

Aus dem Julius Wolff Institut für Biomechanik und Muskuloskeletale Regeneration der
Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Computertomographische Analyse der ossären Mikroarchitektur
mit räumlichem Bezug zu einem osteochondralen Defekt –
Entwicklung einer distanzabhängigen Darstellungsmethode

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Lena Westermann
aus Münster, Westfalen

Datum der Promotion: 13.12.2019

INHALTSVERZEICHNIS

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	iii
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	v
<i>Tabellenverzeichnis</i>	vi
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	vii
<i>Abstract</i>	viii
1. <i>Einleitung</i>	1
1.1 Physiologie und Mikroarchitektur des Knochens	1
1.2 Klinische Relevanz der knöchernen Mikroarchitektur	4
1.3 Darstellung der Mikroarchitektur	7
1.3.1 Histomorphometrie	8
1.3.2 Micro-Computertomographie	8
1.3.3 Hochauflösende periphere quantitative Computertomographie	10
1.3.4 Multidetektor-Computertomographie	10
1.3.5 Magnetresonanztomographie	11
1.3.6 Thresholding	11
1.4 Grundlagen der knöchernen Mikroarchitektur in der Forschung	13
1.5 Zugrundeliegendes Studienmodell	14
1.5.1 Ziele dieser Arbeit	15
2. <i>Konzept und Entwicklung der Darstellungsmethode</i>	17
2.1 Erste makroskopische Einschätzung der Proben	17
2.2 Regions of Interest	17
2.3 Visuelle Differenzierung von Knochentypen	18
2.4 Algorithmus zur Visualisierung von Knochenparametern in Relation zum osteocondralen Defekt	18
2.4.1 Anwendung anhand der Dichteparameter	18
2.4.2 Übertragung der Methode auf weitere Knochenparameter	19
3. <i>Material und Methoden</i>	21
3.1 Gewinnung des Datensatzes	21
3.1.1 Herstellung der implantierten Scaffolds	21
3.1.2 Einteilung in Versuchsgruppen	22
3.1.3 Vorgehen bei der Implantation	22
3.1.4 Probengewinnung	24

3.2	Vorbereitung der Proben und Bildgewinnung mittels μ CT	25
3.3	Etablierte μ CT-Analyse	25
3.3.1	Definition der ROI	25
3.3.2	Binarisierung	26
3.3.3	Berechnung der Knochenparameter	27
3.4	Distanzorientierte Darstellung der ossären Mikroarchitektur	27
3.4.1	Ausrichtung der Scans	28
3.4.2	Analyse der Proben mit Fiji	28
3.5	Statistik	32
3.5.1	Binarisierung	32
3.5.2	Knochenparameterbestimmung mit Scanco	32
3.5.3	Distanzorientierte Darstellungsmethode	33
4.	<i>Ergebnisse</i>	35
4.1	Visuelle Darstellung der μ CT-Scans	35
4.2	Binarisierung	36
4.3	Analyse der Daten durch ROIs	38
4.4	Entwicklung der distanzorientierten Darstellungsmethode	41
4.4.1	Deskriptive Definierung ossärer Zonen	41
4.4.2	Separation Threshold	42
4.4.3	Grundlagen der distanzorientierten VpD-Methode	45
4.4.4	Anwendung und Auswertung anhand der Dichte	48
4.4.5	Übertragbarkeit der VpD-Methode auf weitere Parameter	58
5.	<i>Diskussion</i>	63
5.1	Limitationen in der Auswertung von definierten Arealen	63
5.2	Auswertung mit räumlichem Bezug ohne die Verwendung von ROIs	64
5.3	Anwendungsbeispiele der VpD-Methode auf andere Studien	65
5.4	Ausblick	68
	<i>Literaturverzeichnis</i>	71
	<i>Eidesstattliche Versicherung</i>	79
	<i>Lebenslauf</i>	81
	<i>Danksagung</i>	83

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

1	Röhrenknochen	2
2	Remodelling	3
3	Computertomographische Darstellung einer pathologischen Knochenstruktur	4
4	Physiologische und pathologische Mikroarchitektur	5
5	Funktionsweise eines μ CT	9
6	Beispiel Binarisierung	12
7	Auswirkung der Wahl des Thresholds	13
8	Beispiel Scaffold im Schafmodell	15
9	Schema der Regions of Interests	26
10	Schematische Erstellung der globalen ROI _X	30
11	Computertomographische Rekonstruktion der Proben	35
12	Vergleich visueller und algorithmischer Threshold	37
13	Vergleich der Standzeiten im Boxplot	39
14	Visueller Eindruck Knochentyp A und B	42
15	Histogramme von Knochentyp A und B	43
16	Binarisierung mittels Separation Threshold	44
17	Grundlage der distanzabhängigen VpD-Darstellung	46
18	Grafisches Ergebnis der VpD-Methode	47
19	Ergebnis der VpD-Darstellung ohne sichtbare Umbauprozesse (N_1 - N_6)	50
20	Ergebnis der VpD-Darstellung mit sichtbaren Umbauprozessen (O_1 - O_8)	51
21	Vergleich der Darstellung mit CT und distanzorientierter Darstellungsmethode	52
22	Schematische Darstellung der mathematischen Berechnung der Graphen	55
23	Beispielhafte Darstellung der umrandeten Trabekel	59
24	Distanzorientierte Darstellung der Anzahl der Übergänge von Trabekel zu Pore	60
25	Vergleich Dichte und Porenanteil in der VpD-Darstellung	61

TABELLENVERZEICHNIS

1	Versuchsgruppen	22
2	Statistische Auswertung	38
3	Auswertung der Graphen der distanzorientierten Darstellungsmethode . .	56

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

n	Anzahl der Elemente in der Stichprobe
r	Radius
3D	dreidimensional
anti-rhBMP-2	anti-recombinant human bone morphogenetic protein-2 antibodies
anti-TGF β	anti-transforming growth factor beta antibodies
BMD	bone mineral density (Knochendichte)
BV	bone Volume (Knochenvolumen)
BV/TV	bone volumen (Knochenvolumen) per total volume (Gesamtvolumen)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomograph
DXA	dual energy X-ray absorptiometry (Doppelröntgenabsorptiometrie)
HR-pQCT	High-resolution peripheral quantitative computed tomography (Hochauflösende periphere quantitative Computertomographie)
IOF	International Osteoporosis Foundation
MDCT	Multi Detektor Computertomographie
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PLG	Poly(D,L-lactide-co-glycolide)
RGB-Bild	Bild im Rot-Grün-Blau Farbraum
rhBMP-2	recombinant human bone morphogenetic protein-2
rhTGF β	recombinant transforming growth factor beta
ROI	region of interest (ausgewählter Bildbereich)
SNR	signal to noise ratio (Signal-Rausch-Verhältnis)
Tb.N	trabecular number (Trabekelanzahl)
Tb.Sp	trabecular separation (Trabekelabstand)
Tb.Th	trabecular thickness (Trabekeldicke)
VOI	volume of interest (ausgewähltes Volumen)
VpD	Value per Distance
WHO	World Health Organization
μ CT	micro Computertomographie

ABSTRAKT

Die Mikroarchitektur eines Knochens ist eng verknüpft mit seiner biomechanischen Funktionalität. Der Einfluss dieser knöchernen Mikroarchitektur wird in Bezug auf Pathogenese und klinische Einschätzung von Krankheiten wie Osteoporose, Rheumatoider Arthritis und Stoffwechselerkrankungen sowie im Rahmen der Entwicklung pharmakologischer und invasiver Interventionen intensiv untersucht. Entsprechende Eingriffe sind die Implantation von Bioimplantaten und Osteosynthesematerial - häufig zunächst tierexperimentell getestet - zur Verbesserung der Knochenheilung. In beiden Fällen basiert der Therapieerfolg unter anderem auf einer guten Integration des Materials in den Knochen und förderlichen Wechselwirkungen zwischen Implantat und umgebenden Gewebe.

Diese Arbeit zielt darauf einzelne Parameter der ossären Mikroarchitektur (BV/TV, Tb.Th, Tb.N, und Knochendichte) in Relation zu einem konkreten Ausgangspunkt – in diesem Fall einem Defekt - zu setzen und dessen Einfluss in allen räumlichen Dimensionen übersichtlich und dennoch differenziert betrachten zu können. Hierfür wurde zunächst das etablierte Vorgehen angewandt einzelne ROIs in verschiedenen Positionen zum Defekt auszuwerten. Da diese Methode bezogen auf den verwendeten Probensatz nicht zufriedenstellend war, erfolgte als Ergebnis dieser Arbeit die Entwicklung eines Algorithmus, der die Verteilung der Trabekelparameter in der gesamten Probe mit Bezug auf ihre räumliche Positionierung zum Defekt übersichtlich visualisiert. Die erhaltene grafische zweidimensionale Darstellung umfasst drei quantitative Informationen: (1) Distanz des Parameters zum Ausgangspunkt, (2) Höhe des Parameters innerhalb der Probe und (3) Anteil der erfassten Pixel an dieser Position.

Diese zweidimensionale Darstellungsform der computertomographischen 3D-Bilder ermöglicht trotz hohen Informationsgehalts eine übersichtliche Visualisierung der ossären Mikroarchitektur in Abhängigkeit von ihrer Distanz zum Defekt. Sie ermöglicht eine verbesserte Auswertung der Zusammenhänge zwischen Implantaten und ihrem Einfluss auf den umgebenden Knochen unabhängig von ROIs, einzig bezogen auf ihre Distanz zum Defekt, und wird hoffentlich dadurch zur Entwicklung von Materialien für die Knochenheilung beitragen.

ABSTRACT

The biomechanical functionality of bones is, among other things, based on their microarchitecture. There is ongoing and intensive research on the influence of bone architecture on the pathogenesis and the clinical evaluation of diseases such as osteoporosis, rheumatoid arthritis or metabolic diseases as well as its role in the development of pharmacological and invasive interventions. One such intervention, often first tested in animal models, is the implantation of biomaterial-based implants and osteosynthesis materials, designed to improve bone healing. In both cases a solid integration of the implant into the bone and supportive interactions between implant material and surrounding tissue is fundamental to therapy success.

This thesis elaborates a way to assess bone microarchitectural parameters such as BV/TV, Tb.Th, Th.N and bone density in relation to a specific starting point – in this case a defect – and evaluate its influence clearly on all spatial dimensions. To this purpose, a well-established procedure was first applied on individual ROIs in specific spatial positions to the defect. Because this method was insufficient to properly characterize the architecture an algorithm was developed, that enables us to clearly visualize the distribution of trabecular parameters throughout the sample with respect to their spatial positioning to the defect. The two-dimensional representation obtained comprises three quantitative forms of information: (1) Distance of the parameter to the starting point, (2) height of the considered parameter within the sample and (3) quantity of considered pixels at that position.

This approach to summarize three dimensional information into a two dimensional graphic allows us to offer a clear and intuitive visualization of bone microarchitecture in relation to the distance from the defect while retaining a high density of information in the same visualization. It enables us an improved evaluation of interactions between implants and surrounding bone without using ROIs, only depending on the spatial relation to the defect, and will hopefully help to improve the development of materials for bone healing.

1. EINLEITUNG

1.1 *Physiologie und Mikroarchitektur des Knochens*

Der menschliche Körper zählt über 200 einzelne Knochen. Sie werden in ihrer Gesamtheit als Skelettsystem bezeichnet, erfüllen jedoch unterschiedliche Funktionen und sind diesen entsprechend in Form, Anordnung und Struktur angepasst. Ein komplexes Zusammenspiel von langen Röhrenknochen, Sehnen und Muskeln ermöglicht beispielsweise aktive Bewegungen. Andere Knochen wie Rippen und der Schädel umgeben und schützen empfindliche innere Organe oder sind als Träger des Knochenmarks an der Blutbildung beteiligt. Durch die gesteuerte Einlagerung und Freisetzung von Calcium und Phosphat sind sie wichtiger Bestandteil des Calcium-Phosphathaushaltes und interagieren mit dem Hormonsystem.¹ Besonders stark mineralisierte Gehörknöchelchen übertragen Schallwellen vom Trommelfell in das Innenohr² und tragen so zur Sinneswahrnehmung bei. Knochen erfüllen also vielfältige Funktionen, die weit über den Bewegungsapparat hinausgehen, und sind eng verzahnt mit den komplexen physiologischen Abläufen des Körpers.^{1,3} Die hohe Variabilität der funktionalen Ansprüche spiegelt sich in den individuellen Eigenschaften der einzelnen Knochen wider. Das menschliche Skelettsystem ist beispielsweise darauf ausgelegt einer Vielzahl unterschiedlicher mechanischer Belastungen standzuhalten. Um Gewicht tragen zu können müssen Knochen fest und stabil sein. Bei jeder Bewegung muss beispielsweise Kompressionsenergie abgefedert werden können ohne die Knochenstruktur zu beschädigen. Die Eigenschaften des Knochens sind daher ein Kompromiss zwischen Festigkeit und Flexibilität, der je nach Belastungsanspruch in die eine oder andere Richtung gewichtet ist. So zeigen die Knochen des Skelettsystems unterschiedliche strukturelle und anatomische Eigenschaften und können diese auch in begrenztem Umfang an ihre Funktion adaptieren.⁴

Der makro- und mikroskopische Aufbau des Knochens bildet die Grundlage für seine Funktionalität. Knochengewebe besteht aus Zellen sowie organischen und nicht-organischen Anteilen. Der wichtigste organische Bestandteil sind Fibrillen vom Kollagen-Typ-1 zwischen denen Hydroxyapatitkristalle aus Calcium und Phosphat ausfallen und den Knochen mineralisieren.⁵ Die Verknüpfung von zugfestem Kollagen und druckfesten Kristallen verleiht dem Knochen seine Biegefestigkeit.⁵ Ein erhöhter Anteil mineralisierter Hydroxyapatitkristalle bedingt dabei eine erhöhte Festigkeit des Knochens bei verminderter Flexibilität.² Zwei Knochentypen werden aufgrund ihrer Fibrillenstruktur unterschieden: Unreifer Knochen zeigt netzartig miteinander verwebte Fibrillen und wird daher als Geflechtknochen bezeichnet. Während der Knochenreifeung werden die Fibrillen in ihrer Anordnung optimiert und bilden etwa 3-5µm dicke Knochenlamellen aus ähnlich ausgerichteten Kollagenfibrillen. Aufgrund der schichtartigen Anordnung der Knochenlamellen wird dieser Knochen als Lamellenknochen bezeichnet.⁵

Makroskopisch werden zwei Knochentypen voneinander differenziert (exemplarisch

dargestellt in Abb. 1). Die Substantia compacta (=Kortikalis) besteht aus sehr kompakten, dicht und konzentrisch geordneten Knochenlamellen. Sie bildet die äußere Rindenschicht des Knochens, kann je nach Beanspruchung unterschiedlich stark ausgeprägt sein⁵ und macht etwa 80% der gesamten Knochenmasse aus.⁴ Im Inneren der Knochen befindet sich die Substantia spongiosa. Hierbei handelt es sich um eine porös erscheinende Struktur, in der die Knochenlamellen zu Trabekeln angeordnet und ihre Zwischenräume mit Knochenmark gefüllt sind.² Die inneren Knochenoberflächen werden von Endost ausgekleidet, einer Schicht aus Knochenzellen.⁵ Von außen umgibt das Periost den Knochen.⁵ Der Anteil von Kortikalis und Spongiosa variiert und ist abhängig von der mechanischen Funktion des Knochens.^{5,6} Durch ihre Architektur ist die Spongiosa trotz geringer Knochenmasse extrem belastbar.^{2,4}

