

**Etablierung eines Protokolls zur Erstellung und Simulation eines
Finite Elemente Modells aus Mikro-CT-Scans – am Beispiel eines
Kompressionstests von Mauswirbelkörpern**

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

vorgelegt von Julian Herfurth
aus Schweinfurt

Gießen 2021

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Labor für experimentelle Unfallchirurgie der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-
und Wiederherstellungschirurgie

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thaqif El Khassawna

Gutachterin: Prof. Dr. med. Gabriele A. Krombach

Tag der Disputation: 10.12.2021

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Funktionen, Aufbau und biomechanische Eigenschaften des Knochens.....	2
1.1.1	Funktionen und Aufgaben des Knochens.....	2
1.1.2	Strukturelle Zusammensetzung	3
1.1.3	Biomechanische Eigenschaften	4
1.2	Methode der Finiten Elemente.....	6
1.2.1	Allgemeines zur Methode	6
1.2.2	Kurzer Überblick über die Historie	8
1.2.3	Anwendung in Medizinforschung und Patientenversorgung	9
1.3	Tiermodelle und das 3R Prinzip.....	12
1.4	Knochenveränderungen bei autistischen Patienten.....	14
1.4.1	Allgemeines zu Autismus-Spektrum-Störungen	14
1.4.2	Erhöhtes Frakturrisiko	15
1.4.3	Gestörte Knochendichte und Mikroarchitektur	15
1.5	Zielsetzung der Arbeit.....	16
2	Material und Methoden	18
2.1	Versuchstiere und Studiendesign	18
2.2	Mikrocomputertomographie	19
2.3	Verwendete Hardware.....	20
2.4	Bearbeitung und Segmentierung der Scans	20
2.5	Bestimmung der Knochenmineraldichte.....	22
2.6	Generierung des FE Modells.....	23
2.6.1	Extraktion des Oberflächennetzes	23
2.6.2	Konversion der Oberfläche in ein FE Netz	24
2.7	Simulation eines Kompressionstests	25
2.8	Biomechanische Testung	29
2.9	Berechnung des mikroskopischen Elastizitätsmoduls	29
2.10	Statistische Auswertung	30
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Knochenmineraldichte der Wirbelkörper.....	31
3.2	Biomechanische Steifigkeit.....	33
3.3	Einfluss der bei der Simulation verwendeten Parameter auf das Ergebnis.....	35
3.4	Einfluss der bei der Netzerstellung verwendeten Parameter auf das Ergebnis sowie auf die Berechnungszeit	37
3.4.1	Einfluss der bei der Extraktion des Oberflächennetzes verwendeten Kantenlänge	37
3.4.2	Einfluss der Zahl der Volumenelemente auf das Ergebnis	38

3.4.3	Einfluss der Zahl der Tetraeder auf die Berechnungszeit	39
3.5	Ergebnisse des simulierten Kompressionstests	40
3.5.1	Von-Mises-Vergleichsspannung	40
3.5.2	Strukturkonstanten der Wirbelkörper	42
3.5.3	Errechneter mikroskopischer E-Modul	42
3.6	Protokoll zur Erstellung und Simulation von FE-Modellen	43
4	Diskussion	45
4.1	Einflüsse auf die Knochenmineraldichte	45
4.2	Biomechanische Steifigkeit	47
4.3	Beeinflussung des Simulationsergebnisses durch verschiedene Parameter	49
4.3.1	μCT-Aufnahmen und Extraktion des Oberflächennetzes	49
4.3.2	Konversion der Oberfläche in das FE Netz	50
4.3.3	Wahl des verwendeten E-Moduls	51
4.4	Von-Mises-Vergleichsspannung	52
4.5	Mittels FEM berechnete biomechanische Eigenschaften	53
4.5.1	Strukturkonstante	53
4.5.2	Mikroskopischer E-Modul	54
4.6	Unterschiede zur voxelbasierten Methode	56
4.7	Vor- und Nachteile der FEM	58
4.8	Methodenkritik und Limitationen der Arbeit	59
4.9	Fazit und Ausblick in die Zukunft	60
5	Zusammenfassung	62
6	Summary	63
7	Abkürzungsverzeichnis	64
8	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	65
8.1	Abbildungen	65
8.2	Tabellen	66
9	Literaturverzeichnis	67
10	Anhang	75
10.1	Tabellarisches Protokoll zur Erstellung und Simulation eines FE-Modells	75
10.2	Protokolliertes Vorgehen auf Video	78
11	Publikationsverzeichnis	79
12	Erklärung zur Dissertation	80
13	Danksagung	81

1 Einleitung

Die speziellen biomechanische Eigenschaften der Knochen sind für den Schutz und die Fortbewegung unseres Körpers elementar (Morgan et al. 2018). Die biomechanische Kompetenz des Knochens wird durch seine mikroskopischen/intrinsischen und makroskopischen/extrinsischen Eigenschaften, die ineinander integriert und voneinander abhängig sind, bestimmt (Forestier-Zhang & Bishop 2016). Pathologische Prozesse können durch Störung eines dieser Bereiche zu einem erhöhten Frakturrisiko führen. Um die biomechanische Kompetenz auf mikroskopischer Ebene zu untersuchen waren aufwendige Experimente wie beispielsweise die Nanoidentierung notwendig (Donnelly 2011). Durch die ursprünglich in den ingenieurstechnischen Fächern etablierte und sukzessive auch in der medizinischen Forschung angewandten Methode der Finiten Elemente (FEM) lassen sich die intrinsischen Parameter mit FE Modellen ausgehend von einem dreidimensionalen Bilddatensatz simulieren (Müller et al. 2019).

Autismus-Spektrum-Störung (A-S-S) ist eine tiefgreifende Entwicklungs- und Verhaltensstörung, die mit verschiedenen schwerwiegenden Komorbiditäten assoziiert ist und so auch zu einer bis zu 2,8-fachen Mortalitätsrate führt (Woolfenden et al. 2012). Patienten mit A-S-S haben im Vergleich zur Normalbevölkerung ein erhöhtes Frakturrisiko (Neumeyer et al. 2015), Jungen mit A-S-S weisen eine verminderte Knochendichte und veränderte Knochenarchitektur auf (Neumeyer et al. 2017). Die Ursache hierfür ist aktuell noch ungeklärt und muss weiter in präklinischer und klinischer Forschung untersucht werden.

In dieser experimentellen Arbeit sollen ausgehend von Mikro-CT-Scans FE-Modelle von Mauswirbelkörpern erstellt werden. An diesen soll im Anschluss ein Kompressionstest simuliert werden. In Korrelation mit biomechanischer Testung kann so der mikroskopische E-Modul als intrinsischer biomechanischer Parameter berechnet werden. An Nlgn-3 und Nlgn-4 KO Mäusen als akzeptiertes Modell für A-S-S soll dadurch überprüft werden, ob das Fehlen dieser Gene zu herabgesetzten biomechanischen Parametern führt.

1.1 Funktionen, Aufbau und biomechanische Eigenschaften des Knochens

1.1.1 Funktionen und Aufgaben des Knochens

Aufgrund der vielfältigen Funktionen und Aufgaben der Knochen ist das Knochenskelett essenziell für den Organismus. In diesem Kapitel soll ein grober Überblick über einige wichtige Funktionen des Knochens gegeben werden:

Stabilität, Schutz und Bewegung

Die meisten Knochen des Skeletts agieren neben ihren anderen Funktionen als Stütze für die restlichen Organe bzw. Gewebe, sie verleihen dem Körper Halt und Struktur. Damit einhergehend ist der Schutz lebenswichtiger innerer Organe wie beispielsweise des Herzens, der Lunge und des Zentralnervensystems (ZNS). Da die Knochen gleichzeitig als Ursprung und Ansatz von Muskeln, Sehnen und Bändern dienen sowie durch Gelenke miteinander interagieren ermöglichen sie die Fortbewegung aus eigener Muskelkraft. (Clarke 2008)

Hämatopoese

Das Knochenmark bietet einen geschützten Ort für die Entstehung und Reifung der Blutzellen. So entstehen in den Nischen des Knochenmarks aus multipotenten Stammzellen durch Zellteilung und Differenzierung schließlich die ausgereiften Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten. Auch die Lymphopoese beginnt im Knochenmark, die endgültige Reifung vollzieht sich dann im Thymus. Die Hämatopoese findet im Kindesalter hauptsächlich in den Diaphysen langer Röhrenknochen wie Femur und Tibia statt. Im erwachsenen Organismus hingegen findet sie zum größten Teil im Achsenskelett statt. (Taichman 2005)

Speicherfunktion für Mineralien

Aufgrund der Zusammensetzung des mineralisierten Knochengewebes aus größtenteils Hydroxylapatit ($\text{Ca}_5(\text{OH})(\text{PO}_4)_3$) bilden die Knochen den Hauptspeicher an Kalzium und Phosphat. Bei Bedarf können diese Mineralien über endokrinologische Regelkreise freigesetzt und so dem Körper zur Verfügung gestellt werden. Zusammen mit den Nieren trägt der Knochen durch Beeinflussung des Phosphathaushaltes zu der Pufferung des pH-Wertes bei. (Clarke 2008)

Endokrine Funktionen

Neben der Hormon-gesteuerten Freisetzung von Mineralien sezerniert das Knochengewebe selbst Hormone. So bilden die Osteoblasten unter anderem das Peptidhormon Osteocalcin. In Maus-Experimenten förderte Osteocalcin die Freisetzung von Insulin aus den Beta-Zellen des Pankreas und führte über die Freisetzung von Adiponectin aus Fettzellen zu einer erhöhten Insulinsensitivität. So konnte *in vivo* eine höhere Glukosetoleranz erzielt werden. (Lee et al. 2007)

1.1.2 Strukturelle Zusammensetzung

Um all die im Vorherigen genannten Funktionen bei möglichst geringem Eigengewicht gewährleisten zu können, bestehen Knochen aus zwei strukturell integrierten Komponenten:

Die außen liegende Kompakta umgibt die innen gelegene Spongiosa. Die Kompakta stellt sich homogen dar und besteht aus konzentrisch angeordneten Lamellen (Rho et al. 1998). Je nach Lokalisation des Knochens ist die Kompakta unterschiedlich breit. Die Spongiosa besteht dahingegen aus feinen Trabekeln, die sich nach dem Wolffschen Gesetz entsprechend den einwirkenden Kräften ausrichten (Wolff 1892). Zwischen den Trabekeln liegt das Knochenmark. Mikroskopisch besteht das ausgereifte Knochengewebe zum einen aus Zellen, zum anderen aus der mineralisierten Extrazellulärmatrix (EZM). Hauptbestandteil der Matrix sind Kollagenfibrillen aus überwiegend Kollagen Typ I und Hydroxylapatit. Die Kollagenfibrillen sind in Lamellen angeordnet und führen so zu einer höheren Biegefestigkeit. (Rho et al. 1998)

Für das Knochengewebe spezifische Zellen sind Osteoblasten, Osteozyten und Osteoklasten mit jeweils eigenen Aufgaben. Die Osteoblasten liegen einer bereits gebildeten knöchernen Oberfläche an und bilden durch Kollagensynthese und Steuerung der Mineralisation neue EZM. Gleichzeitig regulieren sie über die Osteoklasten den Knochenabbau. Nach Bildung des neuen Knochengewebes geht ein Teil in Apoptose, während ein anderer Teil der Osteoblasten in das Gewebe integriert wird und so zu Osteozyten differenziert. Die Osteozyten bilden ein verzweigtes Netzwerk im mineralisierten Gewebe und kommunizieren über *Gap junctions* miteinander. (Franz-Oudendaal et al. 2006)

Die großen mehrkernigen Osteoklasten liegen mit ihrer *ruffled border* der Matrix direkt an, dadurch gelingt eine Vergrößerung der Plasmamembran und so eine Steigerung des

Einleitung

Knochenabbaus. Für den Abbau sezernieren Osteoklasten zunächst Säuren, die zur Auflösung der anorganischen Mineralverbindungen führen. Durch Sekretion lysosomaler Enzyme wird die organische Matrix dann abgebaut und im Anschluss phagozytiert. Osteoblasten und -klasten stehen miteinander in Verbindung und regulieren so den kontinuierlich stattfindenden Knochenumbau (*remodeling*). (Teitelbaum 2000)

Es existiert ein Zusammenspiel von Liganden und Rezeptoren wie das RANKL-OPG-Gleichgewicht: Die Osteoklasten können über den *receptor activator of nuclear factor- κ B* (RANK) mit dem auf der Membran des Osteoblasten sitzenden RANK-Ligand (RANKL) aktiviert werden. Durch das sezernierte Protein Osteoprotegerin (OPG) kann der Osteoblast die Wirkung des RANKL blockieren. Über dieses Gleichgewicht können Hormone auf den Knochenstoffwechsel einwirken. (Kim et al. 2020)

1.1.3 Biomechanische Eigenschaften

Mechanische Anforderungen an die mikrostrukturelle Zusammensetzung und den Knochen als Ganzes sind enorm. Je nach Lokalisation muss der Knochen, z.B. beim Abfedern eines Sprunges ein Vielfaches des Körpergewichtes tragen ohne zu frakturieren. Er muss im gewissen Maße elastisch sein um Biegespannung zu kompensieren, gleichzeitig muss er jedoch hart genug sein um seine Schutzfunktion ausüben zu können und dem Organismus Stabilität zu verleihen. Zudem muss er sich dynamisch den individuellen mechanischen Belastungen anpassen. Diese Funktionen müssen bei möglichst geringem Eigengewicht gewährleistet werden. Um all dies zu ermöglichen, haben Knochen besondere biomechanische Eigenschaften. (Morgan et al. 2018)

Diese lassen sich in intrinsische und extrinsische Eigenschaften untergliedern und sind voneinander abhängig. Sie können durch unterschiedliche experimentelle Testungen untersucht werden. Kommt es durch pathologische Prozesse zu Beeinträchtigungen in einem dieser Bereiche kann der Knochen den mechanischen Beanspruchungen nicht mehr standhalten, was wiederum zu einer höheren Frakturneigung führt.

Extrinsische Eigenschaften beschreiben das Verhalten des Knochen als Ganzes auf mechanische Einwirkungen. Etablierte Methoden um diese Eigenschaften zu charakterisieren sind Kompressionstests an Wirbelkörpern oder 3-Punkt-Biegeversuche an langen Röhrenknochen. Extrinsische oder makroskopische biomechanische Eigenschaften setzen sich aus den intrinsischen Parametern des Materials sowie des

Einleitung

makroskopischen Aufbaus des Knochens zusammen. Wichtige Parameter hierfür sind die Steifigkeit und die maximale Traglast. Die extrinsische Steifigkeit setzt sich aus den intrinsischen Eigenschaften und der Mikroarchitektur des Knochens zusammen und entspricht der Steigung des linearen Parts des im biomechanischen Test erstellten Kraft-Verformungsdiagramms. Die maximale Traglast ist der Punkt während eines Tests, bei dem der Knochen bricht, also die maximale Kraft, die der Knochen aushalten kann. Die Traglast korreliert mit der Steifigkeit. (Forestier-Zhang & Bishop 2016)

Intrinsische Eigenschaften werden durch die Zusammensetzung des Knochengewebes auf mikroskopischer Ebene bestimmt. Einfluss darauf haben unter anderem der Grad der Mineralisation, der über Knochendichtemessungen abgeschätzt werden kann, sowie Zusammensetzung und Qualität der Kollagenfibrillen und der mikroskopische Aufbau der Knochenlamellen. Ein wichtiger Parameter für die intrinsischen Eigenschaften ist der mikroskopische Elastizitätsmodul (E-Modul). Dieser Wert gibt an wie elastisch ein Material ist. Je niedriger der Wert, desto elastischer ist das Material, desto weniger Kraft wird benötigt um das Material zu verformen (z.B. ein Gummiband). Ein Material mit einem hohen E-Modul (z.B. Granit) ist dahingegen steifer und lässt sich kaum verformen. Ein steifes Material kann dafür nur in sehr geringem Umfang Energie absorbieren ohne zu zersplittern. Knochengewebe muss folglich in einem Gleichgewicht zwischen Elastizität und Starrheit stehen. (Forestier-Zhang & Bishop 2016)

Die Auswirkungen von pathologischen Veränderungen auf die mikroskopischen biomechanischen Parameter zu untersuchen rückt immer weiter in den Fokus der Forschung. Eine Methode hierfür stellt beispielsweise die Nanoidentierung dar. Dabei wird eine kleine Prüfspitze in das Material, im Falle von Knochen in einen Trabekel, eingeführt und gleichzeitig die benötigte Kraft und Eindringtiefe gemessen, woraus sich schließlich der E-Modul berechnen lässt (Donnelly 2011). Neben dieser aufwendigen und spezielles Equipment fordernden Methode, bieten durch hoch auflösende μ CT-Aufnahmen erstellte Finite Elemente-Modelle eine weitere Möglichkeit den mikroskopischen E-Modul zu bestimmen. Mit dieser Methode konnten bereits in einem Rattenmodell signifikante Verringerungen des mikroskopischen E-Moduls im osteoporotischen Knochen beobachtet werden (Müller et al. 2014).

1.2 Methode der Finiten Elemente

1.2.1 Allgemeines zur Methode

Die Methode der Finiten Elemente (FEM) ist ein diskretes, numerisches Verfahren zur Simulation und approximativen Lösung von physikalischen Fragestellungen in Bezug auf ein Objekt. Dabei wird ein Körper, der zu komplex für die explizite mathematische Berechnung ist, in ein Netz, bestehend aus einer endlichen Zahl an Elementen, zerlegt. Dieses Verfahren wird als „Diskretisierung“ bezeichnet und ist sowohl im zweidimensionalen als auch im dreidimensionalen Raum möglich. Die einzelnen Elemente sind an ihren Randpunkten (Knoten) miteinander verbunden. Durch das Erstellen und Lösen von Differenzialgleichungssystemen können Parameter wie Kräfte und Verschiebungen an den Knoten simuliert bzw. berechnet werden. Dadurch sind Aussagen zur (bio-)mechanischen Kompetenz eines Materials möglich. Die Kräfte an den Knoten befinden sich dabei in einem Gleichgewichtszustand, bei dem die Summe aller Kräfte 0 ist. Durch das Auftragen von neuen Randbedingungen auf vorher bestimmte Knoten, z.B. eine Verformung auf die obersten Knoten, kann das FE Programm die resultierenden Kräfte und Verformungen in den übrigen Knoten *in silico* berechnen. (Zienkiewicz et al. 2013)

Das Verfahren ist eine Approximation des wahren Ergebnisses. Für die Genauigkeit ist der Grad der Diskretisierung bestimmend. Je kleiner die einzelnen Elemente sind, also je feiner das Netz ist, desto genauer ist das simulierte Ergebnis. Mit der Anzahl der Elemente steigt jedoch auch der Rechenaufwand. Das Ziel der Erstellung eines FE Modells ist ein möglichst feines Netz mit so wenigen Elementen wie möglich ohne Beeinträchtigung der Genauigkeit zu erzeugen. Hierfür gibt es leistungsfähige Algorithmen und spezielle Softwarelösungen. (Knothe & Wessels 2017)

Um ein passendes dreidimensionales FE Netz zu generieren, gibt es je nach Problemstellung mehrere Wege, die im Folgenden kurz erläutert werden:

- Virtuelle Konstruktion eines Objektes (z.B. Bauteil) mittels *computer-aided design* (CAD) und nachfolgende Vernetzung („*Meshing*“) (Abbildung 1). Dieses Verfahren kommt ursprünglich aus den angewandten ingenieurtechnischen Fächern und wird sukzessiv weiter auf medizinische Fragestellungen angewandt.

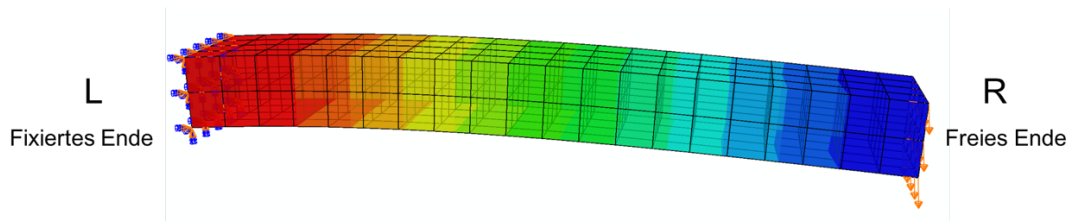


Abbildung 1: Mittels CAD konstruierter Balken unter Punktbiegung.

Der Balken wurde in einem CAD-Programm konstruiert, anschließend wurden die Randbedingungen aufgetragen: Der Balken ist auf der linken Seite (L) fixiert, die Punkte der rechten Seite (R) stehen unter Kompressionskraft nach unten. Die schwarzen Linien markieren die Kanten der hexaedrischen Elemente. Deren Ecken entsprechen den Knoten an denen die Kräfte und Verformungen berechnet werden. Die Verteilung der Mises Vergleichsspannung ist farblich gekennzeichnet. Die Höhe der Spannung nimmt rechts nach links zu.

- Vernetzung eines realen Objektes anhand von dreidimensionalen Bilddaten (z.B. CT-Scans). Dieses Verfahren wird hauptsächlich bei komplizierten, asymmetrischen Geometrien wie beispielsweise Knochen angewandt (Abbildung 2). Bei diesem Verfahren gibt es zwei unterschiedliche Vorgehensweisen, die nachfolgend dargestellt werden.
 - *Voxel based meshing*: Die dreidimensionalen Volumenelemente der Bilddaten („Voxel“) können direkt in gleich große hexaedrische Elemente konvertiert werden. Die Elementgröße und -anzahl ist durch die Voxelgröße vorgegeben. Der Objektrand ist aufgrund der Kanten der Voxel sehr uneben.
 - *Surface based meshing*: Zuerst wird die Oberfläche des Objektes virtuell extrahiert und als Netz aus Dreiecken dargestellt, in einem zweiten Schritt wird der entstandene Hohlraum schließlich mit den finiten Elementen gefüllt. Dies ermöglicht eine Änderung der Art und Größe der Elemente, was zu einer Optimierung der Rechenzeit führt. Gleichzeitig sind die Randflächen glatter.

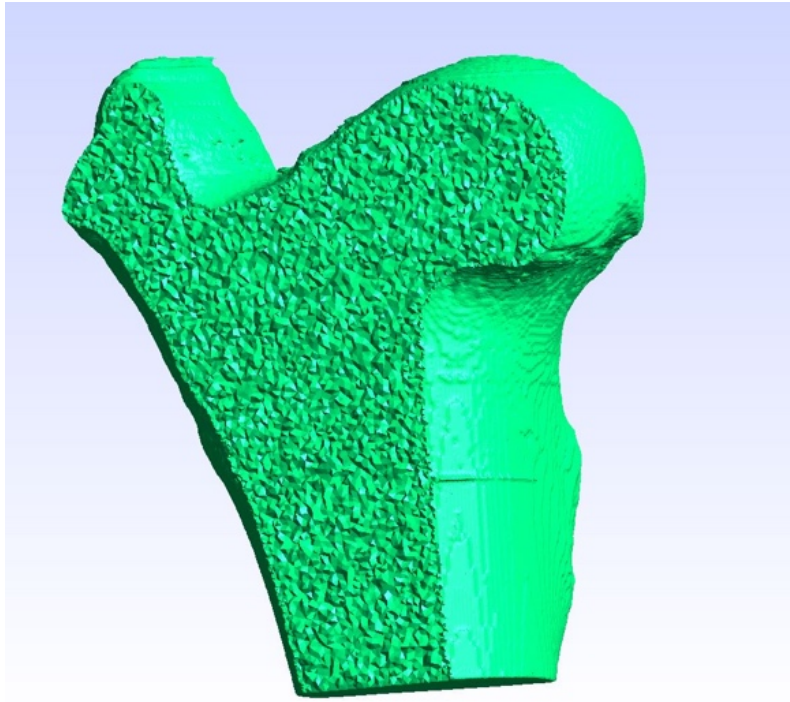


Abbildung 2: Aus CT-Aufnahmen erstelltes FE-Modell eines Femurkopfes. Zuerst wurde die Oberfläche eines Femurs vom Schaf aus CT-Aufnahmen extrahiert und im Anschluss mittels surface based meshing als FE-Netz aus Tetraedern dargestellt. Zur Veranschaulichung wurde das Modell in der sagittalen Ebene halbiert so dass die Tetraeder im Inneren sichtbar werden.

1.2.2 Kurzer Überblick über die Historie

Theoretische Überlegungen und Verfahren auf denen die FEM aufbaut, entstanden schon im 19. Jahrhundert. Als Beispiel sei hier die Arbeit „*Die Fundamentalgleichungen der Theorie der Elastizität fester Körper, hergeleitet aus der Betrachtung eines Systems von Punkten, welche durch elastische Streben verbunden sind*“ von Ernst G. Kirsch genannt (Kirsch 1868). Diese Gleichungen wiederum entstanden auf dem Boden der Festigkeitslehre, die unter anderem von Bernoulli und Euler schon Jahrhunderte zuvor geprägt wurden. (Knothe & Wessels 2017)

Erste praktische Anwendung und Namensgebung der Methode wurden maßgeblich von Ray W. Clough beeinflusst. Dieser arbeitete in den 1950er-Jahren unter Jon Turner bei dem US-amerikanischen Luft- und Raumfahrtunternehmen Boeing an einem mathematischen Modell für Vibrationsanalysen von Flugzeugtragflächen. Dafür benutzte Clough ein Netz aus Dreiecken um die Außenhülle des Flügels zu modellieren. Er stellte fest, dass seine Ergebnisse erstaunlich gut mit den Ergebnissen des physischen Modells übereinstimmten. Je kleinere Dreiecke er benutzte, desto genauer war die Übereinstimmung. Diese Ergebnisse veröffentlichte er zusammen mit Turner, was später

Einleitung

als das erste FEM-Paper bezeichnet wurde (Turner et al. 1956). Clough arbeitete weiter an der Methode und veröffentlichte zahlreiche Paper. 1960 benutzte er erstmals den Begriff *Finite Elemente* (Clough 1960).

Durch die rasante Entwicklung in der elektronischen Datenverarbeitung sowie neuer benutzerfreundlicher Programme, fand die Methode in den nachfolgenden Jahren breite Anwendung, vor allem in den ingenieurstechnischen Fächern. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist das 1972 eröffnete Münchner Olympiastadion, für dessen Dachkonstruktionsplanung die FEM benutzt wurde (Tomlow 2016).

Neben der oben genannten Luft- und Raumfahrtindustrie war und ist die Automobilindustrie ein Bereich, in dem die Methode breit angewendet wurde und wird. Dort helfen die Simulationen den Materialverbrauch, beispielsweise bei Crash-Tests, zu reduzieren und dadurch Kosten zu sparen.

Sukzessive folgten die Anwendung in naturwissenschaftlichen Bereichen sowie in der Medizinforschung.

1.2.3 Anwendung in Medizinforschung und Patientenversorgung

Die FEM wird heutzutage immer breiter in der Forschung verschiedenster medizinischer Fachbereiche eingesetzt und etabliert. Von der Analyse der Stressverteilung in der Wand von Aortenaneurysmen (Plonek et al. 2017) über das elastische Verhalten der weißen Hirnsubstanz beim Eindrücktest (Samadi-Dooki et al. 2018) bis hin zur Untersuchung möglicher Schädeltraumen durch einen Cricket-Ball (Mohotti et al. 2018).

