den Ergebnissen der deskriptiven Betrachtung. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf Flächen- und Längenausprägungen zwischen den stimulierten Präparaten und den Kontrollen festgestellt werden. Auch der Vergleich der Stimulationen der verschiedenen Gruppen führte zu keinem signifikanten Unterschied. Die durchgeführten Folgeversuche, in denen die Kontrollpräparate ausgelagert wurden, ergaben keine Unterschiede bezüglich des Kultivierungsortes der Kontrollen.

5 Diskussion

Die enchondrale Ossifikation ist ein wichtiger Bestandteil der fetalen Knochenentwicklung, des Skelettwachstums und der Frakturheilung. Der Prozess der Verknöcherung beinhaltet die Abläufe von Proliferation und Hypertrophie der Chondrozyten, Mineralisierung der Knorpelmatrix und schließlich die der Knochenformation. Das mechanische Umfeld ist ein wichtiger Faktor bei der Differenzierung von Zellen und Geweben und beeinflusst die Entwicklung von adulten und fetalen Knochen nachhaltig. In zahlreichen Studien konnte die Auswirkung von biomechanischer Stimulation auf fetale Knochenanlagen nachgewiesen werden (Burger et al., 1992; Copray et al., 1985a; Klein-Nulend et al., 1987b; Korstjens et al., 2004; Nolte et al., 2001; Trepczik et al., 2007; van't Veen et al., 1995).

Ziel dieser Studie war es, den Einfluss von mechanischer Stimulation in Form einer Drei-Punkt-Biegung auf murine fetale Metatarsalknochen zu testen. Dazu wurde ein Organkulturmodell mit Knochenanlagen von Mäusefeten 17,5 dpc verwendet, in dem die Biegung in Intervallen von zweimal, viermal und zwölfmal 20 Minuten pro Tag ausgeführt wurde. Die Ergebnisse wurden vergleichend zwischen dem rechten, per Biegung stimulierten Metatarsalblock, und der linken, nicht-stimulierten Kontrolle erhoben. Die Auswertung erfolgte mittels histologischer und histomorphometrischer Analysen.

5.1 Organkulturmodell

Organkulturen im Allgemeinen stellen für Kurzzeitexperimente eine gute und gebräuchliche Methode dar, um bestimmte Aussagen in physiologischer, pharmakologischer und toxikologischer Hinsicht zu treffen. In den hier verwendeten fetalen Knochenanlagen der Maus mineralisiert ein Viertel der metatarsalen Länge innerhalb eines Tages und Auswirkungen auf die Mineralisation machen sich innerhalb kurzer Zeit bemerkbar (Burger et al., 1992; Tanck et al., 2000; Van Loon et al., 1995). Es wurden mehrere Methoden etabliert, um Knochen- und Knorpelzellen zu kultivieren und diese Zellen während der Organkultur verschiedenen Formen von biomechanischer Belastung auszusetzen. Die *in vitro* kultivierten Zellen des Skelettsystems sprachen auf diese Behandlungen unterschiedlich an aber es konnte klar gezeigt werden, dass mechanische Belastung auf zellulärer Ebene eine Reaktion auslöst (Murray and Rushton, 1990; Reich et al., 1990; Veldhuijzen et al., 1979). Nahezu alle in diesen Studien verwendeten Zellen wurden den Knochen von embryonalen, fetalen oder neonaten Tieren entnommen, wobei zunächst fraglich war, ob derart schnell wachsendes Gewebe überhaupt empfänglich auf mechanische Stimuli reagiert. Diese Tatsache konnte mittlerweile hinreichend bewiesen werden (Burger et al., 1991; Klein-Nulend et al., 1986), und auch die Nutzung von ganzen fetalen Knochenanlagen in Organkultur zur Bestimmung von mechanischen Auswirkungen *in vitro* wurde als geeignet befunden. Das Modell der

Metatarsalknochen zwei bis fünf en bloc im Alter von 17,5 dpc war für die hier durchgeführten Versuche besonders passend, da es zwei Phasen der chondralen Ossifikation repräsentierte. Sowohl die Kalzifizierung des hypertrophen Knorpels, als auch die desmale Bildung der periostalen Knochensäume fanden in diesem Präparat statt (Nolte et al., 2001). Der Metabolismus der Knochenmatrix und die Zelldifferenzierung reagieren ab dem Zeitpunkt der Entstehung von hypertrophen Knorpelzellen besonders sensitiv auf das mechanische Umfeld. In Studien, in denen intermittierende Druckkraft als Stimulans verwendet wurde, konnte gezeigt werden, dass nicht das Einsetzen der Hypertrophie, aber, sobald eine hypertrophe Zone entwickelt war, die Mineralisierung innerhalb dieser Zone beschleunigt werden konnte (Burger et al., 1992). Die aufgeführten Tatsachen zeigen erstens, dass Knochen-Organulturen nutzbar sind, um skeletale Adaptationen auf zellulärer Ebene zu studieren und zweitens, dass potentiell alle differenzierten Knochenzellen mechanosensitiv sind, unabhängig vom Alter des Individuums (Burger et al., 1992). Die Zellkultur-Technik bietet außerdem die Möglichkeit, die Parameter der ausgeübten Kraft zu kontrollieren und ihre Übertragung detailgenau zu erforschen (Jones et al., 1995).

5.2 Diskussion von Material und Methoden

5.2.1 Versuchsaufbau

Der Versuchsaufbau dieser Arbeit basiert auf einem im Julius Wolff Institut der Charité 2006 etablierten Organkulturmodell, in dem eine Drei-Punkt-Biegung von fetalen murinen Metatarsalknochen *in vitro* in einer Stimulationseinheit durchgeführt werden kann (Trepczik et al., 2007). Zum Zweck der mechanischen Stimulation wurde eine spezielle Einheit (siehe Stimulationseinheit, Abb. 1, Kapitel 3.4.1) konstruiert, die es unter gleichbleibenden äußeren Bedingungen gestattete, durch Biegung eine kontrollierte Kraft auf die Knochenanlagen auszuüben. Im Gegensatz zu anderen Studien, die sich mit Biegung von fetalen Knochenanlagen beschäftigten (Tanck et al., 2004), war in diesem Studiendesign keine Entnahme der Präparate aus dem Organkulturmedium zur Durchführung der mechanischen Stimulation nötig. Somit konnte während der gesamten Dauer der Organkultur eine gleichbleibende Versorgung der Knochenanlagen mit Nährstoffen, Flüssigkeit und Wärme gewährleistet werden.

5.2.2 Präparation

Die Entnahme der Metatarsalknochen erfolgte aufgrund ihrer Größe von circa zwei Millimetern Länge mal eineinhalb Millimetern Breite (MT II bis V nebeneinander) und 0,3 Millimetern Höhe mit Hilfe eines Stereomikroskops. Es wurden „en bloc“ Präparate der MT II-IV gewonnen, damit der später zu untersuchende MT III geschützt zwischen den anderen Knochenanlagen lag und somit die Gefahr einer versehentlichen Verletzung geringer war. Haut, Muskulatur, sowie proximal und distal angrenzende Knochen mussten mit Hilfe von zwei Pinzetten abgetragen werden. Trotz sorgfältigen Vorgehens kam es gelegentlich zum Zerreißen des Präparats im Interdigitalspalt oder zu Brüchen der feinen Metatarsalia. Da in die Versuchsreihe jeweils nur ein Fetus pro Muttertier einging um statistische Abhängigkeiten zu vermeiden, jede Muttermaus aber mindestens mit vier Feten trächtig war, konnte in so einem Fall auf einen anderen Fetus zurückgegriffen werden.

5.2.3 Organkultur und mechanische Stimulation

Von dem hergestellten Blockpräparat wurde aus mehreren Gründen nur der MT III zur Auswertung herangezogen. Erstens befanden sich die MT II-V zum Zeitpunkt 17,5 dpc in verschiedenen Entwicklungsstadien. Die Metatarsalia III und IV zeigten an Tag 16,5 dpc bereits kleine kondensierte Regionen von Ossifikation, während in den anderen MT noch keine Anzeichen von Verknöcherung zu sehen waren (Kaufmann, 1992). Zweitens bot die mittlere Position des MT III Schutz vor Verletzung, wie bereits weiter oben im Text erwähnt wurde. Die Kalzifizierung des Knorpelgewebes in den fetalen Metatarsalia beginnt in dem Moment, in dem die ersten Muskelkontraktionen der plantaren Muskulatur auftreten (Burger et al., 1991). Diese Tatsache lässt vermuten, dass der Mineralisierungsprozess von mechanischer Belastung stimuliert wird, was in dieser Studie nachgeahmt und die dafür nötigen Bedingungen untersucht werden sollten (Tanck et al., 2004).

Der Block der Metatarsalia lag während der Kulturphase einem Nitrozellulosefilter auf. In einem Vorversuch konnte gezeigt werden, dass der Filter das Wachstum der Knochenanlagen beeinflusste. Bei einem Längenvergleich zwischen Knochen, die mit und ohne Filterunterlage kultiviert wurden, konnte nach sieben Tagen Kultivierung ein verstärktes Längenwachstum ohne Filter festgestellt werden. Aus diesem Grund wurden die nicht stimulierten Kontrollen ebenfalls auf Nitrozellulosefiltern gelagert und kultiviert. Das Kulturmedium wurde während der gesamten sieben Tage nicht erneuert. In dieser Zeit wurden Inhaltsstoffe verbraucht und der pH des Mediums änderte sich, da Nährstoffe von den Zellen aufgenommen und respiratorische Abbaustoffen ausgeschieden wurden. Der zugesetzte pH-Indikator Phenol-Rot vollzog in keiner der Kulturen einen Farbumschlag von rot zu gelb. Dieses Ergebnis ließ vermuten, dass weder der Zellmetabolismus noch äußere

Einflüsse die Zusammensetzung des Mediums auf eine Weise veränderten, die die enthaltenen Organkulturen schädigte. In wieweit das metatarsale Wachstum durch möglicherweise fehlende oder nicht bis zum Kern der Knochenanlage vorgedrungene Nährstoffe beeinflusst war, kann nur vermutet werden. Auch unter den besten Organkulturbedingungen bestehen immer Differenzen zu den *in vivo*-Bedingungen und die möglicherweise suboptimale Beschaffenheit des Kulturmediums könnte zu einer verzögerten Mineralisierung geführt haben (Tanck et al., 2000). Die Zellmorphologie und -vitalität zeigte sich in der histologischen Examination normal und gesund und es wurden keine Anzeichen von Nekrosen festgestellt. Ein weiterer Grund für die nicht vorgenommene Erneuerung des Mediums während sieben Tagen war, dass die Zellen vermutlich Mediatoren in Form von lokalen Wachstumsfaktoren in das Medium sezernierten (Gerstenfeld and Shapiro, 1996). Es ist anzunehmen, dass diese Mediatoren andere Zellen der Knochenanlage beeinflussen. Um diese Interaktionen nicht zu stören oder zu unterbrechen, wurde entschieden, dass Medium während der gesamten Kulturphase nicht zu erneuern.