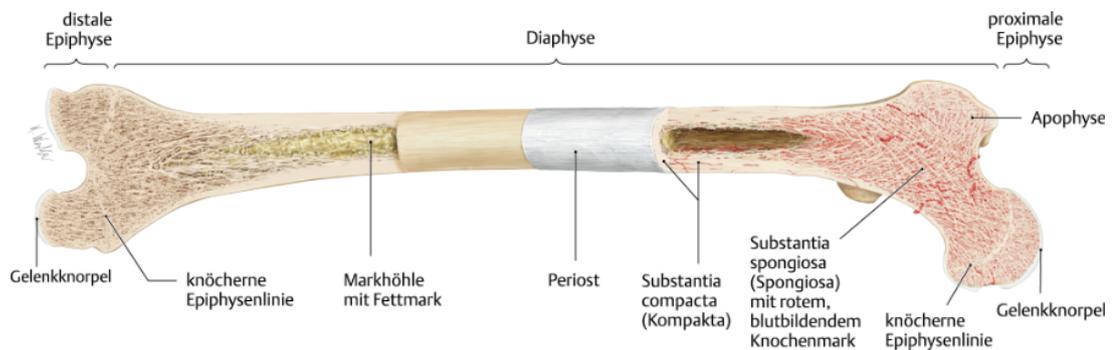


Abb. 1: Röhrenknochen

Schematischer Aufbau eines langen Röhrenknochens (Quelle: Aumüller et al. 2014⁷)

Abbildung 2 gibt eine Übersicht über die komplexen Interaktionen verschiedener Zellen, die für den Auf- und Abbau des Knochengewebes verantwortlich sind und den Grad der Mineralisation regulieren. Etwa 90% dieser Knochenzellen sind Osteozyten.¹ Sie befinden sich eingemauert von mineralisierter Knochenmatrix in kleinen Lakunen und interagieren untereinander und mit anderen Zellen über lange Fortsätze, die sich durch kleine Kanälchen im Knochengewebe ziehen.^{1,5} Ihnen wird eine wichtige Rolle für die Vitalität sowie für die Erkennung der mechanischen Belastung des Knochens zugesprochen.¹ Osteoblasten gelten als Zellen des Knochenaufbaus, da sie Kollagene, Proteoglykane, Glykoproteine und weitere Bestandteile der organischen Extrazellulärmatrix synthetisieren und die Grundlage für Mineralisation und Entstehung neuer Knochenlamellen bilden.⁵ Gleichzeitig interagieren sie mit Osteoklasten, großen mehrkernigen Zellen, die mineralisierten Knochen durch enzymatische Auflösung der Calcium-Phosphat-Kristalle und Kollagene in definierten Arealen abbauen können.⁵ Knochenstellen an denen keine Umbauprozesse stattfinden werden von Bone Lining Cells bedeckt, die über Gap Junctions miteinander in Kontakt stehen und insbesondere Resorptionsvorgänge durch Osteoklasten hemmen.¹ Jährlich werden durch diese Zellen etwa 10% der gesamten Knochenmasse umgebaut.⁵ Dieser als Remodelling bezeichnete Prozess ermöglicht die

ständige Anpassung des Knochens an belastungsabhängige, hormonelle und metabolische Veränderungen⁴ und wird gewährleistet durch das balancierte Zusammenspiel von Knochenab- und -neubau.¹ Es wird angenommen, dass Osteozyten als Mechanosensoren geschädigte oder zu überarbeitende Knochenareale identifizieren und die Zellen für den Knochenumbau aktivieren.¹ Osteoklasten resorbieren die entsprechenden Knochenareale innerhalb definierter Abbauzonen und interagieren ihrerseits mit Osteoblasten, welche anschließend diese Regionen mit neuen Kollagenfibrillen und weiteren organischen Bestandteilen füllen.⁴ Die Mineralisation dieser organischen Matrix durch die Ablagerung von Calcium-Phosphat-Kristallen härtet die neue Knochenstruktur.¹

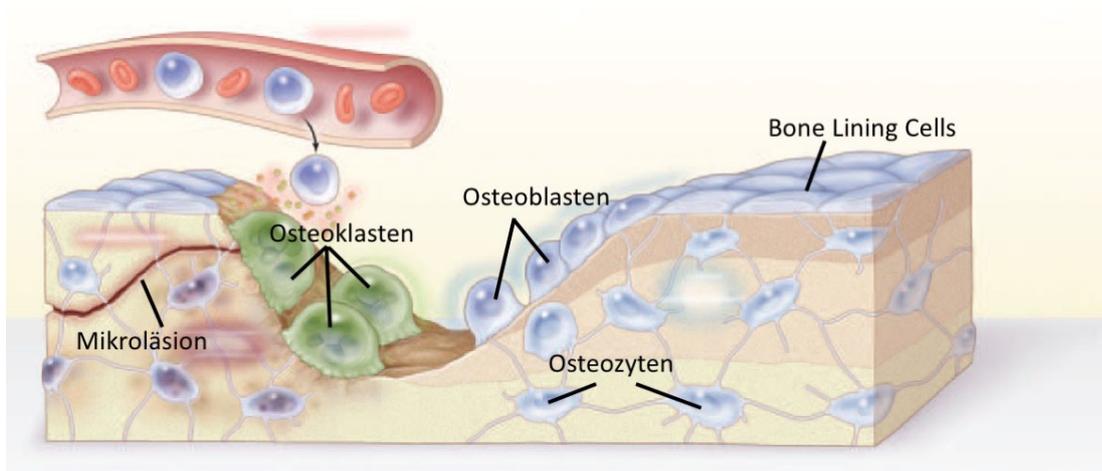


Abb. 2: Remodelling (Quelle: adaptiert nach Seeman und Delmas 2006²)

Die Trabekel der Spongiosa werden in diesem Prozess deutlich häufiger umgebaut und neu ausgerichtet als die Lamellen in der Kortikalis.² Die Umbauprozesse orientieren sich dabei unmittelbar an den biomechanischen Anforderungen. Die Trabekel der Spongiosa werden beispielsweise ab- und in optimierter Ausrichtung zur größten Krafteinwirkung neu aufgebaut, sodass ihre Zug- und Druckstabilität der Belastung bestmöglich angepasst wird.⁴ Dass sich der Aufbau des Knochens an seiner Belastung orientiert beschreibt auch das Wolff'sche Gesetz. Beanspruchung eines Knochens induziert demnach Knochenaufbau und vermehrte Stabilität, wohingegen mangelnde Beanspruchung eines Knochens zu dessen Abbau führt. Zugleich kann durch eine optimierte Ausrichtung der Knochen-trabekel die gesamte Knochenmasse reduziert und der Knochen zugleich leicht und stabil gestaltet werden.⁴ Seine Funktionalität basiert unter anderem auf dieser dreidimensionalen Ausrichtung und Gestalt der Trabekel, welche durch verschiedene Parameter beschrieben werden können. Dabei spielen unter anderem die Anzahl der Trabekel, ihre Dicke, ihre Vernetzung untereinander und ihr Abstand eine Rolle. Die Gesamtheit der Eigenschaften der Knochen-trabekel wird als Mikroarchitektur des Knochens bezeichnet⁴ und ist ein wichtiger Parameter für die Knochenqualität.^{4,8,9}

1.2 Klinische Relevanz der knöchernen Mikroarchitektur

Zahlreiche Erkrankungen sind mit einer Veränderung der Knochenfunktion und –qualität assoziiert. Neben offensichtlichen Pathologien wie beispielsweise einer Fraktur gehen auch subtilere Prozesse wie Osteoporose, Arthrose, Rheumatoide Arthritis und Stoffwechselerkrankungen mit einer gestörten Knochenphysiologie einher¹⁰ und haben einen entscheidenden Einfluss auf die Mobilität und Belastbarkeit. Pathophysiologisch sind häufig die Prozesse des Remodellings und somit des adäquaten Umbaus des Knochens gestört.⁴ Dies führt letztendlich aufgrund reduzierter Belastungsfähigkeit zu Läsionen auf mikroskopischer Ebene, die bis zu Fraktur und Funktionsverlust akkumulieren können.

Von Bedeutung ist hierbei die Komplexität des Systems. Die Veränderungen einzelner Parameter im Stoffwechsel, in der Belastung oder in der Aktivität der Knochenzellen können bereits große Auswirkungen auf das Skelettsystem zeigen. Im Rahmen der Osteomalazie oder Rachitis kann eine gestörte Einlagerung von Calcium und Phosphat, häufig aufgrund eines pathologischen Vitamin-D-Stoffwechsels, zu einer verminderten Mineralisation und Stabilität des Knochens führen. Folge hiervon können Knochenschmerzen und Deformierungen der Knochen bis hin zu Frakturen sein.¹¹ Aus einem Ungleichgewicht im Remodelling mit verstärkter Osteoklastenaktivität und inadäquater Osteoblastenaktivität kann ein Verlust von Knochensubstanz resultieren, ein Pathomechanismus der Osteoporose.¹ Im Gegenzug hierzu ist bei Osteopetrose der Knochenumbau unter anderem durch eine genetisch bedingte reduzierte Osteoklastenaktivität eingeschränkt. Eine hierdurch bedingte Zunahme der Knochenmasse kann letztlich aufgrund eines inadäquaten Remodelling und einer pathologischen Mikroarchitektur trotz erhöhter Knochendichte und Knochenmasse zu einer verminderten Knochenqualität und letztlich zu Frakturen führen.¹²

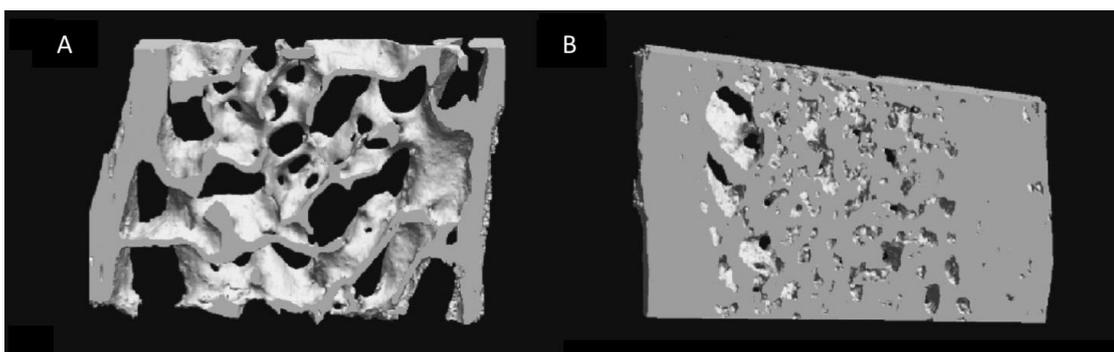


Abb. 3: Computertomographische Darstellung einer pathologischen Knochenstruktur

Human; (A) Knochenstruktur bei Osteoporose und (B) bei Morbus Paget. (Quelle: Chappard et al. 2005¹³)

Im Rahmen des Morbus Paget ist der Knochenumbau insgesamt erhöht. Eine gesteigerte Osteoklastenaktivität führt zu einem überdurchschnittlich hohen Knochenabbau,

der kompensatorisch erhöhte Knochenaufbau durch Osteoblasten erfolgt unorganisiert und führt langsam zu einer pathologischen Verdickung und Verformung der Knochen (siehe Abb. 3). Die dadurch reduzierte Knochenqualität und inadäquate Belastungsfähigkeit begünstigt weitere Deformationen und Frakturen.¹⁴ Auch im Rahmen entzündlicher Prozesse des Knochens und der Gelenke wird die Knochenstruktur angegriffen, die Stabilität reduziert und das Remodelling beeinflusst. So können entzündliche Gelenkerkrankungen des rheumatoiden Formenkreises, Knochenentzündungen infektiöser Genese oder (aktivierte) Arthrosen die Knochenqualität und -funktionalität nachhaltig beeinträchtigen.¹⁴⁻¹⁶

Bis in die 1980er Jahre wurden Pathophysiologien des Skelettsystems jedoch weitestgehend ohne Berücksichtigung der knöchernen Mikroarchitektur erforscht und behandelt. Osteoporose beispielsweise wurde ausschließlich als reduzierte Knochendichte (= Bone mineral density = BMD = Anteil mineralisierten Gewebes pro Knochenvolumen) definiert.^{17,18} Zahlreiche Forschungsergebnisse der letzten Jahrzehnte beweisen jedoch, dass nicht die Knochendichte allein, sondern auch die Knochenqualität einen entscheidenden Einfluss auf die Funktionalität und Belastungsfähigkeit hat.^{9,17,19,20} Felsenberg und Doonen stellten 2005 den bone quality framework vor, in dem relevante Faktoren für die Knochenqualität kombiniert werden. Ihnen zufolge ist die Qualität des Knochens abhängig von der Geometrie (wie Form, Durchmesser, mechanische Orientierung), der Mikroarchitektur (Anzahl, Dicke, Ausrichtung, Abstand und Verknüpfung der Trabekel), der Porosität der Kortikalis, der Qualität der Kollagenfibrillen und ihrer Mineralisation sowie dem Vorhandensein von Mikroläsionen.^{6,8,21}

Auch die World Health Organisation (WHO) und die International Osteoporosis Foundation (IOF) beschreiben die Osteoporose seit den 1990er Jahren als generalisierte Knochenerkrankung, assoziiert mit geringer Knochendichte und Veränderungen der knöchernen Mikroarchitektur (exemplarisch dargestellt in Abbildung 4), welche gemeinsam zu einem erhöhten Frakturrisiko führen.²² Die diagnostisch relevanten Parameter einer Osteoporose umfassen demnach sowohl eine Einschätzung der Knochenmasse - routinemäßig, mit geringem Aufwand und flächendeckend mittels Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DXA-Scans) durchgeführt - als auch eine Beurteilung der Knochenqualität.²²

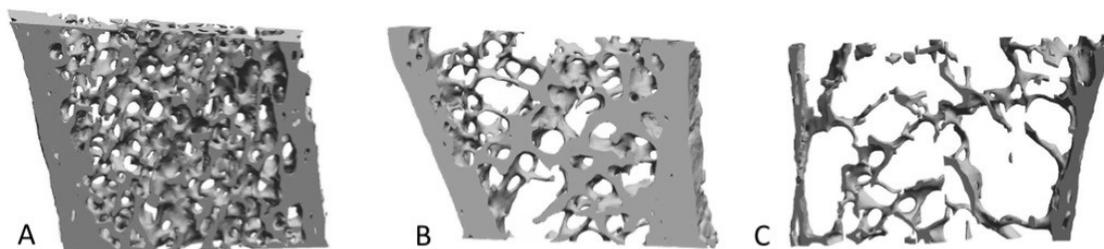


Abb. 4: Physiologische und pathologische Mikroarchitektur

A) Physiologisch: dichte Substantia compacta und stabile Spongiosa B) Postmenopausale Osteoporose C) Schwere Osteoporose unter Glucocorticoidtherapie (Quelle: adaptiert nach Chappard et al. 2008⁴)