Die meisten FEM Paper findet man jedoch in den Bereichen Unfallchirurgie, Orthopädie, Zahnheilkunde sowie Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie. Dort liegt der Fokus zum einen auf Analysen der Stressverteilung in Implantaten oder Prothesen und des umgebenden Knochens. Durch die daraus gewonnenen Erkenntnisse können die Implantate mit Hilfe von CAD verändert und optimiert werden (Geramizadeh et al. 2018). Ein weiterer Schwerpunkt liegt in der Simulation von biomechanischen Testungen um unter anderem die Steifigkeit oder Bruchfestigkeit von Knochen im Kontext verschiedener Erkrankungen zu testen (Nyman et al. 2015). Auch für die Erforschung von Sportverletzungen bietet die FEM neue Möglichkeiten. Möchte man beispielsweise den Schaden eines Treffers mit dem Cricket-Ball analysieren, lässt sich dies zum einen aus ethischen Gründen nicht an Tieren durchführen. Zum anderen ist es experimentell

Einleitung

kaum möglich reproduzierbare Bedingungen (z.B. Geschwindigkeit, Ort des Einschlages) zu schaffen.

Zusätzlich zum Einsatz der Methode zur Forschung rückt die Gewinnung von patientenspezifischen Modellen zur klinischen Versorgung immer weiter in den Vordergrund. An diesen Modellen lassen sich dann personalisierte Vorhersagen, beispielsweise bezüglich des individuellen Frakturrisikos, treffen. Die Schritte zur Erstellung eines patientenspezifischen Modells sind in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Zur Generierung eines FE Modells für den experimentellen Bereich kann analog vorgegangen werden.

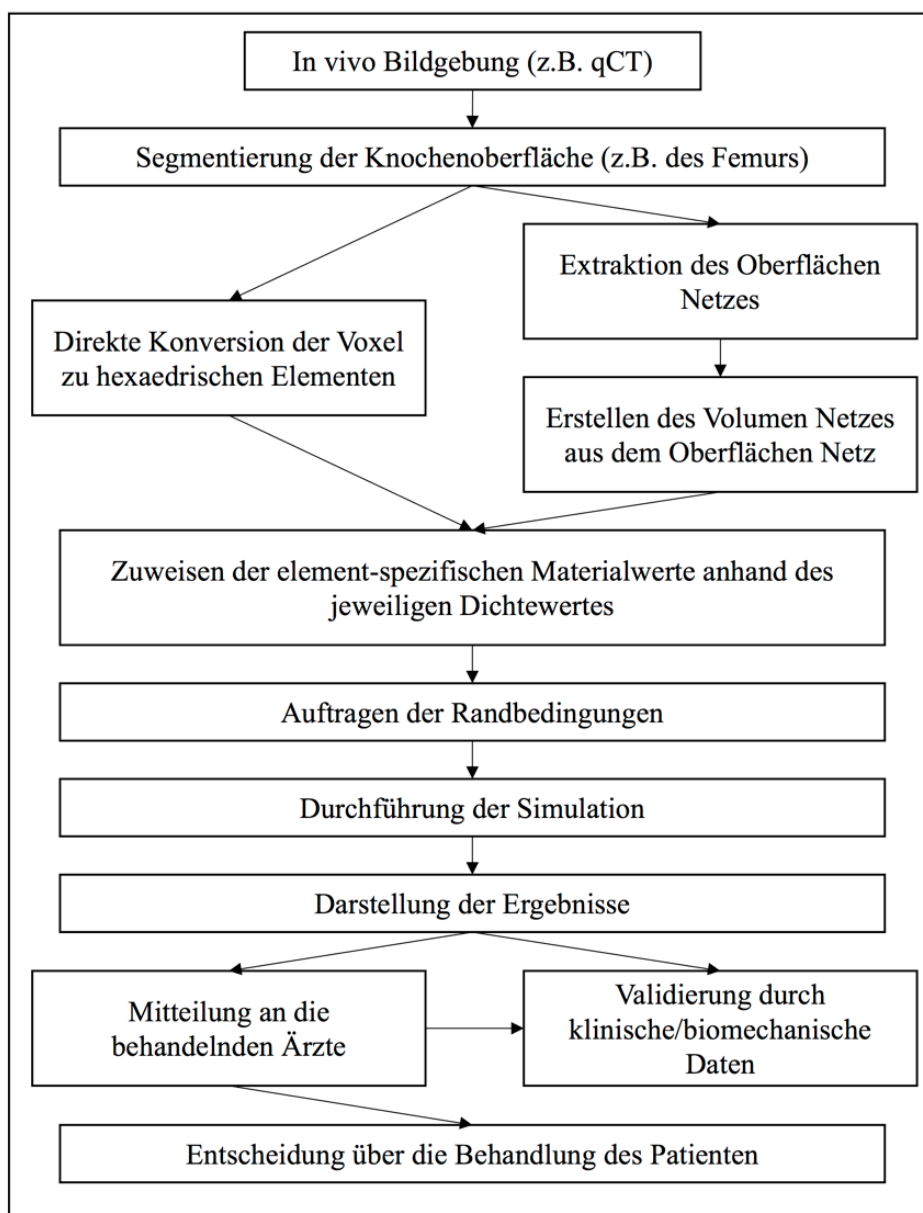


Abbildung 3: Schritte zur Erstellung eines patientenspezifischen FE Modells.

Einleitung

An erster Stelle steht die Akquisition eines hochaufgelösten dreidimensionalen Bilddatensatzes (z.B. mittels CT). Dieser Datensatz muss danach bearbeitet und segmentiert werden, so dass er im Anschluss zu einem 3D-FE Netz verarbeitet werden kann. Diesem FE Netz werden dann die jeweiligen patientenspezifischen Parameter (z.B. Knochendichte) und die Randbedingungen übergeben. Damit kann nun die Simulation durchgeführt werden. Die Ergebnisse können dann mit weiteren Untersuchungen korreliert und validiert werden, so dass die behandelnden Ärzte dann in Zusammenschau aller Untersuchungen eine Entscheidung über die Behandlung des Patienten treffen können.
(Modifiziert nach Poelert et al. 2013)

Bis vor kurzem dienten zur Abschätzung des Frakturrisikos hauptsächlich die mittels *Dual Energy X-ray Absorptiometry* (DXA) oder quantitativer Computertomographie (qCT) gewonnenen Dichtewerte des Knochens. Abweichungen dieser Werte vom Normwert der Bevölkerung, bzw. der gleichaltrigen Vergleichsgruppe, können als Vielfaches der Standardabweichung in dem T-, bzw. Z-Wert erfasst werden. Die Stabilität des Knochens hängt jedoch nicht nur von seiner Dichte oder dem Calciumgehalt, sondern auch von seinen geometrischen Eigenschaften ab. Dies kann durch patientenspezifische FE Modelle berücksichtigt werden. Gleichzeitig wird die mittels qCT gemessene Dichte mit den elastischen Eigenschaften der Elemente durch mathematische Formeln in Relation gesetzt. So berücksichtigen die FE Modelle zusätzlich zur Dichte die geometrischen Eigenschaften. (Viceconti et al. 2018)

Mehrere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass patientenspezifische FE Modelle eine höhere Vorhersagequalität bezüglich Schenkelhalsfrakturen aufweisen als die bisher verwendeten DXA oder qCT Messungen, auch wenn es methodologisch bedingte Unterschiede zwischen den Studien gab (Cody et al. 1999; Johannesdottir et al. 2017; van den Munckhof & Zadpoor 2014; Viceconti et al. 2018).

Die Akquisition des benötigten hochaufgelösten Bilddatensatzes bedeutet zwar eine höhere Strahlenbelastung. Eine Risiko-Nutzen-Analyse von Viceconti et al. verglich die, für die Erstellung des Modells, notwendigerweise höhere Strahlenbelastung mit der Reduktion der Mortalität der Schenkelhalsfraktur. Die Mortalitätsreduktion durch rechtzeitige Behandlung und dadurch verhinderte Frakturen mit deren Folgen beträgt nach den Berechnungen der Gruppe 0,0784 %, wohingegen die Wahrscheinlichkeit an einem, durch die leicht erhöhte Strahlenbelastung induziertem, Tumor zu versterben mit 0,0080 % wesentlich niedriger ist. Somit ergab sich ein positives Nutzen-Risiko-Verhältnis (Viceconti et al. 2018).

Wird für die Erstellung des Modells ein kommerzieller Service, wie beispielsweise CT2S des Insigneo Instituts (Universität von Sheffield, UK), benutzt, führt die Klinik die qCT

Scans durch, schickt anschließend die DICOM Dateien online an den Dienstleister und bekommt normalerweise binnen 48 Stunden das Ergebnis der FE Analyse. Dieser Vorgang war in einer britischen Untersuchung noch nicht kosteneffizient. Mit weiterer Forschung in diesem Bereich und sinkenden Kosten für die Analyse, beispielsweise durch automatisierte Generation des Modells, kann sich dies ändern und die Methode kann standardmäßig zur Evaluierung des Frakturrisikos verwendet werden. (Viceconti et al. 2018)

1.3 Tiermodelle und das 3R Prinzip

Für die präklinische Forschung ist es vielfach notwendig Versuche an Tieren als Modellorganismen durchzuführen. Hierfür werden häufig sogenannte Knockout (KO) Mäuse, bei denen bestimmte Gene inaktiviert wurden, eingesetzt. Da vielen Krankheiten als Ursache eine Inaktivität oder Fehlfunktion verschiedener Gene zu Grunde liegt, eignen sich Knockout Mäuse hervorragend diese Krankheit nachzubilden und dadurch Rückschlüsse auf Pathogenese oder mögliche Therapieoptionen zu ziehen. Gleichzeitig wird durch die Verwendung von KO Mäusen eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet, da die Mäuse, im Gegensatz zu Patienten, die an der Krankheit leiden, unter festgelegten identischen Bedingungen aufwachsen. (Braun & Willnow 1996)

Aus moralischer Sicht sollen Tierexperimente jedoch auf ein nötiges Minimum begrenzt werden und möglichst schonend für die eingesetzten Lebewesen sein. Im Jahr 1959 veröffentlichten die Briten William Russel und Rex Burch in ihrem Buch „*The principles of humane experimental technique*“ das 3R Prinzip. Die 3R stehen im Original für **Replacement**, **Reduction** und **Refinement**. Im Folgenden wird erklärt, was die drei Schlagwörter bedeuten und wie sie umgesetzt werden können. (Russell & Burch 1959)

- **Replacement** (Vermeidung): Tierversuche sollen möglichst vermieden und durch andere Methoden ersetzt werden. Dies kann unter anderem durch den Einsatz von *in vitro* Zellkultur, einfacheren Lebewesen (z.B. Bakterien) sowie Simulationen am Computer erreicht werden.
- **Reduction** (Verringerung): Die Zahl der verwendeten Tiere soll auf ein Minimum begrenzt werden. Dies gelingt durch Optimierungen bei der Versuchsplanung, der statistischen Auswertung und durch einen besseren Datenaustausch zwischen einzelnen Gruppen.

Einleitung

- *Refinement* (Verbesserung): Das Wohlbefinden der Tiere muss geachtet werden. Dies setzt eine artgerechte Haltung in genügend großen Gehegen voraus. Weiterhin sollen die nötigen Untersuchungen, beispielsweise durch den richtigen Einsatz von Narkose, möglichst belastungsarm durchgeführt werden. Die Tiere sollen stressfrei gehalten werden und möglichst nicht leiden.

Trotz der schon etwa 60 Jahre zurückliegenden Veröffentlichung, sind diese Prinzipien aktueller denn je. Die 3R Richtlinien sind heutzutage sowohl in nationalen, wie auch in internationalen Gesetzen verankert. Als Beispiel sei hier die Tierversuchsrichtlinie 2010/63/EU genannt. Weiterhin gibt es mittlerweile einen Bereich der Forschung, der sich explizit um die Verbesserung der Tierversuche und die Entwicklung neuer Methoden als Ersatz für Tiermodelle im Sinne des 3R Prinzips kümmert. Auch das Land Hessen zusammen mit der Universität Gießen leisten dafür einen Beitrag. So wurde im Oktober 2017 mit Hilfe von Landesmitteln ein interdisziplinäres 3R Zentrum, dessen Ziele die Vermeidung sowie Verbesserung der Tierversuche sind, an der Justus-Liebig-Universität Gießen etabliert (Pressemitteilung Nr. 177 der JLU Gießen, 2017).

Zur Forschung über das Krankheitsbild des Autismus werden beispielsweise Neuroligin-3 bzw. Neuroligin-4 (Nlgn-3; Nlgn-4) KO Mäuse verwendet. Diese Gene liegen auf dem X-Chromosom und kodieren die entsprechenden Proteine. Neuroligine sind zelluläre Adhäsionsproteine, die an der postsynaptischen Membran lokalisiert sind. Sie interagieren mit den präsynaptischen Neurexinen und vermitteln dadurch die Ausbildung und Aufrechterhaltung neuer Synapsen zwischen Nervenzellen. Dieser Vorgang ist Voraussetzung für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des neuronalen Netzwerkes des Gehirns. (Varoqueaux et al. 2006)

Das Fehlen dieser Proteine ist eine häufige Ursache für das monogenetische Entstehen von autistischen Erkrankungen. Aus diesen Gründen sind Nlgn-3, bzw. Nlgn-4 KO Mäuse ein akzeptiertes Tiermodell zur Erforschung von autistischen Erkrankungen. (El-Kordi et al. 2013)

1.4 Knochenveränderungen bei autistischen Patienten

1.4.1 Allgemeines zu Autismus-Spektrum-Störungen

Bevor auf die Knochenveränderungen bei Personen mit Autismus eingegangen wird, soll in diesem Kapitel ein Überblick über das Krankheitsbild gegeben werden.

Autismus, klinisch und im aktuellen *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition* (DSM-5) zu Autismus-Spektrum-Störungen (A-S-S) zusammengefasst (American Psychiatric Association 2013), ist eine heterogene, tiefgreifende Entwicklungs- und Verhaltensstörung mit einer weltweiten medianen Prävalenz der Gesamtbevölkerung von ungefähr 0,60 % (Elsabbagh et al. 2012). Das männliche Geschlecht ist dabei je nach Ausprägung des Krankheitsbildes ca. 2- bis 5-mal häufiger als das weibliche betroffen (Lai et al. 2014). Die Krankheit ist durch frühzeitig auftretende Schwierigkeiten in der sozialen Interaktion und durch repetitive, stereotypische Aktionen und Verhalten gekennzeichnet. Zu diesen zwei Hauptsymptomen können noch unterschiedliche zusätzliche Symptome, wie eine abnormale Sprachentwicklung und ängstliches oder aggressives Verhalten, hinzukommen (American Psychiatric Association 2013). Aufgrund dieser variablen Ausprägungen spricht man von Autismus-Spektrum-Störungen. Häufige mit A-S-S assoziierte Komorbiditäten sind unter anderem Epilepsie, Immundysregulation sowie paranoide und schizoide Persönlichkeitsstörung. (Lai et al. 2014)

Patienten mit A-S-S weisen auch aufgrund der auftretenden Komorbiditäten eine 2,8-fache standardisierte Mortalitätsrate auf (Woolfenden et al. 2012).

Die Diagnose wird mittels strukturierten Fragebögen beim Großteil der Patienten bereits im Kindesalter gestellt. Die Pathogenese ist noch nicht abschließend geklärt. Aufgrund familiärer Häufung und Zwillingsstudien liegen genetische oder Umwelt-bezogene Ursachen nahe (Bailey et al. 1995). Mehr als 100 Gendefekte stehen unter Verdacht, einen Zusammenhang mit der Entstehung von A-S-S zu haben (Betancur 2011). Auch viele syndromale Erkrankungen sind mit der Entstehung von A-S-S assoziiert. Einige Beispiele hierfür sind: Fragiles-X-Syndrom (21-50% der Betroffenen haben autistische Störungen), Timothy-Syndrom (60-70%), Down-Syndrom (5-39%), Angelman-Syndrom (50-81%) (Benvenuto et al. 2009; Moss & Howlin 2009). Diese Heterogenität in der Entstehung kann auch die unterschiedlichen Ausprägungen des Krankheitsbildes erklären. (Lai et al. 2014)

Einleitung

Die Therapie sollte individualisiert und multidisziplinär sein. Medikamente spielen dabei eine untergeordnete Rolle und werden vorrangig zur Behandlung der Komorbiditäten eingesetzt. Stattdessen nimmt die Verhaltenstherapie einen großen Raum ein. Gleichzeitig soll den Patienten ein passendes Umfeld geschaffen und die Eltern im Umgang mit der Erkrankung geschult werden. Die Versorgung der Patienten stellt aufgrund der unterschiedlichen Bedürfnisse bei verschiedenen Ausprägungen und Komorbiditäten eine Herausforderung für die Angehörigen und das Gesundheitssystem dar. (Lai et al. 2014)

1.4.2 Erhöhtes Frakturrisiko

Eine von Neumeyer et al. im Jahr 2015 veröffentlichte US-amerikanische Studie kam zu dem Ergebnis, dass Kinder sowie Erwachsene mit A-S-S ein, im Vergleich zur Normalpopulation, signifikant erhöhtes Risiko für Frakturen aufweisen. Als Grundlage für die Studie diente die nationale Datenbank für Notaufnahmebesuche in den USA. Kinder und junge Erwachsene im Alter von 3 bis 22 Jahren mit A-S-S wiesen dabei ein höheres Risiko für Schenkelhalsfrakturen auf (Odds-Ratio (OR) 3,33; $p < 0,0001$). Erwachsene im Alter von 23 bis 50 Jahren mit A-S-S wiesen ebenfalls ein höheres Risiko für Schenkelhalsfrakturen auf (OR 11,7; $p < 0,0001$). Erwachsene Frauen mit A-S-S hatten zusätzlich ein höheres Risiko für Frakturen der oberen Extremität (OR 2,27; $p = 0,0038$) sowie Wirbelkörperfrakturen (OR 10,61; $p = 0,0034$). (Neumeyer et al. 2015)

1.4.3 Gestörte Knochendichte und Mikroarchitektur

Als mögliche Erklärung für das höhere Frakturrisiko geben Neumeyer et al. eine verminderte Knochenmineraldichte (*bone mineral density*, BMD) mit gleichzeitig gestörter Mikroarchitektur an. So konnte belegt werden, dass Jungen im Alter zwischen 9 und 18 Jahren mit A-S-S eine geringere BMD als altersgleiche gesunde Kinder besitzen. Die BMD wurde mittels DXA und qCT Scans bestimmt. Die mittlere kortikale, volumetrische BMD des distalen Radius bei Jungen ohne A-S-S betrug 680,9 mgHA/cm³, bei Jungen mit A-S-S 639,1 mgHA/cm³, dies entspricht einer Differenz von 41,8 mgHA/cm³ ($p = 0,075$). Neben der BMD ist die Mikroarchitektur des Knochens entscheidend für die Festigkeit. Hier betrug die mittlere Dicke der Trabekel im distalen Radius bei gesunden Jungen 0,070 mm, bei Jungen mit A-S-S 0,063 mm. Dies entspricht einer signifikanten Differenz von 0,007 mm ($p = 0,004$). Die mittels FEM gewonnene

Differenz der Drucksteifigkeiten des distalen Radius zwischen gesunden und an A-S-S erkrankten Jungen betrug 13 kN/mm zugunsten der Kontrollgruppe ($p=0,030$). Als mögliche Ursachen für diese Unterschiede gaben die Autoren der Studie eine verminderte sportliche Aktivität, verminderte Kalziumaufnahme sowie ungenügendes Ansprechen auf Wachstum stimulierende Hormone an. (Neumeyer et al. 2017)

Auch andere neurodegenerative oder systemische Erkrankungen gehen mit einer signifikant schlechteren Knochenqualität einher. Beispiele hierfür sind unter anderem Morbus Parkinson (Torsney et al. 2014) und Neurofibromatose Typ 1 (Kühnisch et al. 2014).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Um intrinsische biomechanischen Eigenschaften des Knochengewebes zu untersuchen, gibt es mehrere Methoden. Eine davon stellt die FEM dar. In dieser Arbeit soll ein strukturiertes Vorgehen entwickelt werden, um aus μ CT-Aufnahmen ein FE-Modell zu erstellen und an diesem Modell eine Simulation durchzuführen.

Als Beispiel dienen μ CT-Scans von Wirbelkörpern aus Wildtyp (WT)- und Nlgn-3, bzw. Nlgn-4 KO Mäusen als akzeptiertes Modell für Autismus. Durch Skalierung der simulierten Ergebnisse auf das im biomechanischen Kompressionstest erhaltene Ergebnis soll der mikroskopische E-Modul des Knochengewebes bestimmt werden.

Menschen, die an einer Autismus-Spektrum-Störung leiden, weisen signifikant häufiger Frakturen sowie eine geringere Knochendichte, bzw. eine gestörte Mikroarchitektur auf. Die Ursache dafür ist noch nicht geklärt. Mittels den erstellten FE Modellen sollen die intrinsischen biomechanischen Eigenschaften simuliert werden und unter der Hypothese, dass Mäuse mit Autismus eine suboptimale biomechanische Kompetenz und einen niedrigeren mikroskopischen E-Modul aufweisen als Wildtyp Mäuse, verglichen werden. Gleichzeitig sollen die Ergebnisse der Simulation mit den biomechanischen Testungen verglichen werden und auf Plausibilität geprüft werden.

Da die FEM für die Experimentelle Unfallchirurgie Gießen eine neue Methode darstellt, wird das Vorgehen unter anderem auf Video dokumentiert. Dadurch wird eine hohe Reproduzierbarkeit gewährleistet. Gleichzeitig soll diese Dissertation als Vorlage für weitere Arbeiten in diesem Forschungsfeld dienen. Die routinemäßige Anwendung der FEM soll langfristig dafür sorgen, dass die Anzahl der benötigten Tiere im Sinne des 3R-Prinzips reduziert wird.

Einleitung

Die verschiedenen Meilensteine dieser Arbeit sind:

- Etablierung eines Workflows zur Erstellung eines FE Modells aus μ CT-Scans von Mauswirbelkörpern.
- Quantifizierung des Einflusses verschiedener Parameter auf das Ergebnis der Simulationen.
- Simulation eines Kompressionstests mit den Wirbelkörpern der drei Gruppen.
- Berechnung des mikroskopischen E-Moduls mithilfe von Daten aus biomechanischen Testungen und den Ergebnissen der FEM.
- Vergleich der durch die Simulation berechneten Parameter der drei Gruppen unter der Hypothese, dass Mäuse mit Autismus eine suboptimale biomechanische Kompetenz und einen niedrigeren mikroskopischen E-Modul aufweisen als die gesunde Kontrollgruppe.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Studiendesign

Die Wirbelkörper der WT- und KO-Mäuse wurden vom Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin in Göttingen zur Verfügung gestellt. Dort wurden die Mäuse gezüchtet, euthanasiert und im Anschluss das Zentralnervensystem untersucht, so dass das Skelettsystem übrig blieb. Bei den verwendeten Tieren handelte es sich um männliche C57BL/6J Mäuse im Alter von durchschnittlich 12 Wochen. Durch eine *loss of function* Mutation in den Nlgn-3 (lokalisiert auf dem X-Chromosom an Stelle Xq 13.1) bzw. Nlgn-4 (lokalisiert auf dem X-Chromosom an Stelle Xp 22.3) Genen fehlten die synaptischen Adhäsionsmoleküle Neuroligin- 3 bzw. 4. Dadurch zeigten die KO-Tiere in verschiedenen verblindet durchgeführten Verhaltenstests abnorme soziale Interaktionen und Verhalten, die stark an Personen mit Autismus-Spektrum-Störungen erinnerten. Unter anderem aus diesem Grund gelten Nlgn-3 und Nlgn-4 KO-Mäuse als ein akzeptiertes Modell für monogenetische Formen der A-S-S. (Jamain et al. 2008; Varoqueaux et al. 2006)

In zwei Chargen wurden L1 und L2 Wirbelkörper von insgesamt 23 Tieren entnommen. Die genaue Aufteilung ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Verteilung der verwendeten Tiere

Charge	WT	Nlgn-3 KO	Nlgn-4 KO
1	1	0	3
2	9	5	5
Gesamtanzahl:	10	5	8

Die L1 Wirbelkörper waren für die biomechanische Testung bestimmt, wohingegen die L2 Wirbelkörper mittels μ CT untersucht wurden und anschließend der histologischen Aufarbeitung zugeführt wurden. Aus den μ CT Aufnahmen entstanden die FE- Modelle und Analysen. (Abbildung 4)

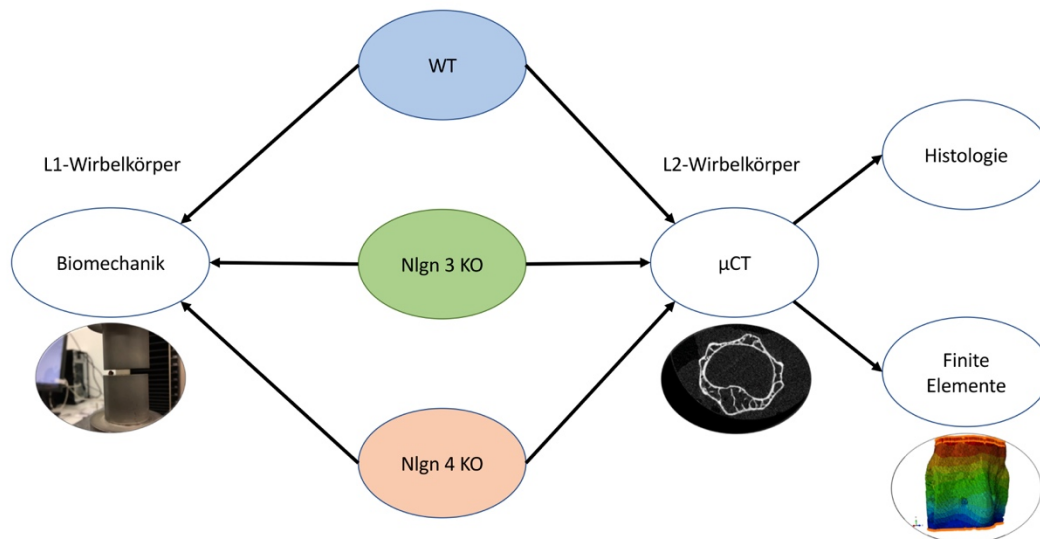


Abbildung 4: Grafische Darstellung des Studiendesigns.

Am Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration an der Charité Berlin wurde mit den L1-Wirbelkörpern die biomechanische Testung durchgeführt. Die L2-Wirbelkörper wurden im μ CT gescannt und anschließend für die histologischen Untersuchungen verwendet. Gleichzeitig wurde mit den μ CT Aufnahmen das FE-Modell und die FE-Simulation erstellt.

2.2 Mikrocomputertomographie

Die L2 Wirbelkörper der bereits euthanasierten Mäuse wurden sorgfältig freipräpariert, anschließend mittels 0,9-prozentiger Natriumchlorid-Lösung fixiert und in Kompressen aufbewahrt. In einer Kooperation mit dem Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration wurden die μ CT-Scans dort durchgeführt. Bei dem verwendeten Gerät handelte es sich um den Kegelstrahltomograph *vivaCT40* (Scanco Medical AG, Wangen-Brüttisellen, Schweiz).

Zur Bildakquisition wurden die Proben auf dem Probenhalter platziert und korrekt ausgerichtet. Im Anschluss rotierte die Probe langsam um 180° durch die kegelförmige Röntgenstrahlung. Die nicht absorbierte Reststrahlung wurde am Detektor gemessen. Durch insgesamt 1000 Projektionen aus unterschiedlichen Winkeln und anschließender Rekonstruktion entstand so der 3D-Bilddatensatz. Die Scans wurden mit einer Röhrenspannung von 70 kV und einer Stromstärke von 57 μ A angefertigt. Die Voxelgröße betrug isotrop 10,5 μ m. Der Bilddatensatz wurde als DICOM-Dateien für die weitere Bearbeitung gespeichert.

