

**EVALUATION DER FRAKTURHEILUNG IM OSTEOPOROTISCHEN  
TIERMODELL MITTELS MIKRO-CT**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Helena von Dewitz  
aus Köln

Gießen 2015

Aus dem medizinischen Zentrum für Radiologie  
Abteilung für Diagnostische Radiologie  
des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen  
Leitung: Prof. Dr. med. G. Krombach

Gutachter: Prof. Dr. med. A. C. Langheinrich

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Schnettler

Tag der Disputation: 15.02.2016

## EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig- Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden. "

Gießen, 14.02.2015

---

Ort, Datum

Helena v. Rumbold

---

Unterschrift



## Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 Pathogenese der Osteoporose .....	2
1. 1. 1 Knochenmasse und Knochenqualität .....	3
1. 1. 2 Risikofaktoren und Ursachen .....	6
1. 1. 2. 1 Genetik .....	7
1. 1. 2. 2 Hormonhaushalt .....	7
1. 1. 2. 3 Alterung .....	8
1. 1. 2. 4 Komorbiditäten .....	9
1. 2 Frakturheilung .....	10
1. 2. 1 Physiologie der Frakturheilung .....	10
1. 2. 2 Besonderheiten der osteoporotischen Frakturheilung .....	13
1. 3 Bildgebende Verfahren .....	14
1. 3. 1 Computertomographie .....	15
1. 3. 2 Mikro-Computertomographie .....	17
1. 4 Ziel und Fragestellung der Arbeit .....	20
<b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>21</b>
2. 1 Tiermodell.....	21
2. 2 Induktion der Osteoporose .....	22
2. 3 Evaluation der Knochendichte mittels DXA.....	22
2. 4 Femur Osteotomie.....	22
2. 5 Probengewinnung.....	24
2. 6 Bildgebende Verfahren.....	25
2. 6. 1 Mikro- Computertomographie .....	25
2. 6. 2 Quantitative Bildanalyse .....	26
2. 7 Statistische Auswertung .....	29
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>30</b>
3. 1 Osteoporose .....	30
3. 2 Mikro-CT.....	30
3. 2. 1 Knochenkeil.....	30
3. 2. 2 Knochenneubildung.....	31
3. 2. 2. 1 Drei- Millimeter- Defekt .....	32
3. 2. 2. 2 Fünf- Millimeter- Defekt.....	32
3. 2. 3 Vaskularisierung.....	34
3. 2. 3. 1 Drei- Millimeter- Defekt .....	35
3. 2. 3. 2 Fünf- Millimeter- Defekt.....	35
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>38</b>
4. 1 Tiermodell.....	38
4. 2 Mikro- Computertomographie .....	41
4. 3 Frakturheilung .....	44
4. 4 Limitationen .....	47
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>49</b>
<b>6. SUMMARY .....</b>	<b>50</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>51</b>
<b>8. ANHANG.....</b>	<b>60</b>
8. 1 Material.....	60

8. 2 Abbildungsverzeichnis.....	60
8. 3 Tabellenverzeichnis .....	63
8. 4 Abkürzungsverzeichnis.....	64
<b>9. DANKSAGUNG .....</b>	<b>67</b>
<b>10. PUBLIKATIONEN.....</b>	<b>68</b>

# 1. EINLEITUNG

Osteoporose ist eine weit verbreitete Knochenkrankheit, deren Management auf Grund des demografischen Wandels eine zunehmende Herausforderung für das Gesundheitssystem darstellt.<sup>1,2</sup> Statistiken verdeutlichen, dass die Prävention, Behandlung und Erforschung der Osteoporose außerordentlich wichtig ist. 75 Millionen Menschen sind schätzungsweise weltweit betroffen.<sup>3</sup> Das Risiko eine im Zusammenhang mit Osteoporose stehende Fraktur zu erleiden, beträgt für Frauen circa 50% und für Männer 20%.<sup>4</sup> Wegen der zunehmenden Lebenserwartung ist davon auszugehen, dass die Anzahl der Patienten weiter ansteigt. So wird weltweit ein Anstieg der Hüftfrakturen von 1.7 Millionen im Jahre 1990 auf 6.3 Millionen im Jahre 2050 erwartet.<sup>5</sup> Die Fraktur des systemisch erkrankten Knochens ist besonders dramatisch, da körperliche Behinderung, der Verlust der Selbstständigkeit und sogar eine erhöhte Letalität, vor allem nach Hüftfrakturen, die Folgen sein können. Frakturen anderer Knochen, wie z.B. Wirbelkörperbrüche, führen bei Patienten, die älter als 75 Jahre sind, ebenfalls zu erhöhter Mortalität.<sup>6</sup> Auch wenn die Sterblichkeitsrate von anderen Gegebenheiten wie chronischen Erkrankungen und weiteren Nebendiagnosen stark beeinflusst wird, ist die finanzielle Belastung des Gesundheitssystems unbestreitbar. Therapiekosten, Krankenhausaufenthalte und Versorgungsmaßnahmen der Patienten kosten allein in den USA \$20 Billionen Dollar pro Jahr.<sup>7</sup>

Auf Grund der aktuellen Datenlage war die Osteoporose in den vergangenen zehn Jahren bereits Gegenstand vieler Arbeitsgruppen und Forschungsprojekte.<sup>8</sup> Der Schwerpunkt dieser Forschungsarbeiten bezog sich dabei in erster Linie auf Epidemiologie, Pathophysiologie, Diagnose und medikamentöse Therapien der Erkrankung. Weitere Arbeiten analysierten die Krankheit auf molekularer und zellulärer Ebene. Trotzdem sind Diagnose und optimale Behandlung der Frakturen noch nicht ausreichend erforscht.<sup>9</sup>

Die Knochenheilung im Allgemeinen und insbesondere bei Osteoporose ist ein komplexer Prozess, der von mikrovaskulären und biomechanischen Bedingungen sowie individuellen Gegebenheiten abhängt.<sup>9,10</sup> Um die hohe Versagensrate von Schrauben und Implantaten in osteoporotisch veränderten Knochen senken zu können, müssen die Besonderheiten der osteoporotischen Fraktur verstanden werden. Wissenschaftliche Untersuchungen von diaphysären Frakturen und Bohrlöchern<sup>9,11-14</sup> geben Hinweise auf

eine gestörte, osteoporotische Frakturheilung. Pathologische Frakturen treten aber vor allem im metaphysären Knochenbereich auf.<sup>15-17</sup> Trotzdem gibt es kaum wissenschaftliche Untersuchungen zu diesem Frakturmuster.<sup>18</sup> Ziel der Osteoporose Forschung sollte es daher sein, ein Forschungsmodell zu entwickeln, das den Knochen auf biomechanischer, histologischer und bildgebender Ebene konsequent analysiert. Die daraus resultierenden Ergebnisse können gegebenenfalls die Behandlung pathologischer Frakturen verbessern. So könnten Mortalität, Morbidität und Kosten der Osteoporose langfristig effektiv gesenkt werden.

## **1.1 Pathogenese der Osteoporose**

Osteoporose ist die häufigste polygenetische Erkrankung des Skelettsystems. Das Kennzeichen dieser Krankheit ist eine gestörte Remodellierung der Knochensubstanz, die durch ein Ungleichgewicht in der Aktivität der Osteoblasten und der Osteoklasten verursacht wird.<sup>8</sup> Der erhöhte Knochenumsatz führt zu einer reduzierten Mineralisierung des Knochens.<sup>19</sup> Sowohl die organische als auch die anorganische Knochenmatrix sind betroffen.<sup>20</sup> Die daraus resultierende pathologische Mikroarchitektur führt zu einer reduzierten Knochendichte mit einem massiv gesteigerten Risiko für Fragilitätsfrakturen als typische Komplikation.<sup>21</sup>

95% aller Patienten sind von einer primären Osteoporose betroffen. 80% der Patienten sind Frauen, die postmenopausal durch den vergleichsweise plötzlichen Östrogenabfall einen Verlust an Knochenmasse erleiden. Da vor allem die trabekulären Knochenstrukturen betroffen sind, führt diese Erkrankung häufig zu Wirbelkörperbrüchen, aber auch zu Brüchen anderer Knochen. So sind auch der Femur und der distale Radius, vor allem im Bereich der Metaphyse, häufig betroffen.<sup>8</sup>

Die senile Osteoporose tritt im höheren Lebensalter als Folge von natürlichen Alterungserscheinungen, Vitamin-D-Mangel, Kalziummangel und Immobilisation auf. Sie betrifft Männer genauso häufig wie Frauen und ist durch Frakturen der langen Röhrenknochen gekennzeichnet, da hier Kortikalis und Spongiosa gleichermaßen betroffen sind.<sup>22</sup>



Die sekundäre Osteoporose tritt mit 5% deutlich seltener auf. Diese Form der Erkrankung ist Folge von Endokrinopathien wie zum Beispiel vom Cushing Syndrom<sup>23</sup>, von Hyperthyreose<sup>24</sup> oder Hyperparathyreoidismus.<sup>25</sup>

### **1. 1. 1 Knochenmasse und Knochenqualität**

Zwei Parameter, die durch viele verschiedene Risikofaktoren beeinflusst werden, sind für die Pathogenese und das Ausmaß der Erkrankung entscheidend: Die Knochenmasse und die Knochenqualität.

Die Knochenmasse ist im Laufe des Lebens ständigen Veränderungen ausgesetzt. Sie nimmt intrauterin, im Kindes- und im Jugendalter kontinuierlich zu, bis ungefähr um das 30. Lebensjahr ein Maximum erreicht wird. Nach diesem sogenannten „Peak Bone Mass“ nimmt die ossäre Masse zunächst langsam (0.3%- 0.5% jährlich) wieder ab.<sup>8</sup> In den ersten Jahren nach der Menopause kann die jährliche Abnahme der Knochendichte bis zu sechs Prozent betragen bis sie im hohen Alter nur noch bei ungefähr 50% der „Peak Bone Mass“ liegt.<sup>26</sup> Die Abnahme betrifft bei Frauen vor allem das trabekuläre Knochengewebe. Der Verlust der Kompakta hingegen ist deutlich geringer.<sup>9</sup> Bei Männern sind vor allem die Veränderungen der spongiösen Knochenanteile sehr viel geringer ausgeprägt. Das Verhältnis von Knochenmasse im Vergleich zu Gewebemasse (BV/TV) ist bei Frauen und Männern allerdings zu gleichen Teilen reduziert.<sup>27</sup>

Die maximale Knochenmasse wird durch genetische Faktoren, Umwelteinflüsse, Ernährung und individuelle Beanspruchung des Bewegungsapparats beeinflusst.<sup>8</sup>

Der Abbau der Knochenmasse kann durch pathologisch erhöhte Aktivität der Osteoklasten z.B. postmenopausal verstärkt werden.

Da diese Veränderungen zunächst keine Symptomatik zeigen, bleibt die Osteoporose meist lange unerkannt, weshalb die präventive Behandlung der Erkrankung schwierig ist.<sup>28</sup>

Auf weitere Risikofaktoren der Erkrankung wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit noch eingegangen.

Osteoklasten und Osteoblasten halten sich auf molekularer Ebene im gesunden Knochen stets die Waage zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau. Dieses Prinzip wird „Coupling“ genannt. Für das Gleichgewicht ist der Ligand des RANK Rezeptors (Receptor Activator of NF-κB), RANKL (Receptor Activator of NF-κB Ligand),

entscheidend. Der Ligand wird von Osteoblasten exprimiert und führt nach Bindung an den RANK Rezeptor zu einer gesteigerten Bildung von Osteoklasten aus Vorläuferzellen. Gleichzeitig bilden sich Osteoblasten, möglicherweise unter dem Einfluss von Östrogen und Osteoprotegrin (OPG), und verhindern die Bindung zwischen Ligand und Rezeptor.<sup>8</sup> Kommt es zu Unregelmäßigkeiten in diesem Gleichgewicht, welche beispielsweise durch die fehlende negative Rückkopplung von Östrogen auf Interleukin-1 oder den Tumor-Nekrose-Faktor verursacht werden können, steigt die Osteoklastogenese, die Rate der Remodellierungszyklen und der Knochenumsatz. Man spricht dann von „Decoupling“.<sup>8</sup>

Der zweite wesentliche Parameter ist die Knochenqualität. Die Beziehung zwischen sinkender Knochendichte und erhöhtem Frakturrisiko ist interessanterweise nicht linear.<sup>29</sup> Anders gesagt: Osteoporosetherapien erzielen nur einen geringen Anstieg an Knochendichte (circa 3-8% pro Jahr), das Frakturrisiko wird aber um über 50% gesenkt. Dies lässt sich nicht allein über die gesteigerte Knochenmasse erklären.<sup>30, 31</sup>

Der Begriff der Knochenqualität schließt die Faktoren ein, die über die Knochendichte hinaus zur Stabilität eines Knochens beitragen. Darunter fällt die Makroarchitektur des Skeletts, also Größe und Form, sowie die Mikroarchitektur der kortikalen und spongiösen Knochenanteile. Auch der Aufbau der Knochenmatrix, die Knochenmineralisation und die Höhe des Knochenumsatzes spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Osteoporose.<sup>8</sup>

So ist der systemisch erkrankte Knochen nicht nur durch eine geringere Knochendichte gekennzeichnet, sondern auch durch reduzierte Quervernetzungen und Ausdünnung der Trabekel. Bei Frauen kommt es durch erhöhte Osteoklastenaktivität und damit verbundener stärkerer Resorption und Perforation der spongiösen Knochenanteile zu einer Auslöschung ganzer Trabekel. Der Abstand der noch vorhandenen Knochenbälkchen untereinander nimmt zu. Somit kommt es zu einem Verlust von Knochenvolumen (siehe Abbildung 1).<sup>32</sup>

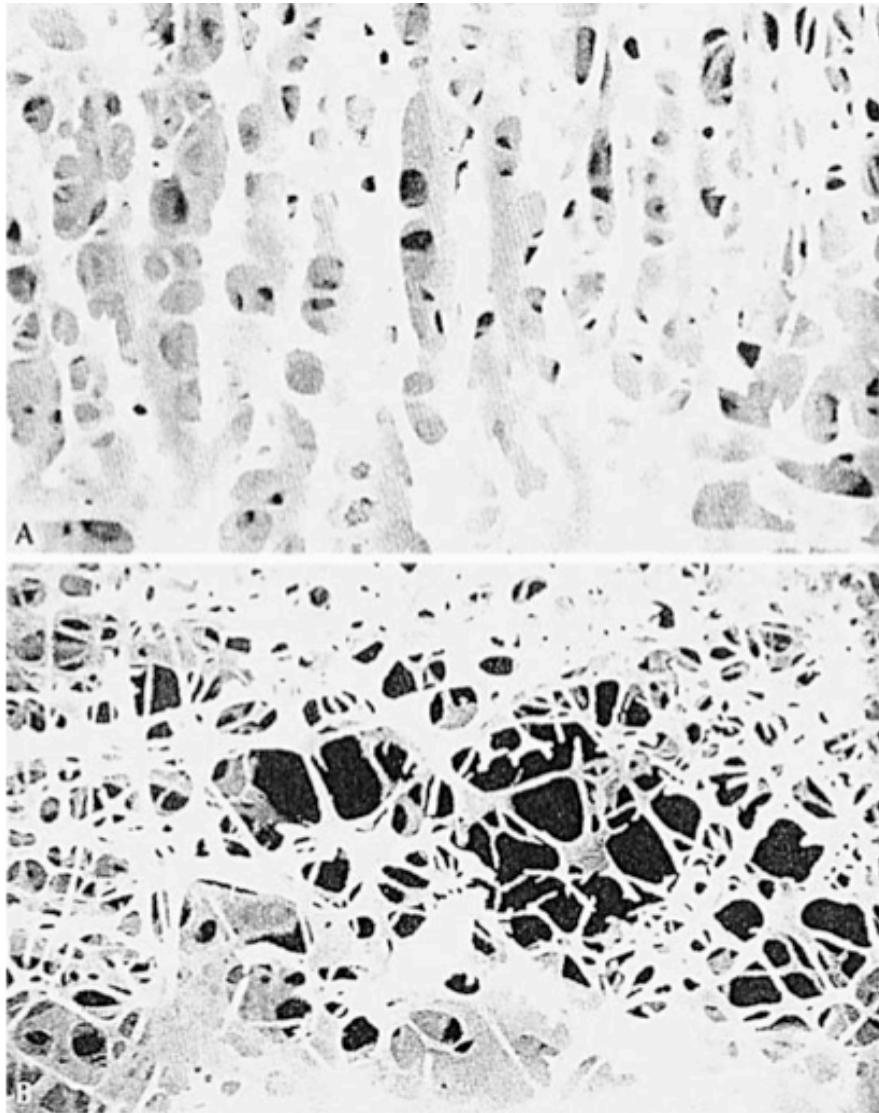
Ein weiterer Unterschied zwischen den Geschlechtern ist der Abbau der Kortikalis. Zwar sind sowohl bei Männern als auch bei Frauen vor allem die endokortikalen Bereiche betroffen und im Ausmaß auch vergleichbar, beim weiblichen Geschlecht ist aber der dem Knochenabbau gegenüberstehende subperiostale Aufbau an Knochenmasse reduziert. Subperiostaler Knochenaufbau kann z.B. im alternden Knochen beobachtet werden (siehe Abbildung 2).

Somit kommt es zu einer verminderten kortikalen Fläche und zu einer Trabekularisierung der kortikalen Strukturen. Dem gegenüber nimmt die mit Spongiosa ausgekleidete Markhöhle an Größe zu.<sup>33</sup>

Diese Entwicklung kann durch den prozentualen Gehalt der Trabekel im gesamten Markraum (BV/TV(%)), die Angabe der Trabekel pro Fläche (Tb.N( $1/mm^2$ )), die Dicke der Strukturen (Tb.Th(mm)) und die Entfernung einzelner Trabekel voneinander (Tb.Sp(mm)) objektiv beschrieben werden.<sup>34</sup> Diese Parameter konnten schon vor Entwicklung der Mikro-CT histomorphologisch bestimmt werden.

Alle genannten Veränderungen beeinflussen Biege- und Torsionseigenschaften des Knochens und prädisponieren für Frakturen schon bei geringer Gewalteinwirkung und verschlechtern die Haltbarkeit von Implantaten nach operativer Versorgung der Knochenbrüche.<sup>35</sup> Im Ergebnis ist die Knochenstärke auch von der Trabekelstruktur abhängig und daher bei einer gestörten Mikroarchitektur des Knochens reduziert.<sup>36</sup>

Um Therapiefortschritte in der Osteoporosetherapie und in der Prävention von Frakturen zu erzielen, ist es essenziell, den Zusammenhang zwischen Knochenmasse, Funktion der einzelnen Knochenabschnitte und dreidimensionaler Knochenarchitektur zu verstehen. Dafür sollten geeignete Tiermodelle entwickelt und die Möglichkeiten der bildgebenden Verfahren wie die Mikro-CT genutzt bzw. ausgebaut werden.<sup>30</sup>



*Abbildung 1: Vergleich normales Knochengewebe mit osteoporotischem Knochengewebe. Auffallend ist die größere Masse und höhere Dichte der Trabekel des gesunden Knochengewebes (A) verglichen mit dem osteoporotischen Knochenbefund (B)<sup>37</sup>*

---

### **1. 1. 2 Risikofaktoren und Ursachen**

Wie oben bereits angedeutet, sind viele verschiedene Faktoren für die Entwicklung einer manifesten Osteoporose verantwortlich. Genetische Belastungen spielen eine bedeutende Rolle. Diese sind aber noch nicht vollständig erforscht. Dahingegen ist der Einfluss des Hormonhaushaltes und der Alterung auf die Entwicklung einer Osteoporose weitgehend erschlossen worden. Auch Komorbiditäten wie z.B. chronische Erkrankungen beeinflussen den Mineralhaushalt des Knochens.

### **1. 1. 2. 1 Genetik**

Durch verschiedene Familien- und Zwillingsstudien konnte gezeigt werden, dass die Genetik, also die erbliche Belastung und die familiäre Vorgeschichte, einer der Hauptrisikofaktoren ist. So sind 60-80% der Knochenmasse genetisch festgelegt.<sup>21</sup> Es konnte aber bis jetzt nicht gezeigt werden, dass bestimmte Gene, die z.B. für den Vitamin-D-Rezeptor, für das Kollagen I, für Zytokine oder Wachstumsfaktoren codieren, für sich allein genommen, einen signifikanten Einfluss auf die Erkrankung haben.<sup>38</sup> In Kombination mit anderen Determinanten, wie Alter, Geschlecht und Umwelteinflüssen, steigern die „Polymorphismen des menschlichen Genoms in ihrer komplexen Zusammensetzung das genetische Risiko einer verminderten Knochenformation, erhöhten Knochenresorption oder verminderten Knochenfestigkeit“<sup>21</sup> aber durchaus. Kriterien, die die normale Knochenheilung beeinflussen, wurden jedoch besser entschlüsselt als Faktoren, welche die osteoporotische Knochenheilung betreffen.<sup>21</sup>

Die Genetik scheint vor allem die Knochenmasse in Abhängigkeit von Alter und Zustand des Skeletts<sup>39</sup>, sowie weitere Osteoporose Einflussgrößen wie den „Body Mass Index (BMI)“<sup>40</sup> oder Marker für den Knochenumsatz<sup>41</sup> zu bedingen. Frakturen und der Verlust von Knochenmasse scheinen dagegen eher in jüngeren Jahren genetisch determiniert zu sein.<sup>42</sup>

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass es wichtig ist, die genetischen Hintergründe der Osteoporose weiter zu erforschen, da eine positive Familienanamnese eine der größten Risikofaktoren für Osteoporose ist<sup>43</sup> und „die Erfassung komplexer Konstellationen des Genoms ein wichtiges Werkzeug zur Risikoerfassung werden wird“.<sup>21</sup>

### **1. 1. 2. 2 Hormonhaushalt**

Des Weiteren ist natürlich der postmenopausal abrupt abfallende Östrogenspiegel für den Großteil der Osteoporose-Erkrankungen bei Frauen verantwortlich. Die Ovarien stellen ihre Tätigkeit ein. Der Körper produziert nur noch kleine Mengen Östron in der Nebenniere– ein schwächer wirksames Östrogen als Estradiol.<sup>44</sup> Der Östrogenmangel führt nicht nur zu einem gesteigerten Remodeling und einer höheren Knochenresorption, sondern beeinflusst auch das physiologische osteoinduktive und

osteogene Potential der Knochenzellen. So reagiert gesunder Knochen auf mechanische Belastung normalerweise mit einer erhöhten Knochenformation. Ausgelöst wird diese Reaktion durch Östrogen, das an den ER-Alpha Rezeptor, den wichtigsten Rezeptor für die Östrogenwirkung in Knochenzellen, bindet. Bei Östrogenmangel wird die Rezeptordichte herunter reguliert und die Knochenstärke nimmt ab.<sup>21,45-48</sup>

Der Parathormon/Vitamin D- Regelkreislauf spielt vor allem bei älteren Menschen während der Entwicklung einer Osteoporose eine Rolle. Zwar ist der Vitamin-D Metabolismus bei dem alten, gesunden Menschen relativ ungestört, allerdings ist die Vitamin- D Synthese wegen niedriger UV-Strahlung, einer reduzierten Fähigkeit der Haut zur Herstellung des Vitamins und einer niedrigen Nahrungszufuhr eingeschränkt.<sup>49</sup> Niedrige Kalziumspiegel führen zu einem sekundären Hyperparathyreoidismus, der wiederum für einen erhöhten Knochenumsatz, Osteoporose und eine erhöhten Frakturinzidenz verantwortlich ist.<sup>50</sup> Das Risiko von Fragilitätsfrakturen kann durch Calcium- und Vitamin D Substitution um bis zu 12% gesenkt werden und ist somit der Grundstock der Osteoporosetherapie.<sup>51</sup>

Eine ausreichende Versorgung mit den oben genannten Metaboliten ist somit auch für die Frakturheilung von großer Bedeutung.<sup>21</sup>

### **1. 1. 2. 3 Alterung**

Als weiterer Risikofaktor für Osteoporose ist Alterung zu nennen. Altern ist ein dynamischer Prozess, der abhängig von zellulären Alterungsprozessen und äußeren Einflüssen wie z.B. Krankheit, Bewegungsmangel und Ernährung ist.

