

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Institut für Osteologie und Biomechanik

Leiter Univ.-Prof. Dr. med. M. Amling

**Einfluss von Konservierung auf die biomechanische Kompetenz
des Knochens im Mausmodell**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Birthe Anderssohn

aus Hamburg

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 13.09.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der / die Vorsitzende: Prof. Dr. M. Amling

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter / in: PD Dr. F. Barvencik

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter / in: PD Dr. T. Beil

Inhaltsverzeichnis

1 Fragestellung	1
2 Einleitung	2
2.1 Knochenaufbau.....	2
2.1.1 Knochengewebe.....	2
2.1.2 Knochen als Organ.....	5
2.2 Funktion des Knochens.....	6
2.2.1 Mechanische Eigenschaften von Knochen.....	7
2.3 Biomechanik.....	8
2.4 Die Maus als Modell.....	11
2.5 Konservierung von Knochen und klinische Relevanz der Konservierung.....	12
2.5.1 Physikalisch -Gefrieren.....	13
2.5.2 Chemische Konservierung.....	13
2.5.3 Fomaldehyd.....	14
2.5.4 Ethanol.....	15
2.5.5 Glutaraldehyd.....	15
3 Material und Methoden	17
3.1 Tiere.....	17
3.2 Konservierungsmethoden.....	18
3.2.1 Gefrieren.....	18
3.2.2 Formaldehyd.....	18
3.2.3 Ethanol.....	18
3.2.4 Glutaraldehyd.....	18
3.3 Bildgebung.....	19
3.3.1 Mikrocomputertomographie (μ CT).....	19
3.3.2 Dichtemessung.....	19
3.3.3 Softwaremodule.....	20
3.3.4 Morphometrie.....	20
3.4 Experimentelle Biomechanik.....	21
3.5 Numerische Analyse.....	22
3.5.1 Spannungsberechnung.....	23
3.5.2 Elastizitätsmodul.....	23
3.6 Statistische Analyse.....	24
4 Ergebnisse	25
4.1 Morphometrie und Morphologie.....	25
4.1.1 Morphometrische Parameter.....	25
4.2 Ergebnisse der biomechanischen Testung.....	27
4.2.1 Kraft-Weg-Diagramme.....	27
4.3 Einfluss der Konservierung.....	29
4.3.1 Auswirkung der Konservierung auf die Bruchlast.....	29
4.3.2 Auswirkung der Konservierung auf die maximale Durchbiegung.....	29
4.3.3 Auswirkung der Konservierung auf die Steifigkeit.....	30
4.3.4 Auswirkung der Konservierung auf den E-Modul.....	31
4.3.5 Auswirkung der Konservierung auf die Zugspannung.....	31
4.3.6 Auswirkung der Konservierung auf die Energieabsorbtion (Work-to-failure)....	32
5 Diskussion	34
5.1 Eignung des Gefrierens zur Konservierung von Mäuseknochen.....	34
5.2 Eignung der Fixierung mit Formaldehyd zur Konservierung von Mäuseknochen....	35
5.2.1 Gepuffertes Formaldehyd.....	35

5.2.2 Ungepuffertes Formaldehyd.....	37
5.3 Eignung der Fixierung mit Ethanol zur Konservierung von Mäuseknochen.....	38
5.4 Eignung der Fixierung mit Glutaraldehyd zur Konservierung von Mäuseknochen....	40
5.5 Fehlerbetrachtung.....	41
5.5.1 Versuchsaufbau.....	41
5.5.2 Konservierung.....	41
5.5.3 Biegetest.....	42
5.5.4 Fazit.....	42
6 Zusammenfassung.....	44
7 Abstract.....	45
8 Literaturangaben.....	46
9 Anhang: Box-and-Whiskers Diagramme.....	51
10 Danksagung.....	57
12 Eidesstattliche Versicherung:.....	58

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1: Vergrößerter Querschnitt der Kompakta (Gray, 1918).....	3
Abb. 2.2: Kompakta und Spongiosa des Knochens (nach SEER Training 2010).....	4
Abb. 2.3: Rechter Femur der Maus als beispielhafte Darstellung eines langen Knochens.....	5
Abb. 2.4: Hauptbelastungslinien des Knochens. (Gray 1918).....	6
Abb. 2.5: Spannungs-Dehnungs-Diagramm.....	9
Abb. 2.6: Versuchsanordnung für Biegetests am Femur. (Kummer 2008).....	11
Abb. 3.1: Versuchsaufbau.....	17
Abb. 3.2: Phantom zur Kalibrierung.....	19
Abb. 3.3: Quantitatives Histogramm (nach Kummer 2008).....	20
Abb. 3.4: Zwick-Prüfmaschine (Kummer 2008).....	21
Abb. 3.5: Kraft-Weg-Diagramm.....	22
Abb. 3.6: Spannungsberechnung nach der Balkentheorie. (nach Kummer 2008).....	23
Abb. 4.1 A und B: Gruppe Frozen. Kumulierte Darstellung.....	27
Abb. 4.2 A und B: Gruppe Formalin. Kumulierte Darstellung der Graphen.....	27
Abb. 4.3 A und B: Gruppe Formalin nbf. Kumulierte Darstellung der Graphen.....	28
Abb. 4.4 A und B: Gruppe Ethanol. Kumulierte Darstellung der Kraft-Weg-Diagramme....	28
Abb. 4.5 A und B: Gruppe Glutaraldehyd. Darstellung der kumulierten Graphen	28
Abb. 4.7: Auswirkung der Konservierung auf die Bruchlast.....	29
Abb. 4.8: Auswirkung der Konservierung auf die maximale Durchbiegung.....	30
Abb. 4.9: Auswirkung der Konservierung auf die Steifigkeit von Knochen.....	30
Abb. 4.10: Auswirkung der Konservierung auf den Elastizitätsmodul.....	31
Abb. 4.11: Auswirkung der ausgewählten Konservierungsmethoden auf die Zugspannung.	32
Abb. 4.12: Auswirkung der Konservierung auf die Energieabsorption (Work-to-failure).....	32
Abb. 5.1: Auswirkungen des Gefrierens	34
Abb. 5.2: Auswirkung der Fixierung der Mäusefemora mit gepuffertem Formaldehyd	35
Abb. 5.3: Auswirkung der Konservierung mit ungepuffertem Formalin	38
Abb. 5.4: Auswirkung der Konservierung mit Ethanol.....	39
Abb. 5.5: Vergleich der mit Glutaraldehyd konservierten Femora mit ihrer Kontrollgruppe	40

Abb. 9.1: Normalverteilung bezüglich F_{max}	51
Abb. 9.2: Normalverteilung bezüglich der maximalen Durchbiegung;	52
Abb. 9.3: Normalverteilung bezüglich der Steifigkeit.....	53
Abb. 9.4: Normalverteilung bezüglich des E-Moduls.....	54
Abb. 9.5: Normalverteilung bezüglich der Zugspannung.....	55
Abb. 9.6: Normalverteilung bezüglich der Work-to-failure.....	56

Abkürzungen

Bezeichnung	Formelzeichen	SI-Einheit
Kraft	F	N = Newton
mechanische Spannung	σ	N/m ² = Pascal (Pa)
Elastizitätsmodul	E-modul	N/m ² = Pascal (Pa)
Elastizitätsgrenze	EL	
Torsionsmodul	G	N/m ² = Pascal (Pa)
Bruchlast	F_{max}	N = Newton
maximale Durchbiegung	U_{max}	mm
Steifigkeit		N/mm
Work-to-failure		Nm
Biegemoment	M	
Flächenträgheitsmoment	I	mm ⁴
Knochenmineraldichte	BMD	mg/ml

1 Fragestellung

Die Fragestellung ergibt sich aus der Verwendung genetisch modifizierter Mausmodelle zur biomechanischen Untersuchung von Knochen.

Aus logistischen Gründen kann häufig auf eine Konservierung der Knochen nicht verzichtet werden. Ausgehend davon, dass verschiedene Konservierungsverfahren in unterschiedlichem Ausmaß Einfluss auf die biomechanische Kompetenz von Knochen nehmen stellt sich die Frage:

- Welches Konservierungsverfahren beeinflusst die biomechanischen Eigenschaften von Mäuseknochen am wenigsten und sollte daher als Standard eingesetzt werden?
- Wie wirkt sich das histopathologisch etablierte, in der Verwendung zur Konservierung von Knochen vor biomechanischer Testung aber untypische Glutaraldehyd auf die biomechanische Kompetenz des Mäusefemurs aus?

Das Ausmaß des Einflusses vierer ausgewählter Verfahren, dem Gefrieren sowie der chemischen Konservierung mit Formalin, Ethanol und Glutaraldehyd soll evaluiert und verglichen werden.

2 Einleitung

2.1 Knochenaufbau

2.1.1 Knochengewebe

Knochengewebe ist ein spezialisiertes Bindegewebe, welches durch seinen stabilen Aufbau den Organismus stützt und aufrecht hält und die inneren Organe umgibt und schützt. Zusammengesetzt ist es aus Zellen (Osteozyten und Osteoblasten) und einer organischen extrazellulären Matrix, die aus Fasern und aus der von den Zellen produzierten Grundsubstanz besteht (Kugler 2006, Lippert 1996, Löffler 1996).

Die Besonderheit des Knochengewebes ist sein hoher Gehalt anorganischen Materials, welches in Form von Mineralsalzen in die organische Matrix eingelagert ist (Buckwalter et al. 1995). Durch diese anorganische Komponente wird Knochen einerseits hart und steif, aber auch spröde (Burr, 2002, Currey, 2002), während die organische Komponente ihm Flexibilität und Zugfestigkeit verleiht (Wang et al. 1998, Wang et al. 2001). Die Zusammensetzung von Knochen ist abhängig vom untersuchten Organismus, seiner Lokalisation, Alter und Ernährung (Kaplan et al. 1993, Biltz und Pellegrino 1969).

Beim Menschen besteht der mineralische Anteil des Knochens vorwiegend aus Kalzium und Phosphat, hauptsächlich in Form kleiner, an synthetisches Hydroxylapatit erinnernder Kristalle ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). 99% des Gesamtkörperbestandes an Kalzium sowie 86% des Phosphats sind so im Knochen gespeichert und machen die Stabilität des Gewebes aus (Frankel und Nordin 2001, Lang F und Murer H 2007). Kalzium- und Phosphathomöostase sind miteinander gekoppelt und streng hormonell reguliert (Parathormon, Calcitriol, Calcitonin), u.a. ist Kalzium von Bedeutung für Blutgerinnung, Immunabwehr und die Übertragung neuromuskulärer Impulse (Barett und Barett 2005).

Knochenmineral ist eingebettet in die verschieden ausgerichteten Fasern des Proteins Kollagen. Kollagenfasern (Typ I) sind widerstandsfähig und biegsam, aber wenig dehnbar. Sie stellen 80% der extrazellulären Matrix und 25-30% des Knochengewichts (Frankel und Nordin 2001).

Einleitung

Die gelartige Grundsubstanz, welche die mineralisierten Kollagenfasern umgibt, besteht in der Hauptsache aus Glycosaminoglycanen vorwiegend in Form komplexer Makromoleküle, der Proteoglykane. Die Proteoglykane wirken als Klebeschicht zwischen den Lagern mineralisierter Kollagenfasern (Frankel und Nordin 2001).

Im lebendigen Knochen ist Wasser reichlich vorhanden und macht 25% seines totalen Gewichts aus. Überwiegend findet es sich in der organischen Matrix um die Kollagenfasern, in der Grundsubstanz und als Hydratationsschicht, die die Knochenkristalle umgibt. Ein kleinerer Anteil ist in den Kanälen und Kavitäten, die durch Knochenzellen gebildet werden, und durch die das Knochengewebe mit Nährstoffen versorgt wird (Currey 2002, Frankel und Nordin 2001).

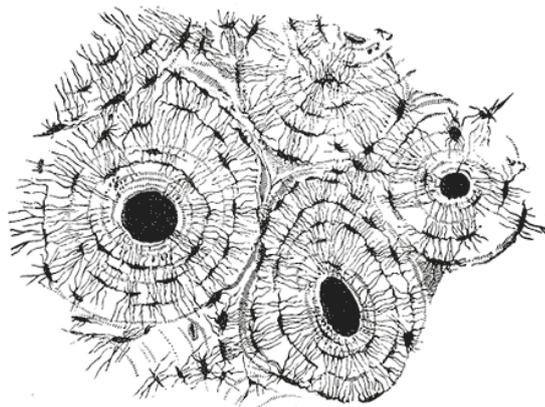


Abbildung 2.1: Vergrößerter Querschnitt der Kompakta (Gray, 1918).

Auf mikroskopischer Ebene ist der Baustein des Knochens das Osteon. Im Zentrum jedes Osteons ist ein sogenannter Havers-Kanal, der Nerven und Blutgefäße führt. Das Osteon selbst besteht aus mehreren ringförmig angeordneten Lagen (Lamellae) mineralisierter Matrix, die den Havers-Kanal umgeben. Im Kontaktbereich der einzelnen Lamellae findet sich eine Vielzahl Lakunen, in welchen sich jeweils eine einzelne Knochenzelle (Osteozyt) befindet. Zahllose kleine Kanäle (Canaliculi) strahlen von jeder Lakune aus und verbinden diese miteinander und mit dem Haverskanal. Über Zellfortsätze, die in den Canaliculi laufen, sind die Osteozyten miteinander und mit dem Havers-Kanal verbunden. Die Funktion der

Einleitung

Osteozyten ist bislang noch nicht vollständig geklärt, vermutet wird aber eine Rolle als Mechanorezeptor bei Um- und Anbauvorgängen im Knochen (Cowin 2002, Bonewald 2006). Desweiteren lassen aktuellere Untersuchungen vermuten, dass das Osteozytennetzwerk an der Regulation des Mineralstoffwechsels beteiligt ist und direkten Einfluss auf seine Mikroumgebung nehmen kann (Feng et al. 2002, Lane et al. 2006, Liu et al. 2006, Rowe et al. 2000).

Im Randbereich des Osteons befindet sich eine zementähnliche Schicht aus Proteoglykanen, die weder von Osteozytenfortsätzen noch vom Kollagengeflecht des Osteons erreicht wird und so mikrostrukturell eine Schwachstelle darstellt (Currey 2002).

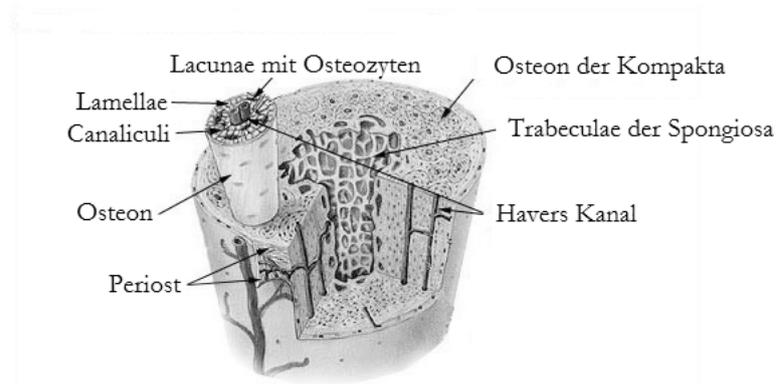


Abbildung 2.2: Kompakta und Spongiosa des Knochens (nach SEER Training 2010).

Im Schnitt haben Osteone einen Durchmesser von 200 μ m und sind in langen Knochen überwiegend longitudinal orientiert, allerdings nicht, ohne sich dabei zu verästelnd und zu anastomosieren. Die Bereiche zwischen den Osteonen werden durch Schaltlamellen gefüllt, die in ihrer Zusammensetzung den Osteonen entsprechen, aber einen anderen geometrischen Aufbau haben.

Osteone und Schaltlamellen bauen Lamellenknochen auf. Dieser Typ Knochengewebe überwiegt beim Erwachsenen und ist gekennzeichnet durch eine außen liegende kompakte Schicht (Kompakta) und innen liegende Bälkchenknochen (Spongiosa).

Einleitung

Nach außen wird die Kompakta von großflächigen Generallamellen abgeschlossen, die von gefäß- und nervenreichem Periost bedeckt sind, welches sich in das Stratum osteogenicum und das Stratum fibrosum aufteilt (Kugler 2006, Lippert 1996).

Das Stratum fibrosum besteht aus straffem geflechtartigem Bindegewebe; von hier aus dringen kollagene Fasern (Sharpey-Fasern) in den Knochen und verankern so das Periost. Im Stratum osteogenicum, der Keimschicht des Knochens, finden sich ruhende Osteoblasten (lining cells), welche bei Aktivierung Knochenapposition oder Regeneration (Bruchheilung) bewirken können.

Die Knocheninnenflächen werden von Endost, einem lockeren Verband flacher Zellen, ausgekleidet (Kugler 2006).

2.1.2 Knochen als Organ

Im Knochen findet sich neben reinem Knochengewebe Fettgewebe, blutbildendes Gewebe im Markraum, Knorpel im Bereich der Gelenke und in den Wachstumszonen, Knochenhaut aus straffem Bindegewebe, Endothel, die Wände der Blutgefäße, welche sich aus elastischem Bindegewebe und glatten Muskelzellen zusammensetzen, sowie Nervengewebe (Lippert 1996).

Knochen können entsprechend ihrer Form in verschiedene Typen eingeteilt werden. Exemplarisch seien hier die langen Knochen dargestellt.

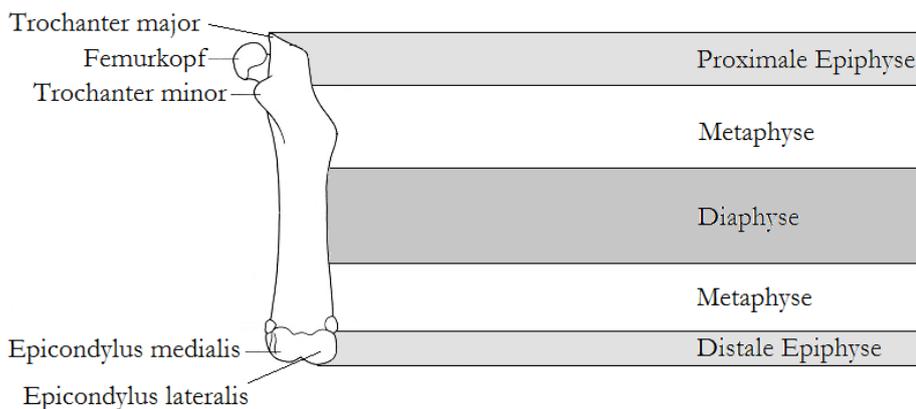


Abbildung 2.3: Rechter Femur der Maus als beispielhafte Darstellung eines langen Knochens.

Lange Knochen (Ossa longa) bestehen aus der Diaphyse, dem Schaft, der an beiden Seiten in der Epiphyse endet. Zwischen Epi- und Diaphyse liegt die Metaphyse, welche oft Muskeln zum Ansatz dient und an der sich dementsprechende Vorsprünge, die Apophysen, befinden. Zwischen Epi- und Metaphyse liegt die Epiphysenfuge, von welcher das Längenwachstum des Knochens ausgeht und welche nach abgeschlossenem Wachstum zur Epiphysenlinie verknöchert. Die Diaphyse enthält die von Kompakta umgebene Markhöhle. Im Bereich der Epiphysen findet sich Spongiosa. Die Gelenkflächen der Epiphysen sind von hyalinem Knorpel bedeckt (Kugler 2006, Lippert 1996, Schumacher 1997).

2.2 Funktion des Knochens

Knochen dient, wie schon bei der Beschreibung des Gewebes herausgestellt, der Strukturbildung, dem Schutz innerer Organe und der Speicherung von Kalzium und Phosphat. Er ermöglicht Bewegung und Aufrichtung gegen die Schwerkraft. Eine höchstmögliche Effektivität bei der Erfüllung dieser Aufgaben wird durch ein möglichst geringes Gewicht erzielt, entsprechend finden sich im Skelett viele Strukturen des Leichtbaus wie zum Beispiel Rahmenkonstruktionen an Schädel, Oberschenkelknochen und Wirbelkörpern. Diese trajektorielle Bauweise sieht nur in besonders beanspruchten Bereichen dichtes Knochengewebe vor. Die Diaphyse des Röhrenknochens ist daher im Inneren frei von Knochengewebe, weil die hier auftretenden Spannungen im Vergleich mit den Randbereichen gering sind. Diese Einsparung an Gewebe reduziert den Energiebedarf des Körpers und das geringere Gewicht entlastet die Skelettmuskulatur, die so weniger Arbeit verrichten muss (Kugler 2006). Insgesamt macht der Knochen nur ein Zehntel des Körpergewichts aus,



Abbildung 2.4: Hauptbelastungslinien des Knochens. Im Bereich der stärksten Belastung ist der Knochen entsprechend des Leichtbauprinzips massiver ausgebildet, während er im Bereich des Schaftes schmal und sogar hohl ist (Gray 1918).

obwohl er mit einer Dichte von 2 bis 3g/ml das schwerste Gewebe des Menschen ist (Lippert 1996).