2.3 Verwendete Hardware

Für das Bearbeiten der Scans, das Erstellen des FE Modells sowie für die Berechnung der Simulation wurde folgende Hardware benutzt:

Dell Precision T5810 (Dell Technologies Inc., Round Rock, TX) mit Intel Xeon CPU E5-1620 (Intel Corporation, Santa Clara, CA) und 16 GB Arbeitsspeicher. Das verwendete Betriebssystem war Windows 7 Professional, Service Pack 1 (Microsoft Corporation, Redmond, WA).

2.4 Bearbeitung und Segmentierung der Scans

Die zuvor erstellten DICOM-Bilddateien wurden mithilfe des *Volume Tools* in das Programm Analyze 12.0 (AnalyzeDirect, Overland Park, KS) geladen und dabei automatisch zu einem Volumendatensatz zusammengesetzt. Voraussetzungen hierfür sind: alle transversalen Einzelbilder müssen sich im selben Ordner befinden, im selben Dateiformat gespeichert sein und eine einheitliche Pixelgröße sowie Pixelanzahl aufweisen.

Damit das spätere Modell die richtigen Maße besaß, musste die Voxelgröße von den voreingestellten Werten auf die tatsächlichen Werte der Aufnahme geändert werden. Wichtig hierbei war die Verwendung der Einheit Millimeter (mm). Die Voxelgröße der Scans betrug in allen 3 Ebenen 0,0105 mm.

Im Anschluss wurde der Scan so ausgerichtet, dass die cranio-caudale Achse des zu segmentierenden Wirbels senkrecht zur transversalen Ebene stand (Abbildung 5a). Die axialen Schichten cranial und caudal des Wirbels sowie die Endplatten wurden entfernt. Das Entfernen der Endplatten hat einen sehr geringen Einfluss auf das Ergebnis bei einem axialen Kompressionstest, erleichtert jedoch das gleichmäßige Auftragen der Kräfte (Maquer et al. 2012). Im *Image Edit* Modul des Programms wurde analog des Vorgehens von Boyd et al. der Wirbelkörper unter Zuhilfenahme einer konstanten *Region of interest* (ROI) in allen axialen Schichten vom Wirbelbogen getrennt (Abbildung 5 b). Dieser Schritt diente der Reduktion der später benötigten Elementanzahl und sorgte dadurch für kürzere Rechenzeiten. Ohne den Wirbelbogen verringerte sich die von Boyd et al. bestimmte Steifigkeit zwar um 17-21 %, dieser Effekt wurde jedoch gleichermaßen in der Test- und Kontrollgruppe beobachtet sodass das Entfernen des Wirbelbogens keinen Einfluss auf die relativen Unterschiede in den Kompressionstests hat (Boyd et al. 2011).

Material und Methoden

Nachdem der Datensatz nun zurecht geschnitten wurde, musste der Wirbelkörper mit der Kortikalis und den Trabekeln vom restlichen Gewebe segmentiert werden. Dieser Vorgang wurde im *Volume Edit* Modul von Analyze 12.0 mit einem semi-automatischem *region growing* Algorithmus vollzogen. Der Schwellenwert (*threshold*) wurde so gewählt, dass nur Voxel, deren Grauwerte in einem bestimmten Bereich lagen, als zum Wirbelkörper zugehörig registriert wurden. Anschließend wurde ein Startpunkt, auch *seed* genannt, in das Knochengewebe gesetzt. Der Algorithmus segmentierte daraufhin iterativ die Nachbarvoxel anhand ihrer Grauwerte. So wuchs die Region Schritt für Schritt an (*region growing*). Der so segmentierte Bilddatensatz (Abbildung 5 d) wurde als *Object Map* gespeichert. Diese Datei wurde für die spätere Extraktion der Oberfläche benötigt.

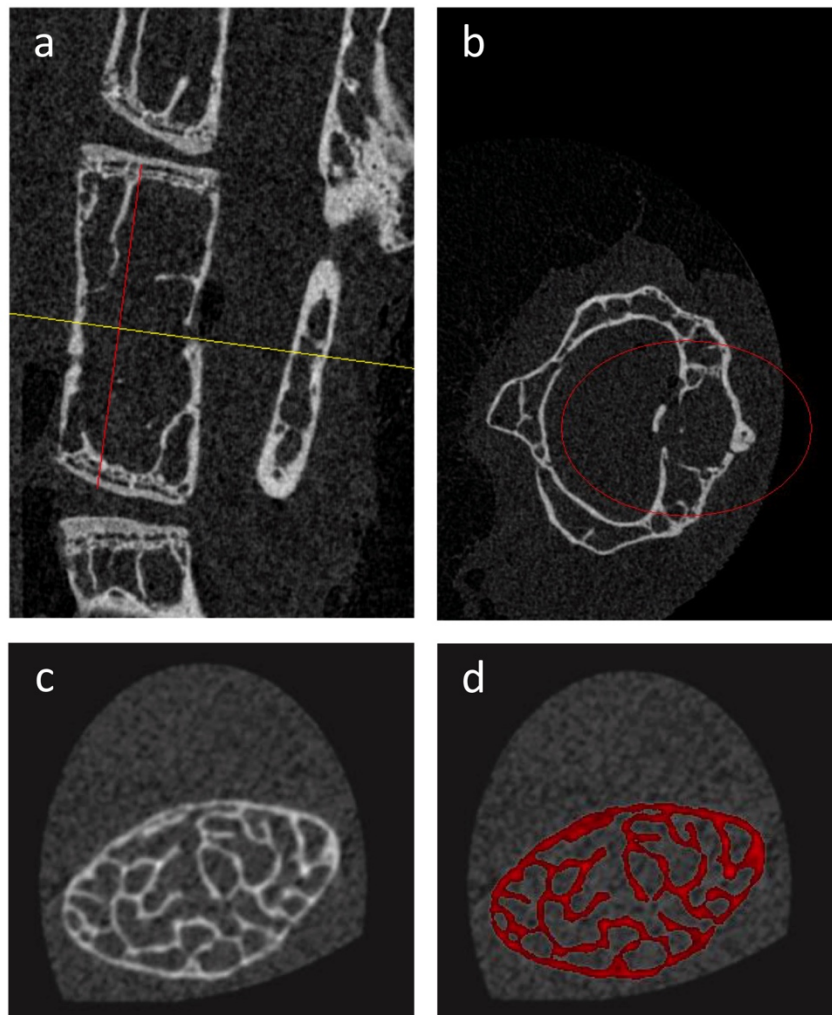


Abbildung 5: Bearbeiten und Segmentieren des Scans.

Die cranio-caudale Achse des Wirbels wird senkrecht zur transversalen Ebene ausgerichtet (a). Trennen des Wirbelkörpers vom Wirbelbogen mit konstanter ROI (b). Unsegmentierte, bearbeitete ROI (c). Segmentierte und bearbeitete ROI, das Knochengewebe wird rot dargestellt (d).

2.5 Bestimmung der Knochenmineraldichte

Im Anschluss wurde die Knochenmineraldichte (*bone mineral density, BMD*) und TMD (*tissue mineral density*) jedes Wirbelkörper bestimmt. TMD entspricht dabei der mittleren Dichte des mineralisierten Knochengewebes, BMD entspricht der mittleren Dichte des gesamten Wirbelkörpers (mineralisiertes und nichtmineralisierte Gewebe).

Die während der μ CT-Scans mitaufgenommenen Phantome bestehen aus Hydroxylapatit (HA) und besitzen eine bekannte Dichte, in diesem Fall 250 und 750 mg HA/cm³. Diese Aufnahmen der Phantome wurden in Analyze 12.0 geladen. Im *Region of Interest* Modul wurde eine ROI jeweils in der Mitte des Phantoms bestimmt. Über mehrere Schichten wurde dort die durchschnittliche Intensität in Hounsfield Units (HU) gemessen. Die so gewonnen Werte wurden als y-Werte zu den bekannten Dichtewerten in ein Diagramm eingetragen und eine Ausgleichsgerade durch beide Werte gelegt. (Abbildung 6)

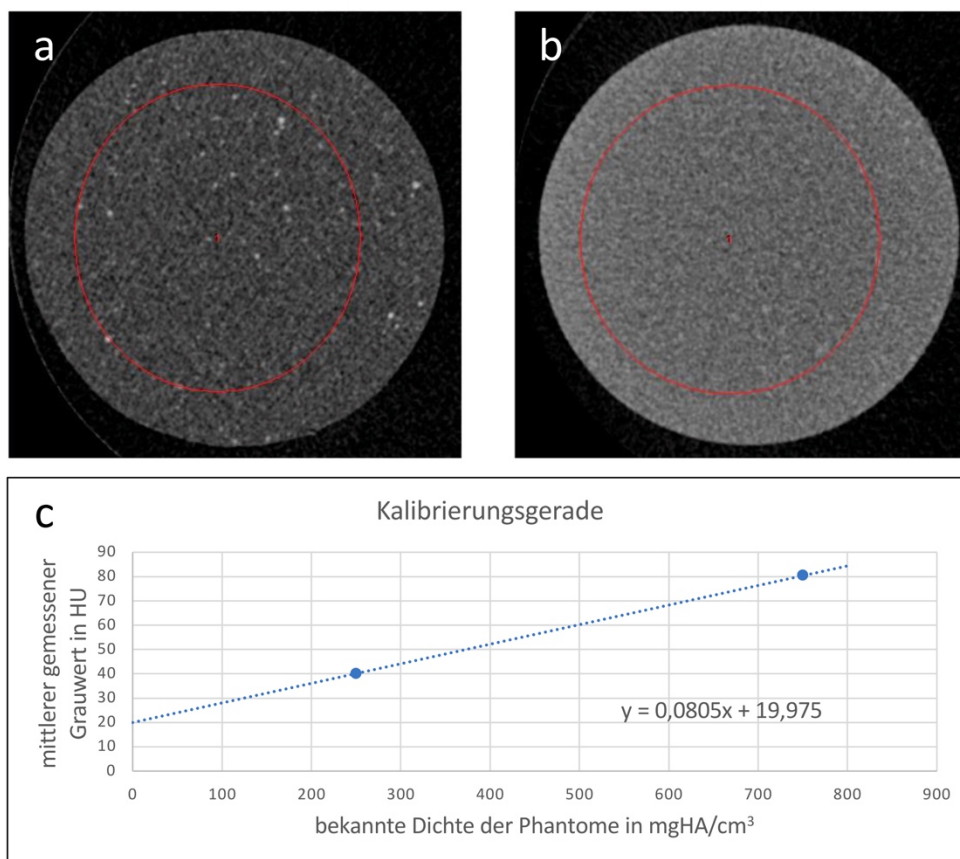


Abbildung 6: Erstellen der Kalibrierungsgerade.

Phantom mit 250 mg HA/cm³ (a) und Phantom mit 750 mg HA/cm³ (b). Die ROI zur Erfassung des mittleren Grauwerts ist jeweils in Rot dargestellt und erstreckt sich über mehrere Schichten. Die Werte der Phantome sind als blaue Punkte dargestellt. Die Ausgleichsgerade, die durch beide Punkte zieht ist dargestellt und entspricht der Kalibrierungsgerade, deren Formel angegeben wird (c).

Die Formel der so entstandenen Kalibrierungsgeraden mit der Form $y = m \cdot x + t$ wurde ausgegeben. Nun wurde der in den vorherigen Kapiteln bearbeitete Scan geladen und durch das *Image Algebra* Modul mit der Formel: $\text{Output} = (\text{Input} - t) / m$ (wobei hier die jeweiligen Werte für t und m der Kalibrierungsgerade benutzt wurden) in die korrekten HU umgewandelt. Der eben kalibrierte Scan wurde zusammen mit der in den vorherigen Kapiteln erstellten *Object Map* in das *Bone Microarchitecture Analysis Add-On* der Software Analyze 12.0 geladen. Das Knochengewebe wurde automatisch segmentiert und die Werte für Dichte und Mikroarchitektur wurden ausgegeben. Die so gemessenen Dichtewerte wurden in der Vergleichseinheit mgHA/cm^3 ausgegeben.

2.6 Generierung des FE Modells

Das Erzeugen des FE Modells bestand aus zwei Schritten: Zuerst wurde die Knochenoberfläche in Analyze 12.0 extrahiert um dann im Anschluss mit einer finiten Anzahl an Elementen, in diesem Fall Tetraeder, ausgefüllt zu werden. Im Folgenden werden beide Schritte näher beschrieben.

2.6.1 Extraktion des Oberflächennetzes

Ziel dieses Schrittes war die Oberfläche des, aus Voxeln bestehenden, Wirbelkörpers zu extrahieren und diese mit Hilfe eines Netzes von Knotenpunkten und Dreiecken zu beschreiben. Die dabei erstellte Oberfläche sollte möglichst detailgetreu der Grenze zwischen Knochen und dem restlichen Gewebe folgen, jedoch auch die rechtwinklige Form der Voxel glätten um eine Stufenbildung zu vermeiden. Ebenso durfte das erstellte Oberflächennetz keine Löcher oder Überschneidungen der Polygone aufweisen, da sonst das nachfolgende Erstellen des Volumen Netzes nicht funktionieren würde.

Dafür wurde der zuvor bearbeitete Scan ausgewählt und im *Surface Extraction* Modul von Analyze 12.0 geöffnet. Gleichzeitig wurde die im Kapitel 2.4 erstellte und gespeicherte *Object Map* geladen. Die *Object Map* enthielt die Informationen, welche Voxel zum Knochen zugeordnet wurden. Nun wurde das zu extrahierende Objekt, in diesem Fall der Knochen, ausgewählt. Im Anschluss konnte die *Cube Edge Size*, gewählt werden. Je kleiner diese war, desto genauer entsprach die Oberfläche dem Verlauf der Voxel zwischen Knochen und Nicht-Knochen. Wählte man eine größere Kantenlänge, wurde die Oberfläche glatter, entsprach aber nicht mehr genau den Voxelgrenzen (Abbildung 7). Um die, für die Simulation, am besten geeignete Kantenlänge zu finden,

wurden drei verschiedene Oberflächennetze mit einer Kantenlänge von 0,01 mm, 0,02 mm und 0,03 mm gewählt. Danach wurde die Oberfläche durch einen in Analyze 12.0 vorhandenen, speziellen Algorithmus extrahiert und anschließend für die Programm-übergreifende Bearbeitung als *stereolithography* (STL) Datei gespeichert. Das STL-Dateiformat ist weit verbreitet und wird von den allermeisten CAD-Programmen unterstützt. Gleichzeitig dient es als Schnittstelle zu den immer breiter verfügbaren 3D-Druckern und somit als Vorlage für den 3D-Druck.

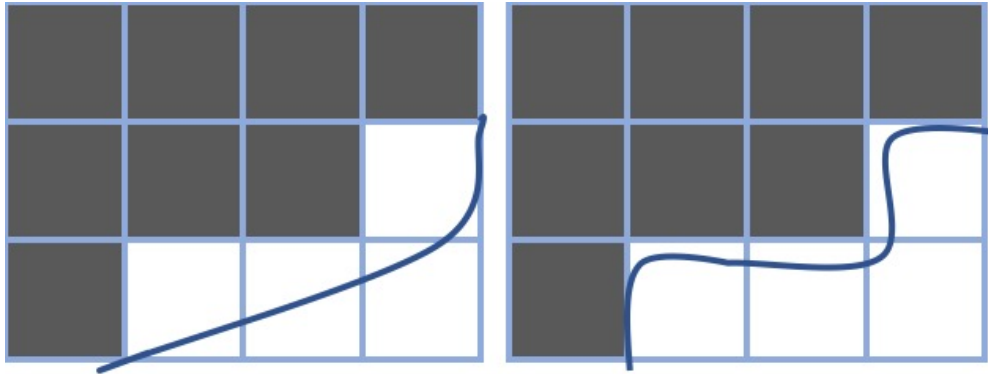


Abbildung 7: Skizze zur Veranschaulichung der unterschiedlichen „Cube Edge Size“. Links: größere Cube Edge Size. Rechts: kleinere „Cube Edge Size“. Schwarze Kästen: zum Knochengewebe zugehörige Voxel. Eine größere „Cube Edge Size“ führt zu einer glatteren Oberfläche, die zum Knochen gerechnete Fläche nimmt jedoch zu, so dass ein ungenaueres Modell entsteht.

2.6.2 Konversion der Oberfläche in ein FE Netz

Für die Durchführung der Simulation war es notwendig, das, von der Oberfläche der Knochenstruktur des Wirbelkörpers begrenzte, Volumen mit den Finiten Elementen zu füllen. Hierfür wurde die STL-Oberflächendatei in das Programm Avizo Fire 7 (Thermo Scientific, Waltham, MA) geladen. Hier konnte die Oberfläche noch einmal visualisiert und bei Bedarf bearbeitet werden. Zudem wurde damit vor dem Start der Generation des FE Netzes die Qualität der Oberfläche kontrolliert. Wurden Löcher oder sich überschneidende Dreiecke gefunden, konnte kein Tetraeder Netz erstellt werden und das Oberflächennetz musste noch einmal bearbeitet werden. Im Anschluss wurde die STL-Oberflächendatei in die grafische Benutzeroberfläche des breit verbreiteten *open source* Programms *gmsh* (Geuzaine & Remacle 2009) geladen. Das Programm diente dazu, das durch die Oberfläche begrenzte Volumen mit einer endlichen (finiten) Anzahl an Elementen zu füllen. Dafür mussten zuerst die Volumengrenzen definiert und die gewünschte Größe der Elemente gewählt werden. Im Anschluss wurde das leere Volumen durch den in *gmsh* integrierten *Delaunay*-Algorithmus mit Tetraeder ausgefüllt

und das so entstandene Netz noch einmal optimiert. Um zu überprüfen inwiefern sich die Elementgröße und somit die Feinheit des Netzes auf das Ergebnis auswirkt, wurde das Oberflächennetz eines Wildtyp-Wirbelkörpers mit jeweils unterschiedlich großen Elementen beschrieben. Die so erstellten FE Netze wurden als Abaqus *input-File* gespeichert und konnten so im nächsten Schritt nach Abaqus importiert werden. Die Tetraeder entsprechen dem Abaqus Elementtyp C3D4. (Abbildung 8)

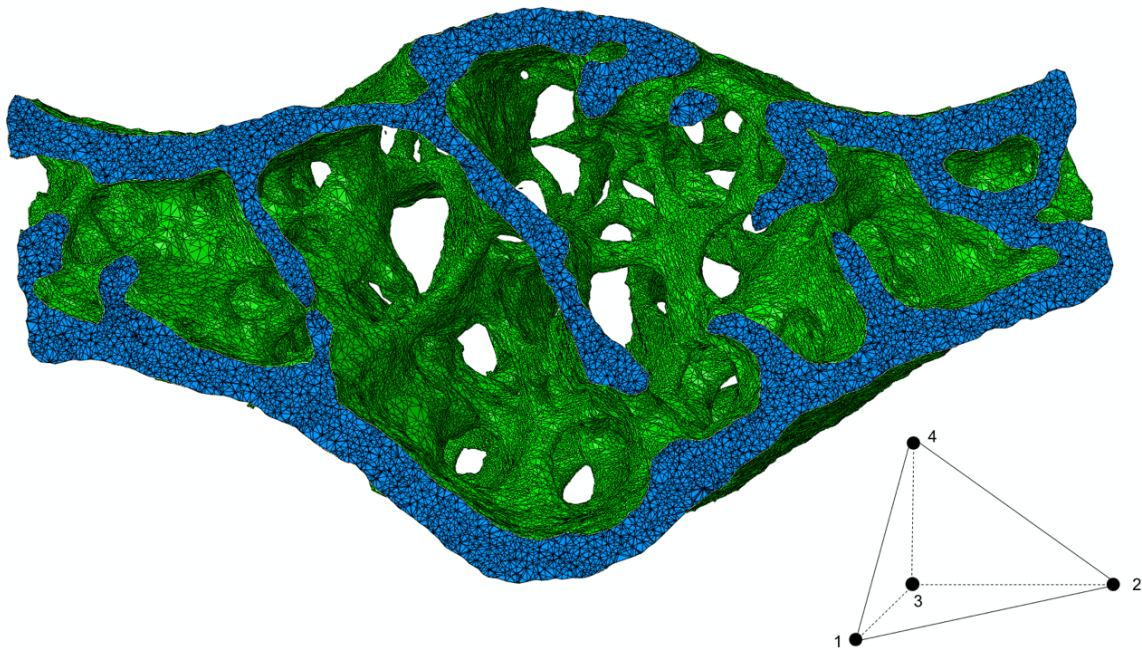


Abbildung 8: FE-Modell eines Wildtyp Wirbelkörpers.

Das Modell ist in der Transversalebene geschnitten. Die Schnittfläche ist blau dargestellt. Die schwarzen Linien markieren die einzelnen Elemente. Das hier abgebildete Modell besteht aus 3.118.020 tetraedrischen Elementen. In der unteren rechten Ecke ist ein C3D4-Element schematisch dargestellt: es besteht aus 4 Ecken und 4 Flächen.

2.7 Simulation eines Kompressionstests

Die Simulation wurde mit Hilfe des Softwarepakets Abaqus 2017 (Dassault Systèmes, Véliz-Villacoublay, Frankreich) durchgeführt und gliederte sich in folgende drei Komponenten:

- *Pre Processing* in Abaqus/CAE: In diesem Schritt wurden die Materialwerte sowie die Randbedingungen festgelegt und das *input-File* für die nachfolgende Berechnung erstellt.
- *Processing* in Abaqus/Standard: Der eigentliche Simulationsschritt, während dem der *solver* das Modell berechnete und ein *output-File* erstellte.

- *Post Processing* in Abaqus/CAE: Das vom *solver* erstellte *output-File* konnte visualisiert und die Ergebnisse ausgegeben werden.

FE-Programme rechnen einheitenlos und geben die Ergebnisse ohne Einheiten aus, deswegen ist es wichtig konsistente Einheiten bei der Eingabe der Parameter zu benutzen. Nur so kann man den ausgegebenen Werten wieder die korrekten Einheiten zuordnen. In Tabelle 2 sind die verwendeten Einheiten zu den entsprechenden physikalischen Größen dargestellt.

Tabelle 2: Während der Simulation verwendete Einheiten

Länge	Kraft	Zeit	Elastizitätsmodul und Spannung
Millimeter (mm)	Newton (N)	Sekunde (s)	Megapascal (MPa = N/mm ²)

Um die Randbedingungen festzulegen, wurde das FE Modell des Wirbelkörpers als *input-File* in Abaqus/CAE geladen. Für die Simulation wurde ein linear-elastisches Verhalten angenommen. Als E-Modul wurde 1.000 MPa beliebig festgelegt und homogen jedem Element zugewiesen. Der mikroskopische E-Modul wurde danach durch lineare Skalierung des Ergebnisses berechnet (Kapitel 2.9). Im Übrigen wurden isotrope Bedingungen und eine Querkontraktionszahl von 0,33 angenommen. Gemäß Ladd und Kinney haben Änderungen dieses Wertes nur einen geringen Einfluss auf das Ergebnis (Ladd & Kinney 1998).

Nun wurden die untersten Knotenpunkte des FE Netzes in Kompressionsrichtung (entlang der z-Achse) fixiert. Dies verhinderte das Verschieben des Wirbelkörpers während der Simulation und entspricht der Auflagefläche im realen Kompression. Die Knotenpunkte auf der Oberseite wurden ebenfalls ausgewählt und in einem sogenannten *Node Set* gespeichert. Zur Simulation der Kompression wurde auf diese oberen Knoten eine Verschiebung entlang der z-Achse aufgetragen. (Abbildung 9)

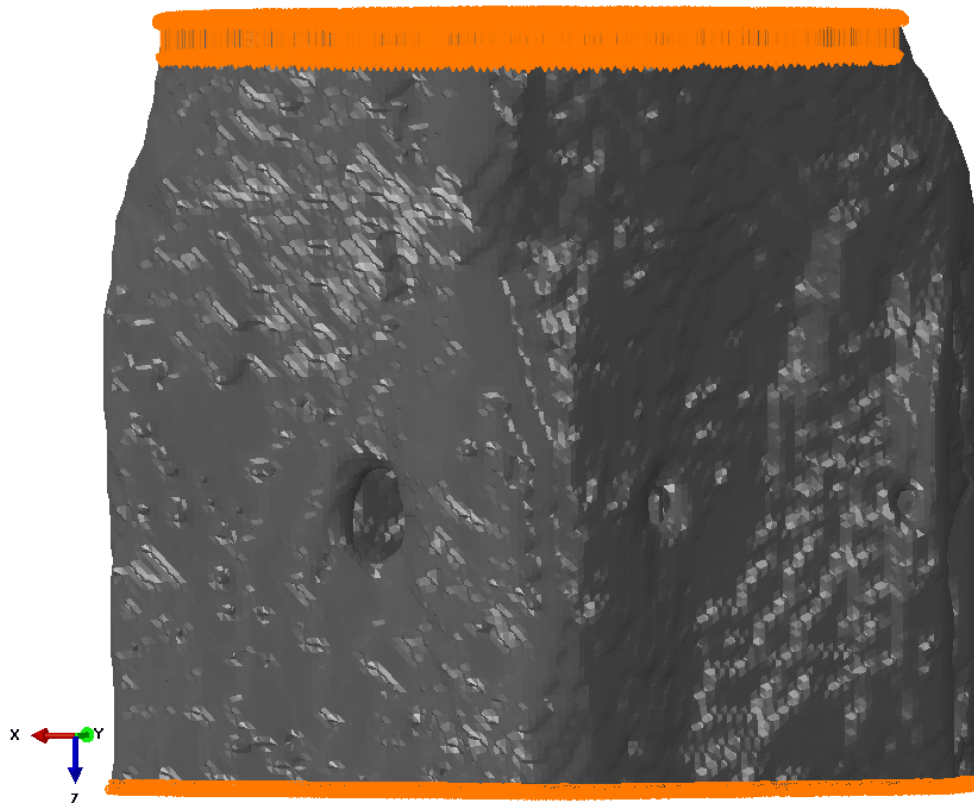


Abbildung 9: Darstellung der aufgetragenen Randbedingungen.

Die beschränkten Knotenpunkte werden orange angezeigt, die Kompression in Richtung der z-Achse wird mit den kleinen, orangen Pfeilen am oberen Ende dargestellt (aufgrund der großen Zahl an Pfeilen schlecht erkennbar). Die unteren Knotenpunkte sind fixiert. Die hier aufgetragenen Bedingungen entsprechen denen des biomechanischen Kompressionstests.

Somit wurden alle Randbedingungen und Materialwerte eingegeben und das *input file* konnte erstellt werden. Dabei handelt es sich um eine Datei, die alle Befehle für die Berechnung der Simulation enthält und direkt oder mithilfe der grafischen Benutzeroberfläche geändert werden kann. Diese Datei wurde im Anschluss mit dem *open-source* Texteditor Vim (vim.org) um den Befehl „*NODE PRINT, NSET=oben, TOTALS=YES, RF“ ergänzt (Abbildung 10). Der Befehl diente dazu, die zur Kompression benötigte Kraft nach der Simulation in einer Datei auszugeben. (Smith 2009)

```
** -----  
**  
** STEP: compression  
**  
*Step, name=compression, nlgeom=NO  
*Static  
1., 1., 1e-05, 1.  
**  
** BOUNDARY CONDITIONS  
**  
** Name: BC-3 Type: Displacement/Rotation  
*Boundary  
oben, 3, 3, 0.2  
**  
** OUTPUT REQUESTS  
**  
*Restart, write, frequency=0  
**  
** FIELD OUTPUT: F-Output-1  
**  
*NODE PRINT, NSET=oben, TOTALS=YES  
RF  
*NODE PRINT, NSET=unten, TOTALS=YES  
RF  
**  
*Output, field, variable=PRESELECT  
**  
** HISTORY OUTPUT: H-Output-1  
**  
*Output, history, variable=PRESELECT  
*End Step  
~  
~
```

Abbildung 10: Auszug aus dem input File für die Simulation.