Auf molekularer Ebene führen zelluläre Schäden zur Ansammlung von geschädigten und abnormalen Proteinen in der Zelle, die nicht entfernt werden können, was wiederum eine gestörte Funktion zur Folge hat.<sup>21,52</sup> Als Schutzmechanismus vor unkontrollierter Zellproliferation wird die Zelle entweder apoptotisch oder tritt in die replikative Seneszenz ein. Das bedeutet, dass sie praktisch keine Funktion mehr besitzt.<sup>21</sup> DNS Reparaturmechanismen sind ebenfalls eingeschränkt und die Regenerationsfähigkeit von Zellverbänden lässt nach.<sup>21</sup> Diese Alterungsprozesse finden im gesamten Organismus und auch im Knochengewebe statt. Diverse Organsysteme weisen einen Funktionsverlust auf. In Bezug auf den Stütz- und Bewegungsapparat lässt sich eine Reduktion der Muskelmasse, eine Abnahme der Dehnbarkeit der Sehnen und der Beweglichkeit der Gelenke feststellen. Außerdem nimmt der Mineralstoffgehalt der

Knochen ab. Dadurch kommt es zu einem Verlust von Knochenmasse.<sup>10</sup> Viele durch Alter bedingte Veränderungen in der Knochenstruktur stellen ein Risikofaktor für die veränderte Frakturheilung im systemisch erkrankten Knochen dar (siehe Abbildung 2).<sup>10</sup>

Die Zunahme des Fettgehalts des Knochenmarks im Alter durch höhere Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen in Adipozyten als in Osteoblasten zeigt ähnliche Effekte. Fettsäuren und Adipokine hemmen die Knochenformation und fördern die Knochenresorption.<sup>53</sup>

#### 1. 1. 2. 4 Komorbiditäten

Letztendlich tragen auch chronische Inflammationskrankheiten und Stoffwechselerkrankungen wie z.B. rheumatoide Arthritis und Diabetes mellitus durch die Produktion von osteoklastogenetisch wirkenden Interleukinen zu einer negativen Knochenbilanz und einer reduzierten Vitamin D Aktivierung bei.<sup>21</sup> Die Vermutung liegt nahe, dass derartige chronische Erkrankungen nicht nur eine Osteoporose bedingen, sondern sich auch negativ auf die Frakturheilung auswirken.<sup>21</sup>

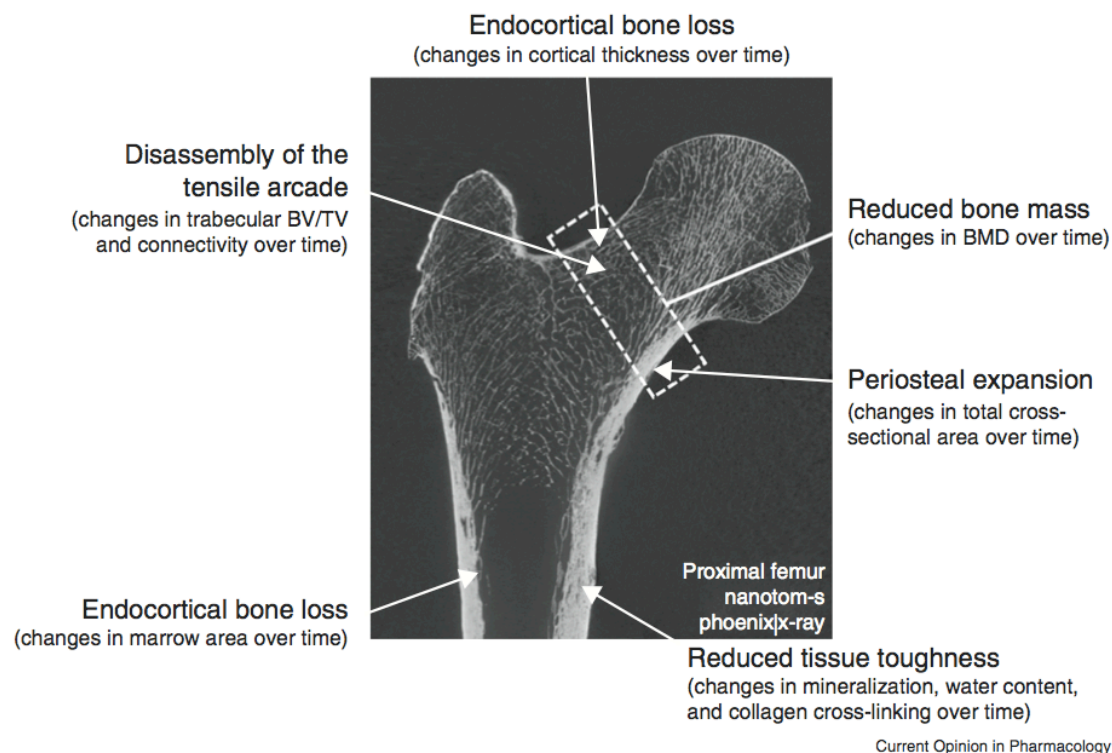


Abbildung 2: Sagitalschnitt eines menschlichen Femur, proximal. (25 Mikron Voxelgröße, nanotom-S, phoenix|x-ray, GE Measurement & Control; Wunstorf, Deutschland) Abgebildet sind die strukturellen und geweblichen Veränderungen, die im Alter auftreten.<sup>10</sup>

## **1. 2 Frakturheilung**

Frakturheilung ist schon im gesunden Knochen ein hoch-komplexer Prozess, dessen molekulare Details noch nicht vollständig erforscht sind.<sup>21</sup> Ein Phänomen dieses Ablaufs ist die vollständige Geweberegeneration ohne Narbenbildung.<sup>54 55</sup> Die Stabilität des Frakturspalts, der Kontakt der Frakturrenden und biologische Faktoren wie die Kondition der mesenchymalen Stammzellen, die Expression von Wachstumsfaktoren und die Blutversorgung bestimmen die Regenerationsfähigkeit des Knochens.<sup>21,54</sup> Minimale Bewegungen im Frakturbereich fördern die Knochenheilung und stellen einen Wachstumsreiz dar, wohingegen eine zu flexible Stabilisation zu reduzierter Kallusbildung und eingeschränkter Vaskularisation führt.<sup>54,56</sup> Die Regenerationsfähigkeit des Knochens nimmt ferner mit zunehmender Größe des Frakturspalts ab. Frakturtyp und Frakturlokalisierung sind für den Heilungsvorgang ebenfalls wichtig.<sup>9</sup> So weisen Verletzungen im Bereich der Metaphyse, eine typische Lokalisation für pathologische Frakturen, eine erhöhte Anzahl an Komplikationen auf.<sup>21</sup> Auch Alter, Infektionen, Drogenkonsum, Ernährungszustand des Patienten und chronische Erkrankungen wie Diabetes, spielen bei der Knochenheilung eine Rolle.<sup>9,55</sup>

### **1. 2. 1 Physiologie der Frakturheilung**

Knochengewebe kann sich auf zwei verschiedene Arten regenerieren. Die primäre, desmale Knochenbildung läuft direkt ohne Kallusbildung durch Differenzierung von mesenchymalen Zellen zu Osteoblasten ab. Möglich ist dies wenn das Periost noch erhalten ist oder die Frakturrenden eng adaptiert sind, so dass Osteoklasten und Kapillaren direkt einwachsen können.<sup>21</sup> Außerdem wandern Osteoblasten ein und es bilden sich Kanäle, die später Knochenbrücken bilden. Die desmale Knochenbildung ist bei Gewebedehnungen bis zu 5% möglich. Scherkräfte bis 15% führen zur chondralen Ossifikation.<sup>21,56</sup>

Letztere ist die häufigste Variante der Frakturheilung. Diese Form der Knochenheilung ist eine Mischung aus intramembranöser Ossifikation und indirekter Knochenneubildung bei der zunächst Kallusgewebe entsteht.<sup>21,57</sup> Diese Form der Frakturheilung gliedert sich in vier Phasen.

Am Anfang steht die reaktive Phase. Als Antwort auf die Verletzung des muskuloskeletalen Systems bildet sich ein Hämatom und es kommt zu einer Entzündungsreaktion. In diesem Bereich proliferieren bereits die ersten mesenchymalen



Stammzellen<sup>21</sup> unter anderem durch die Freisetzung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren von Makrophagen, Granulozyten und Lymphozyten. Es bilden sich Fibroblasten, die sich zusammen lagern und so ein vaskularisiertes Granulationsgewebe bilden.<sup>54</sup> Die Angiogenese beginnt. Wie wichtig die inflammative Reaktion des Organismus ist, macht die Erkenntnis deutlich, dass Cyclooxygenasehemmer die Frakturheilung behindern.<sup>58</sup>

Die zweite Phase ist die reparative Phase. Die Frakturheilung im Frakturgebiet ist nicht homogen: Die Zelleinheiten des interkortikalen Gebiets und des Knochenmarkkanals in unmittelbarer Nähe des Frakturbereichs wandeln sich in Chondroblasten um, die in ausgereiftem Zustand zunächst hyalinen Knorpel, also weichen Kallus, bilden.<sup>58</sup> Zellen der weiter distal gelegenen subperiostealen Region und des umliegenden Weichteilgewebes werden zu Osteoblasten, die durch desmale Ossifikation Geflechtknochen bilden.<sup>58,57,59</sup>

Nach circa drei bis vier Wochen sind diese Bereiche locker miteinander verbunden und es hat sich eine Manschette aus Kallusgewebe gebildet, die der Primärstabilität dient.<sup>21</sup> Danach beginnt im dritten Schritt die enchondrale Ossifikation: Das Gewebe wird durch Mineralisation in hartes Kallusgewebe bzw. in Geflechtknochen umgewandelt.<sup>60</sup> Das Kallusgewebe vergrößert den Durchmesser des Knochens und reduziert interfragmentäre Bewegungen.<sup>56</sup> Als letztes findet das Remodeling statt. Trabekuläres Knochengewebe wird mit Hilfe von Osteoblasten und Osteoklasten, die Howship Lakunen bilden, in Lamellenknochen umgewandelt. Kallusgröße und Vaskularisierung werden wieder auf ein physiologisches Niveau reduziert<sup>55</sup> (siehe Abbildung 3).

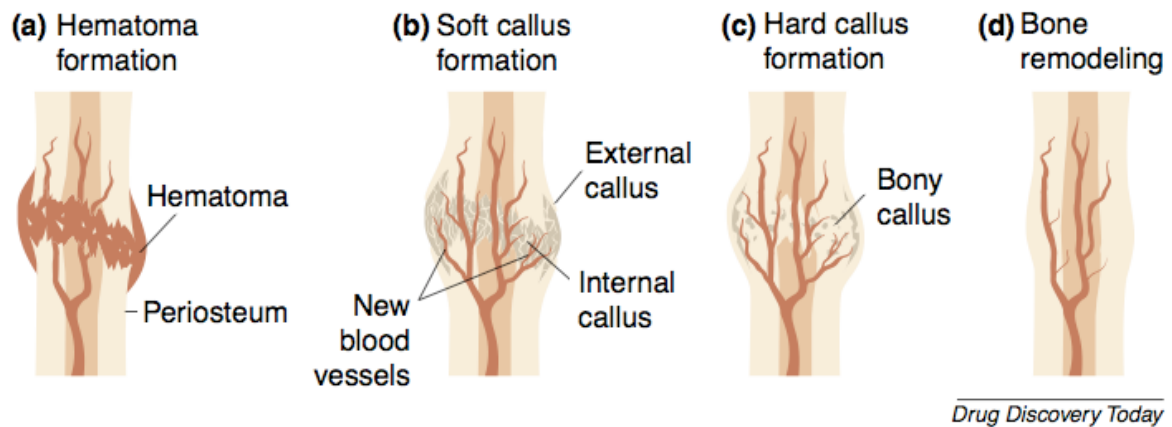


Abbildung 3: Stadien der Frakturheilung (a) Hämatombildung: Nach einer Verletzung führt die Unterbrechung der Blutgefäße zu einem Hämatom (b) Weiche Kallusbildung. Das beinhaltet: Blutgefäße, die aus bereits bestehenden Gefäßen gebildet werden (Angiogenese), Externes Kallusgewebe (intramembranöse Ossifikation) und internes Kallusgewebe (Faserknorpel); (c) Harte Kallusbildung: Das Kallusgewebe wird mineralisiert, es entsteht harter Kallus aus Geflechtknochen (d) Remodeling: Das Kallusgewebe wird von sekundärem lamellärem Knochen ersetzt und die Blutversorgung normalisiert sich.<sup>55</sup>

Mechanische und biologische Faktoren beeinflussen sich also gegenseitig, indem eine Fraktur einen Reiz für Osteoblasten und Osteozyten darstellt, Wachstumsfaktoren und Zytokine auszuschütten und die Frakturheilung zu aktivieren.<sup>56</sup>

Um den Transport von Stammzellen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren in den Frakturbereich zu gewährleisten und um das verletzte Gewebe vor Hypoxie und Nekrose zu schützen, ist eine gute Blutversorgung zu jedem Zeitpunkt von allergrößter Wichtigkeit.<sup>54</sup> Angiogenese, also die Entstehung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen durch Sprossungs- und Spaltungsvorgänge mit Hilfe von angiogenetischen Faktoren, ist von großer Bedeutung für alle Phasen der Frakturkonsolidation.<sup>21</sup> Trotzdem begann man erst 1963 nachhaltig auf diesem Gebiet zu forschen: Die Entdeckung eines „Vascular Stimulating Factors“ (VSF) durch Trueta et al.<sup>61</sup> und weiterer angiogenetischer Faktoren und Wachstumsfaktoren wie den Fibroblast Growth Factor (FGF), den Transforming Growth Factor (TGF- $\beta$ ), das Bone Morphogenetic Protein (BMP), den Insulin-like Growth Factor (IGF- 1/2), den Platelet Derived Growth Factor (PDGF) und den Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), brachten den Durchbruch in der Forschung.<sup>56</sup> Vor allem letzterer fördert nicht nur die Neovaskularisation, sondern stimuliert auch die Reifung und Aktivität von Osteoblasten. So zeigten Street et al. in ihrem Tiermodell, dass die Hemmung von VEGF in Mäusen mit Femurfraktur zu einer reduzierten Knochenformation und Kallusmineralisation sowie einer eingeschränkten Angiogenese in der frühen

Heilungsphase führt.<sup>62</sup> Ein Grund für eine schlechtere Frakturheilung im Alter scheint, unabhängig von Osteoporose, eine beeinträchtigte Angiogenese zu sein.<sup>56</sup>

### **1. 2. 2 Besonderheiten der osteoporotischen Frakturheilung**

Osteoporose-Therapie bedeutet nicht nur die optimale medikamentöse Therapie zur Verbesserung der Knochendichte zu finden, sondern schließt auch die Behandlung der osteoporotischen Frakturen mit ein.<sup>63</sup> Zwar sind Hüft-, Wirbelkörper- und Handgelenksfrakturen auf Grund der Knochenmorphologie typische Lokalisationen der Osteoporose-assoziierten Frakturen, das Risiko einen Knochenbruch zu erleiden ist aber bei Osteoporose für jeden Frakturtyp erhöht.<sup>8</sup> Sowohl atraumatische als auch traumatische Frakturen treten im systemisch erkrankten Knochen häufiger auf.<sup>63</sup> Es ist deshalb von großer Wichtigkeit, dass nicht nur die Frakturprävention erforscht wird, sondern dass auch die Therapie von osteoporotischen Knochenbrüchen optimiert wird.<sup>63</sup> Die Tatsache, dass viele orthopädische Chirurgen die Behandlung bzw. Operation von Fragilitätsfrakturen ablehnen, bestätigt die Notwendigkeit dieses Forschungsbereichs.<sup>9</sup> Hinzu kommt, dass sich viele Studien auf diaphysäre Femur- oder Tibiafrakturen<sup>64</sup> beschränken, obwohl dies keine typischen Lokalisationen von pathologischen Frakturen sind. Osteoporotische Frakturen finden sich meist im Bereich der Metaphyse der langen Röhrenknochen und heilen im Vergleich zu diaphysären Frakturen mit weniger periostaler Kallusbildung.<sup>64</sup> Die Entwicklung passender Tiermodelle hat dementsprechend eine große Bedeutung.

Die Hauptmerkmale des systemisch erkrankten Knochens sind, wie oben bereits genannt, die Rarefizierung der Trabekel, eine Größenzunahme des Knochenmarkkanals und eine Abnahme der Knochendichte und –dicke der Kortikalis.<sup>63,35</sup> Zwar durchläuft die osteoporotische Knochenheilung nach einer Fraktur die typischen Stadien der physiologischen Knochenheilung<sup>35</sup>, die Torsions- und Biegetoleranz des Gewebes und die Primärstabilität für Frakturen, die durch Implantate behandelt wurden, ist aber reduziert und die Dauer der Knochenheilung dadurch möglicherweise verlängert.<sup>35</sup>

Klinische Erfahrungen und experimentelle Studien zu diesem Thema bringen allerdings keine einheitlichen Ergebnisse und werden diskutiert.<sup>21</sup>

### 1.3 Bildgebende Verfahren

Es gibt zahlreiche bildgebende Verfahren und neue technische Entwicklungen, die zur Darstellung von Knochenpathologien bzw. von Frakturen geeignet sind.

Typisch für osteoporotisch veränderte Knochen sind die radiologisch sichtbaren, sogenannten Rahmenwirbel, die durch eine Transparenzerhöhung der Spongiosa und eine dadurch prominenter wirkende Kortikalis gekennzeichnet sind. Die Wirbelkörper haben ein strähniges Aussehen, da die horizontal verlaufenden, durch axialen Druck weniger belasteten Spongiosabälkchen rarefizieren und die statisch wichtigeren, senkrecht verlaufenden Trabekel sich dadurch deutlicher hervorheben. Wenn die Wirbelkörper dem statischen Druck nicht mehr Stand halten können, kommt es zu Sinterungsfrakturen und die Knochen werden als Keil- bzw. Fischwirbel bezeichnet.<sup>37</sup> Zwar ist das konventionelle Röntgen in zwei Ebenen nach wie vor der Goldstandard, um möglichst schnell eine Verletzung des Skeletts nachzuweisen, wenn es aber um komplexere Fragestellungen geht, reicht dieses Verfahren nicht aus.<sup>65</sup> So kann eine osteoporotisch bedingte Abnahme der Knochendichte erst ab circa 40% Verlust des Mineralgehalts diagnostiziert werden.<sup>66</sup> Statt dessen werden Verfahren wie die quantitative Computertomographie (QCT) und die duale Röntgenabsorptionsmetrie (DEXA) zur Osteodensitometrie in der Osteoporosediagnostik eingesetzt. Die DEXA ist ein zweidimensionales, planares Verfahren, das mit zwei energetisch unterschiedlichen Röntgenquellen arbeitet. Aus dem Absorptionsgrad der emittierten Photonenstrahlen wird die Knochendichte ermittelt und als T-Score angegeben. Ab einem T-Score von -2,5 Standardabweichungen im Vergleich zum Mittelwert gesunder junger Frauen, spricht man von einer Osteoporose<sup>10</sup> (siehe Tabelle 1).

<b>T-WERT</b>	<b>SCHWEREGRAD</b>
$\geq -1 \text{ SD}$	Normale BMD
$-2,5 \text{ SD} < x < -1 \text{ SD}$	Osteopenie, reduzierte BMD
$\leq -2,5 \text{ SD}$	Osteoporose
$\leq -2,5 \text{ SD} + \text{Fraktur}$	Manifeste Osteoporose

*Tabelle 1: Einteilung des Schweregrades bei Knochendichteverlust basierend auf dem T- Wert<sup>67</sup>*

Im Gegensatz zur DEXA ist die quantitative Computertomographie ein dreidimensionales Messverfahren, das osteoporotische Veränderungen schneller erkennen lässt und eine getrennte Analyse von Kortikalis und Spongiosa in Bezug auf die Mineralisation erlaubt.<sup>68</sup>

Trotzdem können Röntgenabsorptionsmethoden strukturelle Veränderungen der Knochenstruktur nicht ausreichend erfassen. Diese sind aber für die mechanische Belastbarkeit des Gewebes und die Evaluation des Frakturrisikos von Osteoporosepatienten von großer Wichtigkeit.<sup>69</sup>

Genauere Analysen in Bezug auf die Darstellung von Knochenpathologien erlauben neue Methoden wie die Mikro- und Nano- Computertomographie. Auf diese und die Computertomographie im Allgemeinen soll deshalb im Folgenden weiter eingegangen werden.