2.2.1 Mechanische Eigenschaften von Knochen

Steifigkeit und Bruchfestigkeit sind die wichtigsten Materialeigenschaften von Knochen. Durch seine Steifigkeit ermöglicht der Knochen erst eine effiziente Nutzung der Skelettmuskulatur -die Aufrichtung und das Heben von Lasten. Ohne seine Widerstandsfähigkeit gegenüber Belastung wäre Bewegung nicht effektiv -durch eine erhöhte Bruchneigung würde der Knochen nutzlos und der Gesamtorganismus immobil (Currey 2002). So ist beispielsweise bei der Osteomalazie der Mineralgehalt des Knochens reduziert, bei der Osteogenesis imperfecta Kollagen Typ I fehlgebildet (Burr 2002). Beide Krankheitsbilder sind Ursache für eine erhöhte Knochenbrüchigkeit.

Erste Untersuchungen zur mechanischen Bedeutung von Knochen finden sich bereits 1601 bei Jan Jessenius „De Ossibus Tractatus“. Galilei erkannte 1638 Zusammenhänge zwischen der Größe, Form und Masse der Knochen verschiedener Lebewesen in „De Animalium motibus“ (Martinko 1985, Völker 2004).

In den sechziger Jahren des 19. Jahrhunderts entdeckte der Züricher Anatom Hermann Meyer Regelmäßigkeiten beim Vergleich des Aufbaus der Spongiosa gleicher Knochen verschiedener Individuen. Der Ingenieur Karl Culmann wies dieser Regelmäßigkeit Bedeutung zu. Als Entwickler der Graphischen Statistik, einer Methode zur Spannungsanalyse, erkannte er in der Ausrichtung der Bälkchen in den Köpfen des Os metatarsi I Ähnlichkeit mit den Spannungstrajektorien eines von ihm mit Graphischer Statistik abgebildeten Fairbairn-Krans. Meyer publizierte diese Entdeckung 1867 (Maurer und Lehmann 2006). Die genauere Untersuchung wurde durch den Berliner Arzt Julius Wolff vorgenommen (Brand 2010). In Zusammenarbeit mit Culmann stärkte er so dessen Annahmen und veröffentlichte 1892 (August Hirschfeld, Berlin) sein hauptwissenschaftliches Werk „Das Gesetz der Transformation von Knochen“. Kernaussage seiner Publikation ist, dass sich *„im Gefolge primärer Abänderungen der Form und der Inanspruchnahme oder auch bloß der Inanspruchnahme der Knochen, bestimmte, nach mathematischen Regeln folgende sekundäre Umwandlungen der äußeren Form der betreffenden Knochen vollziehen“* (Meyer 1997, Duda et al. 2010). Mit der Entdeckung der Röntgenstrahlung 1895 (Rother 2001) stand der Analyse

von Knochen ein weiteres Werkzeug zur Verfügung. Das „Wolffsche Gesetz“ wurde aufgegriffen und die Forschung auf dem Gebiet der Knochenmechanik fortgesetzt. Friedrich Pauwels beschrieb den funktionellen Aufbau des Knochens bezüglich mikroskopischer Gestalt und Struktur und versuchte in seinen „Beiträgen zur funktionellen Anatomie und kausalen Morphologie des Stützapparates“ die Vermutungen der klassischen Vertreter der Biomechanik zu untermauern. Er kam zu dem Ergebnis, dass das menschliche Skelett ein Leichtbau und die Triebkraft für die funktionelle Belastung die Biegebeanspruchung sei (Pauwels 1965). Der amerikanische Orthopäde Harald Frost entwickelte in den 1960er Jahren die „Mechanostat Hypothese“ (Schönau und Fricke 2006), die Wolffs „Gesetz der Transformation von Knochen“ weiterentwickelte.

Die Untersuchungen vieler weiterer Forschungsgruppen im 20. Jahrhundert ermöglichen heute eine differenziertere Sichtweise. Grundlegende Annahmen gelten auch weiterhin, ausgereifte Knochenzellen können auf mechanische Beanspruchung mit Knochenumbau reagieren. Bei Erkrankungen ist das Gleichgewicht zwischen mechanischer Belastung und der Fähigkeit des Knochens zur funktionellen Anpassung gestört. Es ist jedoch falsch den Knochen wie Wolff als solide Struktur und von einem rein mechanisch-mathematischen Gesichtspunkt aus zu betrachten. Cowin beschrieb 1997, dass dem Wolffschen Gesetz die Beachtung der Komplexität des Knochens als Material fehlte (Cowin 1997).

Heute ist eine wesentliche Aufgabe der Biomechanik geeignete Modelle und Versuchsaufbauten unter Berücksichtigung eben dieser komplexen Materialeigenschaften zu entwickeln.

2.3 Biomechanik

Einige grundlegende Begriffe aus der Physik ermöglichen ein besseres Verständnis der Mechanik von Knochen.

Jeder Form der Mechanik liegen Kräfte zugrunde, so ist die Definition von *Kraft*, Masse mal Beschleunigung, auch das zweite Newton'sche Gesetz und die Grundgleichung der Mechanik (Harten 2006). Kraft ist eine gerichtete Größe, ein Vektor, die, sobald sie auf einen Körper wirkt, dessen Beschleunigung, Deformation oder Richtungsänderung zur Folge hat (Breuer 1990). Wirkt eine definierte Kraft über einen definierten Weg wird *Arbeit* geleistet.

Die SI-Einheit der Kraft ist Newton ($1\text{N} = 1\text{m} \cdot \text{kg} / \text{s}^2$), die der Arbeit Newtonmeter.

Einleitung

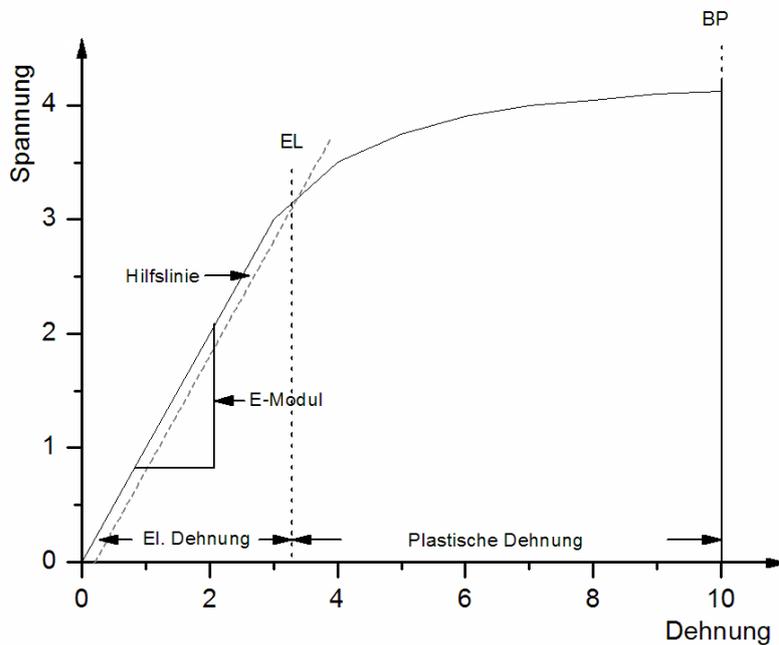


Abbildung 2.5: Spannungs-Dehnungs-Diagramm. Das arbiträr über eine Hilfslinie bestimmte Elastizitätslimit EL kennzeichnet den Übergang von elastischer in plastische Verformung, BP ist der Bruchpunkt, das heißt die Maximalspannung, die auch als maximale innere Kraft des Testkörpers gilt. Die Steigung im linearen Abschnitt definiert den Elastizitätsmodul.

Knochen lässt sich anhand physikalischer Definitionen am ehesten zu den Festkörpern zählen, das heißt, er ist gekennzeichnet durch eine kristalline Struktur, ist formstabil, aber nicht starr, sondern ermöglicht eine elastische und geringfügige plastische Verformung.

Anschaulich wird dies beispielsweise im Zugversuch (Harten 2006). Hierbei wird ein Testkörper auf Zug belastet, gemessen wird

die applizierte Spannung und die erfolgte Dehnung. Die ermittelten Werte können in Form einer Kurve in ein Koordinatensystem übertragen werden, man erhält ein *Spannungs-Dehnungs-Diagramm*. Im linearen Teil der Kurve, dem sogenannten *Hookeschen Bereich*, ist die *Dehnung* proportional zu der ausgeübten Kraft pro Fläche, der *Spannung*; die Verformung ist elastisch, demnach vollständig reversibel. Die Steigung der Kurve repräsentiert den *Elastizitätsmodul*, eine Materialeigenschaft die ebenso wie die Spannung σ in N/m^2 oder Pascal ausgedrückt wird. Die Elastizitätsgrenze EL kennzeichnet den Übergang zur plastischen irreversiblen Verformung bis es schließlich am Ende der Kurve zu einem Zerreißen des Testkörpers kommt. Eine Veränderung der Länge geht in der Regel mit einer Veränderung der Dicke einher, diese Relation heißt *Poisson-Effekt* und beträgt bei kortikalem Knochen 0,28 - 0,45 (Ashman et al. 1984, Turner und Burr 1993). Zur sogenannten plastischen Verformung kommt es beim Knochen nicht ohne eine Beschädigung des

Materials, beispielsweise durch Mikrofrakturen. Es wäre daher korrekter von einer unwiderruflichen Dehnung zu sprechen (Currey 2002, Harten 2006).

Analog zur Zugspannung können auf einen Festkörper *Druckspannung* und *Schub- oder Scherspannung* wirken. Druckspannungen entstehen durch senkrecht zur Oberfläche wirkende Kräfte und führen zu einer Stauchung. Das Volumen des Festkörpers verkleinert sich. Schubspannungen resultieren dagegen aus tangential wirkenden Kräften. Die Formveränderung ist eine Scherung –bei gleich bleibendem Volumen ändern sich die Winkel eines gedachten Würfels innerhalb des Materials, eine Portion des Materials verschiebt sich relativ zu einer anderen. Diese Verformung hängt wie die Zugspannung linear von der Größe der einwirkenden Kraft ab und wird durch das *Scher-, Schub- oder Torsionsmodul G* definiert (Gerthsen und Meschede 2003). Druck-, Zug- und Scherspannungen treten auch bei einfachen Kraftapplikationen fast immer gemeinsam auf (Turner und Burr 1993).

Mögliche Versuchsaufbauten für die Ermittlung der Widerstandskraft eines Materials gegenüber Druckspannung sind der Kompressions- und der Biegetest. Beim *Kompressionstest* wird das Material komprimiert und kollabiert in sich selbst. Verwendete Prüfkörper müssen meistens bearbeitet werden, um einen gleichmäßigen Kraftangriff auf planen parallelen Flächen zu ermöglichen. Die Anisotropie des Knochens, das heißt die Richtungsabhängigkeit seines mechanischen Verhaltens, bedingt bei solchen Versuchsaufbauten eine Fehleranfälligkeit insbesondere im Randbereich. Vorteile sind die Durchführbarkeit mit sehr kleinen Prüfkörpern und die bessere Vergleichbarkeit mit in vivo-Bedingungen, beispielsweise bei Knochen aus der Wirbelsäule (Turner und Burr 1993).

Beim *Biegetest* werden Drei- und Vierpunktbiegung unterschieden. Auf der Seite der Kraftapplikation resultieren Druckspannungen, auf der gegenüberliegenden Seite dagegen Zugspannungen, beide zum Zentrum des Prüfkörpers abnehmend. Zentral liegt eine spannungsfreie neutrale Faser (Harten 2006, Turner und Burr 1993).

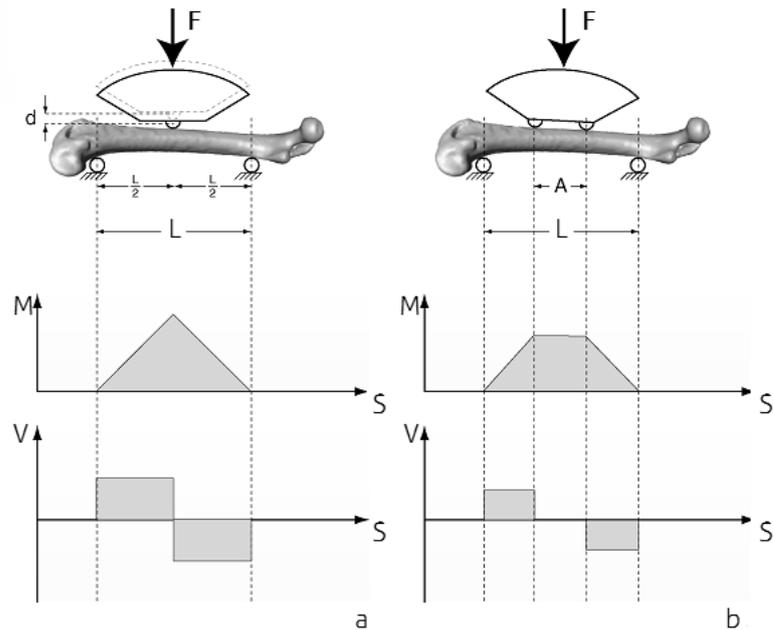


Abbildung 2.6: Versuchsanordnung für Biegetests am Femur. Beim einfacheren Aufbau der Dreipunktbiegung [a] zeigt sich eine ungleichmäßige Verteilung des Biegemoments und der Scherkräfte mit Konzentration auf den Ort der Kraftapplikation, im Vergleich dazu zeigt die Vierpunktbiegung [b] zwischen den Auflagern eine gleichmäßige Verteilung der Kräfte. Nachteilig bei der Vierpunktbiegung ist eine Zunahme der Scherkräfte bei kleinerer Distanz der Auflagern, die bei kleinen Knochen zu Quetschungen führen kann. F =Kraft, M =Biegemoment, V =Scherkräfte, d =Durchbiegung (Kummer 2008).

Aufgezeichnet wird das Kraft-Weg-Diagramm, aus dem sich analog dem Spannungs-Dehnungs-Diagramm direkt die applizierte Maximalkraft, die maximale Durchbiegung und die Steifigkeit ablesen lassen. Weitere biomechanische Eigenschaften wie Spannung und E-Modul können errechnet werden. Üblicherweise wird die Vier-Punkt-Biegung wegen des geringeren Auftretens von Scherkräften bevorzugt eingesetzt, bei sehr kleinen Knochen kann es jedoch aufgrund des geringen Abstandes der Auflagern zu Quetschungen kommen, in solchen Fällen ist die Drei-Punkt-Biegung vorteilhafter (Kummer 2008, Turner und Burr 1993).

2.4 Die Maus als Modell

Seit Beginn des vorigen Jahrhunderts nimmt die Maus eine Schlüsselrolle als Versuchstier für medizinische Forschungszwecke ein (Davisson und Linder 2004). Die Maus ist wie der

Mensch ein Säugetier und verfügt trotz der äußeren Unterscheidungen über ein ähnliches Organsystem, ähnliche Gewebe sowie Ähnlichkeiten bezüglich Reproduktion, Verhalten und Krankheitsverlauf. Die Haltung von Mäusen ist unproblematisch und preiswert, was die Voraussetzung für große Untersuchungsgruppen mit identischen Haltungsbedingungen und damit die Akkumulation großer und somit aussagekräftiger Datenmengen schafft. Auch die Beurteilung von Alterungsprozessen ist aufgrund der vergleichsweise kurzen Lebenserwartung von 18 bis 24 Monaten möglich. Mit der vollständigen Sequenzierung von Mensch- und Mausgenom (The Human Genome Project 2001, Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002) stellt das Mausmodell ein wichtiges Werkzeug für das Verständnis und die Untersuchung genetisch bedingter Prozesse wie Alterung und Krankheit dar (Paigen 2003; O'Brien und Woychik 2003). Auf DNA-Ebene finden sich zwischen Human- und Mausgenom Übereinstimmungen von über 95% (Mouse Genome Sequencing Consortium, 2002), neben der Möglichkeit der Manipulation einzelner Gene, deren Addition oder Ausschaltung (sogenannte Knock-out-Mäuse) und somit Simulation menschlicher Erkrankungen, hilft die Arbeit mit Versuchstieren auch ein besseres Verständnis für die Genetik des Menschen zu entwickeln (Akhter et al. 2006). Skelettal veränderte Mäuse werden zunehmend in der biomechanischen Untersuchung von Knochen eingesetzt (Nazarian et al 2008; Aerssens et al 2010), neue Testverfahren und sensitivere Geräte ermöglichen heute die Untersuchung sehr kleiner Knochen. Mithilfe der Genetik können so medizinisch therapeutische wie auch pharmakologische Fragestellungen besser beantwortet werden (Vashishth 2008).

2.5 Konservierung von Knochen und klinische Relevanz der Konservierung

Kurz nach Knochenentnahme beginnt der Gewebezellerfall. Zellorganellen degenerieren bereits fünf Minuten nach Aufhören der Durchblutung und der damit verbundenen Unterbrechung der Sauerstoff-Zufuhr (Anderson 1982), es folgt Zellnekrose und Autolyse, bei bakterieller Beteiligung kommt es zu Fäulnis oder Verwesung. Die anorganischen Bestandteile der Knochenmatrix werden durch die direkten Effekte dieses Zelltods kaum beeinflusst (Greenberg et al. 1968), können allerdings durch die freiwerdenden Enzyme verändert werden (Black 1976, 1984). Der Feuchtigkeitsverlust des Gewebes bei trockener Aufbewahrung führt zu einer erhöhten Sprödigkeit, die sich auch in einer Erhöhung des Elastizitätsmoduls und der

Zug- und Biegefestigkeit widerspiegelt (Turner und Burr 1993). Die Bruchzähigkeit (Toughness) wird geringer (Currey 1988, Linde und Sørensen 1993). Da auch die feuchte Aufbewahrung bei Zimmertemperatur zwangsläufig zum Zelltod führt und die Gefahr der Mineralienauswaschung durch Wahl eines ungeeigneten Aufbewahrungsmediums hinzukommt (Gustafson et al 1996), muss dem Gewebeerfall durch Konservierung entgegengewirkt werden, wenn der Knochen nicht direkt dem geplanten Versuchsaufbau zugeführt werden kann.

Man unterscheidet die physikalische Konservierung durch Gefrieren von verschiedenen chemischen Möglichkeiten der Konservierung.

2.5.1 Physikalisch -Gefrieren

Vorteilhaft beim Gefrieren ist, dass keine Chemikalien appliziert werden und so die biologischen Strukturen des Knochens weitestgehend unverändert bleiben. Allerdings kann es durch die Bildung von Eiskristallen zu mikroskopischen Schäden und Rissen kommen. Bilden sich diese Eiskristalle zuerst in der extrazellulären Flüssigkeit, kommt es zur Ausbildung eines osmotischen Gradienten über der Zellmembran, der die Dehydrierung der betreffenden Zellen zur Folge hat, was beim Auftauen zu einer schnelleren Lyse führen kann. Die Veränderung biomechanischer Eigenschaften des Knochens durch Gefrieren hängt von dessen Größe und der gewählten Temperatur ab. Geringsten Einfluss scheinen Temperaturen von -20°C zu haben (Martin und Sharkey 2003).

2.5.2 Chemische Konservierung

Durch chemische Konservierung von Gewebe kommt es in der Regel zu morphologischen Veränderungen. Es stehen eine Reihe von Histopathologen entwickelte Methoden zur Verfügung, die neben der Vermeidung von Gewebeerfall gleichzeitig die Zellstruktur für Untersuchungen mit dem Mikroskop erhalten sollen. Ein möglichst geringer Einfluss auf den Mineralgehalt ist bezüglich der Konservierung für biomechanische Untersuchungen elementar wichtig. Außerdem wird gefordert, dass die gewählten Lösungen den Knochen schnell und vollständig durchdringen. Unterschieden werden hierbei die Immersionsfixierung, bei der das Gewebe in die Fixierlösung eingelegt wird, und die Perfusionsfixierung, bei der die

Fixierlösung das Gewebe auf dem Blutweg durchströmt. Üblicherweise sind Formaldehyd, Alkohol oder Glutaraldehyd enthalten (Lang 2006).

