

Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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 Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Die Veränderung spongiöser boviner Knochenstanzzyylinder bei unterschiedlichen
Lagerungsbedingungen

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

vorgelegt von Dirk Lommel
aus Gießen

Gießen 2003

Aus dem Medizinischen Zentrum für Radiologie
Abteilung Diagnostische Radiologie
Leiter Prof. Dr. med. W.S. Rau
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. W.S. Rau

Gutachter: Prof. Dr. A. Schulz

Tag der Disputation: 14.05.2004

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 PATHOGENESE DER OSTEOPOROSE.....	1
1.2 BILDGEBENDE VERFAHREN ZUR DIAGNOSTIK DER OSTEOPOROSE.....	2
1.3 DIE MIKRO-COMPUTERTOMOGRAPHIE (MIKRO-CT).....	4
1.4 ZIELSETZUNG UND FRAGESTELLUNGEN DER ARBEIT	5
2. MATERIAL UND METHODEN	7
2.1 VERSUCHSTIERE.....	7
2.2 PROBEN	8
2.2.1 Probenentnahme.....	8
2.2.2 Probenlagerung.....	9
2.3 MIKRO-CT	10
2.3.1 Bildakquisition.....	13
2.3.2 Bildberechnung	14
2.4 BILDANALYSE	15
2.4.1 Strukturparameter.....	16
2.4.2 Berechnung der multiplanaren und dreidimensionalen Bildrekonstruktionen.....	18
2.5 KOMPRESSIONSVERSUCHE.....	18
2.5.1 Kompressionsgerät.....	18
2.5.2 Mehrkanalmessverstärker.....	19
2.5.3 Datenerfassung.....	20
2.5.3 Kompressionsarbeit.....	20
2.5.4 Kompressionskraft.....	21
2.6 HISTOLOGIE.....	24
2.6.1 Grundlagen.....	24
2.6.2 Herstellung der histologischen Schnittpräparate.....	24
2.7 STATISTIK.....	24
3. ERGEBNISSE	26
3.1 KRAFT-WEG DIAGRAMME	26
3.2 VERGLEICH DER KOMPRESSIONSARBEIT UND MAX. KOMPRESSIONS-KRAFT DER LAGERUNGSVERSUCHE.....	28

3.3 VERGLEICH DER KOMPRESSIONSARBEIT UND MAX. KOMPRESSIONS-KRAFT DER AUFTAUVERSUCHE.....	31
3.4 VERGLEICH DER KNOCHENSTRUKTURPARAMETER IM VERLAUF DER AUFTAUVERSUCHE.....	33
3.4.1 Hotelling T2-Test der Strukturparameter.....	35
3.5 KORRELATION DER STRUKTURPARAMETER MIT DER KOMPRESSIONSARBEIT UND DER MAXIMALEN KOMPRESSIONS-KRAFT	36
3.5.1 Kompressionsarbeit.....	37
3.5.2 Maximale Kompressionskraft.....	38
3.6 VERGLEICH DER HISTOLOGISCHEN SCHNITTPRÄPARATE MIT DEN MULTIPLANAREN BILDREKONSTRUKTIONEN	39
4. DISKUSSION.....	42
4.1 PROBENGEWINNUNG UND PROBENLAGERUNG.....	42
4.2 ANALYSE DER KNOCHENSTRUKTURPARAMETER MIT DER MIKRO-CT.....	44
4.3 MECHANISCHE STABILITÄTSPRÜFUNG	51
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	54
6. LITERATURVERZEICHNIS	57
7. DANKSAGUNG	62
8. LEBENSLAUF	63

1. Einleitung

1.1 Pathogenese der Osteoporose

Die Osteoporose ist die häufigste chronische Erkrankung des Knochenstoffwechsels. Sie ist eine typische Erkrankung des höheren Lebensalters, bei der es zu einer Verringerung der Knochenmasse und einer Verschlechterung der Knochenstruktur kommt. „Osteoporosis is a skeletal disease characterized by low bone mass and micro architectural deterioration of bone tissue, with a consequent increase in bone fragility and susceptibility to fracture” (Consensus statement on Osteoporosis, 1993).

Die osteoporotische Fraktur ist als Endpunkt des Krankheitsbildes für den einzelnen Patienten der Hauptfaktor in der Einschränkung seiner Lebensqualität.

Es kommt vor allem zu Frakturen am Oberschenkelhals, dem Unterarm und der Wirbelsäule. Die Häufigkeit, Schwere und Prognose dieser assoziierten Frakturen stellen ein großes gesundheitsökonomisches Problem dar, das sich durch die demographische Entwicklung der Industrienationen noch verschärfen wird. Bis zum Jahr 2040 wird sich der Anteil der über 65-jährigen in der europäischen Union verdoppeln, d.h. bei gleich bleibender Inzidenz wird die Anzahl von Schenkelhals- und Wirbelkörperfrakturen um 135% bzw. 57% ansteigen (Compston et al., 1998).

Diese Prognosen zeigen, daß der frühzeitigen Diagnose und der sich daraus ergebenden Therapie eine immer größere Bedeutung zukommen wird.

Verschiedene therapeutische Ansätze sind je nach Form der Osteoporose möglich: Zur medikamentösen Unterstützung, um dem weiteren Verlust der Knochenmasse vorzubeugen, werden Bisphosphonate, Östrogene, Östrogen-Rezeptor-Modulatoren, Calcitonin und Parathormon eingesetzt. Ergänzt werden diese medikamentösen Therapien durch eine Neuausrichtung der Ernährung, d.h. eine Sicherstellung der Kalzium- und Vitamin-D-Zufuhr und einer Änderung der Lebensumstände, mit Ausschaltung der Risikofaktoren und gezielter körperliche Betätigung (Woolf und Akesson, 2003)

Unterschieden wird die Osteoporose in eine primäre und sekundäre Form. Die primäre Osteoporose bezeichnet die Osteoporose mit unbekannter Ätiologie und wird weiter in Typ I und Typ II differenziert. Typ I, die durch Hormonmangel verursachte Osteoporose, ist insbesondere bei der Frau in der Postmenopause zu finden und tritt im Vergleich zur Osteoporose beim Mann mit einer Häufigkeit von 6:1 auf, ca. 5-10% der 50-70-jährigen sind von dieser Form betroffen (Seibel MJ und Stracke H, 1997). Der primär trabekuläre Knochenverlust wird vorwiegend im Bereich der distalen Brustwirbelsäule, der

Lendenwirbelsäule und am distalen Radius biomechanisch relevant, so dass in dieser Lokalisation Frakturen gehäuft auftreten (Kanis, 1994)

Typ II der primären Osteoporose, die senile Osteoporose, tritt bei Frauen gegenüber Männern doppelt so häufig auf. Nach Erreichen des 70ten Lebensjahres leiden 90-95% der Osteoporosepatienten an dieser Form, sie führt im Gegensatz zur postmenopausalen Form auch zur Ausdünnung des kortikalen Knochens. Ein weiterer zusätzlicher Prädispositionsort ist bei diesen Patienten der Schenkelhals (Riggs et al., 1998).

Ursächlich für das Auftreten einer sekundären Osteoporose können der Morbus Cushing, die Hyperthyreose, der Hypogonadismus, sowie ein Malabsorptionsyndrom sein. Auch Medikamenten-induzierte Formen sind bekannt, wie z.B. unter der Therapie mit Heparin und Kortikostereoiden (Hawker GA, 2003).

Die klinische Manifestation der kortikoid-induzierten Osteoporose ist von den Formen anderer Genese nicht zu unterscheiden. Im Gegensatz zur postmenopausalen Osteoporose, bei der es primär zum Verlust der horizontalen Trabekel im Wirbelkörper kommt, ist bei der Form unter Kortisontherapie mit einer generellen Reduktion der Trabekelstruktur zu rechnen (Marcus, 1996). Dies wirkt sich auch in der radiologischen Darstellung aus: die medikamenten-induzierte Form führt zu einem verschwommenen und filigranen Bild der Trabekelstruktur, hingegen ist bei dem Fehlen der Sexualhormone eine deutliche Betonung der vertikalen Trabekel zu erkennen.

1.2 Bildgebende Verfahren zur Diagnostik der Osteoporose

In den letzten Jahren sind neue, zum Teil konkurrierende Methoden auf dem Gebiet der Osteoporosedagnostik und Forschung etabliert worden.

Konventionelle Röntgenaufnahmen sind nicht in der Lage die Frühformen zu erfassen, erst wenn 1/3 der Knochenmasse abgebaut ist, kann nativradiologisch eine verminderte Mineralisation vermutet werden (Caniggia und Nuti, 1991; Jergas und Schmid, 1999). Die klinisch manifeste Osteoporose mit Frakturen und Formveränderungen im Achsenskelett und peripheren Frakturen kann dagegen sicher erkannt werden.

Zur Diagnosesicherung und der Verlaufsbeurteilung der Osteoporose unter Therapie haben sich die quantitative Computertomographie (QCT) und die duale Röntgenabsorptiometrie (DEXA=Dual Energy x-Ray Absorptiometry, Synonym: DXA = Dual x-Ray Absorptiometry) etabliert (Kanis, 2000).

Die QCT beruht auf der unterschiedlichen Schwächung von Röntgenstrahlung abhängig vom durchstrahlten Objekt. Die Standardisierung der Messung erfolgt durch einen miterfassten

Prüfkörper definierter Dichte und Zusammensetzung. Die Kalibrierung des Systems mit dem Prüfkörper ermöglicht die Angabe des Dichteäquivalentes in mg Hydroxylapatit (HA)/cm³ (Kalender et al., 1988). Problematisch bei der QCT als Einenergietechnik ist der Fettfehler. Er resultiert aus dem Vorhandensein von Fettmark in der Wirbelkörperspongiosa. Dieser individuell variable Fettanteil des Knochenmarks führt zu einer Unterschätzung des Knochenmineralgehaltes. Der Fettfehler wird drastisch reduziert durch Vergleich mit den entsprechenden Normalwerten, ermittelt an einem gleichartigen CT-Typ. Die Messungen sollten im Energiebereich um 80kV erfolgen (Gluer und Genant, 1989)

Das am häufigste verwendete Verfahren für die Knochendichtemessung ist die DEXA. Sie ist gegenüber der QCT ein zweidimensionales Verfahren. Das Messprinzip beruht auf der Schwächung zweier Photonenstrahlen mit unterschiedlicher Energie. Beim Durchtritt durch den Körper ist die Schwächungsdifferenz im Knochen deutlich größer als im Weichteilgewebe. Da es sich bei der DEXA nur um ein Projektionsverfahren handelt, erfolgt die Angabe des Knochenmineralgehaltes im mg Hydroxylapatit (HA)/cm².

Gegenüber der QCT, bei der kortikaler und spongioser Knochen getrennt ausgewertet werden, kann bei der DEXA nur der gemeinsame Mineralsalzgehalt von Kortikalis und Spongiosa bestimmt werden.

Im Alter zwischen 25 und 35 Jahren wird bereits die maximale Knochenmasse erreicht, danach kommt es zu einem stetigen Abfall der bei Frauen ca. 30-40%, bei Männern ca. 10-20% beträgt (Melsen und Melsen, 1976). Nach Definition der WHO ist von einer Osteoporose auszugehen, wenn der T-Score unterhalb der 2,5-fachen Standardabweichung liegt. Der T-Score beschreibt die Differenz des Patientenwertes zum Mittelwert gesunder junger Menschen in Standardabweichungen. Das Risiko eine osteoporotische Fraktur zu erleiden beträgt dann ca. 20% (Kanis, 1994).

Die Röntgenabsorptionsmethoden erfassen den allgemeinen Verlust der Knochenmasse, sie sind jedoch nicht in der Lage, die strukturellen Veränderungen zu erkennen. Dieser Verlust an Knochenmasse geht sicher auch mit einer Strukturveränderung einher, und beides resultiert dann in einer Reduktion der mechanischen Belastbarkeit, offenbar aber disproportional. Daß die Veränderungen der Knochenstruktur entscheidender für die mechanische Belastbarkeit sind, zeigen die Untersuchungen von Kleerekoper et al., (1985) und Parfitt et al., (1983; Parfitt, 1987): Die Versagenslast des Knochens ist kleiner als es der reine Verlust der Knochenmasse erwarten ließe.

Zahlreiche Studien haben bereits die mechanischen Eigenschaften des trabekulären Knochens und die Beziehungen zu seiner Struktur untersucht (Carter und Hayes, 1977; Keaveny et al.,

1993; Linde et al., 1989; Linde et al., 1991; Odgaard et al., 1997). Die altersabhängigen Veränderungen wurden an Proben aus unterschiedlichen Bereichen mehrfach beschrieben (Ding et al., 2002; Lindahl, 1966; Mosekilde et al., 1985; Mosekilde und Mosekilde, 1986).

In den letzten zwei Jahrzehnten fokussierte sich das Interesse auf die Auswertung der morphometrischen Parameter des vertebrealen und iliacaalen trabekulären Knochens. Es wurden signifikante altersabhängige Veränderungen zahlreicher Strukturparameter wie z.B. der relativen Knochendichte, der Oberflächendichte und des Verhältnisses von Knochen-Oberfläche zur relativen Knochendichte gefunden (McCalden et al., 1997; Mosekilde und Mosekilde, 1986; Thomsen et al., 2002).

Ein weiterer negativer Zusammenhang zwischen Alter und Knochenstruktur besteht bei der trabekulären Dicke (TbTh) und dem Structure-Model-Index (SMI). Ding und Hvid stellten an tibialen Knochenzylindern jenseits des 80. Lebensjahres eine signifikante Reduktion der Trabekeldicke fest (Ding und Hvid, 2000). Ein Ansteigen des SMI zeigte ihnen eine Umwandlung der Trabekelstruktur vom platten- zum zylinderartigen Typ an.

Für das Knochenvolumen (BV) und die Volumenfraktion (BV/TV) wurden mit 75-80 % die besten Korrelationen mit der Kompressionskraft bei Beckenkamm- und Wirbelkörperbiopsien gefunden (Kabel et al., 1999; Thomsen et al., 1998).

1.3 Die Mikro-Computertomographie (Mikro-CT)

Als neue Methode und potentielle Alternative zur qualitativen Histologie hat sich im letzten Jahrzehnt die Technologie der Mikro-CT in der ex-vivo Forschung etabliert. Zahlreiche Untersuchungen wurden in den letzten Jahren auf dem Gebiet der Osteoporoseforschung vorgenommen und es haben sich beeindruckende Ergebnisse in der Darstellung und Quantifizierung pathologischer Knochenveränderungen gezeigt.

Ein erster Ansatz, die Knochenstruktur in dreidimensionalen Mikro-CT Datensätzen zu quantifizieren, wurde von Rüegsegger und Mitarbeitern unternommen (Rüegsegger et al., 1996). In dieser methodischen Arbeit konnte gezeigt werden, daß es möglich ist, Knochenproben mit einer Größe von bis zu 14mm und einer Auflösung von 28µm darzustellen. Weiterführende Arbeiten von Hildebrand et al. und Müller et al. haben durch geeignete Segmentations- und Extraktionsalgorithmen eine lückenlose Analyse und Quantifizierung von verschiedenen Knochenparametern (BV, TV, ThTh, ThN, ThSp, SMI) durchgeführt (Hildebrand und Rüegsegger, 1997; Müller et al., 1998)

Ausgehend von diesen Erkenntnissen wurden aus verschiedenen Regionen des Skelettsystems Knochenproben analysiert, deren morphometrische Parameter bestimmt und miteinander

verglichen (Hildebrand et al., 1999). Es wurden außerdem zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, deren Ziel es war, die im Mikro-CT gewonnen Parameter in Bezug zur Biomechanik der Knochenstruktur zu stellen (Ding et al., 1998; Ding et al., 2002; Goulet et al., 1994; Ito et al., 2002).

Die hier verwendeten Knochenproben waren dabei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen bis zur Darstellung im Mikro-CT und den biomechanischen Tests ausgesetzt. Die Überprüfung der mechanischen Stabilität von Knochenproben mit Kompressionsversuchen ist ein etabliertes Verfahren und wird von der FDA empfohlen (Ding und Hvid, 2000).

In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben über den Effekt einmaliger oder mehrmaliger Gefriervorgänge:

An langen Röhrenknochen von Katzen und Hunden wurden Torsions- und Biegebelastungsversuche nach Kryoasservation und Formaldehydlagerung durchgeführt (Goh et al., 1989). Die Katzenfemora ließen keine Veränderungen ihrer Biomechanik erkennen, die Hunde Oberschenkel hingegen, die ebenfalls einer Reihe von Gefriervorgängen ausgesetzt waren, zeichneten sich durch eine verringerte Steifigkeit aus.

Untersuchungen an spongiösen Knochenzylindern (50 x 25mm), die bei minus 20°C oder minus 60°C für 6, 12 und 24 Monate gelagert wurden und anschließend einer Kompressionsprüfung unterzogen wurden, präsentierten hingegen identische Ergebnisse (Matter et al., 2001).

Spongiosascheiben von Rindern aus der Tibia mit einer Dicke von 20mm, die in Kochsalzlösung und trockenem Zustand mehreren Gefrier- und Auftauvorgängen unterzogen waren, zeigten keine signifikante Änderung der mechanischen Parameter (Kang et al., 1997).

1.4 Zielsetzung und Fragestellungen der Arbeit

Die Food and Drug Administration empfiehlt für die mechanische Prüfung osteoporotischer Knochen verschiedene Verfahren. Die Testung von trabekulären Knochenproben sollte mit Kompressionsverfahren erfolgen. Für die Überprüfung von kortikalen Knochenproben sollten Zug- Biegungs- und Torsionstests angewandt werden. Empfehlungen über die vorherige Lagerung und Behandlung existieren dagegen nicht (Food and Drug Administration, 1994).

Die Zusammenhänge zwischen verschiedenen Lagerungsumständen von Knochenproben, deren Auswirkung auf biomechanische Prüfungen und auf die mit Hilfe der Mikro-CT bestimmten Knochenparameter sind bisher nicht ausreichend untersucht. Insbesondere sind uns keine Studien bekannt, die diese Zusammenhänge an Biopsien aus trabekulären Knochen aufklären.

Es ergaben sich daraus für uns folgende Fragestellungen:

1. Ist die mechanische Belastbarkeit von direkt post mortem entnommenen bovinen Knochenstanzzyllindern, von formalinfixierten oder von tiefgekühlten Proben mit unterschiedlicher Lagerungszeit gleich oder hängt sie von den Lagerungsbedingungen ab?
2. Hat das Durchlaufen mehrerer Gefrier- und Auftauvorgänge Einfluss auf die Stabilität?
3. Wird die Knochenarchitektur durch zyklische Auftauvorgänge geschädigt und können diese Veränderungen durch die im Mikro-CT bestimmte dreidimensionale Morphometrie erfasst werden?
4. Besteht ein Zusammenhang zwischen den im Mikro-CT ermittelten Strukturparametern und der verrichteten Kompressionsarbeit bei zyklisch kryoasservierten bovinen Stanzzyllindern?

2. Material und Methoden

Der hier vorgelegten experimentellen Studie gingen Untersuchungen von Plönissen (1995) und Braune (1998) voraus, deren Ziel es war, die Stabilität von Wirbelkörpern mit der Stabilität von Knochenstanzen aus Wirbelkörpern und dem Beckenkamm zu vergleichen. Eine weitere Fragestellung betraf die Korrelation des im QCT gemessenen Mineralsalzgehalts mit projektionsradiographisch ermittelten Strukturparametern von Knochenstanzen.

In Fortsetzung dieser Untersuchungen wurden zunächst bei 7 Rindern je vier Knochenstanzylinder entnommen, die vor der Durchführung eines Kompressionsversuches unterschiedlichen Lagerungsbedingungen ausgesetzt waren. In einem zweiten Schritt wurden bei 8 Tieren je vier Knochenstanzen entnommen und nach mehreren Gefrier- und Auftauzyklen im Mikro-CT untersucht. Anschließend wurden auch diese Knochenproben einer Kompressionsprüfung zugeführt.

Aus den im Mikro-CT gewonnenen Datensätzen wurden standardisierte Strukturparameter der knöchernen Trabekelstruktur ermittelt. Die Kompressionstests lieferten Daten über die mechanische Stabilität der bovinen Knochenstanzylinder.

Abschließend wurden aus einem Rinderwirbelkörper 4 Knochenproben entnommen. Diese Proben wurden vor und nach Durchlaufen von einem bis vier Gefrier- und Auftauzyklen im Mikro-CT untersucht. Im Anschluss erfolgte die histologische Aufarbeitung der Proben in unentkalktem Zustand.

2.1 Versuchstiere

In die Studie wurden Proben von insgesamt 16 Schlachtrindern aus dem Schlachthof der Stadt Gießen einbezogen. Die Tötung erfolgte mit Hilfe eines Bolzenschussgerätes entsprechend der gültigen Tierschutzschlachtverordnung (TierschV.1997), die standardisierte Weiterverarbeitung gemäß der Fleischhygieneverordnung. Nach dem Entbluten, Enthäuten und Auswaiden des Tieres erfolgte die Zerteilung entlang der Längsachse mit einer Säge. Die Wirbelsäule der Tiere wird somit in ihrer gesamten sagittalen Ausdehnung gespalten. Eine sichere Zuordnung der Wirbelkörperhöhen durch Abzählen ist somit möglich. Nach der Zerteilung wurden die Tierhälften über ein automatisches Fördersystem in die Vorkühlanlage gebracht, dies geschah ca. 30-60min. nach dem Ableben des Tieres. Das durchschnittliche Alter der Tiere betrug ca. 1-3 Jahre. Nach Erreichen der Vorkühlung erfolgte die unmittelbare Entnahme der Knochenzylinder im Vorkühlraum. Die Rinderschlachtung wird am Schlachthof der Stadt Gießen immer an zwei festen Tagen pro Woche vorgenommen. Die

Entnahme der Knochenproben erfolgte im Verlauf eines Monats an drei unterschiedlichen Schlachttagen.

2.2 Proben

2.2.1 Probenentnahme

Direkt nach dem Erreichen des Vorkühllageraumes wurden die Wirbelkörperstanzen entnommen. Die Tierhälften waren an einem Transportsystem in cranio-caudaler Orientierung aufgehängt. Die gesamte geteilte Brust- und Lendenwirbelsäule war somit gut einer Intervention zugänglich (Abb. 1 und Abb. 2).

Der erste Lendenwirbelkörper wurde durch Abzählen von caudal nach cranial ermittelt. Parallel der Mittellinie des Wirbelkörpers wurden dann mit einer Jamshidi-Nadel die Knochenstanzzyylinder entnommen.