### **1. 3. 1 Computertomographie**

Die Computertomographie gilt als eine der größten medizinischen Entdeckungen.<sup>70</sup> Obwohl die ersten Geräte, die Anfang der 1970er Jahre auf den Markt kamen, mit der heutigen Technik kaum vergleichbar sind, wurden sie direkt im klinischen Alltag akzeptiert. So wurde nun - im Gegensatz zum konventionellen Röntgen - die überlagerungsfreie Darstellung der Körperstrukturen bzw. die Abbildung von Weichteilgewebe mit geringen Kontrastunterschieden, möglich. Der amerikanischen Physiker Allan M. Cormack und der britischen Ingenieur Godfrey N. Hounsfield erhielten dafür im Jahre 1979 den Nobelpreis für Medizin.<sup>70</sup>

Die technische Methode basiert auf einem Röntgenstrahl, der von einem Blendensystem, dem Kollimator moduliert und von einem Detektor erfasst wird.<sup>70</sup> Es werden Absorptionsprofile der Gewebeeinheiten aus verschiedenen Richtungen erstellt und daraus die Volumenstruktur rekonstruiert. Anschließend findet die Bildrekonstruktion basierend auf dem Algorithmus der gefilterten Rückprojektion bzw. der Radontransformation am Computer statt.<sup>71</sup>

Dieses Prinzip wurde im Laufe der Zeit immer weiter ausgebaut. So stellt die Entwicklung der Einzelschicht-Spiral-CTs Anfang der 1990er Jahre einen Meilenstein in der technischen Entwicklung dar. Durch die spiralförmige Abtastung des gesamten Scanvolumens während einer kontinuierlichen Röhren-Detektorrotation und gleichzeitiger fortlaufender Tischbewegung, konnten Volumendatensätze erstellt werden.<sup>72</sup> Die dreidimensionale Darstellung von Strukturen wurde durch

Bildnachverarbeitungsverfahren, wie Multiplanare Rekonstruktionen (MPR), Maximum-Intensity-Projektionen (MIP) und Volume-Rendering-Techniken (VRT), also durch Umrechnung der Datensätze in zweidimensionale Projektionsbilder, möglich.<sup>72,73</sup>

1998 kam der 4-Schicht Spiralscanner auf den Markt. Durch den Einbau von mehreren Detektorreihen in die Gantry konnten vier Axialebenen gleichzeitig aufgenommen werden.<sup>72</sup> Heute ist die Erfassung von bis zu 320 Schichten gleichzeitig möglich, 64 Zeilen sind in der klinischen Routine üblich (Multi-Slice-CT, MSCT).<sup>70</sup> Dadurch können sehr große Untersuchungsvolumina in guter transversaler Auflösung mit geringen Artefaktraten und kurzen Scan-Zeiten untersucht werden.<sup>74</sup>

In der Dual-Source-CT (DSCT) befinden sich zwei um 90 Grad versetzte 64-Zeilen-Systeme, die eine Auflösung bis in den Mikrometerbereich garantieren.<sup>75</sup> Die High-Resolution-CT (HRCT) ist wegen ihrer extrem hohen Ortsauflösung und dünnen Schichtführung besonders für Aufnahmen des Lungengewebes geeignet.<sup>76</sup>

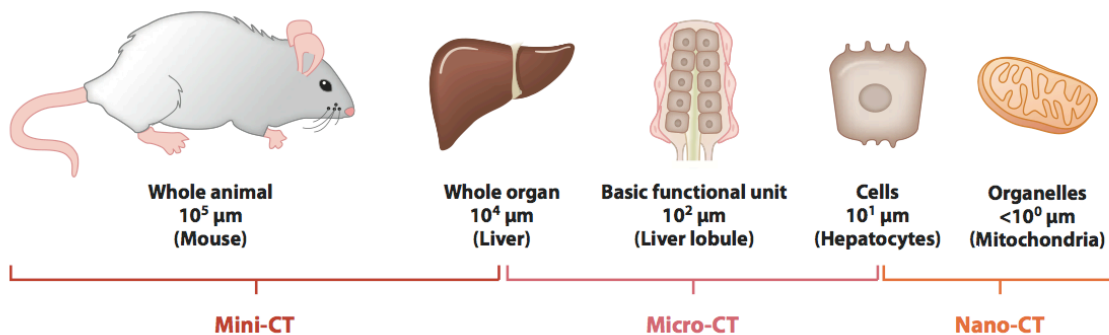


Abbildung 4: Die Größe von Nagetieren beträgt ca. 10 cm. Ihre Organe sind ca. 1 cm gross. Die Gewebe- Funktionseinheiten (Tissue basic functional units, BFU) sind 100 µm groß. Zellen sind ca. 5-10 µm groß. Zellorganellen sind <10µm groß. Die Mikro- CT bzw. Nano-CT kann alle diese Ebenen als Volumenbild darstellen.<sup>77</sup>

	Ganzkörper-Spiral-CT	Mikro-CT
<b>Geometrie</b>	Fächerstrahl (Detektor u. Röhre rotieren)	Fächer- oder Kegelstrahl (Objekt rotiert)
<b>Maximale Ortsauflösung</b>		
in der Schicht	0,25 – 1,0 mm	5 – 50 µm
Schichtdicke	0,50 -2,0 mm	5 – 50 µm
<b>Röhre</b>	Hochleistungs-CT-Röhre	Fein- oder Mikrofokusröhre
Strom	10 – 500 mA	40 – 100 µA
Spannung	80 – 140 kV	10 – 150 kV
Fokusgröße	0,7 – 1,5 mm	5 – 30 µm
<b>Detektor</b>	Zeilendetektor	Zeilen- oder Flächendetektor
<b>Objektdurchmesser</b>	5-50 cm	< 5 cm
<b>Matrixgröße</b>	512 <sup>2</sup>	512 <sup>3</sup> - 1024 <sup>3</sup>
<b>Speicherbedarf</b>	0,5 MB/Bild (16 bit) 160 MB/Datensatz	0,5 – 2,1 MB/Schicht (16 bit) 270 – 2150 MB/Datensatz
<b>Volumenscanzeiten</b>	20 – 40 s (Thorax)	Minuten bis Stunden

Tabelle 2: Vergleich der Eigenschaften der Mikro- CT mit der Spiral- CT. Modifiziert nach Engelke et al.<sup>78</sup>

### 1. 3. 2 Mikro-Computertomographie

Die Mikro-Computertomographie ist ein recht neues radiologisches Verfahren, das die Abbildung von Strukturen im Mikrometerbereich, vergleichbar mit der Auflösung eines Lichtmikroskops, ermöglicht.<sup>79</sup> Die Entwicklung der Mikro-Computertomographie (Mikro-CT) revolutionierte die biomedizinische Forschung, da dieses nicht-invasive bildgebende Verfahren die Untersuchung von Nagetiermodellen wie z.B. Ratten im Mikrometerbereich möglich macht.<sup>80</sup> Objekte bzw. Organe und Gewebe können durch die nicht-destruktive, kontinuierliche Erstellung von Schnittbildern im Ganzen dreidimensional visualisiert und hinsichtlich morphologischer Eigenschaften beurteilt

werden.<sup>81</sup> Knochengewebe ist auf Grund seiner Stabilität und wegen der hohen Röntgendichte seiner mineralisierten Anteile als Forschungsobjekt besonders gut geeignet.<sup>81</sup> Um die Morphologie und Mikroarchitektur des Knochengewebes, die in der Pathophysiologie der Osteoporoseentstehung eine große Rolle spielen<sup>34</sup> zu analysieren, ist die Anwendung heute bereits Goldstandard.<sup>82</sup> So können histomorphometrische Parameter, wie zum Beispiel Knochenoberfläche, Knochenvolumen, Anzahl, Dicke und Abstand der Trabekel untereinander dreidimensional bestimmt werden.<sup>34</sup> Die ersten Mikro-CT Geräte wurden Anfang der 1980er Jahre auf den Markt gebracht. 1989 gelangen Feldkamp et al. eine erste dreidimensionale Darstellung von knöchernen Mikrostrukturen in vitro mit einer Auflösung von 30-50 µm isotroper Voxelgröße.<sup>83,84</sup> Heute ist die Voxelauflösung im Bereich von 1-50 µm möglich (siehe auch Abbildung 4).<sup>77</sup> Durch die kontinuierliche Verbesserung der bildanalytischen Verfahren und der Erforschung neuer Kontrastmittel besteht heute auch die Möglichkeit hochauflösende Weichteiluntersuchungen z.B. von Blutgefäßen, Tumoren und Organen durchzuführen.<sup>77,85-87</sup> Die Mikro-CT stellt somit eine realistische Alternative zur quantitativen Histologie dar.<sup>86</sup>

Der technische Aufbau der Geräte ähnelt dem klinischer Computertomographen, bestehend aus einer Strahlungsquelle, einem Schlitten auf dem die Probe angebracht wird und einer CCD-(Charged-Coupled-Device) Detektorkamera oder einem Flachbilddetektor (siehe Abbildung 5).

Ein entscheidender Unterschied zu klinischen CTs ist natürlich die weitaus höhere Ortsauflösung der Mikrotomographen. Dies ist durch den Einsatz von Synchrotronstrahlungsquellen oder von verbesserten Fein- & Mikrofokusröntgenröhren möglich. Wobei sich für erstere eine Parallelstrahlgeometrie ergibt, deren Auflösung von der des Detektors bestimmt wird. Letztere senden Fächer- oder Kegelstrahlen aus. Hier ist die Fokusgröße der Röntgenröhren, die durch den Einsatz von Transmissions- oder Reflexionsanoden weiter reduziert werden kann, entscheidend. Eine Reduktion der Fokusgröße führt aber ebenfalls zu einer reduzierten Leistung der Röntgenröhre. Dadurch ist auch die Röntgenquantenzahl limitiert. Diese muss aber für eine optimale Auflösung bei sinkender Probengröße eigentlich steigen. Um die gewünschte hohe Auflösung der Mikro-CT zu realisieren, muss die Probengröße also auf wenige cm<sup>3</sup> limitiert werden. Außerdem verlängert sich die Messzeit auf mehrere Stunden.<sup>78</sup>

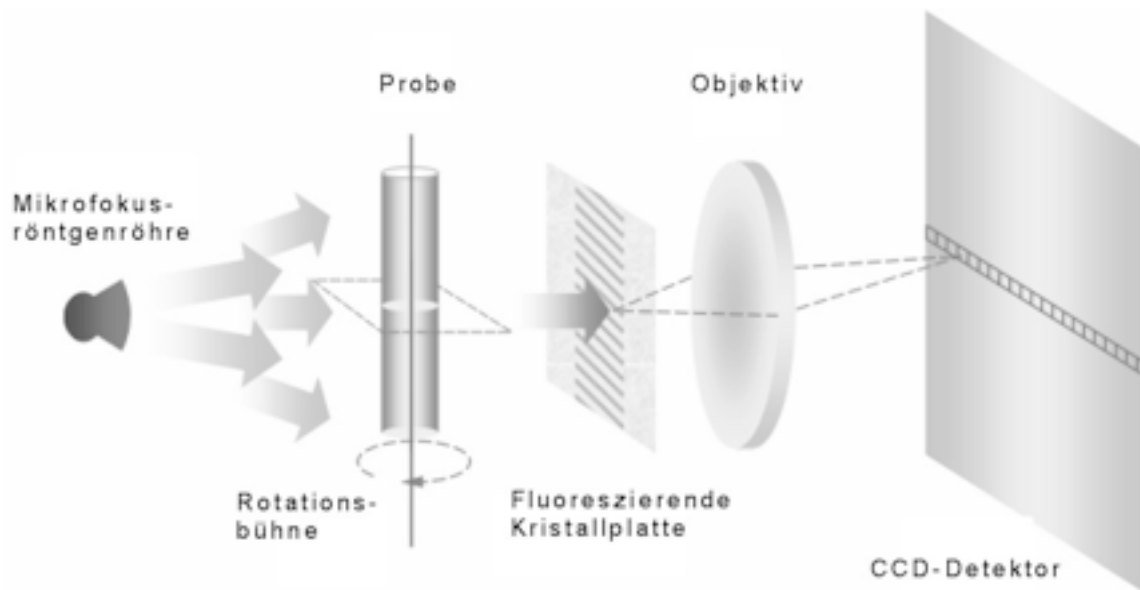
Im Gegensatz zu klinischen CTs rotieren nicht Strahlungsquelle und Detektor um das



Untersuchungsobjekt, sondern die Probe selbst kreist in definierbaren Winkelschritten um eine vertikale Achse.<sup>88</sup> Um die Projektion zu optimieren, kann die Probe auch längs der Achse bewegt werden. Allerdings ist bei hoher geometrischer Vergrößerung die Brennfleckgröße limitierend. Das Projektionsbild auf dem Detektor wird -mit anderen Worten- unscharf, wenn das Objekt zu nah an die Strahlungsquelle gefahren wird.<sup>86</sup>

Die 12bit-CCD- Kamera ist an eine 25 Mikrometer dicke, aus Caesiumiodid und Thallium bestehende, Szintillatorschicht gekoppelt.<sup>89</sup> Diese generiert aus der von der Strahlungsquelle emittierten Strahlung ein Lichtsignal, welches über Fiberoptik an die Kamera weitergeleitet wird.<sup>88</sup> Ein digitaler Frame-Grabber dient der intelligenten Digitalisierung und Weitergabe des Bildmaterials an die Computerarbeitsplätze. Die durch Feldkamp etablierte Rückprojektionstechnik dient der Umwandlung der Daten in isotrope, axiale Schnittbilder, die anschließend als dreidimensionaler Körper dargestellt werden. Die einzelnen Bilder haben bei einer Akquisitionsmatrix von 1024x 1024 Bildpunkten eine Größe von je 1MB, der Rekonstruktionsvorgang dauert circa sechs Stunden.<sup>86</sup> Alternativ werden in den neusten Geräten sogenannte Flachbilddetektoren eingesetzt. Indirekte Flachbilddetektoren bestehen ebenfalls aus einem Szintillator, der entweder aus Gadolinium- Oxysulfid oder Caesiumiodid besteht und die Röntgenstrahlen in Licht umwandelt. Dahinter befindet sich ein Halbleiter aus amorphem Silizium. Um das Licht in Elektronen umzuwandeln wird eine Fotodiode eingesetzt. Ein Kondensator speichert diese Ladung und durch einen ebenfalls integrierten Transistor werden die Pixel dann separat ausgelesen. Die Matrixgröße liegt hier zwischen 2000x 2000 und 3000x 3000 Bildelementen.

Um die Bilddatensätze schlussendlich analysieren zu können, bietet sich der Einsatz einer Bildanalysesoftware wie zum Beispiel ANALYZE® (Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, MN, USA) an.<sup>90</sup>



*Abbildung 5: Schematische Darstellung der Mikro-CT-Technik mit Kegelstrahlgeometrie und CCD- Detektor. Abbildung von E.L. Ritman, Department of Physiology and Biomedical Engineering, Mayo Clinic, Rochester, MN, US<sup>91</sup>*

---

#### **1. 4 Ziel und Fragestellung der Arbeit**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich im Rahmen des Sonderforschungsbereiches Transregio 79 (SFB/TR 79) mit der osteoporotischen Frakturheilung. Um Unterschiede in der physiologischen und pathologischen Knochenheilung zu erkennen, werden osteoporotische Femora von Ratten mit Kontrollgruppen hinsichtlich der Fläche neugebildeten Knochengewebes und der Neovaskularisation im Frakturspalt verglichen. Außerdem wird evaluiert, welche Rolle die Defektgröße eines frakturierten Knochens in der osteoporotischen Knochenheilung spielt. Diese Fragen sollen mit Hilfe mikrotomographischer Untersuchungen so weit wie möglich beantwortet werden. Mit Hilfe dieses bildgebenden Verfahrens soll ebenfalls herausgefunden werden, ob sich das verwendete Tiermodell zur weiteren Osteoporoseforschung, beispielsweise in Bezug auf den Einsatz von Knochenersatzmaterialien, eignet.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

Das Projekt ist Teil des T2- Projektes des Sonderforschungsbereiches/Transregio 79 (SFB/ TRR 79) unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Alt (Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, UKGM).

### **2.1 Tiermodell**

Das im Folgenden beschriebene osteoporotische Tiermodell mit metaphysärem Frakturdefekt wurde von Alt et al in der Unfallchirurgie (siehe oben) entwickelt und publiziert<sup>64</sup>. Diese Arbeit stellt eine Fortführung des Modells dar.

Die Tierversuche werden, nach Genehmigung durch das Regierungspräsidium am 03.08.2010, gemäß § 8 Abs. 1 des Deutschen Tierschutzgesetzes (GVbl.I S. 307, 24.05.2007), durchgeführt. Die Erlaubnis hat das Aktenzeichen V54-19c20-15(1) GI20/28 Nr. 92/2009.

Die 26 weiblichen Sprague- Dawley Ratten stammen aus der Charles River GmbH in Sulzfeld, Deutschland.

Die Tiere werden in Gruppen von zwei bis vier Ratten in Plastikkäfigen mit Filter gehalten und haben freien Zugang zu Nahrung und Wasser.

Nach einer vierwöchigen Adaptionsphase in der sich die Tiere an ihre neue Lebenssituation gewöhnen konnten, werden sie randomisiert in zwei Gruppen eingeteilt. 13 Ratten werden durch die Unfallchirurgie des Universitätsklinikum Gießen (siehe oben) ovariectomiert und erhalten eine spezielle Diät. Die anderen 13 Ratten bilden die Kontrollgruppe, die lediglich eine Sham Operation erhält.

Drei Monate nach oben genannter Operation wird die Knochendichte der beiden Gruppen mittels DXA ermittelt und miteinander verglichen.

In einer weiteren Operation wird sowohl die Gruppe der ovariectomierten Tiere, als auch die Kontrollgruppe im Bereich des linken Femurs osteotomiert. 12 Ratten (sechs OVX- und sechs Sham- Tiere) wird ein Knochendefekt von drei Millimetern gesetzt. Weiteren 14 Ratten wird ein fünf Millimeter großer Defekt zugefügt.

## **2. 2 Induktion der Osteoporose**

Der osteoporotische Knochenbefund wird durch eine bilaterale Ovariectomie und eine spezielle, auf dem Modell von Heiss et al basierende Diät herbei geführt<sup>92</sup>. Die Nahrung, die die Tiere zur Unterstützung der Induktion der Osteoporose erhalten, ist eine calcium-, phosphor-, vitamin D3-, soja- und phytoöstrogenfreie Diät (Altromin-C1034, Altromin Spezialfutter GmbH, Lage, Germany). Die Kontrollgruppe erhält ein Standardfutter.<sup>92</sup>

Die Operation wird in Vollnarkose, durch die Injektion von Ketamin (62.5 mg/Kg/KG, Hostaket®, Hoechst), und Xylazin (7.5 mg/Kg/KG, Rompun®, Bayer), durchgeführt. Die Eröffnung des Operationsgebiets erfolgt von der Rückenmittellinie aus. Die Ovarien werden ektomiert. In der Kontrollgruppe wird eine Laparotomie ohne Ovariectomie durchgeführt.

## **2. 3 Evaluation der Knochendichte mittels DXA**

Die Knochendichte wird sowohl in der OVX-Gruppe, als auch in der Sham-Gruppe zwei Mal mittels Doppellröntgen- Absorptionsmetrie (Dual- Energy X-ray Absorptiometry, DXA, Lunar Prodigy, GE Healthcare, Germany) bestimmt. Das erste Mal unmittelbar nach der Operation, das zweite Mal drei Monate später. Beide Male erfolgt die Knochendichtemessung in der Wirbelsäule und im rechten Femur unter Vollnarkose und wird anschließend mit Hilfe der enCORE software (GE Healthcare, v. 13.40) analysiert.<sup>64,90</sup>

## **2. 4 Femur Osteotomie**

Drei Monate nach der Ovariectomie bzw. nach Sham Operation und nach der zweiten Knochendichtemessung werden die Tierversuche zur Erstellung eines metaphysären Osteotomie-Modells an der linken distalen Femurmetaphyse der Ratten unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Versuchstiere erhalten eine Vollnarkose mit Ketamin (62.5 mg/Kg/KG, Hostaket®, Hoechst), und Xylazin (7.5 mg/Kg/KG, Rompun®, Bayer). Nach Lagerung der Tiere auf der rechten Seite, wird der linke Femur mit Povidon Jod (Braunol®, Braun, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. An der seitlichen, unteren Hälfte des linken Oberschenkels wird ein vier Zentimeter langer

Hautschnitt gesetzt und die Muskelfaszie durchtrennt. Das Femur wird zwischen dem M. vastus lateralis und dem lateralen Kopf des M. biceps femoris dargestellt und vom lateralen Kondylenbereich bis zum mittleren Femurschaft freigelegt. Anschließend wird eine Mini-T-Platte mit sieben Schraublöchern (Leibinger® XS-miniplate, Stryker®, Schönkirchen, Germany) auf dem mittleren und distalen Oberschenkelknochenbereich fixiert. Mit Hilfe einer speziell angefertigten Sägevorrichtung wird eine distale, transversale Osteotomie in der metaphysären Region des Femurs knapp proximal des epiphysealen Gelenkknorpels durchgeführt und ein drei bzw. fünf Millimeter großer, keilförmiger Knochendefekt durch eine oszillierende Säge (Piezosurgery® 3, Saw blade OT7S-3, Mectron, Germany) gesetzt (siehe Abbildung 6). Zuletzt wird der Defekt mit sterilem Wasser gereinigt, die Wunde verschlossen und die Haut mit 4/0 Prolene- Nahtmaterial genäht. Postoperativ werden die Ratten individuell untergebracht und haben freien Zugang zu Wasser und ihren zugeteilten, oben beschriebenen, Diäten.

Vier der entnommenen Knochenkeile werden in die Experimentelle Radiologie des UKGM überführt, wo die Größe des Defekts und die trabekuläre Knochenstruktur mittels Untersuchung im Mikrocomputertomografen bestätigt werden sollen (siehe Abbildung 7, C/D/E).