2.5.3 Fomaldehyd

Formaldehyd ist bei Zimmertemperatur gasförmig aber gut in Wasser löslich. In Reaktion mit Wassermolekülen kommt es zu Polymerisation und Bildung von Dihydroxymethylan, besonders gefördert durch die Präsenz organischer Substanzen oder durch Sonnenlicht. Die Wasserlöslichkeit bleibt bis zu einer Bildung von 8-10-gliedrigen Polymeren erhalten, danach fallen diese als weißer Niederschlag aus der Lösung aus. Durch Trocknung der Polymerisate lässt sich Paraformaldehyd gewinnen, welches zur Herstellung frischer Formaldehydlösung verwendet werden kann. Gut wirksame Formaldehydlösungen sollten reich an Monomeren sein, daher wird üblicherweise Methanol als Polymerisationshemmer beigesetzt. Eine 37-40%-ige wässrige Lösung von Formaldehyd wird als Formalin bezeichnet (Lang 2006).

Formaldehyd stellt ein universelles Fixativ für alle Gewebe dar und wird in 4%-Konzentration verwendet, das entspricht einer etwa 10%-igen Formalinlösung. Durch Einwirkung vor allem von Sonnenlicht kann es zu einer spontanen Redoxreaktion zweier Formaldehydmoleküle kommen, der sogenannten Cannizzaroreaktion (Fox und Whitesell 2004). Dabei wird ein Formaldehydmolekül zu Methanol reduziert; aus dem anderen bildet sich durch Oxidation Methansäure (Ameisensäure). Es folgt ein Absinken des pH-Werts der Lösung, was sich negativ auf die Gewebequalität im Allgemeinen und speziell bei Knochen auf den Mineralgehalt auswirken kann. Gegenmaßnahmen sind die Aufbewahrung in dunklen Flaschen und die Pufferung der Lösungen (Zimmermann und Schaffner 2005). Bei der Wahl des Puffers ist zu beachten, dass es bei Verwendung von Phosphatpuffer zu Mineralanreicherungen und Artefakten im fixierten Knochen kommen kann (Dickson 1984).

Formaldehyd wirkt proteinvernetzend und wenig denaturierend, Zellmembranen, Enzymaktivitäten und Antigenstrukturen bleiben erhalten. Es dringt in Abhängigkeit von Konzentration und Temperatur schnell, mit einer Geschwindigkeit von etwa 1mm pro Stunde (abnehmend mit zurückgelegter Strecke), in das Gewebe ein (Martin und Sharkey 2003). Nach zirka 24 Stunden ist in Abhängigkeit von der Stärke des Gewebes mit einer angemessenen Vernetzung zu rechnen, eine komplette Fixierung wird bei Raumtemperatur erst nach 1-2 Wochen erreicht. Durch die proteinvernetzende Wirkung des Formaldehyds und

die Ausbildung von Polyoxymethan in Gegenwart von Wasser wird konserviertes Gewebe aufgehärtet. Somit ist von einer Veränderung der biomechanischen Eigenschaften auszugehen. An Protein gebundenes Formalin kann durch längere Waschung aus dem Gewebe entfernt werden (Lang 2006).

2.5.4 Ethanol

Ethanol konserviert Gewebe, indem es die Wasserhülle von Proteinen angreift und dadurch eine Koagulation bewirkt. Das heißt, es erfolgt eine Denaturierung durch Aufbruch der Wasserstoffbrückenbindungen. Eine zusätzlich Kühlung unter 5°C ermöglicht eine Fällung der Proteine ohne Denaturierung (Lang 2006). Ethanol ist pH-neutral, Mineralien werden nicht aus dem Knochen gelöst. Allerdings wird der Knochen langsam durchdrungen und in der Konservierung von Zellmembranen ist es dem Formaldehyd unterlegen (Martin und Sharkey 2003). Die Präzipitation von Proteinen durch Wasserentzug kann sich auf die Steifigkeit von Knochen auswirken. Der Wasserverlust sollte daher vor der Testung durch mehrstündige Rehydrierung mit isotoner Kochsalzlösung ausgeglichen werden (Linde und Sørensen 1993, Greenberg und Luttes 1993, Turner und Burr 1993).

2.5.5 Glutaraldehyd

Glutaraldehyd ist das in der Fixierung seit 1962 meist verwendete bifunktionale Aldehyd und das Fixativ der Wahl in der Elektronenmikroskopie, findet jedoch kaum Verwendung in der Konservierung von Knochen vor biomechanischer Testung. Es polymerisiert in wässriger Lösung durch Aldol-Kondensation und bildet dabei hauptsächlich Di- und Trimere aus. Das Bestehen unterschiedlich langer Moleküle nebeneinander begründet wahrscheinlich den besonders guten Fixiereffekt (Lang 2006). Standard ist eine 25%-ige wässrige Lösung von Glutaraldehyd mit einem pH-Wert von 3, welche zur Fixierung verdünnt und in Verbindung mit einem Phosphat- oder Kokodylatpuffer verwendet wird. Für die Fixierung von Knochen werden 5%-ige Konzentrationen empfohlen (Zimmermann und Schaffner 2005). Glutaraldehyd verfügt über eine end- und eine mittelständige funktionelle Aldehydgruppe, wobei vor allem die mittelständige Gruppe durch Proteinbindung und Iminbildung für die Vernetzung der Eiweißstruktur sorgt. Viele Aldehydgruppen werden so nicht abgesättigt und stehen auch nach erfolgter Fixierung weiter als Reaktionspartner zur Verfügung. Ist dies nicht

Einleitung

erwünscht, ist eine Blockierung durch Glycin- oder Lysin-haltige Waschlösungen möglich. Auch wenn es Formalin gegenüber bezüglich der Zellfixierung überlegen ist, durchdringt Glutaraldehyd das Gewebe nur langsam mit einer Geschwindigkeit von etwa 0,5mm in vier Stunden (Johannessen 1978). Eine Immersionsfixierung kommt nur bei sehr kleinen Gewebeprobe-n in Frage, bei Fixierung von ganzen Versuchstieren ist die Perfusionsfixierung vorzuziehen. Die feinmaschige Proteinvernetzung führt zu einer starken Gewebeaufhärtung, was Einfluss auf die biomechanische Kompetenz haben kann (Lang 2006).

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

Untersucht wurden ganze Femora von C57Bl/6 Mäusen. Die Versuche wurden an 30 jeweils acht Wochen alten männlichen sowie 20 jeweils zwölf Wochen alten weiblichen Mäusen durchgeführt. Diese wurden von den *Charles River Laboratories* (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Mäuse wurden unter standardisierten Bedingungen bis zur Knochenentnahme gehalten. In Abstimmung mit dem Tierschutzgesetz war die Versuchsreihe beim Tierschutzbeauftragten des Universitätsklinikums Eppendorf, Hamburg angemeldet.

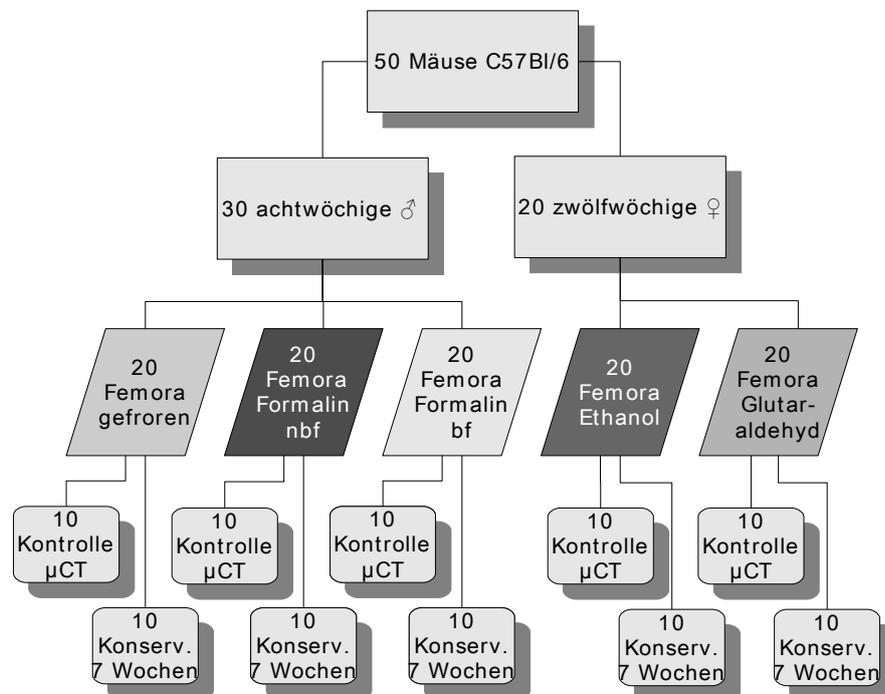


Abbildung 3.1: Versuchsaufbau

Die Mäuse wurden gewogen und einzeln euthanasiert. Beide Oberschenkelknochen wurden frisch entnommen und atraumatisch von den umliegenden Weichgeweben befreit. Dabei diente randomisiert ein Femur als Kontrolle, der andere wurde gemäß der gewählten Methoden konserviert. Die Kontroll- und Versuchsgruppe setzten sich jeweils zur Hälfte aus rechten und linken Femora zusammen.

Alle Femora der Kontrollgruppen wurden direkt nach der Entnahme mittels Mikro-Computertomographie (μ CT) gescannt und im Anschluss der biomechanischen Testung

unterzogen. Auf ein Scannen der konservierten Femora wurde verzichtet, da von seitengleicher Morphometrie ausgegangen wurde (Bonick et al. 1996).

3.2 Konservierungsmethoden

Vier verschiedene Standardverfahren der Konservierung wurden bezüglich ihrer Auswirkung auf die biomechanischen Eigenschaften der Gewebeproben untersucht.

Alle Konservierungsmethoden wurden über einen Zeitraum von sieben Wochen appliziert.

3.2.1 Gefrieren

Die erste zu untersuchende Gruppe, *Frozen*, wurde bei -20°C trocken tiefgefroren. Vor der biomechanischen Testung erfolgte eine Rehydrierung in isotoner Kochsalzlösung über 30 Minuten bei Zimmertemperatur.

3.2.2 Formaldehyd

Die zweite Gruppe, *Formalin bf*, wurde in 3,7%-igem, neutral gepuffertem Formaldehyd bei Zimmertemperatur konserviert. Zur Pufferung diente phosphatgepufferte Salzlösung (PBS). Die dritte Gruppe, *Formalin nbf*, wurde in ungepuffertem Formaldehyd gleicher Konzentration bei Zimmertemperatur konserviert.

Die Konservierung mit ungepuffertem Formalin wurde von uns aus wissenschaftlichem Interesse durchgeführt und entspricht wegen der Gefahr einer Cannizzaroreaktion nicht den von der Histopathologie empfohlenen Vorgehen (Lang 2006).

Im Anschluss erfolgte in beiden Fällen eine Wässerung in isotoner Kochsalzlösung für dreißig Minuten bei Zimmertemperatur.

3.2.3 Ethanol

Ethanol (Gruppe *Ethanol*) wurde in 80%-iger Konzentration bei Zimmertemperatur verwendet. Vor der Testung erfolgte bei Zimmertemperatur eine dreißigminütige Rehydrierung in isotoner Kochsalzlösung.

3.2.4 Glutaraldehyd

Die letzte untersuchte Gruppe, *Glutaraldehyd*, wurde mit 5%-igem PBS-gepuffertem Glutaraldehyd fixiert. Auch diese Femora wurden bei Zimmertemperatur eine halbe Stunde in isotoner Kochsalzlösung gewässert.

3.3 Bildgebung

3.3.1 Mikrocomputertomographie (μ CT)

Die Femora der Kontrollgruppe wurden mithilfe eines Mikrocomputertomographen, μ CT 40 (Scanco Medical, Basserdorf, Schweiz), gescannt, um eine spätere Berechnung der Geometrie und Analyse der Knochendichte zu ermöglichen. Aufgrund ihrer Nichtinvasivität wurde diese Methode der klassischen Histomorphometrie vorgezogen. Nachstehende Tabelle zeigt die zugrundeliegenden technischen Parameter.

Auflösung	10,0 x 10,0 x 10,4 μ m
Röntgenstrahl	55kV, 145 μ A
Detektor	2048 x 256 Elemente, 24 μ m pitch
Integrationszeit	300ms

Tabelle 3.1: Technische Parameter des μ CT

Zum Scannen wurden jeweils fünf Femora mit Agarosegel (Biozym Diagnostik GmbH, Oldendorf) in einem Probehälter fixiert.

3.3.2 Dichtemessung

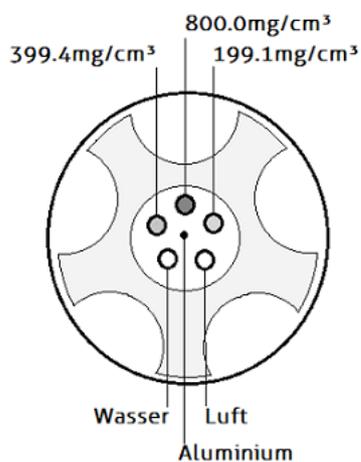


Abbildung 3.2: Phantom zur Kalibrierung.

Das mit den Femora verwendete Phantom wurde von Götzen (Götzen 2006) für das Mausmodell speziell für die Dichtemessung von Wirbelkörpern entwickelt und von Kummer (Kummer 2008) für die Untersuchung von Femora angepasst.

Die fünf Femora sind um das Phantom angeordnet, welches aus einem zentralen Aluminiumstab mit fünf umliegenden Kammern besteht. In drei der Kammern befindet sich Hydroxylapatitgranulat (QRM GmbH, Möhrendorf, Deutschland) unterschiedlicher Konzentration, in den restlichen Kammern befindet sich Luft und Wasser. Diese Anordnung ermöglicht zum

einen eine direkte Kalibrierung über das Softwaremodul μ CT-Calibration (Götzen 2006, Kummer 2008), zum anderen wird das Energiespektrum durch den zentral liegenden Aluminiumstab ausgeglichen. Dieser verhindert die Aufhärtung des Strahlenkegels durch unterschiedliche Knochendichten indem er Streustrahlung absorbiert (Rother 2001).

3.3.3 Softwaremodule

Zur weiteren Verarbeitung der Daten dienten die auf der Grundlage der Programmiersprache *MatLab* (Version 6.5 –The Math Works, Inc., Natick, USA) von Götzen (Götzen 2006) und Kummer (Kummer 2008) entwickelten Softwaremodule:

- *μCT-Calibration* zur Phantomkalibrierung.
- *Scanco2Amira* zur Konvertierung der Datensätze für die Software *Amira* (Version 3.0, Mercury Computer Systems, Inc., San Diego, USA)

Die Knochendichte wurde anhand der auf der Dichtemessung basierenden Kalibrierungskurve ermittelt. Mithilfe von *Scanco2Amira* konnten die Datensätze beschnitten, die Auflösung reduziert und die Absorptionswerte in Knochendichtewerte umgerechnet werden. Das für die Berechnung der Morphometrie benötigte binäre Bild entstand durch Herausstellen des mineralischen Anteils in den quantitativen Histogrammen oberhalb eines empirisch ermittelten Schwellenwertes von $375\text{mgHA}/\text{cm}^3$ (Kummer 2008).

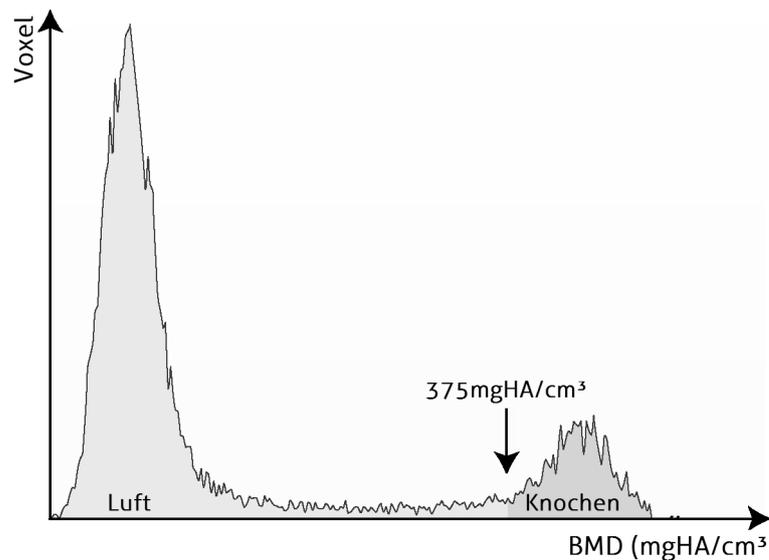


Abbildung 3.3: Quantitatives Histogramm zur Ermittlung des Schwellenwerts zwischen Luft und Knochen (nach Kummer 2008)

3.3.4 Morphometrie

Die gewonnenen Datensätze erlauben eine morphometrische Analyse der Femora entlang der Längsachse. Über das Softwaremodul *Morphoanalyse* (Götzen 2006, Kummer 2008) konnten der Querschnitt, die kortikale Dicke, der Radius und das Trägheitsmoment berechnet werden.

3.4 Experimentelle Biomechanik

Verwendet wurde eine Biegevorrichtung in einer Zwick Prüfmaschine (Modell Z2,5/TN1S, Zwick GmbH & Co. KG., Ulm, Deutschland). Die Biegevorrichtung wurde von Kummer (Kummer 2008) speziell für die Biegung von Mäusefemora entworfen und von der Firma Littmann Präzision GmbH (Norderstedt, Deutschland) hergestellt. Rotationsgelagerte obere Prüfköpfe stehen unteren auf einem speziell gefertigten X-Y-Tisch (Kugellager und Schienen: SKF GmbH, Schweinfurt, Deutschland) befestigten Auflagern gegenüber. Das System positioniert sich durch diese Anordnung automatisch in der Belastungsebene, eine Anpassung an die unregelmäßige Oberfläche ganzer Knochen ist möglich. Die Form des oberen Prüfkopfs bestimmt wie in Abbildung 3.4 dargestellt die Art der Biegung.

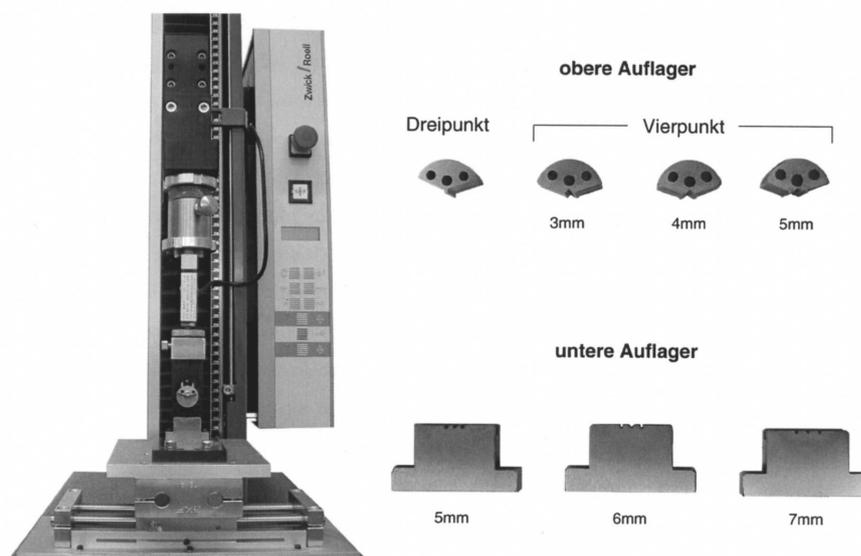


Abbildung 3.4: Zwick-Prüfmaschine mit verschiedenen Auflagern für unterschiedliche Biegungen (Kummer 2008).

Für unseren Versuchsaufbau wählten wir die Dreipunktbiegung bei einer Spannweite von 6mm. Die nachstehende Tabelle gibt einen Überblick über die Testparameter. Die Vorkraft dient zur Annäherung des Knochens an das Auflager und wurde auf 1 Newton festgelegt.