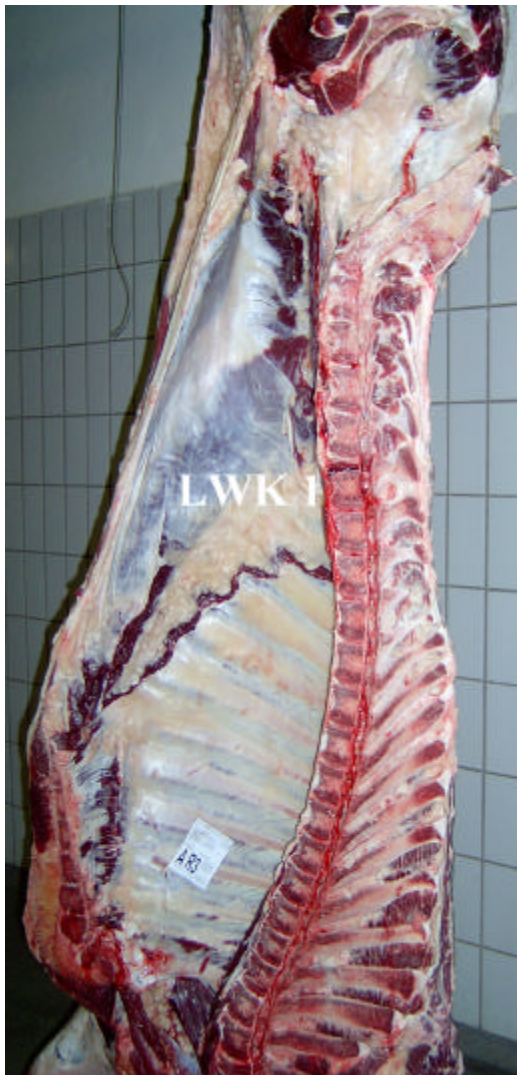


Abb. 1 Rinderhälfte im Vorkühlraum

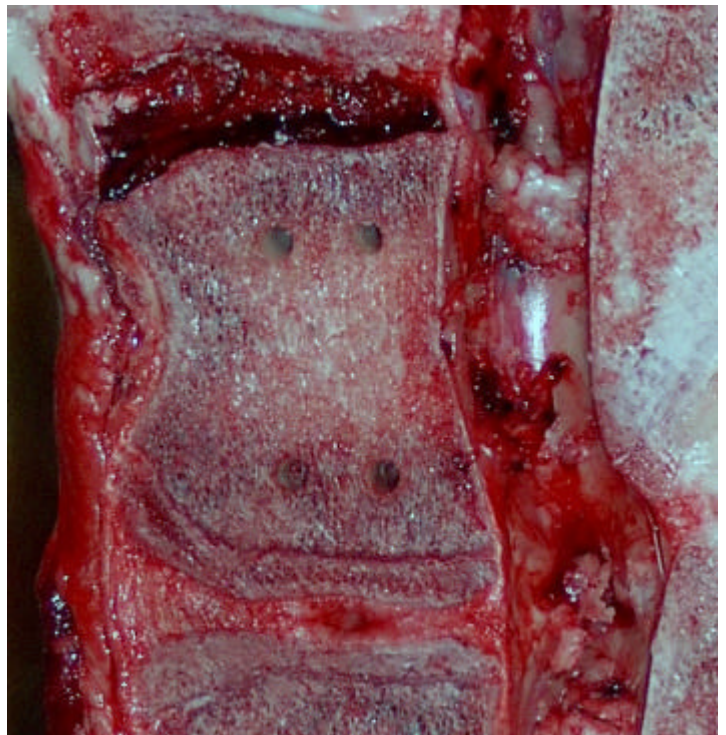


Abb. 2 Entnahmestellen der Knochenzylinder aus dem ersten Lendenwirbelkörper

Bei der Jamshidi-Nadel handelt es sich um eine Knochenschneidbiopsienadel, die aus einer Hohl-nadel (Durchmesser 2mm Innenlumen) mit innenliegendem Stilett besteht. Die Probenentnahme erfolgte mit ca. 3-5mm Abstand von der Grund- oder Deckplatte.

Die verwendete Biopsienadel wurde hierbei ohne das innenliegende Stilett eingesetzt, ein Durchstoßen der Kortikalis war bei der durch die Teilung der Wirbelkörper bereits gut zugänglichen Spongiosa nicht erforderlich.

Durchschnittlich konnten mit einer der hier verwendeten Einwegnadeln (Fa. Bauer; Florida, USA) ca. 3-5 Biopsien gestanzt werden. Nach diesem Gebrauch war die Hohl-nadel durch die sehr harte Spongiosa abgestumpft und wurde ersetzt, um die Rate von artifiziellen Mikrofrakturen der Trabekel zu minimieren. Die gewonnenen Spogiosazyylinder haben einen Durchmesser von 2mm und erreichen im Mittel eine Länge von bis zu 15mm (Abb. 3), kortikaler Knochen wurde nicht entnommen.



Abb. 3 Knochenstanzzylinder

2.2.2 Probenlagerung

Nach Entnahme der Knochenzylinder erfolgte die umgehende Lagerung entsprechend der drei Versuchseinheiten.

Im ersten Abschnitt wurden sieben Rindern je vier Knochenstanzen entnommen. Jede der vier Knochenstanzen wurde unter vier unterschiedlichen Umständen gelagert. Entsprechend der Lagerungsumstände erfolgt die Einteilung in vier Gruppen, für jede Gruppe ergibt sich damit eine Anzahl von sieben Proben.

Gruppe	1a	-unbehandelt (n=7)
	2a	-Formalin 3-5% gepuffert für 11 Tage (n=7)
	3a	-minus 40°C für vier Tage (n=7)
	4a	-minus 40°C für zehn Tage (n=7)

Im Anschluss an das entsprechende Lagerungsintervall erfolgte die sofortige Kompression der Knochenstanzen, die in Formalin eingelegten Proben wurden nach 11 Tagen komprimiert. Die unbehandelten Proben der Gruppe 1a am Tag der Probenentnahme.

Der zweite Abschnitt der Untersuchung bestand aus der Gewinnung von je vier Knochenstanzen aus acht Rindern. Auch hier wurden vier Gruppen gebildet mit je acht Stanzen. Die erste Gruppe wurde einmal bis auf minus vierzig Grad gekühlt und anschließend im Mikro-CT untersucht und komprimiert. Die Gruppen zwei, drei und vier wurden zweimal, dreimal und viermal einem Gefrier- und Auftauzyklus unterzogen, bevor sie im Mikro-CT untersucht und abschließend komprimiert wurden. Zum Auftauen waren die Proben ca. 30 Minuten Zimmertemperatur ausgesetzt, dies geschah periodisch im Abstand von vier Tagen.

Gruppe	1b	-Ein Gefrier-Auftauzyklus (n=8)
	2b	-Zwei Gefrier-Auftauzyklen (n=8)
	3b	-Drei Gefrier-Auftauzyklen (n=8)
	4b	-Vier Gefrier-Auftauzyklen (n=8)

Im letzten Abschnitt der Untersuchung wurden vier Proben (CA-CD) aus einem Rinderwirbelkörper in unbehandeltem Zustand im Mikro-CT untersucht. Nachdem die Proben ein- bzw. zwei-, drei- und viermal den Gefrier- und Auftauzyklus durchlaufen hatten wurden sie erneut im Mikro-CT untersucht. Abschließend wurden von diesen Proben histologische Schnittpräparate angefertigt.

2.3 Mikro-CT

Der offensichtlichste Unterschied zwischen einem klinischen Computertomographen und einem Mikro-CT-Scanner besteht in der unterschiedlichen Qualität der Ortsauflösung.

Mit einem medizinischen Gerät der neueren Generation lässt sich eine nicht isotrope Ortsauflösung von 0,5 bis 1,0 Millimeter erzielen, bei einem Mikro-CT liegt dieser Wert je nach Objektgröße zwischen 5 und 50µm.

Das uns zur Verfügung stehende Mikro-CT ist ein Gerät der Firma Skyscan (Belgien) mit der Typenbezeichnung „SkyScan-1072 High-resolution desk-top micro-CT system“. Es besteht aus dem Scanner, der in ein röntgendichtes Gehäuse eingebracht ist, sowie zwei PC-Einheiten zur Gerätesteuerung und Bildrekonstruktion (Abb. 4).

Im Scanner ist zwischen einer Mikrofokusröntgenröhre und einem CCD (Charge-Coupled-Device)-Detektor auf einer drehbaren Achse der Probenschlitten angebracht. Dieser führt eine Rotationsbewegung in frei definierbaren Winkelschritten durch und kann entlang der Längsachse zwischen Röntgenröhre und CCD-Detektor bewegt werden, d.h. der Objekt-Fokusabstand kann je nach gewünschter Vergrößerung verschoben werden, so daß Proben bis zu einem maximalen Durchmesser von ca. 1,5cm untersucht werden können.



Abb. 4 SkyScan-1072 High-resolution desk-top micro-CT system

Die luftgekühlte Röntgenröhre besitzt einen Fokus kleiner $8\mu\text{m}$ und kann bei einer Spannung von 20-80kV bei einem Röhrenstrom vom 0-100 μA betrieben werden. Die Fokusgröße bestimmt die maximal erreichbare Auflösung: Je kleiner der Fokus jedoch ist, desto geringer wird auch die Leistung der Röntgenröhre. Daraus ergeben sich für die Mikro-CT geringe Probengrößen bei langen Messzeiten. Der CCD-Detektor (Abb. 5) ist elektronisch gekühlt, hat eine Matrix von 1024x1024 Pixeln und lässt einen maximalen Bildausschnitt (field of view, FOV) von 25mm zu. Eine kontinuierliche Überwachung der Probe ist durch eine kleine optische Kamera gewährleistet. Die Spannungsquelle und die Steuerelektronik sind im Scanner untergebracht.

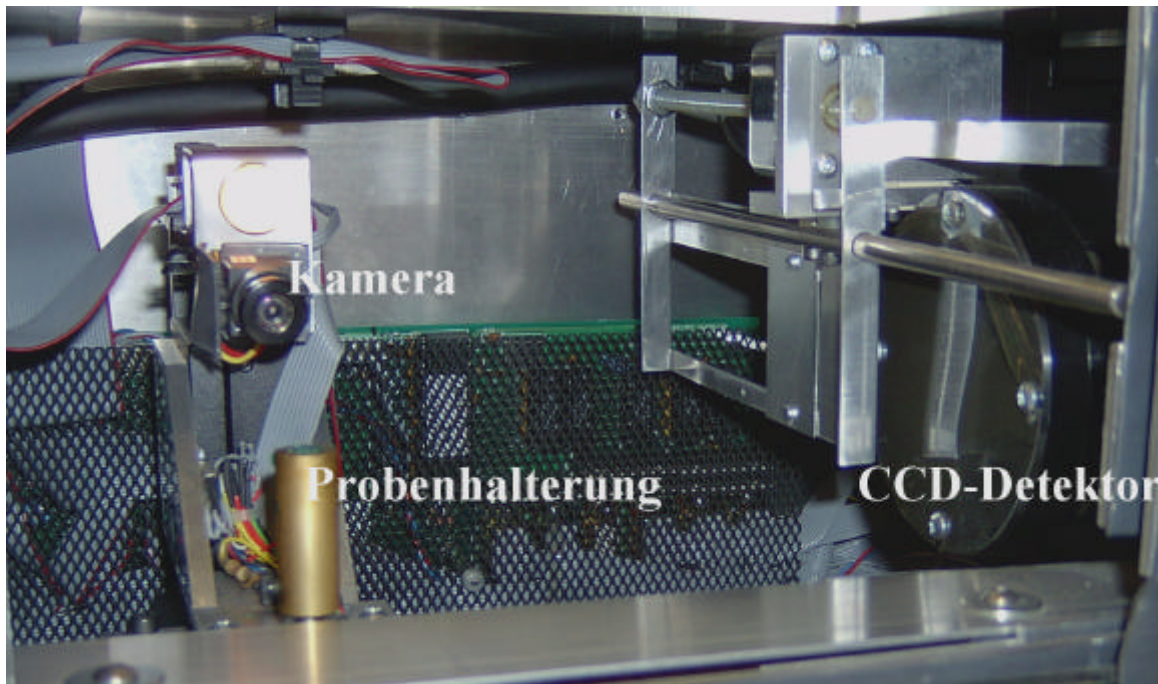


Abb. 5 Mikro-CT mit Probenhalterung und CCD-Detektor

Für die Bilderzeugung durch die Mikrofokusröhre werden Röntgenquanten erzeugt und kegel- oder fächerförmig fokussiert. Beim Durchtritt durch das Objekt werden sie geschwächt, und der CCD-Detektor misst die ankommende Röntgenstrahlung, die in ein digitales Signal umgewandelt wird. Es werden so in $0,45^\circ$ oder $0,90^\circ$ Winkelschritten Absorptionbilder des Objektes erzeugt. Diese können dann mit Hilfe einer Rückprojektionstechnik, dem Feldkamp-Algorithmus, in axiale Schnittbilder umgewandelt werden. Es entstehen so Bilder mit einer Größe von ca. einem Megabyte (MB) aus isotropen Voxeln bei einer Akquisitionsmatrix von 1024×1024 Pixeln. Bei einer gewählten Matrix von 512×512 Pixeln beträgt die Datenmenge pro Bild 257 Kilobyte (kB).

Die Auflösung im Mikro-CT ist von mehreren Faktoren abhängig: Die Fokusgröße der Röntgenröhre sollte so klein wie möglich sein, je kleiner diese jedoch ist, desto geringer wird ihre Leistung, und somit ergeben sich bei diesen Geräten wesentlich längere Messzeiten als bei den klinisch eingesetzten Computertomographen, die sich im Sekundenbereich befinden. Durch die Verschieblichkeit des Probenschlittens zwischen Strahler und CCD-Detektor lässt sich der Vergrößerungsfaktor in einem weiten Bereich anpassen. Einschränkungen bestehen jedoch durch die Fokusgröße von ca. $8\mu\text{m}$. Die theoretische Möglichkeit, ein sehr kleines Objekt dicht an die Strahlenquelle heranzuführen, um so einen möglichst großen

Vergrößerungsfaktor zu erzielen, ist durch die geometrische Unschärfe des Projektionsbildes auf dem CCD-Detektor begrenzt, denn die Strahlenquelle ist nicht punktförmig.

Eine weitere Einschränkung ist durch die maximale Probengröße gegeben: Das Projektionsbild des Objektes auf dem CCD-Detektor darf nicht breiter sein als der Detektor selbst, da sonst Artefakte bei der Bildberechnung entstehen.

Die maximale geometrische Auflösung des Projektionsbildes und der daraus errechneten Querschnittsbilder beträgt somit 1/1000 des Objektdurchmessers. Die tatsächliche Auflösung nimmt jedoch wegen der Brennfleckgröße (in unserem Fall $8\mu\text{m}$) in dem Maße ab, in dem der Vergrößerungsfaktor durch Annäherung des Probenschlittens an die Röntgenröhre gesteigert wird.

2.3.1 Bildakquisition

Nach Entnahme der Knochenproben aus der Küvette, in der sie in entsprechender Umgebung lagerten, wurden sie in Cellofanfolie eingehüllt und auf der Probenhalterung mittels Formmasse zentriert fixiert. Die Cellofanumhüllung verhinderte das Austrocknen der Probe. Die Formmasse stellte sich als unkomplizierte und variabelste Fixationsmöglichkeit heraus. Der Probenhalter wurde dann in den Scanner verbracht und seine optimale Positionierung durch Anfertigen eines Übersichtsbildes (Scout view) überprüft (Abb. 6).

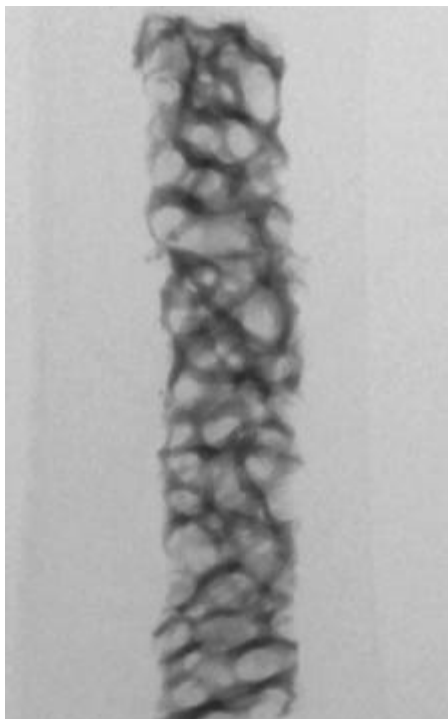


Abb. 6 Scout view zur Aquisitionplanung

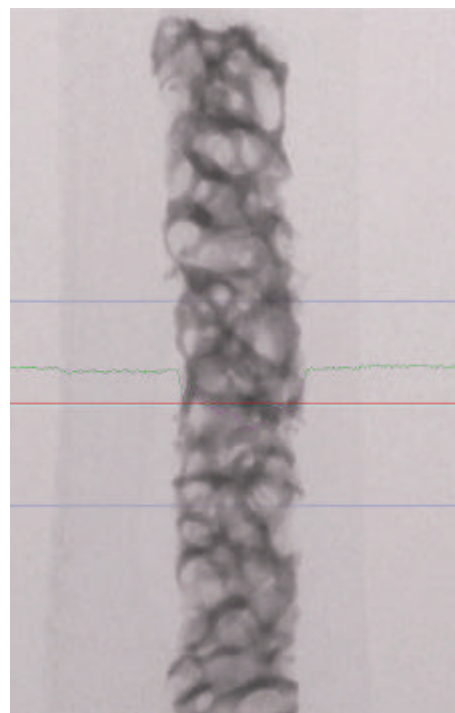


Abb. 7 Scout view mit Absorptionskurve

Zeigte sich hierbei eine falsche oder suboptimale Einstellung, d.h. war die Probe evtl. dezentriert, zu niedrig oder zu hoch abgebildet, konnte dies durch Manipulation des Knochenzylinders und Ansteuerung der Probenhalterung beeinflusst werden. Kontrollieren ließ sich dies durch zwei in 90°- Stellung zu einander aufgenommenen Topogrammen. Alle Proben wurden mit den gleichen Parametern untersucht. Die Röhrenspannung betrug 80kV, der Röhrenstrom 100µA, die Vergrößerung war mit dem Faktor 13 immer konstant. Eine Matrix von 512x512 Pixeln bei einem Rotationswinkelschritt von 0,68° und einer 180° Drehung diente der schnellen Bildakquisition. Die Expositionszeit wurde nach der Auswertung einer Absorptionskurve im Topogramm ermittelt, dies diente der Vermeidung von Über- und Unterbelichtungen (Abb. 7).

Bei einer durchschnittlichen Expositionszeit von ca. 1,8s und ca. 265 Einzelbildern ergab sich eine reine Gesamtexpositionszeit von ca. 8 Minuten. Die Gesamtscannzeit war jedoch ca. dreimal länger, da zwischen jedem Einzelbild eine Abspeicherung der aufgenommenen Rohdaten, in sogenannten WTS-Dateien erfolgen musste. Vor dem Entfernen des Knochenzylinders aus dem Gerät ließ sich die ausreichende Bildqualität mit der Anfertigung eines einzelnen Rekonstruktionsbildes überprüfen.

2.3.2 Bildberechnung

Durch den primären Scanvorgang existierten zunächst nur Rohdaten, die im WTS-Format mit einer Größe von 180kB (Matrix 512²) vorlagen. Aus diesen Daten wurden axiale Schnittbilder rekonstruiert.

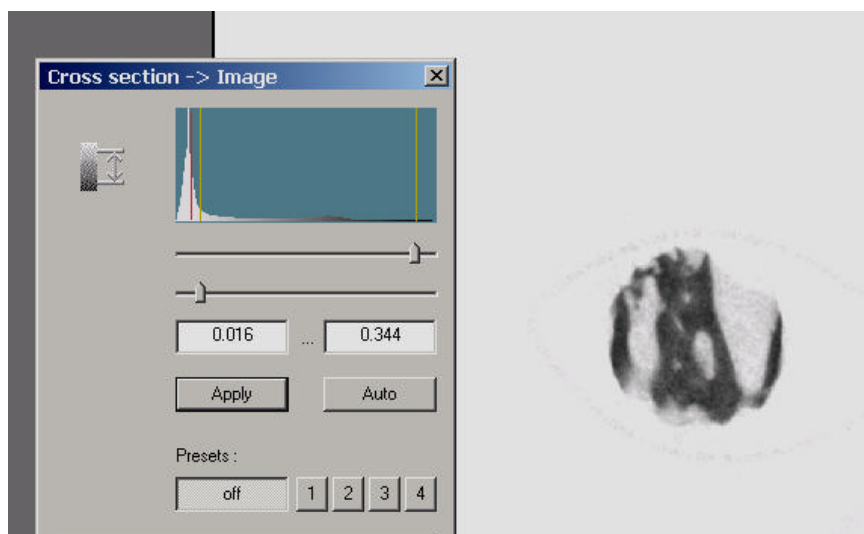


Abb. 8 Axiales Schnittbild einer Knochenstanze mit der grafischen Darstellung der Grauwertverteilung zur Planung der Bildrekonstruktion

Nach der Anfertigung einer einzelnen Rekonstruktion und der Optimierung der Grauwertdarstellung, d.h. der Festlegung des minimalen und maximalen Grauwertes (Abb.8), erfolgte die serielle Rekonstruktion der axialen Schnittbilder der gesamten Probe.

Für die Rekonstruktion der axialen Schnittbilder war nur eine Rotation der Probe um 180° notwendig. Die weitere Rotation von 180° bis 360° würde nur eine zusätzliche spiegelbildliche Information erbringen und das entgültige Schnittbildergebnis nicht beeinflussen. Außerdem würde dadurch die erforderliche Bildakquisitionszeit (Scanzeit) verdoppelt.

Es konnte wahlweise die Darstellung in positivem oder negativem Kontrast gewählt werden, wir verwendeten die positive Darstellung, die Strukturen hoher Dichte sind dadurch schwarz abgebildet. Die erzeugten axialen Schnittbilder im Bitmap-Format besitzen eine Größe von ca. 257kB, sie sind damit einer schnellen Darstellung und morphometrischen Auswertung zugänglich. Erzeugt wurden ca. 500 Schnittbilder bei einer Pixelgröße von 32,5µm.

2.4 Bildanalyse

Die Auswertung der im Mikro-CT untersuchten Knochenproben der Gefrier-Auftauversuche erfolgte mit dem Programm „3D-Calculator“ der Fa. Skyscan (Belgien). Dieses Programm ermöglicht die automatische Bestimmung mehrerer Knochenstrukturparameter an einer beliebigen Anzahl von Schnittbildern eines Knochenvolumens. Von jeder Knochenprobe sind 300 Schnittbilder in die Analyse einbezogen worden. Damit ergibt sich bei einer Voxelgröße von 32,5x32,5x32,5µm eine ausgewertete Zylinderlänge von 9,75 Millimetern. Die 300 Schnittbilder wurden aus dem Zentrum der Probe bestimmt, um sicher zu gehen, daß artifiziell veränderter Knochen am Anfang und Ende des Zylinders nicht berücksichtigt wird. Zu Beginn der Strukturparameter-Auswertung erfolgte die Grauwertfestlegung zur Definition des Hintergrundes, der Knochenstruktur und der Nicht-Knochenstruktur, d.h. der in den Trabekelräumen befindlichen Weichteilmasse. Hierzu wurde als erstes eine quantitative Analyse sämtlich in den Bildern vorkommender Grauwerte durchgeführt. Die Analyse bezog alle Schnittbilder mit ein und wurde grafisch dargestellt (Abb. 9). In dem angefertigten Histogramm der Grauwertverteilung konnten die Häufigkeitsgipfel für Knochen, Nichtknochengewebe und Hintergrund erkannt werden. Mit Hilfe der ermittelten Häufigkeitsgipfel wird ein in das Auswerteprogramm implementierter Algorithmus zur Grauwertfestlegung parametrisiert. An einem repräsentativen Schnittbild können die entsprechenden Schwellenwerte visuell überprüft werden.

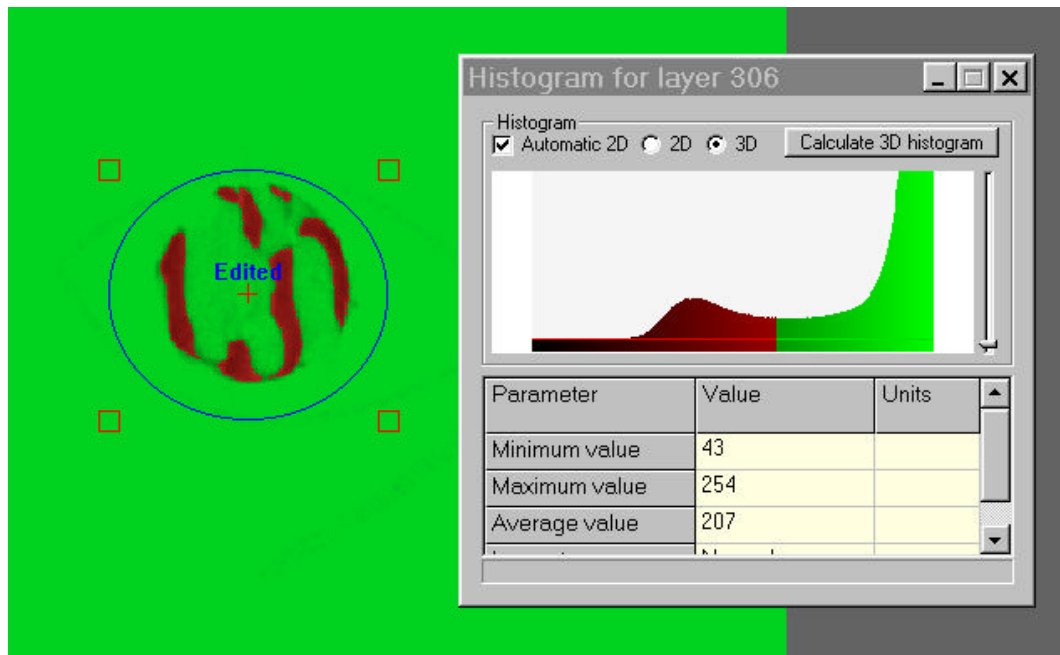


Abb. 9 Darstellung der Häufigkeitsverteilung sämtlicher Grauwerte aus dem dreidimensionalen Volumendatensatz einer Knochenprobe

2.4.1 Strukturparameter

Nach Festsetzung der Schwellenwerte wurden folgende Strukturparameter aus den axialen Schnittbildern der Proben ermittelt.