Für die mechanische Stimulation der Metatarsalknochen war die Anheftung der Präparate am Nitrozellulosefilter essentiell. Diesem Prozess wurde im Vorfeld der Biegung 24 Stunden Zeit gegeben. Drei während des Versuchs beobachtete Tatsachen deuteten darauf hin, dass diese Anheftung tatsächlich in ausreichendem Maße stattgefunden hat. Erstens zeigte der bereits oben im Text beschriebene Vorversuch ein unterschiedliches Längenwachstum bei mit und ohne Filter kultivierten Präparaten. Aus dieser Tatsache lässt sich schlussfolgern, dass eine Anheftung zwischen Präparat und Filter stattgefunden haben muss, da frei schwebend in Flüssigkeit das Längenwachstum nicht beeinträchtigt gewesen wäre. Zweitens wurde in keinem Fall eine Ablösung der Knochenanlagen von der Filteroberfläche am Ende der Kulturzeit festgestellt. Es wurde angenommen, dass, sollten die Metatarsalia nicht mit gebogen worden sein, es zu einem vollständigen Kontaktverlust zwischen Knochen und Filteroberfläche gekommen wäre. Drittens wurden hochauflösende Photographien angefertigt (siehe Kapitel 3.4.2), die ausschließen konnten, dass es zu einer Ablösung während der Biegung kam. Aufgrund dieser Belege wurde davon ausgegangen, dass das Knochenpräparat dauerhaft am Filter haftete und bei einer Biegung der Krümmung des Filters folgte. Die Verbindung des Nitrozellulosefilters mit dem unterliegenden Titanchip ergab sich aus dem Aufbau der Stimulationseinheit und wurde ebenfalls durch die angefertigten hochauflösenden Photographien belegt. Die Flüssigkeitsbewegung in den Wells der Kulturschale sollte ebenfalls als mögliches Stimulans der Verknöcherung bedacht werden (Burger et al., 2003). Während der stattfindenden Biegung wurde die Stimulationseinheit mit einer Frequenz von einem Hertz in die Well gedrückt und verursachte eine an der Oberfläche sichtbare, Flüssigkeitsbewegung nur für die stimulierten Präparate. Da durch die Bewegung von Flüssigkeit Osteozyten stimuliert werden und diese als

Mediatoren der Mechanotransduktion gehandelt werden, hätte diese Flüssigkeitsbewegung möglicherweise eine Steigerung der enchondralen Ossifikation verursachen können, selbst wenn die Drei-Punkt-Biegung wirkungslos geblieben wäre (McGarry et al., 2005; Mullender et al., 2004).

Die Steifigkeit des Titanchips wurde -wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben- getestet und dieser Chip mit entsprechender Kraft gebogen, so dass auf den Knochen circa 1000 μE einwirkten, was über die Längenabnahme desselben zu erkennen war. Es gibt für Zellen keine Möglichkeit Belastung direkt wahrzunehmen. Belastung führt zu einer mehr oder weniger starken Deformation der Zellen und des umliegenden Gewebes in Abhängigkeit von seiner Steifigkeit. Diese Deformation kann von den Zellen abgelesen werden (Lanyon, 1984). In Knochen von gesunden jungen Säugetieren erfolgt ab einer Einwirkung von 500 μE bis hin zu einer Kraft von 1500 μE ein Aufbau von Knochenmasse (Frost, 2004; Lanyon, 1984). Physiologische Reaktionen wurden bis zu Spitzenwerten von 3000 μE gefunden (Burr et al., 1996). Verschiedene Studien, die sich mit mechanischer Einwirkung auf humane Knochenzellen beschäftigten, applizierten Kräfte von 1000 μE auf diese Zellen und fanden eine erhöhte Zellaktivität (Kaspar et al., 2000b; McGarry et al., 2005). Es muss für den hier vorgestellten Versuch in Betracht gezogen werden, dass die angewendete Kraft von 1000 μE für fetale Knochenanlagen zu groß gewählt worden war, da die angegebenen Werte in μE für Knochen von jungen adulten Säugetieren gelten. Die Abläufe der enchondrale Ossifikation, die hier beeinflusst werden sollten, findet jedoch am adulten wie am fetalen Knochen nach dem gleichen Muster und unter Beteiligung der gleichen Zellen statt (Ferguson et al., 1999; Gerstenfeld et al., 2003). Es konnte anhand isolierter Osteozyten in Organkultur ein positiver Einfluss auf die Verknöcherung bei einer Kräfteinwirkung von 1000 μE festgestellt werden und diese Zellen lagen ebenfalls nicht im Verbund innerhalb eines adulten Knochens, sondern befanden sich nur als dünne Schicht auf einer Protein-Layer (Kaspar et al., 2000b; Neidlinger-Wilke et al., 1994). Die Angabe der Einheit Microstrain steht nicht für eine absolut ausgeübte Druckkraft, sondern ändert sich mit der Steifigkeit des Materials und hat also bei 1000 μE für jedes Material einen eigenen Wert. Eine Kraft von 1000 μE entspricht einer Längenänderung (Verkürzung) des Knochens von 0,1% der Gesamtlänge (Frost, 2004). Die Metatarsalia in diesem Versuch erfuhren ebenfalls eine Verkürzung um 0,1% ihrer Länge, welches im Vorversuch, wie in Kapitel 3.4.2 beschrieben, mittels DIC-Analyse überprüft wurde. Embryonale Knochen sind bedeutend weniger steif als adulte und bestehen zunächst nur aus einem Knorpelgerüst, welches im Laufe der Entwicklung mineralisiert und dadurch steifer wird. Wong und Carter (1990b) berechneten mit dem Finite Element-Verfahren die Elastizitätsmoduln für unkalzifizierte Gewebe mit sechs MPa und für kalzifizierte Gewebe mit 300 MPa. Diese Ergebnisse wurden von Gelenknorpel und Knochen abgeleitet, basierten aber nicht auf experimentellen Befunden mit fetalen Knochen. Tanck und Kollegen (2004)

fürten erste Untersuchungen an fetalen Rippenknochen durch und fanden für nicht-mineralisierten Knorpel ein Elastizitätsmodul von $1,11 (\pm 1,08)$ MPa und für mineralisierten Knorpel $117 (\pm 62)$ MPa (16 dpc) und $250 (\pm 145)$ MPa. (17 dpc) Diese Studie zeigt, dass kalzifizierter Knorpel der Diaphyse zwei Größenordnungen steifer ist als nicht-kalzifizierter Knorpel der Epiphyse. Die zwei Messwerte für mineralisierten Knorpel wurden mit einem Tag Altersunterschied, an Tag 16 und 17 post conceptionem, erhoben und differierten bereits um etwa eine Größenordnung (in diesem Fall entspricht eine Größenordnung etwa 100 MPa). Der Elastizitätsmodul gibt zwar Auskunft über die Steifigkeit von Knorpel- und Knochengewebe, sagt aber nichts darüber aus, bei welcher Größenordnung, ausgedrückt in Microstrain, die Krafteinwirkung zu einer verstärkten Ossifikation von fetalen Knochen führt. Ziel dieser Studie war es, die anzuwendende Größenordnung zu ermitteln. Auch wurden die Werte der Elastizitätsmoduln für mineralisiertes und nicht-mineralisiertes Knorpelgewebe unabhängig voneinander erhoben und in der hier vorgestellten Studie sind beide Gewebe in den Metatarsalia vereint, was vermutlich zu einem Mischwert führen würde. Die sich entwicklungsabhängig verändernde Größenordnung der einzusetzenden Kraft wirft eine klare Problematik für diesen Versuch auf. Wenn sich der Elastizitätsmodul innerhalb eines Tages verdoppelt ist es fraglich, ob eine Kraft von $1000 \mu\text{E}$, ausgeübt über sechs Tage der Entwicklung, nicht hätte angepasst werden müssen. Denn auch die Muskelkraft, mit der der Fetus *in utero* Stimuli auf die Metatarsalia ausübt und welche in diesem Experiment imitiert werden sollte, wächst ja mit zunehmender Größe desselben.

Die Frequenz der Biegungen wurde mit einem Hertz durchgeführt, da diese Frequenz als physiologisch angesehen wird (Goodship and Kenwright, 1985; Sah et al., 1989). Sie kam bereits in einigen anderen Studien mit mechanischer Beeinflussung von Knochen- und Knorpelzellen erfolgreich zur Anwendung (Kaspar et al., 2000b; Lee and Bader, 1997; McGarry et al., 2005; Neidlinger-Wilke et al., 1994). Auch in der vorangegangenen Studie, von welcher ein Teil des Studiendesigns übernommen wurde, wurde mit einer Hubfrequenz von einem Hertz gearbeitet (Treczik et al., 2007).

Die tägliche Häufigkeit der Biegungsintervalle von 20 Minuten wurde für zwei- vier- und zwölfmal festgelegt, denn die nötige Häufigkeit der Biegeintervalle, um eine verstärkte Ossifikation zu erzielen, war zu Beginn der Versuche unklar. In einer vorangegangenen Untersuchung von Treczik und Kollegen (2007) wurde die mechanische Stimulation zweimal täglich durchgeführt und damit lediglich moderate Einflüsse auf die Verknöcherung erzielt. Von diesen Daten ausgehend, wurden Intervalle von zwei- vier- und zwölfmal täglich festgelegt, da davon ausgegangen wurde, dass eine Häufigkeit von zweimal am Tag keinen ausreichenden Stimulus setzte. Allerdings konnten Meyer und Kollegen (1999) feststellen, dass die Größenordnung der angewandten Kraft und nicht die Frequenz der mechanischen

Belastung die Differenzierung von Knochenzellen und die Knochenformation beeinflusst. Es ist also unter Umständen möglich, dass eine erhöhte Anzahl von Biegeintervallen pro Tag gar keinen Einfluss auf die enchondrale Ossifikation nimmt.

5.2.4 Histologische Aufarbeitung

Aufgrund der geringen Größe der Präparate (2 x 1,5 x 0,3mm) und des daher sehr kleinen Anteils an mineralisiertem Gewebe wurden die Proben nicht entkalkifiziert, bevor man sie in Paraffin einbettete. Ebenfalls der Größe der Präparate geschuldet, stellte das Schneiden der Paraffinblöcke am Rotationsmikroskop eine Herausforderung dar. Die Ebene der größtmöglichen Ausdehnung des MT III musste gewährleistet sein, um eine korrekte Auswertung durchführen zu können. Da die Präparate aber trotz Vorlaufstrecke aus Paraffin und aller Sorgfalt manchmal verkippt eingebettet waren, reichten schon einige Schnitte aus, um ein Teil der Knochenanlage so zu dezimieren, dass die Ebene der größten Ausdehnung nicht mehr für den gesamten MT III zu treffen war.