Die Beurteilung der Knochenqualität ist jedoch aufgrund der Vielzahl an assoziierten Faktoren ungleich schwieriger. Bislang fehlt eine klinisch etablierte Methode, sodass im Alltag die Diagnose der Osteoporose weitestgehend auf der BMD-Auswertung mittels DXA-Scans beruht.^{17,22} Die frühzeitige Diagnose einer Osteoporose ist wichtig, um das Frakturrisiko einschätzen und gegebenenfalls therapeutisch entgegensteuern zu können. Unter der Annahme, dass auch die räumliche Gestaltung der Knochen trabekel einen von der Knochendichte unabhängigen Einfluss auf das Frakturrisiko hat, könnte durch die gezielte Einbeziehung der Trabekelparameter als einen Faktor der Knochenqualität die Einschätzung des Frakturrisikos verbessert werden.^{19,20,23} Ein Ansatz hierfür ist die Kombination der Messwerte des DXA-Scans mit klinischen Parametern des Patienten wie Alter und Geschlecht zu sogenannten FRAX-Scores (fracture risk assessment tools), die eine verbesserte Risikoeinschätzung des Frakturrisikos ermöglichen sollen.^{22,24–27} Als Erweiterung können auch Mikroarchitektureigenschaften hinzugezogen werden (z.B. der Trabecular bone score TBS),²⁸ die jedoch ebenfalls auf der zweidimensionalen DXA-Messung basieren, nur in lumbaren Wirbelkörpern bestimmt werden und deren Aussagekraft bezüglich der Knochenstabilität nicht eindeutig geklärt scheint.^{27–29} Aufgrund der volkswirtschaftlichen und globalen Relevanz der Osteoporose und damit verbundenen Frakturen wird hier intensiv nach zuverlässigen, kostengünstigen und flächendeckend einsetzbaren Analysemethoden gesucht.²⁷

Die Bedeutung der knöchernen Mikroarchitektur zeigt sich exemplarisch auch in der chirurgischen Intervention knöcherner Pathologien. Die osteosynthetische Versorgung von Frakturen beispielsweise ermöglicht über das Einbringen von Materialien wie Schrauben und Platten eine hohe Stabilität und bildet die Grundlage einer verbesserten Frakturheilung auch bei komplizierten Brüchen. Endoprothesen wie künstliche Knie- und Hüftgelenke werden seit vielen Jahren und immer häufiger in das Skelettsystem integriert.³⁰ Der Erfolg solcher eingebrachten Implantate ist aber grundsätzlich auch von der Knochenqualität und damit auch von der knöchernen Mikroarchitektur abhängig in welche sie eingebettet werden. Verminderte Knochenqualität wie bei Osteoporose erhöht nicht nur das Frakturrisiko sondern reduziert gleichzeitig die Stabilität und Wirksamkeit von Knochenimplantaten,^{31–34} was insgesamt die therapeutischen Maßnahmen bei osteoporotischen Patienten begrenzt. Es ist vorstellbar unter Kenntnis der lokalen Knochenqualität eine bessere Nutzen-Risiko-Abschätzung für den Einsatz von Prothesen und Implantaten und dadurch ein besseres Outcome in der Versorgung insbesondere älterer Patienten zu erzielen.^{32–34}

Anhand der klinischen Beispiele der Osteoporose sowie der Implantation von Fremdmaterialien in Knochen wird deutlich, dass die Beurteilung der Knochenqualität, und als ein Aspekt dieser die Mikroarchitektur eine entscheidende Rolle spielt. Die klinische Bedeutung einzelner Parameter der Trabekelarchitektur wurde bislang jedoch nicht grundlegend genug erforscht, als dass ihre Erhebung zum Beispiel in Form von Algorithmen zur Einschätzung des Frakturrisikos Verwendung fände. Eine notwendige Voraussetzung hierfür sind umfassende Datenerhebungen und Referenzwerte, um ein Verständnis davon

zu ermöglichen wie die Architektur des Knochens in gesunden Individuen aufgebaut ist, wie sie sich im Laufe des Lebens und unter physiologischen Einflüssen verändert und in welchem Maße sie mit Pathologien des Skelettsystems korreliert.^{19,20,33–35} Grundlegend werden hierfür technische Methoden benötigt, die diese Parameter unverfälscht erfassen und analysieren können und potenziell klinisch etablierbar sind. Unter Anderem aufgrund der zunehmenden Relevanz der Osteoporoseforschung in einer demographisch älter werdenden Gesellschaft wird vielfach an der Entwicklung entsprechender technischer Verfahren gearbeitet. Unter anwendungsorientierten Gesichtspunkten gilt es zurzeit einen methodischen Mittelweg zwischen qualitativ hoher Auflösungen zur akkuraten Darstellung der Mikroarchitektur und umsetzungsrelevanten Kriterien wie Invasivität, Strahlenbelastung und Verfügbarkeit zu finden. Von Besonderem Interesse sind für den klinischen Alltag daher Ansätze, die auf eine strahlenarme oder strahlenfreie in vivo Analyse der Trabekelarchitektur und damit potenziell der Knochenqualität zielen. Ein tiefgreifendes Verständnis dieser Prozesse durch umfassende Datenerhebung und Forschung kann langfristig sowohl in der Prävention als auch in der Therapie knöcherner Erkrankungen von entscheidendem Vorteil sein. Hier seien beispielsweise eine mögliche Ergänzung der aktuellen DXA-Scans zur Prädiktion von Frakturrisiken oder die verbesserte Evaluation der Wirksamkeit von pharmakologischen oder chirurgisch-interventionellen Therapien bei Knochenpathologien erwähnt.^{22,31,32,36–39} Im Folgenden wird auf die derzeit verfügbaren technischen Möglichkeiten zur Beurteilung der knöchernen Mikroarchitektur eingegangen, um die Rolle der radiologischen Bildgebung in der Knochenforschung für die weitere Arbeit zu erläutern.

1.3 Darstellung der Mikroarchitektur

Da die Darstellungsmethoden der knöchernen Mikroarchitektur lange Zeit technisch stark limitiert waren galt auch die gezielte Analyse von Knochen trabekeln und ihrer komplexen Architektur als schwierig. Trabekel sind mikroskopisch kleine Strukturen mit einer durchschnittlichen Größe von 80 bis max 200µm, deren erste Untersuchungen histomorphometrisch erfolgten. Im Folgenden werden zunächst die technischen Verfahren beschrieben, die eine Darstellung der Knochenstruktur erlauben und so eine Auswertung ermöglichen. Hierbei stellt die Histomorphometrie die Grundlage zur Darstellung der Trabekelarchitektur dar. Es folgte die Entwicklung radiologischer Darstellungsmethoden, von denen die Mikro Computertomographie (µCT) aufgrund der hohen Auflösung insbesondere ex vivo als Goldstandard dient. In der klinischen Anwendbarkeit in vivo nähern sich qualitativ unter anderem die hochauflösende periphere quantitative Computertomographie (HR-pQCT), die Multidetektorcomputertomographie (MDCT) und die Magnetresonanztomographie (MRT) dieser Referenzmethode an.

1.3.1 Histomorphometrie

In der Histomorphometrie werden seit den 1950er Jahren Knochenbiopsien in mikroskopischen Schnitten ausgewertet. Sie galt für viele Jahre als Standard zur Beurteilung der Knochenarchitektur und findet häufig Verwendung um neben mineralisiertem Knochen auch Zellen, Proteine und Remodellingprozesse histologisch zu analysieren, wofür radiologische Verfahren ungeeignet sind.^{10,11,40} Die Histomorphometrie ist jedoch zweidimensional und die Extrapolierung der Trabekelparameter zur Beurteilung der Trabekelstruktur im Raum insbesondere im Vergleich zu dreidimensionalen Messverfahren wie der μ CT fehleranfällig.^{13,40,41} Zusätzlich ist die Probengewinnung invasiv, die Proben stehen anschließend keinen weiteren Untersuchungen zur Verfügung und die Auswertung ist zeitaufwändig und untersucherabhängig, sodass die klinische Anwendbarkeit für die Analyse der knöchernen Mikroarchitektur eingeschränkt ist.

Relevante Parameter der Trabekelstruktur in der Histomorphometrie sind der prozentuale Anteil mineralisierten Knochens am Gesamtknochenvolumen ($BV/TV = \text{bone volume} / \text{total volume}$), die Anzahl der Knochen trabekel pro Millimeter ($Tb.N = \text{trabecular number}$), die Dicke der Trabekel ($Tb.Th = \text{trabecular thickness}$) sowie der Abstand zwischen einzelnen Trabekeln in Millimetern ($Tb.Sp = \text{trabecular separation}$).⁴¹ Das BV/TV kann direkt anhand der zweidimensionalen Bilder berechnet werden. Die dreidimensionalen Parameter $Tb.N$, $Tb.Sp$ und $Tb.Th$ werden durch mathematische Berechnungen aus den zweidimensionalen Schnittbildern der Histomorphometrie abgeleitet basierend auf der Annahme, dass ein bestimmtes Strukturmodell zugrunde liegt. Im Gegensatz zur Berechnung des BV/TV s sind diese Werte entsprechend fehleranfälliger.^{40,41} Diese und weitere von Parfitt 1987 standardisierte Parameter bilden die Grundlage der quantitativen Morphometrie und werden heute auch auf die radiologische Auswertung übertragen.⁴⁰⁻⁴² Sie werden im Folgenden bei Bedarf als Trabekelparameter zusammengefasst.

1.3.2 Micro-Computertomographie

Die Einführung der hochauflösenden Mikro-Computertomographie (μ CT) durch Feldkamp et al., 1989, ermöglichte erstmalig die nicht-destruktive Auswertung der knöchernen Mikroarchitektur in vitro.⁴³ Die Bildgenerierung erfolgt analog zu regulären Computertomographen mit einer polychromatischen Strahlenquelle (siehe Abb. 5). Ein Kegel aus Röntgenstrahlen wird auf die Probe gerichtet und je nach Beschaffenheit der Probe bei seinem Durchtritt unterschiedlich abgeschwächt.⁴⁴ Die elektronendichten Hydroxyapatitkristalle des Knochens schwächen die Röntgenstrahlen besonders deutlich ab, was eine gute Differenzierung zwischen Knochen und Weichteilen ermöglicht.^{10,44} Die Strahlen treffen auf einen hinter der Probe befindlichen Detektor und generieren einen Messwert, der digital gespeichert wird. Anschließend wird je nach Gerät entweder die Probe oder der Komplex aus Strahlenquelle und Detektor um einen definierten Winkel, meist $0,5^\circ$ rotiert und eine weitere Messung durchgeführt.⁴⁴ Die Rotation erfolgt bis 180°

oder 360°. Die typische Aufnahmedauer ex vivo liegt je nach Probengröße und Auflösung zwischen einigen Minuten und mehreren Stunden.¹⁰

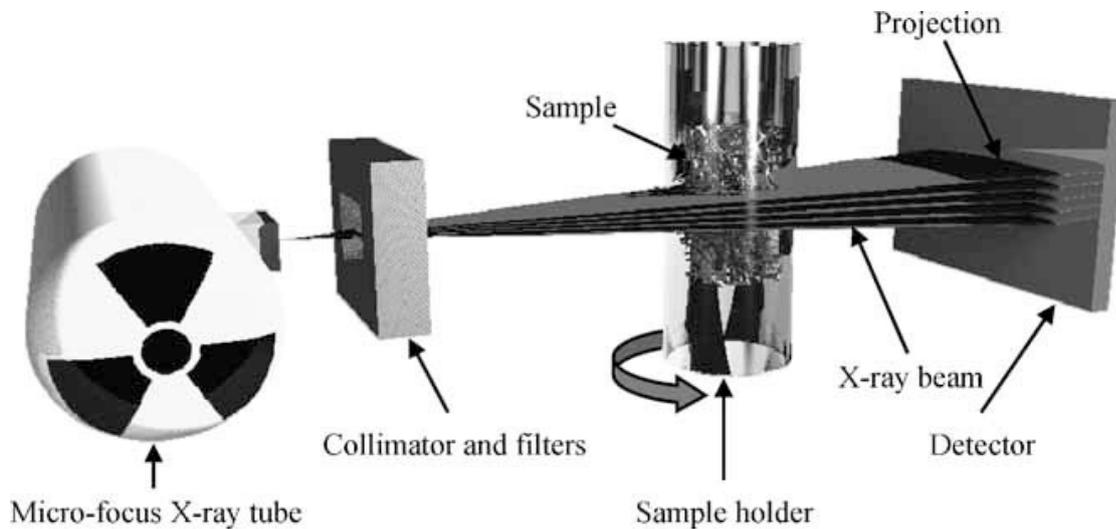


Abb. 5: Funktionsweise eines µCT (Quelle: Bouxsein et al. 2010⁴⁰)

Mithilfe einer Rekonstruktionssoftware können die aus zahlreichen Positionen erhaltenen Werte in Form von Grauwerten zu Schnittbildern umgerechnet werden. Diese stehen in Relation zur Hydroxyapatitkonzentration des Knochens und können daher zur Analyse der Knochenstruktur herangezogen werden.¹⁰ Je kleinschrittiger die einzelnen Messungen, desto höher die Auflösung. Erreicht das Verfahren eine Auflösung im Bereich von 1-100µm wird es als µCT bezeichnet.¹⁰ Von allen derzeit verfügbaren radiologischen Messmethoden verfügt die µCT mit Abstand über die höchste Auflösung.¹⁰

Die Voxelgröße beschreibt die dreidimensionalen Ausmaße der kleinsten gemessenen Einheit. Sie umfasst einen zweidimensionalen Bereich im Schnittbild (Pixel) sowie die Schichtdicke und ist idealerweise isotropisch, das heißt in allen drei Dimensionen gleich.^{35,40} Um die Strukturen von Interesse darstellen zu können sollte die Voxelgröße kleiner sein als diese.⁴⁰ Bei Großtieren und Menschen sind die Knochen trabekel mit einer Größe von 30-200µm durch die hohe Auflösung der µCT grundsätzlich gut darstellbar.^{10,40} Mit entsprechend kleinen Voxelgrößen können auch feinere Trabekel in Kleintiermodellen gut wiedergegeben werden.⁴⁰ Generell sehr niedrige Voxelgrößen für alle Fragestellungen zu verwenden ist nur bedingt umsetzbar, da hierdurch deutlich längere Aufnahmezeiten und größere Datensätze entstehen.⁴⁰ Grundsätzlich zeigt die µCT Analyse der Trabekelstruktur eine hohe Korrelation mit histomorphometrischen Auswertungen und erreicht eine sehr hohe Auflösung, sodass sie unter den radiologischen Verfahren als Goldstandard gilt.^{40,45}

Durch die hohe Auflösung und die mittlerweile flächendeckende Verfügbarkeit verfügt die µCT insbesondere in der Knochenforschung über einen hohen Stellenwert.^{40,44} Der hohen Auflösung und entsprechend qualitativ hochwertigen Aufnahmen stehen eine hohe Zahl an Einzelmessungen und damit einhergehend eine lange Messdauer sowie ei-

ne hohe Strahlenbelastung gegenüber. Außerdem ist die Probengröße limitiert, weshalb die μ CT aktuell vor allem bei Biopsien in vitro oder Kleintiermodellen in vivo (hier aber nicht-invasiv möglich) Verwendung findet.^{35,40,46} Für die klinische in vivo Analyse werden zunehmend andere radiologische Verfahren entwickelt und eingesetzt. Alle radiologischen Schnittbildverfahren verfügen gegenüber der Histomorphometrie über den entscheidenden Vorteil, dass die Proben erhalten bleiben und weiteren Untersuchungen zur Verfügung stehen. Des Weiteren basiert die Analyse der Knochenmorphometrie durch die Auswertung von Schnittbildern auf dreidimensionalen Berechnungsmethoden (beispielsweise durch die Einpassung von Kugeln) und ist dadurch präziser als die indirekte Übertragung aus zweidimensionalen Strukturen in der Histologie.