Spannweite	6mm
Vorkraft	1N
Vorkraftgeschwindigkeit	3 mm/min
Prüfgeschwindigkeit	3 mm/min

Tabelle 3.2: Verwendete Testparameter

Mithilfe der integrierten *Test-Expert-Software* (Version 10.1) wurden die Ergebnisse aufgezeichnet. Diese wurden mittels *OriginPro* (Version 7.5, OriginLab, Northampton, MA, USA) in Kraft-Weg-Diagramme übertragen, über welche Bruchlast (F_{Max}), maximale Durchbiegung (U_{Max}), Steifigkeit und Work to failure ermittelt werden konnten.

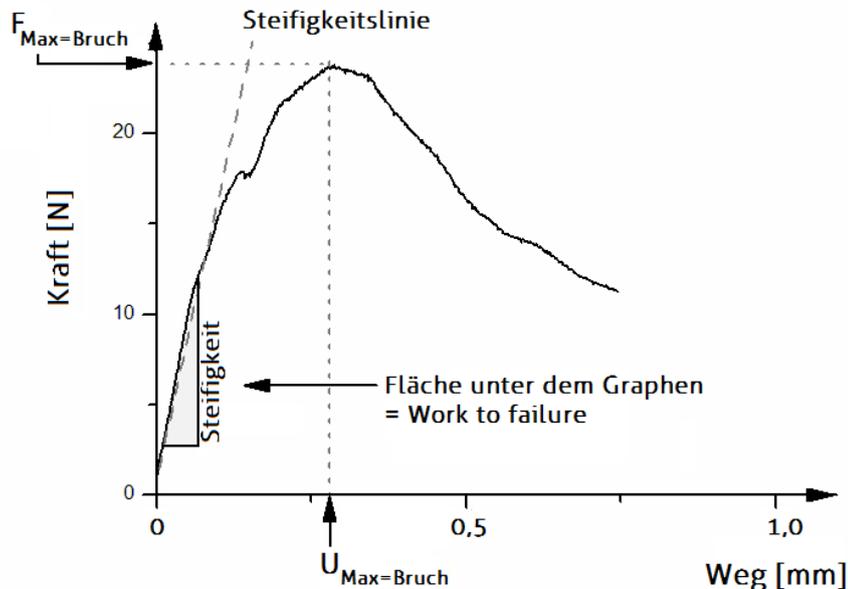


Abbildung 3.5: Kraft-Weg-Diagramm der Dreipunktbiegung eines unbehandelten Femurs. Der Bereich der eher linearen Steigung der Kurve kennzeichnet die elastische Verformung des Knochens und damit die Steifigkeit, im folgenden nicht linearen Bereich erfolgt eine sogenannte plastische Verformung. Die Fläche unterhalb der Kurve gibt die Energieabsorption bis zum Bruchpunkt des Knochens als Maß für dessen Belastbarkeit wieder.

Alle Femora wurden bei Zimmertemperatur mit demselben Prüfprotokoll auf ihre biomechanischen Eigenschaften getestet. Die Kontrollgruppe wurde direkt nach der Morphometrie getestet, die behandelten Gruppen nach Konservierung und anschließender Wässerung in isotoner Kochsalzlösung.

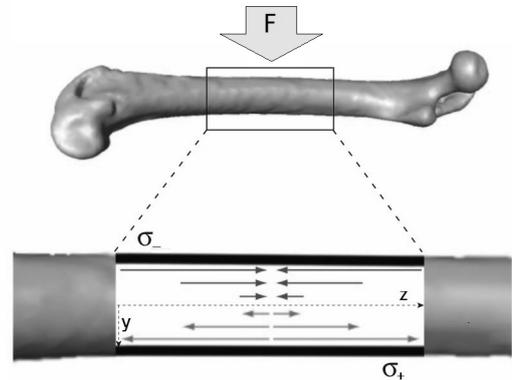
3.5 Numerische Analyse

Durch die numerische Analyse wurden die Daten aus der Morphometrie mit den Daten der experimentellen biomechanischen Testung zusammengebracht. Es gibt hierzu verschiedene Möglichkeiten. Die von uns verwendete einfache Balkentheorie bringt bei deutlich geringerem Zeitaufwand im Vergleich mit der Finite Elemente Methode vergleichbar zuverlässige Ergebnisse (Kummer 2008)

Vorraussetzungen für die Anwendung sind ein im Vergleich mit der Länge deutlich kleinerer Querschnitt und eine Belastung senkrecht zur Längsachse mit vernachlässigbar kleinen Querkräften. Dies ist durch den Versuchsaufbau gegeben (Schnell et al. 2002).

3.5.1 Spannungsberechnung

Die bei der Dreipunktbiegung eingesetzte Kraft wirkt auf der Seite des Kraftangriffs als Druckkraft, auf der gegenüberliegenden Seite als Zugkraft. In der Mitte verläuft eine neutrale Faser, in deren Bereich keine Spannungen in Längsrichtung wirksam werden.



Gemäß nachstehender Grundformel lässt sich die Spannung nach der Balkentheorie berechnen (Gross et al 2009).

$$\sigma = \frac{M}{I} \times y$$

M = Biegemoment, I = Flächenträgheitsmoment,
 y = Abstand von der Mittellinie

Abbildung 3.6: Spannungsberechnung nach der Balkentheorie. Auf der Seite des Kraftangriffs werden Druck- auf der Gegenseite Zugkräfte wirksam. Diese werden mit dem Abstand zur mittigen neutralen Faser größer (nach Kummer 2008)

Die Größe der Spannung steigt mit der Größe der eingeleiteten Kraft und mit Entfernung zur neutralen Faser. Nach Zusammenfassung aller relevanten Einflussgrößen nach Gere und Timoshenko (Gere und Timoshenko 1984) ergibt sich für die Dreipunktbiegung folgende Formel:

$$\sigma = \frac{F L y}{4 I}$$

F = Kraft, L = Abstand der unteren Auflager, y = Abstand zur neutralen Faser, I = Flächenträgheitsmoment

Die Spannungsberechnung wurde mit dem Softwaremodul *BendingSimple* durchgeführt (Götzen 2006, Kummer 2008).

3.5.2 Elastizitätsmodul

Für den Elastizitätsmodul E gilt bei der Dreipunktbiegung (Sonstegard und Matthews 1977)

$$E = \frac{F}{d} \times \frac{L^3}{48 I}$$

F = Kraft, d = gemessene Durchbiegung, L = Länge, I = Flächenträgheitsmoment

Da der Elastizitätsmodul eine Materialkonstante ist (Breuer 1990), wird vorausgesetzt, dass er im Bereich des gesamten Knochens gleich ist. Zu seiner Berechnung ist daher eine Betrachtung der Balkenmitte ausreichend. Errechnet wurde der Elastizitätsmodul mithilfe des Softwaremoduls *BendingYoungs* (Götzen 2006, Kummer 2008).

3.6 Statistische Analyse

Zur statistischen Analyse der Daten dienten die Programme *OriginPro* und *Microsoft Excel* 2000 (Version 9, Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim).

Werte mit $p < 0.05$ wurden vor Beginn der Studie als statistisch signifikant festgelegt und in der graphischen Darstellung mit einem Asterix gekennzeichnet.

Die Kontrollseite entspricht beim Vergleich mit der konservierten Gegenseite einem Ausgangswert von 100%. Abweichungen der konservierten Femora konnten so einheitlich zwischen den Gruppen veranschaulicht werden. Die Standardabweichung als Maß der Streuung um den Mittelwert wurde ebenfalls in Prozent umgerechnet und floss in die Darstellung der Ergebnisse ein.

Die Normalverteilung der Daten wurde mit Box-Plots dargestellt. Eine Box wird durch das 25%- und das 75%-Prozent-Quantil begrenzt. Die sogenannten Whiskers begrenzen die übrigen Quantile und spiegeln somit auch die Extremwerte wieder. Ebenso sind Mittelwert und Median eingezeichnet.

Zur Herausstellung von Signifikanzen dienten der t-Signifikanztest im paarweisen Vergleich. Zur vergleichenden Analyse diente die Anova (Analysis of Variance), die durch eine Post-Hoc-Analyse (Scheffé-Test) zur Ermittlung signifikanter Unterschiede ergänzt wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Morphometrie und Morphologie

4.1.1 Morphometrische Parameter

Tabelle 4.1 zeigt die Ergebnisse des Scans der unbehandelten Femora.

	Mittlerer Querschnitt [mm ²]	Mittlere kortikale Dicke [mm]	Mittlerer Radius [mm]	Flächenträgheitsmoment [mm ⁴]	Mittlere BMD [mg/ml]
Frozen	1,14 ± 0,06	0,22 ± 0,01	0,76 ± 0,04	0,24 ± 0,03	1035,95 ± 13,16
Formalin bf	1,12 ± 0,08	0,21 ± 0,01	0,72 ± 0,06	0,22 ± 0,04	994,55 ± 23,91
Formalin nbf	1,11 ± 0,09	0,23 ± 0,01	0,7 ± 0,03	0,19 ± 0,03	1048,71 ± 22,22
Ethanol	0,81 ± 0,04	0,19 ± 0,01	0,64 ± 0,01	0,13 ± 0,01	975,55 ± 26,42
Glutaraldehyd	0,82 ± 0,05	0,19 ± 0,01	0,64 ± 0,02	0,13 ± 0,01	977,06 ± 25,21

Tabelle 4.1: Durchschnittliche morphometrische Parameter.

Die Kontrollgruppe *Frozen* war bezüglich ihres Querschnitts signifikant verschieden zu den Kontrollgruppen der mit Ethanol und Glutaraldehyd behandelten Femora. Ebenso verhielt es sich mit der kortikalen Dicke. Beim Radius und beim Flächenträgheitsmoment zeigten sich signifikante Unterschiede zu der Kontrollgruppe der mit nicht gepuffertem Formalin behandelten Femora sowie zu den Kontrollgruppen *Ethanol* und *Glutaraldehyd*, der Mineralsalzgehalt (BMD) war zu *Formalin bf* sowie zu *Ethanol* und *Glutaraldehyd* signifikant verschieden. Zur Übersicht sei auf die nachstehenden Tabellen 4.2 und 4.3 verwiesen.

	Mittlerer Querschnitt	Mittlere kortikale Dicke	Mittlerer Radius	Flächenträgheitsmom.	Mittlere BMD
Formalin bf					*
Formalin nbf			*	*	
Ethanol	*	*	*	*	*
Glutaraldehyd	*	*	*	*	*

Tabelle 4.2: Ergebnisse der Anova für die Kontrollgruppe *Frozen*; * = $p < 0,05$.

Die Kontrollgruppe der mit gepuffertem Formalin behandelten Femora unterscheidet sich in Querschnitt, kortikaler Dicke, Radius und Flächenträgheitsmoment signifikant von den Kontrollgruppen *Ethanol* und *Glutaraldehyd*. Die Messung des Mineralsalzgehalts ergab signifikante Unterschiede zu der Kontrollgruppe *Formalin nbf*.

	Mittlerer Querschnitt	Mittlere kortikale Dicke	Mittlerer Radius	Flächenträgheitsmom.	Mittlere BMD
Formalin nbf					*
Ethanol	*	*	*	*	
Glutaraldehyd	*	*	*	*	

*Tabelle 4.3: Ergebnisse der Anova für die Kontrollgruppe Formalin bf, * = $p < 0,05$.*

Die Kontrollgruppe *Formalin nbf* war in allen Bereichen signifikant verschieden zu den Kontrollgruppen *Ethanol* und *Glutaraldehyd*, während es zwischen diesen beiden letztgenannten Gruppen in keinem Bereich einen signifikanten Unterschied gab.

4.2 Ergebnisse der biomechanischen Testung

4.2.1 Kraft-Weg-Diagramme

Zum besseren Überblick wurden die Kraft-Weg-Diagramme nachstehend für die einzelnen Versuchsgruppen zusammengefasst und kumuliert dargestellt. Erste Vergleichsmöglichkeiten der Auswirkung der Konservierung bietet die Gegenüberstellung der jeweils frischen und konservierten Femora einer Gruppe.

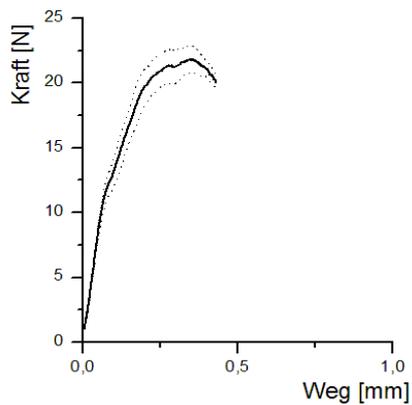


Abbildung 4.1: Gruppe Frozen. A: Kumulierte Darstellung der unbehandelten Femora mit Konfidenzintervall.

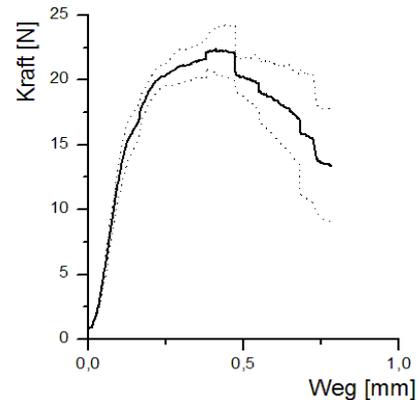


Abbildung 4.1 B: Kumulierte Darstellung der Graphen der gefrorenen Femora. Das Konfidenzintervall ist gepunktet dargestellt.

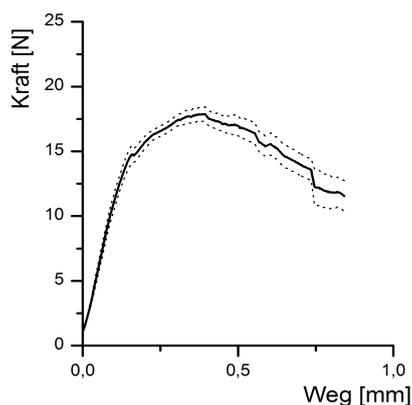


Abbildung 4.2: Gruppe Formalin. A: Kumulierte Darstellung der Graphen der Kontrollgruppe mit Konfidenzintervall.

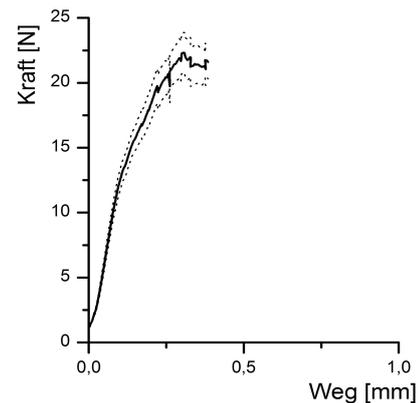


Abbildung 4.2 B: Kumulierte Darstellung der Kraft-Weg-Diagramme der konservierten Femora der Gruppe Formalin.

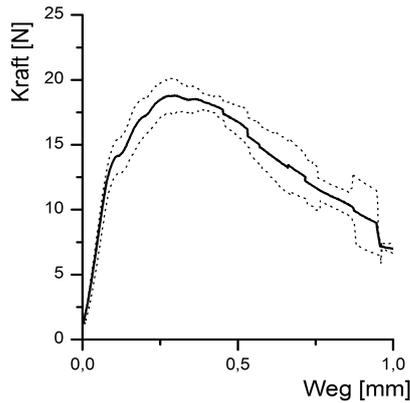


Abbildung 4.3: Gruppe Formalin nbf. A: Kontrolle: Kumulierte Darstellung der Graphen mit Konfidenzintervall.

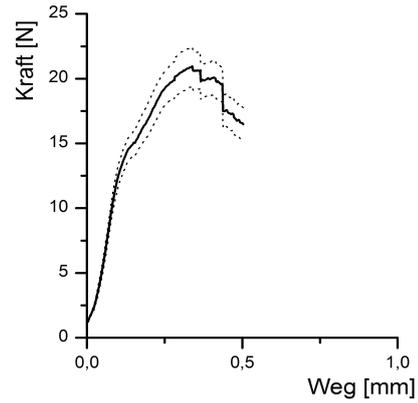


Abbildung 4.3 B: Formalin nbf Konserviert. Kumulierte Darstellung der aufgezeichneten Kraft-Weg-Diagramme.

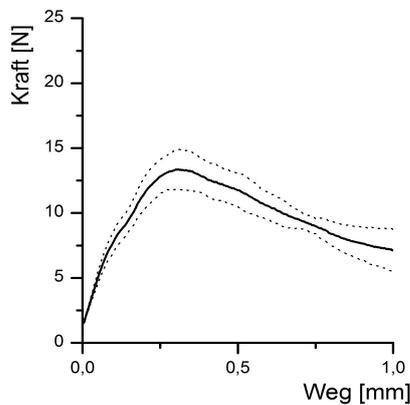


Abbildung 4.4: Gruppe Ethanol. A: Kontrollgruppe; Kumulierte Darstellung der Kraft-Weg-Diagramme.

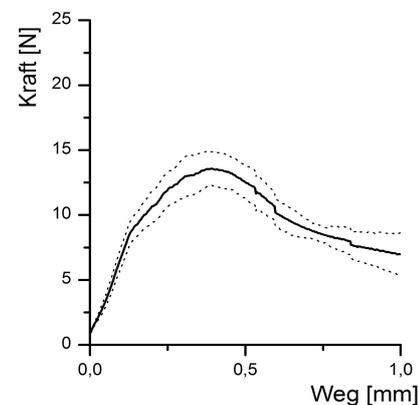


Abbildung 4.4 B: Ethanol Konserviert; Kumulierte Darstellung der Graphen einschließlich Konfidenzintervall.

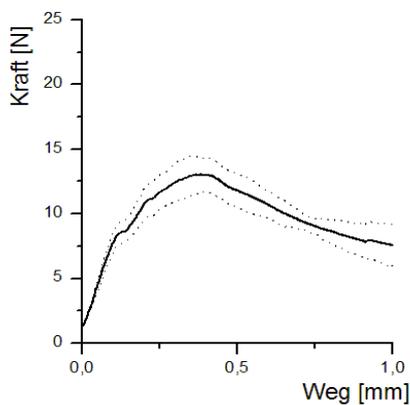


Abbildung 4.5 Gruppe Glutaraldehyd. A: Darstellung der kumulierten Graphen der Kontrollgruppe.

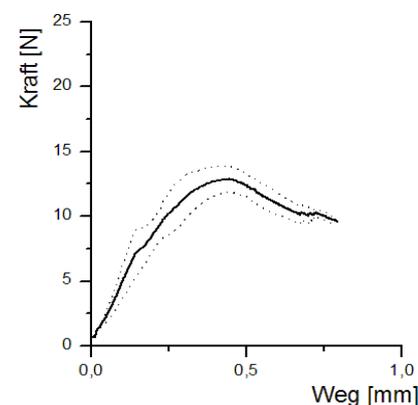


Abbildung 4.5 B: Konserviert mit Glutaraldehyd. Darstellung der kumulierten Graphen mit Konfidenzintervall.

4.3 Einfluss der Konservierung

4.3.1 Auswirkung der Konservierung auf die Bruchlast

Die Auswirkung der unterschiedlichen Konservierungsmethoden auf die Bruchlast stellt sich wie folgt dar.

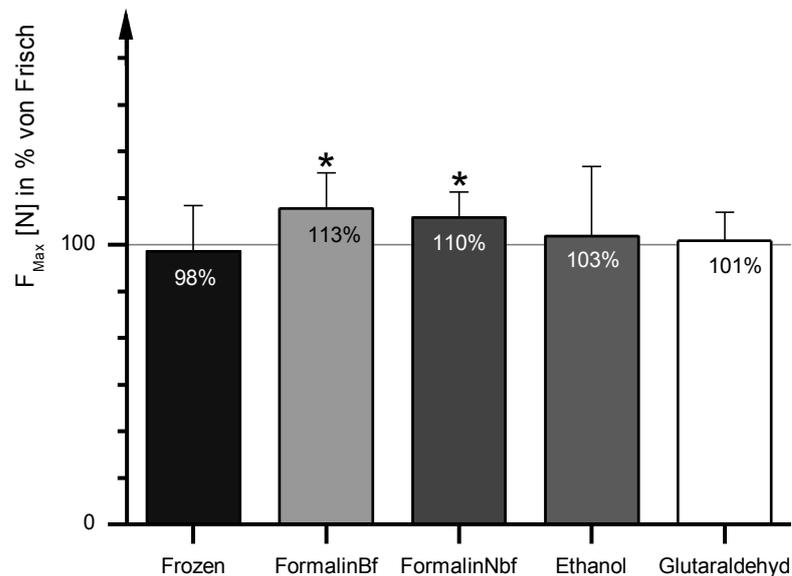


Abbildung 4.7: Auswirkung der Konservierung auf die Bruchlast.