5.2.5 Histomorphometrie

Die computergestützte Bildanalyse erleichterte die Auswertung histomorphometrischer Daten, und die Quantifizierung festgelegter Parameter bietet die Möglichkeit, Messungen von mehreren Untersuchern vornehmen zu lassen. Jedes Tier ging mit einem Schnitt des rechten, stimulierten MT-Blocks und einem Schnitt des linken, als Kontrolle dienenden MT-Blocks in die histomorphometrische Auswertung ein. Es wurden nach Safranin-Orange/von Kossa gefärbte Schnitte verwendet, da diese Färbung eine gute farbliche Abgrenzung des mineralisierten vom nicht-mineralisierten Gewebe gestattete. Die Masson-Goldner Trichrom-Färbung bot aufgrund des farblich einheitlich dargestellten Zelltyps und einer fehlenden Farbunterscheidung von mineralisiertem Gewebe zu wenig Kontrast. Die Verwendung von mehreren Schnitten hätte eventuell die Genauigkeit der Aussagen erhöht. Das Zentrum der größten Ausdehnung der Knochenanlage wies jedoch bei optischer Überprüfung von Serienschnitten nur wenige Variationen in Struktur und Zellanordnung auf, weswegen auf die Auswertung mehrerer Schnitte verzichtet wurde.

Nachdem in 50facher Vergrößerung die Längenmessung des gesamten MT III vorgenommen wurde, wurde in 100facher Vergrößerung die Region Of Interest (ROI) festgelegt. Es wurden eingangs Mehrfachuntersuchungen einzelner Präparate von ein- und demselben Untersucher durchgeführt und es konnte festgestellt werden, dass die ermittelten Ergebnisse untereinander nur wenig differierten. Die Breite der ROI war definiert durch den medialen und lateralen periostalen Knochenaum, in der Längenausdehnung wurde die Begrenzung vom Untersucher festgelegt. Die hypertrophe und kalzifizierte Zone war in der Safranin-Orange/von Kossa Färbung schwarz dargestellt und konnte somit leicht vom Rot

des nicht-kalzifizierten Knorpels abgegrenzt werden. Die hypertrophe Zone beinhaltete auch nicht-kalzifizierte Chondrozyten, deshalb wurde die Grenze zwischen proliferierenden und hypertrophen Zellen vom Untersucher gezogen. Die Festlegung der Länge der ROI war also benutzerdefiniert und stellt eine potentielle Fehlerquelle dar. Da die Untersuchungen nur von einer Person durchgeführt wurden und die Unterscheidung der Zellen immer nach den gleichen Kriterien (Größe und Rundung der Zellen) getroffen wurden, ist anzunehmen, dass die Festlegung für jedes Präparat ähnlich erfolgte. Gleiches gilt auch für die Bestimmung des hypertrophen Bereichs in Abgrenzung zur kalzifizierten Zone. Die ROI wurde weiterhin in einzelne Zonen eingeteilt, deren jeweilige Fläche vom Macro errechnet wurde. Bei einigen dieser Flächen kam es zu Überschneidungen. So beinhaltete die mineralisierte Fläche der kalzifizierten Zone auch die mineralisierten Flächen der distalen und proximalen hypertrophen Zonen und konnte aus diesem Grund nicht in der Auswertung verwendet werden. Ebenso verhielt es sich mit der Gesamtfläche der ROI, denn diese müsste um die Flächen der Voids, die in manche Präparate eingezeichnet wurden, um Artefakte von der Berechnung auszuschließen, korrigiert werden. Da die Voids sich aber unter Umständen in den Flächen der hypertrophen und kalzifizierten Zonen überschneiden, ist die Gesamtfläche der Void unbekannt und kann deshalb nicht von der Gesamtfläche der ROI subtrahiert werden. Die Fläche der ROI ging deshalb ebenfalls nicht in die Auswertung ein. Die Möglichkeit die Farbintensität des zu segmentierenden kalzifizierten Gewebes nach zu regulieren, schuf eine weitere untersucherabhängige Fehlerquelle. Der Farbübergang von rot zu schwarz erfolgte über ein dunkelrot-braun, dass die Abgrenzung zwischen den Geweben an manchen Stellen erschwerte. Auch die Zellkerne wurden zum Teil bei der Segmentierung mit angefärbt und mussten durch manuelle Korrektur aus der Wertung entfernt werden.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Deskriptive Histologie

Das histologische Erscheinungsbild der die hypertrophen und kalzifizierten Zonen und den periostalen Knochensaum beinhaltende ROI der MT III, stellte sich in allen Präparaten-Paaren gleichförmig dar. Es wurde kein Unterschied zwischen den Stimulationen und den Kontrollen gesehen. Zwischen den metatarsalen Knochenanlagen der einzelnen Feten gab es jedoch zum Teil sehr deutliche Unterschiede. Diese bestanden hauptsächlich in der Länge der kalzifizierten Zone, in dem Vorhandensein einer Markhöhle und in den Durchbrüchen des periostalen Knochensaums.

Der allgemeine Aufbau der Metatarsalia wiederholt sich proximal und distal der Diaphyse in den Epiphysen und die charakteristische Sanduhrform der Knochenanlagen war in Stimulationen und Kontrollen erkennbar. Der hyaline Knorpel der Epiphysen ging in Knorpelzellsäulen über, aus denen sich großblasige und schließlich hypertrophe Chondrozyten entwickelten. Die Zone des nicht-mineralisierten hypertrophen Knorpels hatte meistens nur eine Länge von zwei bis fünf hintereinander liegenden hypertrophen Chondrozyten, bevor die Mineralisierung der Matrix begann. Die Grenze zwischen mineralisiertem und nicht-mineralisiertem Knorpel verlief überwiegend konkav oder geradlinig zur kalzifizierten Zone in den Stimulations- und Kontrollpräparaten. Von Tanck und Mitarbeitern (2000) wurden bei einem Vergleich von *in vitro* und *in vivo* kultivierten fetalen Metatarsalknochen für die Geometrie der Ossifikationszentren Unterschiede gefunden. Die *in vivo* entwickelten Knochenanlagen zeigten eine gerade verlaufende Mineralisierungsfront, während die *in vitro* kultivierten eine eher konvexe Form aufwiesen, die Tanck einer verzögerten Mineralisierungsrate in der Peripherie des kalzifizierten Zylinders zuschrieb. Zwischen den einzelnen Zellen traten mehr oder weniger breite Interzellularräume aus kalzifizierter Matrix auf und die eingeschlossenen Chondrozyten stellten sich zum Teil sehr rund und in den zentralen Bereichen der kalzifizierten Zone ohne Zellkern dar. Der periostale Knochensaum konnte als dunkel angefärbtes Band medial und lateral des mineralisierten Bereichs verfolgt werden, wobei seine proximalen und distalen Enden sich nahezu immer etwas über die Mineralisierung der Zellen hinauszogen. Zum Teil bestand der periostale Saum nur aus einer einzelnen dünnen Schicht von Osteoid, zum Teil waren mehrere Lagen von Osteoid mit separierenden Zwischenräumen und dort eingelagerten Zellen sichtbar. Diese Verbreiterung des Periosts korrelierte häufig mit der Bildung einer Markhöhle und war in ähnlicher Ausprägung immer in einem zusammengehörigen Paar Metatarsalia zu sehen. Auch die Größe der kalzifizierten Zone korrelierte innerhalb eines Fetus und nicht zwischen den Stimulationen. In einigen Präparaten war die gesamte kalzifizierte Zone angefüllt mit im Verbund liegenden Knorpelzellen, die umgeben waren von mineralisierter Matrix. In anderen ließen sich die verschiedenen Stadien der Markhöhlenbildung beobachten. Zum Teil waren nur geringfügige Ausbildungen zu sehen, in denen der Zellverbund an einigen Stellen zerstört und nur noch kalzifizierte Spangen der Matrix vorhanden waren. In anderen Präparaten war das Zentrum der kalzifizierten Zone komplett eingebrochen und nur noch wenige vorhandene Anteile der mineralisierten Interzellulärsubstanz ließen die ursprüngliche Lage der Chondrozyten erahnen. In allen Fällen begann die Ausprägung der primären Markhöhle randständig, das heißt am medialen oder lateralen Periost. Diese Exkavationen standen mit dem periostalen Saum in Verbindung, welcher an dieser Stelle mindestens einmal durchbrochen war. Die enchondrale Ossifikation lief am proximalen und distalen Ende der frisch entwickelten primären Markhöhle ab, die zum Teil auch andere Zelltypen als

Chondrozyten zu enthalten schien. Es konnten kleine runde Zellen und gelegentlich mehrkernige Riesenzellen gesehen werden. Das Vorhandensein einer Markhöhle korrelierte nicht mit der An- beziehungsweise Abwesenheit der mechanischen Stimulation. Allerdings traten Markhöhlen in nahezu allen Fällen in einem zusammengehörigen Paar fetaler Knochenanlagen auf. Die zum Teil sehr unterschiedliche Ausprägung, reichend von Abwesenheit einer Markhöhle bis hin zur kompletten Ausfüllung der kalzifizierten Zone durch eine Markhöhle, könnte möglicherweise interindividuellen Unterschieden oder wahrscheinlicher dem Alter der Feten geschuldet sein. Obwohl alle verwendeten Feten gleichalt waren, also 17,5 Tage post conception entnommen wurden, gab es möglicherweise Abweichungen. Um das Alter der Feten zu kennen, erfolgt die Verpaarung der Mäuse kontrolliert. Da Mäuse nachtaktiv sind wird als Zeitpunkt des erfolgten Coitus die Mitte der Nacht, also circa 24:00 Uhr angenommen. Nach erfolgreicher Paarung hinterlässt das männliche Tier eine Plug (Gewebebropf) in der Vagina des weiblichen Tieres und die Feststellung dieses Plugs am folgenden Morgen markiert den ersten Trächtigkeitstag. Es ist aber nicht unüblich, dass ausgehend von dieser Annahme eine Differenz von 0,5 Tagen zwischen den einzelnen Würfen bestehen kann (Tuan and Lo, 2000). Da die Verknöcherung der Diaphyse der Feten sehr rasch voranschreitet, kann es bereits innerhalb von einem Tag zu großen Unterschieden in der Ausprägung der kalzifizierten Zone kommen, wie die Präparate der MT 16,5 dpc demonstrieren. Die Entnahme der Feten fand in allen Fällen am Morgen statt, um die Einhaltung des Zeitraumes von einem halben Tag zu gewährleisten. Wie auch Johnson (1980) feststellte, fand die Bildung einer primären Markhöhle, unabhängig von der Kulturdauer, erst ab einem bestimmten Explantationsalter der Feten statt. Er sah außerdem, dass nur hypertropher Knorpel von Blutgefäßen oder mesenchymalen Zellen infiltriert wird und im Fall von Organkulturen die mesenchymale Invasion stattfinden kann und somit auch ohne Blutversorgung Durchbrüche im Periost und die Entstehung einer primären Markhöhle möglich ist. Aus anderen Studien ist bekannt, dass intermittierende Druckkraft die Migration von Osteoklasten und ihren Vorläufern vom Periost in die Diaphyse und die darauf folgende Bildung einer primären Markhöhle hemmt (Burger et al., 1989; Klein-Nulend et al., 1987a; Klein-Nulend et al., 1990). Im Falle dieser Studie allerdings scheinen das Auftreten einer Markhöhle und die periostalen Durchbrüche in zusammenhängenden Paaren zu korrelieren und nicht mit der Anwendung von mechanischer Stimulation beeinflussbar zu sein. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass nur Unterschiede beim Vergleich der Paare untereinander zu erkennen waren, und nicht beim Vergleich von Stimulation und Kontrolle.