1.3.3 Hochauflösende periphere quantitative Computertomographie

2005 wurde die hochauflösende periphere quantitative Computertomographie (HR-pQCT) vorgestellt, welche bei einer Voxelgröße von bis zu $82\mu\text{m}$ ¹⁰ die differenzierte Darstellung von kortikalem und trabekulärem Knochen in vivo ermöglicht.⁴⁷ Es ist die erste in vivo Methodik, deren Auflösung hoch genug ist, um die Trabekelarchitektur zu erfassen.⁴⁷ Es handelt sich um eine nicht-invasive Methode der Computertomographie, die aktuell allerdings auf die Messung von distalem Radius und distaler Tibia beschränkt ist und damit die Hauptmanifestationsorte der Osteoporose wie Wirbelsäule und Femur nicht beurteilen kann.^{10,36} Weitere Nachteile sind die Strahlenbelastung von etwa $3\mu\text{Sv}$ pro Scan und eine vermehrte Anfälligkeit für Bewegungsartefakte aufgrund der durchschnittlichen Messdauer von etwa 3 Minuten in vivo.^{10,48} Die HR-pQCT ist außerdem aktuell aufgrund geringer Verfügbarkeit vor allem der Forschung vorbehalten. Potenziell ist sie jedoch auch in der Klinik einsetzbar.³⁶ Die HR-pQCT hat langfristig das Potenzial einen Einblick in die knöchernen Mikroarchitektur des Menschen in vivo in verschiedenen Altersgruppen, Ethnizitäten, Geschlechtern und Erkrankungen zu geben und so aufschlussreiche Informationen über die Funktion und Entwicklung der Trabekelarchitektur zu liefern.³⁸

1.3.4 Multidetektor-Computertomographie

Die Multidetektor-Computertomographie (MDCT) ist ein gängiges CT-Verfahren, welches in der klinischen Anwendung flächendeckend eingesetzt wird. Mehrere Detektorzeilen ermöglichen die gleichzeitige Aufnahme mehrerer Schichten und erlauben so eine deutliche Verkürzung der Messdauer auch bei hochauflösenden Scans. Im Gegensatz zu HR-pQCT ist die MDCT auch für Aufnahmen von proximalen Skelettregionen wie Wirbelsäule und Femurkopf geeignet und daher bei osteoporoserelevanten Fragestellungen von Interesse.⁴⁹ Hochauflösende Aufnahmen des proximalen Skeletts gehen dabei mit einer hohen durchschnittlichen Strahlenbelastung von 3mSv sowie vermehrten Bewegungsartefakten einher. Eine weitere Limitation ist die geringe maximale Auflösung von $150\text{-}300\mu\text{m}$ bei einer Schichtdicke von mindestens $300\text{-}500\mu\text{m}$ in vivo, was über der

durchschnittlichen Größe der Knochen trabekel liegt.¹⁰ Bei Ito et al. ermöglichte jedoch die Auswertung der MDCT-Trabekelparameter eine zuverlässigere Differenzierung osteoporotischer Frakturen als die Bestimmung der BMD mittels DXA-Scan.⁵⁰ Auch Issever et al. halten die MDCT trotz geringer Auflösung zur Beurteilung der Trabekelarchitektur für grundsätzlich geeignet, da viele Parameter trotz der geringen Auflösung gut mit Vergleichswerten aus Histomorphometrie und μ CT korrelieren.^{49,51-53} Als Ergänzung der DXA in der Evaluation des Frakturrisikos erscheint die MDCT daher durchaus geeignet. Im klinischen routinemäßigen Einsatz wird die Anwendung der MDCT jedoch durch die hohe Strahlenbelastung limitiert, in der Forschung je nach Fragestellung durch die verhältnismäßig schlechte Bildqualität.

1.3.5 Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist ein strahlungsfreies, nicht-invasives radiologisches Verfahren. Unter Anlegung eines Magnetfeldes zeigen Atome unterschiedliche Relaxationszeiten. Abhängig von der Zusammensetzung der Gewebe lassen sich diese durch charakteristische Relaxationszeiten differenzieren. Kalzifiziertes Gewebe stellt sich aufgrund eines niedrigen Wasser- und Fettgehaltes hypointens dar. Für die Beurteilung der Mikroarchitektur wird daher insbesondere das fett- und wasserreiche und dadurch hyperintense Knochenmark zwischen den Trabekel dargestellt, wodurch im Umkehrschluss eine Aussage über die Trabekelarchitektur getroffen werden kann.^{27,54} Abhängig von der Magnetfeldstärke und dem Signal-Rausch-Verhältnis (signal to noise ratio = SNR) können im peripheren Skelett in vivo Auflösungen von etwa 100 μ m und Schichtdicken von 300-1000 μ m erreicht werden.^{27,39} Eine höhere SNR sowie eine geringe Voxelgröße hängen unmittelbar zusammen und können unter anderem durch eine nähere Positionierung an der Magnetspule (z.B. periphere versus proximale Messpunkte) oder eine höhere Magnetfeldstärke optimiert werden.^{27,55} Das Verfahren ist in vitro und in vivo einsetzbar. Zahlreiche Studien an peripheren Messpunkten zeigen eine zunehmend gute Korrelation der Messwerte mit computertomographischen Verfahren.^{27,56} Die zunehmende Verfügbarkeit von Geräten mit höherer Magnetfeldstärke (insbesondere 7 Tesla Geräte) führt zudem zu einer wachsenden Anzahl an Daten aus proximalen Messpunkten wie Hüfte und Wirbelkörper.^{3,27} Die Beurteilung der knöchernen Mikroarchitektur mittels MRT ist insbesondere aufgrund der fehlenden radioaktiven Strahlenbelastung und Nicht-Invasivität in der Klinik sehr vielversprechend.^{3,27,55} Aktuelle Limitationen sind verhältnismäßig lange Messzeiten,²⁷ ein hoher Zeit- und Kostenaufwand,^{27,55} eine geringere Verfügbarkeit der Geräte,⁵⁵ eine erhöhte Anfälligkeit für Bewegungsartefakte sowie eine bislang limitierte Anwendbarkeit und Studienlage bezüglich proximaler Messpunkten.^{3,27,55}

1.3.6 Thresholding

Neben der technischen Bildgenerierung stellt in allen radiologischen Aufnahmen auch die Bildprozessierung einen entscheidenden Schritt dar. Diese erfolgt anhand der generierten

Grauwerte am Computer und umfasst den Umgang mit Bildrauschen, die sinnvolle Auswahl der auszuwertenden Region sowie eine Binarisierung der Grauwerte, die möglichst exakt die Struktur der Probe wiedergibt. Letzteres ist eine entscheidende Voraussetzung für die Bestimmung der Strukturparameter Trabekeldicke, -anzahl und -abstand analog zu Parfitt et al⁴¹ und beruht auf der Wahl eines geeigneten Thresholds. Alle Grauwerte eines Schnittbildes werden durch die Zuteilung zu „Knochen“ oder „Nicht-Knochen“ binarisiert. Hierzu wird auf Grundlage der Histogramme der Schnittbilder ein Wert gewählt, der die beiden Peaks für „Knochen“ und „Nicht-Knochen“ differenziert. Abbildung 6 demonstriert beispielhaft die Verarbeitung eines Graubildes (A) durch Anwendung eines Thresholds in ein binarisiertes Bild (B). Hierfür stehen zahlreiche Algorithmen zur Verfügung.

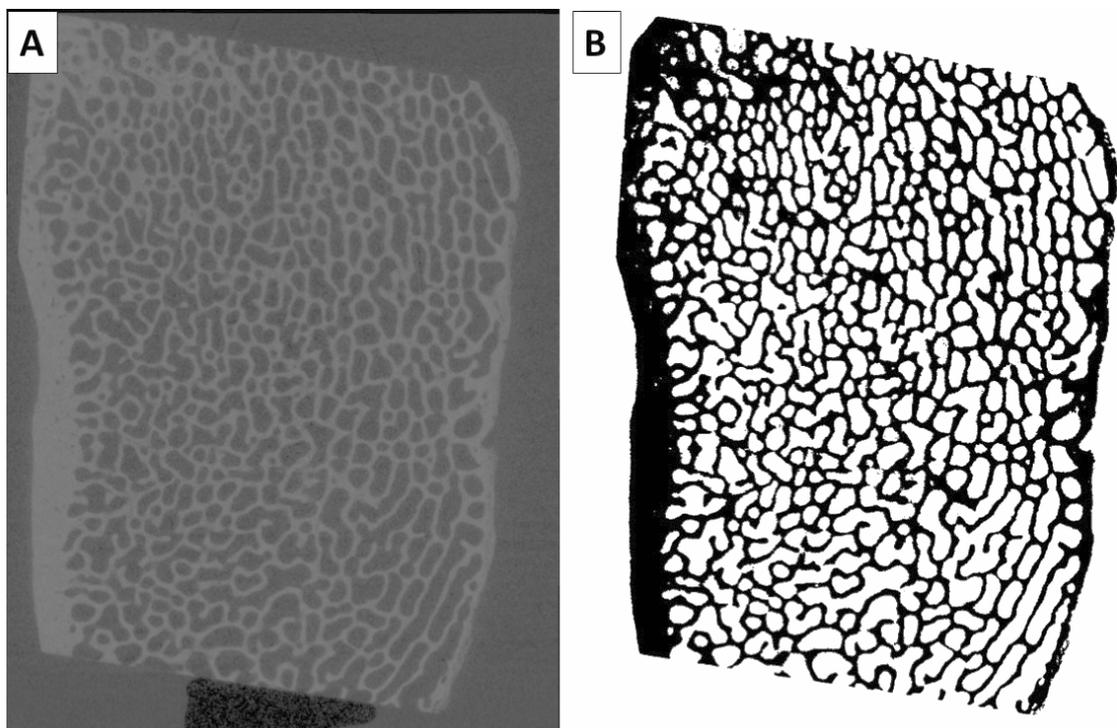


Abb. 6: Beispiel Binarisierung

Computertomographische Schnittbildaufnahme, Knochenprobe: ovine Femurkondyle; A) Graubild B) binarisiert

Die Wahl des Thresholds hat großen Einfluss darauf, welche Grauwerte in die Analyse einfließen. Abbildung 7 zeigt eindrücklich, wie unterschiedliche Thresholds zu einer Über- oder Unterschätzung des vorhandenen Knochens führen und dadurch Parameter wie Knochendichte, Trabekeldicke und -anzahl sowie Porengröße verfälschen können. Die Analyse der Texturparameter wie Anisotropie und Muster erfolgt ohne Binarisierung am Graustufenbild und ist daher unabhängig von einem Threshold.

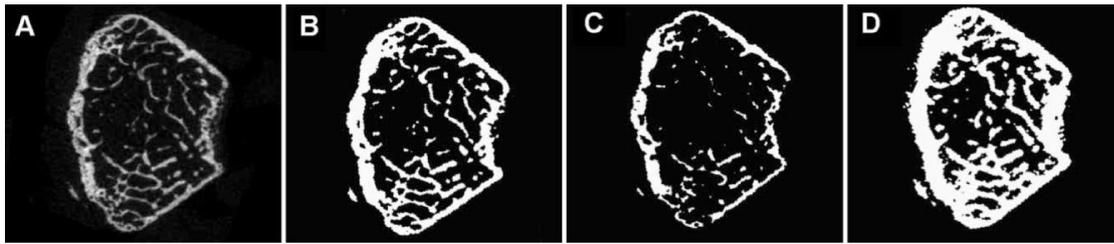


Abb. 7: Auswirkung der Wahl des Thresholds

Grafik A) zeigt das ursprüngliche Graubild (distaler Femur, Maus) und B) eine Binarisierung dieses Bildes, die den ursprünglichen Knochen recht zuverlässig wiedergibt. C) zeigt eine Binarisierung mit einem zu hohen Threshold, welcher zum Ausschluss von relevantem Knochenmaterial führt. D) wurde im Gegenzug mit einem zu niedrigen Threshold generiert, durch welchen die Trabekelstruktur ebenfalls verfälscht wird. (Quelle: Bouxsein et al. 2010⁴⁰)

1.4 Grundlagen der knöchernen Mikroarchitektur in der Forschung

Aus dem besseren Verständnis der Physiologie und Pathophysiologie der mikroskopischen Knochenstruktur erhofft man sich in zahlreichen klinischen Fragestellungen einen therapeutischen Nutzen. Die knöchernen Mikroarchitektur wird daher im Rahmen der Forschung verstärkt bei der Entwicklung therapeutischer Interventionen ausgewertet. Ein Beispiel stellen Knochenimplantate dar wie neue Osteosynthesematerialien, Endoprothesen oder die Knochenheilung unterstützenden Scaffolds.^{31,32} Dem klinischen Einsatz am Patienten gehen hierbei häufig tierexperimentelle Versuche voraus, bei denen die Methoden gezielt getestet und ihre Auswirkungen auf den Knochen *in vivo* präzise analysiert werden können.^{32,57–63}

Eine besondere Herausforderung stellt die Versorgung osteochondraler Defekte, klinisch häufig im Rahmen einer Arthrose, dar. Mit der Erforschung therapeutischer Verfahren derartiger Defekte setzte sich auch die dieser Arbeit zugrundeliegende Studie auseinander. Ein osteochondraler Defekt zeichnet sich durch eine kombinierte Beeinträchtigung von Knorpel und Knochen aus. Seine Versorgung gestaltet sich anspruchsvoll, da der therapeutische Ansatz zwei verschiedene Gewebe ansprechen muss, von denen insbesondere der Knorpel nur bedingt regenerationsfähig ist.^{57,59,60} Einen seit mehreren Jahren intensiv beforschten Ansatz zur therapeutischen Beeinflussung von Knochendefekten stellen Scaffolds dar deren Implantation in den Defekt die lokale Gewebeheilung fördern soll. Scaffolds funktionieren wie ein Gerüst, das den Defekt stabilisiert und das Einwachsen von Knochen und Knorpel fördert. Das Outcome wird von mehreren Eigenschaften der Scaffolds wie Material, Porosität, Biomechanik, Degradierbarkeit oder Freisetzung von Wachstumsfaktoren beeinflusst, deren Optimierung zurzeit Gegenstand der Forschung ist.^{57–62}

Grundsätzlich muss nach therapeutischer Intervention eines Knochendefektes durch ein implantiertes Material das regenerierte Gewebe unter quantitativen wie qualitativen Gesichtspunkten analysiert werden, um die Wirksamkeit objektivieren und langfristig

eine Übertragung in die Klinik ermöglichen zu können. Verschiedene Analysemethoden wie eine makroskopische Evaluation, Histomorphometrie, μ CT und andere bildgebende Verfahren sowie biomechanische Tests zielen darauf, die Auswirkungen der angewendeten Methode im Gesamtbild darzustellen. Die Beurteilung der knöchernen Mikroarchitektur ist hierfür ein entscheidender Teilaspekt, welcher entsprechend bei der Auswertung neuer Therapieformen einbezogen werden kann.