Der Befehl NODE PRINT zur Ausgabe der benötigten Kraft wurde manuell eingefügt. Alle anderen Befehle wurden unter Zuhilfenahme der grafischen Benutzeroberfläche von dem Programm Abaqus in das input File übertragen.

Nun konnte der eigentliche Rechenschritt der Simulation entweder über die grafische Benutzeroberfläche oder über die Kommandozeile gestartet werden. Dieser Vorgang lieferte als Ergebnis mehrere Dateien, die im Arbeitsverzeichnis gespeichert wurden. Zum einen die, für die Darstellung der Ergebnisse benötigte, *Abaqus Output Database* (ODB) Datei, zum anderen eine Text-Datei, in der die angeforderte Kraft ausgegeben wurde. Gleichzeitig wurde eine Datei mit allen Informationen zur Simulation wie Berechnungszeit und Anzahl der Elemente gespeichert. Die ODB Datei wurde in Abaqus CAE geladen, um unter anderem die Stressverteilung, Deformation und Kräfte in Projektion auf den verformten Wirbelkörper darzustellen. Die errechneten Werte für die Kraft wurden in ein Tabellenkalkulationsprogramm übernommen. Die Steifigkeit des Wirbelkörpers (k_{calc}) konnte aufgrund des linear elastischen Verhaltens mit folgender Formel berechnet werden:

$$k_{calc} = dF/du \text{ [N/mm]}$$

Wobei F für die benötigte Kraft und u für die Kompression stehen.

Die restlichen Daten wurden ebenfalls in das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, WA) übertragen und ausgewertet.

2.8 Biomechanische Testung

Die Biomechanik-Experimente wurden am Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration an der Charité Berlin von Dag Wulsten durchgeführt.

Die bei -20° Celsius gefrorenen L1-Wirbelkörper wurden über Nacht bei Raumtemperatur aufgetaut und mittels phosphatgepufferter Salzlösung (Waldeck, Münster, Deutschland) rehydriert. Für den Kompressionstest wurde eine ElectroForce LM1 Materialprüfmaschine (Bose Corporation ElectroForce Systems Group, Eden Prairie, MN) verwendet. Die Wirbelkörper wurden zwischen zwei Edelstahlplatten gelegt, wobei die untere mit einem Kraftmesser Model 31 (Honeywell Corporation, Charlotte, NC) verbunden war. Dieser wies eine Messauflösung von 0,01 N und eine maximal messbare Kraft von 225 N auf. Zuerst wurde die obere Platte auf die Probe zubewegt bis der erste Kontakt durch einen Anstieg der Kraft um 0,01 N registriert wurde. Danach folgte eine Verformungs-kontrollierte Kompression mit einer Kompressionsrate von 10 mm/min bis zum Materialversagen. Die Kompressionstiefe und die Kraft wurden mit einer Frequenz von 100 Hz registriert. Die Daten wurden graphisch dargestellt. Mit einer MATLAB (The Mathworks Incorporated, Natick, MA) Routine konnte im Anschluss die Steifigkeit als Steigung des linearen Parts des Kraft-Verformungsdiagramm bestimmt werden.

Die statistische Auswertung der Steifigkeit fand in der Experimentellen Unfallchirurgie Gießen statt.

2.9 Berechnung des mikroskopischen Elastizitätsmoduls

Der Elastizitätsmodul (E-Modul) ist ein wichtiger Materialkennwert, der Einfluss auf die Verformbarkeit des jeweiligen Materials hat. Um Materialien mit einem hohen E-Modul zu komprimieren, wird mehr Kraft benötigt als bei Materialien mit einem niedrigeren.

Um den mikroskopischen E-Modul (E_{mic}) der Wirbelkörper zu berechnen, wurden die Ergebnisse aus der biomechanischen Testung benötigt.

Die Steigung des linearen Parts der experimentell bestimmten Kraft-Verformungskurve entsprach dabei der Steifigkeitskonstante (k_{exp}) des jeweiligen Wirbelkörpers.

Gleichzeitig wurde die Steifigkeitskonstante (k_{calc}) bei der Simulation eines Kompressionstests mit beliebigem E-Modul (E) mit der Formel: $k_{\text{calc}} = dF/du$ (Kapitel 2.7) bestimmt.

Da die Steifigkeit bei der linear-elastischen Simulation direkt proportional zum E-Modul ist und zusätzlich von der Struktur des Knochens abhängt, ließ sich durch das Einführen einer weiteren Konstante (S) folgende Formel aufstellen:

$$k_{\text{calc}} = S \cdot E \text{ [N/mm]}; \text{ umgeformt: } S = k_{\text{calc}}/E \text{ [mm]}$$

S entspricht der Strukturkonstante und ist nur durch die Mikroarchitektur des jeweiligen Knochens bestimmt. E steht für den während der Simulation beliebig gewählten E-Modul.

Nun wurde vorausgesetzt, dass die berechneten und experimentell bestimmten Steifigkeitskonstanten der jeweiligen Wirbelkörper gleich sein müssen: $k_{\text{calc}} = k_{\text{exp}}$.

Unter dieser Voraussetzung konnte schließlich E_{mic} wie folgt berechnet werden:

$$E_{\text{mic}} = k_{\text{exp}}/S \text{ [MPa]}. \text{ (Müller et al. 2014; Pendleton et al. 2018)}$$

2.10 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden mit dem Programm IBM SPSS Statistics 24.0 (IBM Corporation, Armonk, NY) ausgewertet.

Zuerst wurden die Daten mittels deskriptiver Statistik und Quantil-Quantil-Diagramme hinsichtlich ihrer Verteilung überprüft. Hierbei zeigten die mittels μCT erhobene Daten eine Schiefe von $-0,673$ bis $0,797$ und eine Kurtosis von $-0,643$ bis $0,473$. Somit wurde eine Normalverteilung angenommen. Die biomechanisch erhobene Steifigkeit zeigte eine Schiefe von $0,292$ und eine Kurtosis von $-1,221$ so dass auch hier eine Normalverteilung angenommen wurde. Für die mittels FEM gewonnenen Daten wurde bei einer Schiefe von $0,742$ bis $0,947$ und einer Kurtosis von $-0,725$ bis $0,718$ ebenfalls eine Normalverteilung angenommen. Im Anschluss daran konnte mittels Levene-Test die Homogenität der Varianzen bestätigt werden. Somit waren die Voraussetzungen für einen Gruppenvergleich mittels *Oneway analysis of variance* (ANOVA)-Test gegeben. Ab einem p-Wert $\leq 0,05$ wurde ein signifikantes Ergebnis angenommen. Balkendiagramme werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Knochenmineraldichte der Wirbelkörper

Die Knochenmineraldichte der verschiedenen Gruppen wurde wie in Kapitel 2.5 beschrieben bestimmt. Die TMD ist ein Maß für die kalibrierte Dichte des Knochengewebes selbst. Die BMD dagegen stellt die Dichte des gesamten Knochens, also Knochengewebe und Knochenmark, dar.

Die mittlere TMD war in der Nlgn-4 KO Gruppe mit 864,68 mgHA/cm³ am größten, gefolgt von den WT Wirbelkörpern (858,53 mgHA/cm³). Am niedrigsten war die mittlere TMD in der Nlgn-3 KO Gruppe (856,85 mgHA/cm³). Die Standardabweichung betrug in der WT Gruppe 19,6 mgHA/cm³, in der Nlgn-3 KO Gruppe 32,71 mgHA/cm³ sowie 18,44 mgHA/cm³ in der Nlgn-4 KO Gruppe.

Die größte mittlere BMD zeigte sich in der WT Gruppe (mittlere BMD \pm Standardabweichung in mgHA/cm³: 422,09 \pm 27,52). Die niedrigste BMD fand sich in der Nlgn-4 KO Gruppe (408,43 \pm 38,37). Die Nlgn-3 KO Gruppe lag mit 415,00 \pm 23,73 in der Mitte. Zwischen den drei Gruppen bestand kein signifikanter Unterschied. (Abbildung 11 und Tabelle 3)

Der Anteil des Volumens des mineralisierten Knochengewebes (*bone volume*) zum Gesamtvolumen (*total volume*) (BV/TV) betrug bei den WT Wirbelkörpern 41,29 % \pm 4,83 % (Mittelwert \pm Standardabweichung) und war somit gering höher im Vergleich zu den Nlgn-3 KO (40,48 % \pm 2,12 %) bzw. Nlgn-4 KO (40,62 % \pm 4,00 %) Mäusen (Abbildung 12 und Tabelle 3).

Deskriptiv zeigten die μ CT-Aufnahmen der Wirbelkörper der drei Gruppen keine über das Ausmaß der interindividuellen Abweichungen herausragenden Unterschiede in Aufbau oder Struktur des trabekulären Knochens. Auch bei der Dicke der Kortikalis konnten keine Differenzen bemerkt werden. (Abbildung 13).

Ergebnisse

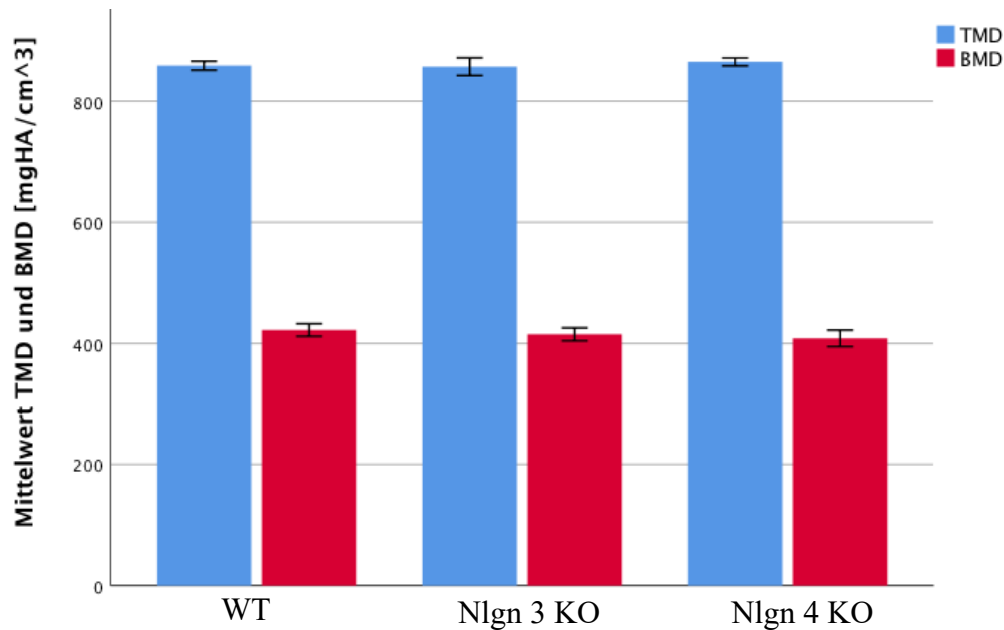


Abbildung 11: Mittlere TMD und BMD der Wirbelkörper im Vergleich.

Die TMD (blau) stellt die kalibrierten Dichtewerte des reinen Knochengewebes dar. Die BMD (rot) gibt den kalibrierten Dichtewert des gesamten Knochens (Knochengewebe und Knochenmark) an. Die Fehlerbalken zeigen jeweils den einfachen Standardfehler an. Die Dichtewerte der Gruppen (WT, Nlgn-3 KO und Nlgn-4 KO) zeigten nur geringe Unterschiede. Es bestand keine statistische Signifikanz.

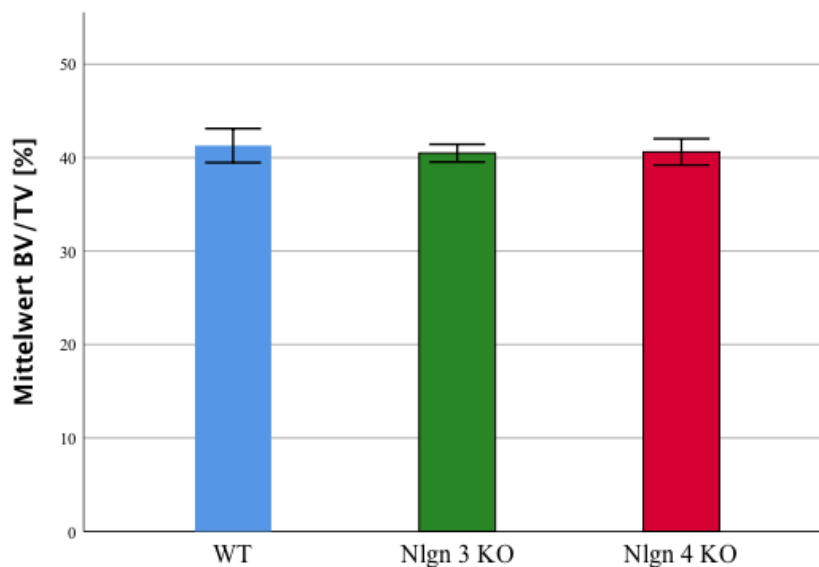


Abbildung 12: Mittleres BV/TV der Gruppen im Vergleich.

Anteil des Knochengewebes zum Gesamtvolumen (BV/TV) in %. Die Wildtyp Mäuse weisen ein gering höheres BV/TV Verhältnis auf. Der Unterschied war nicht statistisch signifikant.

Ergebnisse

Tabelle 3: Mittlere TMD, BMD und BV/TV mit Standardabweichung.

Gruppe (n: Gruppengröße)	mittlere TMD in mgHA/cm ³ ± Standardabweichung	mittlere BMD in mgHA/cm ³ ± Standardabweichung	mittleres BV/TV in % ± Standardabweichung
WT (n=7)	858,53 ± 19,60	422,09 ± 27,52	41,29 ± 4,83
Nlgn-3 KO (n=5)	856,85 ± 32,71	415,00 ± 23,73	40,48 ± 2,12
Nlgn-4 KO (n=8)	864,68 ± 18,44	408,43 ± 38,37	40,62 ± 4,00

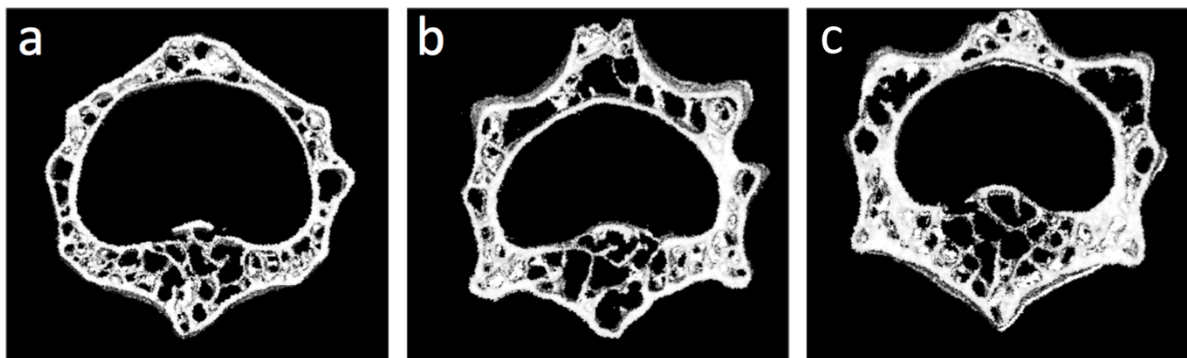


Abbildung 13: 3D Schnitte durch die Wirbelkörper.

Transversalschnitte (210 µm dick) der µCT-Aufnahmen nahe der Wirbelkörpermitte. Die Aufnahmen zeigen einen ähnlichen strukturellen Aufbau der Wirbelkörper zwischen WT (a), Nlgn-3 KO (b) und Nlgn-4 KO (c). Keine klar ersichtlichen Differenzen der Knochenarchitektur.

3.2 Biomechanische Steifigkeit

Zur Bestimmung einer Kraft-Verformungskurve wurden die Wirbelkörper wie in Kapitel 2.8 beschrieben unter Messung der benötigten Kraft komprimiert. Ein Beispiel einer so entstandenen Kraft-Verformungskurve ist in Abbildung 14 dargestellt. Die Kurve lässt sich in drei Phasen gliedern: Zunahme des Kontaktes zwischen Testzylinder und Wirbelkörper (I); nahezu linear-elastische Verformung (II) und letztendlich plastische Verformung sowie Bruch der Teststruktur (III).

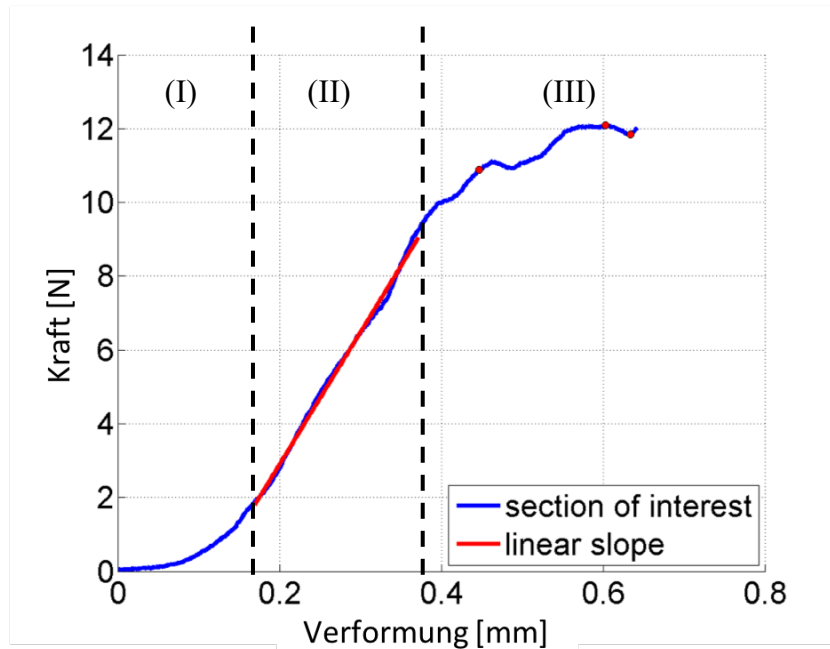


Abbildung 14: Kraft-Verformung-Kurve eines Wirbelkörpers.

Exemplarisch dargestelltes Kraft-Verformung-Diagramm eines Wirbelkörpers aus der Nlgn-3 KO Gruppe. Die drei verschiedenen Abschnitte sind mit römischen Zahlen markiert. In Phase I stellt sich der Kontakt zwischen Testzylinder und Wirbelkörper her, die Kraftübertragung beginnt. In Abschnitt II findet die linear-elastische Verformung statt. In Phase 3 liegt die plastische Verformung sowie der Bruch des Wirbelkörpers. Die Steigung des linearen Parts ist als rote Gerade dargestellt und entspricht der biomechanischen Steifigkeit.

Die Steigung des linearen Parts der biomechanischen Testung entsprach der Steifigkeit jedes Wirbelkörpers und wurde im Anschluss an den Kompressionstest bestimmt.

Dabei lagen die Mittelwerte der WT (Mittelwert \pm Standardabweichung; Gruppengröße: 63,49 N/mm \pm 22,34 N/mm; n=7) und Nlgn-3 KO (57,09 N/mm \pm 24,20 N/mm; n=5) Gruppen nah beieinander, während der Mittelwert der Nlgn-4-KO (49,27 N/mm \pm 17,32 N/mm; n=8) Mauswirbelkörper etwas niedriger war. Die Mediane zeigten eine ähnliche Verteilung (Abbildung 15). Für diese Unterschiede ergab sich keine statistische Signifikanz. Die Einzelwerte wiesen eine große Streuung auf wobei die Werte der Nlgn-4-KO Gruppe weniger weit streuten als die beiden anderen. (Abbildung 15)

Ergebnisse

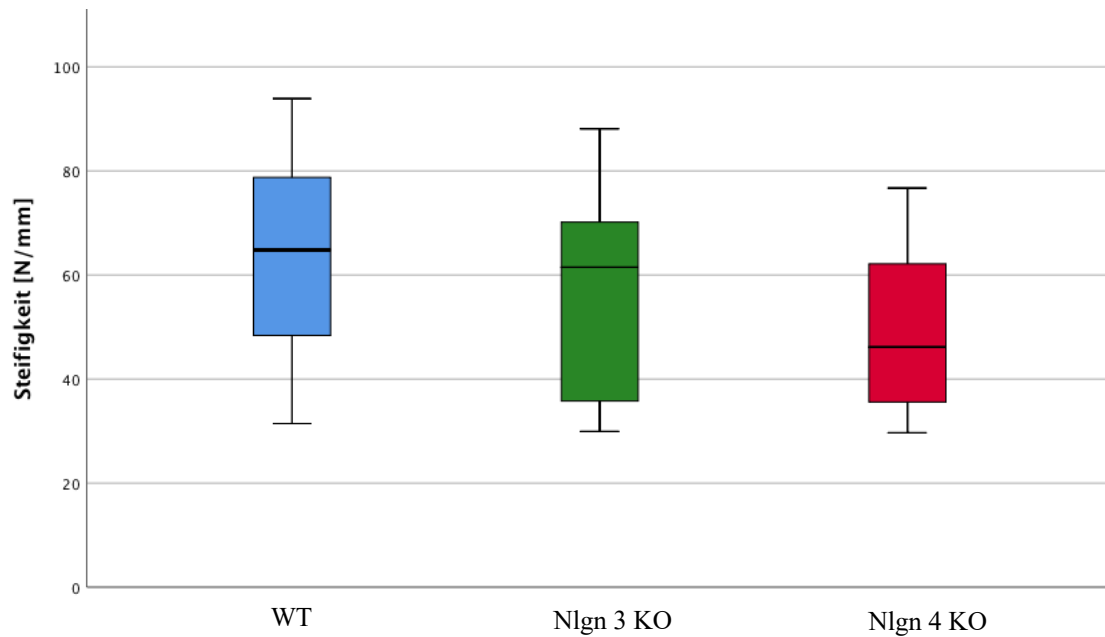


Abbildung 15: Boxplot der biomechanisch bestimmten Steifigkeiten der Wirbelkörper.
Der Median der Nlgn-4 KO Wirbelkörper war niedriger, als die der beiden anderen Gruppen. Es zeigte sich eine große Streuung der Werte.

3.3 Einfluss der bei der Simulation verwendeten Parameter auf das Ergebnis

Vor der eigentlichen Simulation wurde der Einfluss der verschiedenen, bei der Simulation sowie bei der Modellerstellung verwendeten, Parameter auf das Ergebnis untersucht.

Um das gewünschte linear-elastische Verhalten der Simulation zu überprüfen, wurden an demselben Wildtyp Wirbelkörper mehrere Simulationen mit unterschiedlichen Kompressionstiefen bei ansonsten gleichbleibenden übrigen Parametern (Modell mit 1.619.072 Elementen; E-Modul von 1000 MPa; Querkontraktionszahl von 0,33) durchgeführt. Hierbei stieg die benötigte Kraft linear ($R^2=1$) zur Verformung an. Die Steigung der Geraden entspricht der Steifigkeit in N/mm. (Abbildung 16)

Ergebnisse

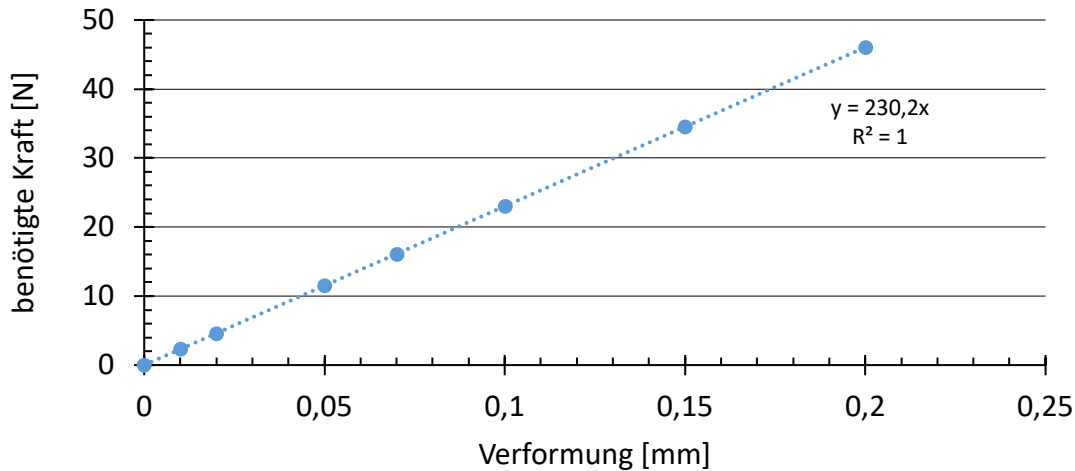


Abbildung 16: Kraft-Verformungskurve eines WT Wirbelkörpers.

Die zur Verformung benötigte Kraft steigt linear ($R^2=1$) an. Die Steigung der Geraden entspricht der Steifigkeit.

Bei einem linear elastischen Verhalten ändert sich die, um eine gewisse Verformung zu verursachende, Kraft linear mit den elastischen Eigenschaften des Materials. Diese Eigenschaften werden mit dem E-Modul beschrieben. Je höher der E-Modul eines Materials ist, desto mehr Kraft wird für dieselbe Verformungsstrecke benötigt. Um diesen Zusammenhang in der Simulation zu überprüfen, wurde der E-Modul des bereits oben verwendeten Wirbelkörpers geändert und dieser konstant um 0,1 mm komprimiert. Es zeigte sich, dass die benötigte Kraft und dadurch die Steifigkeit ebenso linear ($R^2=1$) zu dem angegebenen E-Modul anstiegen. Die Steigung entsprach der Strukturkonstante (S). (Abbildung 17)

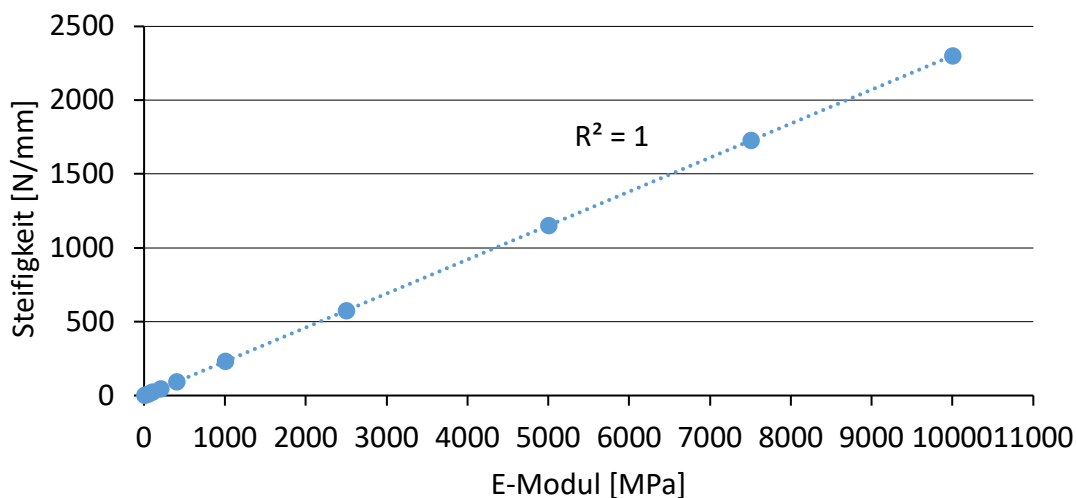


Abbildung 17: Einfluss des E-Moduls auf die Steifigkeit.