5.3.2 Histomorphometrie

Die Anwendung von mechanischer Stimulation in Form einer Drei-Punkt-Biegung zeigte nicht den erhofften Effekt. Die Präparate, bei denen über einen Zeitraum von sechs Tagen entweder zwei-, vier- oder zwölfmal täglich eine Stimulation stattfand, waren in der enchondralen Ossifikation bezüglich einer vermehrten Kalzifizierung, Hypertrophie und eines verlängerten periostalen Knochensaums nicht fortgeschrittener als die unstimulierten Kontrollpräparate.

Betrachtet man die Gesamtlänge des MT III, so sind beim Vergleich von Stimulation und Kontrolle keine signifikanten Unterschiede innerhalb der einzelnen Untergruppen zu messen gewesen. Diese Tatsache wurde als Vermutung bereits in den Arbeitshypothesen formuliert, da aus mehreren anderen Studien, die sich mit Einwirkung von mechanischer Stimulation auf fetale Metatarsalknochen beschäftigten, bereits bekannt war, dass keine Längenänderung zu erwarten war (Klein-Nulend et al., 1987b; Korstjens et al., 2004; Nolte et al., 2001; van't Veen et al., 1995). Weder hat niedrig gepulster Ultraschall noch intermittierende Druckkraft einen Effekt auf die Chondrozytenproliferation, die, würde sie beeinflusst, für ein vermehrtes Längenwachstum der Knochenanlage gegenüber der Kontrolle sorgen würde. Die nicht-hypertrophen Zellen werden augenscheinlich nicht durch die untersuchten mechanischen Stimuli beeinflusst. Das Längenwachstum von Kontrolle und Stimulation erfolgte gleichmäßig, da beide Organanlagen einem Nitrozellulosefilter auflagen. Wie bereits in Kapitel 5.2.3 beschrieben, erfolgt ein gesteigertes Längenwachstum ohne Anheftung an den Filter, aber da beide Präparate unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden, ist eine Beeinflussung dadurch nicht anzunehmen. In der statistischen Auswertung zeigte sich bei den Vergleichen der Kontrollen und Stimulationen untereinander einige längere MT III jeweils in den nicht mit den Stimulationen kultivierten Präparaten. Da die Vermutung, die zu der Auslagerung der Kontrollen aus der gleichen Kulturschale wie die Stimulationen führte, eine Beeinflussung im Sinne einer Verstärkung des Wachstums implizierte, ist dieses Ergebnis eher interindividuellen Unterschieden zuzuschreiben, zumal die verglichenen Kontrollen von Feten aus verschiedenen Muttertieren stammten.

Die Länge der ROI wurde ebenfalls nicht beeinflusst. Dieser Parameter beinhaltet die Längen der proximalen und distalen hypertrophen Zone und die Länge der kalzifizierten Zone. In diesen Zonen enthalten liegen die hypertrophen Chondrozyten, von denen in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass sie mit mechanischer Stimulation beeinflussbar sind. Nolte und Kollegen (2001) stellten eine um 30 Prozent längere kalzifizierte Diaphyse in sieben Tagen Organkultur zwischen den mit niedrig gepulstem Ultraschall behandelten Knochenanlagen und den Kontrollen fest, und auch Korstjens und Mitarbeiter (2004) fanden eine tendenzielle Steigerung der Länge der kalzifizierten Diaphyse.

Intermittierende Druckkraft führte ebenfalls zu einer längeren kalzifizierten Zone (van't Veen et al., 1995) In den Versuchen von Klein-Nulend und Kollegen (1987b) war sie sogar zweifach länger als in den Kontrollen. Wenn in dieser Studie eine verstärkte enchondrale Ossifikation im Sinne einer vermehrten Hypertrophie von Knorpelzellen stattgefunden hätte, würden diese Zellen mehr Platz einnehmen und sich anhand der Längenmessung darstellen.

Bei den Vergleichen der einzelnen Flächen waren keine Unterschiede zwischen Stimulation und Kontrolle messbar. Die Längenmessung der ROI deutete bereits an, dass in der hypertrophen und kalzifizierten Zone keine vermehrte Hypertrophie der Knorpelzellen stattgefunden hatte. Auch eine verstärkte Mineralisierung der Matrix innerhalb der kalzifizierten Zone blieb aus, obwohl diese bei einer gleichbleibenden Größe der kalzifizierten Zone hätte stattfinden können. Wie bereits in Kapitel 5.3.1 diskutiert, ist ein Auftreten von primären Markhöhlen eher dem Alter der Feten geschuldet als einer Auswirkung der Stimulation zuzuschreiben. Darin mag die Erklärung für einen relativ einheitlichen Median der Fläche der Markhöhle in der kalzifizierten Zone zwischen Stimulation und Kontrolle zu suchen sein: die rechte und linke Gliedmaße desselben Fetus war auf dem gleichen Entwicklungsstand und somit war eine Ähnlichkeit der Daten innerhalb der Paare gewährleistet. Die zwischenzeitlich aufgekommene Idee, die Versuche mit MT 16,5 dpc anstelle von 17,5 dpc durchzuführen, in der Annahme, dass alle Schnitte ein einheitlicheres Bild bezüglich der Größe des kalzifizierten Bereichs und des Vorhandenseins einer primären Markhöhle zeigen würden, wurde wieder verworfen. Die Präparate der 16,5 dpc alten Feten wiesen wenig bis keine Mineralisierung auf, und auch der periostale Knochensaum war zum Teil noch gar nicht knöchern ausgeprägt. Die bereits ausgewählten Auswertungskriterien, die auch eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien gewährleisten sollten, hätten auf diese Präparate nicht angewandt werden können. Allerdings wäre es vielleicht sinnvoll gewesen, einen Kompromiss einzugehen und Feten mit einem Alter von 17 Tagen pc auszuwählen, um nach sieben Tagen Organkultur möglichst keine Präparate mit Markhöhlenausprägung zu erhalten. Zusätzlich zur Angabe des Alters nach Plugkontrolle hätte ein Staging der entnommenen Feten durchgeführt werden können, um deren Alter noch genauer zu bestimmen und mögliche Abweichungen auszuschließen (Tuan and Lo, 2000).

Die Flächen der kalzifizierten, der kalzifizierten und mineralisierten und der proximal und distal hypertrophen Zonen überschneiden sich zum Teil gegenseitig und werden, falls vorhanden, von der Fläche der Markhöhle im kalzifizierten Bereich überlagert. Diese Überschneidung der einzelnen Zonen birgt potentielle Probleme bei der Vergleichbarkeit der Flächen. Es macht also nur Sinn, sie separat untereinander zu vergleichen und auch nur jeweils innerhalb eines MT-Paares von einem Fetus. Berücksichtigt man das

Erscheinungsbild der verschiedenen Paare mit individuellen anatomischen oder altersbedingten Unterschieden, lässt dies nur weniger aussagekräftige Vergleiche zwischen den Paaren zu. Auch variierte der Anteil des Gehalts an mineralisiertem Gewebe der kalzifizierten Zone zwischen den Präparaten stark, da das kalzifizierte Gerüst bei Vorhandensein einer Markhöhle zum Teil nur noch in der Peripherie des mineralisierten Zylinders vorhanden und sein Anteil daher sehr gering war.

Zusätzlich zur Längenmessung des medialen und lateralen periostalen Saumes wurden die addierten Längen der periostalen Durchbrüche und deren prozentualer Anteil am gemessenen Periost bestimmt. In allen Messungen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Stimulation und Kontrolle festgestellt werden. Die Beeinflussung der Länge des periostalen Knochensaums stellt sich in durchgeführten Studien unterschiedlich dar. Bei Versuchen mit niedrig gepulstem Ultraschall konnten Korstjens und Kollegen (2004) keine Längenzunahme des Periosts beobachten, während Nolte und Kollegen (2001) eine Erhöhung der Länge des Knochensaumes feststellten. Unter der Applikation von intermittierender Druckkraft sahen van't Veen und Mitarbeiter (1995) ebenfalls keine Längenzunahme während Klein-Nulend und Mitarbeiter (1987b) eine Verlängerung des Periosts messen konnten.

Während der Folgeversuche sollte abgeklärt werden, ob eine Interaktion der Stimulation mit der Kontrolle über die Luft stattfinden konnte. Beide Präparate befanden sich in benachbarten Wells der Kulturschale, deren Deckel die einzelnen Wells nicht luftdicht voneinander abschloss. Es war also nicht auszuschließen, dass potentiell sezernierte Mediatoren sich aerogen zwischen den Medien der Organanlagen ausbreiteten und für eine Stimulation der Verknöcherung auch bei den Kontrollen sorgte und diese Tatsache zu einem einheitlichen Bild der Ergebnisse beitrug. Fetales Knochengewebe ist in der Lage lokale Gewebefaktoren wie Wachstumsfaktoren zu produzieren, die die Knochenzellvermehrung und Formation der Matrix stimulieren und Wachstum und Differenzierung der Osteoklastenvorläuferzellen beeinflussen (Klein-Nulend et al., 1993). Die etwas vergrößerte Gesamtlänge des MT III in beiden Folgeversuchen gegenüber dem Hauptversuch wird wie weiter oben im Text bereits angesprochen, keiner Einwirkung von außen, sondern individuellen Unterschieden der einzelnen Feten zugeschrieben. Die Fläche der kalzifizierten und mineralisierten Zone war im Hauptversuch tendenziell größer gegenüber beiden Folgeversuchen. Theoretisch könnte eine Beeinflussung über aerogen verteilte Mediatoren zu einer verstärkten Matrixproduktion in den nicht ausgelagerten Kontrollen geführt haben, aber wie in Kapitel 5.3.1 bereits erwähnt, ist diese Fläche sehr stark abhängig vom Vorhandensein primärer Markhöhlen und müsste unter diesem Aspekt nochmals statistisch in Bezug gesetzt werden. Da aber beide Ergebnisse keine Signifikanzen aufweisen, wurde

davon abgesehen. Weitere herausgestellte Differenzen innerhalb der Folgeversuche sind unter Umständen auf die Abhängigkeit der Feten untereinander zurückzuführen, da diese zum Teil von den selben Muttertieren stammten.

5.4 Schlussfolgerung

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die nach diesem Studiendesign durchgeführte mechanische Stimulation keine messbaren Auswirkungen auf die enchondrale Ossifikation fetaler Metatarsalknochen hat.