Das Ziel derartiger Implantate ist in der Regel ein Einwachsen von neuem Knochenmaterial in den Defekt. Analyseziel ist dementsprechend häufig eine quantitative und qualitative Beurteilung dieses neuen Knochengewebes innerhalb des Defektes. Hierzu kann der ursprüngliche Defekt beispielsweise in computertomographischen Aufnahmen markiert und eine definierte ROI ausgewertet werden. Wiederholt über mehrere Zeitpunkte kann so eine Aussage über eine Zu- oder Abnahme einzelner Trabekelparameter in diesem definierten Bereich getroffen werden. Eine ROI über mehrere Schnittbilder hinweg beschreibt ein Volumen, in welchem der durchschnittliche Wert des Parameters angegeben wird, zum Beispiel die gesamte Knochenmenge innerhalb des Defekts. In der Entwicklung neuer Implantate ist neben der Auswertung innerhalb des Defektes oder Implantats auch eine mögliche Auswirkung des eingebrachten Fremdmaterials auf die umgebende Mikroarchitektur von Bedeutung. In diesem Fall muss eine Auswertung über die Defektgrenzen hinausgehen. Dies trifft auch auf die hier zugrundeliegende Studie zu.

1.5 Zugrundeliegendes Studienmodell

In der Studie, die dieser Arbeit zugrunde liegt, wurden osteochondrale Defekte im Schafmodell durch die Implantation von Scaffolds versorgt (siehe Abb. 8). In der *in vivo* Testung von implantierten Biomaterialien oder Osteosynthesematerialien in der Orthopädie wird häufig auf das Schafmodell zurückgegriffen, da das Skelettsystem des Schafes dem des Menschen in Morphologie, Belastung, Knochenstruktur, Zellstoffwechsel und Defektheilungszeit ähnlich ist.^{64,65} Für die potenzielle Übertragbarkeit der Forschungsergebnisse ist dies von Vorteil. Als Lokalisation für Defekte und Implantate werden bevorzugt Humerus und Femur gewählt.^{57,60,64}

In der hier zugrundeliegenden Studie wurde in den gewichtstragenden Bereich einer Femurkondyle ein Defekt mit 5,4mm Durchmesser gebohrt. Knochen – und Knorpelwachstum induzierende Faktoren sowie inhibierende Antikörper wurden in unterschiedliche Schichten der Scaffolds eingearbeitet, um je Schicht entweder spezifisch Knochen- oder Knorpelwachstum zu fördern. Die Scaffolds trugen entweder (i) keine Wachstumsfaktoren oder (ii) Wachstumsfaktoren in unterschiedlichen Schichten: eine chondrogene Schicht mit rhTGF β zur Induktion des Knorpelwachstums, eine osteogene Schicht mit rhBMP-2 sowie eine trennende Schicht mit anti-TGF β sowie anti-rhBMP-2. Wider Erwarten zeigte sich nach 4 und 12 Wochen Standzeit kein vermehrtes Knochen- und Knorpelwachstum sondern eine Ausdehnung des ursprünglich zugefügten Defektes. Die behandelten Femurkondylen wurden explantiert, um sie histomorphometrisch und



Abb. 8: Beispiel Scaffold im Schafmodell

Ovine explantierte Femurkondyle mit zentralem Bohrlochdefekt, der hier zur Demonstration mit einem Scaffold gefüllt wurde.

mikroskopisch zu untersuchen. Zur Darstellung der Mikroarchitektur wurde die μ CT verwendet, da sie als Goldstandard der Bildgebung in diesem Bereich gilt und für eine qualitativ hochwertige Auswertung der Trabekelparameter eine hohe Auflösung Voraussetzung war. Um auswerten zu können welchen Einfluss verschiedene Bereiche des Defektes auf das umgebende Knochengewebe hatten und so die Veränderungen in der Mikroarchitektur kausal einordnen zu können sollten die Trabekelparameter rund um den osteochondralen Defekt mit ihrem räumlichen Bezug zum Defekt beurteilt werden.

1.5.1 Ziele dieser Arbeit

Die Funktionalität des Knochens im Skelettsystem hängt neben seiner Masse auch von seiner Qualität ab. Die knöcherne Mikroarchitektur ist ein entscheidender Parameter für Knochenstabilität und in den letzten Jahren verstärkt Gegenstand der Forschung, nicht zuletzt aufgrund ihrer Funktion in der Pathogenese relevanter Volkskrankheiten wie Osteoporose. Neben dem Verständnis der Physiologie der Mikroarchitektur spielt auch ihre therapeutische Beeinflussung eine zunehmend größere Rolle. Zahlreiche Ansätze zielen auf eine verbesserte Knochenqualität und damit Stabilität ab, darunter biologisch abbaubare Scaffolds zur Behandlung osteochondraler Defekte.

Die trabekulären Parameter können in verschiedenen relevanten Lokalisationen, meistens definiert durch ROIs ausgewertet werden. Der räumliche Bezug der Parameter zum Defekt oder Implantat ist von großer Bedeutung, um die Auswirkungen und möglichen kausalen Zusammenhänge besser evaluieren zu können. In der zugrunde liegenden Studie ergab sich das Ziel, die außerhalb des ursprünglichen Defekts veränderte Mikroarchitektur in direktem räumlichen Bezug zum Defekt zu analysieren. Dies sollte zunächst mithilfe etablierter Methoden der μ CT-Analyse durch die Platzierung von ROIs erfolgen, auch um die Anwendbarkeit dieses Ansatzes unter den vorliegenden Anforderungen zu evaluieren. In einem zweiten Schritt wurde die Darstellung der Knochenparameter in

ihrem räumlichen Bezug zum Defekt ohne Verwendung von ROIs angestrebt.

Zusammenfassung der Ziele dieser Arbeit:

1. Analyse der räumlichen Verteilung der Trabekelparameter im behandelten osteochondralen Defekt durch etablierte μ CT-Auswertung mittels ROIs
2. Eigenständige Entwicklung einer neuen Methode zur visuellen zweidimensionalen Darstellung der Trabekelparameter mit ihrem dreidimensionalen räumlichen Bezug zum Defekt

2. KONZEPT UND ENTWICKLUNG DER DARSTELLUNGSMETHODE

Die Knochenparameter der vorhandenen Proben sollten in ihrem räumlichen Bezug zum Defekt ausgewertet werden, um die Auswirkungen der implantierten Scaffolds auf den Defekt und das umliegende Knochengewebe einordnen zu können. Ziel dieser Arbeit war es, ein hierfür geeignetes Verfahren zu finden. Hierzu wurden die Proben zunächst nach dem gängigen Standard computertomographisch analysiert, wofür drei unterschiedliche platzierte ROIs gewählt wurden. Im Rahmen dieser Analyse ergaben sich weitere Fragen und Anforderungen an die Auswertung der Proben, die eine Auswertung über das etablierte ROI-basierte Verfahren nicht befriedigend beantworten konnte. Dieser Abschnitt gibt einen Überblick über die Schritte von der Anwendung des etablierten Verfahrens hin zur Entwicklung der neuen Methodik.

2.1 *Erste makroskopische Einschätzung der Proben*

Aus dem Aufbau des Versuches (Implantation eines wachstumsinduzierenden Scaffolds in einen osteochondralen Defekt) ließ sich eine Neubildung von Knochen im herbeigeführten Defekt erwarten. Die makroskopische und bildgebende Analyse zeigte jedoch scheinbar unabhängig von den Versuchsgruppen in vielen Proben sowohl Knochenneubildung als auch ausgedehnte osteolytische Bereiche. Der sichtbare Knochenabbau erstreckte sich bei den Tieren mit längerer Standzeit dabei ausgeprägter in den umgebenden Knochen als bei den Tieren mit kürzerer Standzeit. Ein Verteilungsmuster der Osteolysen zu erkennen war makroskopisch nicht möglich.

2.2 *Regions of Interest*

Um das Ausmaß an Umbauprozessen zu quantifizieren und zu lokalisieren wurden einheitliche, auf alle Proben anwendbare und somit vergleichbare ROIs gewählt. Diese umfassten neben dem ursprünglichen Knochendefekt auch umliegende Areale um die Ausbreitung der Prozesse im Knochen und ihre Relation zum Defekt zu bewerten. Aufgrund der Größe und Beschaffenheit der Proben waren die Maße und Platzierungen von einheitlichen ROIs allerdings begrenzt. Die Ergebnisse aus der Auswertung dieser ROIs gaben nur einen limitierten Einblick in das tatsächliche Ausmaß der Prozesse in und um den Defekt herum, da sie nur einen kleinen Teil des Knochens einbeziehen und die Ergebnisse einen Mittelwert je ROI darstellen. Außerdem gestaltete es sich mit diesen ROIs schwierig eine Aussage über die räumliche Verteilung und die Ausdehnung von Osteolysen und Umbauprozessen zu treffen. Eine differenzierte Analyse dieser Problematik erfolgt im ersten Ergebnisteil (4.3) und leitet die Entwicklung einer eigenen Methodik ein (4.4).

2.3 Visuelle Differenzierung von Knochentypen

In den μ CT-Bildern fielen visuell neben ausgeprägten Osteolysen auch Areale mit unterschiedlich formiertem Knochengewebe auf. In Proben mit geringen Umbauprozessen war eine homogene Verteilung eines scheinbar einheitlichen Knochentyps zu finden, während sich in Proben mit ausgedehnten Umbauprozessen Knochenherde visuell deutlich voneinander abgrenzen ließen. Diese Areale spiegelten sich in der Analyse durch ROIs nicht wider. Die Quantifizierung und Lokalisierung dieser Beobachtungen in der gesamten Probe versprach jedoch einen hohen Erkenntnisgewinn über die Dynamik der stattfindenden Umbauprozesse. Der zweite Schritt der Probenanalyse beschäftigte sich daher zunächst mit der Charakterisierung der visuell auffälligen Knochentypen. Die Ergebnisse fließen anschließend in die Optimierung der entwickelten Methodik ein. Die Definition der beiden visuell unterschiedlichen Knochentypen erfolgte über einen zusätzlichen Threshold (Separation Threshold), welcher die Knochentypen anhand ihrer Dichtewerte voneinander abgrenzt. Die Anwendung dieses Separation Thresholds zeigte in vielen Schnittbildern eine nicht-homogene Verteilung der beiden Knochentypen mit Herden von weniger mineralisiertem Knochen.

2.4 Algorithmus zur Visualisierung von Knochenparametern in Relation zum osteochondralen Defekt

Die axiale Verteilung von wenig mineralisiertem sowie hartem Knochen in Relation zum Defekt ist durch die Anwendung des Separation Threshold bereits in den einzelnen Schnittbildern zu erkennen. Das Ergebnis des letzten Abschnitts besteht darin, diese Verteilung in einem einzigen frontalen zweidimensionalen Bild zusammenzufassen und dadurch auswertbar zu machen. Eine derartige Darstellung soll übersichtlich die Knochenparameter in ihrem räumlichen Bezug zu einem Ausgangspunkt (beispielsweise einen Defekt) darstellen und so kausale Überlegungen zulassen. Es wurde ein Algorithmus entwickelt, der den Bezug eines Knochenparameters zum Defekt über die gesamte Probe übersichtlich visualisiert. Die erhaltene grafische Darstellung umfasst die Dimensionen (1) Distanz zur Mitte des Defektes, (2) Verteilung in der Höhe des Defektes, (3) Wert des betrachteten Parameters.

2.4.1 Anwendung anhand der Dichteparameter

Bei der Auswertung der Knochendichte wurden die Grauwerte durch den Separation Threshold in zwei Kategorien eingeteilt. Hierdurch erfolgte die Abgrenzung von zwei Knochentypen durch eine Binarisierung der Graubilder. Daraus ergaben sich nach Anwendung des Algorithmus zwei frontale grafische Darstellungen, welche durch farbliche Kodierung zu einer 4-dimensionalen Grafik kombiniert wurden: (1) Distanz zur Mitte des Defektes, (2) Verteilung in der Höhe des Defektes, (3) Knochentyp (Farbton), (4) Durchschnittliche Knochenmenge (Helligkeit).

2.4.2 Übertragung der Methode auf weitere Knochenparameter

In den verwendeten Proben wurden zwei Knochentypen anhand ihrer Dichtewerte differenziert und durch die neue Darstellungsmethode in ihrer räumlichen Verteilung verglichen. Grundsätzlich kann die Darstellung einzelner Knochenparameter jedoch auch ohne eine derartige Zuweisung erfolgen. Um dies zu demonstrieren wurde in dieser Arbeit neben den Dichtewerten auch die Porosität der zu Beginn visuell auffälligen Knochenherde mit dem entwickelten Algorithmus dargestellt. Die Auswertung des Porenanteils erfolgte ohne vorherige inhaltliche Zuordnung der Werte, die konkreten Werte können feinstufig beispielsweise über Heatmaps eingefärbt werden. Durch diese beiden beispielhaften Vorgehensweisen werden zwei mögliche Anwendungsoptionen des Algorithmus präsentiert.

Der Ergebnisteil unter Abschnitt 4 wird sich diesem Konzept folgend zusammensetzen aus (1) der Anwendung etablierter Methoden zur Analyse von Knochenparametern im osteochondralen Defekt (Auswertung von ROIs) und ihrer räumlichen Verteilung sowie (2) der Entwicklung einer Methodik zur Darstellung einzelner Parameter mit ihrem räumlichen Bezug zum Defekt.

3. MATERIAL UND METHODEN

Die Beschreibung der Methodik teilt sich in drei Abschnitte: (1) Die Gewinnung des Datensatzes aus der zugrundeliegenden Studie, an welchem die Analyse der ossären Mikroarchitektur vorgenommen werden kann, (2) die Analyse mit etablierter Methodik sowie (3) die Entwicklung der Darstellung und Analyse der ossären Mikroarchitektur in ihrem räumlichen Bezug zum Defekt unabhängig von einer Zuteilung zu ROIs.

3.1 Gewinnung des Datensatzes

Die verwendeten Knochenproben wurden einem Experiment im Schafmodell entnommen, das den Effekt von biologisch degradierbaren Scaffolds mit Wachstumsfaktoren in osteochondralen Defekten untersuchte.