Gesamtvolumen TV (Tissue Volume)

Gesamtvolumen der Probe mit Knochen und Nichtknochengewebe, bestimmt im zweidimensionalen Bild und multipliziert mit der Pixelgröße in Z-Richtung.
Einheit mm³

(Parfitt et al., 1987)

Knochenvolumen BV (Bone Volume)

Volumen der Knochenstruktur, bestimmt im zweidimensionalen Bild und multipliziert mit der Pixelgröße in Z-Richtung.
Einheit mm³

(Parfitt et al., 1987)

Relatives Knochenvolumen BV/TV (Bone Density)

$$\text{Volumen Fraktion} = \frac{BV}{TV} \times 100 \quad \%$$

(Parfitt et al., 1987)

Knochenoberfläche BS (Bone Surface)

Knochenoberfläche. Bestimmt im zweidimensionalen Bild und multipliziert mit der Pixelgröße in Z-Richtung. Einheit mm².

(Parfitt et al., 1987)

Trabekuläre Dicke TbTh (Trabecular Thickness)

$$TbTh = \frac{2}{1,1999} * \frac{BV}{BS} \quad \text{Einheit mm}$$

(Parfitt et al., 1987)

Trabekelanzahl TbN (Trabecular Number)

$$TbN = \frac{BV/TV}{TbTh} \quad \text{Einheit 1/mm}$$

(Parfitt et al., 1987)

Trabekelabstand ThSp (Trabecular Spacing)

$$ThSp = \frac{1}{TbN} - TbTh \quad \text{Einheit mm}$$

(Parfitt et al., 1987)

Struktur Modell Index SMI (Structure model index)

Gibt an ob in einer Knochenstruktur mehr Platten oder Stäbe vorhanden sind

$$SMI = 6 \frac{BV \frac{dBS}{dr}}{BS^2} \quad \text{dimensionslos}$$

SMI (Platten) 0

(Stäbe) 3

dBS/dr = Differential der Knochenoberfläche (dBS) zu ihrem Radius d(r)

(Hildebrand und Rüeggsegger, 1997b)

Euler Zahl (N)

$$N = n - b$$

dimensionslos

n= Anzahl der Knotenpunkte; b= Anzahl der Streben

1-N = Anzahl der Trabekelverbindungen die entfernt werden müssen, bevor die Struktur in zwei Teile zerfällt.

(Odgaard und Gundersen, 1993)

2.4.2 Berechnung der multiplanaren und dreidimensionalen Bildrekonstruktionen

Die grafische Weiterverarbeitung der Mikro-CT-Datensätze wurde mit dem medizinischen Bildverarbeitungsprogramm Analyze AVW (Lenexa, USA) vorgenommen.

Unter direkter visueller Kontrolle wurde bei vier der auch histologisch untersuchten Knochenproben, äquivalent zur histologischen Schnittebene, eine identische multiplanare Bildrekonstruktion aus den axialen Mikro-CT-Bildern angefertigt.

Außerdem wurden aus diesen Mikro-CT-Datensätzen dreidimensionale Oberflächen-Rekonstruktionen zur Veranschaulichung der Spongiosastruktur berechnet.

2.5 Kompressionsversuche

Das hier verwendete Kompressionsgerät wurde bereits in zwei vorherigen Studien eingesetzt. Der Versuchsaufbau wurde im Vergleich zu den damaligen Studien mit einem optimierten digitalen Mehrkanalmessverstärker (Fa. HBM-Messtechnik; Darmstadt) versehen. Im Gegensatz zu dem früher verwendeten Messverstärker können nun die Kraft- und Wegmessung während der Kompressionsprüfung direkt grafisch dargestellt werden. Die grafische Darstellung war zum Erreichen einer kontinuierlichen Kompressionsgeschwindigkeit hilfreich.

2.5.1 Kompressionsgerät

In einem Metallrahmen sind zwei über Führungsbolzen verbundene Kompressionsblöcke gegenüberliegend angebracht. In den Blöcken ist zur Aufnahme der Knochenzylinder auf beiden Seiten eine Rinne, mit einer Tiefe von 0,5 mm bei einer Breite von ca. 1,5mm eingebracht. Der obere Block kann mit einer Mikrometerschraube, in manueller Feinabstimmung, entlang der Bolzen dem unteren Block vollständig angenähert werden. Diese zurückgelegte Wegstrecke wird mit einem Wegaufnehmer (W10 K 18533, Fa. HBM; Darmstadt) über eine Impedanzänderung registriert.

Zwischen der Mikrometerschraube und dem oberen Kompressionsblock ist eine Kraftmessdose (Typ C9a 2 kN, Fa. HBM; Darmstadt) installiert. Diese misst über eine Widerstandsänderung die auftretende Kraft zwischen Schraube und oberem Block.

Die gemessene Kraft ist abhängig von der Kraftübertragung der beiden Blöcke und somit auch von dem dazwischen liegenden Material. Über eine parallele Schnittstelle werden die analogen Messwerte an den Mehrkanalmessverstärker im Zweikanalmodus weitergeleitet.

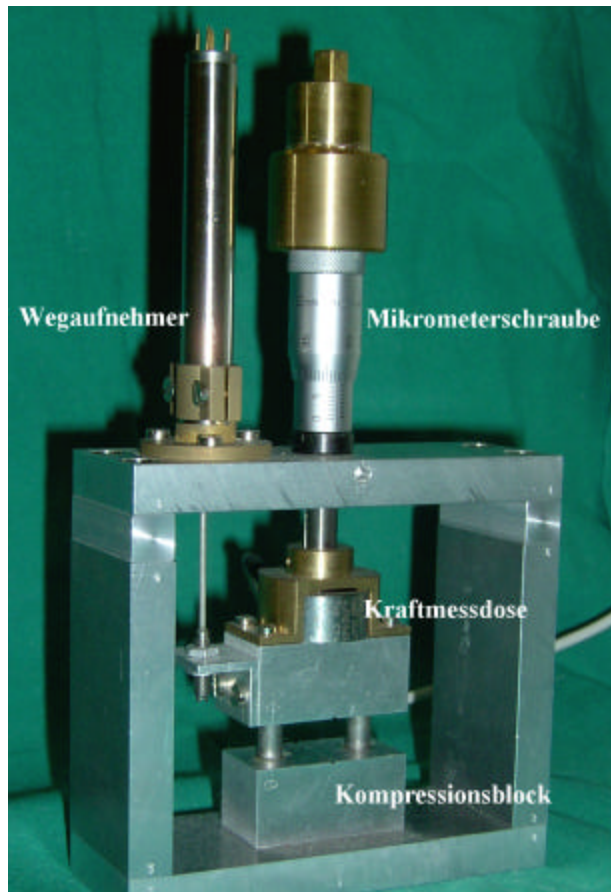


Abb. 10 Kompressionsgerät

2.5.2 Mehrkanalmessverstärker

Zur Erfassung der analogen Messsignale des Kompressionsgerätes wird ein Mehrkanalmessverstärker (Spider 8; Fa. HBM-Messtechnik; Darmstadt) eingesetzt, der über eine parallele Schnittstelle mit einem PC (Pentium I) verbunden ist.

Die Steuerung des Messverfahrens läuft über ein Programm (Catman; Fa. HBM-Messtechnik; Darmstadt), welches die Parametrisierung des Messverfahrens sowie verschiedene Arten der direkten grafischen Darstellung der Messwerte zulässt. Das Signal des Wegaufnehmers liegt

in einem Messbereich von 125mV/V, des Kraftaufnehmers bei 3mV/V, d.h. bei einem Volt Nennspannung der Messaufnehmer ist die Signalspannung 125mV oder 3mV. Die Messwertfrequenz beträgt 25Hz, damit werden pro Sekunde 25 Messwertpaare erzeugt.

2.5.3 Datenerfassung

Nach Lagerung der Knochenprobe im Kompressionsgerät erfolgte zunächst unter visueller Kontrolle eine fast vollständige Annäherung der Kompressionsblöcke bis kurz vor Erreichen des Kraftschlusses. Dieser Kraftschluss ist über die direkte Kontrolle der Kraftmesswerte zu erkennen. Der Messwertaufnehmer wird dann genullt und die Probe vollständig komprimiert. Die Kompressionsgeschwindigkeit lässt sich bei der manuellen Kompression mittels der Mikrometerschraube abschätzen und im Anschluss aus den registrierten Zeitintervallen und Wegstrecken berechnen. Bei einer durchschnittlich angestrebten Kompressionsstrecke von 1,8mm und einer Zeit von 15s ist die Kompressionsgeschwindigkeit 0,12mm/s. Bei einer Messwertfrequenz von 25 Hz stehen somit für jede Probe ca. 375 Messwerte zur Verfügung.

2.5.3 Kompressionsarbeit

Für jede Knochenprobe lagen "originale" Wertepaare des registrierten Weges x_{0i} und der gemessenen Kraft y_{0i} an $i = 1, \dots, n_0$ Messpunkten vor. Die Berechnung der Kompressionsarbeit W und die Bestimmung der Maximalkraft F_{max} . aus den Kraft-Weg-Daten der Kompressionsversuche erfolgten nach folgendem Algorithmus.

1. Als erster Schritt erfolgt ein Vorzeichenwechsel bei den originalen Wegwerten: x_{0i} wird zu $-x_{0i}$ (für alle $i = 1, \dots, n_0$). (Aus diesen "neuen" Kraft-Weg-Wertepaaren wird das Kraft-Weg-Diagramm erstellt.)
2. Die Kraft-Weg-Daten werden eingeschränkt auf diejenigen n_+ Messpunkte, die sowohl einen (nun nach Schritt 1!) positiven Weg- als auch einen positiven Kraftwert aufweisen. Wir bezeichnen ab jetzt diese Wegwerte mit x_i und die Kraftwerte mit y_i für $i = 1, \dots, n_+$.
3. Im Anschluss erfolgt die Bestimmung derjenigen Messpunkte aus Schritt 2, deren Wegwerte weniger als 1,854 mm von x_1 (dem ersten verwendbaren Wegwert) entfernt liegen: Für welche n Messpunkte gilt $x_i - x_1 \leq 1,854$. Diese Messpunkte $i = 1, \dots, n$ liefern die Kraft- und Wegwerte, aus denen (in Schritt 4) die Kompressionsarbeit W berechnet wird. (Diese Messpunkte definieren außerdem den schraffierten Bereich im Kraft-Weg-Diagramm.)

4. Die Kompressionsarbeit ist das Integral unter der Kraftkurve entlang der Wegstrecke. Da es sich in den Daten um diskrete Wegschritte handelt und die Kraft nur an jeder dieser Wegstellen aufgezeichnet wurde, wird der (an sich stetige) Kraftverlauf durch eine Treppenfunktion approximiert. Integrale für Treppenfunktionen ergeben sich durch Summation der "Säulenflächen" unter den (hier sehr kurzen) Konstanzbereichen des Funktionsverlaufs (also hier der Kraftfunktion). Wir berechnen die Kompressionsarbeit W daher wie folgt: $W = (x_2 - x_1) * y_1 + (x_3 - x_2) * y_2 + \dots + (x_n - x_{(n-1)}) * y_{(n-1)}$. Die Arbeit entspricht der Summe der Säulenflächen unter den Konstanzbereichen der Kraftfunktion. In den Kraft-Weg-Diagrammen wird die Arbeit als schraffierte Fläche dargestellt.

2.5.4 Kompressionskraft

Bestimmt wird die maximal erreichte Kraft im Scheitelpunkt des Kraft-Weg-Diagrammes, d.h. das Kraftmaximum vor Erreichen des exponentiellen Kraftanstieges der nur noch durch den direkten Kraftschluss der beiden Kompressionsblöcke herbeigeführt wird. Folgendes Verfahren wird hierzu angewandt:

1. Festsetzen der größten Weglänge (ab dem ersten Messpunkt), auf der F_{max} bestimmt werden soll: $L = 1,8 \text{ mm}$.
2. Für welche n_{max} Messpunkte gilt $x_i - x_1 \leq L$? (Diese Messpunkte $i = 1, \dots, n_{max}$ liefern die Kraftwerte, deren Maximum im nächsten Schritt bestimmt wird.
3. Bestimme $F_{max} := \max\{y_1, \dots, y_{(n_{max})}\}$
4. Optische Überprüfung, ob das gefundene F_{max} im Kraft-Weg-Diagramm "passt". Wenn ja, gehe zu 5. ; wenn nein, setze L auf den nächstkleineren Wert aus $\{0,7, 0,8, 1,2\}$ und gehe wieder zu 2..
5. Einzeichnen des gefundenen F_{max} -Wertes ins Kraft-Weg-Diagramm als waagrechte Linie mit Ordinate $y = F_{max}$.
6. Falls kein eindeutiger Scheitelpunkt vorhanden war, wurde unter visueller Kontrolle das erste Kraftplateau als Scheitelpunkt bestimmt.

Die Festlegung auf eine zu berücksichtigende Wegstrecke von 1,3mm ergab sich aus der Geometrie der Rinne in den Kompressionsblöcken. Die tatsächlich zurückgelegte Kompressionsstrecke war mit 1,8mm deutlich länger, die aufgenommenen Werte der letzten 0,5mm sind nur noch bedingt durch die direkte Kraftübertragung der Kompressionsblöcke.

Aus den bekannten Maßen der Aussparung (Abb. 11) und der Tatsache, dass sie einen Kreisabschnitt bildet, kann zunächst der Radius des Kreises, der diesen Abschnitt beschreibt bestimmt werden.

Der Radius r dieses Kreises steht gemäß dem Satz des Pythagoras in der folgenden

Beziehung:
$$r = (r-T)^2 + \left(\frac{B}{2}\right)^2$$

Auflösen der Gleichung nach r (nachdem erst $(r-T)^2$ gemäß der binomischen Formel multipliziert wurde) liefert

$$r = \frac{T}{2} + \frac{1}{2T} * \left(\frac{B}{2}\right)^2.$$

Das ergibt im vorliegenden Fall mit $T=0,5\text{mm}$ und $B=1,5\text{mm}$ schließlich

$$r=0,8125\text{mm}$$

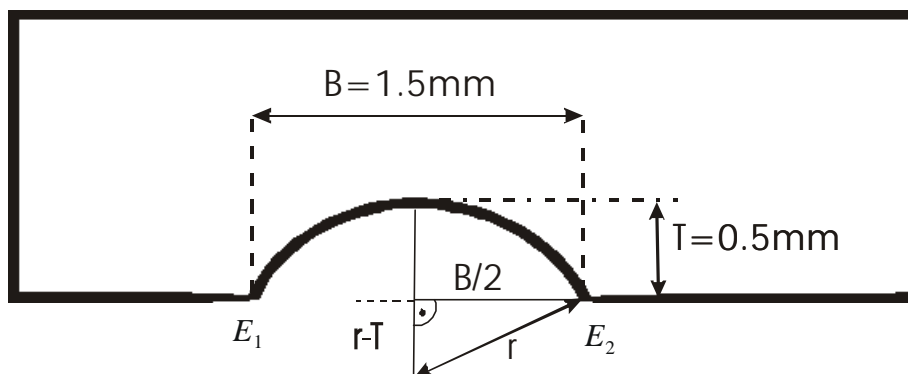


Abb. 11 Schemazeichnung Kompressionsblock

$$r = (r-T)^2 + \left(\frac{B}{2}\right)^2$$

Diese relativ große Abweichung vom geplanten Sollwert ($r=1\text{mm}$) ist offenbar auf eine zu große Toleranz bei der Herstellung des Kompressionsgerätes zurückzuführen. Wir wurden über die ungenaue Fertigung überrascht und müssen den Fehler im Nachhinein mathematisch berücksichtigen.

Es ist klar, dass jede zylinderförmige Probe, die einen Radius von mehr als r besitzt die Aussparung nicht ganz ausfüllen kann, sondern an den Ecken E_1 und E_2 aufsitzt (Abb. 11).

Um die Frage nach dem Anfangsabstand der Kompressionsblöcke zu beantworten, muss also

geklärt werden, wie weit eine zylinderförmige Probe vom Radius R , der größer als r ist, über die Aussparung hinausragt.

In der Abbildung (Abb. 12) bezeichnen die Punkte K_1 und K_2 die Stellen des Probenrandes, an denen er die Aussparung in den Ecken E_1 und E_2 berührt. Die Strecke a ist der Abstand des Mittelpunktes der Probe von der Verbindungslinie zwischen K_1 und K_2 und somit der Abstand des einen Kompressionsblock zum Zentrum des Spaltes zwischen den Kompressionsblöcken.

Wie die Abb. 12 veranschaulicht, liefert auch hier der Satz von Pythagoras die Beziehung zwischen den bekannten Größen(n), denn es gilt:

$$R^2 = a^2 + \left(\frac{B}{2}\right)^2,$$

woraus sich sofort

$$a = \sqrt{R^2 - \left(\frac{B}{2}\right)^2}$$

ergibt. Dies ist offensichtlich auch nur für $R > B/2$, d.h. für Probendurchmesser $2R$ größer als Aussparungsbreite B definiert. Die Gleichung resultierte für den vorliegenden Fall mit

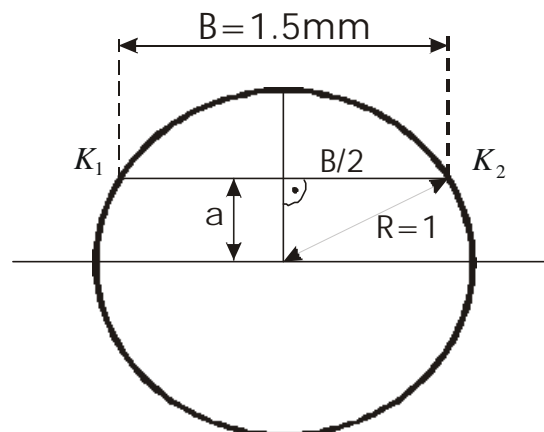
$$R=1\text{mm und } B=1,5\text{mm in}$$

$$a=0,66144\text{mm},$$

so dass der Abstand A der Kompressionsblöcke nach dem Einsetzen der Probe und der „Kontaktaufnahme“ schließlich

$$A=2a=1,32288\text{mm}$$

beträgt.



$$R^2 = a^2 + \left(\frac{B}{2}\right)^2$$

Abb. 12 Schemazeichnung Knochenstanze im Querschnitt

2.6 Histologie

2.6.1 Grundlagen

Zur histologischen Untersuchung von Knochenproben stehen zwei Verfahren zur Verfügung: Das entkalkte Knochengewebe wird entweder in Paraffin oder in unentkalktem Zustand in Methacrylat eingebettet. Die Einbettung in Paraffin ist die häufiger angewandte und technisch einfachere Methode. Der Nachteil ist jedoch, dass der mineralisierte Anteil der Knochenstruktur einer Beurteilung entzogen wird. Technisch schwieriger ist die Einbettung des nicht entkalkten Knochens in Methacrylat. Bei diesem Verfahren können nach der Anfertigung von Dünnschnittschnitten außer dem mineralisierten Anteil auch die Weichteilstrukturen und deren Lagebeziehung zum Knochengewebe beurteilt werden. Das Auftreten von Schrumpfungartefakten ist durch die fehlende Entkalkung und die Methacrylat-Fixierung wesentlich geringer.

2.6.2 Herstellung der histologischen Schnittpräparate

Die Fixierung der Proben nach den Mikro-CT Untersuchungen erfolgte in 3-5% gepuffertem Formalin für ca. 3-5Tage. Entwässert und entfettet wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe über 24 Stunden. Die Proben wurden dann in einer Plastikkapsel mit Methylmethacrylat (Technovit 9100; Fa. Heraeus-Kulzer, Werheim) und Benzoylperoxid (Fa. Heraeus-Kulzer, Werheim) bei 4°C für ca. 24 Stunden durchtränkt. Nach dieser Vorbereitung wurden die Proben über ca. 24 Stunden bei 40°C auspolymerisiert.

Die erzeugten Kunststoffblöcke wurden mit einem Hartschnittmikrotom (Fa. Jung, Heidelberg) geschnitten. Als Schichtdicke wurden 3µm eingestellt. Die Schnitte wurden auf einen Objektträger gebracht, mit einer Streckflüssigkeit aus 70% Äthanol geglättet und mit einer Polyethylenfolie abgedeckt. Mehrere Objektträger wurden übereinandergestapelt und in einer Schraubzwinde für mindestens 4 Stunden getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Schnitte mit der von-Kossa- und Goldner-Färbung gefärbt.

2.7 Statistik

Die hier aufgeführte statistische Ausarbeitung erfolgte mit Hilfe von Dr. Gerrit Eichner, Mathematisches Institut der Justus Liebig Universität Gießen.

Statistische Hypothesen dienen der Überprüfung wissenschaftlicher Vermutungen. Bei der Durchführung eines Gruppenvergleiches wird die Ablehnung dieser Hypothesen durch den Anwender überprüft.

Will man eine Hypothese mit einem geringen Fehler ablehnen, so sollte die Wahrscheinlichkeit, mit der man die Hypothese fälschlicherweise ablehnt, gering sein, d.h. das Signifikanzniveau sich in den üblichen Schranken von 1% ($p=0,01$) und 5% ($p=0,05$) befinden.

Vorraussetzung hierfür ist eine Normalverteilung der Daten. Die Normalverteilung konnte mit dem Test nach Mandia und Kent bestätigt werden.

Die Unterschiede oder die Veränderung der Variablen, zwischen den vier Gruppen jedes Untersuchungsabschnittes, konnte mit dem Hotelling T2-Test(MANOVA) überprüft werden. Hierzu erfolgte die Bildung der drei Differenzen aus den vier Gruppen für jeden Parameter. Der Hotelling T2-Test(MANOVA) berücksichtigt dabei nicht nur die individuellen Werte jedes Tieres, sondern auch die Gesamtheit des entsprechenden Kollektives.