Es wurde eingangs in den Arbeitshypothesen postuliert, dass keine Veränderung der Gesamtlänge des MT III erwartet wird. Diese Hypothese kann anhand der Ergebnisse bestätigt werden, wenn auch einzelne signifikante Längenänderungen zu verzeichnen waren, konnten diese jedoch nicht den stimulierten Präparaten zugeordnet werden. Eine gesteigerte Kalzifizierung des diaphysären Knorpels, die zu verstärkter Knochenformation beigetragen hätte, konnte nicht festgestellt werden. Ebenso wenig fanden eine Verlängerung des periostalen Saums oder eine Vergrößerung der hypertrophen Zone statt.

Als mögliche Ursache wird vor allem das Versagen der Drei-Punkt-Biegung in Betracht gezogen. Obwohl mehrere Beweise zur Anheftung der Präparate auf dem Filter geführt wurden, besteht dennoch die Möglichkeit, dass die Kraft der Biegung nicht ausreichend auf die Organanlage übertragen wurde. Gleiches gilt für die Übertragung der Kraft vom Titanchip auf den Filter. Desweiteren lässt sich die gewählte Stärke der Kraft diskutieren. Es ist sowohl möglich, dass 1000 μ E zu hoch angesetzt sind und deshalb keine gesteigerte Ossifikation stattfand, als auch in Betracht zu ziehen, dass die ausgeübte Kraft zu gering war. Diese Möglichkeit scheint von beiden in Anbetracht der Ergebnisse von Tanck und Kollegen (2004) die wahrscheinlichere zu sein. Es könnten auch Messfehler während der Auswertung per Macro aufgetreten sein, wobei in Studien mit niedrig gepulstem Ultraschall oder intermittierender Druckkraft bereits mikroskopisch deutliche Unterschiede zwischen Stimulation und Kontrolle gesehen werden konnten, die hier ebenfalls hätten auffallen müssen (Klein-Nulend et al., 1987b; Korstjens et al., 2004; Nolte et al., 2001; van't Veen et al., 1995). In den aufgeführten Studien wurde mit Feten bis zu einem Alter von 17 dpc gearbeitet und in keinem Fall wurde von aufgetretenen primären Markhöhlen berichtet. Unter Umständen beginnt ab Tag 17,5 dpc die Ausbildung der Markhöhle und deren Vorhandensein beeinflusst wie in Kapitel 5.3.2 beschrieben die Messungen am kalzifizierten Gewebe.

Die Ergebnisse zeigten, dass dieser Versuchsaufbau mit einer Drei-Punkt-Biegung zur mechanischen Stimulation nicht zu einer gesteigerten enchondralen Ossifikation in murinen fetalen Metatarsalknochen führte. Die Resultate können jedoch nicht zu dem Schluss führen, dass eine kontrolliert gesteigerte Bewegung der Muskulatur in einem Frakturgebiet auch keinen Einfluss auf die enchondrale Ossifikation während der Heilung nimmt, denn diese Tatsache wurde bereits in mehreren Studien belegt (Buckwalter and Grodzinsky, 1999; Goodship and Kenwright, 1985). Die erhaltenen Ergebnisse ließen darauf schließen, dass eine natürliche Muskelbewegung wohl nur annähernd nachempfunden werden konnte. Die Gründe für die wenig aussagekräftigen Ergebnisse könnten auf ein oder mehrere der diskutierten Möglichkeiten zurückzuführen sein. Da die Versuchsdurchführung mit viel Aufwand verbunden war, lohnen sich bei diesen Ergebnissen keine weiteren Versuche mit dem verwendeten Design. In Zukunft können natürlich Folgestudien zur Verbesserung des Versuchsaufbaus durchgeführt werden.

6 Zusammenfassung

Die Entwicklung von Knochen und deren Homöostase werden stark durch das lokale biomechanische Umfeld beeinflusst. Diese Tatsache gilt sowohl für das adulte als auch das fetale Skelettsystem. Adulte Knochen werden ständig durch Bewegung und Einwirkung von äußeren Kräften mechanischen Belastungen ausgesetzt und passen sich diesen Umständen durch Knochenzubildung oder Abbauvorgänge an. Unterbindet man die muskuläre Aktivität von Feten *in utero*, resultiert dieses in verminderter Osteogenese und Osteoporose. Auch bei der Frakturheilung wurde festgestellt, dass eine direkte Knochenvereinigung und Ruhigstellung zu einer langen Heilungsphase mit Abbau von Knochensubstanz und Osteoporose führen kann. Die enchondrale Ossifikation stellt mit den Abläufen der Knorpelzellproliferation, Hypertrophie und Mineralisierung des Gewebes das verbindende Glied zwischen der Frakturheilung und der fetalen Knochengenese dar. Diese Gemeinsamkeiten ermöglichen Untersuchungen von Abläufen auf Zellebene der Osteogenese in fetaler Organkultur. Studien zeigen, dass veränderte biomechanische Belastung die Knorpel- und Knochenzellproliferation und -differenzierung während der fetalen enchondralen Ossifikation beeinflussen können.

In dieser Studie wurde der Effekt der mechanischen Stimulation auf die fetalen Metatarsalia hinsichtlich Knorpelzelldifferenzierung, Mineralisierung der Matrix und Ausbildung des periostalen Knochensaums getestet. Laut Arbeitshypothese wurden eine gesteigerte Mineralisierung der Knorpelmatrix und Knochenzellaktivität erwartet. Die murinen fetalen Metatarsalia wurden zum Zeitpunkt 17,5 Tage nach Befruchtung als „en-bloc“-Präparat entnommen und über sieben Tage auf einem Filter kultiviert. Nach einem Tag Anheftung wurde täglich in Intervallen eine Drei-Punkt-Biegung durchgeführt. Die stimulierten Präparate der rechten Metatarsalia und die als Kontrolle dienenden linken befanden sich in einer zu diesem Zweck konstruierten Stimulationseinheit, die unter Organkulturbedingungen inkubiert wurde. Die Kraft der durchgeführten Biegung betrug 1000 Microstrain bei einer Frequenz von einem Hertz und es wurde in Intervallen von zwei- vier- und zwölfmal 20 Minuten am Tag stimuliert. Die in Paraffin eingebetteten Knochenanlagen wurden histologisch und histomorphometrisch analysiert.

Die Auswertung erfolgte vergleichend zwischen Stimulation und Kontrolle. Während der histologischen Betrachtung zeigte sich ein gesundes normales Erscheinungsbild der Knochenanlagen, ohne dass eine Differenz zwischen Stimulation und Kontrolle sichtbar war. Allerdings zeigten sich große individuelle Unterschiede zwischen den Feten, die vor allem die Ausprägung einer primären Markhöhle betrafen. Histomorphometrische Auswertungen

ergaben eine unveränderte Gesamtlänge der Metatarsalia. Die gemessenen Flächen der hypertrophen und kalzifizierten Zonen waren ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich und auch die Länge des periostalen Saums hatte sich durch die Einwirkung der mechanischen Stimulation nicht verändert. Um eine indirekte Einwirkung auf die Kontrollen auszuschließen, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, indem die Kontrollen in einer separaten Kulturschale untergebracht waren. Auch dieser Versuchsaufbau zeigte in seinen Ergebnissen keine Resultate, die auf einen Unterschied zwischen Stimulation und Kontrolle hindeuten. Die Ergebnisse zeigten, dass dieser Versuchsaufbau zur mechanischen Stimulation nicht zu einer gesteigerten enchondralen Ossifikation in fetalen Metatarsalia führte. Da die verwendete Kraft der Biegung zu keiner Beeinflussung der Verknöcherung geführt hat, könnte diese Kraft in zukünftigen Experimenten gesteigert oder verringert werden. Ebenso könnte die Verwendung von Feten jünger als 17,5 dpc die Messungen hinsichtlich des Auftretens einer Markhöhle einheitlicher gestalten und eventuell dadurch entstandene Fehler ausräumen.

7 Summary

Effects of mechanical stimulation on endochondral ossification in an *in vitro* organ culture model of fetal metatarsal mouse bone anlagen

Salome Sigrist

The musculoskeletal system of vertebrates responds to the mechanical conditions during development, maintenance and repair processes. The underlying mechanisms are involved in embryonic endochondral ossification and also in postnatal bone growth and fracture healing, suggesting that these processes are controlled by similar mechanisms. The similar process in endochondral ossification interlinks embryonic development with fracture healing. It follows a basic sequence of events involving the stages of chondrocyte proliferation, chondrocyte hypertrophy, mineralization and resorption of the cartilage matrix and ultimately bone formation. Several studies have suggested that biomechanical forces influence endochondral ossification. Paralysis of muscles in embryos diminished growth of the skeleton whereas mechanical stimulation in cell and organ culture systems stimulates hypertrophy of chondrocytes and the mineralization process.

This study investigated the effects of three-point bending of murine fetal metatarsal bone anlagen *in vitro* on cartilage differentiation, matrix mineralization and bone collar formation. It was hypothesized that cartilage calcification and bone cell activity are enhanced by mechanical bending. Metatarsal preparations of fetuses day 17.5 gestational age were dissected en bloc and cultured for seven days. After one day in culture to allow adherence to underlying filter they were stimulated six days for 20 minutes two, four or twelve times daily by bending of approximately 1000 microstrain at one Hz. The paraffin embedded bone sections were analyzed using histological and histomorphometrical techniques.

Analysis was performed on the right specimen which was stimulated and compared to the left one, which served as control. Histological analysis revealed a healthy appearance of all analyzed bone anlagen and no differences between stimulated and control groups. Some differences between the individual fetuses concerning an appearance of a primordial bone marrow cavity were found. Histomorphometrical analysis of the specimen demonstrated no enhanced length of the bone anlagen and showed no effect as to the areas of hypertrophic and mineralized zones and the length of the periosteal bone collar. To investigate if there might be an indirect effect of bending on the control bones, further experiments were performed by keeping the controls in a different culture plate than the experimental bones. However, both experiments illustrated very inconsistent effects of the mechanical stimulation. There might be the possibility of influencing the endochondral ossification by using enhanced or decreased microstrains or applying loads to younger bone anlagen.