3.1.1 Herstellung der implantierten Scaffolds

Es wurden Scaffolds aus Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLG) mit einem Molekulargewicht von 120 kDa und einem Stoffmengenanteil von 85% Laktid und 15% Glykolid (8515DLG7E, Lakeshore Biomaterials, Birmingham, USA) hergestellt. PLG Mikrokügelchen wurden durch doppelte Emulsion unter Einbringung von Wachstumsfaktoren und neutralisierenden Antikörper hergestellt und mit Natrium-Chlorid-Partikeln (\varnothing 250-425 μm , Mengenverhältnis von 5% PLG zu 95% NaCl) vermischt. Zur Herstellung der mehrschichtigen Scaffolds, welche verschiedene Wachstumsfaktoren und Antikörper tragen können, wurde das PLG-NaCl-Gemisch in eine stählerne, rostfreie Form (Durchmesser 6 mm) gefüllt und vorsichtig mit einem Hammer Schicht für Schicht komprimiert. Unter einem Druck von 5000 N über 5 min (Statische Prüfmaschine Z010, Zwick, Ulm) wurden die Schichten und Bestandteile zu mehrschichtigen Zylindern komprimiert. Diese wurden mit 55,2 bar CO_2 für 24 h equilibriert. Durch Absenken des Drucks auf Umgebungsbedingungen fusionierten die Mikrokügelchen unter Freisetzung des CO_2 . Durch Immersion in destilliertem Wasser wurden die NaCl-Salze ausgewaschen. Im Resultat entstanden so die PLG Scaffolds mit einer Porosität von 95%. Die Scaffolds wurden für 30 min in 70% Ethanol sterilisiert und anschließend zur Auswaschung etwaiger Ethanolrückstände aus den Poren mit Dulbeco's Phosphat-gepufferter Salzlösung (Sigma-Aldrich D8537) gespült. Die mehrschichtigen Scaffolds bestehen aus drei Schichten: die chondrogene Schicht misst 1,2 mm, die zentrale Pufferzone 3,1 mm und die osteogene Schicht 3,5 mm.

Es wurden zwei Arten von Scaffolds hergestellt: (i) 3-schichtige leere Scaffolds ohne eingearbeitete Proteine sowie (ii) 3-schichtige Scaffolds mit einer zentralen Pufferzone mit 21,2 μg anti-BMP-2 (MAB3552, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt) und 34,5 μg anti-TGF β (MAB1835, R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt), einer chondrogenen Schicht mit 2,3 μg rhTGF β_3 und einer osteogenen Schicht mit 8,5 μg rhBMP-2

und 39,2 µg anti-TGFβ.

3.1.2 Einteilung in Versuchsgruppen

In den Versuch wurden 14 Schafe eingebunden. Um eine Differenzierung der Effekte der verwendeten Scaffolds zu ermöglichen wurden anhand der implantierten Scaffolds zwei verschiedene Gruppen gebildet. Dabei wurde den Tieren der Gruppe E ausschließlich der Poly(D,L-lactide-co-glycolide) (PLG) Scaffold implantiert („empty scaffold“) und in Gruppe G die Scaffolds mit Wachstums- und Inhibitionsfaktoren („growth factor scaffold“). Durch eine weitere Unterteilung in Standzeiten von 4 oder 12 Wochen ergaben sich vier Gruppen. Aufgrund unerwarteter negativer Ergebnisse wurde die Implantation jedoch vorzeitig beendet, sodass in einer Gruppe nur zwei Schafe einbezogen werden können.

Tab. 1: Versuchsgruppen

	4 Wochen	12 Wochen	Gesamt je Scaffold
Empty Scaffold	2	4	6
Growth Factor Scaffold	4	4	8
Gesamt je Standzeit	6	8	

3.1.3 Vorgehen bei der Implantation

3.1.3.1 Versuchstiere

Bei den eingebundenen Tieren handelte es sich um weibliche, zwischen 56 kg und 96 kg schwere Merinomix-Schafe, die von einem konventionellen Züchter bezogen wurden. Die Schafe waren zwischen 2,5 und 5 Jahre alt, wodurch eine vollständige Entwicklung des Knochenskeletts gewährleistet sowie das Risiko altersabhängiger Knochen- und Strukturschäden vermindert wurde und veterinärmedizinisch untersucht. Der gesundheitliche Zustand wurde während der Standzeit durch regelmäßige Gewichts-, Futteraufnahme- und Gesundheitskontrollen durch Fachpersonal sichergestellt. Die Schafe wurden im Stall auf Stroh oder auf der Weide in Gruppen von vier bis acht Tieren gehalten. Jedes Tier wurde bei Aufnahme mit einer Ohrmarke zur Identifikation versehen. Die Genehmigung für den Versuch erfolgte durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (G 0216/13).

3.1.3.2 OP-Vorbereitung der Versuchstiere

Das zu operierende Tier erhielt im Anschluss an eine mindestens 12stündiger Nahrungskarenz zur Einleitung der Narkose Thiopental-Natrium (15-20 µg/kg Körpergewicht; Rotexmedica GmbH, Trittau) über einen peripheren Venenverweilkatheter.

Die Intubation erfolgte in Bauchlage mit einem 8-9 mm Tubus (MallinckrodtTM, Covidien, USA), die anschließende Inhalationsnarkose mit 12-14 Atemzügen pro Minute über das Beatmungsgerät (Ventilator 711, Siemens, München) mit Isofluran 1,5%-2% (Forene[®], Abbott GmbH, Wiesbaden, Deutschland) und einem Gemisch aus Sauerstoff und Lachgas (Verhältnis 3:1). Die Vitalparameter sowie CO₂-Gehalt in der Ausatemluft, Sauerstoffsättigung und Körpertemperatur wurden konstant überprüft. Zum Schutz der Augen wurde Augensalbe verwendet (Bepanthen[®], Bayer, Leverkusen). Eine Magenschlundsonde wurde in den Pansen geschoben um aufgasenden Mageninhalt abzuleiten. Die Hufe wurden zur Vermeidung einer Kontamination verbunden. Am Rücken des Tieres wurde zur Verwendung der Neutralelektrode des Kauters eine etwa 6 cm lange und breite Fläche geschoren und befeuchtet. Das Tier wurde in Rückenlage gelagert und stabilisiert. Der linke Hinterlauf wurde großflächig im Kniebereich geschoren, mit handelsüblicher und antimikrobieller Seife gewaschen und gründlich rasiert. Die anschließende Desinfektion erfolgte mit jodhaltigem Braunol (Braunoderm[®], B. Braun Melsungen AG, Melsungen). Die Kauterplatte wurde platziert, das Tier mit sterilen selbstklebenden Tüchern abgedeckt und eine antibakterielle Folie (Ioban, 3M Health Care, Neuss) auf das Operationsgebiet aufgebracht.

3.1.3.3 Operatives Vorgehen

Die Analgesie erfolgte als Bolus vor der Hautinzision durch 3-5 µg/kg Fentanyl iv (Roxtecmedica GmbH, Trittau), zunächst mit 3 µg/kg, anschließend adaptiert nachdosiert bis 5 µg/kg, und im Verlauf der Operation alle 30 bis 45 Minuten. Als Dauertropf wurden 1000 ml Sterofundin (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) und 500 ml Volulyte[®] (6%, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg) angelegt. Außerdem erhielt jedes Tier intravenös eine einmalige Antibiose mit 3 mg Unacid (1 g Sulbactam, 2 g Amipicillin) (Pfizer Pharmer GmbH, Berlin) in 50 ml NaCl gelöst. Die Gelenköffnung wurde durch einen sechs Zentimeter langen medial parapatellaren Hautschnitt von der Mitte der Patella bis auf die Höhe der Tuberositas Tibiae begonnen. Die darunter liegende dünne subkutane Fettschicht und deutlich ausgebildete Bursa infrapatellaris subcutanea wurden scharf durchtrennt und der Musculus vastus medialis abgesetzt. Die Gelenkkapsel wurde medial der Patellarsehne von proximal nach distal gespalten und die Patella nach lateral luxiert.

Mithilfe einer diamantbeschichteten Hohlfräse mit einem Außendurchmesser von 5,4 mm und einem Innendurchmesser von 4,6 mm, (Diamantfräse T20TL03, Karl Storz-Endoskopie, Tuttlingen) wurde senkrecht auf den lasttragenden Bereich des lateralen Femurkondylus ein osteochondraler Defekt mit einer Tiefe von 7 mm gesetzt. Während des Fräsens wurde die aktuelle Tiefe des Defektes über eine millimetergenaue Markierung an der Fräse überprüft und kontinuierlich durch Spülung mit isotonischer Kochsalzlösung eine Kühlung herbeigeführt, um Hitzeschäden im Gewebe zu vermeiden. Mit einem Extraktor (Extraktor T21TL03, Karl Storz-Endoskopie, Tuttlingen) wurde der ausgefräste

Zylinder aus dem Bohrloch entfernt. Zur Entfernung von potenziell gelenkschädigenden und Inflammation begünstigenden Knochensplintern durch das Bohren wurde das Gelenk mit isotoner Kochsalzlösung gespült. Die gewonnenen Knochenzylinder wurden zur späteren Verwendung in 4% para-Formaldehydlösung (Electron Microscopy Sciences, Hatfield USA) fixiert. Der Scaffold wurde im Press Fit Verfahren in den Defekt eingesetzt. Dies sollte einen möglichen Eintritt von Synovia zwischen Scaffold und Gewebe sowie ein Lösen des Scaffolds aus dem Defekt verhindern. Um den Defektdurchmesser zu bestimmen, der für den verwendeten Scaffold und das Press Fit Verfahren am besten geeignet war, wurden vor Studienbeginn Tests an Kadavern durchgeführt und das Einsetzen der Scaffolds geübt. Nach Füllung des osteochondralen Defektes und Reposition der Patella wurde die Wunde schichtweise verschlossen. Kapsel, Musculus vastus medialis und Fascia cruris wurden mit Ethibond 0 (Ethicon, Johnson & Johnson GmbH, Norderstedt, Deutschland) genäht, die Bursa infrapatellaris subcutanea und die Subcutis mit Vicryl® 2-0 (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt). Für die abschließende Hautnaht in Einzelstichnahttechnik wurde Prolene 2-0 verwendet (Ethicon, Johnsons & Johnson GmbH, Norderstedt, Deutschland). Die Wunde wurde zur Reduzierung des Infektrisikos erneut mit Braunol desinfiziert und mit Aluminium-Spray (Alu Spray „trocken“, Pharma Partner Vertriebs-GmbH, Hamburg, Deutschland) bedeckt. Vor der Narkoseausleitung erhielt jedes Tier ein transdermales analgetisches Hautpflaster (Durogesic® SMAT 75 µg/h, Janssen-Cilag GmbH, Neuss), welches für 72 Stunden postoperativ 75 µg/kg Fentanyl pro Stunde freisetzte.

3.1.3.4 Postoperative Versorgung

Die Tiere wurden nach der Narkoseausleitung und schonenden Extubation im Stall bei der Herde auf Heu gelagert. Das erfolgreiche Aufstehen der Tiere wurde kontrolliert. Während der ersten drei Tage postoperativ erhielt jedes Tier gewichtsadaptiert subkutan Flunixin (Flunidol® RPS, cp-pharma, Burgdorf, Deutschland) zur Schmerzlinderung. Es wurde täglich auf Anzeichen von Schmerzen wie Isolation, verminderte Futteraufnahme und Zähneknirschen geachtet. 10 bis 14 Tage nach der Operation erfolgte die Entfernung der Hautfäden.

3.1.4 Probengewinnung

3.1.4.1 Tötung und Sektion der Versuchstiere

Abhängig von der Standzeit des Tieres erfolgte die Tötung 4 oder 12 Wochen nach der Implantation des Scaffolds. Das entsprechende Tier wurde, analog zur Implantation, von der Herde getrennt und erneut mit einem periphervenösen Zugang versehen. Anschließend erfolgte die Tötung unter einer tiefen Thiopental-Sedierung (20 mg/kg) schmerzfrei mit 100 ml Kaliumchlorid (1 mmol/l) intravenös (7,45% Kaliumchlorid, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Der Tod durch Herzstillstand wurde durch den anwesenden Tierarzt auskultatorisch festgestellt. Das Kniegelenk wurde eröffnet und die

Gelenkflächen zur makroskopischen Dokumentation fotografiert. Die Femora wurden im Knie- und Hüftgelenk abgesetzt. Getränkte Tücher schützten die freiliegenden Femurkondylen für die folgenden Prozessschritte vor dem Austrocknen.

3.1.4.2 Gewinnung und Fixierung der Proben

Der generierte Knochendefekt mit Scaffoldimplantat sowie das vergleichbar lokalisierte gesunde Areal auf der Gegenseite wurden mit einem Aufmaß von 1cm viereckig aus der Femurkondyle herausgesägt. Hierzu wurde unter konstanter Wasserkühlung ein Trennschleifsystem (Trennschleifsystem Makro, Exakt Apparatebau GmbH, Norderstedt) verwendet. Es folgte eine detailliertere makroskopische Beschreibung des Defektes sowie des umliegenden Gewebes. Anschließend wurden die Proben unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur für 48 Stunden in 4%-iger para-Formaldehydlösung fixiert und währenddessen auf einer Schüttelplatte gelagert. Nach Ablauf der 48 Stunden wurde das para-Formaldehyd ausgewaschen und die Proben bei 4 °C in DPBS (Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA) verwahrt.

3.2 Vorbereitung der Proben und Bildgewinnung mittels μ CT

Zur Erhebung der Referenzparameter wurden sowohl die Proben mit den osteochondralen Defekten als auch die extrahierten Knochenzylinder computertomographisch aufgenommen. Die zugrundeliegende Technik wurde bereits ausführlich beschrieben.⁶⁶ Für die Gewährleistung einer guten Bildqualität und sicheren Fixierung im CT wurden die zu testenden Knochenpräparate zunächst in DPBS-getränkte Tücher gewickelt und in einem 50 ml fassenden Röhrchen platziert, welches luftfrei mit DPBS aufgefüllt wurde. Der Flacon wurde in einem μ CT Viva40 (Scanco Medical AG, Brüttisellen, Schweiz) eingesetzt und fixiert. Die Vorbereitungen orientierten sich an den Empfehlungen von Bouxsein et al bezüglich qualitativ hochwertiger und vergleichbarer Analysen mittels μ CT.⁴⁰ Durch eine Übersichtsaufnahme („ScoutView“) konnte die vollständige Probe ausgewählt werden, welche daraufhin mit einer Röhrenspannung von 70 kVp und einer Röntgenstromstärke von 114 μ A bei 180° Rotation gescannt wurden. Daraus ergaben sich isotrope Voxel von 17,5 μ m. Nach Aufnahme der Scans wurden die Proben erneut bei 4 °C in DPBS gelagert.