Die benötigte Kraft und daraus resultierend die Steifigkeit steigt linear ($R^2=1$) zu dem verwendeten E-Modul an. Die Steigung entspricht der Strukturkonstante S.

3.4 Einfluss der bei der Netzerstellung verwendeten Parameter auf das Ergebnis sowie auf die Berechnungszeit

3.4.1 Einfluss der bei der Extraktion des Oberflächennetzes verwendeten Kantenlänge

Um die Detailgenauigkeit der extrahierten Oberfläche und den daraus entstehenden Einfluss auf die Ergebnisse zu untersuchen, wurden von einem Wildtyp-Wirbelkörper Oberflächen mit den Kantenlängen der jeweiligen Dreiecke von 0,01 mm, 0,02 mm und 0,03 mm extrahiert. Es zeigte sich, dass die Oberflächennetze mit einer Kantenlänge von 0,02 mm und 0,03 mm die feine Struktur der Trabekel nicht gut nachbilden konnten. So wurden einzelne Trabekel breiter und es entstanden Verbindungen zwischen Trabekeln, die in den μ CT-Scans nicht vorhanden waren. (Abbildung 18)

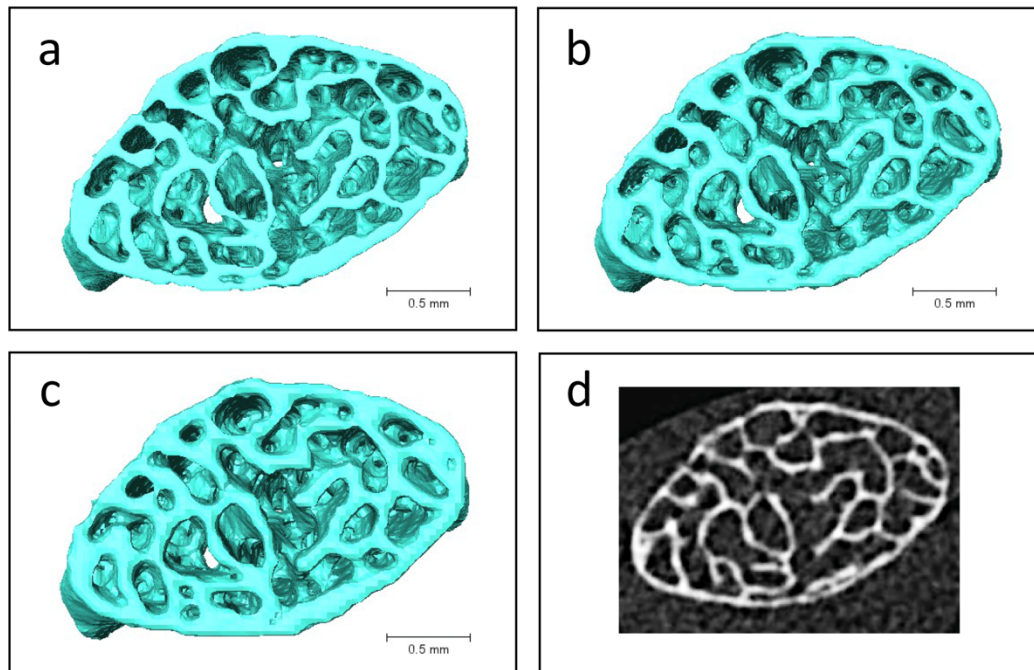


Abbildung 18: Oberflächennetze des selben Wirbelkörpers mit unterschiedlichen Kantenlängen.

Ansicht von caudal. Kantenlänge von 0,01 mm (a). Kantenlänge von 0,02 mm (b). Kantenlänge von 0,03 mm (c). Zum Vergleich das entsprechende Bild aus dem μ CT-Scan des selben Wirbelkörpers (d). Je kleiner die Kantenlänge, desto genauer stimmt das Modell mit den μ CT-Aufnahmen überein und desto feiner werden die Trabekel dargestellt.

Die zur Kompression benötigte Kraft und die daraus berechnete Steifigkeit waren höher, je größer die Kantenlänge bei der Extraktion des Oberflächennetzes war. Der relative Unterschied im Ergebnis zwischen den Kantenlängen von 0,01 und 0,02 mm lag bei

Ergebnisse

21,7 %, der Unterschied zwischen 0,02 und 0,03 mm lag bei 15,4 % (Abbildung 19). Die Wahl der bei der Extraktion benutzten Kantenlänge des Oberflächennetzes hat also einen enormen Einfluss auf das Ergebnis. Da das Ziel dieser Arbeit das Erstellen eines möglichst realitätsgetreuen Modells ist, wurde für die nachfolgenden Simulationen ein Oberflächennetz mit der kleinstmöglichen Kantenlänge (bzw. *Cube Edge Size*) von 0,01 mm verwendet.

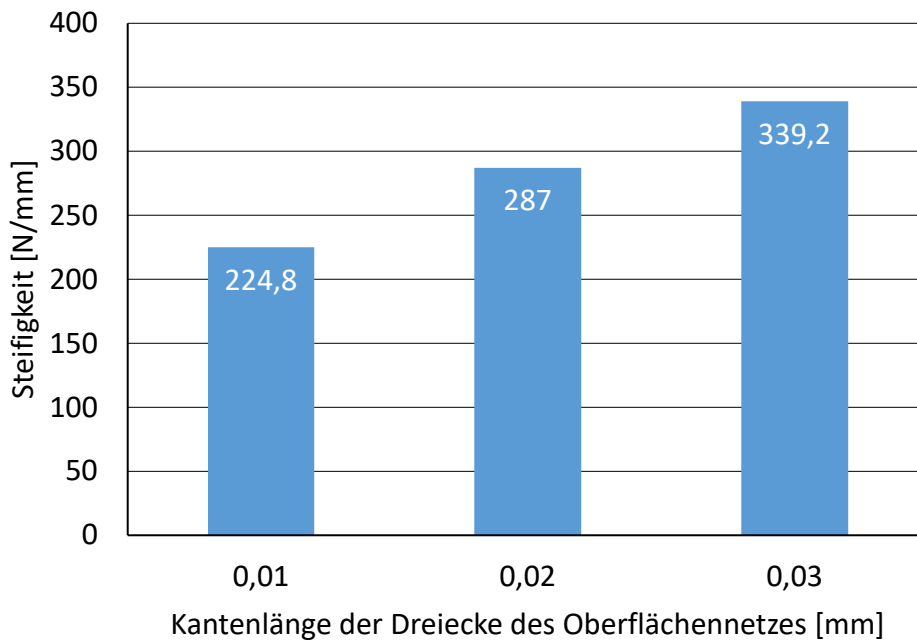


Abbildung 19: Einfluss der Kantenlänge des Oberflächennetzes auf das Ergebnis der Simulation.

Die Steifigkeit ändert sich enorm durch die Verwendung unterschiedlicher Kantenlängen bei der Erstellung des Oberflächennetzes. Ansonsten wurden bei der Simulation mit einem konstanten E Modul von 1.000 MPa und einer Kompression um 0,1 mm identische Bedingungen verwendet.

3.4.2 Einfluss der Zahl der Volumenelemente auf das Ergebnis

Über die Zahl der Oberflächenelemente und die Größe der Volumenelemente konnte die daraus resultierende Zahl der Volumenelemente, in diesem Fall Tetraeder, gesteuert werden. Um den Einfluss der Dichte des FE Netzes auf das Ergebnis zu untersuchen, wurde ein Modell eines Wildtyp Wirbelkörpers mit unterschiedlich vielen Tetraedern erstellt. Damit wurde unter gleichbleibenden Simulationsbedingungen (E-Modul: 1.000 MPa; Kompression um 0,1 mm) die Steifigkeit berechnet.

Hier zeigte sich, dass die Dichte des FE Netzes einen Einfluss auf das Ergebnis hat. Die errechnete Steifigkeit nahm bei steigender Anzahl der Elemente ab. Zwischen 14.601 und 185.790 Tetraedern nahm die benötigte berechnete Steifigkeit um insgesamt 22,1 N/mm

Ergebnisse

ab. Dies entsprach einer Verringerung um 8,4 %. Bei verwendeten Modellen mit Anzahl der Tetraeder zwischen 493.857 und 3.118.020 blieb das Ergebnis relativ konstant. So betrug die Differenz über alle Modelle insgesamt 10,3 N/mm, dies entsprach einer Veränderung von 4,4 %. (Abbildung 20)

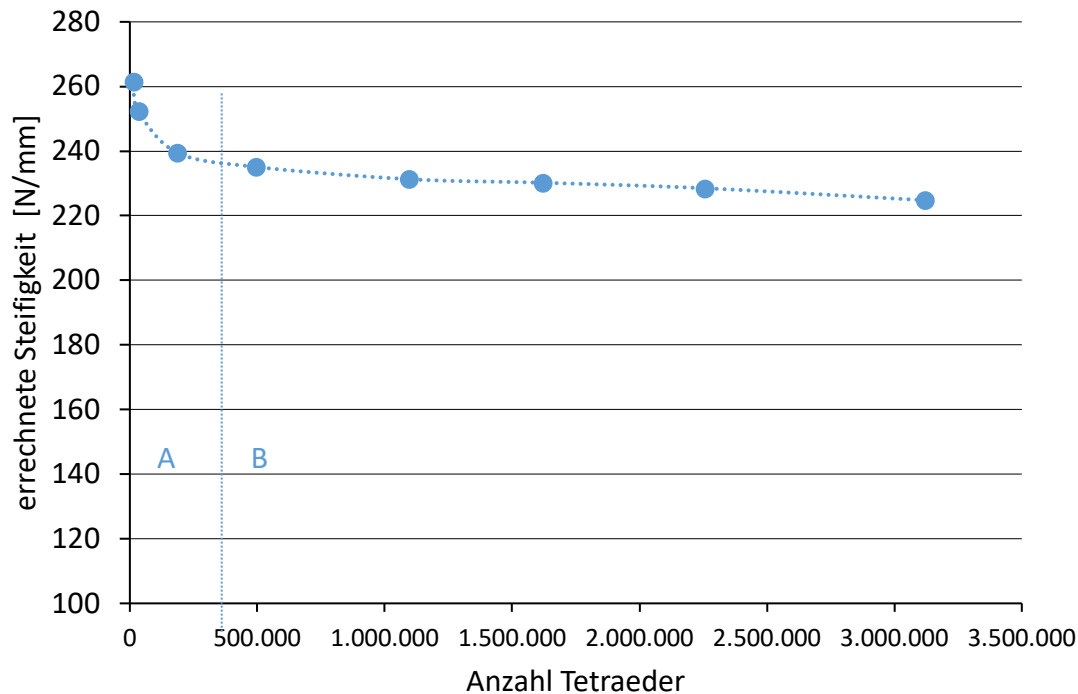


Abbildung 20: Abhängigkeit der Steifigkeit von der verwendeten Anzahl der Tetraeder.
In Abschnitt A sinkt die Steifigkeit stark um insgesamt 22,1 N/mm. In Abschnitt B sinkt die Steifigkeit um insgesamt 10,3 N/mm und nähert sich dem echten Wert asymptotisch an.

3.4.3 Einfluss der Zahl der Tetraeder auf die Berechnungszeit

Um zu überprüfen, wie sich eine höhere Anzahl der Tetraeder auf die Berechnungszeit auswirkt, wurden die benötigten Rechenzeiten der im vorherigen Kapitel benutzten Modelle aus der DAT-Datei ausgelesen. Die Simulation wurde mit der im Kapitel 2.3 beschriebenen Hardware unter Nutzung von 5 CPU-Kernen ausgeführt.

Dabei stieg die Rechenzeit nahezu linear an. Für das Modell mit den wenigsten Elementen (14.601) betrug die Rechenzeit 1,5 Sekunden. Bei dem Modell mit den meisten Elementen (3.118.020) betrug die Rechenzeit dahingegen 671 Sekunden, dies entspricht 11 Minuten und 11 Sekunden. (Abbildung 21)

Ergebnisse

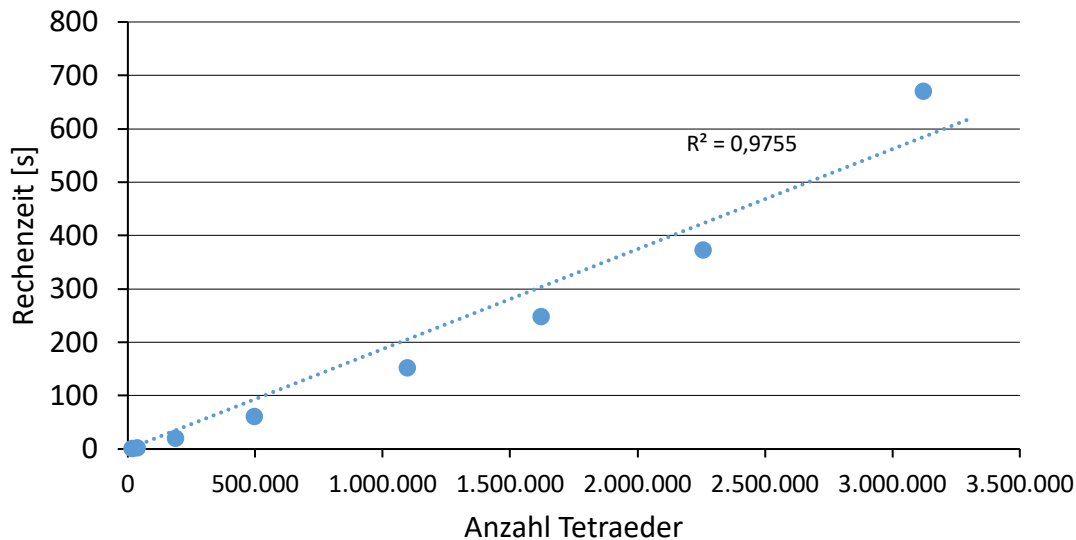


Abbildung 21: Einfluss der Zahl der Elemente auf die Rechenzeit.

Die Rechenzeit steigt nahezu linear ($R^2=0,957$) zu der verwendeten Anzahl an Tetraedern an. Bei dem Modell mit den meisten Elementen lag die Rechenzeit bei über 11 Minuten.

3.5 Ergebnisse des simulierten Kompressionstests

3.5.1 Von-Mises-Vergleichsspannung

Nach erfolgreicher Simulation wurde die Von-Mises-Vergleichsspannung dargestellt (Abbildung 22). Neben der Darstellung des Endzustandes nach Kompression war auch eine dynamische Anzeige der Spannung während des Kompressionstests möglich (das Video befindet sich auf dem beiliegenden Datenträger und ist unter folgendem Link auf der Video-Plattform YouTube aufrufbar: <https://youtu.be/o23bXqvh4pU>).

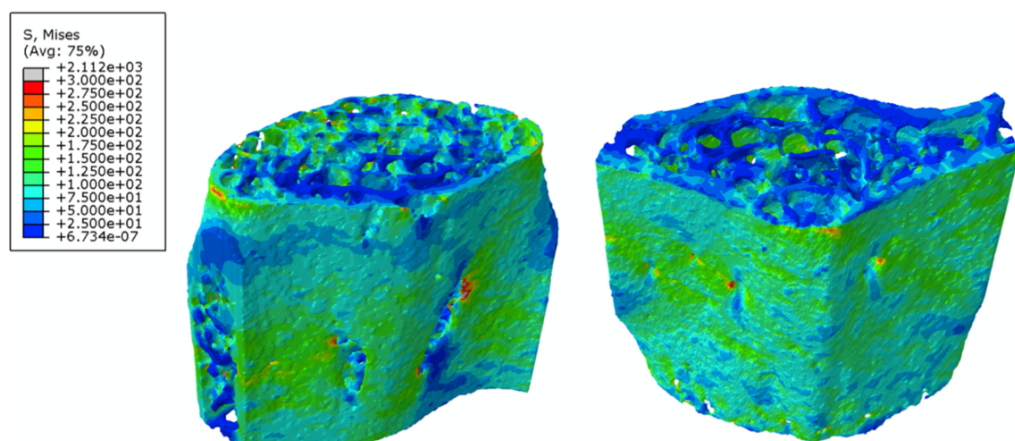


Abbildung 22: Verteilung der Von-Mises-Vergleichsspannung.

Farbkodierte Darstellung der Vergleichsspannung in N/mm^2 (Legende links oben) in Bezug auf einen WT Wirbelkörper. Links: Ansicht von caudo-dorsal. Rechts: Ansicht von cranio-

Ergebnisse

ventral. Durch die farbige Darstellung der Spannung lassen sich besonders belastete Bereiche (hier z.B. die Austrittspunkte der Venae basivertebralis) identifizieren.

Die Spannung verteilte sich homogen über die Kortikalis. An den Foramina, durch die die Gefäße (u.a. die Venae basivertebralis) zogen, fanden sich vereinzelt Spannungsspitzen (rot dargestellt). Um die Von-Mises-Vergleichsspannung der Trabekel im Inneren der Wirbelkörper zu untersuchen, wurde im Anschluss die Spannungsverteilung zwischen den drei Gruppen in den Koronal- sowie Transversalebene verglichen (Abbildung 23). Dabei zeigte sich ebenfalls eine weitestgehend homogene Spannungsverteilung ohne sichtbare Unterschiede zwischen den Gruppen. In der Koronalebene war eine höhere Spannung in den mittleren Trabekeln in allen Gruppen erkennbar.

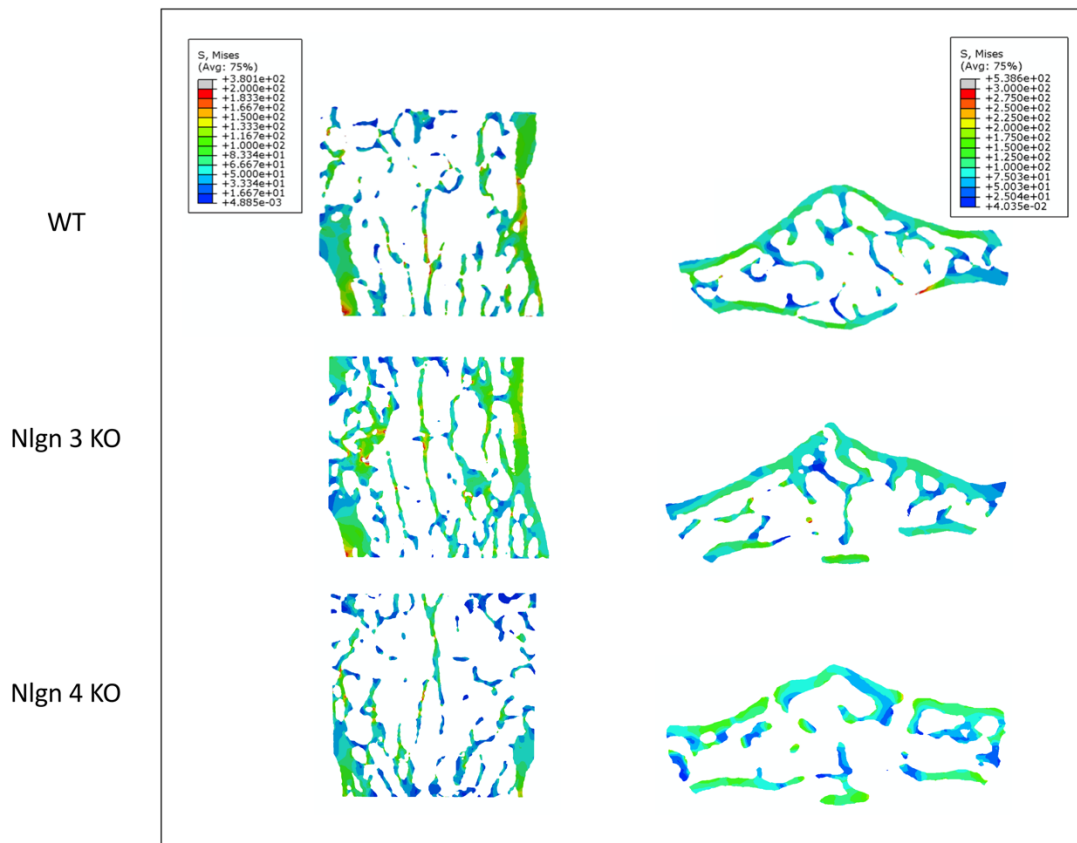


Abbildung 23: Schnittbilder der Von-Mises-Spannung.

Farbkodierte Darstellung der Vergleichsspannung in N/mm² (siehe jeweilige Legende oben).

Linke Spalte: Koronale Schnittebene. Rechte Spalte: Transversale Schnittebene.

In der Koronalebene zeigen die mittleren Trabekel aller Gruppen eine höhere Von-Mises-Spannung.

3.5.2 Strukturkonstanten der Wirbelkörper

Um den Einfluss der Architektur des Knochens auf die Steifigkeit zu untersuchen, wurde die Strukturkonstante berechnet. Diese Konstante ist unabhängig vom verwendeten E-Modul.

Hierbei zeigten sich, im Vergleich zu den WT Proben (Mittelwert \pm Standardabweichung; Gruppengröße: $214,83 \mu\text{m} \pm 41,51 \mu\text{m}$; $n=6$), höhere Werte bei den Nlgn-3 KO Wirbelkörpern ($238,28 \mu\text{m} \pm 36,92 \mu\text{m}$; $n=4$). Die Nlgn-4 KO Wirbelkörper ($195,27 \mu\text{m} \pm 23,58 \mu\text{m}$; $n=6$) wiesen dagegen kleinere Strukturkonstanten auf. (Abbildung 24) Diese Unterschiede waren nicht statistisch signifikant.

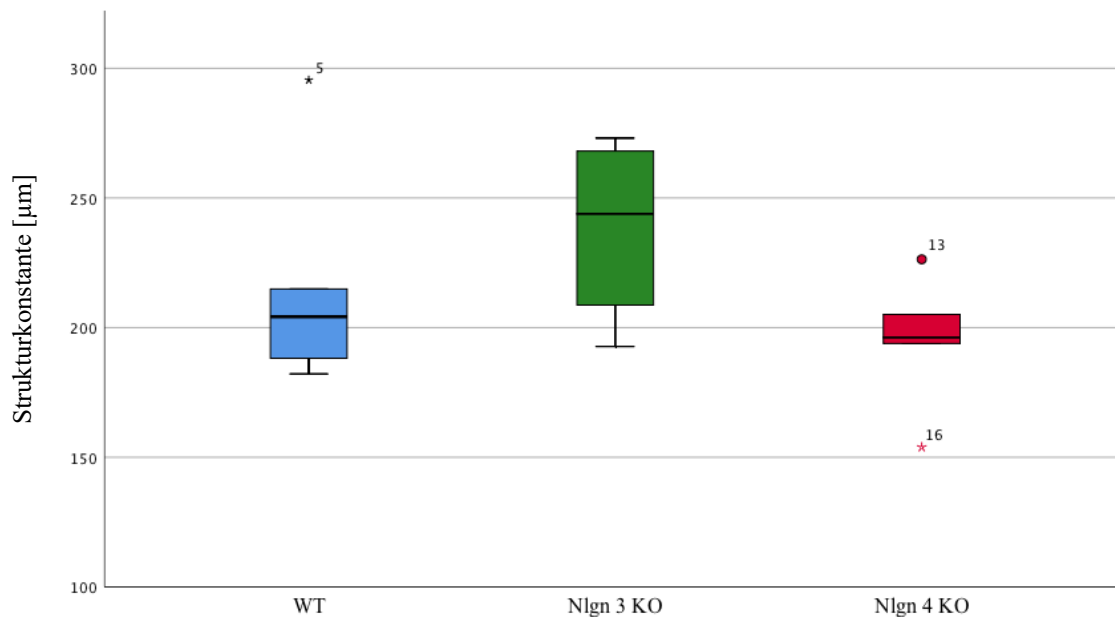


Abbildung 24: Boxplot der Strukturkonstanten.

Die Strukturkonstante ist ein Maß für den Einfluss der Knochenarchitektur auf die Steifigkeit. Die Strukturkonstanten der Nlgn-3 KO Gruppe lagen im Vergleich mit den beiden anderen Gruppen etwas höher.

3.5.3 Errechneter mikroskopischer E-Modul

Wie in Kapitel 2.9 beschrieben, konnte der mikroskopische Elastizitätsmodul durch Skalierung der simulierten auf die biomechanisch gemessene Steifigkeit bestimmt werden. Hierbei war der Mittelwert des mikroskopischen E-Moduls der Nlgn-3 KO Gruppe (Mittelwert \pm Standardabweichung; Gruppengröße: $238,78 \text{ MPa} \pm 153,17 \text{ MPa}$; $n=4$) um 17 % niedriger gegenüber der WT Gruppe ($287,38 \text{ MPa} \pm 122,73 \text{ MPa}$; $n=6$) und der Nlgn-4 KO Gruppe ($287,12 \text{ MPa} \pm 120,08 \text{ MPa}$; $n=6$) (Abbildung 25). Auch bei diesen Werten zeigte sich eine große Streuung und keine statistische Signifikanz.

Ergebnisse

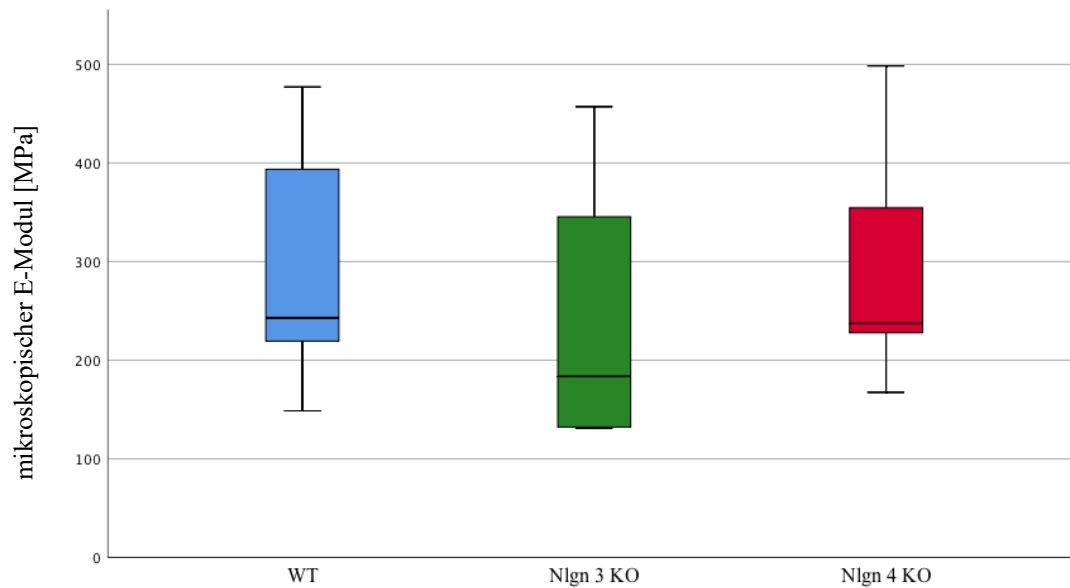


Abbildung 25: Boxplot der mikroskopischen E-Moduln.