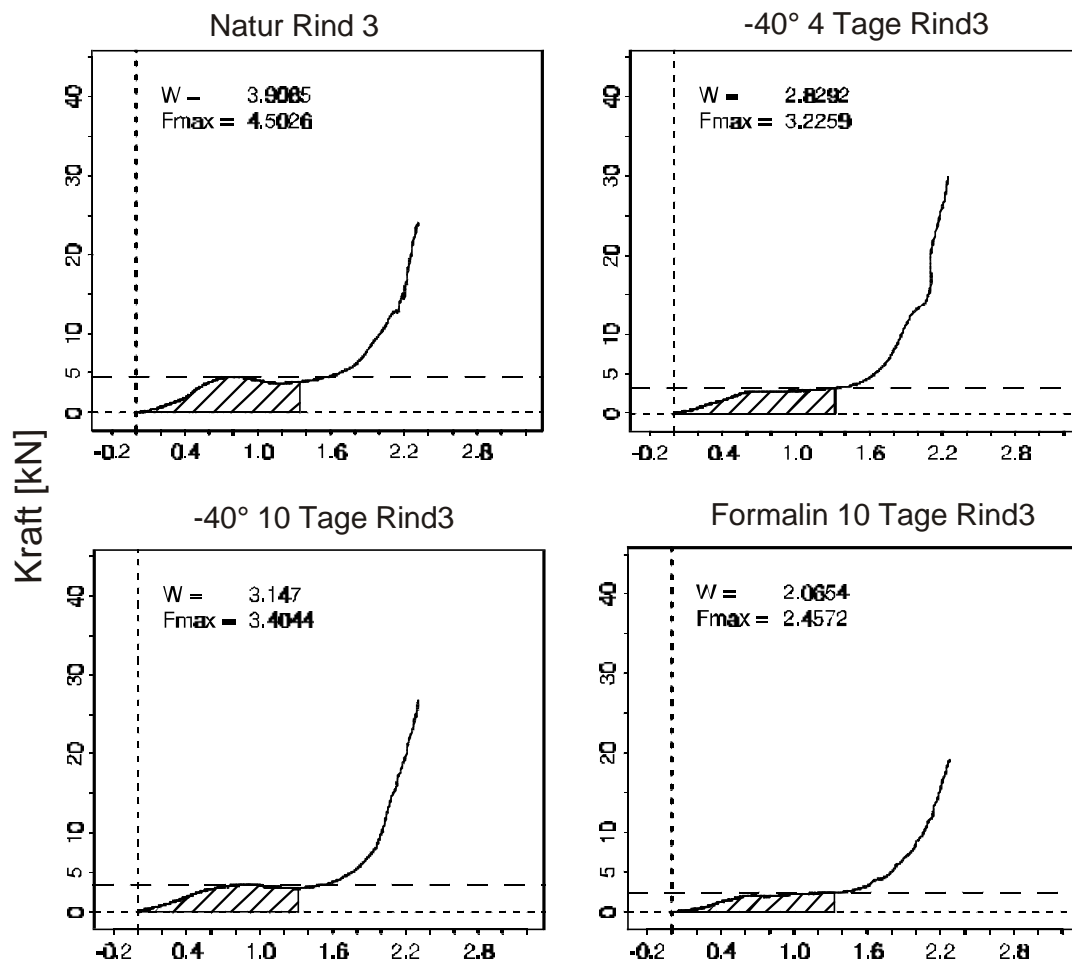
Der Zusammenhang zwischen zwei oder mehr Variablen wird mit der Korrelationsanalyse erfasst, die Maßzahl ist der Korrelationskoeffizient (r). In dieser Arbeit werden zwei Formen der Unkorreliertheit überprüft: Die Paersonsche Korrelation misst den linearen Zusammenhang zweier Parameter. Hingegen überprüft die Spearmansche Korrelation die monotone Beziehung.

Der Korrelationskoeffizient ist eine standardisierte und dimensionslose Größe, die Werte zwischen -1 und $+1$ annehmen kann. Werte um $+1$ signalisieren dabei einen perfekten linearen oder monotonen Zusammenhang. Die Bestimmung der Koeffizienten erfolgte für alle Strukturparameter mit der Kompressionsarbeit (W) und maximalen Kompressionskraft ($F_{max.}$).

3. Ergebnisse

3.1 Kraft-Weg Diagramme

Dargestellt sind in Diag.1 exemplarisch die Kraft-Weg-Kurven von Knochenproben eines Rindes bei verschiedenen Lagerungsbedingungen. Die berechnete Arbeit W (schraffierte Fläche) und die bestimmte maximale Kompressionskraft F_{max} . (gestrichelte Linie) sind eingezeichnet sowie ihre numerischen Werte in den Legenden dokumentiert.

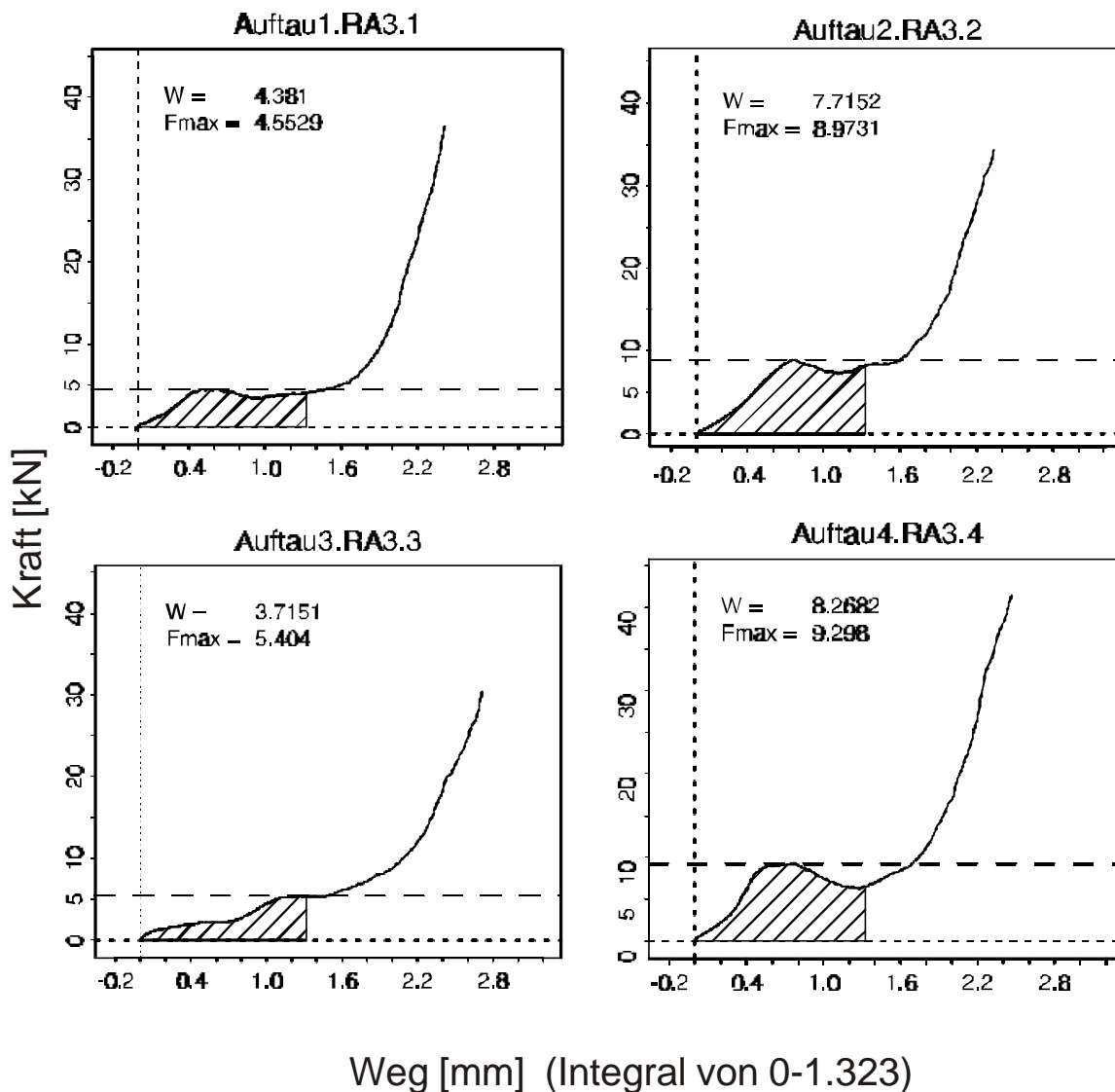


Diag. 1 Kompressionskurven bei unterschiedlichen Lagerungsbedingungen

Die Kompressionskurve der naturbelassenen Wirbelkörperstanze zeigt ein typisches Kompressionsprofil: Nach einem langsamen Ansteigen der Kompressionskraft und Erreichen eines frühen Maximalwertes, des ersten Peaks, erfolgt ein exponentieller Anstieg. In die Berechnung der Kompressionsarbeit gehen nur die Wertepaare ein, die vor dem zweiten Anstieg der Kurve liegen.

Dies konnte bei allen Kompressionskurven direkt grafisch überprüft werden.

Dargestellt sind in Diag. 2 die Kraft-Weg-Kurven der Kompressionsversuche von Knochenproben eines Rindes mit unterschiedlichen Auftauzyklen. Die berechnete Arbeit W (schraffierte Fläche), die bestimmte maximale Kompressionskraft F_{max} . (gestrichelte Linie) sind eingezeichnet und die numerischen Werte angegeben.

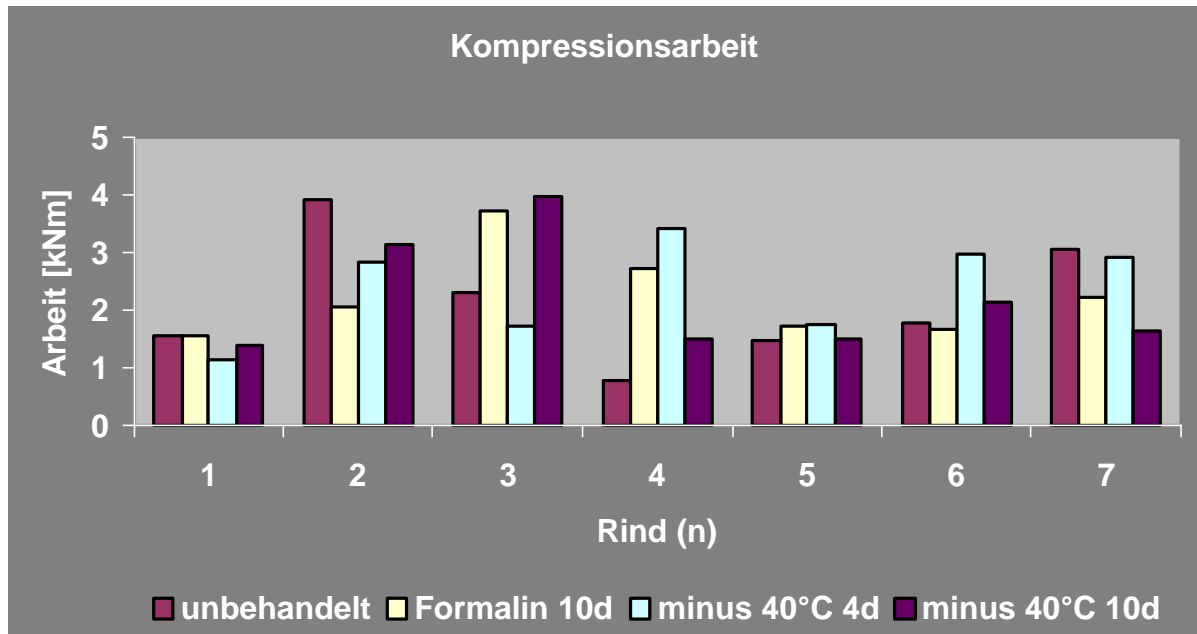


Diag. 2 Kompressionskurven bei verschiedenen Gefrier-Auftauzyklen

Außer der Probe RA3.3 lassen alle Proben den typischen Kraftverlauf erkennen. Der entsprechende Knochenzylinder zeigte in der Mikro-CT Untersuchung keine Besonderheiten seiner trabekulären Struktur.

3.2 Vergleich der Kompressionsarbeit und max. Kompressionskraft der Lagerungsversuche

Die erforderliche Kraft und die verrichtete Arbeit zur Kompression der Wirbelkörperstanzen, die unterschiedlichen Lagerungsumständen ausgesetzt waren, werden für jedes Individuum vergleichend im Balkendiagramm dargestellt.



Diag. 3 Kompressionsarbeit bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

Für jedes Rind erhielten wir vier Kompressionsarbeitswerte (für jeden Lagerungsumstand einen), so dass sich pro Rind ein vierdimensionaler Messvektor ergab. Zu prüfen war die Hypothese, dass die vier Lagerungsumstände hinsichtlich ihres Einflusses auf die mittlere Kompressionsarbeit gleich sind. Diese Hypothese ist äquivalent zu der Hypothese, dass die drei Differenzen zwischen „Formalin 10d“ und „unbehandelt“, zwischen „unbehandelt“ und „minus 40° 4 d“ sowie zwischen „minus 40° 4 Tage“ und „minus 40° 10 d“ im Mittel gleich Null sind. Aus diesem Grund wurde ein jeder der vierdimensionalen Messvektoren durch Bildung der drei o. g. paarweise Differenzen in einen dreidimensionalen Differenzen-Vektor transformiert, so dass sich die folgenden Werte ergaben:

Rind	F10Natr.	NatrN404T	N404TN4010T
1	-0,499	-1,672	1.012
2	0,074	-0,565	0,678
3	-1,053	1,546	-0,269
4	-1,26	1,892	-1,669
5	-1,71	1,673	-1,221
6	1,535	-1,75	-0,819
7	0,0129	-0,623	0,472

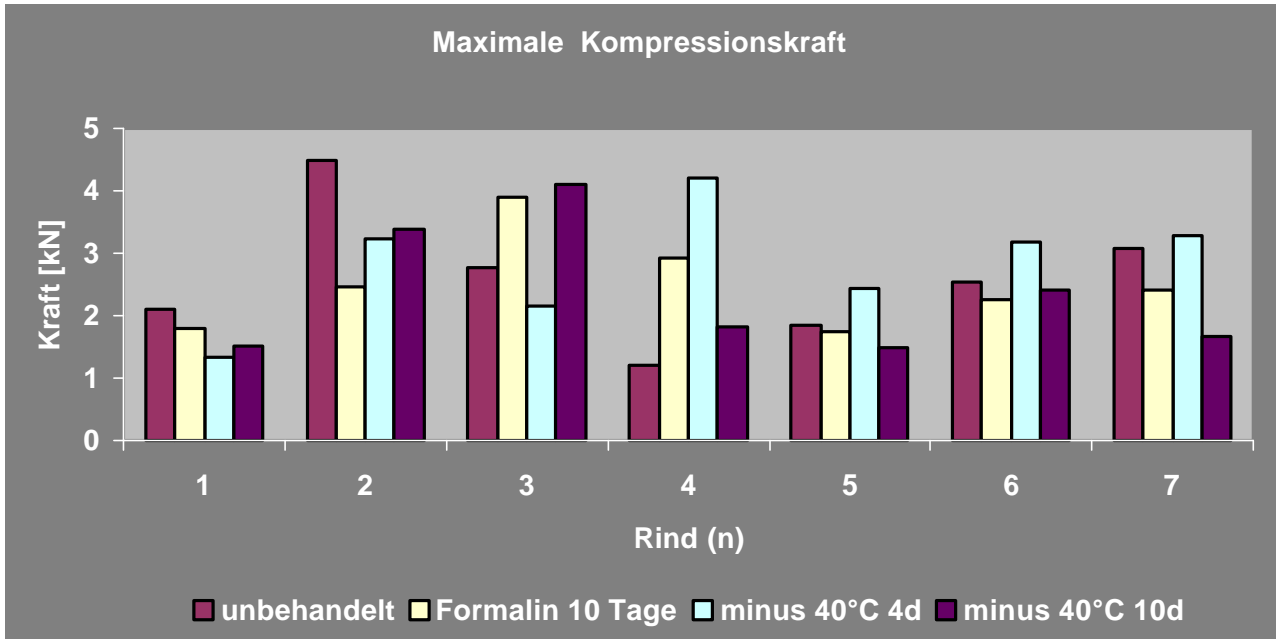
Tab. 2 Differenzen der Kompressionsarbeitswerte

Unter der Annahme, dass die dreidimensionalen Differenzvektoren aus einer multivariaten normalverteilten Grundgesamtheit stammen, kann die Hypothese, dass die Differenzen zwischen den Lagerungsumständen im Mittel gleich Null sind, mit Hilfe des T^2 -Tests von Hotelling (Mardia et al., 1997; Timm, 2002) getestet werden. Um die Zulässigkeit der multivariaten Normalverteilungsannahme zu überprüfen, wurden die empirische multivariate Schiefe (*Engl.: „skewness“*) und die empirische multivariate Krümmung (*Engl.: „kurtosis“*) der Daten bestimmt, wobei sich für keine der beiden Maßzahlen ein Wert ergab, der signifikant gegen die Normalverteilungsannahme spricht (Schiefe: 4,30, asymptotischer p-Wert: 0,933) (Mardia et al., 1997), approximativer p-Wert (auf Basis empirischer kritischer Werte für die Schiefe bei kleinen Stichproben ($n = 25$) der Dimension 3): $\gg 0,1$ (Timm, 2002): kritischer Wert (α): 12,21 (0,1), 14,26 (0,05), 18,42 (0,01)); Krümmung: -1,60, asymptotischer p-Wert: 0,11 (Mardia et al., 1997), approximativer p-Wert (auf Basis empirischer kritischer Werte für die Krümmung bei kleinen Stichproben ($n = 25$) der Dimension 3): $> 0,02$ (Timm, 2002): [unterer kritischer Wert, oberer kritischer Wert] (α): [-1,38, 0,63] (0,2), [-1,49, 0,91] (0,1), [-1,67, 1,61] (0,02). Damit erscheint die Anwendung von Hotellings T^2 -Test zulässig und als Resultat dieses Tests ergab sich ein p-Wert von 0,385 (bei $T^2 = 1,32$), woraus der Schluss zu ziehen ist, dass die gemessenen Daten nicht signifikant gegen die Gleichheit der vier Lagerungsumstände sprechen.

Die mechanische Stabilität unterliegt in dieser Versuchsreihe nicht der Vorbehandlung der Knochenzylinder.

Für die Analyse der maximalen Kompressionskraft wurde analog vorgegangen: Aus jedem vierdimensionalen Messvektor pro Rind wurde ein dreidimensionaler Differenzvektor berechnet. Die erhaltenen Vektoren wurden auf Verträglichkeit mit der multivariaten Normalverteilungsannahme auf Basis von empirischer Schiefe und Krümmung untersucht und schließlich wieder Hotellings T^2 -Test durchgeführt, da sich keine signifikanten Abweichungen von der Normalverteilungsannahme ergaben (Schiefe: 3,80, asymptotischer p-Wert: 0,956 (Mardia et al., 1997), approximativer p-Wert (wie zuvor): $\gg 0,1$ (Timm, 2002): kritische Werte wie zuvor); Krümmung: -1,58, asymptotischer p-Wert: 0,114 (Mardia et al., 1997), approximativer p-Wert (wie zuvor): $> 0,02$ (Timm, 2002): untere und obere kritische Werte wie zuvor).

Als p-Wert für Hotellings T^2 -Test ergab sich 0,246 (bei $T^2 = 2,074$), so dass auch hier die Hypothese der fehlenden Beeinflussung durch die Lagerungsumstände nicht verworfen werden kann.



Diag. 4 max. Kompressionskraft bei verschiedenen Lagerungsbedingungen

Die Kompressionskraft verhält sich in dieser Versuchsreihe äquivalent zur Kompressionsarbeit.

Zusammenfassend wird eine tabellarische Übersicht über die Ergebnisse von Hotellings T^2 -Test und der Analysen auf Normalverteiltheit dargestellt. Gezeigt ist jeweils der (bei Hotelling exakte und sonst approximative) p-Wert des Tests und in Klammern der Wert der Teststatistik:

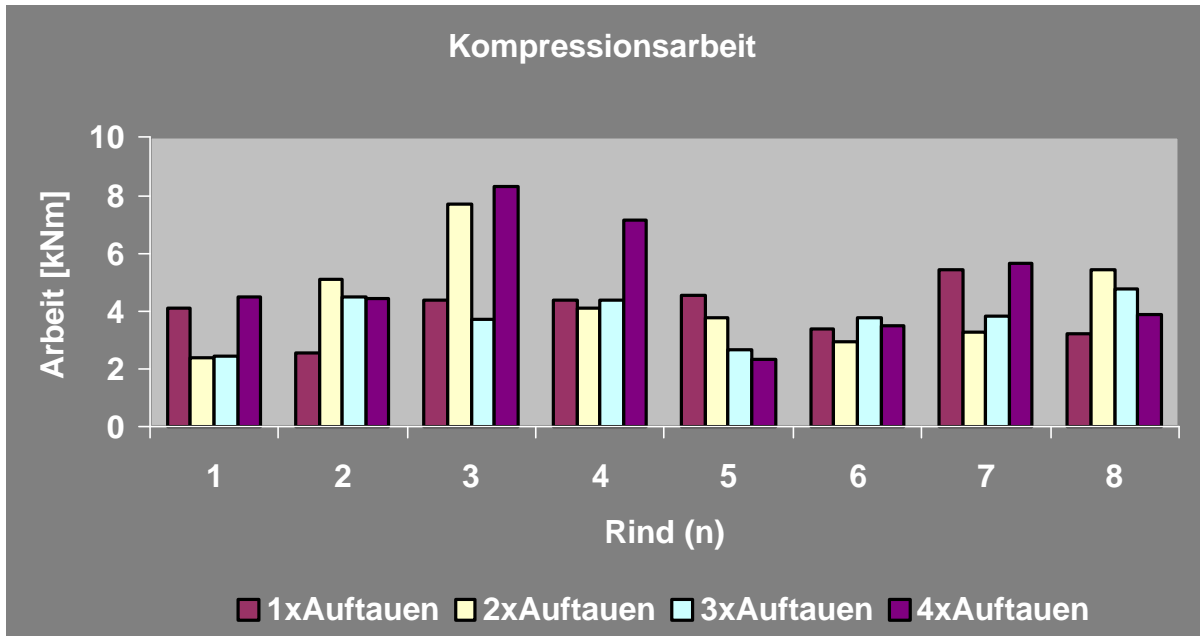
	p (T^2)	p ^(*) (Schiefe)	p ^(*) (Krümmung)
Arbeit (W)	0,385 (1,32)	>> 0,1 (4,30)	> 0,02 (-1,60)
max. Kraft (Fmax.)	0,246 (2,074)	>> 0,1 (3,80)	> 0,02 (-1,58)

(*) Bemerkung: Die angegebenen p-Werte basieren auf empirischen Untersuchungen für den Stichprobenumfang 25; die tatsächlichen p-Werte sind für den vorliegenden Fall (n = 7) größer.

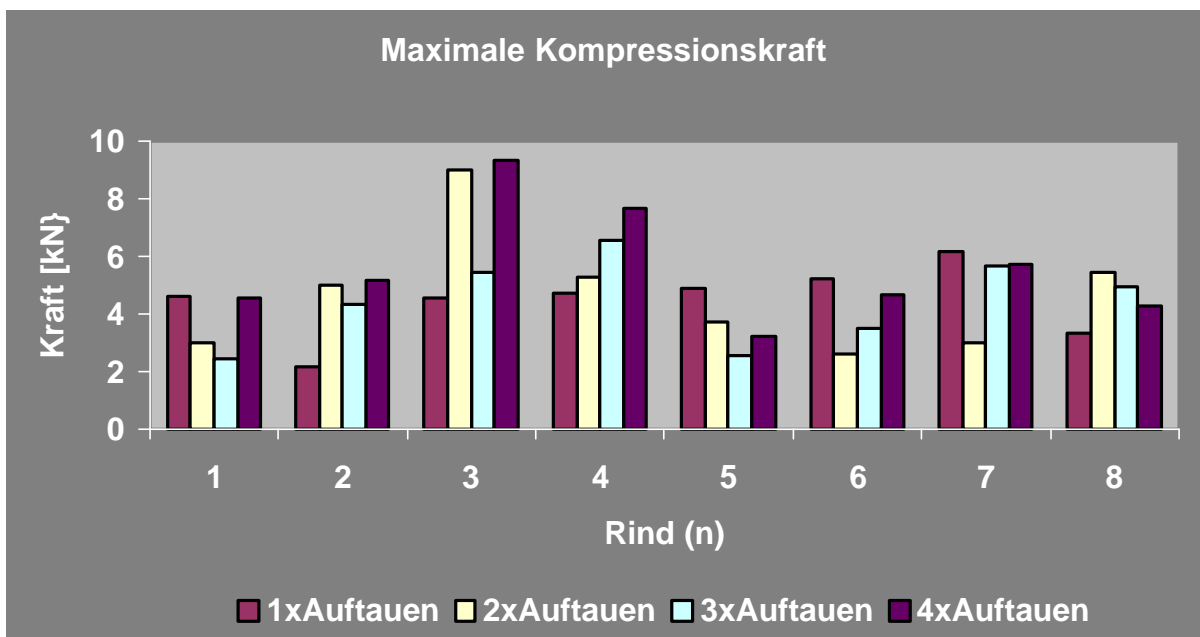
Tab. 3 Ergebnisse Hotelling T^2 -Test Lagerungsversuche

3.3 Vergleich der Kompressionsarbeit und max. Kompressionskraft der Auftauversuche

Die Analyse der Kompressionsarbeit und Kompressionskraft der Auftau-Versuche erfolgt identisch zu 3.2.