3.3 Etablierte μ CT-Analyse

3.3.1 Definition der ROI

Die Scandaten wurden automatisiert als Graubilder in Stapeln im tiff Format zusammengestellt. Um die notwendige Rechenleistung für die Verarbeitung der Daten zu reduzieren wurden in den Aufnahmen (trotz gezielter Auswahl durch die Nutzung des Scout View etwa 15-20GB pro Messung) Schichtbilder entfernt, die keinen Probenanteil

enthielten. Anschließend wurden die Proben visuell optimiert ausgerichtet um eine präzise Platzierung der ROIs zu ermöglichen. Hierzu wurde das integrierte Scanco Medical Evaluationsprogramm genutzt. Zur Auswertung der Knochenparameter wurden in jeder Probe individuell drei verschiedene zylindrische Areale bestimmt. Ziel der Positionierung der ROIs war es, eine Aussage über die räumliche Verteilung der Parameter in ihrem Bezug zum Defekt treffen zu können. ROI_{INNER} beschreibt in Durchmesser und Länge den ursprünglich durch Bohrung herbeigeführten osteochondralen Defekt und hat daher einen Durchmesser von 5,4 mm. ROI_{AROUND} und ROI_{UNDER} beschreiben jeweils einen Durchmesser von 150% des Bohrlochdurchmessers und liegen zentral um das Bohrloch. Das Areal innerhalb des Bohrloches, ROI_{INNER}, wurde in der Berechnung subtrahiert, sodass ROI_{AROUND} und ROI_{UNDER} einen Mantel an Material um das Bohrloch herum beschreiben. ROI_{AROUND} bezieht sich auf das Areal von 25% bis 75% der Bohrlochtiefe, ROI_{UNDER} von 75% bis 125%, also 25% über das Ende des verursachten Defektes hinaus. Die Länge der ROI bezog sich dabei auf die Tiefe des Defektes. Diese wurde individuell je Probe über die Länge des extrahierten Knochenzylinders ermittelt. Der Beginn des Bohrloches wurde definiert durch das erste Schnittbild in dem der Defekt vollständig von Knochen umgeben war.

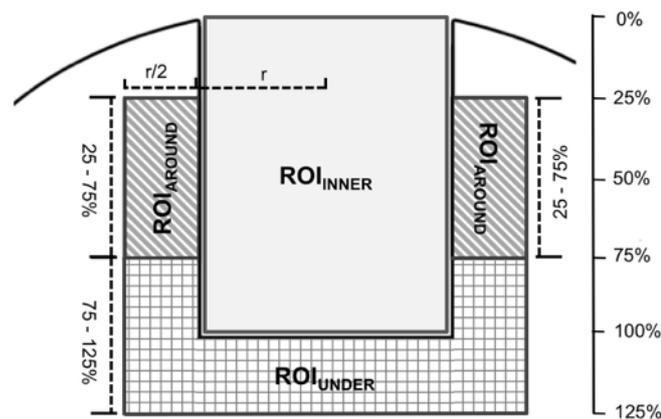


Abb. 9: Schema der Regions of Interests

Schematische Darstellung der subchondralen Knochenplatte einer Femurkondyle mit einem zentral platzierten Bohrlochdefekt. Knochenoberfläche bei 0%.

3.3.2 Binarisierung

3.3.2.1 Binarisierung der Knochenzylinder

Die durch das μ CT aufgenommenen Messwerte werden in Form von Graubildern dargestellt, in denen jedem Pixel ein bestimmter Helligkeitswert zugeteilt ist. Für die Auswertung der Knochenanteile dieser Bilder ist es notwendig einen Wert zu bestimmen, der zwischen den Grauwerten des Knochens und den übrigen Grauwerten - beispielsweise von Hintergrund und Knochenmark, die nicht in die Auswertung mit einfließen sollen - differenziert. Der gewählte Schwellenwert (Threshold) stellt die Strukturen des

Graubilds in schwarzen und weißen Pixel dar. Vereinfacht werden die Pixel mit einem Grauwert oberhalb des Thresholds (Knochen) schwarz, die mit einem niedrigeren Grauwert weiß dargestellt. So lässt sich definieren, welche Bildanteile in die Auswertung der Strukturparameter einbezogen werden (siehe Abb. 6 und 7).

Um einen möglichst geeigneten Threshold zu verwenden wurden vor der Analyse der eigentlichen Proben an den entnommenen Knochenzylindern zwei unterschiedliche Thresholdingverfahren verglichen. Hierfür wurden die entnommenen Knochenzylinder verwendet, da diese nicht dem Einfluss der Intervention unterlagen und daher eine Auswahl des Thresholdverfahrens anhand von physiologischem Knochenmaterial ermöglichen. Alle Zylinder wurden mit einem standardisierten algorithmisch bestimmten Threshold und einem visuellen Threshold ausgewertet und die Ergebnisse verglichen. Der visuelle Threshold wurde durchgehend von der gleichen Person individuell für jeden Plug bestimmt. Die Anwendung des histogrammbasierten Thresholdingalgorithmus erfolgte über Matlab. Er bestimmt anhand der Peaks der Histogramme automatisch einen Threshold für jeden Knochenzylinder. Die berechneten Thresholds aller Zylinder wurden gemittelt und ergaben so einen für alle Proben verwendeten einheitlichen algorithmischen Threshold. In 4.2 sind die mit diesen Thresholds erzielten Ergebnisse dargestellt, deren Vergleich zur Verwendung des algorithmischen Thresholds für die Auswertung der Proben führte.

3.3.2.2 Binarisierung der Proben

Analog zur Binarisierung der Knochenzylinder wurde durch die Anwendung des Thresholdingalgorithmus für jede Probe ein individueller Threshold bestimmt. Hierfür wurde der als ROI_{UNDER} beschriebene Bereich (siehe Abb. 9) zugrunde gelegt. Aus den individuellen Thresholds wurde ein Wert gemittelt und für die einheitliche Binarisierung aller Proben verwendet. Die Präzision dieses Thresholds wurde in allen Proben visuell überprüft.

3.3.3 Berechnung der Knochenparameter

Mit dem Scanco Medical Evaluationsprogramm und dem aus 4.2 gewählten Threshold wurde für jede der drei ROIs die Auswertung der Knochenparameter durchgeführt. Dabei wurden die Parameter BV/TV, Tb.Th sowie Tb.N bestimmt. Die Erhebung der Strukturparameter Tb.Th und Tb.N orientierte sich dabei an den Empfehlungen von Bouxsein et al.⁴⁰ Anhand dieser Vorgehensweise erfolgte die gesamte Auswertung von Teil 1 dieser Arbeit.

3.4 Distanzorientierte Darstellung der ossären Mikroarchitektur

Für die Entwicklung der distanzorientierten Darstellung wurde auf den ausgerichteten Stapel an Graubildern im tiff-Format zurückgegriffen, welche vor allem mit der frei ver-

fügbaren Bildanalysesoftware Fiji (ImageJ 2015, Version 2.0.0, Lizenz: GNU) ausgewertet wurden. Die durch Anwendung des Separation Threshold erhaltenen schwarz-weiß-Bilder wurden mit 8-bit Farbtiefe gesichert. Um eine hohe Präzision zu gewährleisten, erfolgte die Berechnung der Ergebnisse im 16-bit Bereich und wurde entsprechend durch Graubilder mit 16-bit Farbtiefe oder RGB-Bilder visualisiert.

3.4.1 Ausrichtung der Scans

Die rotierten Rohdaten wurden als 16-bit tiff-Bildstapel aus Scanco exportiert. Die Orientierung wurde anschließend durch die Analysesoftware Amira (Thermo Fischer Scientific) optimiert, sodass der Defekt senkrecht im Bildmittelpunkt stand. Alle Berechnungen mit Fiji erfolgten ausschließlich an diesen einheitlich ausgerichteten Bildsätzen.

3.4.2 Analyse der Proben mit Fiji

Die Analyse ab 4.4 erfolgte mit Fiji unter Nutzung des PlugIns BoneJ. Zusätzlich wurden eigene Makros und Plugins entwickelt und verwendet. Ihre Entwicklung ist Bestandteil des Ergebnisses dieser Arbeit.

3.4.2.1 Erstellung einer globalen ROI (ROI_X)

Um den gesamten Probenbereich unabhängig vom Bildhintergrund auswerten zu können wurde die gesamte Probe als ROI markiert. Aufgrund der Stapelgröße von durchschnittlich 1000 Schnittbildern war eine manuelle Auswahl nicht möglich. Die präzise Auswahl der einzubeziehenden Bildanteile stellt jedoch die Grundlage für eine korrekte Auswertung dar.⁴⁰ Um diese zu gewährleisten wurde ein Makro entwickelt, welches die ROI automatisiert erstellt. Dafür wählt das Makro die ROI für jeden Slice als eine konvexe Hülle um die Probe. Unter Verwendung von Fiji-Standardbefehlen geht es dafür nach folgendem Prinzip vor (schematische Darstellung der Schritte siehe Abb. 10):

1. Der erste Schritt ist die Erstellung der Auswahl, die als Grundlage für die weitere Berechnung dient. Es wird der Befehl *Create Selection* genutzt, der eine pixelbasierte Auswahl aller markierten (schwarzen) Pixel erstellt.
2. Um Fehler durch vereinzelte schwarze Pixel außerhalb der Probe zu vermeiden, kann die Auswahl abhängig von der Bildgröße durch die Funktion *Enlarge* um wenige Pixel verkleinert werden. Für die vorliegende Berechnung wurde der Wert -2 gewählt.
3. Um die konvexe Hülle generieren zu können darf die Auswahl keine Löcher enthalten. Dazu wird die Auswahl derart vergrößert, dass alle Löcher geschlossen sind. Der Wert zur Vergrößerung durch die Funktion *Enlarge* wird abhängig von der Größe der Löcher gewählt. Zusätzlich wird dabei die Verkleinerung in Schritt 2 korrigiert. Hier ergab sich der Wert $240+2 = 242$

4. Die Funktion *Interpolate* (Parameter Interval 1.0, Smooth) wird angewendet um die Auswahl von einer pixelbasierten in eine pfadbasierte Auswahl zu transformieren. Dies ist Voraussetzung für die folgende Anwendung von *Convex Hull*.
5. Zuletzt wird die Vergrößerung aus Schritt 3 korrigiert. Zusätzlich kann die Auswahl um wenige Pixel nach außen oder innen angepasst werden. Bei der Berechnung wurde der Wert $-240 - 5 = -245$ verwendet (Damit wird die markierte Umrandung der Probe insgesamt um 5 Pixel nach innen verkleinert).
6. Zur Berücksichtigung des probenspezifischer Anomalien kann anschließend eine manuelle Anpassung der erhaltenen ROIs vorgenommen werden. Hier wurde eine kreisförmige Aussparung zur Berücksichtigung des Defekts aus der ROI hinzugefügt. Diese geht entsprechend nicht in die angestrebte Knochenauswertung mit ein.

Die Parameter der einzelnen Schritte wurden heuristisch gewählt, sodass auf allen Proben bei gleichen Parametern ein gutes Ergebnis erzielt wurde. Die Fixierung der Parameter für alle Proben stellt die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sicher und reduziert die subjektive Beeinflussung.

Für jeden Slice wurde so die ROI individuell erstellt. Die ROI_x beschreibt die Menge aller so erstellten ROIs für eine ausgewählte Anzahl an Schnittbildern (und damit der Höhe) der Probe. Für die vorliegende Auswertung wurde der Bereich vom Beginn des Defekts bis 300 Schnittbilder über den Grund des Defekts hinaus einbezogen. Der Beginn des Defektes wurde definiert als der erste Slice mit einem vollständig von Knochen umgebenen Bohrloch. Eine visuelle Bestimmung des Bohrlochgrundes gestaltete sich aufgrund häufiger Osteolysen als schwierig. Es wurde daher die computertomographisch gemessene Länge der entnommenen Plugs hinzugezogen und anhand dieser die ursprüngliche Defekttiefe bestimmt.

3.4.2.2 Axiale Distanzanalyse

Zur Darstellung der Verteilung von Trabekelparametern in der gesamten Probe mit ihrem räumlichen Bezug zum Defekt wurde ein Java-Plugin entwickelt. Dieses Plugin ist das Kernstück dieser Arbeit und wird im Ergebnisteil ausführlich erläutert. Abbildung 17 zeigt zur Erläuterung eine schematische Darstellung dieser Auswertung. Zur Wahrung der Vollständigkeit des Methodenteils wird die technische Vorgehensweise hier bereits vorab dargestellt. Das Plugin geht vereinfacht nach folgendem Schema vor:

1. Analyse des betrachteten Datensatzes zur Bestimmung des benötigten Speicherplatzes
 - (a) maximal mögliche Distanz zum Defekt, vereinfacht bestimmt durch die Distanz zwischen oberem linken und unterem rechten Pixel zur Umgehung der rechenintensiveren Bestimmung basierend auf der tatsächlichen ROI_x

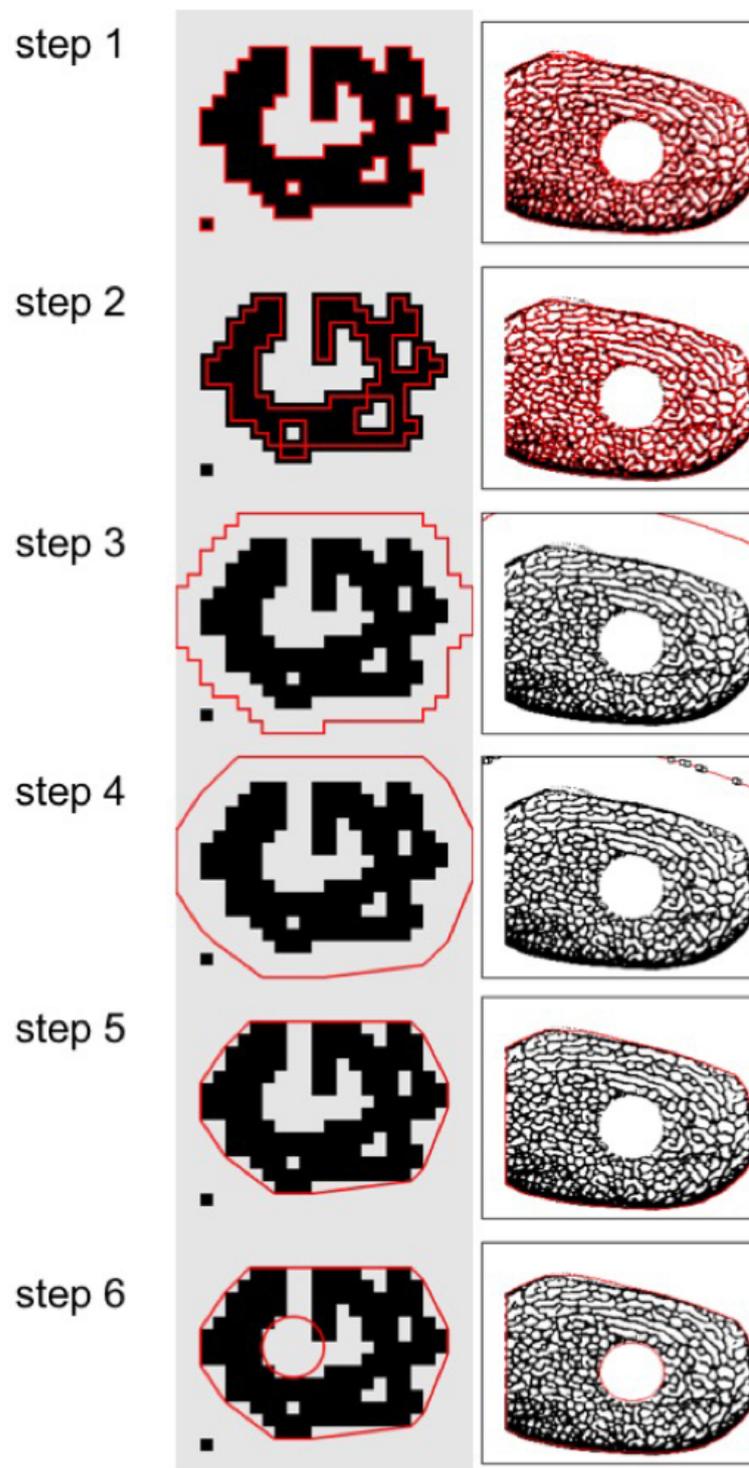


Abb. 10: Schematische Erstellung der globalen ROI_x

Step 1-6 analog zur vorhergehenden schrittweisen Beschreibung; Links grau hinterlegt = schematische Darstellung (schwarz = auszuwählende Pixel grau = Hintergrund); Rechts umrandet beispielhafte Anwendung des schematischen Prinzips an einem Schnittbild einer Probe; Wichtig in Step 2 die Vermeidung einer falschen Hülle durch Ausschluss des vereinzelt schwarzen Pixels im linken unteren Bildbereich sowie in Step 3 das Schließen der Löcher innerhalb des relevanten Bereichs.