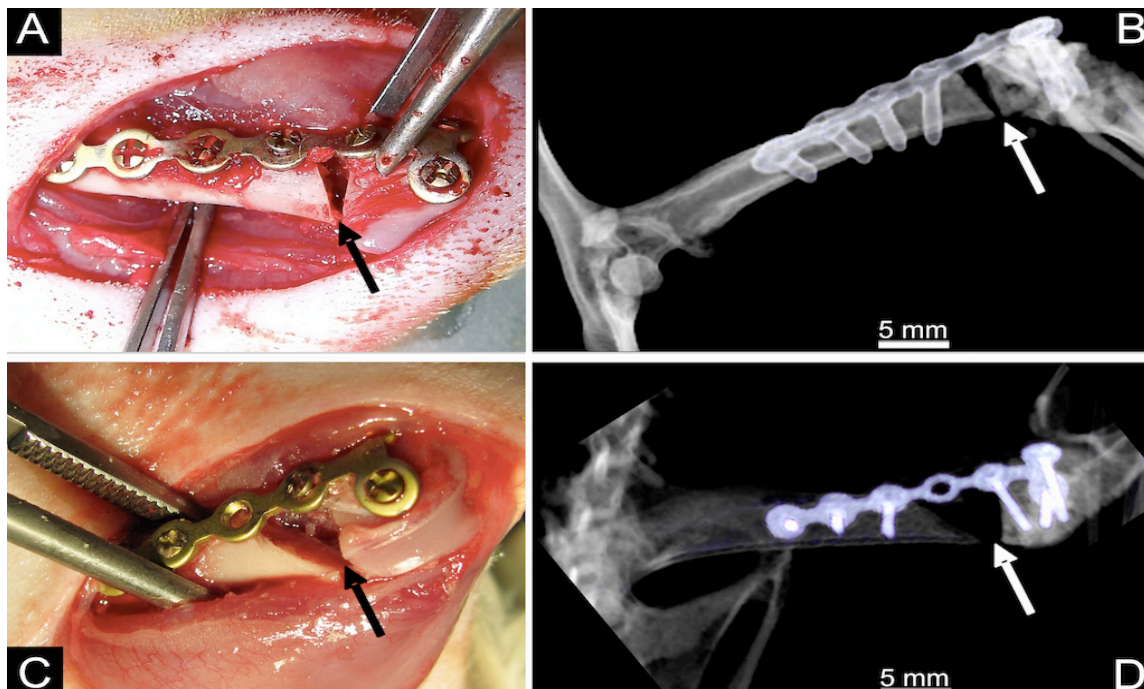


Abbildung 6: Ansicht auf A) 3-mm- Defekt C) 5-mm- Defekt mit Plattenosteosynthese am Femur lateral B) D) CT- Aufnahme postoperativ, keilförmiger Defekt und Plattenosteosynthese gut sichtbar

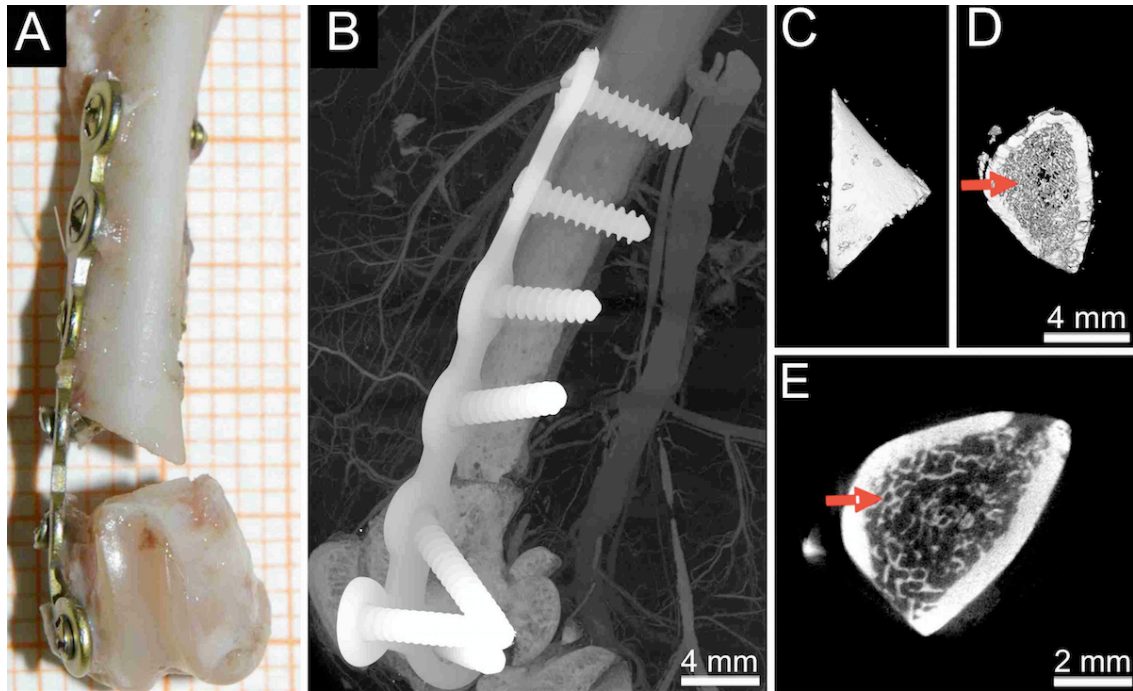


Abbildung 7: A) Makroskopische Darstellung eines Femurs mit keilförmigem Defekt und eingefügter Plattenosteosynthese B) Mikro-CT Aufnahme des Femurs. Neben der Plattenosteosynthese und dem Defekt, sind umliegende Gefäße im Weichteilmantel erkennbar C) entnommener Knochenkeil, Ansicht von anterior auf die Kortikalis D) E) Axiale Schnittbilder des entnommenen Knochenkeils, Pfeile weisen auf die trabekulären Knochenstrukturen, die die metaphysäre Lokalisation beweisen

## 2.5 Probengewinnung

Nach sechs Wochen werden die Tiere in Vollnarkose euthanasiert. Um die Gefäße später bildgebend darstellen zu können, wird das röntgendichte, intravasal aushärtende Kontrastmittel Microfil® (Flow Tech, Inc., Carver, Massachusetts, USA) intraarteriell injiziert. Dazu wird das Abdomen der Ratten eröffnet, das Peritoneum durchtrennt und der Situs ausgelagert. Die Aorta wird oberhalb der Aa. Renales antegrad punktiert und fixiert. Um einer Agglutination vorzubeugen, wird eine heparinisierte Kochsalzlösung (10ml NaCl 0.9% mit 1000 IU Heparin) über die Aorta in das Gefäßsystem infundiert und dieses so lange gespült bis kein Blut mehr über den venösen Ausstrom austritt. Daraufhin wird Microfil® injiziert. Um festzustellen ob das Kontrastmittel homogen im gesamten Gefäßsystem verteilt ist, werden die Hinterläufe der Tiere inspiziert. Diese verfärben sich bei ordnungsgemäßer Injektion gelb. Nach circa 30 Minuten können sowohl die operierten als auch die kontralateralen Femora explantiert werden, da dann das Microfil® ausgehärtet ist. Zur Fixierung des Gewebes werden die Femora in neutral gepufferter 4%iger Formalinlösung gelagert.

## 2. 6 Bildgebende Verfahren

Die Proben werden in der Experimentellen Radiologie (Abt. für Diagn. Radiologie, UKGM) in einem Mikrocomputertomografen (Skyscan 1173) der Fa. Bruker (ehemals SkyScan), Kontich, Belgien untersucht.

### 2. 6. 1 Mikro- Computertomographie

Wie oben bereits erwähnt werden vier entnommene Knochenkeile im Mikrocomputertomografen untersucht. Außerdem werden die 26 operierten Femora der Versuchstiere mit implantierter Osteosynthese als Ganzes gescannt. Nach dem ersten Scan Vorgang wird das Osteosynthesematerial entfernt und die Tiere zur Evaluation des Gefäßvolumens erneut gescannt. Auf Grund von Plattenbrüchen verringert sich die Probenzahl auf n= 21 mit jeweils fünf OVX- und Sham- Versuchstieren in der 3- mm- Gruppe, fünf OVX und sechs Sham Tieren in der 5-mm- Gruppe.

Der Mikro- Computertomograph Skyscan 1173 besteht aus einer Mikrofokusröntgenröhre, dessen Fokusgröße kleiner als fünf Mikrometer ist und mit Kegelstrahlgeometrie arbeitet. Die maximale Röhrenspannung beträgt 130 kV und die maximale Leistung acht Watt. Aufgrund dieser niedrigen Leistung mit der Mikrofokusröhren nur betrieben werden können, resultieren sehr lange Scanzeiten von mehreren Stunden. Vor dem Strahlenaustrittsfenster befinden sich drei Filter: ein 0.5 mm und ein 1.0 mm starker Aluminiumfilter und ein 0.25 mm starker Messingfilter. Sie dienen der Strahlenaufhärtung und kommen wahlweise, je nach Probenbeschaffenheit zum Einsatz.

Als Kamera fungiert ein Flächendetektor mit einer Matrix von 2240x 2240 Pixeln. Die maximale Ortsauflösung liegt im Bereich von vier bis fünf Mikrometern. Zwischen der Mikrofokusröntgenröhre und dem Flachbilddetektor befindet sich die Probenbühne auf welcher der Probenhalter befestigt wird.<sup>93</sup> Dabei sind Röntgenröhre und Kamera fest installiert. Die Probenbühne lässt sich, abhängig von der gewünschten Vergrößerung, zwischen Röhre und Kamera positionieren.

Für die Femora werden Plastikröhrchen (Fa. Sarstedt®) mit einem maximalen Fassungsvermögen von 50 ml verwendet. Das Femur wird senkrecht in dem Röhrchen positioniert (Hüftkopf oben/ Kondülen unten). Dann wird das Plastikröhrchen mit Hilfe

eines Spezialwachs (Periphery wax, Surgident ®) auf dem tellerförmigen Probenhalter angebracht.

Die Probe kreist dann im CT in Winkelschritten von 0.2 Grad um ihre vertikale Achse bis 360 Grad erreicht sind. Bei jedem dieser definierten Rotationsschritte werden 6 Frames bzw. Aufnahmen gemacht. Wenn diese übereinander gelagert werden, verbessert sich das Signal- Rausch- Verhältnis innerhalb eines Bildes. Die Belichtungszeit beträgt jedes Mal 700 ms. Die Aufnahmezeit pro Rotationsschritt beträgt dann also 4.2 Sekunden. Insgesamt benötigt ein Scan circa. sechs Stunden Zeit. Die während des Scanvorgangs gemessenen Rohdatensätze werden als TIFF- Dateien mit einer Grauwerttiefe von 16 bit abgespeichert. Nach Beendigung des gesamten Scanvorgangs werden diese mittels Feldkamp- Flächenstrahl- Algorithmus in zweidimensionale, axiale Schnittbilder umgewandelt. Jedes Bild setzt sich aus isotropen Voxeln zusammen. Sie werden zu dreidimensionalen Datensätzen mit 8-bit Grauwertskala und isotroper Voxelgröße von 13.8 Mikrometer umgewandelt. Auf Grund unterschiedlicher Probengröße und der limitierenden Matrix, beträgt die isotrope Voxelgröße im zweiten Scanvorgang 8.14 Mikrometer.

## **2. 6. 2 Quantitative Bildanalyse**

Die Bildanalyse wird mit den Bildbearbeitungssoftwares DataViewer® (Version: 1.4.0 (64bit)), CT- Analyser® (Version: 1.14.4.1+ (64bit)) und Analyze® (Version: 10.0 Biomedical Imaging Resource, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) realisiert. Erstere bildet die Grundlage für die detaillierten Bildanalysen. Mit Hilfe von CT- Analyser® soll anschließend die Knochenneubildung evaluiert werden. Die Vaskularisierung der Proben wird mit Analyze® untersucht.

### **DataViewer®**

Das Programm DataViewer® erlaubt die Bearbeitung bzw. Drehung und Ausrichtung des Datensatzes in drei Dimensionen. So trägt das Programm dazu bei, dass morphometrische Messungen von Knochenstrukturen akkurat und präzise durchgeführt werden können. Die Ausrichtung der Bilddatensätze der gescannten Femora ist z.B. meist nicht axial.

In jeder der drei Ebenen wird ein Schnittbild in der Mitte der Probe ausgewählt.

Zunächst wird die anteriore Kante der Femora in der transaxialen Ansicht parallel zum



unteren Bildrand ausgerichtet. Anschließend wird die mediale Femur Kante in der koronaren und sagittalen Ebene ebenfalls dem vertikalen Bildrand angeglichen. Die Datensätze, die nun in drei Dimensionen axial ausgerichtet sind, werden als transaxialer Datensatz gespeichert um die Bildanalyse fortzuführen.

#### CT- Analyser®

Mit dem Programm CT- Analyser® (Version: 1.14.4.1+ (64bit)) soll das neugebildete Knochengewebe in dem Frakturspalt quantifiziert werden. Um das neugebildete Knochengewebe zu evaluieren, wird die Frakturzone jeder einzelnen Probe von Hand festgelegt und in jedem Querschnitt vermessen.

Zunächst werden manuell Regions of Interest (ROI) bestimmt, die die Frakturzone und somit auch Knochen, Weichteilgewebe und Gefäße enthalten. Um die Frakturzone festzulegen, wird jede Probe in transaxialer Ansicht untersucht. Sowohl distal als auch proximal wird der erste Schnitt ausgewählt, auf dem kontinuierlich Kortikalis und spongiöses Knochengewebe erkennbar ist. Somit ist sichergestellt, dass sich die vollständige Frakturzone zwischen diesen beiden Schnitten befindet. Auf Grund von individuellen Unterschieden ist jede ROI verschieden groß.

Anschließend wird das neu gebildete Knochengewebe jeweils in der Sagittal- und in der Koronarebene im Querschnitt ( $\text{mm}^2$ ) ausgemessen. Dabei wird zwischen enossaler und lateraler bzw. periostaler Knochenneubildung unterschieden. Als Grenze zwischen lateral und enossal wird die Kortikalis jeweils rechts und links optisch miteinander verbunden. Makroskopisch lässt sich das neugebildete Knochengewebe auf Grund seiner feinen trabekulären Strukturen und seiner Lokalisation gut von dem ursprünglich vorhandenen Knochen abgrenzen (siehe Abbildung 8).

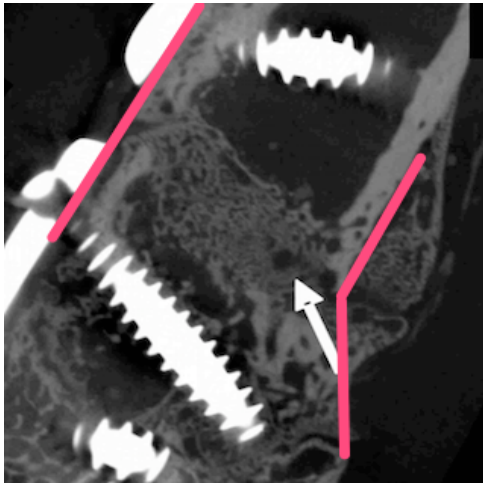


Abbildung 8: 3-mm- Defekt, Frakturzone vergrößert dargestellt. Die knöcherne Durchbauung ist deutlich sichtbar. Der Pfeil weist auf das neugebildete Knochengewebe. Die roten Markierungen zeigen die Begrenzung zwischen endosalem und lateralem Bereich

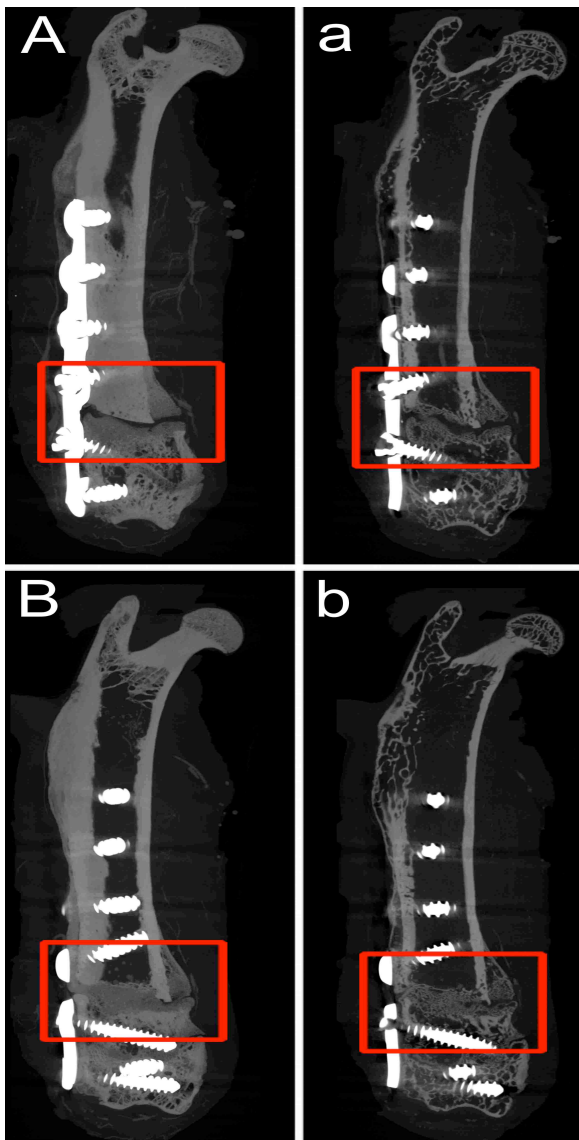


Abbildung 9: Darstellung der knöchernen Durchbauung der Frakturzonen (roter Kasten)

Analyze®

Das Gefäßsystem, das zusammenhängend mit Kontrastmittel bzw. mit Mikrofil gefüllt ist, soll nach dem zweiten Scanvorgang ohne Plattenosteosynthese untersucht werden. Mit Hilfe von Analyze®10.0 (Biomedical Imaging Resource, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) bzw. mittels unterschiedlicher Grauwerte von Knochen und Weichteilen können die Gefäße segmentiert werden.

Um die Gefäße bzw. das Weichteil- und Knochengewebe quantifizieren zu können, soll das Grauwertbild in ein Binärbild umgewandelt werden, um die jeweiligen Bereiche segmentieren zu können.

Da sich der Grauwertbereich des kalzifizierten Knochengewebes und die Absorption des kontrastierten Gefäßsystems überlappen, wird das Knochengewebe manuell segmentiert und gelöscht. So bleibt nur das Weichteilgewebe mit eingeschlossener Vaskularisierung übrig. Die Gewebefläche ( $\text{mm}^2$ ) und der Gefäßanteil ( $\text{mm}^2$ ) werden dann, durch weitere manuelle Segmentationsschritte bestimmt. Dabei wird der Volumenanteil an Gefäßen (Vascular Volume Fraction, VVF) als Fraktion der manuell festgesetzten Volume of interests (VOI) betrachtet.

## **2. 7 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der im Verlauf der Untersuchungen gewonnenen Daten erfolgt mit Hilfe der Statistik Software JMP 6.0 (SAS, CA, USA). Alle Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (MW  $\pm$  SEM) angegeben. Durch die univariate Varianzanalyse (ANOVA) werden statistische Unterschiede zwischen den Gruppen untersucht. Das neugebildete Knochengewebe ist dabei die Zielvariable. Osteoporose bzw. die Defektgröße sind die Einflussvariablen, deren Wirkung auf die Zielvariable evaluiert werden soll. In Kombination mit ANOVA wird der Tukey- Kramer Gegentest angewendet. Die Berechnung des Signifikanzniveaus der einzelnen Gruppen wird mit Hilfe des unpaaren Student t-Tests durchgeführt. Die statistische Wahrscheinlichkeit wird in allen Berechnungen mit  $p < 0.05$  als signifikant gewertet.

### **3. ERGEBNISSE**

Von den 26 Versuchstieren überleben alle Ratten die gesamte Versuchszeit von 18 Wochen ohne Komplikationen. Somit werden die Ergebnisse von 12 Versuchstieren, die einen Knochendefekt von drei Millimetern erhielten und von 14 Ratten, die der 5-mm- Versuchsgruppe angehörten, ausgewertet. Zunächst wird nur die Fläche des neugebildeten Knochengewebes evaluiert. Auf Grund von Plattenbrüchen verringert sich die Probenzahl nach Entfernung des Osteosynthesematerials auf n= 21 mit jeweils fünf OVX- bzw. Sham- Versuchstieren in der 3 mm Gruppe, fünf bzw. sechs OVX bzw. Sham Tieren in der 5 mm Gruppe. Diese Proben werden daraufhin wieder gescannt und die Vaskularisierung der Frakturzonen untersucht.

#### **3. 1 Osteoporose**

Die Induktion der Osteoporose war erfolgreich, wie in den bereits publizierten Daten von Alt et al<sup>64</sup> nachzulesen ist: So kann mit Hilfe von DXA nachgewiesen werden, dass sich der Ausgangswert der Knochendichte in allen Versuchstieren initial nicht signifikant unterscheidet. Drei Monate nach Ovariectomie und Diät bzw. nach Sham-Operation in der Kontrollgruppe, zeigt sich dann eine signifikante Differenz zwischen beiden Gruppen. Die OVX-Tiere weisen eine deutlich niedrigere Knochendichte auf.

#### **3. 2 Mikro-CT**

In der Mikro- CT wird sowohl die metaphysäre Lokalisation des Knochendefekts bestätigt, als auch die Knochenneubildung und Vaskularisierung der Frakturzonen evaluiert. Diesbezüglich wird die Fläche neugebildeten Knochengewebes und die Gefäßneubildung quantifiziert und die einzelnen Gruppen untereinander verglichen. Die Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt.

##### **3. 2. 1 Knochenkeil**

Um festzustellen ob der gesetzte Knochendefekt von drei bzw. fünf Millimetern tatsächlich metaphysär lokalisiert ist bzw. um zu bestätigen, dass es sich bei den

entnommenen Knochenkeilen um trabekuläres Knochengewebe handelt, werden die Proben im Mikro- CT gescannt.

Dort kann bei einer isotropen Voxelgröße von 1.2 Mikrometern bestätigt werden, dass die osteotomierten Knochenkeile trabekuläres Knochengewebe enthalten und die Operation somit in der metaphysären Region des distalen Femurs durchgeführt wurde. Die lateralen Enden der Knochenkeile sind in der 3-mm- Versuchsgruppe  $3\pm 0.2$  mm lang, in der 5-mm-Versuchsgruppe werden  $5\pm 0.3$  mm gemessen werden. (siehe Abbildung 7 und 10)

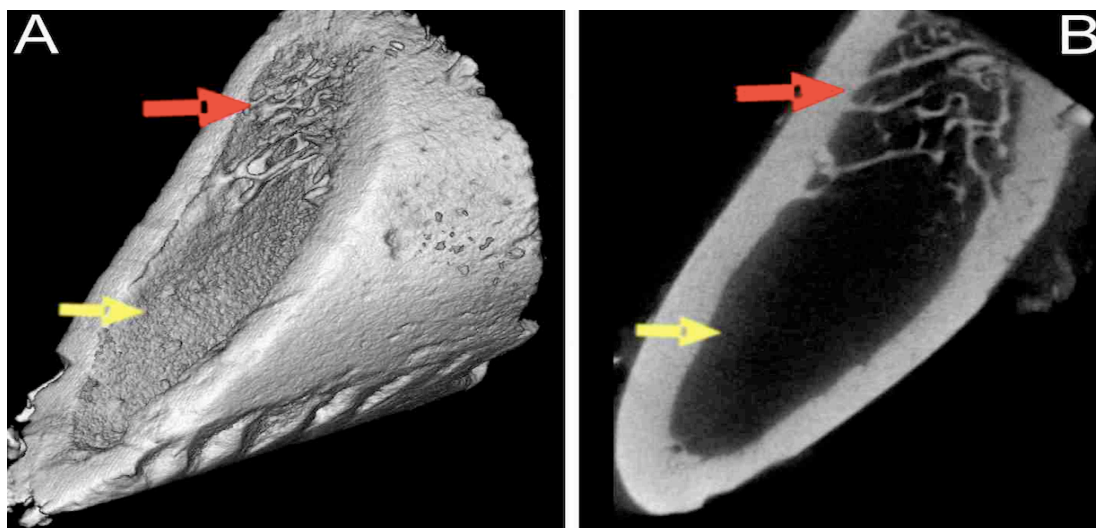


Abbildung 10: vergrößerte Ansicht des keilförmigen Osteotomiedefektes. Axiale Schnittbilder auf denen das Trabekelwerk (Pfeile) als Bestätigung der metaphysären Lokalisation der Osteotomie sichtbar ist

### 3. 2. 2 Knochenneubildung

Die explantierten Femora werden zunächst mit der Plattenosteosynthese gescannt um eine Übersichtsaufnahme zu erhalten und die Knochenneubildung zu evaluieren bzw. zu quantifizieren. Anschließend werden die Platten mit Schrauben entfernt und die Proben erneut gescannt um detaillierte Informationen über die Frakturzone und die Vaskularisierung zu erhalten. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Quantifizierung der Fläche neugebildeten Knochengewebes vorgestellt.

Die beiden unterschiedlichen Defektgrößen (drei Millimeter und fünf Millimeter) werden hinsichtlich knöcherner Durchbauung miteinander verglichen. Außerdem wird

untersucht ob der osteoporotische Knochenstatus einen Einfluss auf das makroskopisch beurteilbare neugebildete Knochengewebe in der Frakturzone hat.

In der Mikro-CT zeigt sich, dass im Frakturbereich aller Proben mit einem drei Millimeter großen Defekt -sowohl der OVX, als auch der Kontrollgruppe – neues Knochengewebe mit Brückenbildung entstanden ist.

Im Gegensatz dazu ist in allen Femora mit einem fünf Millimeter Defekt der Frakturspalt noch deutlich erkennbar und es findet sich keine Brückenbildung aus neuem Knochengewebe zwischen den Fraktarenden (siehe Abbildung 11 und 12).

### **3. 2. 2. 1 Drei- Millimeter- Defekt**

Der Mittelwert der Fläche neugebildeten Knochengewebes in der 3-mm- OVX- Gruppe beträgt  $4.6 \pm 2.9 \text{ mm}^2$ .

In der 3-mm- Kontrollgruppe beträgt die mittlere Knochenfläche  $4.0 \pm 4.0 \text{ mm}^2$ .