8 Literatur

- Blenman, P.R., Carter, D.R., Beaupre, G.S., 1989, Role of mechanical loading in the progressive ossification of a fracture callus. *J Orthop Res* 7, 398-407.
- Braun, W., Ruter, A., 1996, Fracture healing. Morphologic and physiologic aspects. *Unfallchirurg* 99, 59-67.
- Brighton, C.T., 1984, The biology of fracture repair. *Instr Course Lec* 33, 60-82.
- Brighton, C.T., Hunt, R.M., 1997, Early histologic and ultrastructural changes in microvessels of periosteal callus. *J Orthop Trauma* 11, 244-253.
- Bucher, O.W., Hubert, 1997, *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Verlag Hans Huber, Bern, 123-140.
- Buckwalter, J.A., Grodzinsky, A.J., 1999, Loading of healing bone, fibrous tissue, and muscle: implications for orthopaedic practice. *J Am Acad Orthop Surg* 7, 291-299.
- Budras, K.-D., Fricke, W., Richter, R., 2000, *Atlas der Anatomie des Hundes*. Schlütersche GmbH & Co. KG, Hannover, 138-141.
- Burger, E.H., Klein-Nulend, J., Smit, T.H., 2003, Strain-derived canalicular fluid flow regulates osteoclast activity in a remodelling osteon-a proposal. *J Biomech* 36, 1453-1459.
- Burger, E.H., Klein-Nulend, J., Veldhuijzen, J.P., 1991, Modulation of osteogenesis in fetal bone rudiments by mechanical stress in vitro. *J Biomech* 24 Suppl 1, 101-109.
- Burger, E.H., Klein-Nulend, J., Veldhuijzen, J.P., 1992, Mechanical stress and osteogenesis in vitro. *J Bone Miner Res* 7 Suppl 2, S397-401.
- Burger, E.H., Veldhuijzen, J.P., Nulend, J.K., Van Loon, J.J., 1989, Osteoclastic invasion and mineral resorption of fetal mouse long bone rudiments are inhibited by culture under intermittent compressive force. *Connect Tissue Res* 20, 131-141.
- Burr, D.B., Milgrom, C., Fyhrie, D., Forwood, M., Nyska, M., Finestone, A., Hoshaw, S., Saiag, E., Simkin, A., 1996, In vivo measurement of human tibial strains during vigorous activity. *Bone* 18, 405-410.
- Carter, D.R., Orr, T.E., Fyhrie, D.P., Schurman, D.J., 1987, Influences of mechanical stress on prenatal and postnatal skeletal development. *Clin Orthop Relat Res* 219, 237-250.
- Carter, D.R., Wong, M., Orr, T.E., 1991, Musculoskeletal ontogeny, phylogeny, and functional adaptation. *J Biomech* 24 Suppl 1, 3-16.
- Copray, J.C., Jansen, H.W., Duterloo, H.S., 1985a, Effect of compressive forces on phosphatase activity in mandibular condylar cartilage of the rat in vitro. *J Anat* 140 (Pt 3), 479-489.
- Copray, J.C., Jansen, H.W., Duterloo, H.S., 1985b, An in-vitro system for studying the effect of variable compressive forces on the mandibular condylar cartilage of the rat. *Arch Oral Biol* 30, 305-311.

- Cruess, R.L., Dumont, J., 1975, Fracture healing. *Can J Surg* 18, 403-413.
- Cullinane, D.M., Fredrick, A., Eisenberg, S.R., Pacicca, D., Elman, M.V., Lee, C., Salisbury, K., Gerstenfeld, L.C., Einhorn, T.A., 2002, Induction of a neoarthrosis by precisely controlled motion in an experimental mid-femoral defect. *J Orthop Res* 20, 579-586.
- Einhorn, T.A., 1998, The cell and molecular biology of fracture healing. *Clin Orthop Relat Res* 355 Suppl, 7-21.
- Ferguson, C., Alpern, E., Miclau, T., Helms, J.A., 1999, Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech Dev* 87, 57-66.
- Frost, H.M., 1983, The skeletal intermediary organization. *Metab Bone Dis Relat Res* 4, 281-290.
- Frost, H.M., 2000, The Utah paradigm of skeletal physiology: an overview of its insights for bone, cartilage and collagenous tissue organs. *J Bone Miner Metab* 18, 305-316.
- Frost, H.M., 2002, Emerging views about "osteoporosis", bone health, strength, fragility, and their determinants. *J Bone Miner Metab* 20, 319-325.
- Frost, H.M., 2003, Bone's mechanostat: a 2003 update. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 275, 1081-1101.
- Frost, H.M., 2004, A 2003 update of bone physiology and Wolff's Law for clinicians. *Angle Orthod* 74, 3-15.
- Gerber, H.P., Vu, T.H., Ryan, A.M., Kowalski, J., Werb, Z., Ferrara, N., 1999, VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 5, 623-628.
- Germiller, J.A., Goldstein, S.A., 1997, Structure and function of embryonic growth plate in the absence of functioning skeletal muscle. *J Orthop Res* 15, 362-370.
- Gerstenfeld, L.C., Cullinane, D.M., Barnes, G.L., Graves, D.T., Einhorn, T.A., 2003, Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *J Cell Biochem* 88, 873-884.
- Gerstenfeld, L.C., Shapiro, F.D., 1996, Expression of bone-specific genes by hypertrophic chondrocytes: implication of the complex functions of the hypertrophic chondrocyte during endochondral bone development. *J Cell Biochem* 62, 1-9.
- Goodship, A.E., Kenwright, J., 1985, The influence of induced micromovement upon the healing of experimental tibial fractures. *J Bone Joint Surg Br* 67, 650-655.
- Hall, B.K., Miyake, T., 1992, The membranous skeleton: the role of cell condensations in vertebrate skeletogenesis. *Anat Embryol* 186, 107-124.
- Hiltunen, A., Vuorio, E., Aro, H.T., 1993, A standardized experimental fracture in the mouse tibia. *J Orthop Res* 11, 305-312.
- Hosseini, A., Hogg, D.A., 1991, The effects of paralysis on skeletal development in the chick embryo. II. Effects on histogenesis of the tibia. *J Anat* 177, 169-178.
- Johnson, D.R., 1980, Formation of marrow cavity and ossification in mouse limb buds grown in vitro. *J Embryol Exp Morphol* 56, 301-307.

- Jones, D., Leivseth, G., Tenbosch, J., 1995, Mechano-reception in osteoblast-like cells. *Biochem Cell Biol* 73, 525-534.
- Kaspar, D., Seidl, W., Ignatius, A., Neidlinger-Wilke, C., Claes, L., 2000a, In vitro cell behavior of human osteoblasts after physiological dynamic stretching. *Orthopade* 29, 85-90.
- Kaspar, D., Seidl, W., Neidlinger-Wilke, C., Ignatius, A., Claes, L., 2000b, Dynamic cell stretching increases human osteoblast proliferation and C1CP synthesis but decreases osteocalcin synthesis and alkaline phosphatase activity. *J Biomech* 33, 45-51.
- Kaufmann, M.H., 1992, *The Atlas of Mouse Development*. Elsevier, Cambridge, 495-507.
- Klaushofer, K., Peterlik, M., 1994, Pathophysiology of fracture healing. *Radiologe* 34, 709-714.
- Klein-Nulend, J., Semeins, C.M., Veldhuijzen, J.P., Burger, E.H., 1993, Effect of mechanical stimulation on the production of soluble bone factors in cultured fetal mouse calvariae. *Cell Tissue Res* 271, 513-517.
- Klein-Nulend, J., van der Plas, A., Semeins, C.M., Ajubi, N.E., Frangos, J.A., Nijweide, P.J., Burger, E.H., 1995, Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro. *Faseb J* 9, 441-445.
- Klein-Nulend, J., Veldhuijzen, J.P., Burger, E.H., 1986, Increased calcification of growth plate cartilage as a result of compressive force in vitro. *Arthritis Rheum* 29, 1002-1009.
- Klein-Nulend, J., Veldhuijzen, J.P., de Jong, M., Burger, E.H., 1987a, Increased bone formation and decreased bone resorption in fetal mouse calvaria as a result of intermittent compressive force in vitro. *Bone Miner* 2, 441-448.
- Klein-Nulend, J., Veldhuijzen, J.P., van de Stadt, R.J., van Kampen, G.P., Kuijjer, R., Burger, E.H., 1987b, Influence of intermittent compressive force on proteoglycan content in calcifying growth plate cartilage in vitro. *J Biol Chem* 262, 15490-15495.
- Klein-Nulend, J., Veldhuijzen, J.P., van Strien, M.E., de Jong, M., Burger, E.H., 1990, Inhibition of osteoclastic bone resorption by mechanical stimulation in vitro. *Arthritis Rheum* 33, 66-72.
- Korstjens, C.M., Nolte, P.A., Burger, E.H., Albers, G.H., Semeins, C.M., Aartman, I.H., Goei, S.W., Klein-Nulend, J., 2004, Stimulation of bone cell differentiation by low-intensity ultrasound—a histomorphometric in vitro study. *J Orthop Res* 22, 495-500.
- Lanyon, L.E., 1984, Functional strain as a determinant for bone remodeling. *Calcif Tissue Int* 36 Suppl 1, 56-61.
- Lee, D.A., Bader, D.L., 1997, Compressive strains at physiological frequencies influence the metabolism of chondrocytes seeded in agarose. *J Orthop Res* 15, 181-188.
- Liebich, H.-G., 1999, *Funktionelle Histologie der Haussäugetiere*. Schattauer, Stuttgart, 84-98.
- Marotti, G., 2000, The osteocyte as a wiring transmission system. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 1, 133-136.

- McGarry, J.G., Klein-Nulend, J., Mullender, M.G., Prendergast, P.J., 2005, A comparison of strain and fluid shear stress in stimulating bone cell responses—a computational and experimental study. *Faseb J* 19, 482-484.
- McKibbin, B., 1978, The biology of fracture healing in long bones. *J Bone Joint Surg Br* 60-B, 150-162.
- Meyer, U., Meyer, T., Wiesmann, H.P., Stratmann, U., Kruse-Losler, B., Maas, H., Joos, U., 1999, The effect of magnitude and frequency of interfragmentary strain on the tissue response to distraction osteogenesis. *J Oral Maxillofac Surg* 57, 1331-1339; discussion 1340-1331.
- Mullender, M., El Haj, A.J., Yang, Y., van Duin, M.A., Burger, E.H., Klein-Nulend, J., 2004, Mechanotransduction of bone cells in vitro: mechanobiology of bone tissue. *Med Biol Eng Comput* 42, 14-21.
- Murray, D.W., Rushton, N., 1990, The effect of strain on bone cell prostaglandin E2 release: a new experimental method. *Calcif Tissue Int* 47, 35-39.
- Neidlinger-Wilke, C., Wilke, H.J., Claes, L., 1994, Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application. *J Orthop Res* 12, 70-78.
- Nolte, P.A., Klein-Nulend, J., Albers, G.H., Marti, R.K., Semeins, C.M., Goei, S.W., Burger, E.H., 2001, Low-intensity ultrasound stimulates endochondral ossification in vitro. *J Orthop Res* 19, 301-307.
- Perren, S.M., 1992, Biomechanical basis of fracture treatment. *Orthopade* 21, 3-10.
- Platzer, A.C., 1978, The ultrastructure of normal myogenesis in the limb of the mouse. *Anat Rec* 190, 639-657.
- Rahn, B.A., Gallinaro, P., Baltensperger, A., Perren, S.M., 1971, Primary bone healing. An experimental study in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am* 53, 783-786.
- Reich, K.M., Gay, C.V., Frangos, J.A., 1990, Fluid shear stress as a mediator of osteoblast cyclic adenosine monophosphate production. *J Cell Physiol* 143, 100-104.
- Remedios, A., 1999, Bone and bone healing. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 29, 1029-1044.
- Rodriguez, J.I., Palacios, J., Garcia-Alix, A., Pastor, I., Paniagua, R., 1988, Effects of immobilization on fetal bone development. A morphometric study in newborns with congenital neuromuscular diseases with intrauterine onset. *Calcif Tissue Int* 43, 335-339.
- Roelofsen, J., Klein-Nulend, J., Burger, E.H., 1995, Mechanical stimulation by intermittent hydrostatic compression promotes bone-specific gene expression in vitro. *J Biomech* 28, 1493-1503.
- Sah, R.L., Kim, Y.J., Doong, J.Y., Grodzinsky, A.J., Plaas, A.H., Sandy, J.D., 1989, Biosynthetic response of cartilage explants to dynamic compression. *J Orthop Res* 7, 619-636.
- Sandberg, M.M., Aro, H.T., Vuorio, E.I., 1993, Gene expression during bone repair. *Clin Orthop Relat Res* 289, 292-312.