Der Median der Nlgn-3 Gruppe liegt deutlich unter den beiden anderen. Es liegt eine breite Streuung in allen drei Gruppen vor.

3.6 Protokoll zur Erstellung und Simulation von FE-Modellen

Da die Methode der Finiten Elemente zur Analyse von biomechanischen Eigenschaften des Knochengewebes auf mikroskopischer Ebene im Vergleich zu anderen Methoden noch nicht so weit verbreitet ist und vor dieser Arbeit kein bereits etabliertes Protokoll für das Labor der Experimentellen Unfallchirurgie in Gießen bestand, war dies ein Ziel dieser Arbeit.

Das Vorgehen gliederte sich in die in Abbildung 26 dargestellten Schritte.

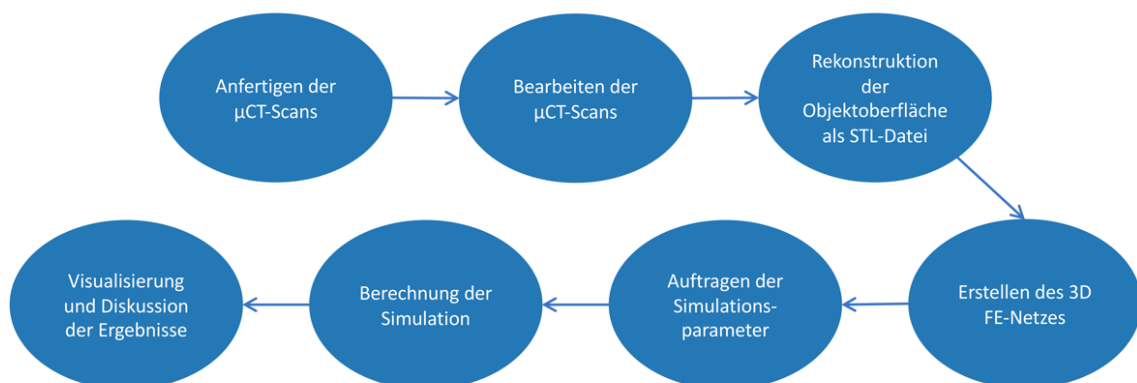


Abbildung 26: Schematische Darstellung der Hauptschritte.

Erster Schritt war das Scannen der Knochenproben mittels μ CT. Diese Scans mussten anschließend bearbeitet (dazu gehörte das korrekte Ausrichten entlang der cranio-caudalen Achse sowie das Entfernen der Deck- und Grundplatten) und segmentiert werden. Danach

Ergebnisse

folgte die Rekonstruktion der Oberfläche als STL-Datei. Die Oberfläche wurde im nächsten Schritt mit dem 3D-FE-Netz ausgefüllt. Auf das so entstandene 3D-Modell des Wirbelkörpers wurden die Simulationsbedingungen aufgetragen. Nun konnte die Simulation am PC berechnet werden. Danach wurden die Resultate visualisiert und analysiert.

Zu beachten war die Wahl der geeigneten Softwarelösungen für die einzelnen Schritte sowie geeignete Dateiformate um den unkomplizierten Datenaustausch zwischen den Programmen zu ermöglichen. Gleichzeitig mussten unterschiedliche Parameter in den Programmen getestet und verändert werden bis der Workflow vom μ CT-Scan bis zur Visualisierung der Simulationsergebnisse letztendlich standardisiert funktionierte. Zur einfacheren Replizierbarkeit wurde das Vorgehen am Bildschirm aufgezeichnet und zu einem Video-Tutorial geschnitten. Zudem wurde ein Protokoll über die Schritte, die benötigten Softwarelösungen und die nötigen Einstellungen entwickelt.

Das Video befindet sich auf dem beiliegenden Datenträger und kann zusätzlich unter folgendem Link oder mittels QR-Code (Abbildung 27) auf der Video-Plattform YouTube abgerufen werden: https://youtu.be/_P1h6jz2LoU



Abbildung 27: QR-Code zu dem Tutorial Video auf YouTube.

Dieser QR-Code kann mit einem mobilen Endgerät gelesen werden, und führt zu dem in dieser Arbeit erstellten Tutorial-Video auf YouTube. In dem Video sind alle Schritte zur Erstellung und Simulation des FE-Modells aufgezeichnet. Dies dient der besseren und schnelleren Replizierbarkeit für weitere Forschungsvorhaben in dem Feld der Finite-Elemente-Methode.

4 Diskussion

4.1 Einflüsse auf die Knochenmineraldichte

Jugendliche Patienten mit einer Autismus-Spektrum-Störung (A-S-S) weisen eine niedrigere Knochenmineraldichte sowie eine beeinträchtigte Mikroarchitektur auf. Ferner erleiden sie häufiger Frakturen. Die Ursachen hierfür sind noch nicht abschließend geklärt. (Neumeyer et al. 2015; Neumeyer et al. 2017)

Um die Auswirkungen des Fehlens der Nlgn-3 und Nlgn-4 Gene als Kandidatengene einer A-S-S auf die Knochenmineraldichte der Wirbelkörper zu messen, wurden die TMD und BMD Werte bestimmt. Bei den volumetrisch mittels μ CT Aufnahmen bestimmten Knochenmineraldichten TMD und BMD lagen die Mittelwerte nahe beieinander ohne signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen. Das Fehlen des Nlgn-3 oder Nlgn-4 Gens wirkte sich also nicht signifikant auf die Knochenmineraldichte der Wirbelkörper aus. Bei der Literaturrecherche fanden sich keine weiteren Studien, die sich mit der Knochendichte bei Nlgn-3/4 KO Mäusen beschäftigten. Eine Einordnung der Ergebnisse ist also nicht möglich.

Die mittlere TMD der WT Gruppe betrug in dieser Arbeit 858,53 mgHA/cm³. Dieser Wert ist ähnlich wie in bereits publizierten Arbeiten. So betrug die mittlere TMD eines C57BL/6J-Maus Femurs in der von Khajuria et al. veröffentlichten Studie 847,03 mgHA/cm³. Dies entspricht einem relativen Unterschied von 1,36 %. (Khajuria et al. 2018)

Neben der TMD und BMD ist das Verhältnis von Knochenvolumen zu Gesamtvolumen (BV/TV) ein weiterer wichtiger morphometrischer Parameter zur Beurteilung der Knochenstruktur. In der Literatur wurde gezeigt, dass dieses Verhältnis bei Prozessen die zu einer verminderten Knochenqualität führen herabgesetzt ist (Böcker et al. 2014; Müller et al. 2019). In dieser Arbeit war der Mittelwert des BV/TV Verhältnis in der WT Gruppe mit 41,29 % am höchsten, knapp gefolgt von Nlgn-4 KO (40,62 %) und Nlgn-3 KO (40,48 %). Das BV/TV zeigte in dieser Arbeit also keinen relevanten Unterschied zwischen den Gruppen. Somit ist davon auszugehen, dass das Fehlen des Nlgn-3 oder Nlgn-4 Gens zu keiner Reduktion des Knochenvolumens führt. Zusammenfassend fanden sich keine statistisch signifikanten Änderungen der Knochenmineraldichte oder des relativen Knochenvolumens zwischen den drei Gruppen.

A-S-S können durch Defekte in verschiedenen Genen, bzw. Gen-Orten entstehen (Betancur 2011). Die Ursache der eingangs erwähnten Reduktion der Knochendichte bei

Diskussion

Patienten mit A-S-S kann also Resultat einer Störung eines der anderen mit A-S-S assoziierten Genen sein. Neben einer genetischen Ursache können auch andere Faktoren ursächlich für die verminderte Knochenmineraldichte sein. Im Folgenden werden einige von diesen Erklärungsansätzen dargestellt.

Medikamentennebenwirkungen: Zur Verringerung von Symptomen, wie Gereiztheit, Hyperaktivität oder selbstverletzendes Verhalten finden Antipsychotika (z.B. Risperidon) breite Verwendung in der medikamentösen Behandlung autistischer Patienten (McDougle et al. 2008). Diese Medikamente haben jedoch ein Vielzahl nachgewiesener Nebenwirkungen, besonders auf das metabolische und endokrine System. So kann als unerwünschte Wirkung eine Hyperprolaktinämie auftreten. Prolaktin wiederum beeinflusst den Knochenstoffwechsel zugunsten des Knochenabbaus. Zusätzlich wirkt Prolaktin hemmend auf die Sexualhormonsynthese und führt dadurch zu einem geringerem Knochenwachstum, vor allem bei Kindern. Roke et. al. untersuchten in einer Studie den Effekt von einer medikamentösen antipsychotischen Therapie auf den Prolaktinspiegel und die Knochendichte von männlichen Jugendlichen im Alter von 10 bis 20 Jahren. In der Studie bestand bei 49 % der behandelten Jungen eine Hyperprolaktinämie. Dabei wiesen die Kinder mit Hyperprolaktinämie einen signifikant niedrigeren mittleren volumetrischen BMD Z-Score der lumbalen Wirbelsäule auf ($p = 0,043$). (Roke et al. 2012)

Diese steroid-ähnliche Nebenwirkung wurde für die beiden einzigen von der US-Behörde für Lebens- und Arzneimittel (*U.S. Food and Drug Administration (FDA)*) zur Therapie der Gereiztheit bei A-S-S Patienten zugelassenen atypischen Antipsychotika Risperidon und Aripiprazol bereits in der Literatur nachgewiesen (Becker et al. 2003; Wang et al. 2014; Wink et al. 2017).

Medikamentennebenwirkungen können also einen Einfluss auf die Knochendichte bei autistischen Patienten haben.

Calcium-Aufnahme und körperliche Aktivität: Neumeyer et al. zeigten, dass männliche Jugendliche mit A-S-S eine, im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe, verminderte Calciumaufnahme durch die Nahrungsaufnahme und Ergänzungsmittel hatten. Ferner konnten sie zeigen, dass die geringere Calciumaufnahme negativ mit der Knochenfestigkeit korrelierte.

Zudem gab es in der Studie deutliche Unterschiede bezüglich der körperlichen Aktivität zwischen den Gruppen. So waren 72,7 % der Jugendlichen der Kontrollgruppe körperlich sehr aktiv, wohingegen der Anteil körperlich sehr aktiver Probanden in der A-S-S

Kohorte nur bei 20 % lag. Gerade in der Adoleszenz wirkt sich körperliche Betätigung und mechanische Belastung positiv auf die Knochenfestigkeit aus. (Neumeyer et al. 2017)

So sind, neben Medikamentennebenwirkungen und endokrinen Faktoren, eine verminderte Nährstoffaufnahme und geringere körperliche Aktivität weitere mögliche Ursachen für die beobachteten negativen Veränderungen in Knochendichte und -architektur sowie Knochensteifigkeit bei Personen mit A-S-S. Der Einfluss dieser exogenen Faktoren muss in weiteren Studien beachtet und genauer untersucht werden.

4.2 Biomechanische Steifigkeit

Wichtige Parameter, welche das Verhalten eines Knochens unter Belastung charakterisieren, sind zum einen die maximale Tragkraft, zum anderen die Steifigkeit. Die Kraft, die ein Knochen gerade noch tragen kann ohne zu frakturieren bezeichnet man als Maximallast oder Tragkraft. Sie hängt von der Knochenstruktur und der Zusammensetzung des Knochengewebes ab. Die Steifigkeit eines Knochens bestimmt die elastische Deformation unter Belastung. Auch sie setzt sich sowohl aus den Eigenschaften des Knochengewebes, hier insbesondere des Gewebe-spezifischen E-Modul, und des makroskopischen Aufbaus zusammen. (Jepsen et al. 2015)

Die vorher genannten Parameter sind essenziell um die Auswirkungen einer Krankheit auf die mechanische Kompetenz des Knochens zu quantifizieren. Sie werden meistens mit Hilfe von biomechanischen Testungen bestimmt.

Der Mittelwert der biomechanisch bestimmten Steifigkeit der WT Gruppe war mit 63,49 N/mm am höchsten, gefolgt von der Nlgn-3 KO Gruppe mit 57,09 N/mm, die Nlgn-4 KO Mäuse wiesen einen deutlich niedrigeren Mittelwert von 49,27 N/mm auf.

Die Minimalwerte der Gruppen lagen mit 31,45 N/mm (WT), 29,95 N/mm (Nlgn-3 KO) und 29,69 (Nlgn-4 KO) nahe beieinander. Bei den Maximalwerten zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. So wiesen die WT Wirbelkörper den höchsten Wert (93,90 N/mm) auf, gefolgt von der Nlgn-3 KO Gruppe (88,09 N/mm). Die maximale Steifigkeit der Nlgn-4 KO Gruppe lag mit 76,71 N/mm deutlich niedriger (18% niedriger im Vergleich zur WT Gruppe). Möglicherweise führt also das Fehlen des Nlgn-4 Gens zu einem herabgesetzten Widerstand gegen Verformungskräfte.

Diskussion

Gleichzeitig fiel eine hohe Streuung der jeweiligen Einzelwerte auf. Dieser Effekt wird häufig in biomechanischen Testungen von Knochen, besonders bei Kleintieren, beobachtet (Brouwers et al. 2009; Pendleton et al. 2018).

Für die Gruppenunterschiede konnte keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden. Dies kann Folge der breiten Streuung der Ergebnisse und der niedrigen Tieranzahl sein. Der Mittelwert der in dieser Arbeit biomechanisch bestimmten Steifigkeit der WT Mäuse betrug 63,49 N/mm. Werte in bereits publizierten Arbeiten reichen von 20 N/mm (Bokhari et al. 2019) über 108 N/mm (M P Akhter et al. 2004) bis ca 260 N/mm (Christiansen et al. 2015). Im Vergleich dazu liegt der in dieser Arbeit gemessene Wert im unteren Drittel der Spannweite. Im Nachfolgenden werden mögliche Gründe hierfür diskutiert.

Die Deckplatten der Wirbelkörper sind sehr uneben geformt. Aufgrund der geringen Größe der Mauswirbelkörper konnten diese Deckplatten jedoch nicht ohne Zerstörung des Wirbelkörpers entfernt werden. Dies führte zu einer ungleichmäßigen Verteilung der komprimierenden Kraft. Daraus ergaben sich lokale Mehrbelastungen, die zu einer größeren Verformung des Objektes bei niedrigeren Kompressionskräften führten. *In vivo* gleichen die Bandscheiben diese Unebenheiten aus, ermöglichen so eine gleichmäßigere Druckverteilung und führen dadurch zu einer höheren Stabilität der Wirbelsäule bei axialer Krafteinwirkung.

Zusammenfassend fällt auf, dass bereits publizierte Werte für die biomechanisch bestimmte Steifigkeit eine große Streuweite haben, da eine einheitliche Druckverteilung bei den kleinen Wirbelkörpern schwierig zu realisieren ist. Dieser Umstand verdeutlicht wie wichtig die Etablierung neuer reliabler Methoden zur Bestimmung biomechanischer Eigenschaften von kleinen Testobjekten ist. Dies kann unter anderem mit Hilfe der Methode der Finiten Elemente realisiert werden.

Mögliche Verbesserungsvorschläge für den analogen Kompressionstest werden im Folgenden genannt.

Um eine gleichmäßigere Kraftauftragung zu erreichen bettete die Arbeitsgruppe um M. Pendleton den Wirbelkörper zuerst in Polymethylmethacrylat ein, so dass anschließend die Grund- und Deckplatten mit einem Mikrotom entfernt werden konnten. So entstanden zwei parallele ebene Flächen (Pendleton et al. 2018).

Alternativ können zwei Akrylplatten mittels Kleber auf den Deckplatten befestigt werden um eine parallele, gleichförmige Kompression zu erreichen (Silva et al. 2004; Steinke et al. 1999).

Gelingt es mit oben beschriebenen Methoden eine gleichmäßigere und damit auch eine besser vergleichbare Kraftauftragung zu gewährleisten, kann dies zu einer geringeren Streubreite und reproduzierbareren Ergebnissen vor allem bei kleinen Kohorten führen.

4.3 Beeinflussung des Simulationsergebnisses durch verschiedene Parameter

Viele verschiedene Faktoren übten einen Einfluss auf die Ergebnisse der Simulation aus. In diesem Kapitel wird auf diese Parameter eingegangen und dargestellt wie sie sich auf das Ergebnis auswirkten und wie sich mit diesen Erkenntnissen die Vorhersagegenauigkeit der Simulation verbessern ließ.

4.3.1 μ CT-Aufnahmen und Extraktion des Oberflächennetzes

Je nach gewünschten Anforderungen an die Simulation müssen die verwendeten Bilddateien gewählt werden. Da in dieser Arbeit auch die Belastung der einzelnen trabekulären Strukturen des Knochens unter Kompression untersucht werden sollten, mussten die Aufnahmen eine dementsprechend hohe Auflösung aufweisen. Nur so war es möglich, die einzelnen Trabekel darzustellen und zu unterscheiden. Aus diesem Grund wurden die Mauswirbelkörper mit einer isotropen Voxelgröße von $(10,5 \mu\text{m})^3$ gescannt. Mit dieser Auflösung war es gut möglich, die Scans zu segmentieren und für das Modell zu verwenden.

Ähnliche Werte wurden auch in der Literatur benutzt: so scannten Müller et al. ihre Proben (Rattenwirbelkörper) mit einer Voxelgröße von $(8 \mu\text{m})^3$, wohingegen Nyman et al. für Mauswirbelkörper $(12 \mu\text{m})^3$ große Voxel nutzten (Müller et al. 2014; Nyman et al. 2015).

Bei der Extraktion der Oberfläche und deren Darstellung als Netz aus Dreiecken übte die Länge der Dreieckskanten einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf das Endergebnis aus. So unterschieden sich die errechneten Steifigkeiten der (ansonsten identischen) Modelle mit der größten und kleinsten Kantenlänge um 33,7 %. Je kleiner die Dreiecke waren, desto genauer entsprach das Netz der Oberfläche des Knochens und desto kleiner war die zum komprimieren benötigte Kraft. Eine mögliche Erklärung für die Zunahme der Steifigkeit mit zunehmender Kantenlänge ist die daraus resultierende Vergrößerung der trabekulären Strukturen und die Entstehung von Verbindungen, die es im echten Knochen nicht gab. Aus diesem Grund wurde mit 0,01 mm die kleinste

Kantenlänge gewählt. Dies resultierte zwar in einer höheren Anzahl an Dreiecken, repräsentierte aber genauer die wahre Architektur des Knochens.

4.3.2 Konversion der Oberfläche in das FE Netz

Vor der Simulation war es notwendig, das vom Oberflächennetz begrenzte, leere Volumen mit den Finiten Elementen zu füllen. Ebenso hatte in diesem Schritt die Größe bzw. Anzahl der Elemente einen Einfluss auf das spätere Ergebnis. So verringerte sich die errechnete Steifigkeit je mehr Elemente verwendet wurden. Ab 1.000.000 verwendeter Elemente waren die Änderungen im Ergebnis jedoch nur sehr gering. Dieser Effekt liegt in der Natur der Methode, da sie nicht auf einer analytischen Berechnung, sondern auf einer Diskretisierung des untersuchten Objekts basiert. Mit feiner werdendem Netz, also mehr Elementen, nähert sich die Simulation dem wahren Ergebnis an.

Gleichzeitig stieg mit einem dichteren Netz die Rechenzeit, da das Programm die Verschiebungen und Kräfte an jedem Knotenpunkt berechnen muss und ein dichteres Netz logischerweise mehr Knotenpunkte besitzt.

Für die Simulation des Kompressionstests wurden Modelle mit ungefähr 2.000.000 Elementen benutzt. Die Verwendung von mehr Elementen hatte nur einen geringen Einfluss auf das Ergebnis, trieb jedoch aufgrund des begrenzten Arbeitsspeichers die Rechenzeit in die Höhe, so dass es nicht sinnvoll war, noch dichtere Netze zu verwenden. Die adäquate Anzahl an Elementen ist je nach simuliertem Vorgang unterschiedlich. Deswegen wird in der Literatur empfohlen zuerst die Simulation mit unterschiedlich dichten FE Netzen durchzuführen und dementsprechend die angemessene Zahl an Elementen zu wählen. Dieser Vorgang wird auch Konvergenzstudie genannt. (Bright & Rayfield 2011; Li et al. 2010).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wahl der Parameter zur Modellerstellung einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf das Endergebnis hat. Gleichzeitig beeinflussen sie maßgeblich den Rechenaufwand. Es ist daher empfehlenswert, diesen Einfluss in Testdurchläufen zu untersuchen. Aus diesen Erkenntnissen können anschließend die am besten geeigneten Parameter für die gewünschte Simulation gewählt werden.

4.3.3 Wahl des verwendeten E-Moduls

Neben den vorher bereits erwähnten Parametern bei der Erstellung des Modells, beeinflusste auch der gewählte E-Modul die errechnete Steifigkeit.

Damit das Programm Abaqus die Simulation berechnen konnte, musste den Elementen ein Wert für deren elastische Eigenschaften gegeben werden.,

Die Werte können homogen allen Elementen zugewiesen werden, es können Elementgruppen mit unterschiedlichen Werten definiert werden oder es kann heterogen jedem Element ein spezifischer Wert gegeben werden.

Gerade aber bei biologischen Geweben wie Knochen ist es aufgrund von inter- sowie intraindividuellen Differenzen schwierig einheitliche Werte in der Literatur zu finden. Der exakte spezifische Wert lässt sich letztendlich nur durch experimentelle Testungen herausfinden.

Gleichzeitig wird eine homogene Verwendung des selben E-Moduls für alle Elemente nicht den lokalen Unterschieden in Mineralisation und Zusammensetzung des Knochens gerecht. Nyman et. al verglichen in Ihrer Studie unter anderem den Einfluss einer homogenen Zuweisung der elastischen Eigenschaften mit der Element spezifischen Zuweisung je nach lokaler TMD und kamen zu dem Ergebnis, dass die Modelle mit der Element spezifischen Zuweisung eine leicht verbesserte Vorhersagegenauigkeit hatten. Die Unterschiede waren jedoch sehr gering. (Nyman et al. 2015)

Mit Hilfe der aus biomechanischer Testung ermittelten Steifigkeit lässt sich der exakte E-Modul jedes Wirbelkörpers durch Finite Elemente Analyse berechnen. Um in Zukunft biomechanische Testungen nur mittels FEM durchzuführen, muss der mikroskopische E-Modul auf andere Weise bestimmt werden. Eine Möglichkeit hierfür stellt die Nanoidentierung dar. Bei dieser Methode dringt eine kleine Testspitze mit bekannter Geometrie in die zu testende Struktur (beispielsweise einen Trabekel) ein. Dabei wird die benötigte Kraft sowie die Eindringtiefe gemessen und darüber der Elastizitätsmodul auf mikrostruktureller Ebene bestimmt. Nachteil dieser Methode sind der hohe Aufwand sowie das benötigte spezielle Equipment. (Donnelly 2011)

Gleichzeitig gibt es Bestrebungen sich diesem Wert über die Knochenmineraldichte anzunähern. Die Hypothese dahinter ist, dass die mineralische Zusammensetzung des Knochens und dadurch die im μ CT gemessene Knochenmineraldichte die elastischen Eigenschaften bestimmen. So wird der E-Modul mittels mechanischen Testverfahren, wie beispielsweise der Nanoidentierung, bestimmt und mit der gemessenen

Knochenmineraldichte in Relation gesetzt. Aus den dadurch entstanden Graphen werden mathematische Formeln abgeleitet. Von diesen unter dem Begriff „*elasticity-density-relationship*“ veröffentlichten Relationen gibt es viele verschiedene. Je nach Veröffentlichung schwanken jedoch die mit den unterschiedlichen Formeln errechneten elastischen Eigenschaften sehr stark. Helgason et. al verglichen in einem Review einige unterschiedliche Formeln. Sie kamen zu dem Schluss, dass neben methodologischen Differenzen noch andere verschiedene Faktoren die Wahl der richtigen Formel beeinflussen. So sollten bei der Wahl unter anderem auch die getestete Spezies, der anatomische Entnahmeort der Probe sowie die mechanische Testmethode berücksichtigt werden. (Helgason & Perilli 2017)

Mit dieser Methode können biomechanische Tests mittels FEM simuliert werden. So können Aussagen über die mechanische Stabilität ohne die Zerstörung von Probenmaterial getroffen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Wahl des E-Moduls einen großen Einfluss auf die Steifigkeit der simulierten Wirbelkörper hat. Durch unterschiedliche Formeln lässt sich der E-Modul aus der TMD annähern. Die in dieser Arbeit eingesetzte Skalierung mittels analogem biomechanischem Kompressionstest stellt eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung des E-Moduls dar.

4.4 Von-Mises-Vergleichsspannung

Aufgrund der hohen Auflösung der μ CT Aufnahmen im Mikrometer-Bereich war es möglich die trabekulären Strukturen der Wirbelkörper in dem FE Modell zu berücksichtigen. Nach der Simulation konnte so die Von Mises Vergleichsspannung in den einzelnen Trabekeln angezeigt werden (Kapitel 3.5.1). Auch eine dynamische Darstellung der Verteilung während der Kompression war möglich. Mithilfe dieser Vergleichsspannung lassen sich mögliche Schwachstellen an denen es zu einem Bruch kommen kann identifizieren. Die Regionen mit Spannungsmaxima sind besonders gefährdet. Krankhafte Veränderungen der Knochenstruktur und des Knochenaufbaus, wie beispielsweise eine verminderte Anzahl an Trabekeln, führen zu einer ungleichmäßigen Verteilung der Spannung und dadurch zu Spannungsspitzen, die zu einem Bruch führen können.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass sich die Spannung homogen über Kortikalis und Trabekel verteilte. Einzelne Maxima fanden sich in der Kortikalis an den Ein-

/Austrittsstellen der Gefäße. Die Trabekel in der Wirbelkörpermitte waren im Gegensatz zu den peripheren Trabekeln höheren Spannungen ausgesetzt. Die drei Gruppen zeigten eine ähnliche Verteilung und Höhe der Vergleichsspannung. Die Knochenarchitektur der verschiedenen Gruppen war also in der Lage, die einwirkenden Kräfte gleichmäßig zu verteilen.

In der Arbeit von Müller et al. zeigte sich eine vergleichbare Spannungsverteilung in den gesunden Wirbelkörpern. Auch hier waren die mittleren Trabekel höheren Spannungen ausgesetzt und somit anfälliger für Frakturen. Die Von-Mises-Vergleichsspannung der mittleren Trabekeln in den osteoporotischen Rattenwirbelkörper war in etwa zehnfach höher als in der Kontrollgruppe. (Müller et al. 2014)

Die Darstellung der Verteilung der Mises-Vergleichsspannung liefert einen deutlichen Zugewinn an Informationen (z.B. die Identifizierung besonders frakturgefährdeter Regionen) und ist nur durch die Durchführung von μ FE Simulationen möglich.

4.5 Mittels FEM berechnete biomechanische Eigenschaften

Wie bereits eingangs erwähnt, ist es für das Verständnis und die Behandlung von muskuloskelettalen Erkrankungen enorm wichtig die biomechanischen Veränderungen des Knochens zu erfassen. Die mikroskopischen Gewebeeigenschaften wie der E-Modul der mineralisierten Matrix bestimmen zusammen mit dem Aufbau der Knochenstruktur (ein Parameter hierfür ist die Strukturkonstante) das biomechanische Verhalten unter Belastung. In dieser Arbeit wurden beide Faktoren an Mauswirbelkörpern bestimmt.