### **3. 2. 2. 2 Fünf- Millimeter- Defekt**

In der 5- mm- OVX- Gruppe beträgt die mittlere Fläche neugebildetes Knochengewebe  $3.3 \pm 3.3 \text{ mm}^2$ . In der 5- mm- Sham- Gruppe beträgt die Fläche neugebildeten Knochengewebes im Mittel  $2.0 \pm 1.8 \text{ mm}^2$ .

Der Vergleich der Flächen des neugebildeten Knochengewebes der 3-mm- OVX- Gruppe mit der 5-mm- OVX- Gruppe zeigte signifikante Unterschiede ( $p= 0.05$ , t- Test).

Auch der Vergleich der beiden Kontrollgruppen miteinander zeigte signifikante Unterschiede ( $p= 0.0064$ ). Somit kann geschlussfolgert werden, dass die Defektgröße einer Fraktur, sowohl eines osteoporotischen als auch eines gesunden Knochens, einen Einfluss auf die maximale Knochenneubildung hat.

Die Gegenüberstellung der Messergebnisse der osteoporotischen Knochenproben mit den Ergebnissen der Kontrollgruppe mit jeweils einem drei Millimeter großen Defekt zeigte keine signifikanten Unterschiede ( $p= 0.34$ , t- Test).

Auch der Vergleich der 5-mm-OVX- Gruppe mit der 5-mm- Sham- Gruppe zeigte keine signifikanten Unterschiede ( $p= 0.06$ , t- Test).

Basierend auf den Messergebnissen, die mit Hilfe der Software Analyze® aus den Mikro- CT Schnittbildern gewonnen wurden, scheint Osteoporose keinen Einfluss auf

die makroskopisch sichtbare und somit visuell quantifizierbare Knochenneubildung zu haben.

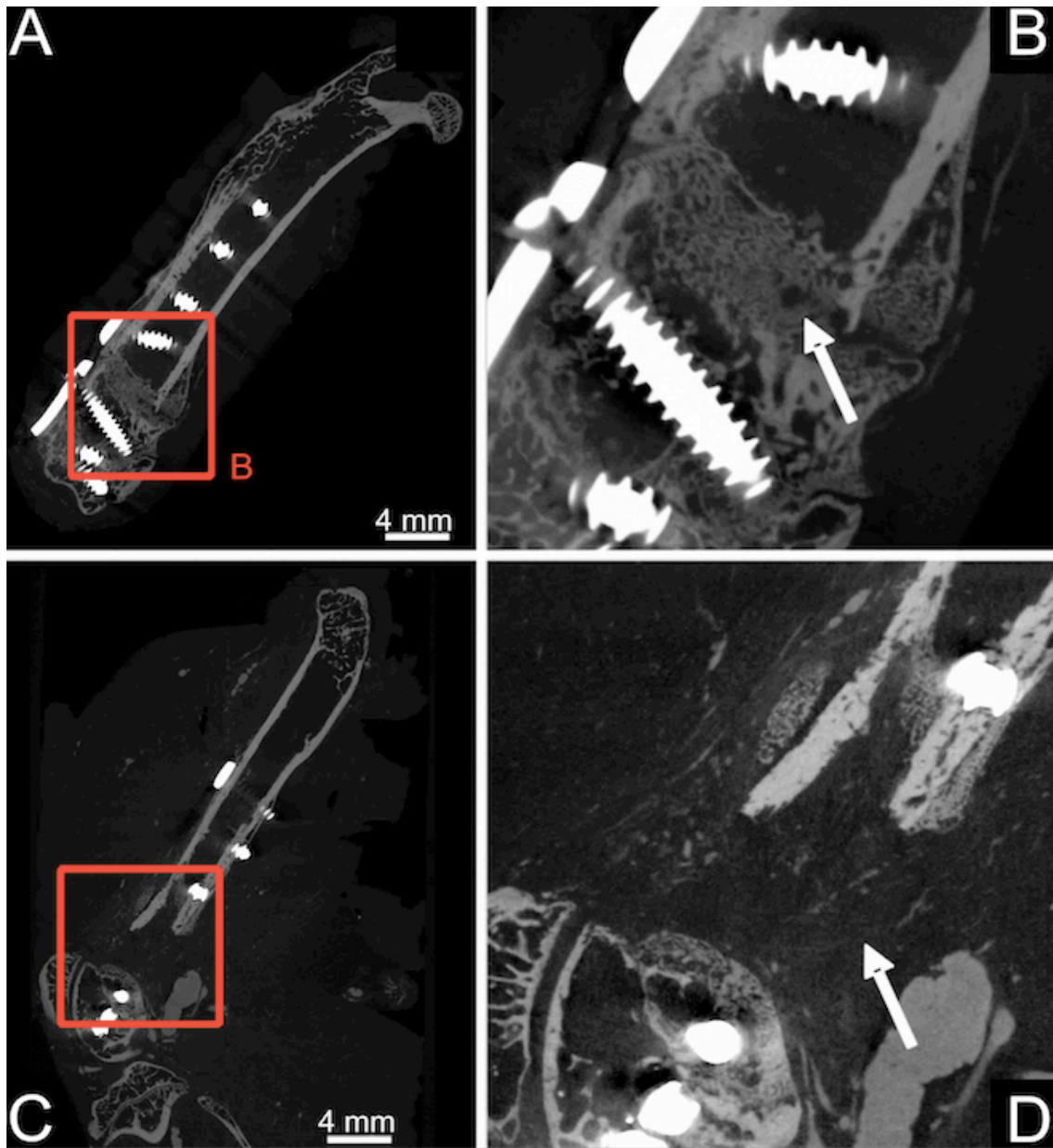


Abbildung 11: A) Übersichtsaufnahme eines Femurs im Mikro- CT mit 3-mm- Defekt B)Frakturzone vergrößert dargestellt. Die knöcherne Durchbauung ist deutlich sichtbar. Der Pfeil weist auf das neugebildete Knochengewebe C) Übersichtsaufnahme eines Femurs im Mikro- CT mit 5-mm- Defekt D) Frakturzone vergrößert dargestellt. Der Frakturspalt ist nicht durchbaut. Es zeigt sich kaum neugebildetes Knochengewebe (Pfeil).

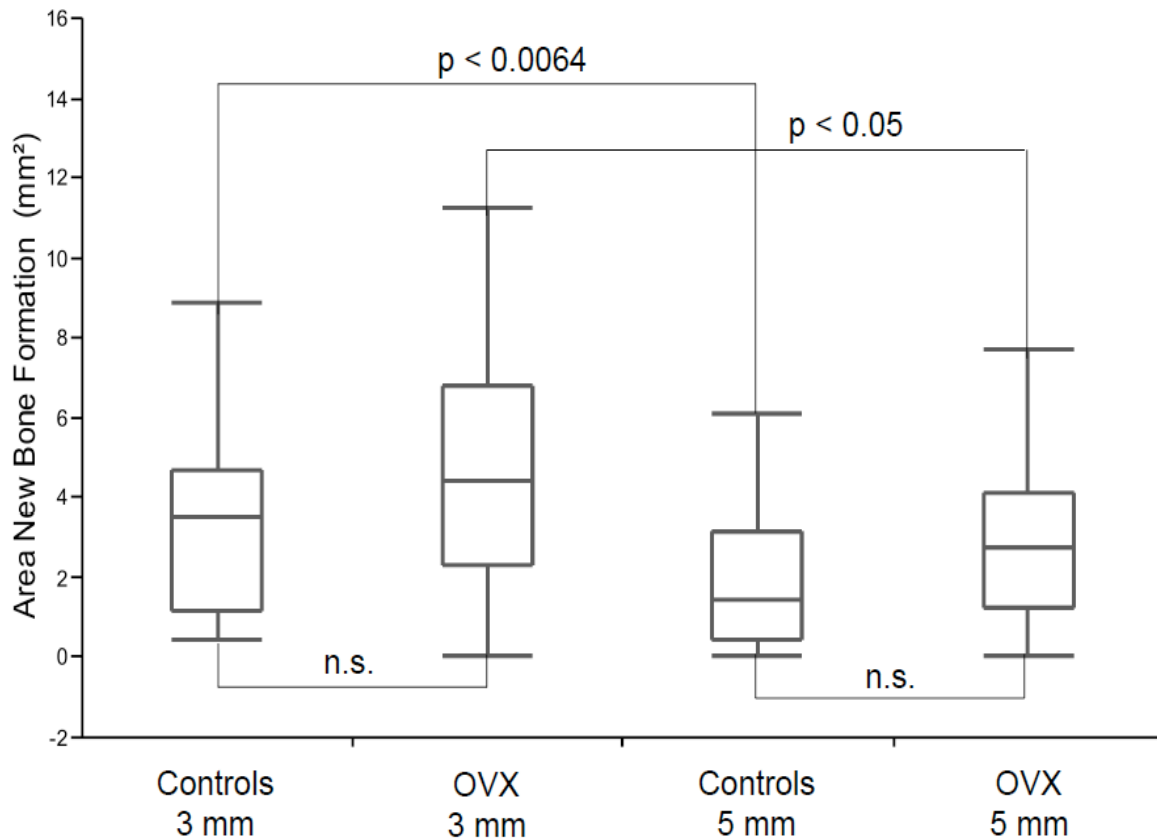


Abbildung 12: Boxplots des neugebildeten Knochengewebes (Area new bone formation) in  $\text{mm}^2$ . Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Fläche neugebildeten Knochengewebes zwischen den osteoporotischen Knochenproben mit einem 3-mm-Defekt (OVX 3 mm) und einem 5-mm-Defekt (OVX 5 mm) ( $p=0.05$ ). Der Unterschied des maximal neugebildeten Knochengewebes zwischen den Kontrollgruppen mit einem 3-mm- und einem 5-mm-großen Defekt (Controls 3 mm und Controls 5 mm) ist ebenfalls signifikant. Die Fläche neugebildeten Knochengewebes innerhalb der Gruppen mit der gleichen Defektgröße unterscheidet sich weder in der 3-mm- noch in der 5-mm- Gruppe signifikant.

### 3. 2. 3 Vaskularisierung

Nach der operativen Entfernung der Plattenosteosynthese, wird die Vaskularisierung der Frakturzone evaluiert und quantifiziert.

Im Folgenden sollen sowohl der Einfluss der Defektgröße auf die Vaskularisierung, als auch die Wirkung der Osteoporose auf die Gefäßneubildung bei konstanter Defektgröße verglichen werden.

In der Mikro- CT zeigt sich, dass in der 3- mm Defekt Gruppe, sowohl in der OVX- Gruppe, als auch in der Kontroll- Gruppe, eine Gefäßneubildung stattgefunden hat. In der 5- mm- Kontroll- Gruppe ist die Gefäßneubildung ebenfalls ausgeprägt. Die Unterschiede zwischen diesen drei Gruppen sind nicht signifikant. Lediglich in der 5-



mm- OVX Gruppe ist der prozentuale Anteil an Gefäßen bezogen auf das gesamte Gewebvolumen im Frakturspalt signifikant niedriger ( $p= 0.04$ , t- Test) (siehe Abbildung 13& 14).

### **3. 2. 3. 1 Drei- Millimeter- Defekt**

Das mittlere Gesamtvolumen der mit Kontrastmittel gefüllten Gefäße innerhalb der Frakturzone der 3-mm- OVX- Gruppe beträgt  $0.6 \pm 0.3 \text{ mm}^3$ . Das mittlere Gesamtvolumen des Defekts zwischen den beiden Fraktarenden beträgt  $10.0 \pm 4.6 \text{ mm}^3$ . Die Volumenfraktion der Gefäße innerhalb der Frakturzone (Vascular Volume Fraction, VVF) ergab im Mittel bei Analyse der Mikro-CT Bilder einen Wert von  $6.6 \pm 4.2\%$ .

Das mittlere Gesamtvolumen der mit Kontrastmittel gefüllten Gefäße innerhalb der Frakturzone der 3-mm- Sham- Gruppe beträgt  $0.8 \pm 0.6 \text{ mm}^3$ . Das mittlere Gesamtvolumen des Defekts zwischen den beiden Fraktarenden beträgt  $28.2 \pm 25.3 \text{ mm}^3$ . Die Volumenfraktion der Gefäße innerhalb der Frakturzone (Vascular Volume Fraction, VVF) ergab im Mittel bei Analyse der Mikro-CT Bilder einen Wert von  $5.3 \pm 4.8\%$ .

### **3. 2. 3. 2 Fünf- Millimeter- Defekt**

Das mittlere Gesamtvolumen der mit Kontrastmittel gefüllten Gefäße innerhalb der Frakturzone der 5-mm- OVX- Gruppe beträgt  $1.1 \pm 0.8 \text{ mm}^3$ . Das mittlere Gesamtvolumen des Defekts zwischen den beiden Fraktarenden beträgt  $36.1 \pm 28.3 \text{ mm}^3$ . Die Volumenfraktion der Gefäße innerhalb der Frakturzone (Vascular Volume Fraction, VVF) ergab im Mittel bei Analyse der Mikro-CT Bilder einen Wert von  $3.1 \pm 1.8\%$ .

Das mittlere Gesamtvolumen der mit Kontrastmittel gefüllten Gefäße innerhalb der Frakturzone der 5-mm- Sham- Gruppe beträgt  $1.3 \pm 1.1 \text{ mm}^3$ . Das mittlere Gesamtvolumen des Defekts zwischen den beiden Fraktarenden beträgt  $25.2 \pm 23.0 \text{ mm}^3$ . Die Volumenfraktion der Gefäße innerhalb der Frakturzone (Vascular Volume Fraction, VVF) ergab im Mittel bei Analyse der Mikro-CT Bilder einen Wert von  $8.0 \pm 4.4\%$ .

Der Vergleich der Gefäßvolumenfraktion zwischen der 3-mm- OVX- Gruppe und der 5-mm- OVX- Gruppe zeigte keine signifikante Unterschiede ( $p= 0.17$ , t- Test).

Auch der Grad der Vaskularisierung der 3-mm- Kontrollgruppe und der 5-mm- Kontrollgruppe unterschied sich nicht signifikant ( $p=0.25$ , t- Test).

Innerhalb der 3-mm-Defekt Gruppe konnte ebenfalls kein entscheidender Unterschied zwischen den osteoporotischen Knochenproben und den Proben der Kontrollgruppe festgestellt werden ( $p= 0.63$ , t- Test).

Innerhalb der 5- mm- Gruppe fand sich aber ein ausgeprägter Unterschied der maximalen Gefäßneubildung zwischen der OVX- und der Kontrollgruppe ( $p= 0.04$ , t- Test).

Die Gefäßneubildung scheint also nicht allein durch die Defektgröße beeinflusst zu werden. Auch ein osteoporotischer Knochenstatus scheint bei kleiner Defektgröße keinen Einfluss auf die Neovaskularisierung zu haben. Die Kombination aus Osteoporose und geringer knöcherner Durchbauung bei relativ großem Frakturspalt scheint aber, soweit makroskopisch beurteilbar, einen Einfluss auf die Gefäßneubildung zu haben. Denn diese war wie oben beschrieben in der 5-mm- OVX- Gruppe signifikant erniedrigt.

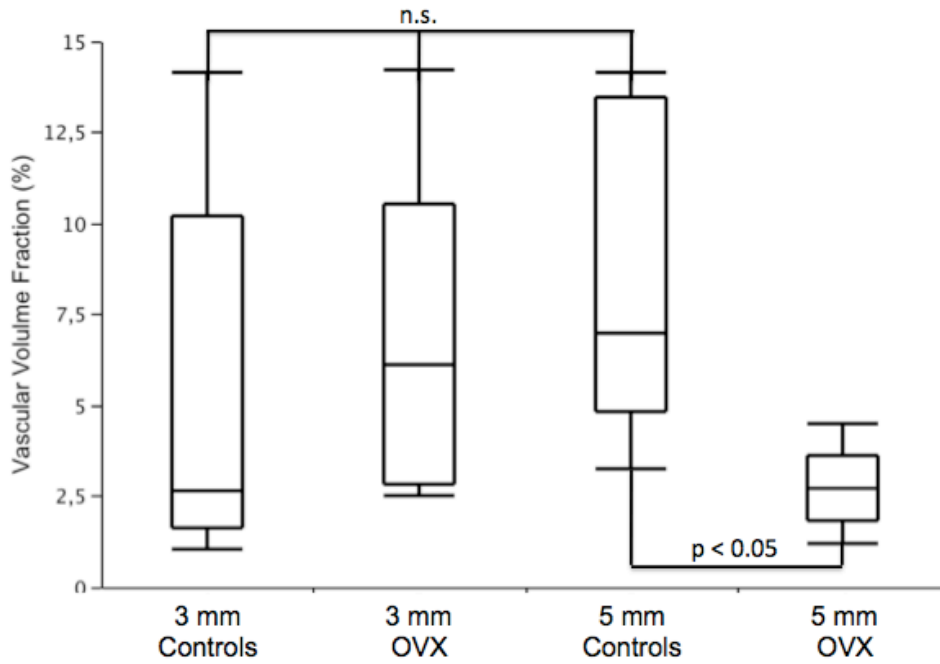


Abbildung 13: Boxplots der Gefäßvolumenfraktionen (Vascular Volume Fraction (%), VVF). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die VVF zwischen der 3-mm-Kontroll-, der 3-mm-OVX- und der 5-mm-Kontroll- Gruppe. Es zeigt sich allerdings ein signifikanter Unterschied der Gefäßneubildung zwischen der 5-mm- Kontroll und der 5-mm- OVX- Gruppe ( $p=0.04$ ).

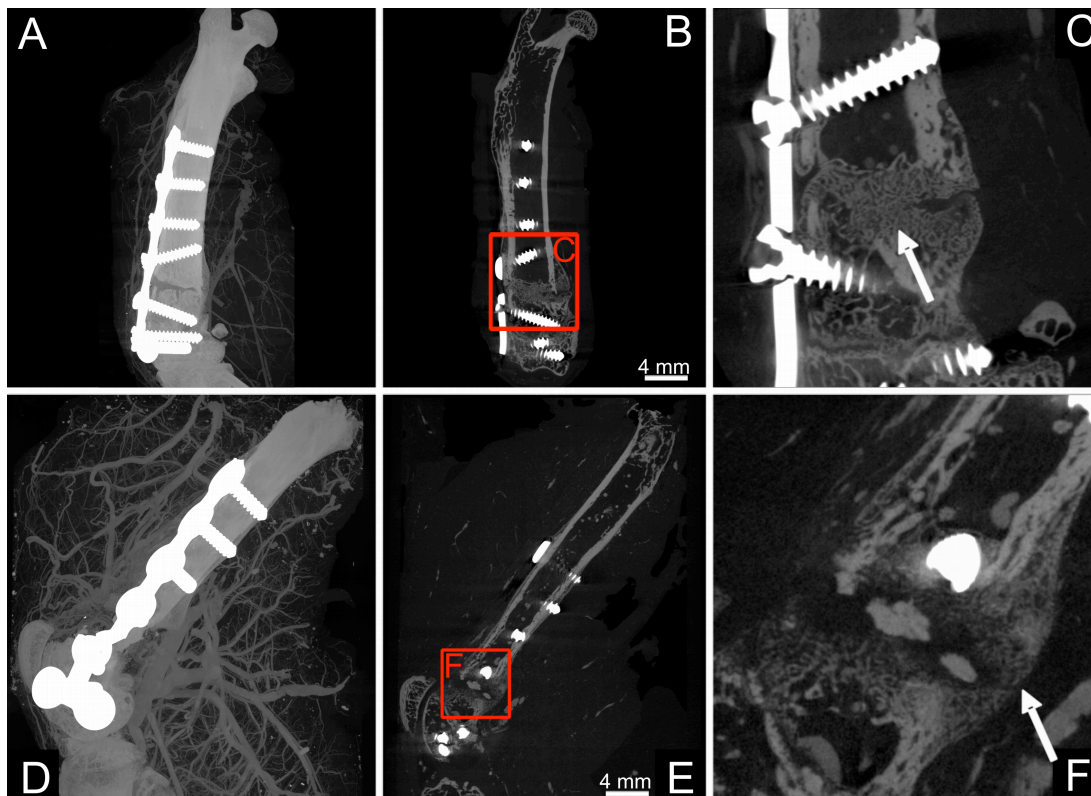


Abbildung 14: Quantifizierung der Durchbauung der Frakturzonen und der Vaskularisierung der Proben, repräsentative A) D) Übersichtsaufnahme Femur, B) E) Durchbaute Frakturzone (roter Kasten C, F), C) F) Vergrößerung der Defektzone, Pfeil: neugebildetes Knochengewebe

## 4. DISKUSSION

Trotz intensiver Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der Osteoporose ist die pathologische Fraktur als Komplikation dieser Erkrankung noch immer nicht zufriedenstellend therapierbar. Aufgrund der Inzidenz der Frakturen, sind Fortschritte und Ergebnisse in diesem Bereich von allergrößter Wichtigkeit. Es gilt heraus zu finden wie sich die osteoporotische Frakturheilung am besten untersuchen lässt und wie sie sich von der physiologischen Knochenheilung unterscheidet.

### 4.1 Tiermodell

Ein klinisch relevantes Tiermodell muss bestimmte Voraussetzungen erfüllen. Zunächst muss gesichert sein, dass das gewählte Versuchstier dem Menschen in Bezug auf die Charakteristika der zu untersuchenden Pathologien ähnlich ist.<sup>94</sup>

In unseren Versuchen setzten wir Sprague- Dawley- Ratten ein.