Diag. 5 Kompressionsarbeit bei verschiedenen Auftauzyklen



Diag. 6 Max. Kompressionskraft bei verschiedenen Auftauzyklen

Zusammenfassend eine tabellarische Übersicht über die Ergebnisse von Hotellings T^2 -Test und der Analysen auf Normalverteiltheit. Gezeigt ist jeweils der (bei Hotelling exakte und sonst approximative) p-Wert des Tests und in Klammern der Wert der Teststatistik:

	p (T^2)	p ^(*) (Schiefe)	p ^(*) (Krümmung)
Arbeit (W)	0,538 (0,72)	>> 0,1 (4,56)	~ 0,1 (-1,50)
max. Kraft (Fmax.)	0,324 (1,49)	>> 0,1 (3,73)	> 0,02 (-1,60)

(*) Bemerkung: Die angegebenen p-Werte basieren auf empirischen Untersuchungen für den Stichprobenumfang 25; die tatsächlichen p-Werte sind für den vorliegenden Fall (n = 7) größer

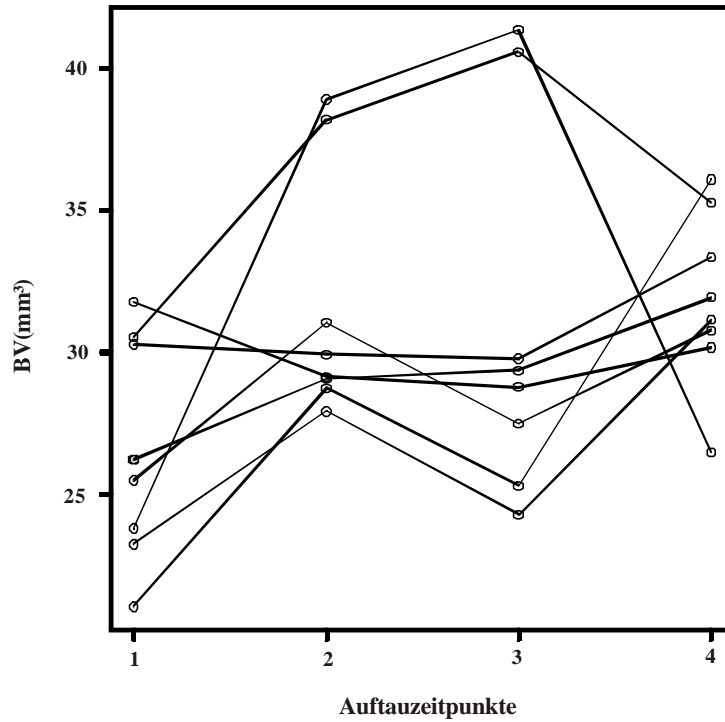
Tab. 4 Ergebnisse Hotelling T2-Test Auftauversuche

Entsprechend den Ergebnissen in 3.2 ist die Hypothese der fehlenden Beeinflussung, durch Überprüfung des Differenzvektors von Kompressionskraft und Kompressionsarbeit auch bei den Auftauversuchen nicht zu verwerfen. Das mehrmalige Auftauen scheint also ebenfalls keinen bedeutsamen Einfluss auf die mechanische Belastbarkeit, getestet durch axiale Kompressionskraft und Kompressionsarbeit, zu haben.

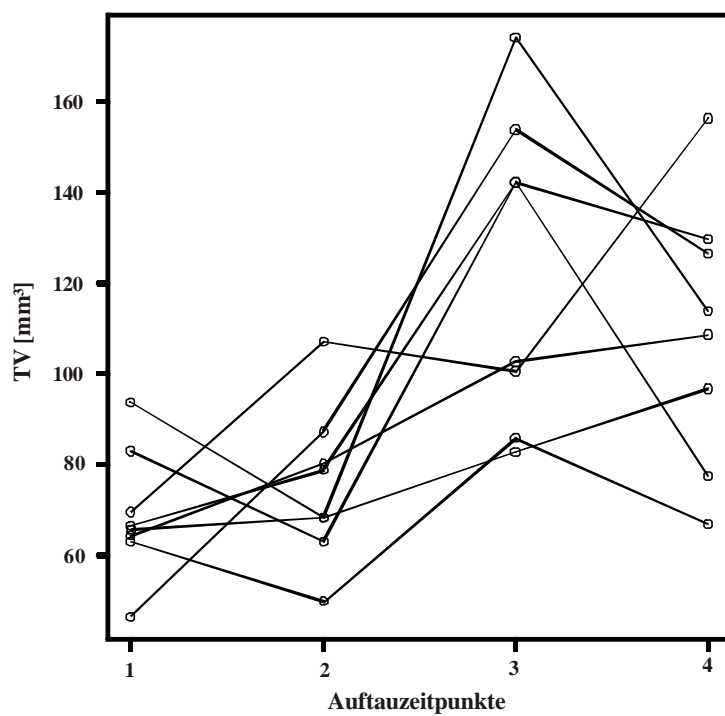
3.4 Vergleich der Knochenstrukturparameter im Verlauf der Auftauversuche

Dargestellt wird die Entwicklung von fünf Strukturparametern im Verlauf der Auftauzyklen.

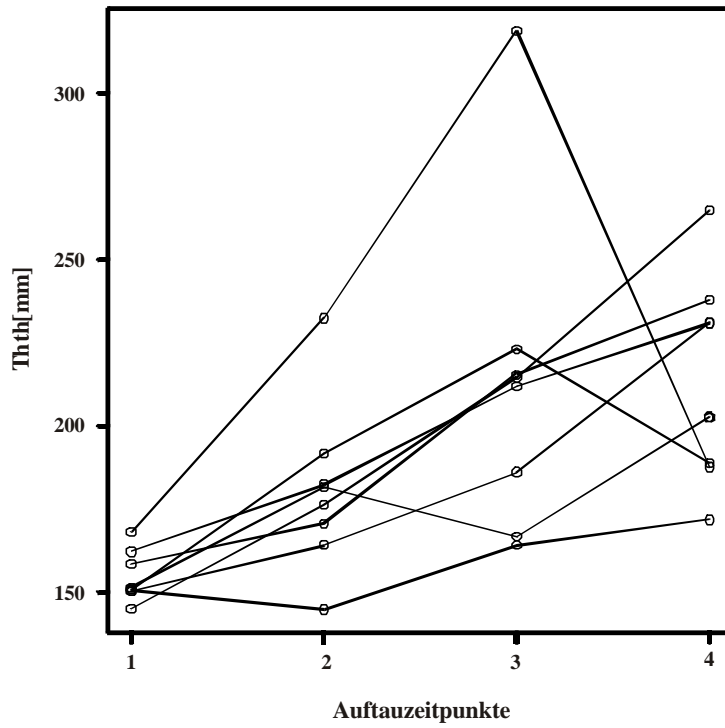
Diag. 7 Verlauf Knochenvolumen (BV)



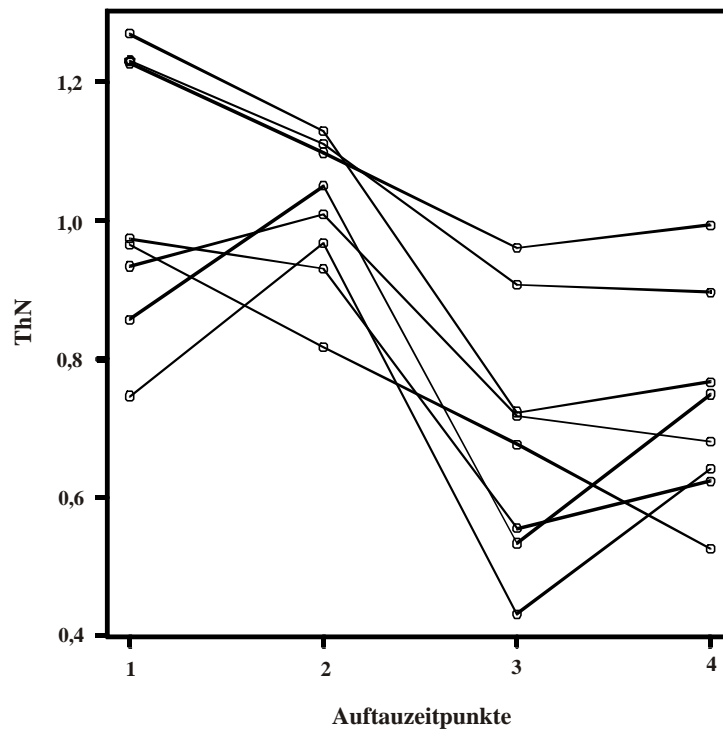
Diag. 8 Verlauf Probenvolumen (TV)



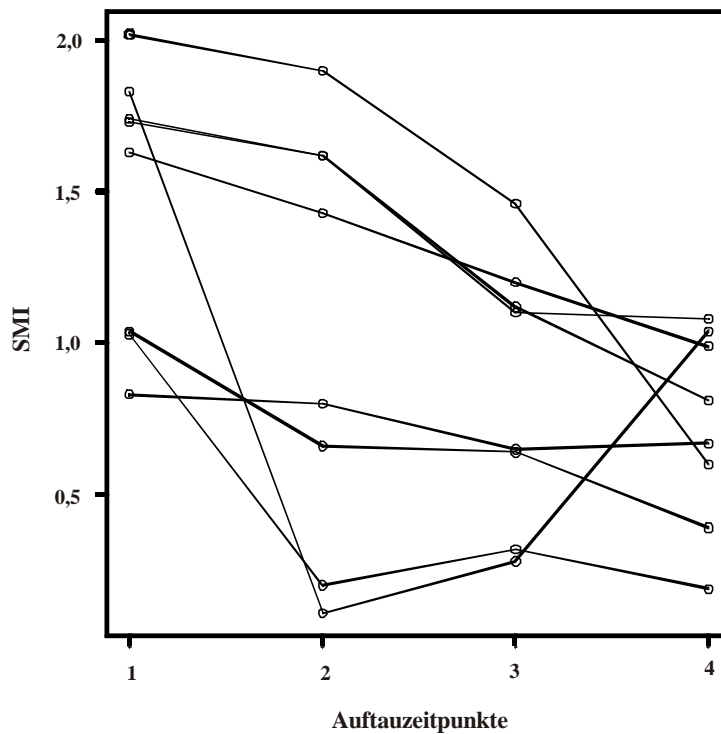
Diag. 9 Verlauf Trabekeldicke (TbTh)



Diag. 10 Verlauf Trabekelanzahl (TbN)



Diag. 11 Verlauf Struktur-Modell-Index (SMI)



3.4.1 Hotelling T2-Test der Strukturparameter

Analog zur Vorgehensweise der Untersuchung, ob sich die mittlere Kompressionsarbeit (bzw. -kraft) mit der Zeit ändert, wurden auch für alle Strukturparameter die vierdimensionalen Messvektoren in dreidimensionale Differenzenvektoren transformiert und letztere mit Hotellings T²-Test auf Null-Gleichheit getestet (nachdem jeweils die multivariate Normalverteilungsannahme geprüft und für keinen der Strukturparameter verworfen worden war).

	BV	TV	TbTh	TbN	SMI
p (T ²)	0,16 (2,65)	0,0095 (12,33)	0,0151 (9,934)	0,0017 (26,52)	0,014 (10,3)
p ^(*) (Schiefe)	>> 0,1 (3,63)	>> 0,1 (4,23)	>> 0,1 (5,76)	>> 0,1 (4,91)	>> 0,1 (4,57)
p ^(*) (Krümmung)	> 0,02 (-1,65)	> 0,02 (-1,54)	> 0,2 (-1,18)	> 0,02 (-1,61)	> 0,1 (-1,46)

^(*) Bemerkung: Die angegebenen p-Werte basieren auf empirischen Untersuchungen für den Stichprobenumfang 25; die tatsächlichen p-Werte sind für den vorliegenden Fall (n = 7) größer.

Tab. 5 Ergebnisse Hotelling T2- Test Strukturparameter

Für die Differenzwerte der Knochenparameter Probenvolumen (TV), Trabekuläre Dicke (ThTh), Trabekelanzahl (ThN) und den Struktur Modell Index (SMI) kann jeweils festgestellt werden, dass diese Werte sich signifikant während der Auftauvorgänge ändern. Die

Hypothese hingegen, daß das Knochenvolumen (BV) konstant bleibt, kann beibehalten werden, p-Wert 0,16.

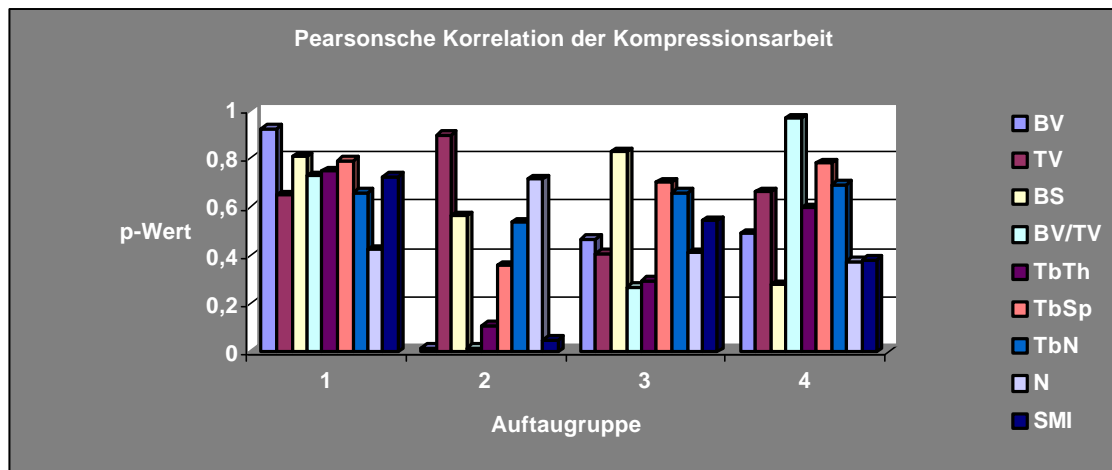
3.5 Korrelation der Strukturparameter mit der Kompressionsarbeit und der maximalen Kompressionskraft

In Beziehung gesetzt werden die aus den Mikro-CT-Daten bestimmten Knochenparameter mit der verrichteten Arbeit und der maximal aufgewendeten Kraft der durchgeführten Kompressionsversuche. Überprüft wird mit dem Pearsonschen und Spearmanschen Korrelationskoeffizienten auf einen linearen bzw. monotonen Zusammenhang. Die Korrelation eines jeden Strukturparameters zur Arbeit bzw. Kraft darf nur getrennt für jede der Auftaugruppen berechnet werden, da die Gruppen miteinander durch die Versuchstiere in Verbindung stehen und somit keine unabhängigen Beobachtungen liefern. Eine Analyse von gruppenübergreifenden und gepoolten Daten, d.h. ohne Berücksichtigung der Gruppenzugehörigkeit, ist statistisch nicht erlaubt. Damit erhalten wir pro Strukturparameter vier Pearsonsche Korrelationswerte (für jede Auftaugruppe einen) und vier Spearmansche Korrelationswerte, wobei diese beiden Korrelationstypen im Folgenden getrennt betrachtet werden.

Für einen jeden Strukturparameter läuft die zusammenfassende Darstellung seiner gruppenspezifischen Korrelationen mit der Arbeit (bzw. Kraft) auf den Test einer so genannten (undifferenzierten) Globalhypothese der Art „Für jede der vier Gruppen sind Arbeit und Strukturparameter X unkorreliert.“ auf Basis von vier (statistisch abhängigen) simultanen Einzeltests hinaus. Damit dieser Test der Globalhypothese das Signifikanzniveau α einhält, muss für die Einzeltests eine α -Fehler-Adjustierung vorgenommen werden, die wir hier durch eine Bonferroni-Korrektur umgesetzt haben. Dazu wird das angestrebte „Globalniveau“ α durch die Anzahl k der Einzeltests (hier ist $k = 4$) dividiert und der resultierende Wert $\alpha^* = \alpha/k$ als Signifikanzniveau für jeden der Einzeltests verwendet. (Bemerkung: Dies ist ein sehr konservatives Verfahren, so dass das effektive Globalniveau deutlich kleiner als α sein kann.)

Ausgehend von einem globalen Signifikanzniveau von 5%, kann bei der Betrachtung von vier p-Werten nach der Methode von Bonferroni die Globalhypothese der Unkorreliertheit also verworfen werden, falls einer dieser vier p-Werte die Schwelle 0,0125, d. h. 1,25 % unterschreitet.

3.5.1 Kompressionsarbeit

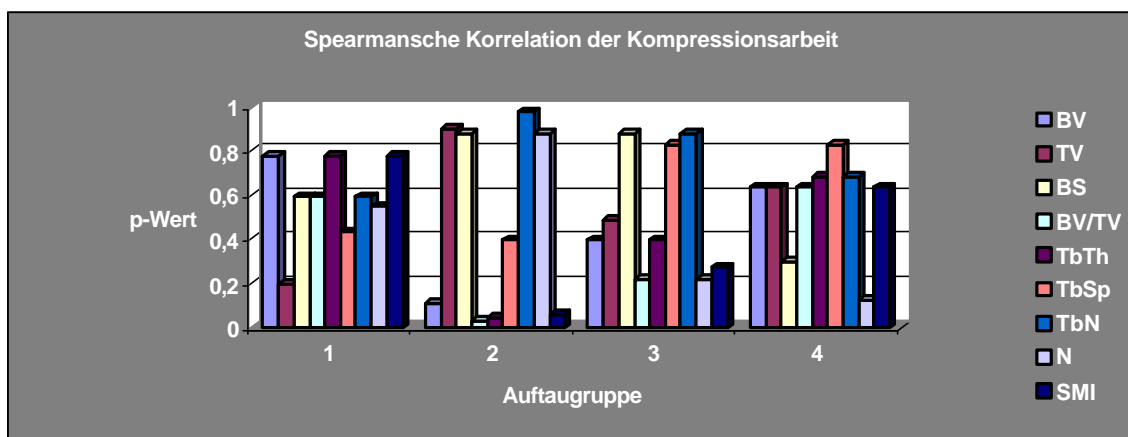


Diag. 13 Pearsonschen Korrelation für die Kompressionsarbeit

Probe	BV	TV	BS	BV/TV	TbTh	TbSp	TbN	N	SMI
1	0,9234	0,649	0,8093	0,7281	0,7485	0,7912	0,6588	0,4227	0,724
2	0,0183	0,8953	0,5632	0,0192	0,1111	0,3601	0,5378	0,7151	0,0503
3	0,4671	0,407	0,8269	0,2704	0,2976	0,7032	0,6586	0,4096	0,5424
4	0,4888	0,6641	0,278	0,9646	0,5985	0,7819	0,6933	0,3768	0,3817

p-Werte des Tests auf Unkorreliertheit

Tab. 6 Werte der Pearsonschen Korrelation für die Kompressionsarbeit



Diag. 14 Spearmanische Korrelation für die Kompressionsarbeit

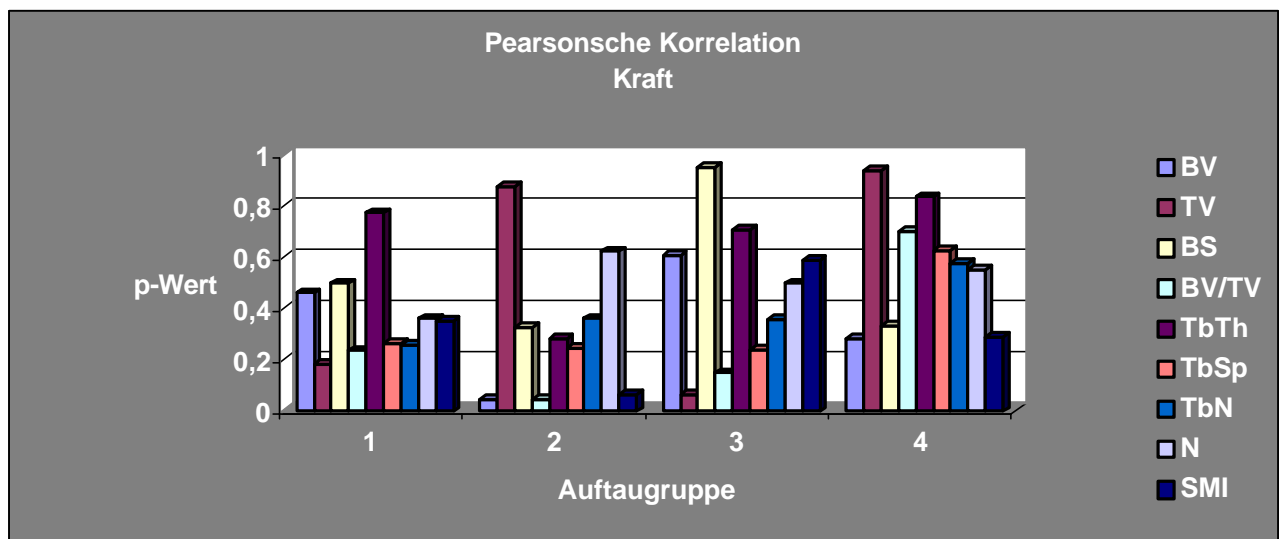
Probe	BV	TV	BS	BV/TV	TbTh	TbSp	TbN	N	SMI
1	0,7768	0,1966	0,5923	0,5923	0,7768	0,431	0,5923	0,5495	0,7768
2	0,1082	0,899	0,8749	0,0298	0,0472	0,3951	0,9749	0,8749	0,0616
3	0,3951	0,4859	0,8749	0,2193	0,3951	0,8255	0,8749	0,2193	0,2703
4	0,6366	0,6366	0,2986	0,6366	0,6822	0,8255	0,6822	0,1227	0,6366

p-Werte des Tests auf Unkorreliertheit

Tab. 7 Werte der Spearmanischen Korrelation für die Kompressionsarbeit

Sämtliche p-Werte des Tests auf Unkorreliertheit der Knochenstrukturparameter befinden sich bei der linearen und monotonen Korrelationsanalyse über einem Niveau von 1,25%. Es gibt bei den hier untersuchten Knochenstanzzyllindern von Rindenlendenwirbelkörpern keinen Hinweis auf einen Zusammenhang der geleisteten Kompressionsarbeit mit den ermittelten morphometrischen Werten.