4.5.1 Strukturkonstante

Durch die Durchführung der Simulation an den μ CT-Aufnahmen mit willkürlich gewähltem E-Modul und nachfolgender Elimination durch Division dieses Wertes aus der Gleichung konnte die Strukturkonstante bestimmt werden. Diese Konstante hängt bei jedem Wirbelkörper nur von seiner morphologischen Struktur ab und ist ein Parameter, der sich direkt aus der FEM bestimmen lässt. Die Werte dieser Konstante ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Die Mittelwerte von den WT- und Nlgn-4 KO-Mäusen unterschieden sich kaum. Der Mittelwert der Nlgn-3 KO-Tiere lag etwas höher. Da es auch schon beim im μ CT gemessenen Verhältnis von Knochengewebe zu Gesamtgewebe (BV/TV) keine signifikanten Unterschiede gab, ist es

nicht überraschend dass sich auch die Strukturkonstanten der Gruppen nicht signifikant unterscheiden.

Da andere Arbeitsgruppen FE Simulationen mit unterschiedlichen Materialeigenschaften durchführen, dient die Strukturkonstante zusätzlich dem Vergleich und Einordnung der Ergebnisse mit bereits veröffentlichten Daten.

So untersuchte die Gruppe um Liu et al. unter anderem Unterschiede in der mittels FEM berechneten Steifigkeit von laktierenden vs. nicht laktierenden Mäusen. Für die Erstellung des FE Modells aus μ CT-Aufnahmen gingen sie ähnlich wie in dieser Arbeit vor und bestimmten so die Steifigkeit bei einem E-Modul von 15 GPa. Die mittlere Steifigkeit der Kontrollgruppe (gesunde, nicht laktierende, weibliche Mäuse im Alter von 10 bis 13 Wochen) errechneten sie mit 3,1 kN/mm. (Liu et al. 2012)

Teilt man nun die Steifigkeit durch den verwendeten E-Modul erhält man die Strukturkonstante, die bei 206,67 μ m lag. Verglichen mit der in dieser Arbeit errechneten mittleren Strukturkonstante der Wildtyp Mauswirbelkörper von 214,83 μ m ergibt sich ein relativer Unterschied von 3,95 %. Das hier vorgestellte Vorgehen liefert also vergleichbare Ergebnisse wie bereits etablierte und publizierte Methoden.

4.5.2 Mikroskopischer E-Modul

Der mikroskopische E-Modul, in englischsprachiger Literatur häufig als *tissue modulus* bezeichnet, ist eine intrinsische Eigenschaft des Knochengewebes. Krankhafte Veränderungen der Knochenmineralisation und des Knochenaufbaus führen zu einer Erniedrigung des Wertes, was wiederum mit einer verminderten Knochenfestigkeit und einer erhöhten Frakturgefährdung einhergeht. Durch seine Bestimmung lassen sich Aussagen über den Zustand des Knochengewebes treffen (Müller et al. 2014).

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich der E-Modul zusammen mit der Mikroarchitektur des Knochens proportional auf die Steifigkeit auswirkte. Für das Ergebnis war es also entscheidend welcher Wert für den E-Modul den tetraedrischen Elementen zugewiesen wurde. Da dieser Wert jedoch bestimmt werden soll, wurde ein beliebiger Wert gewählt. Mit diesem Wert wurde dann die Simulation durchgeführt und die Steifigkeit bestimmt. Mithilfe der Annahme, dass die simulierte Steifigkeit der experimentell gemessenen Steifigkeit entsprechen muss, wurde der wahre mikroskopische E-Modul durch Skalierung der simulierten Steifigkeit auf die experimentellen Werte bestimmt.

Diskussion

Der Mittelwert des so berechneten mikroskopischen E-Modul war in den Nlgn-3 KO Mäusen (238,78 MPa) deutlich, jedoch nicht statistisch signifikant, niedriger als in den WT (287,38 MPa) und Nlgn-4 KO (287,12 MPa) Gruppen. Die Wirbelkörper der Nlgn-3 KO Mäuse wiesen also herabgesetzte mikroskopische biomechanische Eigenschaften auf. Auch die Werte des mikroskopischen E-Modul wiesen eine breite Streuung auf. Dies ist der Tatsache geschuldet, dass der mikroskopische E-Modul durch Skalierung der FEM Ergebnisse mit den Ergebnissen des Kompressionstest, die ebenfalls eine weite Streuung aufwiesen, berechnet wird.

Publizierte Werte des mittels Nanoindentierung bestimmten gewebespezifischen E-Modul der hier verwendeten Mausart (C57BL/6J) liegen mit 13,6 GPa (M. P. Akhter et al. 2004) deutlich über den in dieser Arbeit errechneten Werten. Die Arbeitsgruppe um Müller et al. berechneten den mikroskopischen E-Modul für osteoporotische und gesunde Rattenwirbelkörper auf dieselbe Weise wie in dieser Arbeit und kamen auf ähnlich niedrige Werte (200 – 900 MPa) (Müller et al. 2014).

Mögliche Ursachen für die Diskrepanz der Werte zwischen der hier vorgestellten und der Nanoindentierung Methode werden nachfolgend erörtert.

Die mittels μ CT bestimmte Dicke der Trabekel und das Knochenvolumen ist größer als histomorphometrisch bestimmt (Chappard et al. 2005). Dadurch wird das Knochenvolumen und die Trabekelstärke auch im FE Modell überschätzt, was zu einer höheren berechneten Steifigkeit und dadurch zu einem niedrigeren mikroskopischen E-Modul führt. Ursächlich für diesen Effekt sind Voxel, die zum Teil von Knochen ausgefüllt werden. Je größer die Voxelgröße und je kleiner die trabekulären Strukturen, desto ausgeprägter ist dieser Effekt. (Müller et al. 2014)

Da der mikroskopische E-Modul in dieser Arbeit indirekt mithilfe der Biomechanik-Ergebnisse berechnet wurde und diese im Vergleich mit anderen Publikationen eher niedrig waren, führt dies zu einer weiteren Unterschätzung des mikroskopischen E-Moduls. Gleichzeitig gab es geringe Abweichungen der Kraftauftragung zwischen der Simulation und den Kompressionstests. So wurden die Deckplatten in der FEM abgenommen, was zu einer perfekten axialen Kompression führte. In den biomechanischen Testungen war dies nicht möglich. Dieser Umstand konnte zu einer Abweichung der relativen Ausrichtung des Wirbelkörpers zu den Zylindern der Testmaschine und dadurch zu keiner perfekten Kompression entlang der cranio-caudalen Achse führen (Müller et al. 2014).

Aufgrund des Studiendesigns wurden die FEM an den L2 Wirbelkörpern durchgeführt und mit den biomechanischen Ergebnissen der L1 Wirbelkörper verglichen. Dies geschah unter der Annahme, dass sich die Wirbelkörper L1 und L2 des selben Tieres nicht wesentlich in ihren biomechanischen Eigenschaften unterscheiden.

Zusammenfassend führen also Unterschiede zwischen der Simulation und dem realen Kompressionstest sowie die Überschätzung der Trabekeldicke im FE Modell zu einem (im Vergleich mit der Nanoindentierung) niedrigeren mikroskopischen E-Modul. Die Gruppe um Müller et al. erhielt mit einer vergleichbaren Methodik ähnlich niedrige Werte für Rattenwirbelkörper.

4.6 Unterschiede zur voxelbasierten Methode

Wie eingangs erwähnt, existieren im Wesentlichen zwei weit verbreitete Methoden um aus medizinischen Bilddateien ein FE Modell zu erstellen. Zum einen, die in dieser Arbeit beschriebene oberflächenbasierte Netzerstellung (*surface-based meshing*), zum anderen die voxelbasierte Netzerstellung (*voxel-based meshing*). Im Nachfolgenden sollen diese beide Methoden verglichen werden:

Voxel-based meshing

Beim *voxel-based meshing* werden Voxel, die vorher durch Binarisierung der Zielstruktur zugeteilt wurden, direkt in Finite Elemente umgewandelt. Aufgrund der rechteckigen Form der Voxel sind die daraus resultierenden Elemente zwingenderweise auch hexaedrisch und besitzen die selbe Größe wie die Voxel. Durch vorherige Änderung der Auflösung und *binning* der Voxel kann die Größe und somit auch die Anzahl der Elemente geändert werden. Jedoch besitzen weiterhin alle Elemente dieselbe Größe. Dies führt im Vergleich zum *surface-based meshing* zu einer höheren Elementanzahl und daraus resultierend zu mehr Freiheitsgraden (*degrees of freedom*; DOF). Die DOF bewirken wiederum eine Erhöhung der Rechenzeit. Vorteil des *voxel-based meshing* ist die einfachere Handhabung. So entfällt beispielsweise der Zwischenschritt zur Extraktion der Oberfläche. Dies bietet vor allem bei komplexen Strukturen eine enorme Zeitersparnis. Als Nachteil bietet die Methode weniger Spielraum bei den Elementformen und -größen und kann dadurch zu einem erhöhten Bedarf an Rechenleistung führen.

Diskussion

Das *voxel-based meshing* ist also eine robuste Methode zur Erstellung von FE Modellen, lässt aber weniger Änderungen zu und führt zu einem gesteigerten Bedarf an Rechenleistung.

Beispiele für Publikationen mit durch *voxel-based meshing* erstellte FE-Modelle sind: Liu et al. 2012; Müller et al. 2014; Nyman et al. 2015.

Surface-based meshing

Beim *surface-based meshing* muss zuerst die Oberfläche des segmentierten Volumendatensatzes extrahiert und durch eine Vielzahl an Polygonen beschrieben werden. Im Anschluss kann das von der Oberfläche begrenzte Volumen mit einer endlichen Zahl an Elementen gefüllt werden. Hierbei bietet sich der Vorteil, dass die Elementform nicht zwangsweise hexaedrisch sein muss. In dieser Arbeit wurden beispielsweise tetraedrische Elemente benutzt. Da die Anzahl der DOF unter anderem von der Anzahl der Knotenpunkte abhängt und Tetraeder weniger Eckpunkte als Hexaeder enthalten, können dadurch Rechenzeit und -leistung gespart werden. Zudem kann die Elementgröße variieren. Dies führt dazu, dass der Rand durch kleine Elemente, die zur Mitte hin größer werden, begrenzt wird. Dadurch bleibt bei insgesamt weniger Elementen die Feinheit an den kritischen Stellen (Ränder) erhalten. Ein Nachteil dieser Methode ist zum einen der Zeitaufwand, der zur Extraktion der Oberfläche benötigt wird. Zum anderen muss diese Oberfläche im Anschluss gegebenenfalls noch bearbeitet werden, da sie keine Löcher oder Überlappungen von Dreiecken enthalten darf.

Zusammenfassend bietet das *surface-based meshing* mehr Gestaltungsspielraum bei der Erstellung des FE Modells und führt zu einem geringeren Rechenleistungsbedarf. Nachteilig hierbei ist der erhöhte Zeitaufwand und die Störanfälligkeit bei der Erstellung des Oberflächennetzes.

Beispiele für die Verwendung des *surface-based meshing* sind folgende Publikationen: Lin et al. 2017; Wieding et al. 2012

Beide Methoden haben ihre Vor- und Nachteile. Die Wahl der geeigneteren Methode hängt von den lokalen Gegebenheiten (z.B. Verfügbarkeit eines Hochleistungsrechners bzw. Computerclusters) und dem Ziel der Studie ab.

4.7 Vor- und Nachteile der FEM

Wie jede andere Methode auch, hat die FEM Vor- und Nachteile. Die Kenntnis dieser ist wichtig für die sinnvolle Anwendung. Deswegen sollen im Folgenden einige vorteilhafte wie auch negative Aspekte betrachtet werden.

Vorteile:

- Durch die Simulation entsteht kein Materialverbrauch. Dadurch können an einem FE Modell mehrere Simulationen durchgeführt werden oder das zu untersuchende Objekt kann für andere Methoden benutzt werden. Am Beispiel eines Kompressionstests eines Wirbelkörpers bedeutet dies: Der Wirbelkörper kann im μ CT gescannt und danach für die Histologie benutzt werden. Der Scan dient als Vorlage für das FE Modell, an dem der Kompressionstest simuliert wird. Dies spart Kosten und hilft die Anzahl der benötigten Versuchsobjekte zu reduzieren.
- Möglichkeit der direkten Optimierung des untersuchten Objekts mittels rechnergestütztem Konstruieren (computer-aided design): An dem Modell können verschiedene Parameter, z.B. die Geometrie oder das Material einer Prothese, verändert und gleich im Anschluss erneut getestet werden. Dies hilft beispielsweise dabei, die stabilste Form einer Prothese zu finden.
- Durch die Möglichkeit des *in vivo* μ CTs kann die Dynamik in einem Vorgang dargestellt und quantifiziert werden. So können z.B. während der Knochenbruchheilung in einem Tiermodell zu mehreren Zeitpunkten FE Modelle erzeugt und daran die Festigkeit der Fraktur getestet werden.
- Erzeugung von patientenspezifischen Modellen möglich (siehe Kapitel 1.2.3).
- Kostenreduktion durch Zeitersparnis und ausbleibendem Materialverschleiß: Die benötigten Programme sind zum Teil als *open source* kostenlos. Die Erstellung eines Modells nimmt mit der richtigen Anleitung nicht sehr viel Zeit in Anspruch. Während der PC die Simulation berechnet kann der Mitarbeiter anderer Arbeiten nachgehen. Gleichzeitig entfallen die Kosten für Anschaffung, Wartung und Benutzung der Biomechanik-Maschine.

Nachteile:

- Die Ergebnisse der Simulation hängen stark von den benutzten Materialparametern, der Genauigkeit des FE Netzes und den übrigen Einstellungen ab.

- Der Benutzer muss die Sinnhaftigkeit der Ergebnisse kritisch überprüfen, da das Programm bei falschen Einstellungen auch unlogische, bzw. unrealistische Ergebnisse liefert und dies nicht bemerkt.
- Die Simulation basiert immer auf einem vereinfachten Modell. So können nicht alle im realen Experiment vorhandenen Variablen nachgebildet werden.
- Je nach Größe und Detailgenauigkeit des Modells werden sehr hohe Rechenkapazitäten gebraucht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der sinnvolle und korrekte Einsatz der FEM sehr viele neue Möglichkeiten eröffnet und gleichzeitig helfen kann die Anzahl der benötigten Tiere in einem Tiermodell zu reduzieren. Dies spart Kosten und liefert neue Erkenntnisse.

4.8 Methodenkritik und Limitationen der Arbeit

In dieser Arbeit konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede in den biomechanischen Eigenschaften zwischen den drei Gruppen festgestellt werden. Mögliche Ursachen hierfür sind die geringe Gruppengröße sowie die große Streuung der Ergebnisse des biomechanischen Kompressionstests. Da der mikroskopische E-Modul mit Hilfe dieser Daten berechnet wurde, wies auch er diese breite Streuung auf. Verbesserungen dieser Mängel (wie in Kapitel 4.2 beschrieben) könnten zu signifikanteren Unterschieden führen. Für die Berechnung des mikroskopischen E-Moduls nach der hier vorgestellten Methode sind weiterhin biomechanische Testungen nötig.

In dieser Arbeit wurden nur zwei Gendefekte untersucht, nämlich das Fehlen von Nlgn-3 und Nlgn-4. Da Autismus-Spektrum-Störungen durch eine Vielzahl an Gendefekten entstehen können, ist es auch möglich dass Defekte anderer Genloki oder Umwelteinflüsse ursächlich für die höhere Frakturneigung sind. Dies sollte in weiteren Studien, unter anderem auch mit KO-Mäusen, überprüft werden.

Eine weitere Limitation dieser Arbeit ist der Umstand, dass nur Wirbelkörper getestet wurden. Untersuchungen an den Femur-Knochen der Mäuse laufen im Moment noch.

Ferner konzentrierte sich diese Arbeit auf die Simulation nur des linear-elastischen Parts des Kompressionstests. So konnten weitere, für die Charakterisierung der biomechanischen Eigenschaften, interessante Parameter wie beispielsweise die Bruchlast nicht mittels FEM berechnet werden.

Die Arbeit untersuchte die Auswirkungen des Fehlens der Nlgn-3 und -4 Gene auf die biomechanischen und μ CT-morphologischen Parameter. Auswirkungen der Gendefekte auf histologischer Ebene werden von anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe bearbeitet.

4.9 Fazit und Ausblick in die Zukunft

In dieser Arbeit ist es gelungen, ausgehend von μ CT-Scans der Mauswirbelkörper FE Modelle zu erstellen. Die Modelle bildeten auch die trabekuläre Zusammensetzung des Knochens ab. An diesen Modellen konnte mit einem käuflich erworbenen Simulationsprogramm der biomechanische Kompressionstest nachgestellt und simuliert werden. Die Simulation mit über 2 Millionen Elementen konnte auf einem handelsüblichen PC in überschaubarer Rechenzeit gelöst werden.

Die Ergebnisse der aus der Simulation berechneten Steifigkeit standen in linearem Zusammenhang mit dem zugewiesenen E-Modul sowie der Struktur des Knochens. Des Weiteren beeinflussten die bei der Erstellung des FE Modells verwendeten Parameter, wie beispielsweise Anzahl der Tetraeder, die errechnete Steifigkeit. Aufgrund dieser Tatsachen sollten die hier gewonnen Erkenntnisse in weiteren Arbeiten mit der Finite Elemente Methode berücksichtigt werden.

Durch den Vergleich der Strukturkonstante, ein rein mittels FEM gewonnener Parameter, kann das FE-Modell mit der Literatur verglichen werden. Hier ergab sich ein relativer Unterschied von 3,96 % der WT-Wirbelkörper im Vergleich mit WT-Wirbelkörpern einer anderen Publikation. Das hier vorgestellte Vorgehen liefert also realistische Ergebnisse.

Die häufigeren Frakturen und geringere BMD bei Patienten, die an einer Autismus Spektrum Störung leiden, konnten in diesem Modell mit Nlgn-3/4 KO Mäusen nicht abschließend geklärt werden. Das Fehlen der Nlgn-3 und -4 Gene hatte in dieser Arbeit einen negativen Einfluss auf mikroskopische sowie makroskopische biomechanischen Eigenschaften der Wirbelkörper, diese Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. Es sind weitere Studien und Modelle notwendig, um die Ursache hierfür zu eruieren.

Aufgrund der Auflösung im Mikrometerbereich war es möglich, die Stressverteilung in den einzelnen Trabekeln darzustellen. Diese Aussagen sind mittels herkömmlicher biomechanischer Testung nicht möglich. Die FEM lieferte also zusätzliche Informationen über das Verhalten der Wirbelkörper unter Kompression. Biomechanische Testungen

Diskussion

wurden und werden weiterhin benötigt, durch den Einsatz von FEM können diese Experimente jedoch noch verfeinert und letztendlich deren Zahl verringert werden. Wird der E-Modul auf andere Weise bestimmt (z.B. durch *density-elasticity-relationship*), können die Kompressionstests alleine mittels FEM durchgeführt werden. Kombiniert man diese Möglichkeit mit *in vivo* μ CT-Scanning, kann die Anzahl an benötigten Versuchstieren verringert und Testungen zu verschiedenen Zeitpunkten am selben Tier vorgenommen werden. Dadurch können Aussagen über dynamische Vorgänge wie beispielsweise die Zunahme der Stabilität im Verlauf der Frakturheilung getroffen werden.

Zusätzlich können durch den klinischen Einsatz der FEM patientenspezifische Modelle generiert und daraus die individuelle Knochensteifigkeit und das Frakturrisiko ermittelt werden (Kapitel 1.2.3). Damit können Therapieentscheidungen gezielt für den jeweiligen Patienten im Sinne der personalisierten Medizin getroffen werden.

5 Zusammenfassung

Menschen mit Autismus-Spektrum-Störungen erleiden signifikant häufiger Frakturen, ihre Knochen haben eine herabgesetzte Knochenmineraldichte, eine gestörte Architektur sowie eine niedrigere Steifigkeit. Die Ursache hierfür ist bis heute ungeklärt. Die biomechanische Kompetenz von Knochen wird durch mikroskopische und makroskopische Eigenschaften bestimmt. Zu den mikroskopischen biomechanischen Eigenschaften zählt der gewebespezifische oder mikroskopische E-Modul. Dieser kann mittels speziellen Testungen, z.B. Nanoindentierung, gemessen oder mit Hilfe der Methode der Finiten Elemente berechnet werden. Ziel dieser Arbeit war das Erzeugen eines dreidimensionalen Finite Elemente Modells von Wirbelkörpern autistischer Mäuse und die Bestimmung des mikroskopischen E-Modul durch Kombination der Finite Elemente Analyse mit biomechanischen Kompressionstestungen. Als bereits etabliertes Tiermodell für Autismus-Spektrum-Störungen dienten Nlgn-3 und Nlgn-4 KO Mäuse.

Das Finite Elemente Modell wurde in mehreren Schritten aus den μ CT-Scans erstellt. Um bestmöglichen Simulationsbedingungen zu schaffen, wurde zuerst der Einfluss verschiedener Parameter, wie beispielsweise die Anzahl der verwendeten Elemente, getestet. Danach konnte der Kompressionstest am PC simuliert werden. Gleichzeitig wurden die Wirbelkörper mittels herkömmlicher biomechanischer Testung komprimiert und so die Steifigkeit bestimmt. Da der mikroskopische E-Modul einen linearen Einfluss auf das Resultat des simulierten Kompressionstest hat, konnte er durch Skalierung der Simulationsergebnisse auf die Ergebnisse der Kompressionstestungen berechnet werden. Die biomechanisch bestimmte Steifigkeit war in der Nlgn-4 KO Gruppe niedriger, der errechnete mikroskopische E-Modul war hingegen in der Nlgn-3 KO Gruppe niedriger als in den beiden anderen Gruppen. Aufgrund der hohen Auflösung konnte die Stressverteilung in den einzelnen Trabekeln während des simulierten Kompressionstest dargestellt werden. Hierbei zeigte sich eine ähnliche Verteilung der Von-Mises Vergleichsspannung zwischen den drei Gruppen.

Der mikroskopische E-Modul konnte in dieser Arbeit mit der Methode der Finiten Elemente berechnet werden. Gleichzeitig bietet die Methode im Vergleich mit herkömmlichen mechanischen Testungen zusätzliche Informationen und kann in Zukunft Tierversuche im Sinne des 3R-Prinzips verfeinern und ersetzen. Es zeigte sich eine mögliche Korrelation zwischen Autismus und herabgesetzter Knochenqualität. Zur abschließenden Klärung sind weitere Studien nötig.

6 Summary

Patients with autism spectrum disorders show significant higher fracture rates, decreased bone mineral density, impaired bone architecture and lower bone stiffness. The pathomechanisms, which lead to these alterations remain unknown. The overall biomechanical characteristics of bones are determined by their macroscopic and microscopic properties. These microscopic properties can be quantified by the tissue-level elastic modulus. It can be measured by particular indentation testing or by the combination of Finite Element Analysis with compression tests. This study aims to establish a protocol for obtaining a three-dimensional microscale Finite Element model of autistic mouse vertebrae. By combining Finite Element Analysis with compression testing, the microscopic elastic modulus will be calculated. Nlgn-3 and Nlgn-4 knockout mice were used as an established animal model of autism spectrum disorders.

The Finite Element model was obtained in multiple steps by using micro-CT-scans. To gain precise results, the influence of different parameters and settings on the simulation was observed and adjusted. Afterwards the compression test was simulated. To measure the macroscopic stiffness, the real vertebrae were compressed using a biomechanical testing machine. The microscopic elastic modulus was calculated by scaling the simulated stiffness to the experimental measured stiffness.

The biomechanical measured stiffness was lowest in the Nlgn-4 knockout group. The calculated microscopic elastic modulus was lowest in the Nlgn-3 knockout group. Due to the model's high resolution, the trabecular distribution of von Mises stress during the compression could be analyzed. However it showed no significant differences in magnitude or distribution of stress between the groups.

The established protocol resulted in the opportunity to create a three-dimensional microscale Finite Element model starting from micro-CT-scans of mouse vertebrae. The microscopic elastic modulus was calculated by means of Finite Element Analysis. Concurrently this method leads to additional insights into the vertebra's mechanical behavior under compression and can be used to refine and reduce animal testing according to the Three Rs principle. The study showed in preclinical model of autism spectrum disorders a possible correlation between lower bone quality and autism, which should be investigated by further basic and clinical research.