Kleine Nagetiere weisen allgemein den Vorteil kürzerer Züchtungs- und Beobachtungszeiten auf und benötigen geringere Mengen von Implantaten oder Medikamenten. Diese Tiermodelle erzeugen daher weniger Kosten.<sup>64,95</sup> Hinzu kommt, dass das Genom der kleinen Nagetiere besser erforscht ist als von anderen Versuchstieren.<sup>57</sup>

Für die Osteoporoseforschung ist es wichtig, dass das Knochengewebe der Versuchstiere mit dem des Menschen vergleichbar ist. In verschiedenen Forschungsarbeiten konnte gezeigt werden, dass Ratten dieses Kriterium erfüllen.<sup>96 57,97</sup>

So weisen ovariectomisierte Ratten nach einiger Zeit ebenfalls einen erhöhten Knochenumsatz und eine gesteigerte Knochenresorptionrate auf.<sup>98</sup> Der Knochendichteverlust der Ratte verläuft wie beim Menschen biphasisch mit einem initialen Knochenmasseverlust und einer anschließenden Stabilisierungsphase auf einem osteopenischen Niveau.<sup>99</sup> Wie bei von Osteoporose betroffenen Patienten sind vor allem die trabekulären Knochenanteile und weniger die kortikalen Bereiche betroffen.<sup>98</sup> Des Weiteren sprechen die Versuchstiere ebenfalls auf eine Therapie mit z.B. Tamoxifen, Östrogenen oder Bisphosphonaten an und reagieren auf eine dem Menschen vergleichbare Art und Weise.<sup>98</sup>

Der Knochenzustand der Versuchstiere unterscheidet sich jedoch von dem osteoporotischen Knochenstatus einer postmenopausalen Frau. Durch das kontinuierliche Wachstum der Tiere ist zunächst nicht eindeutig zwischen

Knochendichteverlust und beeinträchtigtem Knochenwachstum zu unterscheiden.<sup>98</sup>

Dieses Problem tritt aber vor allem bei jungen Tieren auf. Unsere Versuchstiere waren bei Studienbeginn bereits 42 Wochen, also ungefähr 294 Tage, alt. Berg et al konnten zeigen, dass das Längenwachstum der Tibiae von weiblichen Sprague- Dawley Ratten zwischen dem 108 und 801. Lebenstag nur 7 Prozent beträgt.<sup>100</sup>

Eine weiterer Unterschied besteht darin, dass die Osteoblastenfunktion der osteoporotischen Ratten, im Gegensatz zum Menschen, in der späten Phase der Östrogendefizienz nicht eingeschränkt ist.<sup>99,101</sup> Die Knochen von Ratten weisen keine Havers- Systeme auf und Remodeling findet nur eingeschränkt statt.<sup>64</sup> Nunamaker et al konnten allerdings zeigen, dass es bei Ratten Resorptionshöhlen gibt, die mit dem Havers- System größerer Tiere vergleichbar sind.<sup>102</sup> Im Übrigen scheinen die eingeschränkten mechanischen Eigenschaften des Skeletts der ovariectomierten Ratte dem postmenopausalen, osteoporotischen Knochenstatus der Frau sehr ähnlich zu sein.<sup>99</sup> Dieser Aspekt ist vor allem für die Erforschung osteoporotischer Frakturen wichtig. Der Knochenstoffwechsel von Schafen ist zwar dem des Menschen noch ähnlicher<sup>102</sup>, Tierversuche mit Schafen sind jedoch deutlich teurer und erfordern mehr Aufwand in der Versuchsumsetzung.<sup>64</sup>

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass ovariectomierte Ratten sich gut für die Osteoporoseforschung eignen, auch wenn sie den osteoporotischen Knochenstatus des Menschen nicht hundertprozentig abbilden. Dieses Tiermodell hat sich in der Osteoporoseforschung bewährt, da die Knochenstrukturen der Ratte nach Ovariectomie dem postmenopausalen, trabekulären Knochenverlust eines Osteoporosepatienten ähnlich sind.<sup>16</sup>

Abgesehen von den notwendigen, oben genannten Vergleichsmöglichkeiten zwischen den Versuchstieren und dem Menschen, war es für unsere Studie natürlich wichtig, dass der osteoporotische Knochenzustand der Versuchsgruppe gesichert ist. Die Induktion der Osteoporose erfolgte durch Diät und Ovariectomie und war in unserem Tiermodell erfolgreich<sup>64,90</sup> Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten eine Sham-Operation (siehe Material und Methoden).

Um anschließend die osteoporotische Frakturheilung zu evaluieren, war außerdem wesentlich, dass der gesetzte Knochendefekt eine spontan auftretende pathologische Fraktur möglichst realistisch simuliert. Osteoporotische Frakturen sind hauptsächlich metaphysär lokalisiert.<sup>95,96,103</sup> Daher treten solche Knochenverletzungen oft am distalen

Radius, am proximalen Humerus oder Femur, in den Wirbelkörpern<sup>21</sup> und eher selten im diaphysären Bereich der langen Röhrenknochen auf. Ferner unterscheidet sich die Frakturheilung in diaphysären und metaphysären Knochenanteilen. So entsteht in der Metaphyse z.B. periostal weniger Kallusgewebe.<sup>17,95,103</sup> Die meisten Forschungsarbeiten haben sich in der Vergangenheit aber vor allem mit diaphysären Frakturmustern beschäftigt.<sup>11,103-106</sup> Die wenigen Veröffentlichungen, die sich mit metaphysären Verletzungen beschäftigen, sind für die Osteoporoseforschung ebenfalls nur bedingt geeignet. So etablierten Stuermer EK et al ein Tiermodell, das aus Mäusen besteht, denen im Bereich der Tibiae ein metaphysärer Frakturdefekt zugefügt wurde. Dieser war allerdings nur 0.5 mm groß.<sup>103</sup> Diese Größe reicht zwar aus, um die Wirkung antiosteoporotischer Medikamenten zu testen, aber nicht um neue heilungsfördernde Biomaterialien zu erforschen.<sup>64</sup> Andere Forschungsprojekte, die sich mit der metaphysären Frakturheilung beschäftigen, untersuchten nur teilweise osteotomierte Knochen<sup>15</sup> oder durch Bohrlöcher hervorgerufene Knochendefekte<sup>107,108</sup>, welche für die oben genannten Forschungszwecke ebenfalls zu klein sind. Unsere Versuchstiere erhielten einen kontinuierlichen, keilförmigen drei bzw. fünf Millimeter großen Knochendefekt, der metaphysär lokalisiert war.

Unsere Untersuchungen zeigten, dass die 5 mm große Frakturzone der osteoporotischen Versuchsgruppe keine vollständige Durchbauung aufwies (siehe Ergebnisse). Das bedeutet, dass sich unser Tiermodell als Critical- Size-Defektmodell eignet. Der Defekt ist groß genug, um Knochenersatzmaterialien in die Frakturzone ein zu bringen. Wenn nach einer solchen Implantation Knochenneubildung im osteoporotischen Knochen beobachtet wird, kann davon ausgegangen werden, dass das eingebrachte Material heilungsfördernd wirkt.<sup>64</sup>

Unsere Arbeit beschreibt somit das erste Tiermodell mit einem ausreichend großen, metaphysär lokalisiertem Knochendefekt, welches im Rahmen weiterer Forschungsarbeiten für die Verbesserung der osteoporotischen Frakturheilung genutzt werden kann.<sup>64</sup>

Unsere zweite osteoporotische Versuchsgruppe, wies einen kleineren Frakturspalt von drei Millimetern auf, der nach sechs Wochen fast vollständig knöchern durchbaut war. Dieses Tiermodell eignet sich daher nicht zur Evaluation von kritischen Knochendefekten, es kann aber zur weiteren Erforschung der osteoporotischen Frakturheilung genutzt werden. Dies ist im Rahmen unseres Projektes zum Teil bereits

erfolgt.<sup>90</sup> Vorliegende Arbeit beschäftigt sich ebenfalls mit den Details der osteoporotischen Frakturheilung und deren Analyse in der Mikro-Computertomographie (siehe unten).

## **4. 2 Mikro- Computertomographie**

Die Radiologie ist ein Teilgebiet der Medizin, das in kurzer Zeit eine große Entwicklung durchlaufen hat. Die Errungenschaften in diesem Gebiet der Technik sind beeindruckend. Die erste computertomographische Aufnahme einer Maus dauerte im Jahre 1967 noch 9 Tage. Die Bildrekonstruktion am Computer benötigte allein 2.5 Stunden Zeit.<sup>70</sup> Heute ist es möglich, einzelne Organe oder den ganzen Körper eines Menschen in 5-20 Sekunden zu scannen und Bilder mit einer Auflösung im Submillimeter Bereich zu rekonstruieren.<sup>109</sup>

In vielen bildgebenden Verfahren wurden in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht, wie z.B. in der MR-Angiographie, in der Mehrzeilen-Computertomographie, im intravasalen Ultraschall oder in der digitalen Subtraktions-Angiographie.<sup>86</sup>

Um zu verstehen, wie Leben auf kleinster, molekularer Ebene abläuft, reichen jedoch auch die neuesten Fortschritte in diesen bildgebenden Verfahren nicht aus. So können mit diesen Verfahren meist keine Auflösungen unter 500 Mikrometer erreicht werden.<sup>110</sup> Auch die Histologie und die Elektronenmikroskopie können, trotz allen Fortschritten, nicht alle Fragen in der morphologischen Diagnostik von Gewebeproben befriedigend beantworten. So handelt es sich um zweidimensionale Darstellungen von eigentlich dreidimensionalen Strukturen. Dadurch ist der Informationsgehalt der Bildanalyse eingeschränkt. Der im Mikroskop sichtbare Probenschnitt ist ein nur kleiner Ausschnitt aus dem gesamten Präparat. Die Präparation ist außerdem personal- und zeitaufwändig.<sup>111,112 86</sup>

Die Mikro- Computertomographie kann die meisten dieser Probleme zu lösen. Durch dieses bildgebende Verfahren ist die nicht-destruktive und dreidimensionale Darstellung von Gewebeproben im Mikrometer Bereich sowie die korrekte Reproduktion und Weiterverarbeitung von Untersuchungsergebnissen möglich.<sup>113</sup> Dieses Verfahren wird deshalb nicht zu Unrecht als dreidimensionale Röntgen-Mikroskopie bezeichnet.

<sup>79,112,114</sup> Im Bereich der Untersuchung von Knochenmorphologien ist die Mikro- CT auf Grund ihres hohen Auflösungsvermögens von mineralisierten Gewebestrukturen bereits Goldstandard.<sup>114</sup> Für die Osteoporoseforschung und insbesondere für die Entwicklung

neuer Therapieansätze, ist die Erkennung der Zusammenhänge zwischen Knochenmasse, dreidimensionaler Knochenarchitektur und der Knochenfunktion besonders wichtig. Dafür sind die Mikro-CT und auch die Mikro- MRT unverzichtbare Werkzeuge.<sup>30</sup> So können Remodelierungsprozesse<sup>112</sup>, Knochenresorption und Knochenaufbau<sup>115</sup>, Strukturparameter wie z.B. die Trabekeldichte, die Integration von Knochenersatzmaterialien<sup>116</sup> und von Implantaten<sup>117</sup> erforscht werden. Die Heilungsvorgänge in frakturierten Knochen können mittels Mikro- CT ebenfalls gut untersucht werden.<sup>115</sup> Patel et al bestätigen durch ihre Untersuchungen ebenfalls, dass die Mikro-CT zur qualitativen und quantitativen Untersuchung der Mikroarchitektur des Knochens geeignet ist.<sup>118</sup> Die relativ geringen Kosten der Mikro-CT stellen einen weiteren Vorteil dieses Verfahrens dar.<sup>114</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde die Frakturheilung im osteoporotischen Knochen mittels Mikro-CT evaluiert, da die Mikro-CT das für diesen Zweck am besten geeignete bildgebende Verfahren ist. Die Beurteilung der Frakturheilung erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit unter anderem durch die Evaluation der Vaskularisierung der Defektzone. Dank der Mikro-CT können Gefäße vollständig verfolgt und dreidimensional dargestellt werden. Die räumliche Darstellung der Blutgefäße ist bis in den kapillaren Bereich möglich. In der vorliegenden Arbeit konnte die Anwendung der Mikro-CT zur sinnvollen und sensitiven Erfassung und Quantifizierung der Gefäßneubildung bestätigt werden.

Trotz aller positiven Aspekte, weist die Mikro-CT auch einige Nachteile auf. Ein Defizit dieser innovativen Technik und ein Grund, warum sich frühere Forschungsansätze hauptsächlich mit Knochen als starkem Kontrastobjekt beschäftigt haben, ist der niedrige Weichteilkontrast.<sup>110</sup> Dieser technischen Einschränkung konnte aber durch gesteigerte Untersuchungsgeschwindigkeiten, neue Kontrastmittel und erhöhte Empfindlichkeit der Detektoren entgegen gewirkt werden.<sup>110</sup> Außerdem ist die Probengröße auf einige  $\text{mm}^3$  bis wenige  $\text{cm}^3$  begrenzt. Dies hängt von der gewünschten Auflösung ab, die unter anderem durch die Anzahl der Pixel der Bilddetektoren in den Mikro- CT- Geräten limitiert wird. Bis vor einigen Jahren war die Anwendung der Mikro- CT ausschließlich auf ex- vivo Untersuchungen beschränkt. Dies bedeutete eine immense Einschränkung der Untersuchungsmöglichkeiten. Heute gibt es auch in-vivo-Mikro-CT-Scanner zur Untersuchung kleiner Labortiere. Dadurch können Krankheitsverläufe fortlaufend dokumentiert bzw. visualisiert werden. Das bedeutet zum Beispiel, dass Veränderungen in der Knochenstruktur und



Knochenmineralisation bei lebenden Versuchstieren während des Knochenheilungsvorgangs zeitversetzt und kontinuierlich beobachtet werden können.<sup>119,120</sup>

Ein weiterer Nachteil ist die hohe Strahlenbelastung, die eine Mikro-CT Untersuchung bedeutet. Das ist einer der Gründe, warum der Einsatz beim Menschen in vivo bis heute noch nicht möglich ist. Für Labortiere ist allerdings eine relativ hohe Strahlendosis erlaubt.<sup>120</sup> Die letale Dosis beträgt für Ratten 5-7.6 Gy<sup>121</sup>. Es ist eine Herausforderung, radiografische Techniken zu finden, die für Kleintiermodelle geeignet sind<sup>111</sup>, da deren Größe eine hohe räumliche und zeitliche Auslösung erfordert.<sup>120</sup> Um die gewünschten Forschungsergebnisse und Untersuchungen der Krankheitsverläufe der Versuchstiere zu dokumentieren bzw. zu visualisieren, sind bildgebende Verfahren aber unverzichtbar und die Mikro-CT ist hierfür eine geeignete Technik.

Die Einsatzmöglichkeiten der Mikro- Computertomographie übersteigen längst die Darstellung von Knochenpathologien. Bei der Untersuchung der Lunge ist es trotz der hohen Respirationsfrequenz und geringen Größe der Kleintiere möglich, Emphyseme und fibrotische Veränderungen des Respirationstraktes von Ratten zu untersuchen. Zum Beispiel wurde durch die Induktion von Bleomycin eine Lungenfibrose bei Ratten induziert und durch Mikro-CT Untersuchungen erforscht.<sup>114,122</sup> Auch im Bereich der Erforschung kardiologischer Erkrankungen im Kleintiermodell scheinen die Einsatzmöglichkeiten der Mikro-CT nahezu unbegrenzt und mit den Untersuchungstechniken am menschlichen Herz vergleichbar.<sup>114</sup> Gefäße können durch Segmentation und Extraktionsalgorithmen kontinuierlich dargestellt und quantifiziert werden und es ist möglich, kleinste Alterationen, wie z.B. atherosklerotische Plaque Veränderungen<sup>123</sup>, aufzuzeigen.<sup>86</sup>

Eine weitere interessante Einsatzmöglichkeit der Mikro-CT ist der Bereich der Tumor Forschung. So konnten z.B. in der Lunge von  $\mu$ -Tauschen Mäusen Raumforderungen von 0.63 mm<sup>3</sup> Größe nachgewiesen werden.<sup>124</sup>

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass durch die Mikro- Computertomographie die Darstellung nahezu aller Organe und der zugehörigen Gefäßversorgung und Gewebeeigenschaften sowohl beim Tier als auch bei menschlichen Gewebeproben und Organen möglich ist. Für die Erforschung von Knochenpathologien im Speziellen ist diese Technik auf Grund der hohen Kontrastunterschiede besonders gut geeignet. Der

klinische Einsatz ist allerdings unter Anderem auf Grund der hohen Strahlenbelastung noch nicht möglich.

### **4.3 Frakturheilung**

Die osteoporotische Frakturheilung ist genau wie die physiologische Knochenheilung ein vielschichtiger Prozess, der noch immer nicht vollständig erforscht ist.<sup>21</sup> Durch die veränderte Gewebestruktur osteoporotischer Knochen kommt es zu einer hohen Versagensrate von Implantaten und Schrauben.<sup>125</sup> Damit verbunden sind längere Liegezeiten von den Patienten, Komplikationen und eine erhebliche finanzielle Belastung. Die Datenlage zu klinischen Studien ist trotzdem schlecht und der Forschungsbedarf auch im Bereich der Grundlagenforschung sehr hoch<sup>9,21</sup>. Die Intention vorliegender Arbeit ist es, die Forschungslage zu verbessern und einen Beitrag zur Exploration oben genannter Funktionszusammenhänge zu leisten.

Zwar zeigen Tiermodelle und klinische Erfahrungen, dass Knochenheilung bei Patienten, die von Osteoporose betroffen sind, verlangsamt abläuft<sup>21</sup>, aber die Forschungsergebnisse sind nicht eindeutig. Es ist bereits unklar, welche klinischen oder pathologischen Konsequenzen die verzögerte Rekonvaleszenzzeit tatsächlich hat.<sup>21</sup> Die publizierten Tierstudien liefern keine klaren Antworten.

S. Larsson stellt fest, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen der Frakturheilung im gesunden bzw. im osteoporotischen Knochen bestehen.<sup>126</sup> Sowohl Blythe und Buchsbaum als auch Langeland untersuchten die Zugfestigkeit von heilenden Frakturen von ovariectomierten Ratten und konnten auch hier keine signifikanten Differenzen zwischen der Versuchs- und der Kontrollgruppe feststellen.<sup>127,128</sup> Dies könnte aber durch den Versuchsaufbau bedingt sein. Die Versuchstiere von Blythe und Buchsbaum waren beispielsweise erst sechs Wochen alt und erhielten auch keine kalzium- phosphor- vitamin D3- soja und phytoöstrogenfreie Diät. Somit ist unklar, ob der osteoporotische Knochenstatus der Tiere in den Versuchen der Forschungsgruppe wirklich repräsentativ war.

Namkung-Matthail et al hingegen konnten zeigen, dass das Kallusgewebe im Bereich einer osteoporotischen Femurfraktur bei der Ratte drei Wochen nach dem Trauma im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert war. Die Knochendichte und mechanische

Stabilität war zu dem Zeitpunkt ebenfalls um 23% vermindert. Außerdem war die Phase der enchondralen Knochenbildung verlängert und die Rate des Knochenumsatzes erhöht.<sup>12</sup> Lill et al fanden in ihrem osteoporotischen Großtiermodell ebenfalls eine um zwei Wochen verzögerte Biegesteifigkeit gegenüber der Kontrollgruppe und eine erniedrigte Torsionssteifigkeit der osteoporotischen, frakturierten Schafstibiae gegenüber den intakten Knochen um 33%.<sup>129</sup> Langfristig gesehen fand sich aber kein Unterschied zwischen der Knochenfestigkeit bzw. in der knöchernen Verbindung der Frakturenden. Dies lässt sich womöglich auf die besondere Regenerationsfähigkeit des Gewebes von Schafen zurückführen.<sup>21</sup>

Meyer et al konstatierten ebenfalls, dass Östrogenmangel bzw. Ovariectomie zu signifikant reduzierter Festigkeit und Bruchkraft in frakturierten Femura bei Ratten älter als 31 Wochen führt. Interessant ist, dass bei alten Versuchstieren (ca. 50 Wochen alt) die Frakturheilung sowohl in der Kontroll- als auch in der Versuchsgruppe eingeschränkt war.<sup>130</sup> Somit lässt sich jedoch ab einem bestimmten Zeitpunkt nicht mehr genau zwischen dem Einfluss des Alters und dem der Osteoporose auf die Knochenfestigkeit differenzieren. Alter ist also möglicherweise generell ein unabhängiger Risikofaktor für eine schlechtere Knochenheilung.<sup>21,130</sup>

Während diese Studien Unterschiede zwischen osteoporotischen und gesunden Knochen eher in der frühen Phase der Frakturheilung feststellen, stellten Kubo et al histologische Unterschiede und Differenzen in der Knochendichte im neugebildeten Knochen ausschließlich 12 Wochen nach der Fraktur fest.<sup>11</sup> Diverse andere Forschungsgruppen konnten die oben genannten Forschungsergebnisse nachvollziehen und bestätigen, dass die osteoporotische Frakturheilung Unregelmäßigkeiten aufweist.<sup>14,131,132</sup> Nicolaou et al konnten sogar im Rahmen einer klinischen Studie zeigen, dass eine durch Osteoporose verzögerte Frakturheilung auch beim Menschen auftritt.<sup>133</sup>

Auch wenn viele Studien bestätigen, dass die osteoporotische Frakturheilung Unregelmäßigkeiten aufweist, ist die Sachlage auf Grund von unterschiedlichen Versuchsaufbauten nicht ganz eindeutig.

Im folgenden Abschnitt werden die Ergebnisse unserer Untersuchungen diskutiert. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit mittels Mikro-CT durchgeführten vergleichenden Untersuchungen zwischen osteoporotischen und gesunden Femora

zeigten keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Fläche des neugebildeten Knochens. Dieses Ergebnis wurde sowohl in der 3-mm- als auch in der 5-mm- Gruppe erhalten. Wir konnten aber zeigen, dass die Größe des Knochendefektes einen wesentlichen Einfluss auf die Knochenheilung hat. So ist die Gesamtfläche neugebildeten Knochengewebes in der 3-mm-Gruppe signifikant höher als in der 5-mm-Gruppe. Dies gilt sowohl für die OVX- als auch für die Sham-Gruppe. Dieses Ergebnis stützt die These, dass sich die physiologische und pathologische Frakturheilung nicht voneinander unterscheiden und lediglich die Defektgröße einen Einfluss auf die Heilung hat. Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass im Mikro-CT ausschließlich kalzifiziertes Gewebe evaluiert und quantifiziert werden kann. Das bedeutet, dass keine Aussage über die Knochenqualität getroffen werden kann, obwohl diese für das Frakturrisiko und das Outcome der Osteoporosepatienten wesentlich ist (siehe Einleitung). Histologische und biomechanische Untersuchungen an denselben Proben, konnten deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Gruppen aufzeigen. Thormann et al. fanden heraus, dass die mechanische Belastbarkeit der osteoporotischen Frakturzonen im Dreipunkt-Biegetest in der 3-mm-Gruppe deutlich geringer war als in der Kontrollgruppe. Andere biomechanische Untersuchungen zeigten wiederum keine signifikanten Unterschiede zwischen der 3-mm- OVX und der 3-mm- Shamgruppe.<sup>90</sup> Die Untersuchungsergebnisse aus der Histologie könnten dies erklären: Dort zeigten sich Knorpelreste im Frakturbereich der OVX- Gruppe. Das Gewebe war weniger mineralisiert. Außerdem waren die Chondrozyten der Kontrollgruppe alle hypertroph und gut organisiert. Schließlich hatte das Remodeling des kortikalen Knochenbereichs bereits eingesetzt<sup>134</sup>. Somit scheint die knöcherne Brückenbildung im Frakturbereich, die in der Mikro- CT sichtbar ist, eine gewisse Primärstabilität zu ermöglichen, die Frakturheilung scheint allerdings verlangsamt zu sein und die Knochenqualität wirkt reduziert.

In vorliegender Arbeit wurde neben der Fläche neugebildeten Knochengewebes auch die Gefäßneubildung quantifiziert. Auch hier zeigte sich, dass sich der Anteil an Gefäßen im Frakturbereich bei OVX- Tieren mit einem 3-mm- Defekt nicht signifikant von der Kontrollgruppe unterschied. Der Gefäßvolumenanteil der OVX- Tiere mit einem 5-mm- großen Defekt war allerdings signifikant niedriger als der entsprechende Gefäßanteil der Kontrollgruppe. Dies zeigt, dass die Größe des Defektes sowohl die Knochenneubildung als auch die Neovaskularisation beeinflusst. Untersuchungen von

Claes et al untermauern diese These. Claes et al konnten zeigen, dass Instabilität einer Fraktur zu einem reduzierten Gefäßwachstum führt.<sup>135,136</sup> Dies wiederum führt zu einer schlechteren Frakturheilung, da eine ausreichende Durchblutung essenziell für die Frakturheilung und Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes ist (siehe Einleitung)<sup>56</sup>

Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Liu et al überein. Liu et al etablierten ein ähnliches Tiermodell wie jenes, welches in unserer Arbeit vorgestellt wird. Die Defektgröße betrug bei Liu et al ebenfalls 3 mm. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Zusammensetzung des Knochengewebes der OVX- Gruppe nach einiger Beobachtungszeit änderte, die Volumenfraktion der Gefäße jedoch nicht. Wie oben bereits besprochen, weist ein Frakturspalt von 3-mm Größe durchaus neugebildetes Knochengewebe auf, ist relativ stabil und schränkt die Neovaskularisation daher nicht ein. Die 5-mm großen Defektzonen zeigten sich nicht durchbaut und können als instabil gelten. Im gesunden Knochen konnten zunächst trotzdem Gefäße entstehen, wie unsere Untersuchungen verdeutlichen. Wenn aber ein osteoporotischer Knochen eine instabile Fraktur aufweist, scheint die Gefäßneubildung stark beeinträchtigt zu sein.