Signifikante Erhöhungen der Bruchlast finden sich bei Konservierung mit sowohl gepuffertem als auch ungepuffertem Formalin. Das Gefrieren der Knochen führt zu einer Reduktion, Konservierung mit Ethanol oder Glutaraldehyd zu einer geringfügigen Steigerung der Maximalkraft. Diese Veränderungen erwiesen sich als nicht signifikant.

4.3.2 Auswirkung der Konservierung auf die maximale Durchbiegung

Sowohl die Konservierung mit gepuffertem Formalin als auch die Konservierung mit Ethanol wirkten signifikant auf die maximale Durchbiegung der Mäusefemora. Durch gepuffertes Formalin wurde die maximale Durchbiegung reduziert. Interessanterweise führte dagegen die Konservierung mit ungepuffertem Formalin zu einer deutlich erhöhten maximalen Durchbiegung, die sich jedoch als nicht signifikant erwies. Ebenfalls nicht signifikant erhöhend wirkten sich die Konservierung mit Ethanol und Glutaraldehyd sowie das Gefrieren aus.

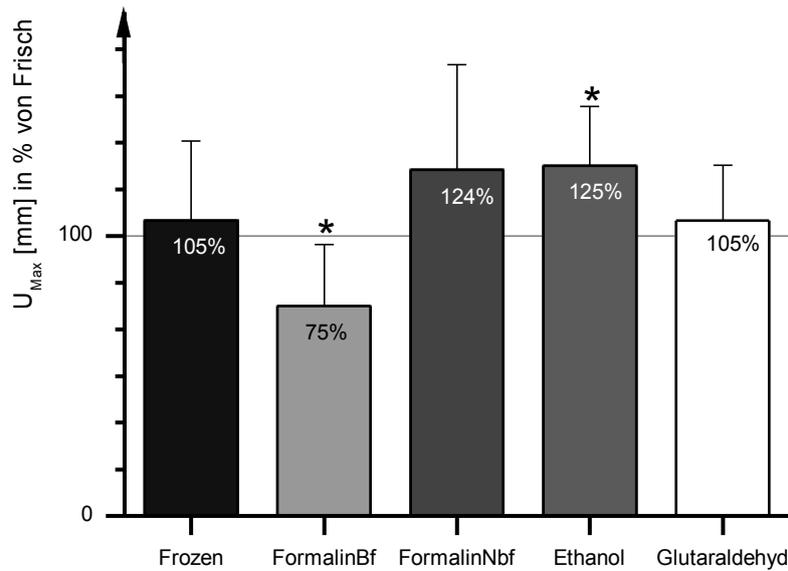


Abbildung 4.8: Auswirkung der Konservierung auf die maximale Durchbiegung.

4.3.3 Auswirkung der Konservierung auf die Steifigkeit

Durch die Konservierung mit gepuffertem Formalin kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Steifigkeit. Nicht signifikant waren dagegen die geringfügige Verminderung der

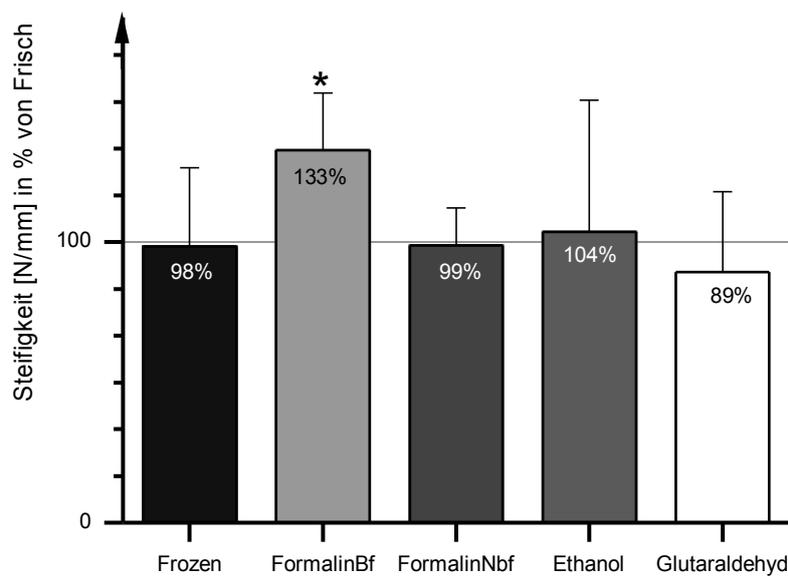


Abbildung 4.9: Auswirkung der Konservierung auf die Steifigkeit von Knochen.

Steifigkeit durch Gefrieren, Konservierung mit ungepuffertem Formalin und Konservierung mit Glutaraldehyd, sowie die Erhöhung derselben durch die Konservierung mit Ethanol.

4.3.4 Auswirkung der Konservierung auf den E-Modul

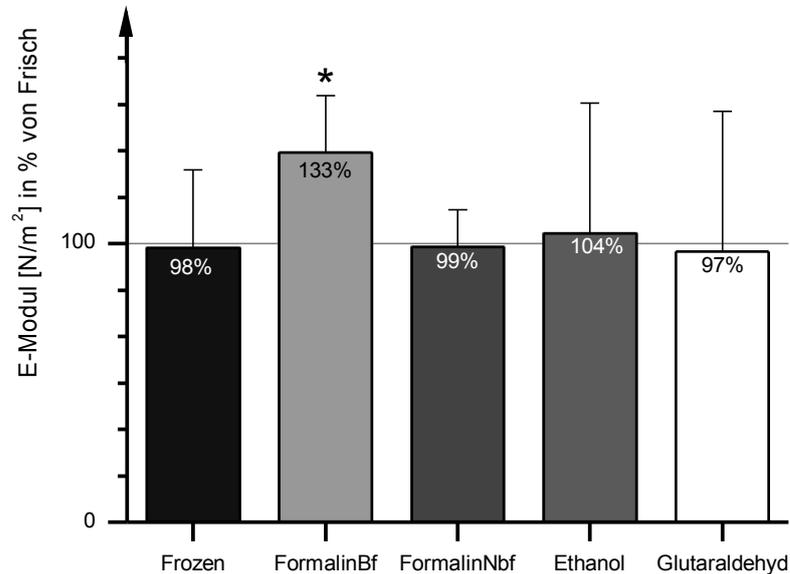


Abbildung 4.10: Auswirkung der Konservierung auf den Elastizitätsmodul.

Auf den Elastizitätsmodul der Mäusefemora wirkte sich die Konservierung mit gepuffertem Formalin signifikant erhöhend aus. Die leichten Reduktionen des Elastizitätsmoduls durch Gefrieren, ungepuffertes Formalin und Glutaraldehyd erwiesen sich als ebenso wenig signifikant wie die leichte Erhöhung durch Konservierung mit Ethanol.

4.3.5 Auswirkung der Konservierung auf die Zugspannung

Sowohl die Konservierung mit gepuffertem als auch mit ungepuffertem Formalin führte zu einer signifikanten Erhöhung der Zugspannung. Auch die Konservierung mit Ethanol und Glutaraldehyd wirkte sich leicht, jedoch nicht signifikant erhöhend aus, wohingegen es durch das Gefrieren zu einer nichtsignifikanten Verringerung der Zugspannung kam.

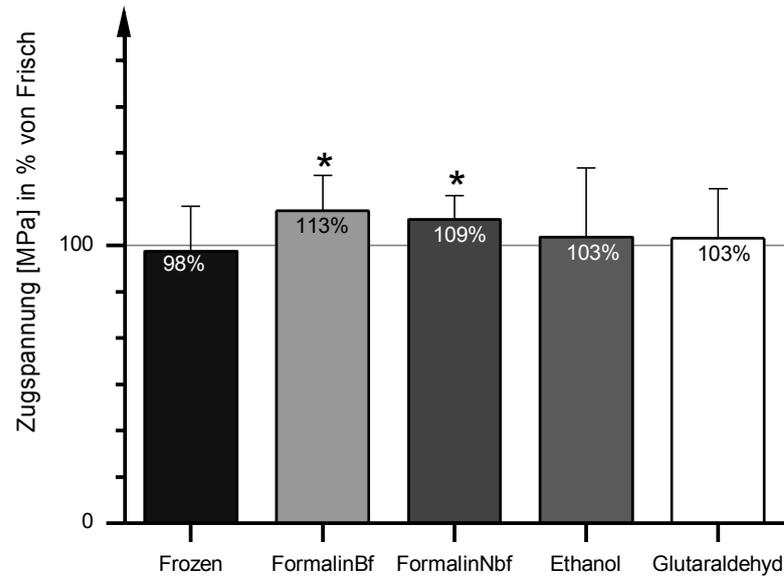


Abbildung 4.11: Auswirkung der ausgewählten Konservierungsmethoden auf die Zugspannung.

4.3.6 Auswirkung der Konservierung auf die Energieabsorption (Work-to-failure)

Durch die Konservierung mit gepuffertem Formalin wurde die Work-to-failure als Maß der Energieabsorption des Knochens signifikant verringert. Die Erhöhungen der Work-to-failure durch Gefrieren, die Fixierung mit ungepuffertem Formalin sowie die Konservierung mit

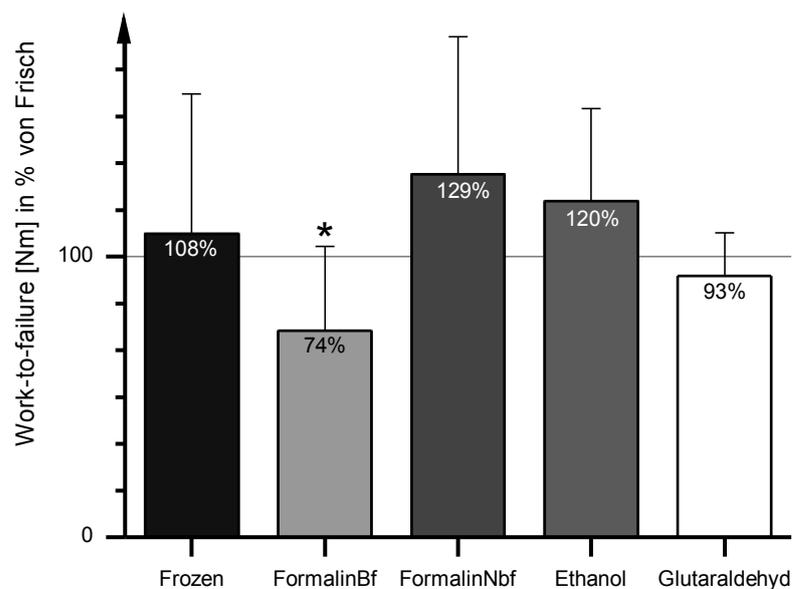


Abbildung 4.12: Auswirkung der Konservierung auf die Energieabsorption (Work-to-failure).

Ethanol erwies sich ebenso wenig als signifikant, wie die leichte Verminderung bei der Verwendung von Glutaraldehyd als Fixativ.

5 Diskussion

5.1 Eignung des Gefrierens zur Konservierung von Mäuseknochen

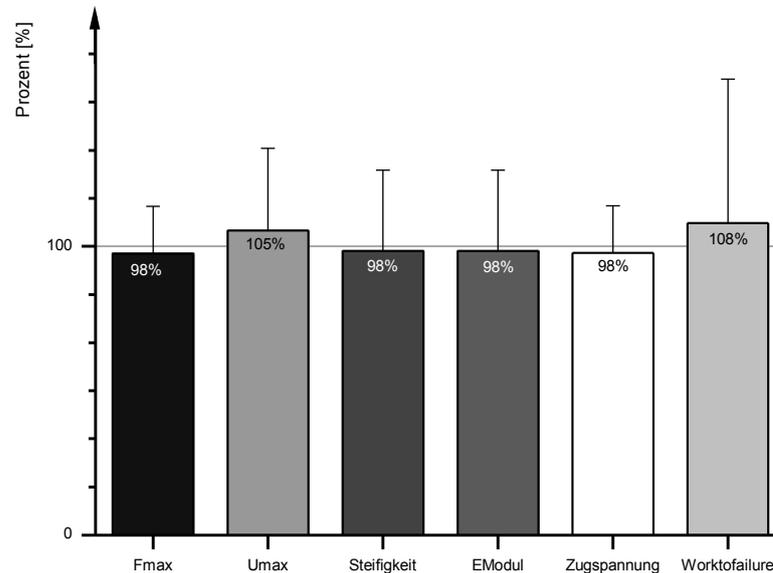


Abbildung 5.1: Auswirkungen des Gefrierens auf die unterschiedlichen überprüften mechanischen Parameter des Mäusefemurs.

Es ergaben sich geringfügige Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe, die jedoch durchweg nicht signifikant waren. Diese Ergebnisse stimmen mit dem Großteil der vorangegangenen Studien zum Gefrieren bei -20°C überein. Sedlin (Sedlin 1965) kommt bei seiner Biegung von Kortikalis aus dem menschlichen Femur ebenfalls zu dem Ergebnis, dass es durch Gefrieren zu keinen Veränderungen der biomechanischen Eigenschaften kommt. Weaver (Weaver 1966) testete die Auswirkung von Gefrieren auf die Knochenhärte und fand ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Pelker und Kollegen (Pelker et al. 1984) stellten nach zweiwöchigem Gefrieren keine Veränderung der mechanischen Eigenschaften von Rattenfemora im Torsionstest fest, wohl aber einen signifikanten Anstieg von Bruchlast und Elastizitätsmodul bei der Kompression von Wirbelkörpern. Roe und Kollegen (Roe et al. 1988) untersuchten Hundefemora und stellten nach einwöchigem Gefrieren einen Anstieg der Bruchlast in Kompression fest, der sich aber nach längerem Gefrieren wieder normalisierte. Goh und Kollegen (Goh et al. 1989), Linde und Sørensen (Linde und Sørensen 1993) sowie Borchers und Kollegen (Borchers et al. 1995) stellten bei unterschiedlichen Versuchsaufbauten, die auch Gefrier- und Tauzyklen einschlossen, keine Veränderungen durch

Gefrieren fest. Das Langzeitgefrieren in Kochsalzlösung hatte nach Griffon und Kollegen (Griffon et al. 1995) einen steigernden Einfluss auf die Toughness von Hundeknochen im Biegetest. Keinen Einfluss fanden dagegen Huss und Kollegen (Huss et al. 1995) beim Pin-Pullout an der Femur-Diaphyse des Hundes, Kang und Kollegen (Kang et al 1997) bei Indention von spongiösem Knochen des Rindes sowie Nazarian und Kollegen (Nazarian et al. 2009) bei der 4-Punkt-Biegung von Mäusefemora und der Kompression von Mäusewirbelkörpern.

Alle neueren Untersuchungen kommen übereinstimmend mit den von uns ermittelten Daten zu dem Ergebnis, dass Gefrieren eine geeignete Methode der Konservierung vor biomechanischer Testung darstellt.

Nachteilig ist jedoch die teure Anschaffung und Wartung von Gefrierschränken und deren Platzbedarf. Des weiteren werden beim Gefrieren keine pathogenen Keime abgetötet und so der Untersuchende nicht in gleicher Weise vor einer möglichen Kontamination geschützt wie bei der chemischen Konservierung.

5.2 Eignung der Fixierung mit Formaldehyd zur Konservierung von Mäuseknochen

5.2.1 Gepuffertes Formaldehyd

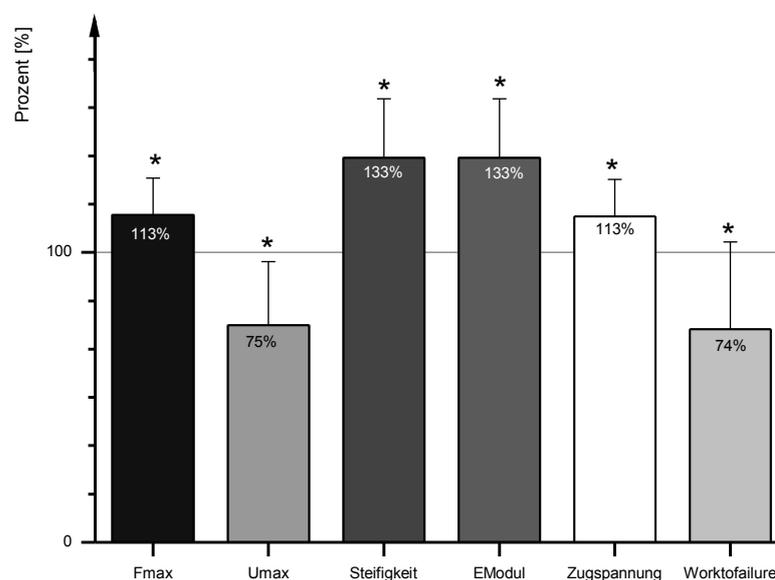


Abbildung 5.2: Auswirkung der Fixierung der Mäusefemora mit gepuffertem Formaldehyd im Vergleich mit der frischen Kontrollgruppe.

Die Fixierung mit gepuffertem Formaldehyd wirkte sich in allen Bereichen signifikant auf die biomechanischen Eigenschaften des Knochens aus. Es kam zu signifikanten Erhöhungen in den Bereichen Bruchlast, Steifigkeit, Elastizitätsmodul und Zugspannung. Aufgrund der proteinvernetzenden Wirkung des Formalins war mit einer Aufhärtung des Gewebes und damit mit einer Erhöhung seiner Steifigkeit zu rechnen. Folgerichtig erscheint daher eine Reduktion der maximalen Durchbiegung in Verbindung mit einer Erhöhung der Steifigkeit. Da die Steifigkeit in die Berechnung des Elastizitätsmoduls einfließt (Turner und Burr 1993), kam es folgerichtig auch zu dessen Erhöhung. Die Erhöhung der Bruchlast wies auf eine größere Stärke des Materials hin, die Energieabsorption (Work-to-failure) war jedoch reduziert. Die Fläche unter der steiler verlaufenden Kurve war trotz der höheren Maximalkraft kleiner, das Material war weniger elastisch und konnte bis zum Bruch weniger Energie aufnehmen. In die Berechnung der Zugspannung beim Versagen (Kummer 2008, Turner und Burr 1993) fließt die Bruchlast mit ein und bedingte somit eine Erhöhung derselben.

Im Vergleich mit bisherigen Untersuchungen zeigt sich bei den Versuchen von Greenberg und Kollegen (Greenberg et al. 1968) und Goh und Kollegen (Goh et al. 1989) ein vergleichbares Ergebnis. Eine Woche Konservierung mit 10%-igem Formalin führte laut Greenberg und Kollegen bei der Drei-Punkt-Biegung von Hunde-Tibia zu einer Erhöhung der Steifigkeit, die sich jedoch als nicht signifikant herausstellte. Goh und Kollegen untersuchten Katzenhumeri und –femora in Torsion und Vier-Punkt-Biegung nach Fixierung über drei respektive 21 Tage und fanden eine signifikante Verminderung der Work-to-failure und Erhöhung der Sprödigkeit. Weaver (Weaver 1966) maß nach 24-stündiger Konservierung eine größere Härte der menschlichen Kortikalis. Sedlin und Hirsch (Sedlin und Hirsch 1966), die ebenfalls menschliche Kortikalis untersuchten fanden im Zugversuch keine veränderten biomechanischen Parameter nach dreiwöchiger Konservierung mit 10%-igem Formalin. Edmondston und Kollegen (Edmondston et al. 1994) hingegen ermittelten nach vierwöchiger Konservierung von Schafwirbelsegmenten eine signifikante Erhöhung der Maximalkraft. Öhman et al. (Öhman et al. 2008) sahen bei der Konservierung von menschlicher Kortikalis über 48 Stunden, vier und acht Wochen eine zeitabhängige Veränderung der biomechanischen Eigenschaften. Kurzzeitige Konservierung bis zu vier Wochen führte zu keinen signifikanten Veränderungen, nach Verdopplung der Konservierungszeit zeigte sich allerdings im Kompressionstest eine signifikante Erhöhung der Bruchlast bei reduziertem Elastizitätsmodul. Wingerter und Kollegen (Wingerter et al. 2006) fixierten Rattenfemora über ein Jahr und fanden, unabhängig davon, ob die Knochen im Anschluss gewässert wurden oder nicht, eine signifikante Verminderung der Bruchspannung als Maß der inneren Stärke des Knochens.