- Simmons, D.J., 1985, Fracture healing perspectives. *Clin Orthop Relat Res* 200, 100-113.
- Skerry, T., 2002, Neurotransmitters in bone. Introduction. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2, 401-403.
- Tanck, E., Blankevoort, L., Haaijman, A., Burger, E.H., Huiskes, R., 2000, Influence of muscular activity on local mineralization patterns in metatarsals of the embryonic mouse. *J Orthop Res* 18, 613-619.
- Tanck, E., Van Donkelaar, C.C., Jepsen, K.J., Goldstein, S.A., Weinans, H., Burger, E.H., Huiskes, R., 2004, The mechanical consequences of mineralization in embryonic bone. *Bone* 35, 186-190.
- Trepczik, B., Lienau, J., Schell, H., Epari, D.R., Thompson, M.S., Hoffmann, J.E., Kadow-Romacker, A., Mundlos, S., Duda, G.N., 2007, Endochondral ossification in vitro is influenced by mechanical bending. *Bone* 40, 597-603.
- Tuan, R.S., Lo, C.W., 2000, *Methods in Molecular Biology; Developmental Biology Protocols Volume II, Vol 136*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 185-193.
- van't Veen, S.J., Hagen, J.W., van Ginkel, F.C., Prah-Andersen, B., Burger, E.H., 1995, Intermittent compression stimulates cartilage mineralization. *Bone* 17, 461-465.
- Van Loon, J.J., Bervoets, D.J., Burger, E.H., Dieudonne, S.C., Hagen, J.W., Semeins, C.M., Doulabi, B.Z., Veldhuijzen, J.P., 1995, Decreased mineralization and increased calcium release in isolated fetal mouse long bones under near weightlessness. *J Bone Miner Res* 10, 550-557.
- Veldhuijzen, J.P., Bourret, L.A., Rodan, G.A., 1979, In vitro studies of the effect of intermittent compressive forces on cartilage cell proliferation. *J Cell Physiol* 98, 299-306.
- Vortkamp, A., Pathi, S., Peretti, G.M., Caruso, E.M., Zaleske, D.J., Tabin, C.J., 1998, Recapitulation of signals regulating embryonic bone formation during postnatal growth and in fracture repair. *Mech Dev* 71, 65-76.
- Wang, N., Butler, J.P., Ingber, D.E., 1993, Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 260, 1124-1127.
- Wendeberg, B., 1961, Mineral metabolism of fractures in man studied counting of strontium 85. *Acta Orthop Scand Suppl* 52, 1-79.
- Willenegger, H., Perren, S.M., Schenk, R., 1971, Primary and secondary healing of bone fractures. *Chirurg* 42, 241-252.
- Wong, M., Carter, D.R., 1990a, A theoretical model of endochondral ossification and bone architectural construction in long bone ontogeny. *Anat Embryol* 181, 523-532.
- Wong, M., Carter, D.R., 1990b, Theoretical stress analysis of organ culture osteogenesis. *Bone* 11, 127-131.

Anhang

Parameter	Untergruppe 1a (2x)		Untergruppe 1b (4x)		p
	Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge des MT3 μm	1521	1323-1753	1579	1389-1626	0,666
Länge der ROI μm	436	359-559	413	334-517	0,605
Fläche der kalzifizierten Zone μm^2	54809	46203-85415	72965	44629-90726	1,000
Fläche der kalzifizierten und mineralisierten Zone μm^2	19711	11366-23183	17383	15277-22157	0,605
Fläche der proximal hypertrophen Zone μm^2	15409	14109-23258	15855	12617-17245	0,340
Fläche der distal hypertrophen Zone μm^2	21305	19188-23888	18919	15389-23172	0,436
Fläche der kalzifizierten Markhöhle μm^2	8040	3658-24778	62690	1664-67323	0,666

Tab. 10 Hauptversuch: Stimulationen 2x und 4x vergleichend

Parameter	Untergruppe 1a (2x)		Untergruppe 1c (12x)		p
	Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge des MT3 μm	1521	1323-1753	1643	1609-1720	0,387
Länge der ROI μm	436	359-559	425	403-474	1,000
Fläche der kalzifizierten Zone μm^2	54809	46203-85415	55814	47110-65921	1,000
Fläche der kalzifizierten und mineralisierten Zone μm^2	19711	11366-23183	28166	17325-30156	0,113
Fläche der proximal hypertrophen Zone μm^2	15409	14109-23258	13592	11285-16449	0,063
Fläche der distal hypertrophen Zone μm^2	21305	19188-23888	21843	15838-24014	0,863
Fläche der kalzifizierten Markhöhle μm^2	8040	3658-24778	961	265-24848	0,436

Tab. 11 Hauptversuch: Stimulationen 2x und 12x vergleichend

Parameter	Untergruppe 1b (4x)		Untergruppe 1c (12x)		p
	Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge des MT3 μm	1579	1389-1626	1643	1609-1720	0,040
Länge der ROI μm	413	334-517	425	403-474	0,730
Fläche der kalzifizierten Zone μm^2	72965	44629-90726	55814	47110-65921	0,546
Fläche der kalzifizierten und mineralisierten Zone μm^2	17383	15277-22157	28166	17325-30156	0,063
Fläche der proximal hypertrophen Zone μm^2	15855	12617-17245	13592	11285-16449	0,436
Fläche der distal hypertrophen Zone μm^2	18919	15389-23172	21843	15838-24014	0,489
Fläche der kalzifizierten Markhöhle μm^2	62690	1664-67323	961	265-24848	0,161

Tab. 12 Hauptversuch: Stimulationen 4x und 12x vergleichend

Parameter	Untergruppe 1a (2x)		Untergruppe 1b (4x)		p
	Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge des MT3 μm	1627	1496-1814	1538	1245-1671	0,164
Länge der ROI μm	435	395-531	486	327-519	0,722
Fläche der kalzifizierten Zone μm^2	60222	51557-85383	72736	38814-84840	0,689
Fläche der kalzifizierten und mineralisierten Zone μm^2	16364	12463-21661	16565	12323-22802	0,824
Fläche der proximal hypertrophen Zone μm^2	16609	14662-20850	15768	10913-22253	0,824
Fläche der distal hypertrophen Zone μm^2	19378	18221-22859	19803	18376-23285	0,859
Fläche der kalzifizierten Markhöhle μm^2	2686	0-46505	15458	742-62757	0,397

Tab. 13 Hauptversuch: Kontrollen 2x und 4x vergleichend

Parameter	Untergruppe 1a (2x)		Untergruppe 1c (12x)		p
	Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge des MT3 μm	1627	1496-1814	1652	1598-1835	0,320
Länge der ROI μm	435	395-531	416	358-447	0,213
Fläche der kalzifizierten Zone μm^2	60222	51557-85383	55474	46784-79438	0,242
Fläche der kalzifizierten und mineralisierten Zone μm^2	16364	12463-21661	20683	15513-25911	0,085
Fläche der proximal hypertrophen Zone μm^2	16609	14662-20850	14915	10651-16605	0,006
Fläche der distal hypertrophen Zone μm^2	19378	18221-22859	18549	14816-22339	0,116
Fläche der kalzifizierten Markhöhle μm^2	2686	0-46505	3456	0-27226	0,623

Tab. 14 Hauptversuch: Kontrollen 2x und 12x vergleichend

Parameter	Untergruppe 1b (4x)		Untergruppe 1c (12x)		p
	Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge des MT3 μm	1538	1245-1671	1652	1598-1835	0,056
Länge der ROI μm	486	327-519	416	358-447	0,563
Fläche der kalzifizierten Zone μm^2	72736	38814-84840	55474	46784-79438	0,689
Fläche der kalzifizierten und mineralisierten Zone μm^2	16565	12323-22802	20683	15513-25911	0,372
Fläche der proximal hypertrophen Zone μm^2	15768	10913-22253	14915	10651-16605	0,449
Fläche der distal hypertrophen Zone μm^2	19803	18376-23285	18549	14816-22339	0,326
Fläche der kalzifizierten Markhöhle μm^2	15458	742-62757	3456	0-27226	0,178

Tab. 15 Hauptversuch: Kontrollen 4x und 12x vergleichend

Parameter	Hauptversuch		Folgeversuch 2a		p
	Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge des MT3 μm	1572	1402-1718	1679	1598-1822	0,031
Länge der ROI μm	416	389-504	434	354-511	0,822
Fläche der kalzifizierten Zone μm^2	59865	47524-83431	67824	46604-85675	0,916
Fläche der kalzifizierten und mineralisierten Zone μm^2	20684	14752-25204	16292	13127-18624	0,091
Fläche der proximal hypertrophen Zone μm^2	16018	13204-21851	16056	11507-20305	0,822
Fläche der distal hypertrophen Zone μm^2	20119	18009-22733	18212	14922-19706	0,086
Fläche der kalzifizierten Markhöhle μm^2	2686	0-54248	11144	0-50836	0,620

Tab. 16 Hauptversuch und Folgeversuch 2a: Kontrollen vergleichend

Parameter	Hauptversuch		Folgeversuch 2b		p
	Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge des MT3 μm	1572	1402-1718	1648	1584-1875	0,052
Länge der ROI μm	416	389-504	424	331-509	0,599
Fläche der kalzifizierten Zone μm^2	59865	47524-83431	56161	35455-76281	0,391
Fläche der kalzifizierten und mineralisierten Zone μm^2	20684	14752-25204	15513	9789-21470	0,086
Fläche der proximal hypertrophen Zone μm^2	16018	13204-21851	15564	13123-16705	0,499
Fläche der distal hypertrophen Zone μm^2	20119	18009-22733	19149	16850-22784	0,708
Fläche der kalzifizierten Markhöhle μm^2	2686	0-54248	7382	0-38249	0,893