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass unsere Ergebnisse zeigen, dass eine Frakturheilung im osteoporotischen Knochen möglich ist und stattfindet. Die Fläche des neugebildeten Knochengewebes wird offenbar nicht beeinflusst. Osteoporose reduziert aber möglicherweise die Kallusqualität und damit die Tragelast und Steifigkeit der Knochen. Die osteoporotische Frakturheilung unterscheidet sich also geringfügig von der physiologischen Knochenheilung. Ungeklärt ist warum nicht alle Forschungsgruppen das gleiche Ergebnis erzielen.

#### **4. 4 Limitationen**

Eine Limitation vorliegender Arbeit ist die Tatsache, dass die durchgeführten Messungen nicht absolut standardisiert ablaufen konnten, da beispielsweise die Festlegung der ROIs von der Person, die die Untersuchung durchführt, abhängt. Des Weiteren sind die Plattenbrüche zu nennen, die bei einzelnen Versuchstieren aufgetreten sind. Dieses Ereignis spiegelt aber die Realität wieder. So treten bei tatsächlichen Patienten sehr häufig Komplikationen nach Implantat-Operationen auf. Außerdem schien der allgemeine Gesundheitszustand der betroffenen Tiere durch die

Plattenbrüche nicht beeinträchtigt. Trotzdem lässt sich nicht mit absoluter Sicherheit ausschließen, dass der Vorfall Konsequenzen für die Ratten hatte. Deshalb ist es besonders wichtig, Tierhaltung und -pflege weiter zu verbessern. Hinzu kommt die geringe Probenzahl, die für die Versuchsdurchführung verwendet wurde. Höhere Probenzahlen sind aber aufgrund des Aufwandes den eine Mikro-CT Untersuchung, bereits wegen der langen Scanzeiten verursacht, sehr kompliziert in der Umsetzung. Die Tatsache, dass ein Tiermodell niemals die Situation des Menschen zu hundert Prozent widerspiegeln kann, ist bekannt. Der Einsatz des Modells ist aber oft das einzige Mittel, um in der Forschung Fortschritte zu erzielen und die Ratte ist als Versuchstier dafür gut geeignet. Bei der Quantifizierung der Gefäßformationen, stellte sich das Problem, dass sich die Grauwerte der kontrastierten Gefäße und des Knochengewebes überschneiden. Dies Problem ist allgemein bekannt und macht die Schwellenwertbasierte Segmentation der verschiedenen Strukturen schwierig. Wir entschieden uns die Knochenstrukturen manuell in jedem Schnittbild zu löschen. Eine Alternative um standardisiertere Ergebnisse zu erhalten, ist die Dekalzifizierung des Knochengewebes. Bei diesem Verfahren gibt es die Möglichkeit der Quantifizierung des neugebildeten Knochengewebes dann allerdings nicht mehr.<sup>137</sup>

Als letztes ist es wichtig zu erwähnen, dass statistische Auswertungen lediglich Zusammenhänge bzw. Korrelationen aufweisen können. So können wir auf Grund unserer Ergebnisse davon ausgehen, dass die Größe des Frakturspalts mit der maximalen Fläche neugebildeten Knochengewebes korreliert und ein Zusammenhang zwischen Defekt, Vaskularisierung und Osteoporose besteht. Ein Kausalitätszusammenhang kann aber nicht bewiesen werden. Die Informationen, die aus den anderen Untersuchungen der Proben im Rahmen weiterer Teilprojekte des T2 Projektes (biomechanische Untersuchungen, Histologie etc. ) gewonnen wurden, scheinen die statistischen Ergebnisse jedoch zu bestätigen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Der Forschungsbedarf im Bereich der Osteoporose ist groß. Besonderes Augenmerk muss auf die Evaluation der pathologischen Fraktur gelegt werden. Das Ziel unserer Arbeiten war es, Grundlagen zu schaffen um dieses Gebiet weiter zu erforschen. Dies bedeutet zunächst die Etablierung eines repräsentativen Tiermodells und dazu passenden Untersuchungsverfahren.

Um ein solches Modell zu entwickeln, wurde bei 13 Sprague- Dawley- Ratten eine Osteoporose durch Ovariectomie und eine kalzium- phosphor- vitamin D3- soja und phytoöstrogenfreie Diät induziert (OVX). Der osteoporotische Knochenstatus wurde mittels DXA bestätigt. Die Kontrollgruppe erhielt lediglich eine Sham- Operation. Anschließend wurde den Versuchstieren ein 3-mm bzw. 5-mm- großer, keilförmiger Knochendefekt im metaphysären Bereich des distalen Femurs gesetzt und mit Hilfe von Plattenosteosynthesen versorgt. Diese Situation spiegelt die Versorgung einer osteoporotischen Fraktur beim Menschen wieder. Sechs Wochen später wurden die Tiere euthanisiert und anschließend die frakturierten Femura im Mikro- CT gescannt. Die so entstandenen axialen Schnittbilder dienten der Analyse der Frakturzone hinsichtlich Durchbauung und Vaskularisierung. Unsere Untersuchungen zeigten, dass sich in der 3-mm-Gruppe deutlich mehr neues Knochengewebe gebildet hatte als in der 5-mm-Gruppe. Dies bedeutet, dass sich ein 5-mm-großer Defekt auf Grund der geringen Durchbauung als critical-size-Modell zur Erforschung von osteoinduktiven Knochenersatzmaterialien oder Implantaten eignet. Die Fläche neugebildeten Knochengewebes und zum Teil auch die Vaskularisierung der osteoporotischen Frakturzonen innerhalb der 3 mm bzw. der 5 mm Gruppe unterschied sich nicht signifikant von den Kontrolltieren. Die Ergebnisse der histologischen und biomechanischen Untersuchungen der Knochenqualität der OVX- Tiere zeigten jedoch Zeichen einer verlangsamten bzw. unvollständigen Frakturheilung. So dass davon ausgegangen werden kann, dass sich die metaphysäre, osteoporotische Frakturheilung von der nicht-osteoporotischen Knochenheilung geringfügig unterscheidet. So konnten die von uns entwickelten Tiermodelle bereits einen Beitrag zu der Erforschung der Osteoporose leisten, sollen und können aber auch in Zukunft im Rahmen anderer Forschungsprojekte helfen die noch offenen Fragen auf diesem Gebiet zu beantworten.

## 6. SUMMARY

There is a great need for research in the field of osteoporosis. Especially osteoporotic fracture repair needs further evaluation. The goal of our work was to establish a basis that makes it possible to further explore this area. This means the creation of a representative animal model and suitable examination methods.

In order to do so 13 Sprague- Dawley- rats received ovariectomy and a calcium-, phosphorus- and vitamin D3-, soy- and phytoestrogen-free diet. The control group underwent sham operation. Subsequently a 3 mm respectively 5 mm wedge-shaped defect was created in the metaphyseal area of the left distal femur of the animals. It was stabilised with a mini T-shaped mini-plate. The situation represents the management of an osteoporotic fracture in a human being. Six weeks later the animals were euthanized and scanned in the micro- CT. The resulting axial sectional images were used to examine the fracture zone regarding bony bridging and vascularisation. The 3 mm defect group showed significantly more new bone tissue than the 5 mm group. This means that a defect that is 5 mm big works as a critical size model to explore osteoinductive bone grafts or implants. Whereas the area of new bone formation and the vascularisation within the 3 mm osteoporotic and the 3 mm control group did not differ significantly from each other. However, biomechanical testing and histology demonstrated healing discrepancies. So osteoporotic fracture repair can be assumed to be slightly different from non- osteoporotic bone healing.

In conclusion it can be said that the animal model we developed could already impact on osteoporotic fracture research. In future it can be used in connection with other research projects to answer outstanding issues on osteoporosis.



## 7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Liu Y, Cao L, Ray S, et al. Osteoporosis influences osteogenic but not angiogenic response during bone defect healing in a rat model. *Injury*. Jul 2013;44(7):923-929.
2. Link TM, Majumdar S, Grampp S, et al. Imaging of trabecular bone structure in osteoporosis. *European radiology*. 1999;9(9):1781-1788.
3. Kartner N, Manolson MF. Novel techniques in the development of osteoporosis drug therapy: the osteoclast ruffled-border vacuolar H(+)-ATPase as an emerging target. *Expert opinion on drug discovery*. May 2014;9(5):505-522.
4. Office of the Surgeon G. Reports of the Surgeon General. *Bone Health and Osteoporosis: A Report of the Surgeon General*. Rockville (MD): Office of the Surgeon General (US); 2004.
5. Cooper C, Campion G, Melton LJ, 3rd. Hip fractures in the elderly: a world-wide projection. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. Nov 1992;2(6):285-289.
6. Leboime A, Confavreux CB, Mehse N, Paccou J, David C, Roux C. Osteoporosis and mortality. *Joint, bone, spine : revue du rhumatisme*. Dec 2010;77 Suppl 2:S107-112.
7. Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *The Lancet*. 2002;359(9319):1761-1767.
8. Sambrook P, Cooper C. Osteoporosis. *The Lancet*. 2006;367(9527):2010-2018.
9. Giannoudis P, Tzioupis C, Almalki T, Buckley R. Fracture healing in osteoporotic fractures: is it really different? A basic science perspective. *Injury*. Mar 2007;38 Suppl 1:S90-99.
10. Jepsen KJ, Schlecht SH, Kozloff KM. Are we taking full advantage of the growing number of pharmacological treatment options for osteoporosis? *Current opinion in pharmacology*. Apr 15 2014;16c:64-71.
11. Kubo T, Shiga T, Hashimoto J, et al. Osteoporosis influences the late period of fracture healing in a rat model prepared by ovariectomy and low calcium diet. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. Mar 1999;68(5-6):197-202.
12. Namkung-Matthai H, Appleyard R, Jansen J, et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone*. Jan 2001;28(1):80-86.
13. Xu SW, Yu R, Zhao GF, Wang JW. Early period of fracture healing in ovariectomized rats. *Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi / Chinese Medical Association*. Jun 2003;6(3):160-166.
14. Wang JW, Li W, Xu SW, et al. Osteoporosis influences the middle and late periods of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Chinese journal of traumatology = Zhonghua chuang shang za zhi / Chinese Medical Association*. Apr 2005;8(2):111-116.
15. Claes L, Veese A, Gockelmann M, Simon U, Ignatius A. A novel model to study metaphyseal bone healing under defined biomechanical conditions. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. Jul 2009;129(7):923-928.
16. Thompson DD, Simmons HA, Pirie CM, Ke HZ. FDA Guidelines and animal models for osteoporosis. *Bone*. Oct 1995;17(4 Suppl):125S-133S.

17. Danielsen CC, Mosekilde L, Svenstrup B. Cortical bone mass, composition, and mechanical properties in female rats in relation to age, long-term ovariectomy, and estrogen substitution. *Calcified tissue international*. Jan 1993;52(1):26-33.
18. Tarantino U, Cerocchi I, Scialdoni A, et al. Bone healing and osteoporosis. *Aging clinical and experimental research*. Apr 2011;23(2 Suppl):62-64.
19. Boivin GY, Chavassieux PM, Santora AC, Yates J, Meunier PJ. Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. *Bone*. Nov 2000;27(5):687-694.
20. Chatterji S, Wall JC, Jeffery JW. Age-related changes in the orientation and particle size of the mineral phase in human femoral cortical bone. *Calcified tissue international*. 1981;33(6):567-574.
21. F.Jakob LS, R. Ebert, J. Eulert, E. Wolf, M. Schieker, W. Böcker, W. Mutschler, M. Amling, P. Pogoda, T. Schinke, A. Liedert, R. Blakytyn, A. Ignatius, L. Claes. *Frakturheilung bei Osteoporose*. 2007.
22. Duque G, Troen BR. Understanding the mechanisms of senile osteoporosis: new facts for a major geriatric syndrome. *Journal of the American Geriatrics Society*. May 2008;56(5):935-941.
23. Broder MS, Neary MP, Chang E, Cherepanov D, Ludlam WH. Burden of Illness, Annual Healthcare Utilization and Costs Associated with Commercially Insured Patients with Cushing's Disease in the United States. *Endocrine practice : official journal of the American College of Endocrinology and the American Association of Clinical Endocrinologists*. Aug 22 2014:1-24.
24. Ciesielska-Kopacz N, Kos-Kudla B, Pluskiewicz W. [The influence of thyroid diseases and their treatment on the development of osteoporosis]. *Przegląd lekarski*. 1998;55(5):271-273.
25. Berger C, Almohareb O, Langsetmo L, et al. Characteristics of hyperparathyroid states in the Canadian multicentre osteoporosis study (CaMos) and relationship to skeletal markers. *Clinical endocrinology*. Jul 25 2014.
26. Riggs BL, Melton LJ, 3rd. The prevention and treatment of osteoporosis. *The New England journal of medicine*. Aug 27 1992;327(9):620-627.
27. Khosla S, Riggs BL, Atkinson EJ, et al. Effects of sex and age on bone microstructure at the ultradistal radius: a population-based noninvasive in vivo assessment. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. Jan 2006;21(1):124-131.
28. Unnanuntana A, Gladnick BP, Donnelly E, Lane JM. The assessment of fracture risk. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. Mar 2010;92(3):743-753.
29. Wasnich RD, Ross PD, Davis JW, Vogel JM. A comparison of single and multi-site BMC measurements for assessment of spine fracture probability. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. Jul 1989;30(7):1166-1171.
30. Borah B, Gross GJ, Dufresne TE, et al. Three-dimensional microimaging (MRmicroI and microCT), finite element modeling, and rapid prototyping provide unique insights into bone architecture in osteoporosis. *The Anatomical record*. Apr 2001;265(2):101-110.
31. Ross PD, Davis JW, Epstein RS, Wasnich RD. Pre-existing fractures and bone mass predict vertebral fracture incidence in women. *Annals of internal medicine*. Jun 1 1991;114(11):919-923.
32. Parfitt AM, Mathews CH, Villanueva AR, Kleerekoper M, Frame B, Rao DS. Relationships between surface, volume, and thickness of iliac trabecular bone in aging and in osteoporosis. Implications for the microanatomic and cellular

- mechanisms of bone loss. *The Journal of clinical investigation*. Oct 1983;72(4):1396-1409.
33. Keshawarz NM, Recker RR. Expansion of the medullary cavity at the expense of cortex in postmenopausal osteoporosis. *Metabolic bone disease & related research*. 1984;5(5):223-228.
  34. Chopra PM, Johnson M, Nagy TR, Lemons JE. Micro-computed tomographic analysis of bone healing subsequent to graft placement. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials*. Feb 2009;88(2):611-618.
  35. Giannoudis PV, Schneider E. Principles of fixation of osteoporotic fractures. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. Oct 2006;88(10):1272-1278.
  36. Mosekilde L. Vertebral structure and strength in vivo and in vitro. *Calcified tissue international*. 1993;53 Suppl 1:S121-125; discussion S125-126.
  37. Bono CM, Einhorn TA. Overview of osteoporosis: pathophysiology and determinants of bone strength. *European spine journal : official publication of the European Spine Society, the European Spinal Deformity Society, and the European Section of the Cervical Spine Research Society*. Oct 2003;12 Suppl 2:S90-96.
  38. Schutze N, Ebert R, Paunescu K, Jakob F. [Genetics of osteoporosis]. *Deutsche medizinische Wochenschrift*. Jul 25 2003;128(30):1609-1614.
  39. Smith DM, Nance WE, Kang KW, Christian JC, Johnston CC, Jr. Genetic factors in determining bone mass. *The Journal of clinical investigation*. Nov 1973;52(11):2800-2808.
  40. Kaprio J, Rimpela A, Winter T, Viken RJ, Rimpela M, Rose RJ. Common genetic influences on BMI and age at menarche. *Human biology*. Oct 1995;67(5):739-753.
  41. Hunter D, De Lange M, Snieder H, et al. Genetic contribution to bone metabolism, calcium excretion, and vitamin D and parathyroid hormone regulation. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. Feb 2001;16(2):371-378.
  42. Michaelsson K, Melhus H, Ferm H, Ahlbom A, Pedersen NL. Genetic liability to fractures in the elderly. *Archives of internal medicine*. Sep 12 2005;165(16):1825-1830.
  43. Ralston SH, de Crombrughe B. Genetic regulation of bone mass and susceptibility to osteoporosis. *Genes & development*. Sep 15 2006;20(18):2492-2506.
  44. Chahal HS, Drake WM. The endocrine system and ageing. *The Journal of pathology*. Jan 2007;211(2):173-180.
  45. Jessop HL, Suswillo RF, Rawlinson SC, et al. Osteoblast-like cells from estrogen receptor alpha knockout mice have deficient responses to mechanical strain. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. Jun 2004;19(6):938-946.
  46. Lima F, Vico L, Lafage-Proust MH, van der Saag P, Alexandre C, Thomas T. Interactions between estrogen and mechanical strain effects on U2OS human osteosarcoma cells are not influenced by estrogen receptor type. *Bone*. Nov 2004;35(5):1127-1135.
  47. Priemel M, Munch C, Beil FT, Ritzel H, Amling M. [Pathophysiology and pathomorphology of osteoporosis]. *Der Radiologe*. Oct 2006;46(10):831-838.
  48. Lee K, Jessop H, Suswillo R, Zaman G, Lanyon L. Endocrinology: bone adaptation requires oestrogen receptor-alpha. *Nature*. Jul 24 2003;424(6947):389.

49. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocrine reviews*. Aug 2001;22(4):477-501.
50. Lips P. Vitamin D physiology. *Progress in biophysics and molecular biology*. Sep 2006;92(1):4-8.
51. Rahmani P, Morin S. Prevention of osteoporosis-related fractures among postmenopausal women and older men. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*. Nov 24 2009;181(11):815-820.
52. Cristofalo VJ, Lorenzini A, Allen RG, Torres C, Tresini M. Replicative senescence: a critical review. *Mechanisms of ageing and development*. Oct-Nov 2004;125(10-11):827-848.
53. Duque G. Bone and fat connection in aging bone. *Current opinion in rheumatology*. Jul 2008;20(4):429-434.
54. Tarantino U, Saturnino L, Scialdoni A, et al. Fracture healing in elderly patients: new challenges for antiosteoporotic drugs. *Aging clinical and experimental research*. Oct 2013;25 Suppl 1:S105-108.
55. Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. *Drug discovery today*. Nov 1 2003;8(21):980-989.
56. Augat P, Simon U, Liedert A, Claes L. Mechanics and mechano-biology of fracture healing in normal and osteoporotic bone. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. Mar 2005;16 Suppl 2:S36-43.
57. Einhorn TA. The cell and molecular biology of fracture healing. *Clinical orthopaedics and related research*. Oct 1998(355 Suppl):S7-21.
58. Phillips AM. Overview of the fracture healing cascade. *Injury*. Nov 2005;36 Suppl 3:S5-7.
59. Gerstenfeld LC, Cullinane DM, Barnes GL, Graves DT, Einhorn TA. Fracture healing as a post-natal developmental process: molecular, spatial, and temporal aspects of its regulation. *Journal of cellular biochemistry*. Apr 1 2003;88(5):873-884.
60. Holstein JH, Menger MD, Scheuer C, et al. Erythropoietin (EPO): EPO-receptor signaling improves early endochondral ossification and mechanical strength in fracture healing. *Life sciences*. Feb 13 2007;80(10):893-900.
61. Trueta J. The role of vessels in osteogenesis. *The Journal of bone and joint surgery*. May 1963;45-B no. 2 402-418.
62. Street J, Bao M, deGuzman L, et al. Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Jul 23 2002;99(15):9656-9661.
63. Schneider E, Goldhahn J, Burckhardt P. The challenge: fracture treatment in osteoporotic bone. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. Mar 2005;16 Suppl 2:S1-2.
64. Alt V, Thormann U, Ray S, et al. A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures. *Acta biomaterialia*. Jun 2013;9(6):7035-7042.
65. Metz VM, Gilula LA. Imaging techniques for distal radius fractures and related injuries. *The Orthopedic clinics of North America*. Apr 1993;24(2):217-228.

66. Caniggia A, Nuti R. [The diagnosis of postmenopausal osteoporosis]. *Minerva endocrinologica*. Apr-Jun 1991;16(2):55-60.
67. Faulenbach M. *EVALUATION DER KNOCHENARCHITEKTUR IM STEROID-INDUZIERTEN OSTEOPOROSEMODELL DER RATTE MITTELS MIKRO-CT*. Gießen: Medizin, medizinisches Zentrum für Radiologie, Abteilung für diagnostische Radiologie, Justus-Liebig-Universität; 2013.
68. Engelke K, Libanati C, Liu Y, et al. Quantitative computed tomography (QCT) of the forearm using general purpose spiral whole-body CT scanners: accuracy, precision and comparison with dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). *Bone*. Jul 2009;45(1):110-118.
69. Kleerekoper M, Villanueva AR, Stanciu J, Rao DS, Parfitt AM. The role of three-dimensional trabecular microstructure in the pathogenesis of vertebral compression fractures. *Calcified tissue international*. Dec 1985;37(6):594-597.
70. Goodman LR. The Beatles, the Nobel Prize, and CT scanning of the chest. *Radiologic clinics of North America*. Jan 2010;48(1):1-7.
71. Burghard AJ, Link TM, Majumdar S. High-resolution computed tomography for clinical imaging of bone microarchitecture. *Clinical orthopaedics and related research*. Aug 2011;469(8):2179-2193.
72. Flohr T, Ohnesorge B, Schaller S. [Current status and future potentials of multislice computed tomography]. *Der Radiologe*. Feb 2004;44(2):113-120.
73. Fishman EK, Ney DR, Heath DG, Corl FM, Horton KM, Johnson PT. Volume rendering versus maximum intensity projection in CT angiography: what works best, when, and why. *Radiographics : a review publication of the Radiological Society of North America, Inc*. May-Jun 2006;26(3):905-922.
74. Hu H, He HD, Foley WD, Fox SH. Four multidetector-row helical CT: image quality and volume coverage speed. *Radiology*. Apr 2000;215(1):55-62.
75. Flohr TG, Leng S, Yu L, et al. Dual-source spiral CT with pitch up to 3.2 and 75 ms temporal resolution: image reconstruction and assessment of image quality. *Medical physics*. Dec 2009;36(12):5641-5653.
76. Muller NL. Computed tomography and magnetic resonance imaging: past, present and future. *The European respiratory journal. Supplement*. Feb 2002;35:3s-12s.
77. Ritman EL. Current status of developments and applications of micro-CT. *Annual review of biomedical engineering*. Aug 15 2011;13:531-552.
78. Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W. [Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure]. *Der Radiologe*. Mar 1999;39(3):203-212.
79. Flannery BP, Deckman HW, Roberge WG, D'Amico KL. Three-Dimensional X-ray Microtomography. *Science (New York, N.Y.)*. Sep 18 1987;237(4821):1439-1444.
80. Schambach SJ, Bag S, Schilling L, Groden C, Brockmann MA. Application of micro-CT in small animal imaging. *Methods*. Jan 2010;50(1):2-13.
81. Ananda S, Marsden V, Vekemans K, et al. The visualization of hepatic vasculature by X-ray micro-computed tomography. *Journal of electron microscopy*. Jun 2006;55(3):151-155.
82. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen KJ, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. Jul 2010;25(7):1468-1486.