McElhany (McElhaney et al. 1964) untersuchte konservierte Rinderknochen auf Zug und Kompression und notierte eine signifikant verminderte Bruchlast. Dahingegen kamen Nazarian und Kollegen (Nazarian et al. 2009) zu dem Ergebnis, dass sich die Konservierung mit 10%-igem gepuffertem Formalin lediglich auf die Viskoelastizität des Knochens auswirkt. Der Vergleich von Mäusefemora und -wirbeln nach zweiwöchiger Konservierung mit ihrer Kontrollgruppe ergab im Kompressions- und Vier-Punkt-Biegeversuch eine signifikante Verminderung des Verlustmoduls. Insgesamt kommen nur Sedlin und Hirsch zu dem Ergebnis, dass Formalin keinen Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften von Knochen hat. Sowohl die Dauer der Konservierung, die Wahl des Knochens als auch die Versuchsaufbauten waren sehr unterschiedlich und somit für einen direkten Vergleich miteinander oder mit unserem Versuchsaufbau kaum geeignet.

Geht man von den grundlegenden proteinvernetzenden Eigenschaften des Formalins aus, scheint sich im Einklang mit unseren Ergebnissen der Einsatz als längerfristiges Konservierungsmittel vor biomechanischer Testung auszuschließen. Kürzere Konservierung wird möglicherweise geringeren Einfluss nehmen, was aufgrund der gleichzeitigen desinfizierenden Wirkung analog mit Nazarian und Kollegen (Nazarian et al. 2009) und Öhman und Kollegen (Öhmann et al. 2008) ihren Einsatz rechtfertigt. Ebenso wäre eine Konservierung mit Formalin möglich, wenn verschiedene, gleichartig fixierte Gruppen miteinander verglichen werden sollen (Turner und Burr 1993).

5.2.2 Ungepuffertes Formaldehyd

Wie in Abbildung 5.3 dargestellt zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Bruchlast und der Zugspannung. Da die Zugspannung rechnerisch von der Bruchlast abhängt, war diese Beziehung nachzuvollziehen. Die Erhöhung der maximalen Durchbiegung um 24 Prozent stellte sich als nicht signifikant heraus. Der Elastizitätsmodul und die Steifigkeit zeigten sich nahezu unverändert. Die Work-to-failure war erhöht, der konservierte Knochen konnte dementsprechend vor dem Bruch mehr Energie aufnehmen, was sich in der höheren Bruchlast und der größeren maximalen Durchbiegung widerspiegelte. Vor dem Versuch, wurde angenommen, dass es durch die Bildung von Methansäure zu einem Herauslösen von Mineralien aus dem Knochen kommen könnte (Lang 2006, Martin und Sharkey 2003). Der Mineralgehalt des Knochens ist entscheidend für dessen Stärke und Steifigkeit, aber auch für dessen Sprödigkeit (Burr 2002). Eine vergrößerte Energieabsorption und maximale Durchbiegung waren Hinweise auf eine Verminderung der Sprödigkeit des Knochens. Demgegenüber steht die durch Formalin bedingte Proteinvernetzung, die sich größtenteils auf

die Festigkeit des Kollagenetzes in der Knochenmatrix auswirken müsste. Kollagen wiederum bestimmt die Duktilität und Zugfestigkeit des Knochens (Wang et al. 2001), was sich in der erhöhten Zugspannung widerspiegeln könnte.

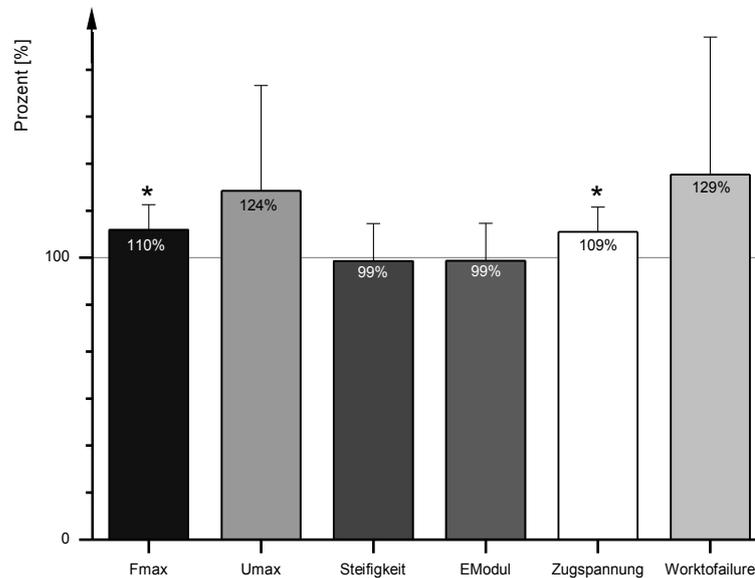


Abbildung 5.3: Auswirkung der Konservierung mit ungepuffertem Formalin auf die biomechanischen Eigenschaften von Mäusefemora.

Zur Auswirkung der Konservierung von Knochen mit ungepuffertem Formalin liegen keine Studien vor. Da aber weder die Bildung von Methansäure noch das Ausmaß der Proteinvernetzung kalkulierbar sind, ist diese Methode für die Konservierung von Mäuseknochen nicht von Bedeutung.

5.3 Eignung der Fixierung mit Ethanol zur Konservierung von Mäuseknochen

In allen Bereichen fanden sich unterschiedlich starke Erhöhungen der mechanischen Parameter, als signifikant stellte sich jedoch nur die verstärkte maximale Durchbiegung heraus. Erwartet wurde eine durch Austrocknung und Proteinfällung erhöhte Steifigkeit (Lang 2006, Martin und Sharkey 2003), diese zeigte sich aber nahezu unbeeinflusst. Eine Rehydrierung der Knochen vor der biomechanischen Testung kann diesem Effekt entgegengewirkt haben. Sedlin (Sedlin 1965) stellte bei Konservierung mit 40%-igem Ethanol über fünf beziehungsweise zehn Tage eine signifikante Erhöhung des Elastizitätsmoduls fest. Linde und Sørensen (Linde und Sørensen 1993) fanden eine gesteigerte Hystereseenergie nach Konservierung über einen, zehn und hundert Tage in 70%-igem Ethanol. Smith (Smith 2009) kam bei der 3-Punkt-Biegung von Rinderkortikalis nach neunwöchiger Konservierung

zu dem Ergebnis, dass sich die biomechanischen Eigenschaften nicht veränderten. Ashman (Ashman 1984) schloss dasselbe aus seiner Ultraschalluntersuchung von in 50%-igem Ethanol konservierter Kortikalis. Die Ethanolkonzentrationen unterscheiden sich zwischen allen Studien ebenso wie die Versuchsaufbauten und die verwendeten Knochen. Sedlin kam zu dem Schluss, dass 40%-iges Ethanol wenig effektiv bezüglich seiner konservierenden Eigenschaften war. Die vergleichsweise niedrige Konzentration mag hierfür ausschlaggebend gewesen sein.

Da Ethanol aufgrund seines neutralen pH-Wertes keinen Einfluss auf den Mineralgehalt des Knochens nimmt und gleichzeitig desinfizierend wirkt, ist seine Verwendung als

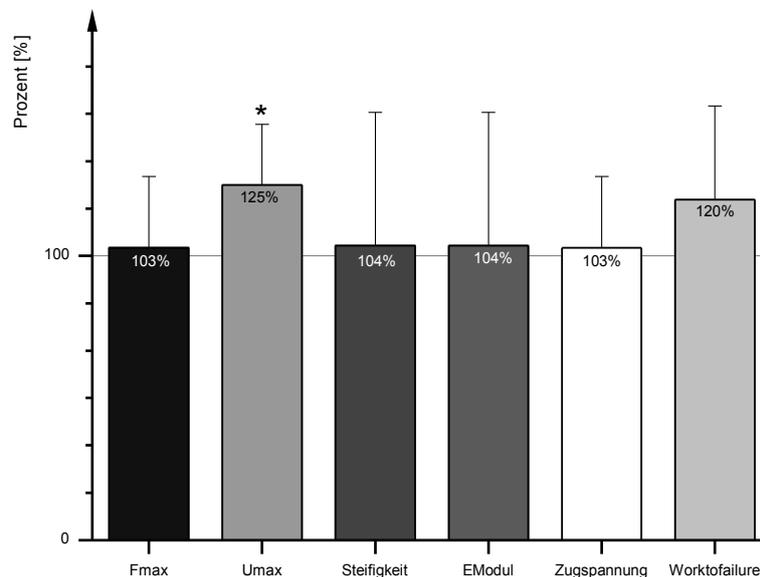


Abbildung 5.4: Auswirkung der Konservierung mit Ethanol auf die biomechanischen Eigenschaften der Mäusefemora

Konservierungsmittel von Knochen in Erwägung zu ziehen, vorausgesetzt der Knochen wird nach der Konservierung vollständig rehydriert. Der Einfluss auf die biomechanischen Eigenschaften ist jedoch größer als der des Gefrierens und im Bereich der maximalen Durchbiegung sogar signifikant erhöht.

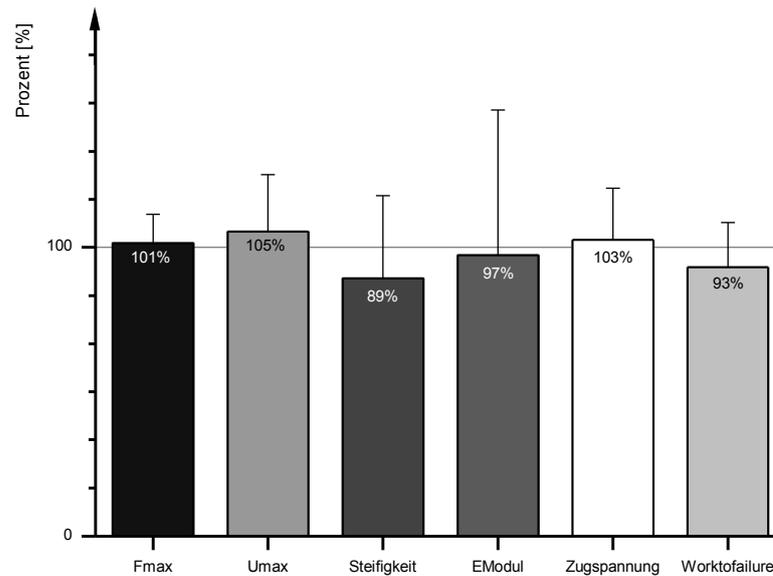
5.4 Eignung der Fixierung mit Glutaraldehyd zur Konservierung von Mäuseknochen

Abbildung 5.5: Vergleich der mit Glutaraldehyd konservierten Femora mit ihrer Kontrollgruppe

Wie eingehend geschildert ist die Fixierung mit Glutaraldehyd kein Standardverfahren vor biomechanischer Testung von Knochen, eine vergleichende Einordnung ist somit nicht möglich.

Die Untersuchungsergebnisse zeigten im Vergleich mit den frischen Femora nur geringfügige nicht signifikante Veränderungen der gemessenen Parameter. Demnach scheint Glutaraldehyd in 5%-iger Konzentration als Konservierungsmittel geeignet zu sein. Daneben hat es zusätzlich zu seinen konservierenden auch desinfizierende Eigenschaften. Die empfohlene maximale Kantenlänge von 3 mm (Lang 2006) wird bei der Verwendung von Mäusefemora nicht erreicht, die Unterlegenheit gegenüber Formalin bezüglich der Durchdringungszeit wird also aufgrund der kleinen Größe der getesteten Knochen irrelevant sein.

Bevor eine sichere Empfehlung bezüglich eines für diesen Anwendungsbereich untypischen Konservierungsmittels wie Glutaraldehyd ausgesprochen wird, sollten weitere Untersuchungen die Resultate bestätigen, da aufgrund der kleinen Gruppengröße von nur zehn getesteten Mäusen pro Gruppe, lediglich eine Tendenz wiedergegeben werden kann.

5.5 Fehlerbetrachtung

5.5.1 Versuchsaufbau

Eine Gruppengröße von zehn Mäusen liefert eine überschaubare relativ kleine Datenmenge, insofern ist die bei der Überprüfung der Normalverteilung in vielen Bereichen beobachtete weite Streuung der Daten wahrscheinlich. Für die kleine Gruppengröße spricht, dass dennoch Signifikanzen festgestellt werden konnten, durch Aquirse größerer Datenmengen bei größeren Untersuchungsgruppen ließe sich vermutlich eine sicherere Aussage bezüglich der Auswirkung der verschiedenen Konservierungsmethoden treffen.

Die Untersuchungen fanden in zwei Etappen im Abstand von anderthalb Jahren statt, aus logistischen Gründen wurden nicht exakt gleiche Mäuse verwendet. Um einen Vergleich der Gruppen dennoch zu ermöglichen, wurde jeweils mit der frischen Gegenseite verglichen, die zur Hälfte aus dem rechten und dem linken Femur bestand. Es wurde vorausgesetzt, dass beide Femora einer Maus bezüglich ihrer Morphometrie gleich sind (Bonnick et al. 1996), vermessen wurde jeweils nur der frische Femur. Dieses Vorgehen birgt einige mögliche Probleme. Zum einen wurde die Übereinstimmung der Morphometrie beider Femora nicht zusätzlich an dem gewählten Mausstamm überprüft. Zum anderen wurden die frischen Femora zur Durchführung des μ CT-Scans in Agarosegel eingebettet. Agarosegel wird zur Verflüssigung erhitzt und schmilzt zwischen 65°C und 95°C. Es bleibt auch bei sinkender Temperatur gießfähig bis es zwischen 25°C und 35°C geliert (Armisen und Galatas 2005). Die Temperatur zum Zeitpunkt des Gießens wurde nicht überprüft, daher ist nicht auszuschließen, dass die Knochen kurzzeitig Temperaturen von 65°C oder mehr ausgesetzt waren, was einen Einfluss auf das Kollagen gehabt haben könnte. Eine mögliche Denaturierung hätte Auswirkungen auf die biomechanische Kompetenz des ganzen Knochens gehabt.

Der anderthalbjährige Abstand zwischen den Versuchsetappen bedingte die biomechanische Testung zu verschiedenen Jahreszeiten. Da die Versuche bei Raumtemperatur in nicht klimatisierten Räumen durchgeführt wurden, war eine gleichmäßige Umgebungstemperatur, wie von Turner (Turner und Burr 1993) gefordert, unwahrscheinlich.

5.5.2 Konservierung

Die Konservierungsmethoden wurden entsprechend der aus der Literatur entnommenen Empfehlungen (Lang 2006, Martin und Sharkey 2003, Zimmermann und Schaffner 2005) angewendet. Lediglich auf die anfängliche Kühlung bei der Verwendung von Glutaraldehyd

und Ethanol wurde verzichtet, die Ergebnisse erscheinen für diese Verfahren jedoch recht überzeugend, es wird daher eine ausreichende Konservierung auch ohne Kühlung vorausgesetzt.

Als übliche Rehydrierungszeit werden drei Stunden empfohlen (Greenberg 1993), diese wurde von uns unterschritten, was Auswirkungen auf die Mechanik des Knochens insbesondere bei der Verwendung von Ethanol gehabt haben könnte. Dennoch zeigte sich die Steifigkeit nach der Konservierung als nahezu unbeeinflusst, was für die verwendete Methode sprechen könnte. Auch andere Forschungsgruppen (z.B. Nazarian et al. 2009) rehydrierten nur über dreißig Minuten.

5.5.3 Biegetest

Ein Auftreten von Scherkräften bei der Drei-Punkt-Biegung ist wahrscheinlich, die gemessene maximale Durchbiegung erscheint durch Einlagerung des Prüfkopfes in die Knochenoberfläche zu hoch. Es kommt in der Folge zu fehlerhaften Werten für das Elastizitätsmodul und die Steifigkeit, die sich bei unserem Versuchsaufbau aus den über die Prüfmaschine ermittelten Werte berechneten. Eine sichere Methode der Messung der maximalen Durchbiegung bietet die direkte Widerstandsmessung am Knochen über entsprechende Apparaturen (Turner und Burr 1993). Da es bei der Auswertung des vorliegenden Versuchsaufbaus um die Gegenüberstellung relativer Messwerte ging und der Standard der biomechanischen Prüfung für alle Gruppen derselbe war, sollte dies als unbedeutend bewertet werden.

5.5.4 Fazit

Ein immanenter Fehler besteht bei dem vorliegenden wie auch bei jedem anderen Versuchsaufbau dieser Art: aus einer ex-vivo-Testung werden Rückschlüsse auf ein dynamisches System gezogen. Konservierung verursacht eine weitere Verfälschung der Ergebnisse. Wie aber bereits eingangs geschildert, bedarf es solcher Versuche, um sich medizinischen oder pharmakologischen Fragestellung zu nähern und um gegebenenfalls geeignete in-vivo-Testungen entwickeln zu können. Der Annahme, dass auch in Zukunft ähnliche Versuchsaufbauten und auch eine Konservierung nicht umgangen werden können, entspringt die Motivation für diese Arbeit, ein Verfahren zu finden, das den Knochen möglichst wenig in seinen biomechanischen Eigenschaften kompromittiert.

Schlussfolgernd lassen sich einige interessante Tendenzen bezüglich der Konservierung von Knochen vor der biomechanischen Testung erkennen. Gefrieren bestätigt sich als gut

geeignete Methode, ähnlich geringen Einfluss scheint die Konservierung mit Glutaraldehyd zu haben.

Um diese Tendenzen zu belegen, sollten mit Berücksichtigung der identifizierten Probleme, weitere Untersuchungen folgen. Ebenso wäre es interessant herauszufinden, in welchem Umfang die Dauer der Konservierung Einfluss auf die biomechanische Kompetenz des Mäuseknochens nimmt.

Die Übertragbarkeit auf andere Mausmodelle sollte überprüft werden, das heißt, inwieweit sich die Konservierungsmethoden bei skelettal veränderten Mäusen auswirken bzw. inwiefern sich die Einflussnahme der Konservierung auf Knochen in anderen Versuchsaufbauten als der Drei-Punkt-Biegung auswirkt. Abweichende Ergebnisse bei der Fokussierung auf andere biomechanische Parameter wären vorstellbar und würden auch die teilweise sehr verschiedenen Ergebnisse bisheriger Untersuchungen zur Konservierung von Knochen erklären.

6 Zusammenfassung

Knochen wächst, wandelt sich und kann sich unter dem Einfluss verschiedener Faktoren funktionell anpassen. Erkrankungen des Knochens führen zu Beeinträchtigung dieser Eigenschaften, ihre Diagnostik und Behandlung muss an geeigneten Modellen erforscht werden. Seit der Sequenzierung ihres genetischen Codes spielen Mäuse eine zunehmend größere Rolle auf diesem Gebiet, die biomechanische Untersuchung ihrer kleinen Knochen erfordert jedoch besondere Sorgfalt. Nicht immer können Knochen sofort nach der Entnahme einer biomechanischen Testung zugeführt werden. Um den Gewebeerfall mit den Konsequenzen der Trocknung, Fäulnis oder Verwesung zu verhindern, muss auf konservierende Maßnahmen zurückgegriffen werden.

Anhand der Drei-Punkt-Biegung von Femora des C57/Bl6-Stammes wurden trockenes Gefrieren bei -20°C , Konservierung mit 3,7%-igem gepuffertem und ungepuffertem Formaldehyd, Konservierung mit 80%-igem Ethanol und Fixierung mit 5%-igem Glutaraldehyd in ihrer Eignung als Konservierungsmethoden über einen Zeitraum von jeweils sieben Wochen miteinander verglichen. Die Morphometrie per μCT floss zur Ermittlung intrinsischer Materialeigenschaften in den Versuchsaufbau mit ein, dabei wurden jeweils die Femora der frisch getesteten Kontrollgruppe gescannt. Direkt aus den aufgezeichneten Kraft-Weg-Diagrammen ermittelt wurden die Bruchlast, die maximale Durchbiegung, die Steifigkeit und die Work-to-failure. Im Zusammenhang mit den Daten aus der Morphometrie konnten zusätzlich der Elastizitätsmodul und die Zugspannung errechnet werden.