7 Abkürzungsverzeichnis

A-S-S	Autismus-Spektrum-Störung
BMD	Bone mineral density
CAD	Computer-aided design
DOF	Freiheitsgrade
DXA	Dual Energy X-ray Absorptiometry
EZM	Extrazellulärmatrix
FE	Finite Elemente
FEM	Methode der Finiten Elemente
HA	Hydroxylapatit
KO	Knockout
Nlgn	Neurologin
ODB	Abaqus Output Database (Dateiformat)
OPG	Osteoprotegrin
qCT	Quantitative Computertomographie
RANK	Receptor activator of nuclear factor- κ B
RANKL	RANK-Ligand
ROI	Region of Interest
STL	Stereolithography (Dateiformat)
TMD	Tissue mineral density
WT	Wildtyp
ZNS	Zentralnervensystem
μ CT	Mikro-Computertomographie

8 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

8.1 Abbildungen

Abbildung 1: Mittels CAD konstruierter Balken unter Biegung.	7
Abbildung 2: Aus CT-Aufnahmen erstelltes FE-Modell eines Femurs.	8
Abbildung 3: Schritte zur Erstellung eines patientenspezifischen FE Modells.	10
Abbildung 4: Grafische Darstellung des Studiendesigns.	19
Abbildung 5: Bearbeiten und Segmentieren des Scans.	21
Abbildung 6: Erstellung der Kalibrierungsgerade.	22
Abbildung 7: Skizze zur Veranschaulichung der unterschiedlichen Cube Edge Size.	24
Abbildung 8: FE-Modell eines Wildtyp Wirbelkörpers.	25
Abbildung 9: Darstellung der aufgetragenen Randbedingungen.	27
Abbildung 10: Auszug aus dem input File für die Simulation.	28
Abbildung 11: Mittlere TMD und BMD der Wirbelkörper im Vergleich.	32
Abbildung 12: 3D Schnitte durch die Wirbelkörper.	33
Abbildung 13: Kraft-Verformung-Kurve eines Wirbelkörpers.	34
Abbildung 14: Boxplot der biomechanisch bestimmten Steifigkeiten der Wirbelkörper.	35
Abbildung 15: Kraft-Verformungskurve eines WT Wirbelkörpers.	36
Abbildung 16: Einfluss des E-Moduls auf die Steifigkeit.	36
Abbildung 17: Oberflächennetze des selben Wirbelkörpers mit unterschiedlichen Kantenlängen.	37
Abbildung 18: Einfluss der Kantenlänge des Oberflächennetzes auf das Ergebnis der Simulation.	38
Abbildung 19: Abhängigkeit der Steifigkeit von der verwendeten Anzahl der Tetraeder.	39
Abbildung 20: Einfluss der Zahl der Elemente auf die Rechenzeit.	40
Abbildung 21: Verteilung der Von-Mises-Vergleichsspannung.	40
Abbildung 22: Schnittbilder der Von-Mises-Spannung.	41
Abbildung 23: Boxplot der Strukturkonstanten.	42
Abbildung 24: Boxplot der mikroskopischen E-Moduln.	43
Abbildung 25: Schematische Darstellung der Hauptschritte.	43
Abbildung 26: QR-Code zu dem Tutorial Video auf YouTube.	44

8.2 Tabellen

Tabelle 1: Verteilung der verwendeten Tiere.....	18
Tabelle 2: Während der Simulation verwendete Einheiten.....	26
Tabelle 3: Mittlere TMD, BMD und BV/TV	33

9 Literaturverzeichnis

- Akhter, M. P., Fan, Z. and Rho, J. Y. (2004). **Bone Intrinsic Material Properties in Three Inbred Mouse Strains**. *Calcified Tissue International* 75, 416–420, doi:10.1007/s00223-004-0241-7.
- Akhter, M P, Otero, J. K., Iwaniec, U. T., Cullen, D. M., Haynatzki, G. R. and Recker, R. R. (2004). **Differences in vertebral structure and strength of inbred female mouse strains**. *Journal of Musculoskeletal Neuronal Interactions* 4, 33–40.
- American Psychiatric Association (2013). *Diagnostic and statistical manual of mental disorders (DSM-5®)*, American Psychiatric Pub.
- Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E. and Rutter, M. (1995). **Autism as a strongly genetic disorder: Evidence from a british twin study**. *Psychological Medicine* 25, 63–77.
- Becker, D., Liver, O., Mester, R., Rapoport, M., Weizman, A. and Weiss, M. (2003). **Risperidone, but not olanzapine, decreases bone mineral density in female premenopausal schizophrenia patients**. *The Journal of clinical psychiatry* 64, 761–766, doi:10.4088/jcp.v64n0704.
- Benvenuto, A., Moavero, R., Alessandrelli, R., Manzi, B. and Curatolo, P. (2009). **Syndromic autism: Causes and pathogenetic pathways**. *World Journal of Pediatrics* 5, 169–176, doi:10.1007/s12519-009-0033-2.
- Betancur, C. (2011). **Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: More than 100 genetic and genomic disorders and still counting**. *Brain Research* 1380, 42–77, doi:10.1016/j.brainres.2010.11.078.
- Böcker, W., El Khassawna, T., Bauer, N., Brodsky, K., Weisweiler, D., Govindarajan, P., Schlewitz, G., Kampschulte, M., Dürselen, L., Thormann, U., Szalay, G., Schnettler, R., Langheinrich, A. C. and Heiss, C. (2014). **Short-term glucocorticoid treatment causes spinal osteoporosis in ovariectomized rats**. *European Spine Journal* 23, 2437–2448, doi:10.1007/s00586-014-3463-z.
- Bokhari, R. S., Metzger, C. E., Black, J. M., Franklin, K. A., Boudreaux, R. D., Allen, M. R., Macias, B. R., Hogan, H. A., Braby, L. A. and Bloomfield, S. A. (2019). **Positive impact of low-dose, high-energy radiation on bone in partial- and/or full-weightbearing mice**. *npj Microgravity* 5, 13, doi:10.1038/s41526-019-0074-3.
- Boyd, S. K., Szabo, E. and Armann, P. (2011). **Increased bone strength is associated**

- with improved bone microarchitecture in intact female rats treated with strontium ranelate: A finite element analysis study.** *BONE* 48, 1109–1116.
- Braun, J. R. and Willnow, T. E. (1996). **Die „Knockout“-Maus als Krankheitsmodell: Prinzipien und klinische Relevanz.** *Dt Ärzteblatt* 93, 1765–1769.
- Bright, J. A. and Rayfield, E. J. (2011). **The Response of Cranial Biomechanical Finite Element Models to Variations in Mesh Density.** *Anatomical Record* 294, 610–620.
- Brouwers, J. E. M., Ruchelsman, M., Rietbergen, B. v. and Bouxsein, M. L. (2009). **Determination of rat vertebral bone compressive fatigue properties in untreated intact rats and zoledronic-acid-treated, ovariectomized rats.** *Osteoporosis International* 20, 1377–1384, doi:10.1007/s00198-008-0803-z.
- Chappard, D., Retailliau-Gaborit, N., Legrand, E., Baslé, M. F. and Audran, M. (2005). **Comparison Insight Bone Measurements by Histomorphometry and μ CT.** *Journal of Bone and Mineral Research* 20, 1177–1184, doi:10.1359/JBMR.050205.
- Christiansen, B. A., Emami, A. J., Fyhrie, D. P., Satkunananthan, P. B. and Hardisty, M. R. (2015). **Trabecular bone loss at a distant skeletal site following noninvasive knee injury in mice.** *Journal of biomechanical engineering* 137, 0110051, doi:10.1115/1.4028824.
- Clarke, B. (2008). **Normal bone anatomy and physiology.** *Clinical journal of the American Society of Nephrology : CJASN* 3, S131-9, doi:10.2215/CJN.04151206.
- Clough, R. W. (1960). **The finite element method in plane stress analysis.** In: **Proceedings of 2nd ASCE Conference on Electronic Computation, Pittsburgh Pa., Sept. 8 and 9, 1960,** 1960.
- Cody, D. D., Gross, G. J., Hou, F. J., Spencer, H. J., Goldstein, S. A. and Fyhrie, D. P. (1999). **Femoral strength is better predicted by finite element models than QCT and DXA.** *Journal of Biomechanics* 32, 1013–1020.
- Donnelly, E. (2011). **Methods for assessing bone quality: A review.** *Clinical Orthopaedics and Related Research* 469, 2128–2138.
- El-Kordi, A., Winkler, D., Hammerschmidt, K., Kästner, A., Krueger, D., Ronnenberg, A., Ritter, C., Jatho, J., Radyushkin, K., Bourgeron, T., Fischer, J., Brose, N. and Ehrenreich, H. (2013). **Development of an autism severity score for mice using Nlgn4 null mutants as a construct-valid model of heritable monogenic autism.** *Behavioural Brain Research* 251, 41–49.
- Elsabbagh, M., Divan, G., Koh, Y.-J., Kim, Y. S., Kauchali, S., Marcín, C., Montiel-

- Nava, C., Patel, V., Paula, C. S., Wang, C., Yasamy, M. T. and Fombonne, E. (2012). **Global prevalence of autism and other pervasive developmental disorders.** *Autism research : official journal of the International Society for Autism Research* 5, 160–179, doi:10.1002/aur.239.
- Forestier-Zhang, L. and Bishop, N. (2016). **Bone strength in children: Understanding basic bone biomechanics,** *Archives of Disease in Childhood: Education and Practice Edition* 101 (1) pp.2–7, doi:10.1136/archdischild-2015-308597.
- Franz-Odendaal, T. A., Hall, B. K. and Witten, P. E. (2006). **Buried alive: How osteoblasts become osteocytes.** *Developmental Dynamics* 235, 176–190, doi:10.1002/dvdy.20603.
- Geramizadeh, M., Katoozian, H., Amid, R. and Kadkhodazadeh, M. (2018). **Three-dimensional optimization and sensitivity analysis of dental implant thread parameters using finite element analysis.** *Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 44, 59–65, doi:10.5125/jkaoms.2018.44.2.59.
- Geuzaine, C. and Remacle, J. F. (2009). **Gmsh: A 3-D finite element mesh generator with built-in pre- and post-processing facilities.** *International Journal for Numerical Methods in Engineering* 79, 1309–1331, doi:10.1002/nme.2579.
- Helgason, B. and Perilli, E. (2017). **Mathematical relationships between bone density and mechanical properties: A literature review.** *Kasmera* 45, 8–15.
- Jamain, S., Radyushkin, K., Hammerschmidt, K., Granon, S., Boretius, S., Varoqueaux, F., Ramanantsoa, N., Gallego, J., Ronnenberg, A., Winter, D., Frahm, J., Fischer, J., Bourgeron, T., Ehrenreich, H. and Brose, N. (2008). **Reduced social interaction and ultrasonic communication in a mouse model of monogenic heritable autism.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 1710–1715, doi:10.1073/pnas.0711555105.
- Jepsen, K. J., Silva, M. J., Vashishth, D., Guo, X. E. and van der Meulen, M. C. (2015). **Establishing Biomechanical Mechanisms in Mouse Models: Practical Guidelines for Systematically Evaluating Phenotypic Changes in the Diaphyses of Long Bones.** *Journal of Bone and Mineral Research* 30, 951–966, doi:10.1002/jbmr.2539.
- Johannesdottir, F., Thrall, E., Muller, J., Keaveny, T. M., Kopperdahl, D. L. and Bouxsein, M. L. (2017). **Comparison of non-invasive assessments of strength of the proximal femur.** *Bone* 105, 93–102.
- Khajuria, D. K., Raygorodskaya, M., Kobylansky, E., Gabet, Y., Hiram Bab, S., Shochat,

- C., Torchinsky, A. and Karasik, D. (2018). **Evaluation of the long-term skeletal effect induced by teratogen 5-aza-2'deoxyctidine on offspring of high (C3H/HeJ) and low (C57BL/6J) bone mass phenotype mice.** Bone reports 8, 239–243, doi:10.1016/j.bonr.2018.05.005.
- Kim, J. M., Lin, C., Stavre, Z., Greenblatt, M. B. and Shim, J. H. (2020). **Osteoblast-Osteoclast Communication and Bone Homeostasis.** Cells 9, doi:10.3390/cells9092073.
- Kirsch, E. G. (1868). **Die Fundamentalgleichungen der Theorie der Elastizität fester Körper, hergeleitet aus der Betrachtung eines Systems von Punkten, welche durch elastische Streben verbunden sind.** Zeitschrift des Vereines Deutscher Ingenieure 7.
- Knothe, K. and Wessels, H. (2017). Finite Elemente - Eine Einführung für Ingenieure, Springer Verlag GmbH Deutschland, doi:10.1007/978-3-642-34797-9.
- Kühnisch, J., Seto, J., Lange, C., Schrof, S., Stumpp, S., Kobus, K., Grohmann, J., Kossler, N., Varga, P., Osswald, M., Emmerich, D., Tinschert, S., Thielemann, F., Duda, G., Seifert, W., Khassawna, T. el, Stevenson, D. A., Elefteriou, F., Kornak, U., Raum, K., Fratzl, P., Mundlos, S. and Kolanczyk, M. (2014). **Multiscale, Converging Defects of Macro-Porosity, Microstructure and Matrix Mineralization Impact Long Bone Fragility in NF1** Ed. Geoffroy, V. PLoS ONE 9, e86115, doi:10.1371/journal.pone.0086115.
- Ladd, A. J. C. and Kinney, J. H. (1998). **Numerical errors and uncertainties in finite-element modeling of trabecular bone.** Journal of Biomechanics 31, 941–945.
- Lai, M.-C., Lombardo, M. V and Baron-Cohen, S. (2014). **Autism.** Lancet 383, 896–910, doi:10.1016/S0140-6736(13)61539-1.
- Lee, N. K., Sowa, H., Hinoi, E., Ferron, M., Ahn, J. D., Confavreux, C., Dacquin, R., Mee, P. J., McKee, M. D., Jung, D. Y., Zhang, Z., Kim, J. K., Mauvais-Jarvis, F., Ducy, P. and Karsenty, G. (2007). **Endocrine Regulation of Energy Metabolism by the Skeleton.** Cell 130, 456–469, doi:10.1016/J.CELL.2007.05.047.
- Li, Z., Kindig, M. W., Subit, D. and Kent, R. W. (2010). **Influence of mesh density, cortical thickness and material properties on human rib fracture prediction.** Medical Engineering and Physics 32, 998–1008, doi:10.1016/j.medengphy.2010.06.015.
- Lin, Y., Ma, L., Zhu, Y., Lin, Z., Yao, Z., Zhang, Y. and Mao, C. (2017). **Assessment of fracture risk in proximal tibia with tumorous bone defects by a finite element**

- method**, *Microscopy Research and Technique* 80 (9) pp.975–984,.
- Liu, X. S., Ardeshipour, L., VanHouten, J. N., Shane, E. and Wysolmerski, J. J. (2012). **Site-specific changes in bone microarchitecture, mineralization, and stiffness during lactation and after weaning in mice**. *Journal of Bone and Mineral Research* 27, 865–875, doi:10.1002/jbmr.1503.
- Maquer, G., Dall'Ara, E. and Zysset, P. K. (2012). **Removal of the cortical endplates has little effect on ultimate load and damage distribution in QCT-based voxel models of human lumbar vertebrae under axial compression**. *Journal of Biomechanics* 45, 1733–1738.
- McDougle, C. J., Stigler, K. A., Erickson, C. A. and Posey, D. J. (2008). **Atypical antipsychotics in children and adolescents with autistic and other pervasive developmental disorders**. *Journal of Clinical Psychiatry* 69, 15–20.
- Mohotti, D., Fernando, P. L. N. and Zaghloul, A. (2018). **Evaluation of possible head injuries ensuing a cricket ball impact**. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 158, 193–205, doi:10.1016/j.cmpb.2018.02.017.
- Morgan, E. F., Unnikrisnan, G. U. and Hussein, A. I. (2018). **Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States**. *Annual review of biomedical engineering* 20, 119–143, doi:10.1146/annurev-bioeng-062117-121139.
- Moss, J. and Howlin, P. (2009). **Autism spectrum disorders in genetic syndromes: Implications for diagnosis, intervention and understanding the wider autism spectrum disorder population**, *Journal of Intellectual Disability Research* 53 (10) pp.852–873, doi:10.1111/j.1365-2788.2009.01197.x.
- Müller, R., Henss, A., Kampschulte, M., Rohnke, M., Langheinrich, A. C., Heiss, C., Janek, J., Voigt, A., Wilke, H. J., Ignatius, A., Herfurth, J., El Khassawna, T. and Deutsch, A. (2019). **Analysis of microscopic bone properties in an osteoporotic sheep model: A combined biomechanics, FE and ToF-SIMS study**. *Journal of the Royal Society Interface* 16, doi:10.1098/rsif.2018.0793.
- Müller, R., Kampschulte, M., Khassawna, T. El, Schlewitz, G., Hürter, B., Böcker, W., Bobeth, M., Langheinrich, A. C., Heiss, C., Deutsch, A. and Cuniberti, G. (2014). **Change of mechanical vertebrae properties due to progressive osteoporosis: combined biomechanical and finite-element analysis within a rat model**. *Medical & Biological Engineering & Computing* 52, 405–414, doi:10.1007/s11517-014-1140-3.
- Neumeyer, A. M., Cano Sokoloff, N., McDonnell, E., Macklin, E. A., McDougle, C. J.

- and Misra, M. (2017). **Bone microarchitecture in adolescent boys with autism spectrum disorder**. *Bone* 97, 139–146, doi:10.1016/j.bone.2017.01.009.
- Neumeyer, A. M., O'Rourke, J. A., Massa, A., Lee, H., Lawson, E. A., McDougale, C. J. and Misra, M. (2015). **Brief Report: Bone Fractures in Children and Adults with Autism Spectrum Disorders**. *Journal of Autism and Developmental Disorders* 45, 881–887.
- Nyman, J. S., Uppuganti, S., Makowski, A. J., Rowland, B. J., Merkel, A. R., Sterling, J. A., Bredbenner, T. L. and Perrien, D. S. (2015). **Predicting mouse vertebra strength with micro-computed tomography-derived finite element analysis**. *BoneKEY Reports* 4, doi:10.1038/bonekey.2015.31.
- Pendleton, M. M., Sadoughi, S., Li, A., O'Connell, G. D., Alwood, J. S. and Keaveny, T. M. (2018). **High-precision method for cyclic loading of small-animal vertebrae to assess bone quality**. *Bone Reports* 9, 165–172.
- Plonek, T., Zak, M., Burzynska, K., Rylski, B., Gozdzik, A., Kustrzycki, W., Beyersdorf, F., Jasinski, M. and Filipiak, J. (2017). **The combined impact of mechanical factors on the wall stress of the human ascending aorta - a finite elements study**. *BMC cardiovascular disorders* 17, 297, doi:10.1186/s12872-017-0733-9.
- Poelert, S., Valstar, E., Weinans, H. and Zadpoor, A. A. (2013). **Patient-specific finite element modeling of bones**, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*.
- Rho, J. Y., Kuhn-Spearing, L. and Zioupos, P. (1998). **Mechanical properties and the hierarchical structure of bone**. *Medical Engineering and Physics* 20, 92–102.
- Roke, Y., Van Harten, P. N., Buitelaar, J. K., Tenback, D. E., Quekel, L. G. B. A., De Rijke, Y. B. and Boot, A. M. (2012). **Bone mineral density in male adolescents with autism spectrum disorders and disruptive behavior disorder with or without antipsychotic treatment**. *European Journal of Endocrinology* 167, 855–863.
- Russell, W. M. S. and Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*, Methuen, London.
- Samadi-Dooki, A., Voyiadjis, G. Z. and Stout, R. W. (2018). **A combined experimental, modeling, and computational approach to interpret the viscoelastic response of the white matter brain tissue during indentation**. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 77, 24–33, doi:10.1016/J.JMBBM.2017.08.037.
- Silva, M. J., Brodt, M. D. and Uthgenannt, B. A. (2004). **Morphological and mechanical**

- properties of caudal vertebrae in the SAMP6 mouse model of senile osteoporosis.** *Bone* 35, 425–431, doi:10.1016/J.BONE.2004.03.027.
- Smith, M. (2009). ABAQUS/Standard User's Manual, Version 6.9., Simulia, Providence, RI.
- Steinke, B., Patwardhan, A. G., Havey, R. M. and King, D. (1999). **Human Growth Hormone Transgene Expression Increases the Biomechanical Structural Properties of Mouse Vertebrae.** *Spine* 24, 1–4.
- Taichman, R. S. (2005). **Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche.** *Blood* 105, 2631–2639, doi:10.1182/blood-2004-06-2480.
- Teitelbaum, S. L. (2000). **Bone resorption by osteoclasts.** *Science* 289, 1504–1508, doi:10.1126/science.289.5484.1504.
- Tomlow, J. (2016). **Designing and constructing the Olympic roof (Munich 1972).** *International Journal of Space Structures* 31, 62–73, doi:10.1177/0266351116642078.
- Torsney, K. M., Noyce, A. J., Doherty, K. M., Bestwick, J. P., Dobson, R. and Lees, A. J. (2014). **Bone health in Parkinson's disease: A systematic review and meta-analysis.** *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*.
- Turner, M. J., Clough, R. W., Martin, H. C., Topp, L. J. and LIEPMANN, H. W. (1956). **Journal of the Aeronautical Sciences.** *Journal Of The Aeronautical Sciences* 23, 805–823, doi:10.2514/8.3664.
- van den Munckhof, S. and Zadpoor, A. A. (2014). **How accurately can we predict the fracture load of the proximal femur using finite element models?** *Clinical biomechanics (Bristol, Avon)* 29, 373–380, URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24485865>.
- Varoqueaux, F., Aramuni, G., Rawson, R. L., Mohrmann, R., Missler, M., Gottmann, K., Zhang, W., Südhof, T. C. and Brose, N. (2006). **Neuroligins Determine Synapse Maturation and Function.** *Neuron* 51, 741–754, doi:10.1016/j.neuron.2006.09.003.
- Viceconti, M., Qasim, M., Bhattacharya, P. and Li, X. (2018). **Are CT-Based Finite Element Model Predictions of Femoral Bone Strengthening Clinically Useful?** *Current Osteoporosis Reports* 16, 216–223.
- Wang, M., Hou, R., Jian, J., Mi, G., Qiu, H., Cao, B. and Tang, M. (2014). **Effects of antipsychotics on bone mineral density and prolactin levels in patients with**

- schizophrenia: a 12-month prospective study.** Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental 29, 183–189, doi:10.1002/hup.2387.
- Wieding, J., Souffrant, R., Fritsche, A., Mittelmeier, W. and Bader, R. (2012). **Finite element analysis of osteosynthesis screw fixation in the bone stock: An appropriate method for automatic screw modelling.** PLoS ONE 7, 1–10.
- Wink, L. K., Pedapati, E. V, Horn, P. S., McDougale, C. J. and Erickson, C. A. (2017). **Multiple Antipsychotic Medication Use in Autism Spectrum Disorder.** Journal of child and adolescent psychopharmacology 27, 91–94, doi:10.1089/cap.2015.0123.
- Wolff, J. (1892). Das Gesetz der Transformation der Knochen, Hirschwald, Berlin.
- Woolfenden, S., Sarkozy, V., Ridley, G., Coory, M. and Williams, K. (2012). **A systematic review of two outcomes in autism spectrum disorder - Epilepsy and mortality.** Developmental Medicine and Child Neurology 54, 306–312, doi:10.1111/j.1469-8749.2012.04223.x.
- Zienkiewicz, O. C., Taylor, R. L. and Zhu, J. Z. (2013). **The Standard Discrete System and Origins of the Finite Element Method.** In: **The Finite Element Method: its Basis and Fundamentals**, Elsevier, pp. 1–20.

10 Anhang

10.1 Tabellarisches Protokoll zur Erstellung und Simulation eines FE-Modells

Schritt	Verwendete Software	Vorgehen
1.) Bearbeiten und Segmentieren der μ CT-Scans und Extraktion der Oberfläche	Analyze 12.0 (AnalyzeDirect, Overland Park, KS)	<ul style="list-style-type: none"> • Import der einzelnen Bilddateien (z.B. DICOM, PNG, TIFF) des μCT-Scans mithilfe des <i>Volume Tools</i>. Dabei auf die korrekte Voxelgröße achten. • Zurechtschneiden des Wirbelkörpers und Entfernen der Deckplatten im <i>Image Edit</i> Modul. • Segmentieren des Knochengewebes mithilfe des <i>Region Growth</i> Verfahren im <i>Volume Edit</i> Modul. Als <i>object map</i> speichern. • Oberfläche des Wirbelkörpers im <i>Surface Extractor</i> Modul extrahieren. Dazu die <i>object map</i> laden und die Extraktion mit einer <i>Cube Edge Size</i> von 1 starten. • Entstandene Oberfläche im STL-Dateiformat speichern.
2.) Erstellen des Volumennetzes	Gsmh (Geuzaine and Remacle 2009) <i>open source</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Oberfläche als STL-Datei importieren. • Volumengrenzen auswählen, GEO-Datei erstellen. • Unter <i>tools</i> \rightarrow <i>options</i> \rightarrow <i>mesh</i> \rightarrow <i>advanced</i> die maximale Elementgröße ändern (in diesem Fall war 0,03 meist ausreichend). • 3D Mesh Erstellen.

Anhang

		<ul style="list-style-type: none"> • Volumennetz als INP-Datei exportieren, Oberflächenelemente in einem Texteditor entfernen.
3.) Erstellen der Simulation	Abaqus 2017 (Dassault Systèmes, Véliz-Villacoublay, Frankreich)	<ul style="list-style-type: none"> • Vorher erstelltes Volumennetz als <i>part</i> importieren. • Materialwerte festlegen: elastisch, E-Modul frei wählen, Poissonzahl 0,33. • <i>Section</i> → <i>solid</i>, <i>homogeneous</i>. • <i>Section</i> dem Wirbelkörper zuweisen. • <i>Assembly</i> erstellen, Wirbelkörper der <i>Assembly</i> hinzufügen. • <i>Node Sets</i> erstellen: obere und untere Knotenpunkte auswählen und speichern (wichtig für das Festlegen der Randbedingungen). • <i>Step</i> erstellen: <i>static</i>, <i>general</i>. • <i>Boundary conditions (BC;</i> Randbedingungen) festlegen: <i>node set</i> „unten“ auswählen und $z=0$ als BC; <i>node set</i> „oben“ auswählen und $z=d$ (wobei d für die Kompression steht, in diesem Fall z.B. 0,2 für 0,2 mm). • <i>Job</i> erstellen und <i>input file</i> schreiben lassen.
4.) Bearbeiten des <i>input file</i>	<i>Open source</i> Texteditor (z.B. Vim.org)	<ul style="list-style-type: none"> • Zur Ausgabe der <i>reaction force</i>, also der Kraft, die für die oben angegebene Kompression benötigt wurde, muss das <i>input file</i> geändert werden. • <i>Input file</i> öffnen und unter <i>output</i> um folgenden Befehl ergänzen: *NODE PRINT, NSET=oben, TOTALS=YES, RF.

Anhang

		<ul style="list-style-type: none"> • Geändertes <i>input file</i> speichern.
5.) Starten der Berechnung	Abaqus 2017 (Dassault Systèmes, Véliz-Villacoublay, Frankreich)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Input file</i> in einen gewünschten Ordner (<i>Work directory</i>) kopieren. • In diesem Ordner <i>shift</i>-Taste und rechtsklick → <i>open command window here</i> → <i>cmd</i>-Fenster öffnet → dort folgendes eingeben: • Call <i>abacus job=name des input files</i> • <i>cpus=anzahl der cpu-Kerne, die verwendet werden sollen (z.B. 5)</i> • mit Enter-Taste bestätigen → Berechnung beginnt
6.) Auslesen der benötigten Kraft und Visualisieren der Stressverteilung	<i>Open source</i> Texteditor (z.B. Vim.org); Abaqus 2017 (Dassault Systèmes, Véliz-Villacoublay, Frankreich)	<ul style="list-style-type: none"> • Nach Beendigung der Simulation das DAT-File (in der <i>Work directory</i>) öffnen und die Gesamtkraft auslesen und in Excel übertragen. • Zur visuellen Darstellung der Stressverteilung im Wirbelkörper kann die ODB-Datei (ebenfalls in <i>Work directory</i>) in Abaqus geladen werden.

10.2 Protokolliertes Vorgehen auf Video

Das Vorgehen in dieser Arbeit wurde zur besseren Reproduzierbarkeit auf Video festgehalten. Das Video befindet sich auf dem beiliegenden Datenträger und kann unter folgendem Link oder unten stehenden QR-Code auf der Video-Plattform YouTube angesehen werden:

https://youtu.be/_P1h6jz2LoU



11 Publikationsverzeichnis

Müller R, Henss A, Kampschulte M, Rohnke M, Langheinrich AC, Heiss C, Janek J, Voigt A, Wilke HJ, Ignatius A, **Herfurth J**, El Khassawna T, Deutsch A. Analysis of microscopic bone properties in an osteoporotic sheep model: a combined biomechanics, FE and ToF-SIMS study.

J R Soc Interface 2019;16: 20180793. DOI: <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2018.0793>

12 Erklärung zur Dissertation

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

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Allen voran bedanke ich mich sehr herzlich bei *Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Christian Heiß*, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des Universitätsklinikums Gießen und der Experimentellen Unfallchirurgie, für die Möglichkeit in seiner Klinik promovieren zu dürfen.

Mein größter Dank gilt *Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thaqif El Khassawna*, dem Betreuer meiner Dissertation und mein Doktorvater. Ohne dich und deine starke Unterstützung sowie deine wertvollen Tipps wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Ich danke dir für dein Vertrauen, deine Geduld und Unterstützung. Vielen Dank für die Möglichkeit ein Teil deines Teams gewesen zu sein.

Ich bedanke mich bei der Leiterin der Experimentellen Unfallchirurgie *Frau Prof. Dr. rer. nat. Katrin Susanne Lips* für die Bereitstellung der Räumlichkeiten zur Durchführung der Arbeit.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der Experimentellen Unfallchirurgie, allen voran *Frau Deeksha Malhan, PhD* die mir bei Fragen immer zur Verfügung stand und mir bei Problemen kompetent und schnell geholfen hat.

Ebenfalls möchte ich mich bei allen beteiligten externen Kooperationspartnern bedanken: *Herrn Robert Müller* von der Technischen Universität Dresden für seine hilfreichen Tipps über die Methode der Finiten Elemente. *Herrn Oskar Schmidt-Bleek* vom Julius Wolff Institut der Charité Berlin für die Überlassung der μ CT-Scans sowie *Herrn Dag Wulsten*, ebenfalls vom Julius Wolff Institut der Charité Berlin für die Durchführung der Biomechanik-Experimente.

Ich bedanke mich nochmals bei allen an dieser Arbeit beteiligten Personen von ganzem Herzen! Ohne Sie/euch wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Dankeschön!