3.5.2 Maximale Kompressionskraft

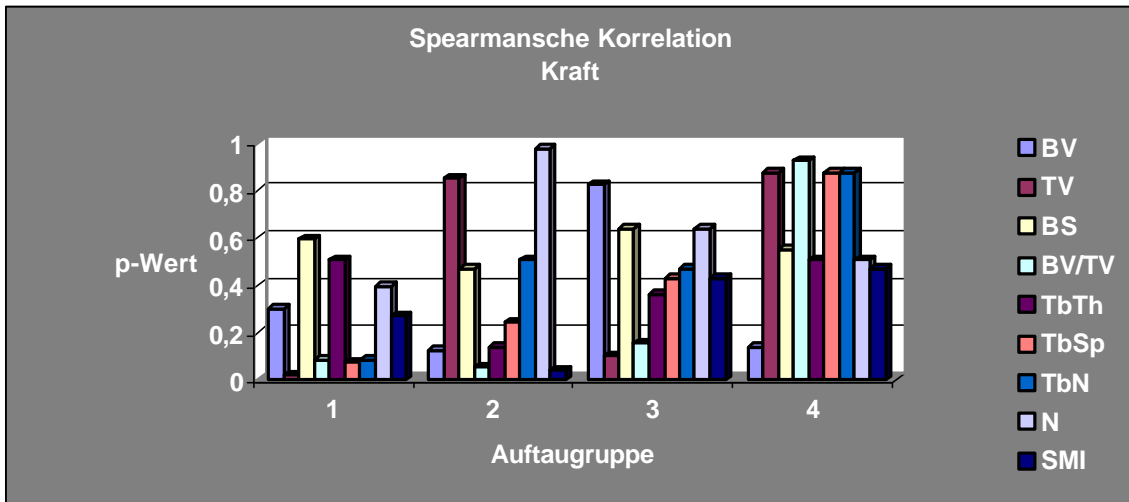


Diag. 15 Pearsonsche Korrelation Kompressionskraft

Probe	BV	TV	BS	BV/TV	TbTh	TbSp	TbN	N	SMI
1	0,4608	0,1833	0,4979	0,2357	0,7725	0,2641	0,2595	0,3606	0,3541
2	0,0448	0,8775	0,3256	0,0474	0,2813	0,2478	0,3612	0,6227	0,0662
3	0,6054	0,0676	0,9519	0,1493	0,7095	0,2392	0,3555	0,4983	0,5896
4	0,2834	0,9409	0,334	0,7004	0,8364	0,628	0,5751	0,5518	0,2909

p-Werte des Tests auf Unkorreliertheit

Tab. 8 Werte der Pearsonschen Korrelation für die Kompressionskraft



Diag. 16 Spearman'sche Korrelation für die Kompressionskraft

Probe	BV	TV	BS	BV/TV	TbTh	TbSp	TbN	N	SMI
1	0,2986	0,0215	0,5923	0,0832	0,5083	0,0726	0,0832	0,3951	0,2703
2	0,1227	0,8491	0,4688	0,0547	0,1388	0,2439	0,5083	0,9749	0,0395
3	0,8255	0,0995	0,6366	0,1564	0,361	0,431	0,4688	0,6366	0,431
4	0,1388	0,8749	0,5495	0,9247	0,5083	0,8749	0,8749	0,5083	0,4688

p-Werte des Tests auf Unkorreliertheit

Tab. 9 Werte der Spearman'schen Korrelation für die Kompressionskraft

Für alle neun Parameter ließ sich weder bei der linearen noch der monotonen Korrelation die Hypothese der Unkorreliertheit verwerfen, denn keiner der Parameter erreicht in einer der vier Gruppen ein Signifikanzniveau von unter 1,25 %.

3.6 Vergleich der histologischen Schnittpräparate mit den multiplanaren Bildrekonstruktionen

Aus den axialen Mikro-CT-Bildern lassen sich multiplanare Rekonstruktionsbilder erzeugen die identisch zur histologischen Schnittebene liegen. Damit besteht die Möglichkeit einer qualitativ visuellen Auswertung zur Vergleichbarkeit der Mikro-CT und konventionellen Histologie. Der bovine Knochenstanzzyylinder in Abb. 13 zeigt sowohl in dem Schnittpräparat als auch in den Rekonstruktionsbildern Mikrofrakturen in den Randbereichen. Diese Mikrofrakturen sind durch die Probenentnahme bedingt und nicht auf die Lagerung

zurückzuführen. Zusätzlich zu diesen Veränderungen sind in dem histologischen Präparat noch zahlreiche weitere Schnittartefakte mit Zerstörung einzelner Knochen trabekel erkennbar.

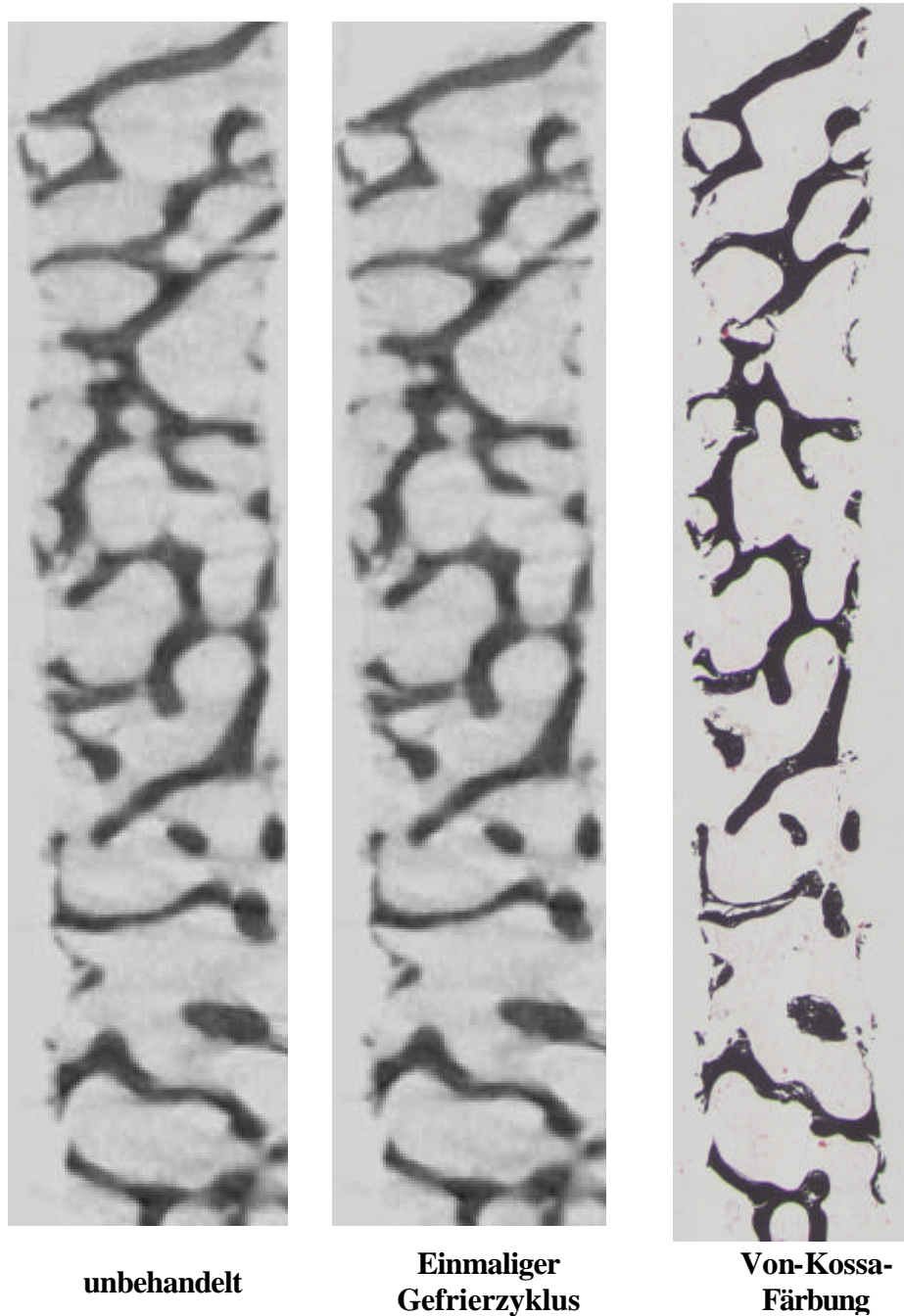


Abb. 13 Multiplanare Rekonstruktionen und von-Kossa Färbung im Vergleich Probe CA

Die Mikrofrakturen in den Randbereichen der Proben wurden nicht durch das einmalige Einfrieren und Auftauen beeinflusst.

In Abb. 14 sind die multiplanaren Rekonstruktionen eines weiteren Knochenstanzzyinders vor und nach dem viermaligen Einfrieren und Auftauen zu sehen. Das histologische Präparat wurde nach den Gefrier- und Auftauzyklen angefertigt. Auch bei dieser Probe sind gegenüber den Mikro-CT Aufnahmen zahlreiche neu aufgetretene Schnittartefakte des histologischen Präparates erkennbar.

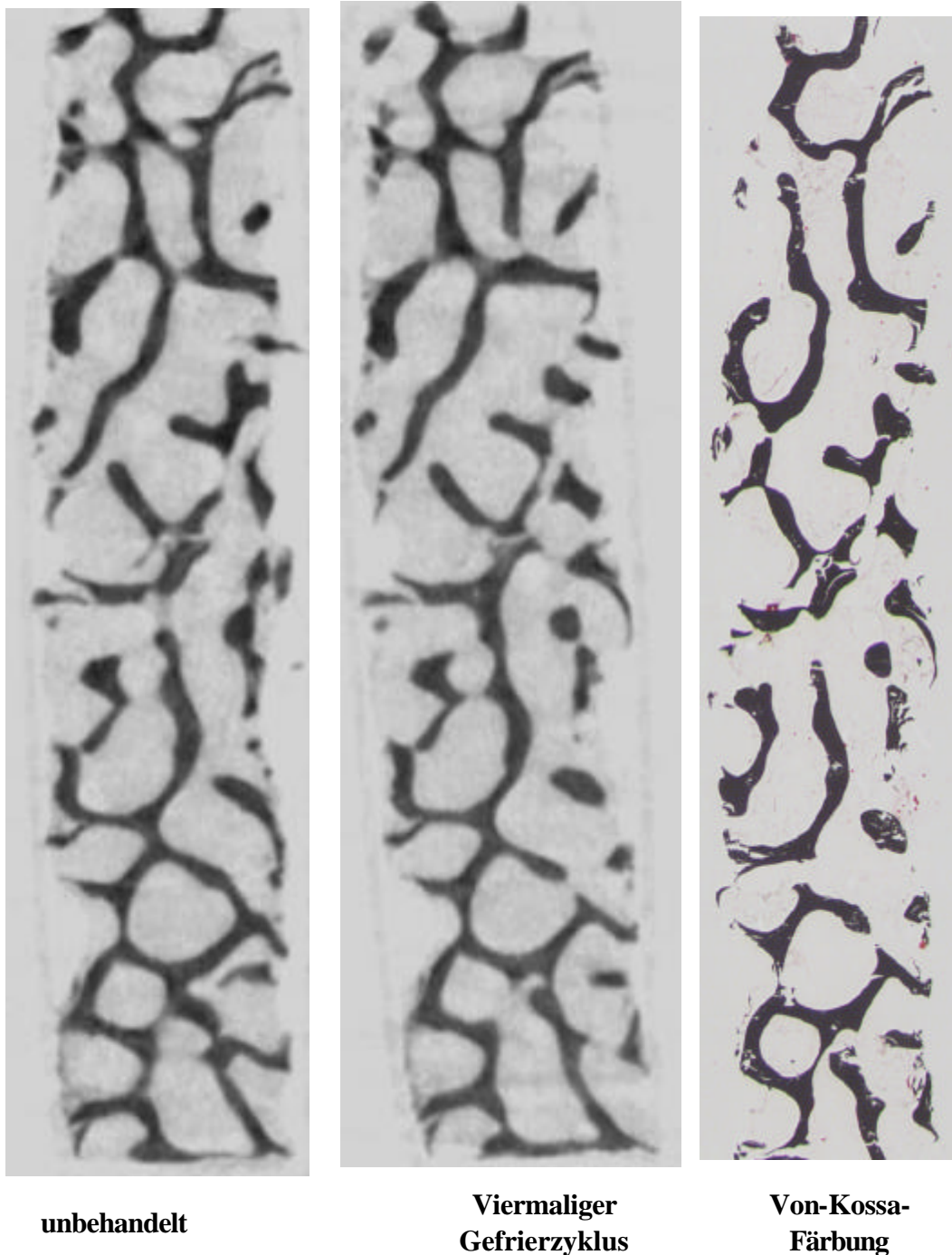


Abb. 14 Multiplanare Rekonstruktionen und von-Kossa Färbung im Vergleich der Probe CD

4. Diskussion

4.1 Probengewinnung und Probenlagerung

Bovine und porcine Knochenzylinder wurden von zahlreichen Untersuchern zu Stabilitätsprüfungen nach unterschiedlichen Lagerungsmodalitäten und Lagerungszeiten eingesetzt.

Die Untersuchungen von Swartz et al. (1991) ergaben identische Werte des relativen Knochenvolumens (BV/TV), des Aschegehalts und der Kompressionskraft von bovinen und humanen Wirbelkörpern. Knochenzylinder aus Rinderwirbelkörpern sind ein akzeptiertes Modell.

Wittenberg et al. (1990) haben die Kompressionskraft von Fibula-, Rippen- und Beckenkammspanen nach einer Ethylenoxidsterilisation verglichen. Sie verwendeten hierzu Knochenproben mit Kortikalis und Spongiosa, wie sie bei Wirbelkörperspondylodesen zur ventralen Verblockung eingesetzt werden. Der Fibulaspan zeigte eine deutlich größere mechanische Stabilität gegenüber der Rippen- und Beckenkammprobe. Nach der Ethylenoxidsterilisation kam es zu keiner wesentlichen Minderung der Festigkeit bei allen drei Proben.

Biegeprüfungen an vollständigen Rattentibiae wurden von Voggenreiter et al. (1995) durchgeführt. Die Röhrenknochen wurden vor der Stabilitätsprüfung autoklaviert, bei minus 70°C tiefgefroren oder mit 1-5kGy bestrahlt. Der tiefgefrorene Knochen zeigte keine wesentliche Beeinträchtigung seiner mechanischen Stabilität. Bei der Bestrahlung und Autoklavierung kam es indes zu einem Verlust der Biegefestigkeit auf 74 bzw. 82%.

Pereira et al. (1999) asservierten Röhrenknochen ausgewachsener Hunde bei minus 70°C und in flüssigem Stickstoff bei minus 150°C. Torsionstests ließen auch hier keinen Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen erkennen, jedoch kam es nach dem Auftauen und dem Überschreiten der minus 40°C Grenze in beiden Gruppen zu kleinen longitudinalen Haarrissen der Kortikalis. Diese alterierten Röhrenknochen waren in ihrer Torsionsfestigkeit auf bis zu 48% reduziert. Die Autoren diskutierten hier als Ursache die Rekristallisation der wässrigen Knochenmarksanteile. Tatsächlich kam es nicht zu diesen Frakturen, wenn der Röhrenknochen vorher von seinen intramedullären Anteilen befreit wurde. Eine deutlich geringere Reduzierung der Torsionsfestigkeit um ca. 5% wurde in einer Serie von Stromberg und Dalen (1976) bei tiefgefrorenen Röhrenknochen von Hunden gefunden.

Matter et al. (2001) haben trabekuläre Knochenzylinder von 6-8 Monate alten Hausschweinen mit einer Größe von 50 x 25mm bei minus 20°C und minus 80°C für 6,12 und 24 Monate

gelagert. Im Anschluss wurde ein Screw-pull-out Test durchgeführt. Bei dem Screw-pull-out Test wird eine Spongiosaschraube in den trabekulären Knochen verschraubt und ihre Festigkeit während eines Zugversuches überprüft. Es konnte in allen drei Gruppen kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden.

Zerstörungsfreie Kompressionsversuche an bovinen Tibia-Knochenscheiben wurden von Kang et al. (1997) angefertigt. Die Knochenscheiben setzten sie vier Gefrier- und Auftauvorgängen in Luft und physiologischer Kochsalzlösung aus. Zwischen allen vier Gruppen wurden bei der Auswertung der Kompressionstests keine signifikanten Differenzen festgestellt. Entgegen der von uns verwendeten Kompressionsmethode wird bei der zerstörungsfreien Kompression die Probe nur bis zu einem deutlich geringeren Kraftwert be- und entlastet. Die entstehende Kraft während der Belastung und die auf den elastischen Eigenschaften beruhende Kraft während der Entlastung werden dabei registriert.

Die Fixierung in Formalin wurde von Currey et al. (1995) und Goh et al. (1989) untersucht. Sie verwendeten lange Röhrenknochen von Hunden und Rindern. Beide Untersucher fanden unter der Formalinfixierung eine Abnahme der Torsionskraft.

Bei keiner der uns bekannten Studien zur Lagerungsabhängigkeit von Knochenproben wurden ausschließlich trabekuläre Knochenproben einer Kompressionsprüfung unterzogen. Die zu diagnostischen Zwecken aus dem Beckenkamm gewonnenen Knochenzylinder bestehen jedoch fast ausnahmslos aus Spongiosa.

Wir verwendeten zur Probenentnahme der bovinen Knochenzylinder eine etablierte handelsübliche Jamshidi-Nadel. Die Knochenbiopsie aus dem Beckenkamm oder der Wirbelsäule ist ein standardisierter Eingriff zur Abklärung hämatologischer und onkologischer Fragestellungen. Zur Abklärung von metabolischen Knochenerkrankungen wie z.B. der Osteoporose, der Osteomalazie oder anderen Osteopathien kommt sie ebenfalls regelmäßig zum Einsatz (Frisch et al., 1982).

Mit der von uns verwendeten Jamshidi-Nadel (Fa. Bauer; Florida, USA) konnten etwa drei bis fünf Proben entnommen werden. Dies geschah innerhalb eines 3-Stunden Intervalls nach Tötung der Tiere. Die Untersuchungen von Kaab et al. (1998) belegen, daß es innerhalb eines Zeitraums von 3,5 Tagen post mortem zu keinem Verlust der mechanischen Stabilität der Wirbelkörper kommt. Die Autoren haben in einer Serie an 48 Lendenwirbelkörpern in einem Intervall von 0, 24, 60 und 84 Stunden post mortem Screw-Pull-Out Tests durchgeführt und erst nach 3,5 Tagen post mortem Veränderung der Kraftverhältnisse vorgefunden. Die Proben waren dabei Zimmertemperatur ausgesetzt.

Ein Intervall von weniger als drei Stunden post mortem für die Knochenzylinderentnahme ist somit akzeptabel und sollte keinen Einfluss auf die Kompressionsversuche haben. Die Fixierung in Formalin erfolgte direkt, das Gefrieren der Knochenzylinder in einem Zeitraum von bis zu zwei Stunden nach Probenentnahme.

4.2 Analyse der Knochenstrukturparameter mit der Mikro-CT

Seit Einführung der Mikro-Computertomographie zur Darstellung der Knochenstruktur durch Feldkamp et al. (1989) steht außer der konventionellen Histologie ein weiteres Verfahren zur Verfügung, das die Strukturanalyse auf zwei- und dreidimensionaler Ebene erlaubt. Der große Vorteil der Strukturanalyse mit der Mikro-Computertomographie ist die zerstörungsfreie Analyse des Knochens und somit eine uneingeschränkte weitere Nutzbarkeit der Proben.

Histopathologische oder biomechanische Untersuchungen sind auch nach der Untersuchung im Mikro-CT noch möglich. Ein Nachteil gegenüber den histologischen Verfahren ist, dass die Mikro-CT-Technik nur die mineralisierten Anteile des Knochens durch ihren hohen Dichteunterschied zu den organischen Knochenbestandteilen darstellen kann. Die organischen Komponenten wie Knochenzellen, kollagene Fasern, glykoproteinhaltige Kittsubstanz, Osteoid und das Knochenmark in den Markräumen sind nicht zu differenzieren.

Demgegenüber stehen die Nachteile der konventionellen Histologie. Bei der Anfertigung histologischer Präparate mit nicht entkalktem Knochen sind Schnittartefakte der in Kunststoff eingebetteten Knochenproben nicht zu vermeiden. Selbst bei optimierter Vorbereitung und der Durchführung durch einen erfahrenen Untersucher sind diese Beeinträchtigungen, wie in Kap. 2.6 abgebildet, nicht zu vermeiden. Wird das Knochengewebe für die weitere histologische Beurteilung entkalkt, entziehen sich die mineralisierten Anteile des Knochens der direkten Beurteilung und es kommt zu Schrumpfungartefakten. Die Beeinflussung der morphometrischen Analyse von Knochenstrukturparametern erscheint unvermeidbar.

Die exakte Darstellung der Knochenstruktur, d.h. die Korrelation zwischen Histomorphometrie und der im Mikro-CT ermittelten Strukturparameter wurde von Uchiyama et al. (1997) überprüft. Sie fanden Korrelationen zwischen $r=0,759$ (TbN, $P<0,005$) und $r=0,949$ (BV/TV, $P<0,005$) bei dem Vergleich der beiden Methoden.

Zur ausreichenden Übereinstimmung der im Mikro-CT bestimmten Parameter und der konventionellen Histomorphometrie wird von Müller et al. (1996,1998) und Uchiyama et al. (1997) eine Auflösung von mindestens $100\mu\text{m}$ gefordert. Zwischen einer Auflösung von $14\text{--}100\mu\text{m}$ sind die ermittelten Werte für das relative Knochenvolumen konstant (Müller et al., 1996). Systeme die eine Auflösung von $100\mu\text{m}$ nicht erreichen, sind nach Parfitt (1992)

ungeeignet für die Analyse der Knochenstruktur. Die von uns verwendeten bovinen Knochenstanzzyylinder wurden daher mit einer nominellen Auflösung von $32,5\mu\text{m}$ untersucht.

Wir verwendeten für die Binärbildumwandlung der Mikro-CT-Bilder eine Grauwertfestlegung (thresholding), die abhängig ist von der Häufigkeitsverteilung der Grauwerte im gesamten Volumen. Die Grauwertfestlegung ist entscheidend für die anschließende Auswertung der Strukturparameter. Dies zeigen die Beobachtungen von Ding et al. (1999) und Rüegesegger et al. (1996). Bei einer nominellen Auflösung von $14\mu\text{m}$ ermittelten Rüegesegger und Mitarbeiter eine lineare Beziehung zwischen dem relativen Knochenvolumen (BV/TV) und der Grauwertfestlegung. Eine Veränderung des Schwellenwertes um 10%, d.h. eine Veränderung der Grauwertgrenze für Knochen um 10%, resultierte in einer Veränderung des relativen Knochenvolumens von 5%.

In der Literatur werden unterschiedliche Methoden für ein optimales „thresholding“ diskutiert. Müller et al. (1998) fordern, dass für die Auswertung eines Probenkollektivs ein einheitliches „thresholding“ angewandt werden muss, um die ermittelten Strukturparameter in Beziehung setzen zu können. Geschieht dies nicht, so ist die Vergleichbarkeit nur unzureichend. Für das „thresholding“ wird dabei von Ding et al. (1999) folgendes System vorgeschlagen: Die exakte Parametrisierung der Grauwertfestlegung erfolgt durch den Vergleich der relativen Knochendichte, die für einen kleinen Stichprobenumfang nach dem archimedischen Prinzip und im Mikro-CT ermittelt wird. Die Auswertung aller Proben wird dann mit diesen geeichten Werten vorgenommen.

Dagegen wird von Feldkamp et al. (1989) und Kuhn et al. (1990) ein an die Probenbeschaffenheit adaptiertes „thresholding“ vorgeschlagen. Für jede Probe wird eine quantitative Analyse aller vorhandenen Grauwerte durchgeführt und dann erfolgt die entsprechende Schwellenwertezuordnung. Die Autoren argumentieren mit den intraindividuellen Dichteunterschieden in einer Probe und der daraus resultierenden Tatsache, daß gleich dichte Strukturen in unterschiedlicher Lokalisation verschieden abgebildet werden. Wir verwendeten in der vorliegenden Studie das oben erwähnte Verfahren, da auch in unseren Proben Dichte-Unterschiede zu sehen waren. Ein einheitliches proben-übergreifendes Verfahren erscheint daher problematisch zu sein.

Die computergestützte Auswertung der Strukturparameter wurde mit dem Programm „3D-Calculator“ (Fa. Skyskan, Belgien) durchgeführt. Die Tabelle 10 stellt einige ausgewählte Strukturparameter im Vergleich zu einer Studie mit humanen Wirbelkörperbiopsien von Hildebrand et al. (1999) dar. Die Werte für die Trabekelanzahl, den Trabekelabstand und die trabekuläre Dicke der bovinen Proben sind mit den Werten aus humanen Wirbelkörper-

Biopsien vergleichbar. Das relative Knochenvolumen (BV/TV) unterscheidet sich deutlich. Die anderen Strukturparameter wurden von den Autoren leider nicht angegeben.