Gefrieren und Konservieren mit Glutaraldehyd wirkten sich nicht signifikant verändernd auf die biomechanischen Eigenschaften aus. Gepuffertes Formaldehyd führte zu signifikanten Erhöhungen von Bruchlast, Steifigkeit, Elastizitätsmodul und Zugspannung sowie zu signifikanten Verringerungen der maximalen Durchbiegung und der Work-to-failure. Ungepuffertes Formaldehyd wirkte signifikant erhöhend auf die Bruchlast und die Zugspannung, Ethanol auf die maximale Durchbiegung.

Aufgrund der weiten Streuung der Daten und der möglichen Einflussnahme bestimmter Unsicherheiten bei den Rahmenbedingungen, empfiehlt sich eine Wiederholung der Versuche unter Berücksichtigung und Ausschluss der identifizierten Fehlerquellen.

7 Abstract

Bone is able to grow, to remodel, and to adapt functionally under the influence of different factors. Bone disease limits the possibilities of adaption and functionality. Appropriate animal models help finding ways of diagnosis and treatment. The role of the mouse model has gained importance since the sequencing of its genetic code in 2002, but biomechanic testing of small bones requires special arrangements and carefulness. Committing fresh bone to biomechanic testing directly after removal can be considered ideal, due to logistic reasons this is not always possible. Tissue decline through drying or rotting must be prevented by applying different preservatives.

Using three-point-bending on C57/Bl6 femora after dry-freezing at -20°C, fixation with buffered and non-buffered 3,7% formaldehyde, 80% ethanol and 5% glutaraldehyde each applied for a period of seven weeks, the different methods were compared with each other hoping to find the ideal method which least altered the biomechanic competence of murine bone. Morphometric measurement of the fresh femora (control-group) by μ CT was included to find out intrinsic qualities. Maximum load, U_{max} , Stiffness and work-to-failure could be extracted directly from the recorded force-displacement-curves. Morphometric data enabled us to calculate modulus of elasticity and tension.

Dry-freezing and fixation with glutaraldehyd had no significant influence on the biomechanik properties of mouse bone. Buffered fomaldehyde led to significant increase of maximum load, stiffness, modulus of elasticity and tension as well as significant decrease of U_{max} and work-to-failure. Non-buffered formaldehyde significantly increased maximum load and tension, while ethanol significantly increased U_{max} .

Due to wide-spread data and a possibility of limiting influence of outer circumstances on the testing protocol, a repetition of the study is proposed respecting and eliminating the identified flaws.

8 Literaturangaben

- Armisen R, Galatas F (2005) Agar. In: Handbook of Hydrocolloids, GO Phillips, PA Williams (Hrg), Woodhead Publishing, Cambridge und CRC Press LLC, Boca Raton, FL, 21-41.
- Aerssens J, Boonen S, Lowet G, Dequeker J (1998) Interspecies differences in bone composition, density, and quality: potential implications for in vivo bone research. *Endocrinology*. 139(2):663-670
- Akhter MP, Cullen DM, Pan LC (2006) Bone Biomechanic Properties in EP4 Knockout Mice. *Calcif Tissue Int*. 78 (6): 357-662.
- Anderson C (1982) Manual for the Examination of Bone. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Ashman RB, Cowin SC, Van Buskirk WC, Rice JC (1984) A continuous wave technique for the measurement of the elastic properties of cortical bone. *J Biomech*, 17, 349-361.
- Austermann KH (2002) Frakturen des Gesichtsschädels. In: Spezielle Chirurgie. N. Schwenzer, M. Ehrenfeld, 3.Aufl., Bd.2 Zahn-Mund-Kieferheilkunde, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, 276-282.
- Barrett EJ und Barrett P (2005) The Parathyroid Glands and Vitamin D. Kap.51 in: Medical Physiology, WF Boron und EL Boulpaep (Hrsg.), Elsevier Saunders, USA, 1087-1092.
- Biltz RM und Pellegrino ED (1969) The Chemical Anatomy of Bone: I. A Comparative Study of Bone Composition in sixteen Vertebrates. *J Bone Joint Surg Am*.51: 456-466.
- Black J (1976) Dead or alive: the problem of in vitro tissue mechanics, *J Biomed Mat Res*, 10: 377.
- Black J (1984) Tissue properties: relationship of in vitro studies to in vivo behavior. In: Natural and Living Biomaterials, G.W. Hastings, , P. Ducheyne (Hrg.), Boca Raton, FL.: CRC Press, 5.
- Bonewald LF (2006) Mechanosensation & Transduction in Osteocytes. *Bonekey Osteovision* 3 (10): 7-15.
- Bonnick SL, Nichols DL, Sanborn CF, Payne SG, Moen SM, Heiss CJ (1996) Right and Left Proximal Femur Analyses: Is There a Need to do Both?. *Calcif Tissue Int*. 58: 307-310.
- Borchers RE, Gibson LJ, Burchardt H, Hayes, WC (1995) Effects of selected thermal variables on the mechanical properties of trabecular bone. *Biomaterials*. 16: 545.
- Brand RA (2010) Biographical Sketch Julius Wolf, 1836-1902. *Clin Orhtop Relat Res*. 468: 1047-1049.
- Breuer H (1990) Mechanik. In: dtv-Atlas zur Physik. Tafeln und Texte, 2.Aufl., Band 1: Mechanik, Akustik, Thermodynamik, Optik. Deutscher Taschenbuch Verlag, München, 26-76.
- Bright RW, Burchardt H (1983) The biomechanical Properties of preserved bone grafts. In *Osteochondral Allografts: Biology, Banking and clinical Applications*, G.E. Friedlaender, H.J. Mankin, H.J. K.W. Sell, (Hrg), Little, Brown, Boston, 241.
- Buckwalter JA, Glimcher MJ, Cooper RR und Recker R (1995) Bone Biology. *J Bone Joint Surg Am*. 77: 1276-1289.
- Burr DB (2002) The Contribution of the Organic Matrix to Bone's Material Properties, *Bone*. 31 (1): 8-11.
- Cowin SC (1997) The False premise in Wolff's law. *Forma*, 12: 247-262.

- Cowin SC (2002) Mechanosensation and fluid transport in living bone, *J Musculoskel Neuron Interact.* 2: 256-260.
- Cowin SC, Doty, SB (2006) Bone Tissue Adaption. In: *Tissue Mechanics*, 1. Aufl., Springer-Verlag, New York, 385-424.
- Currey JD (1988) The effects of drying and rewetting on some mechanical properties of cortical bone. *J Biomech.* 21(5): 439-441.
- Currey JD (2002) *Bones: Structure and Mechanics*, 2.Aufl., Princeton University Press, Princeton.
- Davisson MT, Linder CC (2004) Historical Foundations. In: *The Laboratory Mouse (Handbook of Experimental Analysis)*, H. Hedrich, G. Bullock (Hrg.), 1.Aufl., Elsevier, London, San Diego, 15-21.
- Dickson GR (1984) Chemical fixation and the preparation of Calcified Tissues for Transmission Electron Microscopy. In: *Methods of Calcified Tissue Preparation*, G.R. Dickson (Hrg), Elsevier, New York, 79-148.
- Duda GN, Haas NP, Bergmann G (2010) Founding of the Julius Wolff Institut Charité-Universitätsmedizin Berlin: Editorial Comment. *Clin Orhtop Relat Res.* 468: 1050-1051.
- Edmonston, SJ, Singer KP, Day RE, Breidahl PD, Price RI (1994) Formalin fixation effects on vertebral bone density and failure mechanics: an in-vitro study of human and sheep vertebrae, *Clin Biomech.* 9 (3): 175-179.
- Feng JQ, Ward ML, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, Yu X, Rauch F, Davis SI, Zhang S, Rios H, Drezner MK, Quarles LD, Bonewald LF, White KE (2002) Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet.* 38(11): 1310–1315.
- Fox MA, Whitesell JK (2004) Addition of Hydroxide Ion: The Cannizzaro Reaction and Hydride Transfer, Kap.12: Nucleophilic Addition and Substitution at Carbonyl Groups. In: *Organic Chemistry*, 3rd edition, Jones and Bartlett Publishers Inc, Sudbury, MA, 570-638.
- Frankel VH und Nordin M (2001) Biomechanics of Bone. In: *Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System*. VH Frankel und M Nordin (Hrg.) 3. Aufl., Lippincott Williams&Wilki, Baltimore, Philadelphia, USA, 26-59.
- Gere, JM, Timoshenko S (1984) Stresses in Beams. In: *Mechanics of Materials*, Kapitel 5, 4. Auflage, PWS-Kent, Boston.
- Gerthsen C und Meschede D (2003) *Gerthsen Physik*, 22. Aufl., Springer, Berlin.
- Goh JC, Ang EJ, Bose K. (1989) Effect of preservation medium on the mechanical properties of cat bones. *Acta Orthop. Scand.*, 60 (4): 465-467.
- Götzen N (2006) Integrated phenotypical characterization of the murine skeleton. Dissertation. Technische Universität Hamburg-Harburg.
- Gray H (1918) Osteology -Bone. In: *Anatomy of the human body* [Online im Internet.] URL: <http://bartleby.com/107/> [Stand: 31.10.2010].
- Greenberg AR, Luttges MW (1993) Effects of Rehydration State on the Flexural Properties of Whole Mouse Long Bones. *J. Biomech. Eng.*, 115 (4A): 447-450.
- Greenberg SW, Gonzales D, Gordjian ES, Thomas LM (1968) Changes in physical properties of bone between the in vivo, freshly dead and embalmed conditions. *The Twelfth Stapp Car Crash Conference Proceedings*, Society of Automotive Engineers, New York, 271.
- Griffon DJ, Wallace, LJ, Burchardt, H., Hayes, WC (1995) Effect of selected thermal variables on the mechanical properties of trabecular bone. *Biomaterials*, 16 (7): 545-551.

- Gross D, Hauger W, Schröder J, Wall WA (2009) Balkenbiegung. In: Technische Mechanik 2, 10. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 89-173.
- Gustafson MB, Martin RB, Gibson V, Storms DH, Stover SM, Gibeling J, Griffin L (1996) Calcium buffering is required to maintain bone stiffness in saline solution (technical note). *J Biomech*, 29 (9): 1191-4.
- Harten U (2006) Physik für Mediziner, 11. Aufl., Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- Huss BT, Anderson MA, Wagner-Mann CC, Payne JT (1995) Effects of temperature and storage time on pin pull-out testing in harvested canine femurs. *Am J Vet Res*, 56 (6): 715-719.
- Johannessen JV (1978) Electron Microscopy In Human Medicine. McGraw-Hill International Book Co., New York.
- Kang Q, Yuehwei H, Friedman RJ (1997) Effects of multiple freeze-thawing cycles on ultimate indentation load and stiffness of bovine cancellous bone. *Am J Vet Res*, 58 (10): 1171-3.
- Kaplan FS, Tabas JA, Gannon FH, Finkel G, Hahn GV und Zasloff MA (1993) The histopathology of fibrodysplasia ossificans progressiva. An endochondral process *J Bone Joint Surg Am*. 75: 220-230.
- Kugler P (2006) Zelle – Organ – Mensch, Bau, Funktion und Krankheiten. 1. Aufl., Elsevier GmbH, München.
- Kummer T (2008) Ein Modell zur Untersuchung der biomechanischen Funktion des kortikalen Knochens. Med. Dissertation, Universität Hamburg, UKE.
- Lane NE, Wei Y, Balooch M, Nalla RK, Balooch G, Habelitz S, Kinney JH, Bonewald, LF (2006) Glucocorticoid-treated mice have localised changes in trabecular bone material properties and osteocyte lacunar size that are not observed in placebo-treated or estrogen-deficient mice. *J bone min res*, 21(3): 466-76.
- Lang F und Murer H (2007) Kalzium- und Phosphathaushalt. In: Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie. R. F. Schmidt, U. Lang, M. Heckmann (Hrg.), 30. Aufl., Springer, Berlin, 741-752.
- Lang G (2006) Fixierung. In: Histotechnik: Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik, Springer, Wien, New York, 39-65.
- Linde F, Sørensen HCF (1993) The Effect of different storage methods on the mechanical properties of trabecular bone. *J Biomech*, Vol. 26(10): 1249-1252.
- Lippert H (1996) Lehrbuch Anatomie, 4. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore.
- Liu S, Zhou J, Tang W, Jiang X, Rowe DW, Quarles LD (2006) Pathogenetic role of Fgf23 in Hyp Mice. *Am J Endocrinol Met*, 291(1): E38-49.
- Löffler G (1996) Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. 3. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Martin RB, Sharkey NA (2003) Mechanical Effects of Postmortem Changes, Preservation, and Allograft Bone Treatments. In: *Bone Mechanics Handbook*, CRC Press, Abingdon.
- Martinko V (1985) Zur Abhängigkeit des Knochengewebes von mechanischen Einflüssen (Biomechanik des Knochengewebes), *J of Orofac Orth*, 46 (5): 343-351.
- Maurer B und Lehmann C (2006) Die Statik von Knochen. In: Karl Culmann und die graphische Statik. Zeichnen, die Sprache des Ingenieurs, 1. Aufl., Ernst & Sohn, Weinheim, 126-129.
- McElhaney J, Fogle J, Byars E, Weaver G (1964) Effect of embalming on the mechanical properties of beef bone. *J Appl Physiol* 19: 1234-1236.

- Meyer B (1997) Porträt: Mit ihm beginnt die eigenständige Orthopädie: Der Arzt Julius Wolff (1836-1902). Luisenstädtischer Bildungsverein e.V. [Online im Internet.] URL: <http://www.luise-berlin.de/bms/bmstxt97/9702pord.htm> [Stand: 31.10.2010].
- Mouse Genome Sequencing Consortium (2002) Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420: 520 – 561.
- Nazarian A, Hermansson BJ, Muller J, Zurakowski D, Snyder BD (2009) Effects of tissue preservation on murine bone mechanical properties. *J Biomechan*, 42: 82-86.
- Nesbitt SA, Horton MA (2002) Trafficking of Matrix Collagens Through Bone-Resorbing Osteoclasts. *Science*, 276 (5310), 266-269.
- O'Brien T, Woychik R (2002) Our small relative. *Nature Genetics* 33, 3-4.
- Öhman C, Dall'Ara E, Baleani M, Van Sint J, Serge, Viceconti M (2008) The effects of embalming using a 4% formalin solution on the compressive mechanical properties of human cortical bone. *Clin Biomech*, 23 (10): 1294-1298.
- Paigen K (2003) One Hundred Years of Mouse Genetics: An Intellectual History. I. The Classical Period (1902–1980). *Genetics*. 163: 1–7.
- Pauwels F (1965) *Gesammelte Abhandlungen zur funktionellen Anatomie des Bewegungsapparates*. Springer Verlag, Berlin.
- Pelker RR, Friedlaender GE, Markham TC, Panjabi MM, Moen CM (1984) Effects of freezing and freeze-drying on the mechanical properties of rat bone. *J Orthop Res*, 1 (4): 405-411.
- Roe SC, Pijanowski GJ, Johnson AL (1988) Biomechanical properties of canine cortical bone allografts: effects of preparation and storage. *Am J Vet Res*, 49 (6): 873-877.
- Rother UJ (2001) *Moderne Bildgebende Diagnostik in der Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde*. 1.Aufl., Urban und Fischer Verlag, München, Jena.
- Rowe PSN, de Zoysa PA., Dong, R, Wang HR, White KE, Econs MJ, Odet CL (2000) MEPE, a new gene expressed in bone marrow and tumors causing osteomalacia. *Genomics*, 67(1): 54-68.
- Schatz J, Tammer R (2007) *Erste Hilfe – Chemie und Physik für Mediziner*, Springer Medizin Verlag, Heidelberg.
- Schönau E, Fricke O (2006) Muskel und Knochen –eine funktionelle Einheit. *Deutsches Ärzteblatt*, 103 (50), A3414-9.
- Schumacher G-H (1997) *Anatomie für Zahnmediziner*, 3. Aufl., Karl F. Haug Fachbuchverlag, Stuttgart.
- Sedlin ED (1965) A. rheological model for cortical bone: A study of the physical properties of human femoral samples. *Acta Orthop Scand*, 83: 1-77.
- Sedlin ED, Hirsch C (1966) Factors affecting the determination of the physical properties of femoral cortical bone. *Acta Orthop. Scand.*, 37 (1): 29-48.
- SEER Training modules (2010) *Anatomy & Physiology*. US Nat. Inst. of Health, Nat. Cancer Inst. [Online im Internet.] URL: <http://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/tissue.html> [Stand: 31.10.2010].
- Smith NW (2009) The influence of ethanol conservation on the fracture toughness of bovine cortical bone. Master's thesis, Master of Science in Mechanical Engineering, Texas Tech University.
- Sonstegard DA, Matthews LS (1977) Mechanical property dependence on storage technique and locale of knee joint trabecular bone. *Trans Orthop Res Soc*, 2: 283.
- The Human Genome Project (Venter JC et al.) (2001), The Sequence of the Human Genome. *Science*. 291: 1304-1351.
- Turner CH, Burr DB (1993) *Basic Biomechanical Measurements of Bone: a Tutorial*.

- Bone, 14 (4): 595-608.
- Vashishth D (2008) Small Animal Bone Biomechanics. Bone, 43 (5): 794-797.
 - Völker B (2004) Biomechanik früher und heute. In: Biomechanik, Bewegungslehre, Leistungsphysiologie, Trainingslehre. A. Hüter-Becker, M. Dölken (Hrg.) 1.Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, 3-5.
 - Wang X, Athanasiou KA, Agrawal CM (1998) Contribution of collagen to bone mechanical properties. Biomed Eng Conf, 112.
 - Wang X, Bank RA, Tekoppele JM, Agrawal CM (2001) The role of collagen determining bone mechanical properties. J Orthop Res, 19 (6): 1021-26, 2001.
 - Weaver JK (1966) The microscopic hardness of bone. J Bone Joint Surg Am., 48: 273-288.
 - Wingerter S, Calvert G, Tucci M, Benghuzzi H, Russell G, Puckett A (2006) Mechanical Strength Repercussions of various fixative storage methods on bone. Rocky Mountain Bioengineering Symposium & International Biomedical Sciences Instrumentation Symposium, Terre Haute, Indiana.
 - Zimmermann A, Schaffner T (2005) Gebräuchliche Glutaraldehyd-Ansätze. Institut für Pathologie der Universität Bern, <http://www.pathology.unibe.ch/Diagn/fixation/glutar.htm>, [Stand: 10/2005].

9 Anhang: Box-and-Whiskers Diagramme

Anhand von Box-and-Whiskers Diagrammen wird nachstehend die Normalverteilung der Daten aufgezeichnet.