83. Genant HK, Jiang Y. Advanced imaging assessment of bone quality. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Apr 2006;1068:410-428.
84. Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. Feb 1989;4(1):3-11.
85. Ritman EL. Micro-computed tomography of the lungs and pulmonary-vascular system. *Proceedings of the American Thoracic Society*. 2005;2(6):477-480, 501.
86. Langheinrich AC, Bohle RM, Breithecker A, Lommel D, Rau WS. [Micro-computed tomography of the vasculature in parenchymal organs and lung alveoli]. *RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin*. Sep 2004;176(9):1219-1225.
87. Jun HY, Lee YH, Juhng SK, Lee MS, Oh J, Yoon KH. Micro-CT measurements of tumoral vessels supplied by portal circulation in hepatic colorectal metastasis mouse model. *Microscopy research and technique*. Jun 2014;77(6):415-421.
88. Ritman EL. Micro-computed tomography-current status and developments. *Annual review of biomedical engineering*. 2004;6:185-208.
89. Bentley MD, Jorgensen SM, Lerman LO, Ritman EL, Romero JC. Visualization of three-dimensional nephron structure with microcomputed tomography. *Anatomical record*. Mar 2007;290(3):277-283.
90. Thormann U, El Khawassna T, Ray S, et al. Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats. *Injury*. Mar 2014;45(3):487-493.
91. Ritman EL. Schematische Darstellung der Mikro-CT-Technik mit Kegelstrahlgeometrie. Department of Physiology and Biomedical Engineering, Mayo Clinic, Rochester, MN, US.
92. Heiss C, Govindarajan P, Schlewitz G, et al. Induction of osteoporosis with its influence on osteoporotic determinants and their interrelationships in rats by DEXA. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*. Jun 2012;18(6):BR199-207.
93. Bruker microCT K, Belgium. Bruker Brochure, X-Ray Microtomography. In-Vivo Small Animal Imaging, 2D / 3D Image Analysis. <http://www.skyscan.be/products/1173.htm>.
94. Wessler S. The issue of animal models of thrombosis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1989;556:366-370.
95. Peng Z, Tuukkanen J, Zhang H, Jamsa T, Vaananen HK. The mechanical strength of bone in different rat models of experimental osteoporosis. *Bone*. Sep-Oct 1994;15(5):523-532.
96. Wronski TJ, Lowry PL, Walsh CC, Ignaszewski LA. Skeletal alterations in ovariectomized rats. *Calcified tissue international*. May 1985;37(3):324-328.
97. Aronson J, Shen XC, Skinner RA, Hogue WR, Badger TM, Lumpkin CK, Jr. Rat model of distraction osteogenesis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. Mar 1997;15(2):221-226.
98. Kalu DN. The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone and mineral*. Dec 1991;15(3):175-191.
99. Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. Mar 2005;16 Suppl 2:S129-138.
100. Berg BN, Harmison CR. Growth, disease, and aging in the rat. *Journal of gerontology*. Oct 1957;12(4):370-377.

101. Miller SC, Wronski TJ. Long-term osteopenic changes in cancellous bone structure in ovariectomized rats. *The Anatomical record*. Jul 1993;236(3):433-441.
102. Nunamaker DM. Experimental models of fracture repair. *Clinical orthopaedics and related research*. Oct 1998(355 Suppl):S56-65.
103. Stuermer EK, Sehmisch S, Rack T, et al. Estrogen and raloxifene improve metaphyseal fracture healing in the early phase of osteoporosis. A new fracture-healing model at the tibia in rat. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie*. Feb 2010;395(2):163-172.
104. Cao Y, Mori S, Mashiba T, et al. Raloxifene, estrogen, and alendronate affect the processes of fracture repair differently in ovariectomized rats. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. Dec 2002;17(12):2237-2246.
105. Nakajima A, Shimoji N, Shiomi K, et al. Mechanisms for the enhancement of fracture healing in rats treated with intermittent low-dose human parathyroid hormone (1-34). *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. Nov 2002;17(11):2038-2047.
106. Li C, Mori S, Li J, et al. Long-term effect of incadronate disodium (YM-175) on fracture healing of femoral shaft in growing rats. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. Mar 2001;16(3):429-436.
107. Monfoulet L, Rabier B, Chassande O, Fricain JC. Drilled hole defects in mouse femur as models of intramembranous cortical and cancellous bone regeneration. *Calcified tissue international*. Jan 2010;86(1):72-81.
108. Uusitalo H, Rantakokko J, Ahonen M, et al. A metaphyseal defect model of the femur for studies of murine bone healing. *Bone*. Apr 2001;28(4):423-429.
109. Kalender WA. X-ray computed tomography. *Physics in medicine and biology*. Jul 7 2006;51(13):R29-43.
110. Bag S, Schambach SJ, Boll H, Schilling L, Groden C, Brockmann MA. [Current concepts for experimental micro-CT in small animals]. *RoFo : Fortschritte auf dem Gebiete der Rontgenstrahlen und der Nuklearmedizin*. May 2010;182(5):390-403.
111. Badea CT, Drangova M, Holdsworth DW, Johnson GA. In vivo small-animal imaging using micro-CT and digital subtraction angiography. *Physics in medicine and biology*. Oct 7 2008;53(19):R319-350.
112. Bonse U, Busch F. X-ray computed microtomography (microCT) using synchrotron radiation (SR). *Progress in biophysics and molecular biology*. 1996;65(1-2):133-169.
113. Barbe MF, Adiga R, Gordiienko O, Pleshko N, Selzer ME, Krynska B. Micro-computed tomography assessment of vertebral column defects in retinoic acid-Induced rat model of myelomeningocele. *Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology*. Jun 2014;100(6):453-462.
114. Clark DP, Badea CT. Micro-CT of rodents: State-of-the-art and future perspectives. *Physica medica : PM : an international journal devoted to the applications of physics to medicine and biology : official journal of the Italian Association of Biomedical Physics (AIFB)*. Jun 25 2014.
115. Freeman TA, Patel P, Parvizi J, Antoci V, Jr., Shapiro IM. Micro-CT analysis with multiple thresholds allows detection of bone formation and resorption during ultrasound-treated fracture healing. *Journal of orthopaedic research :*

- official publication of the Orthopaedic Research Society*. May 2009;27(5):673-679.
116. Tsukimura N, Yamada M, Aita H, et al. N-acetyl cysteine (NAC)-mediated detoxification and functionalization of poly(methyl methacrylate) bone cement. *Biomaterials*. Jul 2009;30(20):3378-3389.
  117. Gao Y, Luo E, Hu J, Xue J, Zhu S, Li J. Effect of combined local treatment with zoledronic acid and basic fibroblast growth factor on implant fixation in ovariectomized rats. *Bone*. Feb 2009;44(2):225-232.
  118. Patel V, Issever AS, Burghardt A, Laib A, Ries M, Majumdar S. MicroCT evaluation of normal and osteoarthritic bone structure in human knee specimens. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. Jan 2003;21(1):6-13.
  119. Lukas C, Ruffoni D, Lambers FM, et al. Mineralization kinetics in murine trabecular bone quantified by time-lapsed in vivo micro-computed tomography. *Bone*. Sep 2013;56(1):55-60.
  120. Kohlbrenner A, Koller B, Hammerle S, Ruegsegger P. In vivo micro tomography. *Advances in experimental medicine and biology*. 2001;496:213-224.
  121. Montet X, Pastor CM, Vallee JP, et al. Improved visualization of vessels and hepatic tumors by micro-computed tomography (CT) using iodinated liposomes. *Investigative radiology*. Sep 2007;42(9):652-658.
  122. Shofer S, Badea C, Auerbach S, Schwartz DA, Johnson GA. A micro-computed tomography-based method for the measurement of pulmonary compliance in healthy and bleomycin-exposed mice. *Experimental lung research*. Apr-May 2007;33(3-4):169-183.
  123. Langheinrich AC, Bohle RM, Greschus S, et al. Atherosclerotic lesions at micro CT: feasibility for analysis of coronary artery wall in autopsy specimens. *Radiology*. Jun 2004;231(3):675-681.
  124. Cody DD, Nelson CL, Bradley WM, et al. Murine lung tumor measurement using respiratory-gated micro-computed tomography. *Investigative radiology*. May 2005;40(5):263-269.
  125. Barrios C, Brostrom LA, Stark A, Walheim G. Healing complications after internal fixation of trochanteric hip fractures: the prognostic value of osteoporosis. *Journal of orthopaedic trauma*. 1993;7(5):438-442.
  126. Larsson S. Treatment of osteoporotic fractures. *Scandinavian journal of surgery : SJS : official organ for the Finnish Surgical Society and the Scandinavian Surgical Society*. 2002;91(2):140-146.
  127. Blythe JG, Buchsbaum HJ. Fracture healing in estrogen-treated and castrated rats. *Obstetrics and gynecology*. Sep 1976;48(3):351-352.
  128. Langeland N. Effects of oestradiol-17 beta benzoate treatment on fracture healing and bone collagen synthesis in female rats. *Acta endocrinologica*. Nov 1975;80(3):603-612.
  129. Lill CA, Hessel J, Schlegel U, Eckhardt C, Goldhahn J, Schneider E. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. Sep 2003;21(5):836-842.
  130. Meyer RA, Jr., Tshakis PJ, Martin DF, Banks DM, Harrow ME, Kiebzak GM. Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *Journal of orthopaedic research: official publication of the Orthopaedic Research Society*. May 2001;19(3):428-435.



131. Walsh WR, Sherman P, Howlett CR, Sonnabend DH, Ehrlich MG. Fracture healing in a rat osteopenia model. *Clinical orthopaedics and related research*. Sep 1997(342):218-227.
132. Qiao L, Xu KH, Liu HW, Liu HQ. [Effects of ovariectomy on fracture healing in female rats]. *Sichuan da xue xue bao. Yi xue ban = Journal of Sichuan University. Medical science edition*. Jan 2005;36(1):108-111.
133. Nikolaou VS, Efsthopoulos N, Kontakis G, Kanakaris NK, Giannoudis PV. The influence of osteoporosis in femoral fracture healing time. *Injury*. Jun 2009;40(6):663-668.
134. Alt V, Kogelmaier DV, Lips KS, et al. Assessment of angiogenesis in osseointegration of a silica-collagen biomaterial using 3D-nano-CT. *Acta biomaterialia*. Oct 2011;7(10):3773-3779.
135. Claes L, Eckert-Hubner K, Augat P. The effect of mechanical stability on local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. Sep 2002;20(5):1099-1105.
136. Claes L, Eckert-Hubner K, Augat P. The fracture gap size influences the local vascularization and tissue differentiation in callus healing. *Langenbeck's archives of surgery / Deutsche Gesellschaft fur Chirurgie*. Oct 2003;388(5):316-322.
137. Bolland BJ, Kanczler JM, Dunlop DG, Oreffo RO. Development of in vivo muCT evaluation of neovascularisation in tissue engineered bone constructs. *Bone*. Jul 2008;43(1):195-202.

## 8. ANHANG

### 8. 1 Material

Bildanalyseprogramme: DataViewer<sup>®</sup> (Version: 1.4.0 (64bit)), SkyScan<sup>®</sup>,  
Kontich, Belgien  
CT-Analyser<sup>®</sup> (Version: 1.14.4.1+ (64bit), SkyScan<sup>®</sup>,  
Kontich, Belgien)  
Analyze<sup>®</sup>(Version: 10.0, Biomedical Imaging Resource,  
Mayo Clinic, Rochester, MN, USA)  
μCT-Scanner: SkyScan 1173 X-Ray Microscope-Microtomograph,  
SkyScan<sup>®</sup> Kontich, Belgien  
Statistikprogramm: JMP<sup>®</sup> 8.0, SAS<sup>®</sup> Institute, Cary, NC, USA

### 8. 2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:

Vergleich normales Knochengewebe mit osteoporotischem Knochengewebe. Auffallend ist die größere Masse und höhere Dichte der Trabekel des gesunden Knochengewebes (A) verglichen mit dem osteoporotischen Knochenbefund (B)<sup>37</sup>

Abbildung 2:

Sagitalschnitt eines menschlichen Femur, proximal. (25 Mikron Voxelgröße, nanotom-S, phoenix|x-ray, GE Measurement & Control; Wunstorf, Deutschland) Abgebildet sind die strukturellen und geweblichen Veränderungen, die im Alter auftreten. Abbildung übernommen aus Jepsen KJ, Schlecht SH, Kozloff KM. Are we taking full advantage of the growing number of pharmacological treatment options for osteoporosis? Current opinion in pharmacology. Apr 15 2014;16c:64-71.<sup>10</sup>

Abbildung 3:

Stadien der Frakturheilung **(a)** Hämatombildung: Nach einer Verletzung führt die Unterbrechung der Blutgefäße zu einem Hämatom **(b)** Weiche Kallusbildung. Das beinhaltet: Neue Blutgefäße werden aus bereits bestehenden Gefäßen gebildet (Angiogenese), Externes Kallusgewebe (intramembranöse Ossifikation) und internes Kallusgewebe (Faserknorpel); **(c)** Harte Kallusbildung: Das Kallusgewebe wird mineralisiert, es entsteht harter Kallus aus Geflechtknochen **(d)** Remodeling: Das Kallusgewebe wird von sekundärem lamellären Knochen ersetzt und die

Blutversorgung ist wieder normal. Abbildung übernommen aus Carano RA, Filvaroff EH. Angiogenesis and bone repair. Drug discovery today. Nov 1 2003;8(21):980-989.<sup>55</sup>

Abbildung 4:

Die Größe von Nagetieren beträgt ca. 10 cm. Ihre Organe sind ca. 1 cm gross. Die Gewebe- Funktionseinheiten (Tissue basic functional units, BFU) sind 100 µm im Durchmesser. Zellen sind ca. 5-10 µm im Durchmesser. Zellorganellen sind <10<sup>0</sup>µm. Die Mikro- CT bzw. Nano-CT kann alle diese Ebenen als Volumenbild darstellen. Abbildung übernommen aus Ritman EL. Current status of developments and applications of micro-CT. Annual review of biomedical engineering. Aug 15 2011;13:531-552.<sup>77</sup>

Abbildung 5:

Schematische Darstellung der Mikro-CT-Technik mit Kegelstrahlgeometrie Abbildung übernommen von E.L. Ritman, Department of Physiology and Biomedical Engineering, Mayo Clinic, Rochester, MN, US<sup>91</sup>

Abbildung 6:

Ansicht auf A) 3-mm- Defekt C) 5-mm- Defekt mit Plattenosteosynthese am Femur lateral B) D) CT- Aufnahme postoperativ, keilförmiger Defekt und Plattenosteosynthese gut sichtbar

Abbildung 7:

A) Makroskopische Darstellung eines Femurs mit keilförmigem Defekt und eingefügter Plattenosteosynthese B) Mikro- CT Aufnahme des Femurs. Neben der Plattenosteosynthese und dem Defekt, sind umliegende Gefäße im Weichteilmantel erkennbar C) entnommener Knochenkeil, Ansicht von anterior auf die Kortikalis D) E) Axiale Schnittbilder des entnommenen Knochenkeils, Pfeile weisen auf die trabekulären Knochenstrukturen, die metaphysäre Lokalisation beweisen

Abbildung 8:

3-mm- Defekt, Frakturzone vergrößert dargestellt. Die knöcherne Durchbauung ist deutlich sichtbar. Der Pfeil weist auf das neugebildete Knochengewebe. Die roten Markierungen zeigen die Begrenzung zwischen enossalem und lateralem Bereich

Abbildung 9:

Darstellung der knöchernen Durchbauung der Frakturzonen (roter Kasten)

Abbildung 10:

Vergrößerte Ansicht des keilförmigen Osteotomiedefektes. Axiale Schnittbilder auf denen das Trabekelwerk (Pfeile) als Bestätigung der metaphysären Lokalisation der Osteotomie sichtbar ist

Abbildung 11:

A) Übersichtsaufnahme eines Femurs im Mikro-CT mit 3-mm- Defekt B)Frakturzone vergrößert dargestellt. Die knöchernen Durchbauung ist deutlich sichtbar. Der Pfeil weist auf das neugebildete Knochengewebe C) Übersichtsaufnahme eines Femurs im Mikro-CT mit 5-mm- Defekt D) Frakturzone vergrößert dargestellt. Der Frakturspalt ist nicht durchbaut. Es zeigt sich kaum neugebildetes Knochengewebe (Pfeil).

Abbildung 12:

Boxplots des neugebildeten Knochengewebes (Area new bone formation) in  $\text{mm}^2$ . Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied in Bezug auf die Fläche neugebildeten Knochengewebes zwischen den osteoporotischen Knochenproben mit einem 3-mm-Defekt (OVX 3 mm) und einem 5-mm- Defekt (OVX 5 mm)( $p=0.05$ ). Der Unterschied des maximal neugebildeten Knochengewebes zwischen den Kontrollgruppen mit einem 3-mm- und einem 5-mm-großen Defekt (Controls 3 mm und Controls 5 mm) ist ebenfalls signifikant. Die Fläche neugebildeten Knochengewebes innerhalb der Gruppen mit der gleichen Defektgröße unterscheidet sich weder in der 3-mm- noch in der 5-mm- Gruppe signifikant.

Abbildung 13:

Boxplots der Gefäßvolumenfraktionen (Vascular Volume Fraction (%), VVF). Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied in Bezug auf die VVF zwischen der 3-mm-Kontroll- der 3-mm-OVX- und der 5-mm-Kontroll- Gruppe. Es zeigt sich allerdings ein signifikanter Unterschied der Gefäßneubildung zwischen der 5-mm- Kontroll und der 5-mm- OVX- Gruppe ( $p=0.04$ ).

Abbildung 14:

Quantifizierung der Durchbauung der Frakturzonen und der Vaskularisierung der Proben, repräsentative A) D)Übersichtsaufnahme Femur, B)E) Durchbaute Frakturzone (roter Kasten C,F), C) F) Vergrößerung der Defektzone, Pfeil: neugebildetes Knochengewebe

### 8. 3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:

Einteilung des Schweregrades bei Knochendichteverlust basierend auf dem T- Wert, Tabelle übernommen aus Faulenbach M. Evaluation der Knochenarchitektur im Steroid- Induzierten Osteoporosemodell der Ratte mittels Mikro- CT, Gießen: Medizin, medizinisches Zentrum für Radiologie, Abteilung für diagnostische Radiologie, Justus-Liebig- Universität; 2013, URL: <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2014/11031/><sup>67</sup>

Tabelle 2:

Vergleich der Eigenschaften der Mikro- CT mit der Spiral- CT. Modifiziert nach Engelke et al., Tabelle übernommen aus Engelke K, Karolczak M, Lutz A, Seibert U, Schaller S, Kalender W. [Micro-CT. Technology and application for assessing bone structure]. Der Radiologe. Mar 1999;39(3):203-212<sup>78</sup>

## 8. 4 Abkürzungsverzeichnis

Aa.	Arteriae
Abs.	Absatz
Anova	Analysis of Variance
3D	dreidimensional
BGB	Bundesgesetzbuch
bit	binary digit
BMD	bone mineral density
BMI	Body Mass Index
BMP	Bone morphogenetic protein
BV/TV	Bone Volume/Tissue Volume
bzw.	beziehungsweise
BV	Bone Volume
ca.	circa
CCD	charge-coupled device (ladungsträgergekoppelte Schaltung)
cm	Zentimeter
CT	Computertomographie
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DSCT	Dual Source Computed Tomography
DXA/DEXA	Dual-Energy X-ray Absorptiometry, Doppelröntgen-Absorptiometrie
ER- Alpha- Rez.	Estrogen Alpha Rezeptor
FGF	Fibroblast Growth Factor
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GVbl	Gesetz- und Verordnungsblatt
Gy	gray (unit)
HRCT	High resolution computed tomography

IGF-1/2	Insuline-like Growth Factor 1/2
IU	International Units
JLU Gießen	Justus-Liebig-Universität Gießen
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kV	Kilovolt
M.	Musculus
MB	Megabyte
Mikro-CT/ $\mu$ CT	Mikro-Computertomograph
MIP	Maximum intensity projection
MPR	Multiplanar reconstruction
$\mu$ m	Mikrometer
mm	Millimeter
ms	Milisekunden
MSCT	Multislice- Computertomographie
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
n.s.	nicht signifikant
OPG	Osteoprotegerin
OVX	Ovarektomie
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
QCT	quantitative Computertomographie
RANKL	Rezeptoraktivator des nukleären Faktors NF $\kappa$ B Ligand
ROI	Region of Interest
SD	Standardabweichung
SEM	Standard Error of the Mean
SFB/TR 79	Sonderforschungsbereich/Transregio 79

Tb.N	Trabecular Number
Tb.Sp	Trabecular Separation
Tb.Th	Trabecular Thickness
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor
TIFF	Tagged Image File Format
UV-Strahlung	Ultraviolettstrahlung
VOI	Volume of Interest
vs.	Versus
VSF	Vascular Stimulating Factor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VRT	Volume Rendering Techniken
VVF	Vascular Volume Fraction
z.B.	zum Beispiel



## **9. DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die an der Fertigstellung dieser Arbeit beteiligt waren und dieses Projekt möglich gemacht haben.

- An erster Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. med. A. C. Langheinrich für die Chance an diesem interessanten Thema mitarbeiten zu dürfen und die außerordentlich zuverlässige und ausdauernde Unterstützung bei der Umsetzung des Projektes bedanken.
- Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. M. Kampschulte und Frau G. Martels für die effektive Zusammenarbeit im Labor und Hilfsbereitschaft bei der Lösung aller technischer Fragen.
- Abschließend danke ich allen Mitarbeitern der Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie der Universität Gießen, die an der Vorbereitung und Durchführung der Tierexperimente mitgewirkt haben und so mein Projekt möglich gemacht haben.

## 10. PUBLIKATIONEN

1. Volker Alt , Ulrich Thormann , Seemun Ray, Daniel Zahner, Lutz Dürselen , Katrin Lips , Thaqif El Khassawna , Christian Heiss , Alina Riedrich , Gudrun Schlewitz , Anita Ignatius , Marian Kampschulte , **Helena von Dewitz** , Sascha Heinemann , Reinhard Schnettler , Alexander Langheinrich : A new metaphyseal bone defect model in osteoporotic rats to study biomaterials for the enhancement of bone healing in osteoporotic fractures, *Acta Biomaterialia* 9 (2013) 7035–7042

2. Ulrich Thormann, Thaqif El Khawassna, Seemun Ray, Lutz Dürselen, Marian Kampschulte, Katrin Lips , **Helena von Dewitz**, Sascha Heinemann, Christian Heiss, Gabor Szalay, Alexander C. Langheinrich, Anita Ignatius, Reinhard Schnettler, Volker Alt: Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats, *Injury, Int. J. Care Injured* 45 (2014) 487–493