Strukturparameter		Bovine Proben (n=8)		Humane Wirbelkörperbiopsien (n=52)	
		Mittelwert/SD		Mittelwert/SD	
Trabekelanzahl (ThN)	1/mm	1,03	0,18	1,16	0,18
Trabekulärer Abstand (ThSp)	µm	865,7	192,5	854	143
Rel. Knochenvolumen (BV/TV)	%	15,8	2,69	8,7	3,3
Trabekuläre Dicke (TbTh)	µm	154,59	7,18	139	28

Tab. 10 Vergleich humane und bovine Knochenstrukturparameter

Die Veränderungen an fünf Strukturparametern wurden während der Gefrier- und Auftauvorgänge untersucht: Knochenvolumen (BV), Probenvolumen (TV), trabekuläre Dicke (TbTh), Trabekelanzahl (TbN) und dem Struktur-Modell-Index (SMI). Eine Betrachtung sämtlicher Parameter scheint nicht sinnvoll, da diese teilweise in mathematischem Zusammenhang stehen, wie z.B. Knochenvolumen und relatives Knochenvolumen:

$$\text{relatives Knochenvolumen} = \frac{BV}{TV} \times 100.$$

Das Knochenvolumen lässt als einziger der betrachteten Parameter keine signifikante Veränderung der Werte während der Auftauvorgänge erkennen ($p=0,16$). Es ist also davon auszugehen, daß das mehrmalige Einfrieren und Auftauen von Knochenproben keinen Einfluss auf das reine Knochenvolumen hat. Hingegen lässt sich dies für das Gesamtvolumen der Knochenproben nicht feststellen, eine signifikante Änderung des Probenvolumens (TV) ist daher nicht auszuschließen. Das Probenvolumen setzt sich zusammen aus dem Volumen des Knochen- und Nichtknochengewebes. Da wir davon ausgehen können, daß sich das Knochenvolumen nicht ändert, ist die Zunahme des Gesamtvolumens nur durch die Veränderung des Nichtknochengewebes erklärbar.

Das Knochengewebe besteht aus zwei Komponenten, den anorganischen und organischen Anteilen. Bei dem anorganische Anteil, der ca. 65% des Knochengewebes ausmacht handelt es sich v.a. um Calciumhydroxylapatit $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$. Es finden sich außerdem geringe Spuren von Magnesium, Fluor und Citrat. Das Calciumhydroxylapatit ist für 75% des Knochentrockengewichtes verantwortlich, dagegen sind 20% des Feuchtgewichtes durch Wasser bedingt.

Die organischen Anteile setzen sich zu 90 % aus Kollagen Typ I und zu 10 % aus den nicht-kollagenen Proteinen zusammen. Beim Erwachsenen liegt das Kollagen in ca. 4µm dicken Lagen auf der dem Markraum zugewandten Seite des trabekulären Knochens. Im Mikro-CT

ist dieser Kollagenüberzug durch die geringen Absorptionsunterschiede zwischen Knochenmark und Kollagen nicht zu differenzieren.

Das Nichtknochengewebe befindet sich in den Markräumen des trabekulären Knochens und besteht aus Knochenmark. Das Knochenmark enthält aktive und fettig atrophierte zelluläre Anteile der Hämatopoese. In den Markräumen befindet sich damit ein hydro- und lipophiles Kompartiment.

Die in dieser Studie verwendeten bovinen Knochenstanzzyylinder wurden bei minus 40°C in einem Gefrierschrank asserviert. Bei dem Einfrieren und Auftauen der Proben kann es daher zur mehrmaligen Bildung von Eiskristallen und dem Effekt der Eissprengung kommen. Geht die hydrophile Phase des Markraumes von einem flüssigen in einen festen Zustand über, tritt eine Volumenvermehrung (Dichtanomalie des Wassers) dieses Kompartimentes ein. Infolge der Volumenzunahme kann es zu einer Schädigung der Trabekel kommen. Werden Trabekelplatten oder Stäbe zerstört, ändert sich ihre Oberfläche (BS), d.h. die Größe der Oberfläche nimmt durch diese Frakturen zu. Für die Trabekeldicke konnten wir mit $p=0,015$ eine Veränderung durch die Gefrier- und Auftauvorgänge nicht ausschließen. Allerdings können wir nicht differenzieren ob die Dicke zu oder abnimmt. Die Trabekeldicke ist definiert

durch $TbTh = \frac{2}{1,1999} * \frac{BV}{BS}$. Veränderungen der Knochenoberfläche bei konstantem

Knochenvolumen resultieren also in einer Zu- oder Abnahme der Trabekeldicke.

Verändern sich die Trabekeldicke (TbTh) und das Probenvolumen (TV), so ist mit konstantem Knochenvolumen (BV) auch bei der Trabekelanzahl (ThN) mit der Definition

$ThN = \frac{BV/TV}{TbTh}$ eine Veränderung zu erwarten. Wir konnten dies mit dem von uns

untersuchten Kollektiv bestätigen ($p=0,0017$).

Der Struktur-Modell-Index (SMI) ergibt sich aus folgender Gleichung: $SMI = 6 \frac{BV \frac{dBS}{dr}}{BS^2}$.

Mit einem p-Wert von 0,014 müssen wir auch bei diesem Wert die Hypothese ablehnen, daß es zu keiner Wertänderung durch die Gefrier- und Auftauzyklen kommt. Der Struktur-Modell-Index beschreibt die Spongiosastruktur hinsichtlich ihres Aufbaus durch Platten oder Stäbe. Er ist abhängig von der Knochenoberfläche (BS) und dem Abstand der Oberflächen (r). Platten können sich durch Frakturen oder Löcher in Stäbe umwandeln. Die Veränderung der Knochenoberfläche, z.B. durch artifizielle Frakturen würde sich wie bei den anderen untersuchten Parametern, auch bei dem Struktur-Modell-Index manifestieren.

Welche Ursachen für die Veränderung der Strukturparameter ausschlaggebend sind, ist aus den ermittelten Daten nicht ersichtlich. Statistisch signifikant ($p=0,16$) sind jedoch sicher die fehlende Beeinflussung des Knochenvolumens (BV), die Veränderung der trabekulären Dicke (ThTh), der Trabekelanzahl (ThN), des Probenvolumens (TV) und des Struktur-Modell-Index (SMI).

Die Zusammenhänge zwischen den im Mikro-CT bestimmten Strukturparametern und der Kompressionskraft und -arbeit wurden für die Gefrier- Auftaugruppen analysiert. Betrachtet wurden die Parameter abhängig von ihrer Gruppenzugehörigkeit, d.h. für jede der n-Gefrier- und Auftaugruppen erfolgte ein separater Test auf Unkorreliertheit.

Die Knochenstanzzyylinder gesunder junger Rinder ließen keinen Zusammenhang zwischen den Strukturparametern und der Kompressionsprüfung erkennen. Der Test auf Unkorreliertheit konnte für alle vier Gruppen mit einem Signifikanzniveau von 1,25% nicht verworfen werden.

In der Literatur werden die Parameter Knochenvolumen (BV), relatives Knochenvolumen (BV/TV) und der Trabekelabstand (ThSp) als die besten prädiktiven Faktoren für die Einschätzung der mechanischen Stabilität favorisiert. Thomsen et al. (2002) haben bei 21 Frauen (19-96 Jahre) und 24 Männern (23-95 Jahre) Knochenstanzen aus dem Wirbelkörper und dem dorsalen Beckenkamm entnommen. Verglichen wurde die maximale Kompressionskraft mit der konventionellen Histomorphometrie. Sie fanden die beste Korrelation mit $r=0,86$ für das relative Knochenvolumen (BV/TV) und den Trabekelabstand (ThSp).

Vergleichende Untersuchungen mit den im Mikro-CT bestimmten Strukturparametern und der mechanischen Belastbarkeit von Ulrich et al. (1997) bestätigen diese Zusammenhänge bei humanen Knochenproben aus dem peripheren Skelettsystem und dem Achsenskelett.

In unserem Kollektiv der gesunden jungen Rinder sind Zusammenhänge zwischen den Strukturparametern und der mechanischen Belastbarkeit, getestet durch die Kompressionskraft und -arbeit nicht zu erkennen.

Die Proben wurden bei allen Tieren aus dem ersten Lendenwirbelkörper entnommen. Die Entnahme erfolgte in gleicher Distanz zur Mittellinie und der Grund- oder Deckplatte des Wirbelkörpers. Wir können daher davon ausgehen, daß der intraindividuelle Unterschied der Proben hinsichtlich der Strukturparameter gering sein muss. Ist die Streuung der Strukturparameter und der mechanischen Testung sehr gering, ist ein Stichprobenumfang von 8 evtl. nicht ausreichend um eine eindeutige Korrelation zu berechnen.

Ausgeprägte pathologische oder artifizielle Veränderungen in den Knochenzylindern wurden bei der Untersuchung im Mikro-CT nicht detektiert. Bereits bei der Anfertigung der Topogramme, zur Planung der Mikro-CT Untersuchungen, wären derartige Veränderungen erkannt worden. In den Abbildungen 15 und 16 sind Oberflächenrekonstruktionen von vier Knochenstanzen aus einem Rinderwirbelkörper abgebildet. Die Proben wurden vor dem Einfrieren im Mikro-CT untersucht (CA-CD). Nachdem sie den Gefrier- und Auftauzyklus ein- bis viermal durchlaufen hatten wurden sie im Mikro-CT nachuntersucht (CA1-CD4).

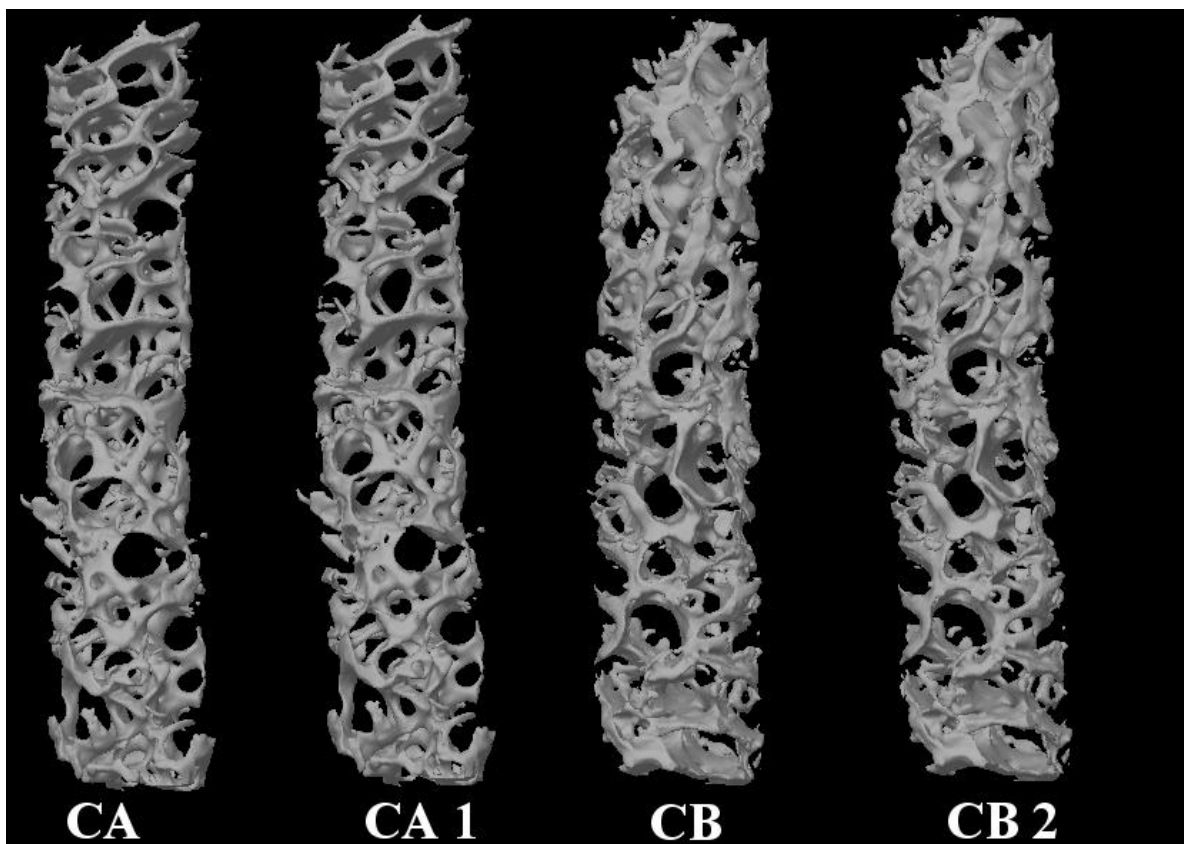


Abb. 15 Dreidimensionale Oberflächenrekonstruktion der Proben CA (CA1) und CB (CB2)

Grobe Zerstörungen der Spongiosaarchitektur durch die unterschiedliche Lagerung oder evtl. sogar iatrogen, durch die Entnahme oder die Untersuchung im Mikro-CT sind nicht erkennbar. Nur in den Randbereichen findet sich kleiner Knochenabrieb der durch die Biopsieentnahme erklärbar ist.

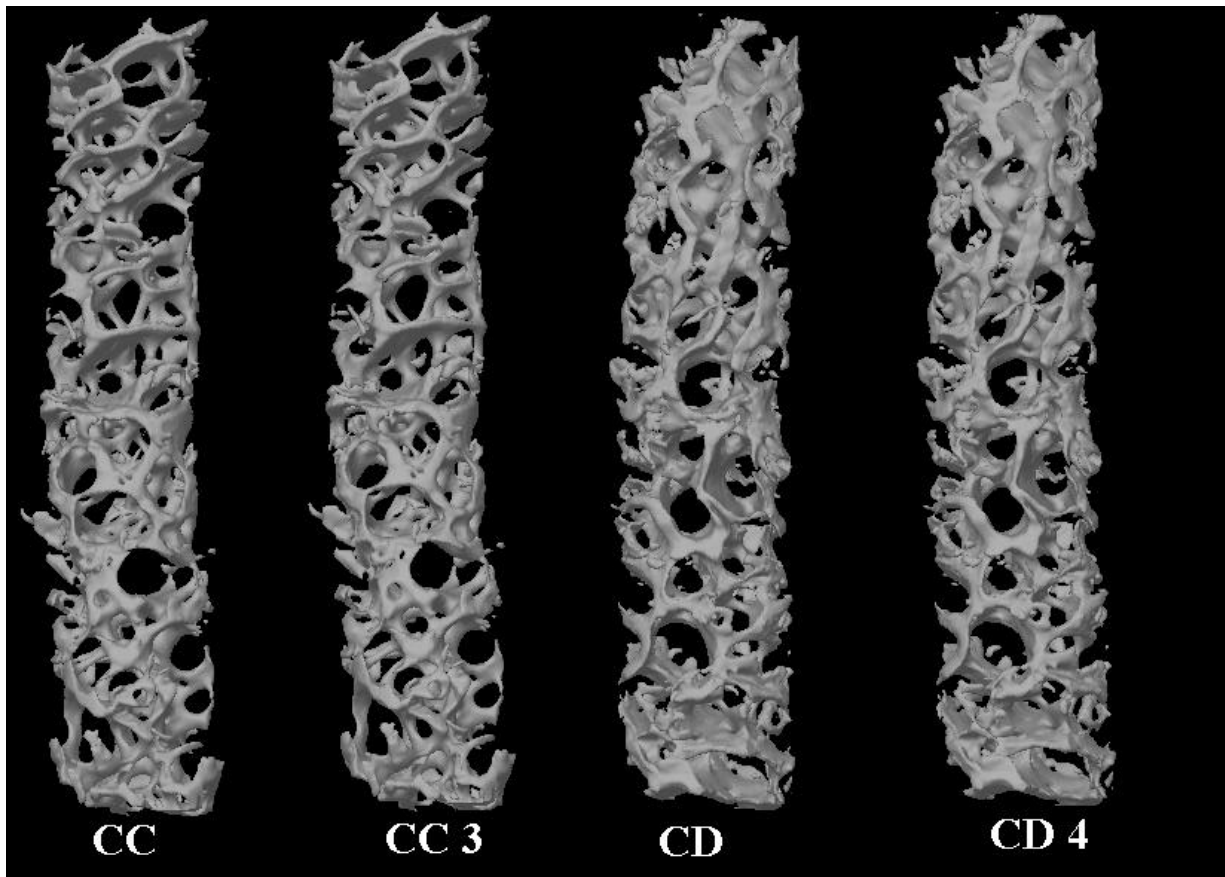


Abb. 16 Dreidimensionale Oberflächenrekonstruktion der Proben CC (CC3) und CD (CD4)

In ihrer Grundstruktur zeigen die Proben einen verwandten Aufbau. Sie bestehen überwiegend aus einer stäbchenartigen Spongiosastruktur mit wenigen Platten in paralleler Orientierung. In der Abb. 17 sind vier Oberflächenrekonstruktionen eines Knochenzylinders während der Rotation um seine Längsachse in 45 °- Schritten zu sehen. In 45°- und 135°-Stellung sind die Trabekelplatten in ihrer Aufsicht gut erkennbar. Die Aufnahme in 0°-Stellung zeigt die Trabekelplatten in seitlicher Ansicht. Verbunden sind diese Platten durch ein Netzwerk stäbchenartiger Trabekel. Dieser anisotrope Aufbau wurde von zahlreichen Untersuchern auch im humanen Wirbelkörper gefunden (Mosekilde et al., 1985; Smit et al., 1997).

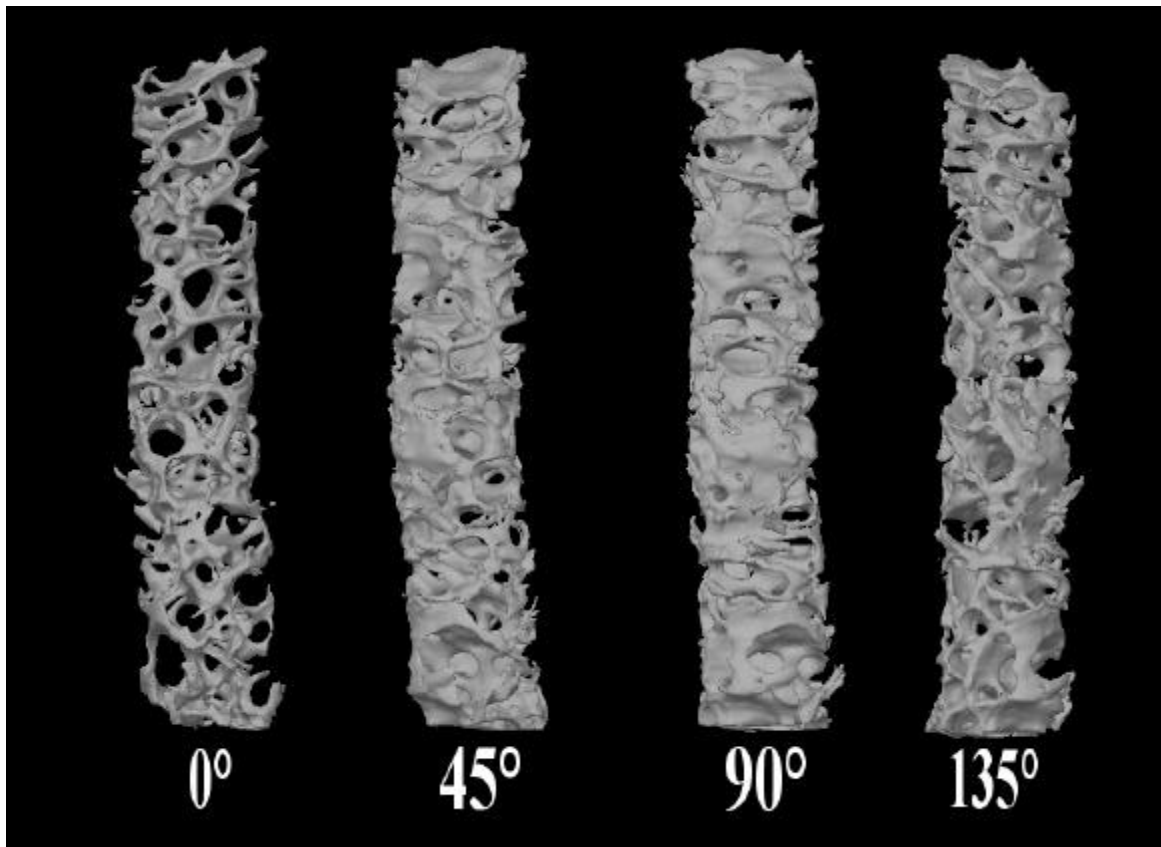


Abb. 17 Oberflächenrekonstruktion einer bovinen Knochenstanze in 45°-Rotationschritten

4.3 Mechanische Stabilitätsprüfung

Die mechanischen Eigenschaften der Knochen setzen sich aus mehreren Teilqualitäten zusammen. Die Zug- Biege- und Torsionsfestigkeit sind Eigenschaften des kortikalen Knochens. Sie können mit entsprechenden Testverfahren überprüft werden. Trabekulärer Knochen ist für die Kraftweiterleitung und Kraftverteilung zuständig, d.h. er ist somit überwiegend einer besonderen Druckbelastung ausgesetzt. Für seine mechanische Testung werden daher statische Kompressionsverfahren eingesetzt (Athanasίου et al., 2000).

Carter und Hayes (1977) beschreiben zur Erklärung der Phänomene, die während der Kompressionstestung von Spongiosaprobe auftreten, den Knochen als Zwei-Phasen-Modell: Die solide Phase entspricht den mineralisierten Anteilen der Knochenstruktur. Blut und Blutgefäße, interstitielle Flüssigkeit, Knochenmark und Nervengewebe bilden die flüssige Phase.

Der Beitrag der interstitiellen Flüssigkeit an der mechanischen Belastbarkeit von Knochenproben wurde von Kafka (1983) untersucht. Er fand bei trabekulären Knochenproben, die mit dem Knochenmark und der darin befindlichen Flüssigkeit komprimiert wurden, eine deutlich höhere Belastbarkeit als bei getrockneten Knochenproben.

Abhängig war diese Belastbarkeit von der Kompressionsgeschwindigkeit. Kafka führte dies auf die Viskosität der im Markraum vorhandenen flüssigen Anteile zurück. Ist die Viskosität groß, kann der liquide Anteil während der Kompression nur langsam entweichen und resultiert in einem höheren Kraftaufwand.

Nuccion et al. (2001) stellten nach der Entfernung der interossären Flüssigkeit aus intakten Kaninchenfemurköpfen eine Reduktion der Belastbarkeit von 30% fest. Die Untersuchungen von Ochoa et al. (1991) zeigten, daß nach dem Einfrieren und Auftauen von intakten Kaninchenfemurköpfen die Belastbarkeit um ca. 33% zurückging. Als Ursache wurde auch hier die Zerstörung der trabekulären Markraumgrenzen durch die Bildung von Eiskristallen angenommen.

Wir konnten diese Veränderungen bei den von uns untersuchten bovinen Knochenstanzzyklindern nicht feststellen. Weder bei der Gruppe der unterschiedlichen Lagerungsbedingungen, noch bei der Gruppe der Gefrier- und Auftauzyklen fanden wir Hinweise auf eine signifikante Veränderung der Kompressionskraft und -arbeit.

Eine Veränderung des Probengesamt volumens konnten wir, wie bereits in Kap. 4.2 beschrieben, jedoch nicht ausschließen. Verursacht ist diese Veränderung durch die Zu- oder Abnahme des Nicht-Knochenanteils. Wir können nicht unterscheiden, ob es sich hierbei um eine Veränderung des Flüssigkeitsgehaltes handelt oder ob sich der Fettanteil verändert. Einen Einfluss auf die mechanische Belastbarkeit, getestet durch die Ermittlung der maximalen Kompressionskraft ($F_{max.}$) und der Arbeit, stellten wir nicht fest.

Entgegen den von uns durchgeführten Kompressionsversuchen, bei denen wir nur trabekuläre Knochenstanzzyklinder testeten, wurden von Nuccion et al. (2001) und Ochoa et al. (1991) komplette Femurköpfe von Kaninchen verwendet. Sie benutzten damit ein Modell mit einem Kompartiment aus Spongiosa das von einer kortikalen Hülle umgeben ist. Die flüssige Phase wird dadurch einmal von den trabekulären Markräumen umschlossen und außerdem als äußere Umhüllung von der Kortikalis. Der Druck der damit auf die flüssige Phase ausgeübt wird, dürfte sehr viel größer sein, als bei der Kompression von rein trabekulären Knochenstanzzyklindern. Bei einem Durchmesser der Knochenstanzen von 2mm ist der Anteil an geschlossenen Markräumen sehr klein.