Tab. 17 Hauptversuch und Folgeversuch 2b: Kontrollen vergleichend

Parameter	Hauptversuch		Folgeversuch 2a		p
	Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge in μm					
Länge des medialen Periosts	359	321-492	384	313-489	0,845
Länge des lateralen Periosts	325	283-452	338	273-469	0,964
Länge der medialen periostalen Durchbrüche	34	0-60	30	11-39	0,916
Länge der lateralen periostalen Durchbrüche	65	0-115	70	25-131	0,685
Prozentualer Anteil der Durchbrüche am medialen Periost	9	0-14	7	5-11	1,000
Prozentualer Anteil der Durchbrüche am lateralen Periost	23	0-39	24	8-31	0,590

Tab. 18 Hauptversuch und Folgeversuch 2a: Kontrollen vergleichend; periostaler Saum

Parameter	Hauptversuch		Folgeversuch 2b		p
	Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge in μm					
Länge des medialen Periosts	359	321-492	352	252-491	0,642
Länge des lateralen Periosts	325	283-452	309	247-423	0,620
Länge der medialen periostalen Durchbrüche	34	0-60	20	0-64	0,685
Länge der lateralen periostalen Durchbrüche	65	0-115	83	0-108	0,776
Prozentualer Anteil der Durchbrüche am medialen Periost	9	0-14	4	0-13	0,753
Prozentualer Anteil der Durchbrüche am lateralen Periost	23	0-39	19	0-33	0,799

Tab. 19 Hauptversuch und Folgeversuch 2b: Kontrollen vergleichend; periostaler Saum

Parameter	Häufigkeit der Stimulation	Stimulation		Kontrolle		p
		Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge des MT3 μm	2x	1756	1602-1869	1679	1634-1866	0,917
	12x	1632	1503-1803	1648	1593-1854	0,463
Länge der ROI μm	2x	501	449-564	490	412-533	0,173
	12x	398	342-508	358	308-485	0,046
Fläche der kalzifizierten Zone μm^2	2x	77801	62712-94400	80342	59890-96109	0,917
	12x	53598	42741-90734	46784	32620-78633	0,028
Fläche der kalzifizierten und mineralisierten Zone μm^2	2x	19445	15310-33084	15721	12493-19435	0,075
	12x	17014	13005-21609	17168	11928-19569	0,173
Fläche der proximal hypertrophen Zone μm^2	2x	18593	14903-22112	17089	15402-21303	0,917
	12x	14936	12383-17450	13168	9779-17960	0,753
Fläche der distal hypertrophen Zone μm^2	2x	23339	22109-25043	18933	17495-21392	0,075
	12x	17464	15795-20796	15008	10751-20929	0,249
Fläche der kalzifizierten Markhöhle μm^2	2x	28629	7115-47763	34021	0-60635	0,345
	12x	25448	0-58957	0	0-32738	0,068

Tab. 20 Folgeversuch 2a: Stimulation und Kontrolle vergleichend

Parameter	Häufigkeit der Stimulation	Stimulation		Kontrolle		p
		Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge des MT3 μm	2x	1576	1514-1785	1601	1521-1867	0,173
	12x	1556	1420-1691	1701	1612-1898	0,028
Länge der ROI μm	2x	450	375-548	417	350-535	0,116
	12x	416	346-470	424	307-477	0,917
Fläche der kalzifizierten Zone μm^2	2x	59325	41360-91119	58764	45335-77953	0,345
	12x	52516	39529-68684	51131	29048-79403	0,753
Fläche der kalzifizierten und mineralisierten Zone μm^2	2x	19389	14350-26612	16694	10282-20932	0,173
	12x	21500	15260-26596	15513	8754-23081	0,116
Fläche der proximal hypertrophen Zone μm^2	2x	17336	14531-19296	16411	14120-18402	0,917
	12x	16436	12689-17946	13889	10564-16613	0,116
Fläche der distal hypertrophen Zone μm^2	2x	21730	15703-24555	19149	18615-25190	0,753
	12x	20608	17896-22717	19187	13431-22947	0,463
Fläche der kalzifizierten Markhöhle μm^2	2x	5437	0-50174	5903	0-42985	0,465
	12x	8052	0-33752	7927	0-34621	0,715

Tab. 21 Folgeversuch 2b: Stimulation und Kontrolle vergleichend

Parameter	Häufigkeit der Stimulation	Stimulation		Kontrolle		p
		Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge des medialen Periosts μm	2x	432	377-520	437	359-507	0,345
	12x	359	217-487	317	208-462	0,043
Länge des lateralen Periosts μm	2x	412	334-496	395	326-490	0,345
	12x	339	194-476	273	172-443	0,043
Länge der medialen periostalen Durchbrüche μm	2x	29	0-104	33	17-72	0,753
	12x	32	6-64	26	5-35	0,138
Länge der lateralen periostalen Durchbrüche μm	2x	110	82-148	90	60-134	0,463
	12x	49	19-72	39	13-137	0,893
Prozentualer Anteil der Durchbrüche am medialen Periost	2x	7	0-20	7	4-18	0,753
	12x	10	3-18	7	5-9	0,225
Prozentualer Anteil der Durchbrüche am lateralen Periost	2x	27	19-32	23	12-42	0,753
	12x	15	10-22	24	7-30	0,500

Tab. 22 Folgeversuch 2a: Stimulation und Kontrolle vergleichend; periostaler Saum

Parameter	Häufigkeit der Stimulation	Stimulation		Kontrolle		p
		Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge des medialen Periosts μm	2x	372	275-497	352	306-510	0,600
	12x	348	260-460	354	221-467	0,917
Länge des lateralen Periosts μm	2x	342	255-459	309	241-438	0,028
	12x	325	201-413	330	208-426	0,345
Länge der medialen periostalen Durchbrüche μm	2x	5	0-24	20	0-52	0,109
	12x	9	0-50	28	0-80	0,465
Länge der lateralen periostalen Durchbrüche μm	2x	37	10-53	88	59-99	0,043
	12x	74	51-127	26	0-128	0,345
Prozentualer Anteil der Durchbrüche am medialen Periost	2x	1	0-5	4	0-15	0,109
	12x	2	0-12	6	0-24	0,465
Prozentualer Anteil der Durchbrüche am lateralen Periost	2x	10	2-17	25	13-35	0,043
	12x	29	17-33	7	0-35	0,249

Tab. 23 Folgeversuch 2b: Stimulation und Kontrolle vergleichend; periostaler Saum

Parameter	Stimulation 2x		Stimulation 12x		p
	Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge des MT3 μm	1756	1602-1869	1632	1503-1803	0,240
Länge der ROI μm	501	449-564	398	342-508	0,093
Fläche der kalzifizierten Zone μm^2	77801	62712-94400	53598	42741-90734	0,240
Fläche der kalzifizierten und mineralisierten Zone μm^2	19445	15310-33084	17014	13005-21609	0,485
Fläche der proximal hypertrophen Zone μm^2	18593	14903-22112	14936	12383-17450	0,065
Fläche der distal hypertrophen Zone μm^2	23339	22109-25043	17464	15795-20796	0,004
Fläche der kalzifizierten Markhöhle μm^2	28629	7115-47763	25448	0-58957	0,937

Tab. 24 Folgeversuch 2a: Stimulationen vergleichend

Parameter	Stimulation 2x		Stimulation 12x		p
	Median	25-75 Perzentil	Median	25-75 Perzentil	
Länge des MT3 μm	1576	1514-1785	1556	1420-1691	0,818
Länge der ROI μm	450	375-548	416	346-470	0,485
Fläche der kalzifizierten Zone μm^2	59325	41360-91119	52516	39529-68684	0,589
Fläche der kalzifizierten und mineralisierten Zone μm^2	19389	14350-26612	21500	15260-26596	0,937
Fläche der proximal hypertrophen Zone μm^2	17336	14531-19296	16436	12689-17946	0,589
Fläche der distal hypertrophen Zone μm^2	21730	15703-24555	20608	17896-22717	0,699
Fläche der kalzifizierten Markhöhle μm^2	5437	0-50174	8052	0-33752	0,818

Tab. 25 Folgeversuch 2b: Stimulationen vergleichend

Danksagung

Ich möchte Herrn Professor Dr. A. Gruber für die Betreuung und Durchsicht meiner Doktorarbeit in seiner Funktion als Erstgutachter und Doktorvater danken.

Vielen Dank an Herrn Professor Dr.-Ing. G. Duda, dessen Institut mir freundlicherweise das Thema überlassen und die Durchführung der Arbeit ermöglicht hat.

Im Gedenken an Dr. Katja Laun gilt ihr mein aufrichtiger Dank für die hervorragende und persönliche Betreuung meiner Arbeit im ersten Jahr. Jederzeit stand sie mir für Fragen und Probleme zur Verfügung und für unterstützte mich tatkräftig während der Laborarbeit und bei der Vorbereitung meines Vortrags im Doktorandenkolloquium.

Danken möchte ich Dr. Hanna Schell, die sich als letztes Einhorn notgedrungen mit diesem Thema beschäftigen musste. Hanna, ich danke Dir vielmals für Deine Hilfe bei der statistischen Auswertung meines Zahlenwusts und dafür, dass Du mein Manuskript so schnell gelesen und viele schlaue Anregungen und wenig Kritik geäußert hast!

Mein Dank gebührt Dr. Jasmin Lienau, die anfangs der Supervisor meines Projekts war, sich aber später doch mit vielen anstrengenden Details und nervigen Fragen meinerseits beschäftigen musste.

Herrn F. Lotz aus dem Institut für Biometrie und Informationsverarbeitung danke ich für das unkomplizierte Supervising meiner statistischen Auswertung.

Vielen lieben Dank an Dorothe Vogel für die last minute Durchsicht meiner Arbeit. Sollten sich dennoch Fehler in der Kommasetzung eingeschlichen haben, so ist das allein mein Verschulden.

Mein größter Dank gebührt meiner Familie: Meinen lieben Eltern danke ich von ganzem Herzen für ihre niemals wankende Unterstützung- ideell sowie materiell. Ohne sie wären meine Universitätsausbildung und diese Arbeit niemals möglich gewesen. Danke, dass Ihr immer an mich geglaubt habt!

An meine Schwester vielen Dank für ihre Motivationspakete und ihre feste Überzeugung, dass ihre große Schwester die letzte Minute nutzen würde.

Last but not least: Meinem Freund Mathias ganz besonderen Dank dafür, dass er den ein oder anderen Nervenzusammenbruch, einen Umzug innerhalb unserer Wohnung und zwei Monate lang die gesamte Hausarbeit ertragen hat. Danke auch für Deine Unterstützung bei allen PC-Notfällen!

Selbständigkeitserklärung

Die vorgelegte Dissertation ist ohne unzulässige Hilfe Dritter von mir selbst verfasst worden. Sie stellt -auch in Teilen- keine Kopie anderer Arbeiten dar. Verwendete Hilfsmittel und Literatur sind vollständig angegeben.

Berlin, den 20.04.2011

Salome Sigrist