9.1 Normalverteilung der Daten bezüglich der Bruchlast

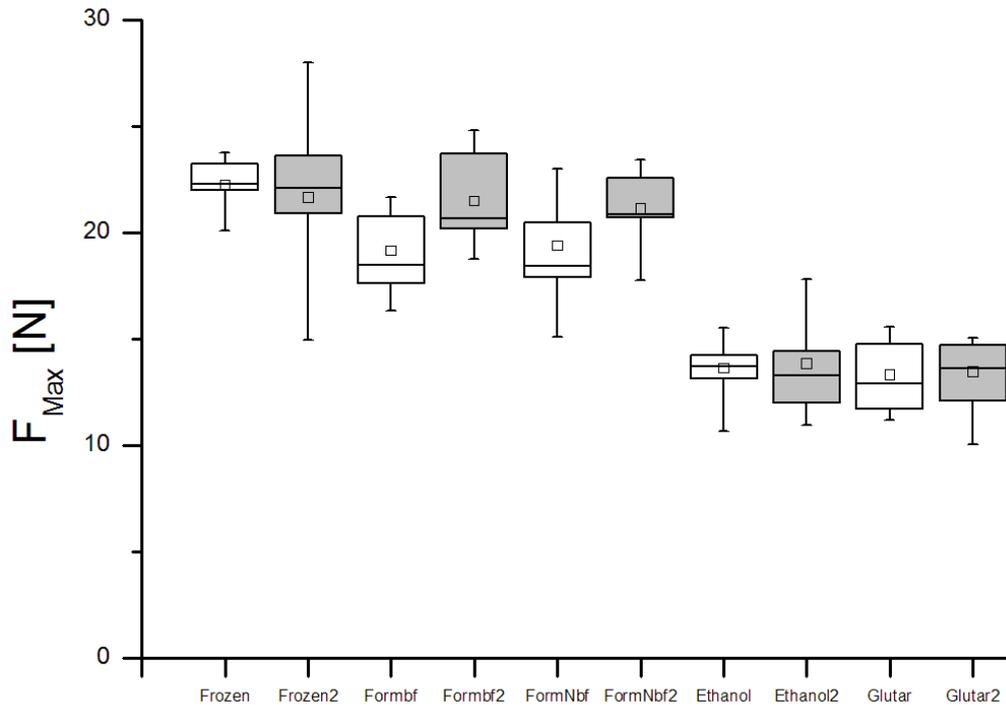


Abbildung 9.1: Normalverteilung bezüglich F_{Max} ; die hellen, jeweils linksstehenden Boxen stellen dabei die Vergleichsgruppen dar; die grau gefüllten Boxen zeigen die Normalverteilung der konservierten Gruppen. Betrachtet man nur die frischen Femora zeigt sich eine relativ moderate Streuung der ermittelten Daten. Zum Teil stellt sich eine leichte Linksverschiebung des Medians dar. Die Streuung der Daten der konservierten Gruppen ist sehr unterschiedlich. Die Gruppe Frozen 2 zeigt eine recht große Streuung, die sich jedoch überwiegend im Bereich der Extremwerte (Whiskers) widerspiegelt. Der Median liegt mittig. Die Daten der Gruppe Formalin bf 2 sind im Bereich des 25%- bis 75%-Quantils vergleichsweise stärker gestreut. Der Median ist nach links verschoben. Eine geringe Streuung aber extreme Linksverschiebung des Medians zeigt die Gruppe Formalin nbf 2. Auch hier spiegelt sich die Streuung der Daten überwiegend in den Extremwerten. Sowohl die Gruppe Ethanol 2 als auch die Gruppe Glutaraldehyd 2 weisen eine moderate Streuung mit zentral liegendem Median auf.

9.2 Normalverteilung der Daten bezüglich der maximalen Durchbiegung

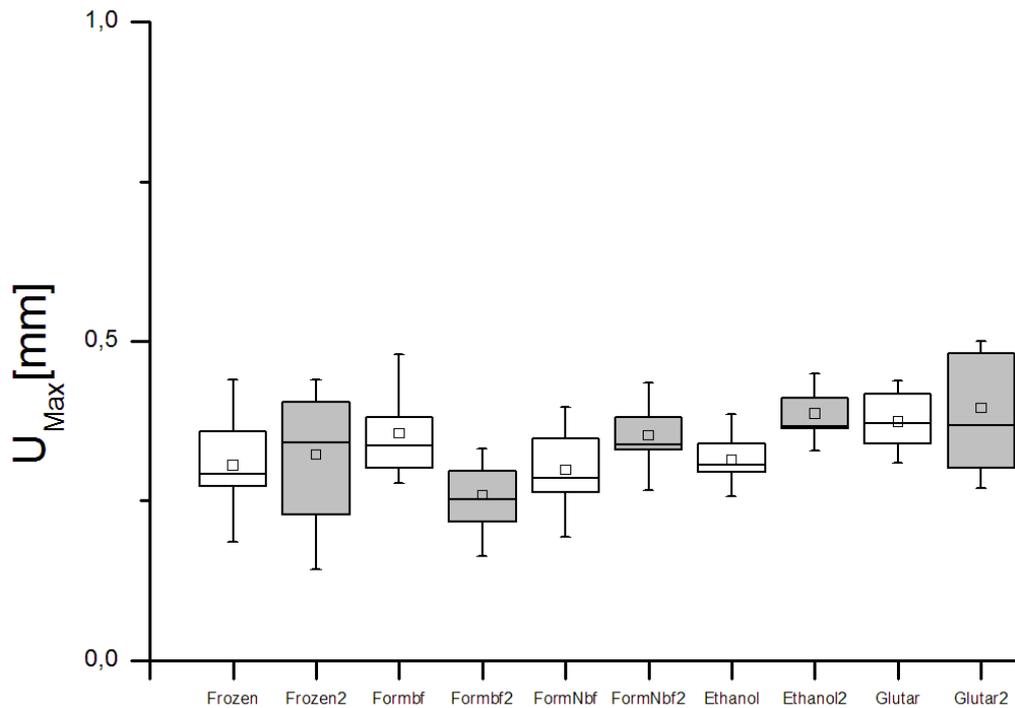


Abbildung 9.2: Normalverteilung der Daten aus der biomechanischen Untersuchung bezüglich der maximalen Durchbiegung; die hellen Boxen repräsentieren die Daten der unbehandelten Kontrollgruppen, die grau getönten Boxen, die der konservierten Knochen. Die größte Streuung der Daten findet sich bei den Gruppen Frozen 2 und Glutaraldehyd 2. Zusätzlich lässt sich bei der Gruppe Frozen 2 eine Rechtsverschiebung des Medians erkennen, bei der Gruppe Glutaraldehyd 2 findet sich eine Linksverschiebung desselben. Auch bei den anderen eher moderat gestreuten Gruppen sind Linksverschiebungen bei Frozen, Formalin Nbf sowie Formalin Nbf 2 und Ethanol sowie Ethanol 2 zu erkennen.

9.3 Normalverteilung der Daten bezüglich der Steifigkeit

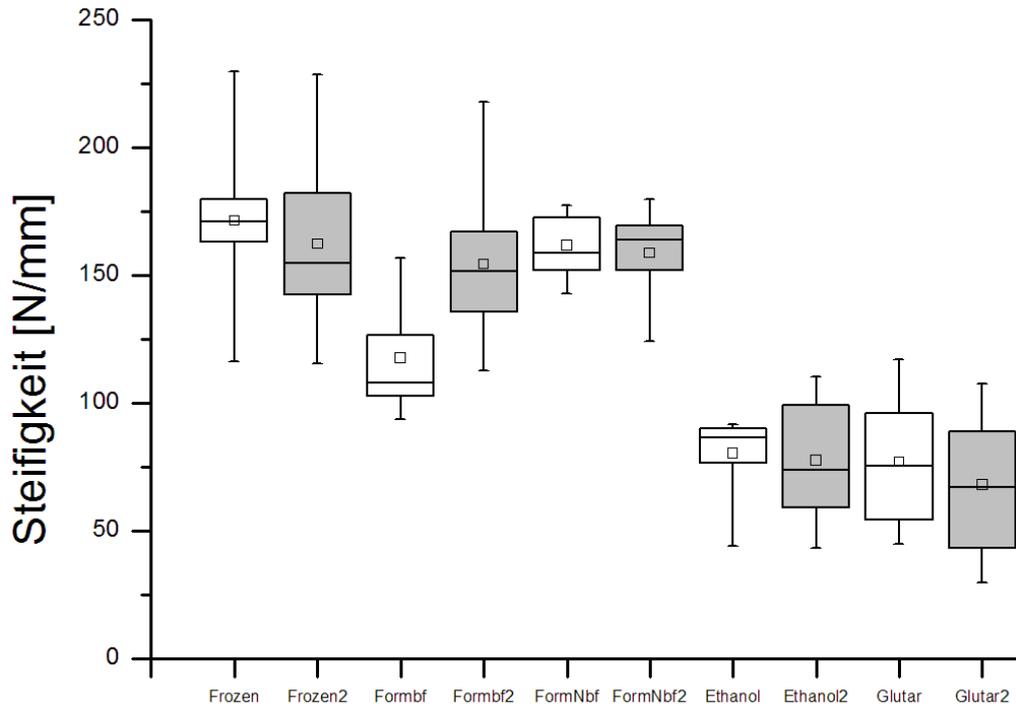


Abbildung 9.3: Normalverteilung bezüglich der Steifigkeit; die hellen, jeweils linksstehenden Boxen stellen dabei die Vergleichsgruppen dar; die grau gefüllten Boxen zeigen die Normalverteilung der konservierten Gruppen. Die Box-and-Whiskers-Diagramme geben für alle konservierten Gruppen, ausgenommen der Gruppe Formalin Nbf 2, eine verhältnismäßig weite Streuung der Daten sowohl im Bereich des 25% bis 75%-Quantils als auch im Bereich der Extremwerte wieder. Leichte Linksverschiebungen des Medians finden sich bei den Gruppen Frozen 2 und Ethanol 2, die Gruppe Formalin Nbf 2 weist eine leicht Rechtsverschiebung des Medians auf.

9.4 Normalverteilung der Daten bezüglich des Elastizitätsmoduls

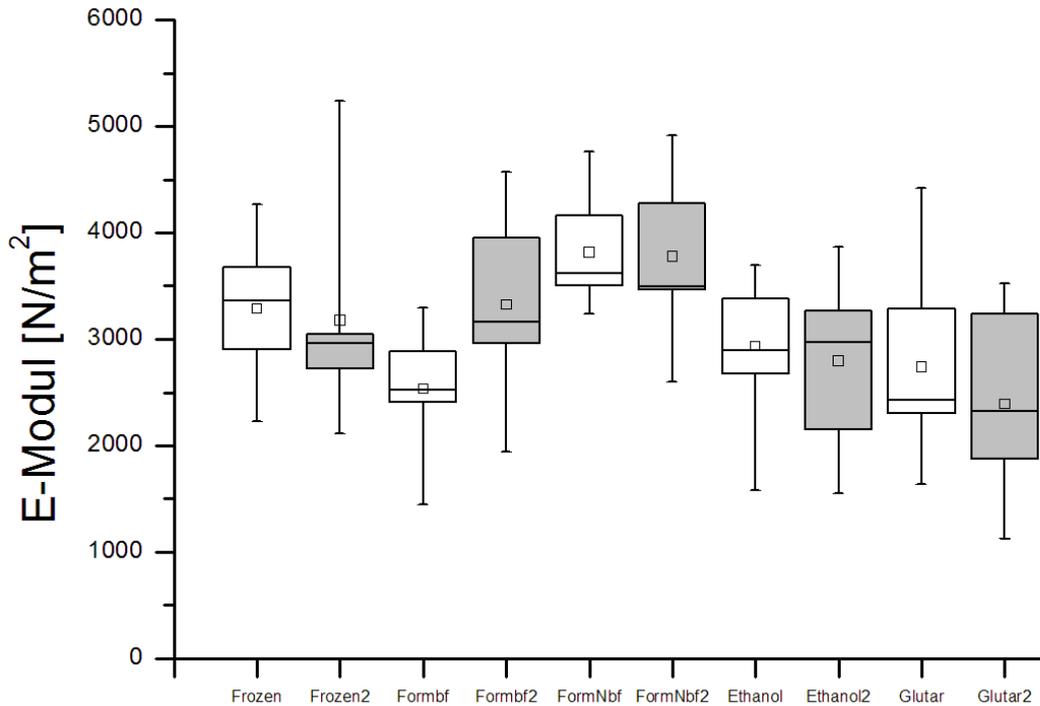


Abbildung 9.4: Normalverteilung der Daten aus der biomechanischen Untersuchung bezüglich des E-Moduls; die hellen Boxen repräsentieren die Daten der unbehandelten Kontrollgruppen, die grau getönten Boxen, die der konservierten Knochen. Auch die ermittelten Werte für den Elastizitätsmodul sind größtenteils weit gestreut; eine Ausnahme stellen lediglich die Gruppen Frozen 2 und Formalin bf dar, bei denen sich die Streuung der Daten vor allem im Bereich der Extremwerte niederschlägt. Linksverschiebungen des Medians finden sich bei Formalin bf und Formalin bf 2, Formalin Nbf und Formalin Nbf 2 (sehr starke Linksverschiebung), Ethanol sowie Glutaraldehyd und Glutaraldehyd 2. Die Mediane der übrigen Gruppen sind nach rechts verschoben.

9.5 Normalverteilung der Daten bezüglich der Zugspannung

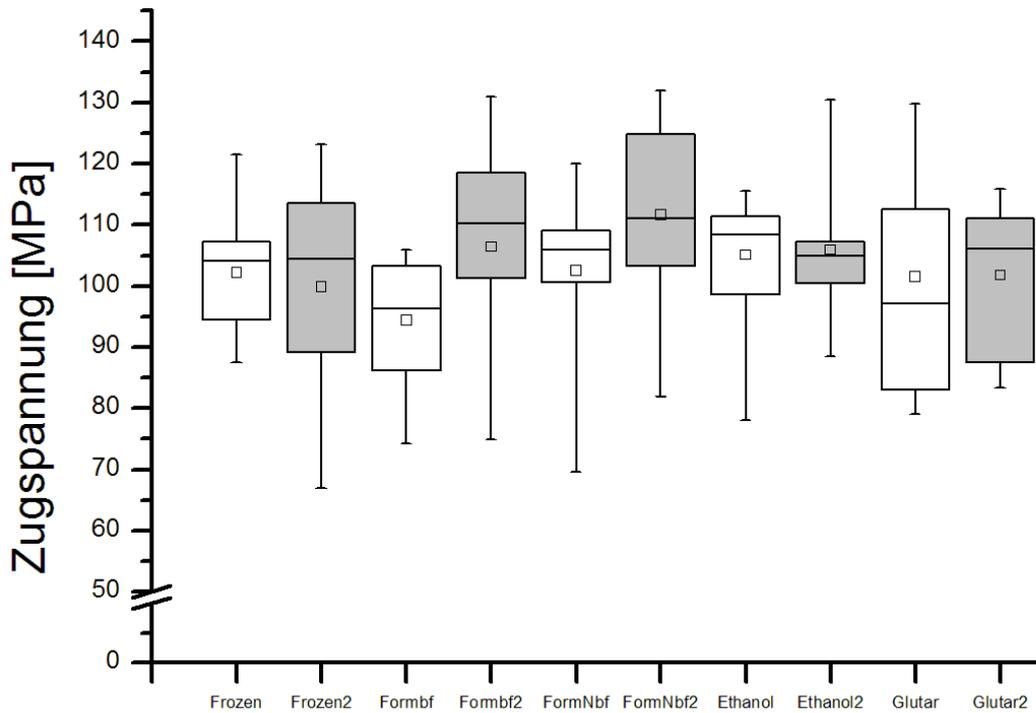


Abbildung 9.5: Normalverteilung bezüglich der Zugspannung; die hellen, jeweils linksstehenden Boxen stellen dabei die Vergleichsgruppen dar, die grau gefüllten Boxen zeigen die Normalverteilung der konservierten Gruppen. Die Daten sind innerhalb des 25%-75%-Quantils weit gestreut, Ausnahmen stellen die Gruppen Formalin Nbf und Ethanol 2 dar, die jedoch eine weite Streuung der Extremwerte aufweisen. Starke Verschiebungen der Mediane finden sich dagegen nicht, leichte Rechtsverschiebungen bei den Gruppen Frozen und Frozen 2, Formalin bf, Formalin Nbf, Ethanol und Ethanol 2 sowie Glutaraldehyd stehen einer leichten Linksverschiebungen bei der Gruppe Formalin Nbf 2 gegenüber.

9.6 Normalverteilung der Daten bezüglich der Work-to-failure

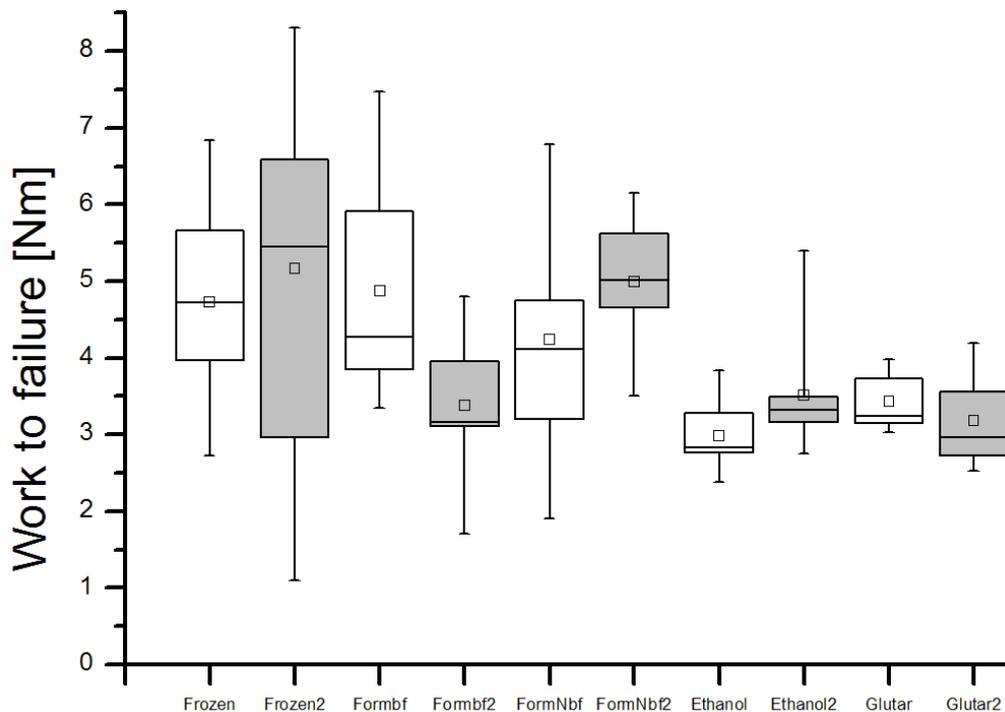


Abbildung 9.6: Normalverteilung der Daten aus der biomechanischen Untersuchung bezüglich der Work-to-failure; die hellen Boxen repräsentieren die Daten der unbehandelten Kontrollgruppen, die grau getönten Boxen, die der konservierten Knochen. Es fällt auf, dass die Daten der ersten sechs Gruppen sehr weit gestreut sind, wohingegen die Streuung der Daten der letzten beiden Gruppen als moderat zu bezeichnen ist. Eine besonders weite Streuung sowohl im Bereich des 25%- bis 75%-Quantils als auch im Bereich der Extremwerte weist die Gruppe Frozen 2 auf. Linksverschiebungen der Mediane finden sich bei den Gruppen Formalin bf und Formalin bf 2, Formalin Nbf 2, Ethanol sowie Glutaraldehyd und Glutaraldehyd 2. Rechtsverschiebungen sind bei den Gruppen Frozen 2 und Formalin Nbf zu verzeichnen.

10 Danksagung

Am Ende aber nicht zuletzt steht der Dank meinen zahlreichen Wegbegleitern gegenüber.

Ich danke meinem Doktorvater, Prof. Dr. Michael Amling, für die Ermöglichung und Begleitung dieser Arbeit.

Ganz besonders danke ich meinem ersten Betreuer und gutem Freund Dr. Tobias Kummer, der mich mit dieser Arbeit betraut und nach seinen Möglichkeiten auch aus dem Ausland weiter betreut und beraten hat. Sein Vertrauen in meine Arbeit, sein wissenschaftliches Verständnis und Intellekt haben mich durch alle Jahre begleitet.

Desweiteren möchte ich meinen beiden nachfolgenden Betreuern Prof. Dr. Arndt M. Schilling und Dr. Robert Percy Marshall danken. Sie haben sich der undankbaren Aufgabe angenommen, eine Doktorandin von einem Kollegen zu übernehmen und sich durch ihre Flexibilität des Denkens und wissenschaftliche Motivation als Inspirationsquelle für mich dargestellt.

Ich danke auch meinen Arbeitgebern Dr. Uwe Hunecke und Dr. Miriam Lüders für Verständnis und Unterstützung bei der wissenschaftlichen Arbeit. Beide haben mir das Gefühl gegeben, dass die Dissertation weiterhin ein wichtiger Bereich meines Lebens ist und mir so entscheidend geholfen, sie nicht aus den Augen zu verlieren.

Marco Beissel danke ich dafür, dass er mir in schwierigen Zeiten den Rücken frei gehalten hat und trotzdem immer für mich da war.

Meinen Eltern und insbesondere meiner Schwester danke ich für ihre fortwährende Ermutigung, Begleitung und Unterstützung. Für den Gedankenaustausch und nicht zuletzt für die Geduld, dieses immer wieder kehrende Thema mit mir zu reflektieren. Ihnen möchte ich diese Arbeit widmen.

11 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne Hilfe verfasst, andere als von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.