Die Abb. 18 zeigt die dreidimensionale Rekonstruktion einer Knochenprobe vor dem Gefrier- und dem Auftauvorgang.

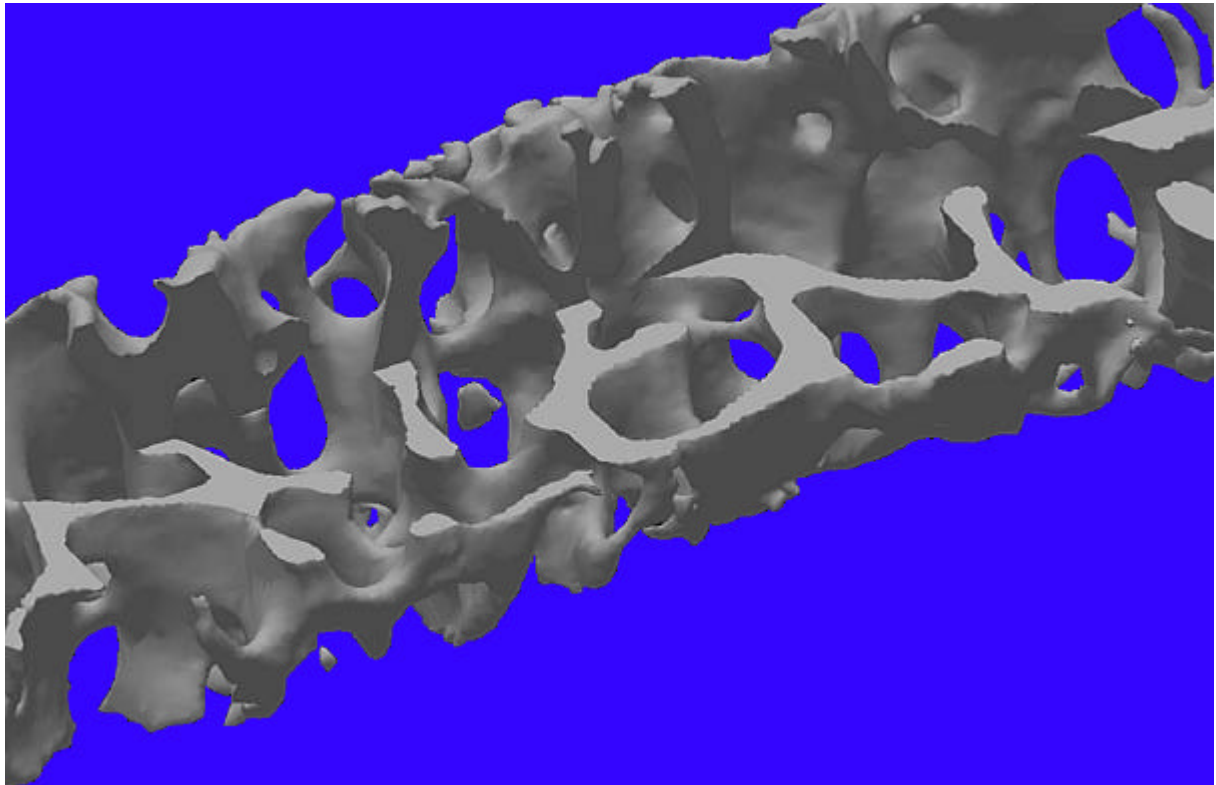


Abb. 18 Oberflächenrekonstruktion der Probe CA (2mm Durchmesser) aus einem Mikro-CT Volumendatensatz.

Zur besseren Einsicht in das Zentrum des Knochenzylinders wurde ein kleiner Teil des Bilddatensatzes nicht in die Oberflächenrekonstruktion mit einbezogen. Abgeschlossene Markräume sind bei dieser Probengröße nicht zu erwarten. Es bestehen fast überall Verbindungen zur Oberfläche der Knochenzylinder. Werden bei Knochenproben dieser Größe Kompressionsversuche durchgeführt, können die flüssigen Markraumanteile leicht entweichen und tragen nur gering zur Kraftentstehung bei.

Es ist daher anzunehmen, daß Veränderungen in der Zusammensetzung des Markraumes, durch die unterschiedliche Vorbehandlung unserer Knochenproben, sich nur gering in der mechanischen Belastungsprüfung manifestieren.

5. Zusammenfassung

Die demographische Entwicklung der nächsten Jahre wird zu einer deutlichen Zunahme der Osteoporose und deren Komplikationen führen. Einer adäquaten Diagnostik und vor allem auch Therapie wird eine immer größere Bedeutung zukommen. Es gilt das aktuelle Frakturrisiko des Patienten abzuschätzen und geeignete therapeutische Maßnahmen einzuleiten. Die bisher in der Osteoporosediagnostik etablierten radiologischen Verfahren leiden unter dem entscheidenden Nachteil, nur die Knochendichte und nicht die Struktur als wichtigen Parameter der Stabilität zu berücksichtigen.

Ziel dieser Studie war es, die Grundlage zu schaffen für die morphometrische und biomechanische Auswertung humaner Knochenstanzbiopsien mit der Mikro-CT und der Kompressionstestung.

Zu diesem Zweck wurden in einem ersten Abschnitt bovine Knochenstanzzyylinder aus dem ersten Lendenwirbelkörper unterschiedlichen Lagerungsbedingungen unterzogen und anschließend der mechanischen Kompressionsprüfung zugeführt. Im zweiten Abschnitt wurden bovine Knochenzyylinder nach dem ein- bis viermaligen Einfrieren und Auftauen im Mikro-CT untersucht und anschließend einer Kompressionsprüfung unterzogen. Aus den im Mikro-CT gewonnenen Datensätzen wurden neun unterschiedliche Knochenstrukturparameter ermittelt.

In dieser experimentellen Studie konnte gezeigt werden, daß unterschiedliche Lagerungsbedingungen keinen Einfluss auf die mechanische Belastbarkeit von bovinen Knochenstanzzyindern haben.

Das mehrmalige Durchlaufen von Gefrier- und Auftauvorgängen hatte keinen Einfluss auf die Stabilität, wohl aber auf die im Mikro-CT bestimmten Strukturparameter. Das Knochenvolumen (BV) ließ als einziger Parameter keine signifikante Änderung erkennen, alle anderen Parameter wurden durch die Gefrier- und Auftauvorgänge beeinflusst.

Einen Zusammenhang zwischen den im Mikro-CT ermittelten Strukturparametern und der Kompressionskraft und -arbeit konnten wir bei den zyklisch kryoasservierten Knochenzyindern gesunder junger Rinder nicht feststellen.

Daraus ergeben sich für weitere Studien an humanen Knochenzyindern folgende Schlussfolgerungen: Die Untersuchung von Knochenzyindern im Mikro-CT sollte ohne vorherige Kryoasservation erfolgen, da eine Beeinflussung der bestimmbareren Strukturparameter nicht ausgeschlossen werden kann. Die Durchführung von

Kompressionsversuchen ist bei den von uns verwendeten Knochenstanzzyindern, mit einem Durchmesser von zwei Millimetern unabhängig von den vorherigen Lagerungsbedingungen.

In Anbetracht dieser Ergebnisse kann das zeitliche Intervall, zwischen der Untersuchung im Mikro-CT und der mechanischen Kompressionsprüfung unproblematisch durch die Lagerung der Proben in einer Formalinlösung überbrückt werden.

Summary

The demographic development of the forthcoming years will bear a noticeable increase in prevalence of osteoporosis and its complications. Adequate diagnostics and especially therapy will have a continuously rising impact. A main issue is the calculation of the individual and effective fracture risk for the initiation of appropriate therapeutic efforts. The so far established radiological procedures have one major disadvantage in common - solely the bone-density rather than the morphological structure as another important parameter of stability is taken into consideration.

The aim of this study was to establish a basis for the morphometric and biomechanical assessment of cylindrical human bone samples with micro-computed-tomography (Micro-CT) and compression testing.

In a first step, bovine cylindrical bone samples were taken from the first lumbar spine and randomised to different storage conditions and subsequently subjected to a compression testing. In the second step, bovine cylindrical bone samples were investigated in micro-computed tomography after passing through a procedure of freezing and defrost one to four times. Afterwards also these samples underwent a compression testing. Nine different parameters of bone structure were derived from the datasets generated in μ CT.

The results from this experimental study indicate, that different storage conditions do not have an influence on the mechanical resistance of bovine cylindrical bone samples.

The repeated exposure to a freezing and defrost procedure did not influence stability, but structural parameters determined with μ CT imaging. Except the bone volume - the only stable parameter - all structural parameters were significantly influenced by the procedure of freezing and defrost. That means, we could not find a correlation between the structural parameters derived from μ CT and the stability parameters in compression testing in cyclic cryopreserved cylindrical bone samples of young cattle.

For further studies with human bone cylinders the following conclusions can be drawn: the investigation of bone cylinders in μ CT should be carried out without earlier cryopreservation, as an influence on structural parameters can not be excluded Results from compression testing in bone cylinders with a diameter of 2mm used in our study are independent of the storage conditions.

In consideration of this results a time interval between investigation in μ CT and mechanical compression testing can be bridged in case of adequate storage of the samples without influence on stability parameters.

6. Literaturverzeichnis

Consensus Development Conference on Osteoporosis. Hong Kong, April 1-2, 1993. *Am J Med* 1993; 95(5A): 1-78.

Athanasίου KA, Zhu C, Lanctot DR, Agrawal CM, Wang X. Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone. *Tissue Eng* 2000; 6(4): 361-381.

Braune C. Röntgenmorphometrie und mechanische Stabilität spongiösen Knochens. Inauguraldissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen, 1997.

Caniggia A, Nuti R. The diagnosis of postmenopausal osteoporosis. *Minerva Endocrinol* 1991; 16(2): 55-60.

Carter DR, Hayes WC. The compressive behavior of bone as a two-phase porous structure. *J Bone Joint Surg Am* 1977; 59(7): 954-962.

Compston JE, Papapoulos SE, Blanchard F. Report on osteoporosis in the European Community: current status and recommendations for the future. Working Party from European Union Member States. *Osteoporos Int* 1998; 8(6): 531-534.

Currey JD, Brear K, Zioupos P, Reilly GC. Effect of formaldehyde fixation on some mechanical properties of bovine bone. *Biomaterials* 1995; 16(16): 1267-1271.

Ding M, Dalstra M, Linde F, Hvid I. Mechanical properties of the normal human tibial cartilage-bone complex in relation to age. *Clin Biomech (Bristol, Avon)* 1998; 13(4-5): 351-358.

Ding M, Hvid I. Quantification of age-related changes in the structure model type and trabecular thickness of human tibial cancellous bone. *Bone* 2000; 26(3): 291-295.

Ding M, Odgaard A, Danielsen CC, Hvid I. Mutual associations among microstructural, physical and mechanical properties of human cancellous bone. *J Bone Joint Surg Br* 2002; 84(6): 900-907.

Ding M, Odgaard A, Hvid I. Accuracy of cancellous bone volume fraction measured by micro-CT scanning. *J Biomech* 1999; 32(3): 323-326.

Ding M, Odgaard A, Linde F, Hvid I. Age-related variations in the microstructure of human tibial cancellous bone. *J Orthop Res* 2002; 20(3): 615-621.

Feldkamp LA, Goldstein SA, Parfitt AM, Jesion G, Kleerekoper M. The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography. *J Bone Miner Res* 1989; 4(1): 3-11.

Food and Drug Administration. Draft Guidelines for preclinical and clinical evaluation of agents used in the prevention or treatment of postmenopausal osteoporosis. Division of metabolism and endocrine drug product, Rockville, Maryland, 1994; 5-15.

- Frisch B, Bartl R, Burkhardt R.** Bone marrow biopsy in clinical medicine: an overview. *Haematologia (Budap)* 1982; 15(3): 245-285.
- Gluer CC, Genant HK.** Impact of marrow fat on accuracy of quantitative CT. *J Comput Assist Tomogr* 1989; 13(6): 1023-1035.
- Goh JC, Ang EJ, Bose K** Effect of preservation medium on the mechanical properties of cat bones. *Acta Orthop Scand* 1989; 60(4): 465-467.
- Goulet RW, Goldstein SA, Ciarelli MJ, Kuhn JL, Brown MB, Feldkamp LA.** The relationship between the structural and orthogonal compressive properties of trabecular bone. *J Biomech* 1994; 27(4): 375-389.
- Hawker GA.** The epidemiology of osteoporosis. *J Rheumatol Suppl.* In press.
- Hildebrand T, Laib A, Müller R, Dequeker J, Rügsegger P.** Direct three-dimensional morphometric analysis of human cancellous bone: microstructural data from spine, femur, iliac crest, and calcaneus. *J Bone Miner Res* 1999; 14(7): 1167-74.
- Hildebrand T, Rügsegger P.** Quantification of Bone Microarchitecture with the Structure Model Index. *Comput Methods Biomech Biomed Engin* 1997; 1(1): 15-23.
- Ito M, Nishida A, Koga A, Ikeda S, Shiraishi A, Uetani M, Hayashi K, Nakamura T.** Contribution of trabecular and cortical components to the mechanical properties of bone and their regulating parameters. *Bone* 2002; 31(3): 351-358.
- Jergas M, Schmid G.** Konventionelle Radiologie der Osteoporose und Röntgenabsorptiometrie. *Radiologe* 1999; 39(3): 174-185.
- Kaab MJ, Putz R, Gebauer D, Plitz W.** Changes in cadaveric cancellous vertebral bone strength in relation to time. A biomechanical investigation. *Spine* 1998; 23(11): 1215-1219.
- Kabel J, Van Rietbergen B, Dalstra M, Odgaard A, Huiskes R** The role of an effective isotropic tissue modulus in the elastic properties of cancellous bone. *J Biomech* 1999; 32(7): 673-680.
- Kafka V.** On hydraulic strengthening of bones. *Biorheology* 1983; 20(6): 789-793.
- Kalender WA, Brestowsky H, Felsenberg D.** Bone mineral measurement: automated determination of midvertebral CT section. *Radiology* 1988; 168(1): 219-221.
- Kang Q, An YH, Friedman RJ.** Effects of multiple freezing-thawing cycles on ultimate indentation load and stiffness of bovine cancellous bone. *Am J Vet Res* 1997; 58(10): 1171-1173.
- Kanis JA.** Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group. *Osteoporos Int* 1994; 4(6): 368-381.
- Kanis JA.** An Update on the Diagnosis and Assessment of Osteoporosis with Densitometry. *Osteoporosis International* 2000; 11(3): 192-202.

- Keaveny TM, Borchers RE, Gibson LJ, Hayes WC.** Trabecular bone modulus and strength can depend on specimen geometry. *J Biomech* 1993; 26(8): 991-1000.
- Kleerekoper M, Villanueva AR, Stanciu J, Rao DS, Parfitt AM.** The role of three-dimensional trabecular microstructure in the pathogenesis of vertebral compression fractures. *Calcif Tissue Int* 1985; 37(6): 594-597.
- Kuhn JL, Goldstein SA, Feldkamp LA, Goulet RW, Jasion G.** Evaluation of a microcomputed tomography system to study trabecular bone structure. *J Orthop Res* 1990; 8(6): 833-842.
- Lindahl O.** Grading of osteoporosis on biopsy specimens. *Acta Orthop Scand* 1966; 37(4): 333-338.
- Linde F, Hvid I, Pongsoipetch B.** Energy absorptive properties of human trabecular bone specimens during axial compression. *J Orthop Res* 1989; 7(3): 432-439.
- Linde F, Norgaard P, Hvid I, Odgaard A, Soballe K.** Mechanical properties of trabecular bone. Dependency on strain rate. *J Biomech* 1991; 24(9): 803-809.
- Marcus R.** Clinical review 76: The nature of osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(1): 1-5.
- Mardia KV, Kent JT, Bibby JM.** *Multivariate Analysis.* London, New York: Academic Press, 1997: 125-126.
- Mardia KV, Kent JT, Bibby JM.** *Multivariate Analysis.* London, New York: Academic Press, 1997: 148-149.
- Matter HP, Garrel TV, Bilderbeek U, Mittelmeier W.** Biomechanical examinations of cancellous bone concerning the influence of duration and temperature of cryopreservation. *J Biomed Mater Res* 2001; 55(1): 40-44.
- McCalden RW, McGeough JA, Court-Brown CM.** Age-related changes in the compressive strength of cancellous bone. The relative importance of changes in density and trabecular architecture. *J Bone Joint Surg Am* 1997; 79(3): 421-427.
- Melsen F, Melsen B.** The relation between densitometric and quantitative histological analysis of bone specimens from the iliac crest. *Clin Orthop* 1976; (117): 321-326.
- Mosekilde L, Mosekilde L.** Normal vertebral body size and compressive strength: relations to age and to vertebral and iliac trabecular bone compressive strength. *Bone* 1986; 7(3): 207-212.
- Mosekilde L, Viidik A, Mosekilde L.** Correlation between the compressive strength of iliac and vertebral trabecular bone in normal individuals. *Bone* 1985; 6(5): 291-295.
- Müller R, Koller B, Hildebrand T, Laib A, Gianolini S, Rügsegger P.** Resolution dependency of microstructural properties of cancellous bone based on three-dimensional μ -tomography. *Technol Health Care* 1996; 4(1): 113-119.

- Müller R, Van Campenhout H, Van Damme B, Van Der PG, Dequeker J, Hildebrand T, Rügsegger P.** Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography. *Bone* 1998; 23(1): 59-66.
- Nuccion SL, Otsuka NY, Davey JR.** The effect of freezing and intraosseous fluid on the stiffness behavior of canine trabecular bone. *Orthopedics* 2001; 24(4): 375-380.
- Ochoa JA, Heck DA, Brandt KD, Hillberry BM.** The effect of intertrabecular fluid on femoral head mechanics. *J Rheumatol* 1991; 18(4): 580-584.
- Odgaard A, Gundersen HJ.** Quantification of connectivity in cancellous bone, with special emphasis on 3-D reconstructions. *Bone* 1993; 14(2): 173-182.
- Odgaard A, Kabel J, Van Rietbergen B, Dalstra M, Huiskes R.** Fabric and elastic principal directions of cancellous bone are closely related. *J Biomech* 1997; 30(5): 487-495.
- Parfitt AM.** Trabecular bone architecture in the pathogenesis and prevention of fracture. *Am J Med* 1987; 82(1B): 68-72.
- Parfitt AM.** Implications of architecture for the pathogenesis and prevention of vertebral fracture. *Bone* 1992; 13 Suppl 2: S41-S47.
- Parfitt AM, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR.** Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 1987; 2(6): 595-610.
- 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. *J Clin Invest* 1983; 72(4): 1396-1409.
- Pereira BP, Khong KS, Ng RT.** The effect of storage at -70 degrees C and -150 degrees C on the torsion properties of the canine femur. *Ann Acad Med Singapore* 1999; 28(1): 37-43.
- Plönissen R.** Mechanische Stabilität, Mineralsalzgehalt und Histomorphometrie spongiösen Knochens. Inauguraldissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen, 1995.
- Riggs BL, Khosla S, Melton LJ, III.** A unitary model for involutional osteoporosis: estrogen deficiency causes both type I and type II osteoporosis in postmenopausal women and contributes to bone loss in aging men. *J Bone Miner Res* 1998; 13(5): 763-773.
- Rügsegger P, Koller B, Müller R.** A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture. *Calcif Tissue Int* 1996; 58(1): 24-29.
- Smit TH, Odgaard A, Schneider E.** Structure and function of vertebral trabecular bone. *Spine* 1997; 22(24): 2823-2833.
- Stromberg L, Dalen N** The influence of freezing on the maximum torque capacity of long bones. An experimental study on dogs. *Acta Orthop Scand* 1976; 47(3): 254-256.

Swartz DE, Wittenberg RH, Shea M, White AA, III, Hayes WC. Physical and mechanical properties of calf lumbosacral trabecular bone. *J Biomech* 1991; 24(11): 1059-1068.

Thomsen JS, Ebbesen EN, Mosekilde L. Relationships between static histomorphometry and bone strength measurements in human iliac crest bone biopsies. *Bone* 1998; 22(2): 153-163.

Thomsen JS, Ebbesen EN, Mosekilde L. Predicting human vertebral bone strength by vertebral static histomorphometry. *Bone* 2002; 30(3): 502-508.

Thomsen JS, Ebbesen EN, Mosekilde L. Static histomorphometry of human iliac crest and vertebral trabecular bone: a comparative study. *Bone* 2002; 30(1): 267-274.

Timm NH. Applied Multivariate Analysis. New York, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2002: 99-100, 121.

Uchiyama T, Tanizawa T, Muramatsu H, Endo N, Takahashi HE, Hara T. A morphometric comparison of trabecular structure of human ilium between microcomputed tomography and conventional histomorphometry. *Calcif Tissue Int* 1997; 61(6): 493-498.

Ulrich D, Hildebrand T, Van Rietbergen B, Müller R, Rügsegger P. The quality of trabecular bone evaluated with micro-computed tomography, FEA and mechanical testing. *Stud Health Technol Inform* 1997; 40: 97-112.

Voggenreiter G, Ascherl R, Fruh HJ, Blumel G, Schmit-Neuerburg KP. Konservierung und Sterilisation von Kortikalis – biomechanische Untersuchungen an der Ratte. *Unfallchirurg* 1995; 98(2): 53-58.

Wüster C. Klinik und Therapie der primären Osteoporose. *Metabolische Osteopathien, Handbuch für Klinik und Praxis.* New York: Schattauer Verlag 1997; 162-163.

Wittenberg RH, Moeller J, Shea M, White AA, III, Hayes WC. Compressive strength of autologous and allogeneous bone grafts for thoracolumbar and cervical spine fusion. *Spine* 1990; 15(10): 1073-1078.

Wolf AD, Akesson K. Preventing fractures in elderly people. *BMJ* 2003; 327(7406): 89-95.

7. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. W.S. Rau für die Überlassung dieses interessanten Themas und für die großzügige Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit in der Abteilung für Diagnostische Radiologie JLU-Gießen.

Herrn Dr. G. Eichner aus dem Mathematischen Institut der JLU-Gießen gilt mein Dank für die überaus hilfsbereite Unterstützung bei der Planung und der statistischen Auswertung dieser Arbeit.

Herrn Dr. T. Dreyer und Herrn F. Doenges aus dem Zentrum für Pathologie der JLU-Gießen danke ich für die wertvollen Anregungen zu dieser Arbeit und die Anfertigung der histologischen Schnittpräparate.

Frau G. Martels aus dem Zentrum für Diagnostische Radiologie der JLU-Gießen danke ich für die zuverlässige Zusammenarbeit am Mikro-Computertomographen.

Vor allem danke ich meiner Frau Michaela und meinen Kindern die mir während meiner ganzen Ausbildung und der Erstellung dieser Arbeit geduldig und hilfreich zur Seite standen.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Dirk Lommel

13.05.1967 in Gießen geboren,
verheiratet mit Michaela Lommel, Lehrerin,
zwei Kinder, Smilla(5) und Ole(2).

Berufstätigkeit

Seit Aug. 2002

Facharzt am Zentrum für Diagnostische Radiologie der JLU-Gießen

1996-2002

Assistenzarzt am Zentrum für Diagnostische Radiologie der JLU-Gießen, Prof. Dr. W.S. Rau

1995-1996

Arzt im Praktikum am Zentrum für Innere Medizin Abteilung Kardiologie und Angiologie der JLU-Gießen, Prof. Dr. Tillmans

Studium und Berufsausbildung

2002

Facharztprüfung für Diagnostische Radiologie

2002

6 Wochen Kurs am Armed forces Institut of Pathology in Washington D.C.

1995

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1994-1995

Praktisches Jahr an der Uni-Klinik Gießen, Wahlfach Neurochirurgie

1994

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1992

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

1991

Ärztliche Vorprüfung

1988

Beginn des Studiums der Humanmedizin an der JLU-Gießen

Schulbildung

1983-1986

Peter-Paul-Cahensly-Schule in Limburg

Abschluss der allg.-Hochschulreife.

1977-1983

Gesamtschule Weilmünster

1973-77

Grundschule Weilmünster

1996-1988

Zivildienst im Psychiatrischen Krankenhaus

Weilmünster