-
- (b) Anzahl der Schnittbilder, Differenz zwischen dem ersten und letzten Schnittbild, welches in die Berechnung einbezogen werden sollte
2. Speicherallokation in Form von zweidimensionalen Listen (Arrays) aus 16-bit Werten indiziert durch Distanz zum Bohrloch und Höhe (Index des Schnittbildes). Benötigt wird je ein Array für
 - (a) Gesamtzahl der Pixel (*ArrayTOTALCOUNT*)
 - (b) Zahl der Pixel innerhalb der ROI_X (*ArrayROICOUNT*)
 - (c) Summe der Werte der Pixel (*ArrayVALUE*)
 3. Berechnung der Werte für jede Distanz zum Zentrum des Bohrlochs pro Schnittbild:
 - (a) Berechnung für jeden Pixel des aktuellen Schnittbildes:
 - i. Berechnung des Abstands zum Mittelpunkt des Defekts und Bestimmung des entsprechenden Index in den Arrays (durch Runden). Damit erfolgt der Zugriff auf die Arrays in den anschließenden Schritten durch den berechneten Distanzindex und den aktuellen Index des Schnittbildes
 - ii. Erhöhung des entsprechenden Wertes im *ArrayTOTALCOUNT* um 1
 - iii. Abbruch der Iteration (Auslassen der nachfolgenden Schritte) falls der Pixel nicht innerhalb der ROI_X liegt
 - iv. Erhöhung des entsprechenden Wertes im *ArrayROICOUNT* um 1
 - v. Erhöhung des entsprechenden Wertes im *ArrayVALUE* um den Grauwert des Pixels (bei vorliegenden binarisierten Datensätzen Beschränkung auf die Werte 0 bzw. 255)
 4. Ausgabe des Ergebnisses durch zwei 16bit Graustufenbilder, wobei jeder Wert im Array einen Pixel beschreibt (Indices im Array = Koordinaten in der Ergebnisdarstellung)
 - (a) Abbildung des Verhältnisses von *ArrayVALUE* zu *ArrayROICOUNT*
 - (b) Abbildung des Verhältnisses von *ArrayROICOUNT* zu *ArrayTOTALCOUNT*

Dabei entspricht a) dem durchschnittlichen Dichtewert je Distanz und Höhe. b) zeigt das Verhältnis der Anzahl an betrachteten Pixeln (innerhalb der ROI_X) zur Gesamtzahl der Pixel je Distanz und Höhe. Dies ermöglicht eine Einschätzung der Aussagekraft der Werte in Darstellung a)
 5. Ausgabe des Ergebnisses als eindimensionale Wertetabelle. Dabei wird analog zu 4a) das Verhältnis von *ArrayVALUE* zu *ArrayROICOUNT* ausgegeben, wobei die Arrays zunächst auf die Distanz reduziert werden (Berechnung des Durchschnittswertes pro Distanz unter Vernachlässigung der Höhe). Anschließend erfolgte die grafische Visualisierung der Wertetabelle im Koordinatensystem durch die Software Prism (2016 GraphPad Software, Prism7.0)

3.5 Statistik

Es erfolgten drei statistische Auswertungen: In Teil 1 der Arbeit (der Analyse mittels herkömmlicher Vorgehensweisen) die Auswahl des Thresholds zur Binarisierung der Proben sowie der Vergleich der gewonnenen Knochenparameter. In Teil 2 wurde die quantitative Analyse der neu entwickelten Darstellungsmethode statistisch ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte unter Beratung durch das Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin.

3.5.1 Binarisierung

In jeder Probe wurden drei Trabekelparameter jeweils mit dem visuellen und dem algorithmischen Threshold ausgewertet. Es wurde der Mittelwert für die algorithmischen und die visuellen Daten gebildet und die Pearson-Korrelation angewendet, um eine Aussage über die Ähnlichkeit der beiden Thresholds treffen zu können. Die Korrelation wird durch Werte zwischen -1 und 1 ausgedrückt, wobei ein Wert nahe 1 für eine starke Korrelation steht, ein Wert nahe 0 für keinen Zusammenhang der Variablen und ein Wert < 0 für eine antiproportionale Korrelation. Eine hohe Korrelation zeigt eine näherungsweise lineare Abhängigkeit der Variablen und wäre ein Zeichen für eine Ähnlichkeit der Thresholds.

3.5.2 Knochenparameterbestimmung mit Scanco

In jeder Probe wurden in je drei ROIs drei Trabekelparameter bestimmt. Durch zwei Behandlungsgruppen mit je 2 Behandlungszeiträumen ergaben sich vier Gruppen. Um eine statistische Aussage über den Einfluss der Behandlungsgruppe unabhängig von der Behandlungszeit treffen zu können wurden die Tiere einzig nach Behandlungsgruppen zusammengefasst. In einer zweiten Gruppierung erfolgte die Auswertung umgekehrt bezogen auf den Einfluss der Behandlungszeit unter Vernachlässigung der Behandlungsgruppen. Diese Zusammenfassung erfolgte zur Vermeidung eines zu kleinen n und damit zur Ermöglichung einer übersichtlichen statistischen Auswertung. Zur Wahl des statistischen Tests wurde über die Schiefe in jeder (Sub)Gruppe eine Einschätzung der Normalverteilung vorgenommen. Zur Ergänzung wurde der D'Agostino-Pearson omnibus K2 angewendet. Die Testergebnisse und die Betrachtung der Schiefe ließen auf eine nicht-parametrische Verteilung schließen. Aufgrund der zusätzlich kleinen und ungepaarten Stichproben wurde für den Vergleich der Gruppen der Mann-Whitney-U Test angewandt. Das Signifikanzniveau wurde bei 5% gesetzt. Die Darstellung erfolgte insgesamt tabellarisch. Der Vergleich der ROIs mit Schwerpunkt auf den Behandlungszeiträumen wurde zusätzlich als Boxplot präsentiert. Die Gruppen sind hier unabhängig von der Behandlungsmethode anhand des Behandlungszeitraums zusammengefasst.

3.5.3 Distanzorientierte Darstellungsmethode

Die Auswertung der Graphen aus der entwickelten Darstellungsmethode basierte auf dem Vergleich zweier nach Auffälligkeiten zusammengefasster Gruppen (Graphen und Gruppen erläutert in 4.4.4). Die Gruppen wurden über die Berechnung des Median/Mittelwert-Quotienten und den Shapiro-Wilk-Test auf Normalverteilung getestet. Die Varianzhomogenität wurde durch den F-Test überprüft. Da basierend auf diesen Ergebnissen von einer Normalverteilung und Varianzhomogenität ausgegangen werden konnte wurde für den Vergleich der Gruppen der t-Test herangezogen. Das Signifikanzniveau wurde für die beiden Hauptparameter nach Anwendung der Bonferoni-Korrektur auf 2,5% abgesenkt. Das Signifikanzniveau für die Nebenparameter blieb bei 5%.

4. ERGEBNISSE

4.1 Visuelle Darstellung der μ CT-Scans

Um die Einflüsse der Implantate auf das umliegende Knochengewebe zu beurteilen wurden zunächst die μ CT-Bilder der Proben dreidimensional rekonstruiert (siehe Abb. 11). Hierfür wurde ein Frontalschnitt mittig durch den Defekt gewählt. Angestrebtes Ziel bei der Bohrung des Defektes war eine zur Gelenkoberfläche vertikale Einbringung der Scaffolds. Die μ CT-Rekonstruktion zeigt ein gemischtes Gelingen. Kein Defekt ist in der beobachteten Zeitspanne vollständig mit Knochen gefüllt und geheilt. Die erkennbaren Defekte unterscheiden sich in Größe und Ausdehnung deutlich voneinander.

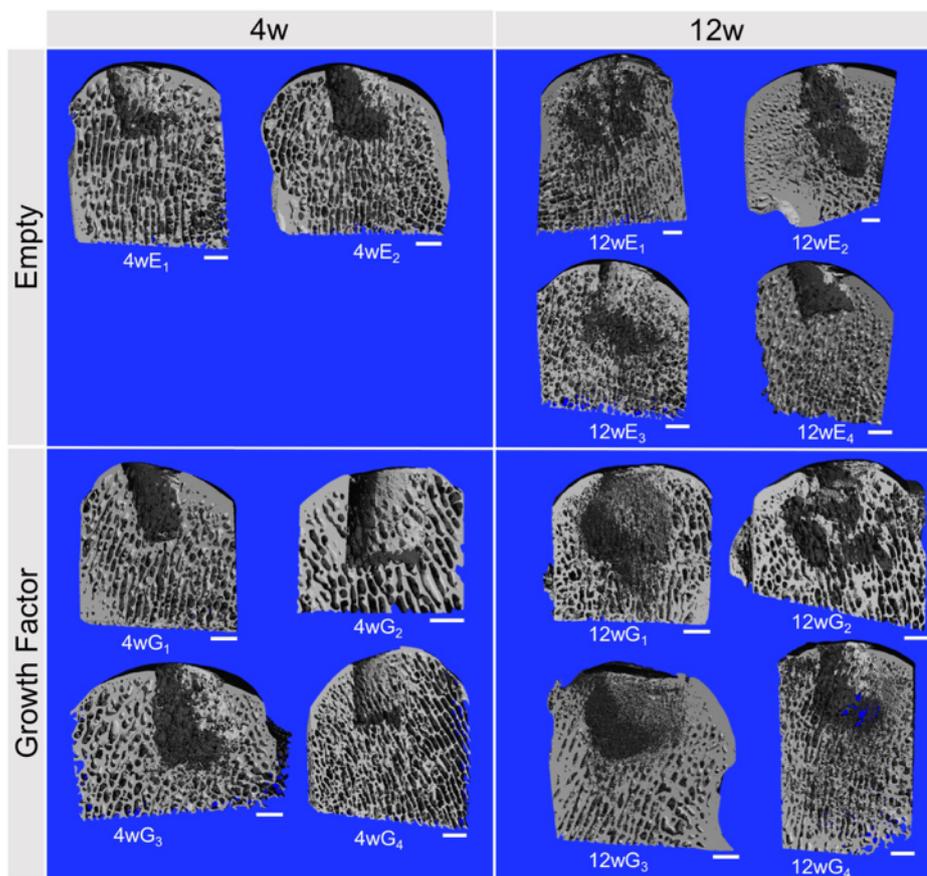


Abb. 11: Computertomographische Rekonstruktion der Proben

Frontaler Schnitt durch die Mitte des Defektes. Visuelle Thresholds. Links: Growth Factor = Scaffold mit Wachstumsfaktoren, Empty = Scaffold ohne Wachstumsfaktoren; Oben: Standdauer 4w = 4 Wochen, 12w = 12 Wochen. Scalebar = 1 mm

Die Tiere mit vier Wochen Heilungszeit lassen bis auf eine Ausnahme in der G-Gruppe (4wG₃) den hinzugefügten Defekt mit klar abgrenzbaren Rändern erkennen. In den Defekt scheint kein radiologisch erfassbares Material eingewachsen zu sein. Zwischen den Behandlungsgruppen ist mit Ausnahme eines Tieres der G-Gruppe (4wG₃)

deskriptiv makroskopisch kein Unterschied in der Defektheilung feststellbar. Die Tiere mit zwölf Wochen Heilungszeit zeigen bis auf eine Ausnahme in der E-Gruppe (12wE₄) eine Vergrößerung des verursachten Defektes. Die Ausmaße des ursprünglichen Bohrloches lassen sich aufgrund von starken Knochenrückgängen an diversen Lokalisationen schwer bis nicht erkennen. Die Osteolysen dehnen sich nach visueller Einschätzung häufig vor allem unterhalb des Defektes aus, aber auch die Seitenränder sind betroffen. Diese Entwicklung war unerwartet. Um sie kausal einordnen zu können ist eine objektivierbare Auswertung der Knochenparameter, insbesondere in ihrem räumlichen Bezug zum Defekt, von großem Interesse.

4.2 Binarisierung

Um eine möglichst korrekte Binarisierung der μ CT-Bilder zu erzielen (siehe Lespessailles 2006³⁵) wurden die Parameter BV/TV (Anteil Knochenvolumen am Totalvolumen), Tb.N (Trabekelanzahl) und Tb.Th (Trabekeldicke) der entnommenen Knochenzylinder mit dem visuellen und algorithmischen Threshold erhoben und miteinander verglichen. Ziel war die Wahl des geeigneteren Verfahrens für die Binarisierung der Proben.

Der Korrelationskoeffizient r , ermittelt durch die Pearson-Korrelation, lag bei allen drei Parametern über 0,9. Dies spricht für eine starke Abhängigkeit der Variablen. Auf diese Daten bezogen steigt und fällt der ermittelte Wert des visuellen Thresholds im gleichen Maße wie der des algorithmischen Thresholds. Es kann also von einer deutlichen Ähnlichkeit des visuellen und algorithmischen Thresholds ausgegangen werden. Dies ermöglicht keine direkte Aussage über die tatsächlich berechneten Werte, aber über ihre Korrelation, also ihre (linear) abhängige Entwicklung. Die Unterschiede in den absoluten Werten lassen sich wie folgt interpretieren:

Die Auswertung mit dem visuellen Threshold zeigt bei BV/TV und Tb.Th durchgängig höhere Werte als mit dem algorithmischen Threshold. Das bedeutet eine visuell verstärkte Einbeziehung von Knochen in die Auswertung, welche in ihrer Ausprägung aber konstant ist (hohe Pearson-Korrelation). Da der Knochen physiologischerweise zum Rand eines Trabekels hin weniger dicht wird liegt nahe, dass das insgesamt erhöhte BV/TV auf die großzügigere Einbeziehung der Trabekelränder zurückzuführen ist. Diese spiegelt sich ebenfalls in einer erhöhten Trabekeldicke (Tb.Th) in der visuellen Auswertung wider, während sich die Anzahl an Trabekeln (Tb.N) zwischen beiden Thresholds nicht nennenswert unterscheidet.

Beide Methoden ermöglichen demzufolge eine zuverlässige Binarisierung. Der hohe Korrelationskoeffizient zeigt, dass beide Verfahren präzise auf Veränderungen in den Grauwerten reagieren und demnach zuverlässige Ergebnisse liefern. Der visuelle Threshold ist kleiner und bezieht dabei einen konstanten Anteil niedrigerer Grauwerte, also weniger mineralisierten Knochen mit ein als der algorithmische. Um eine bessere Objektivität und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten wurde für die folgende Analyse der Proben die Binarisierung mit dem algorithmisch ermittelten Threshold gewählt. Dadurch

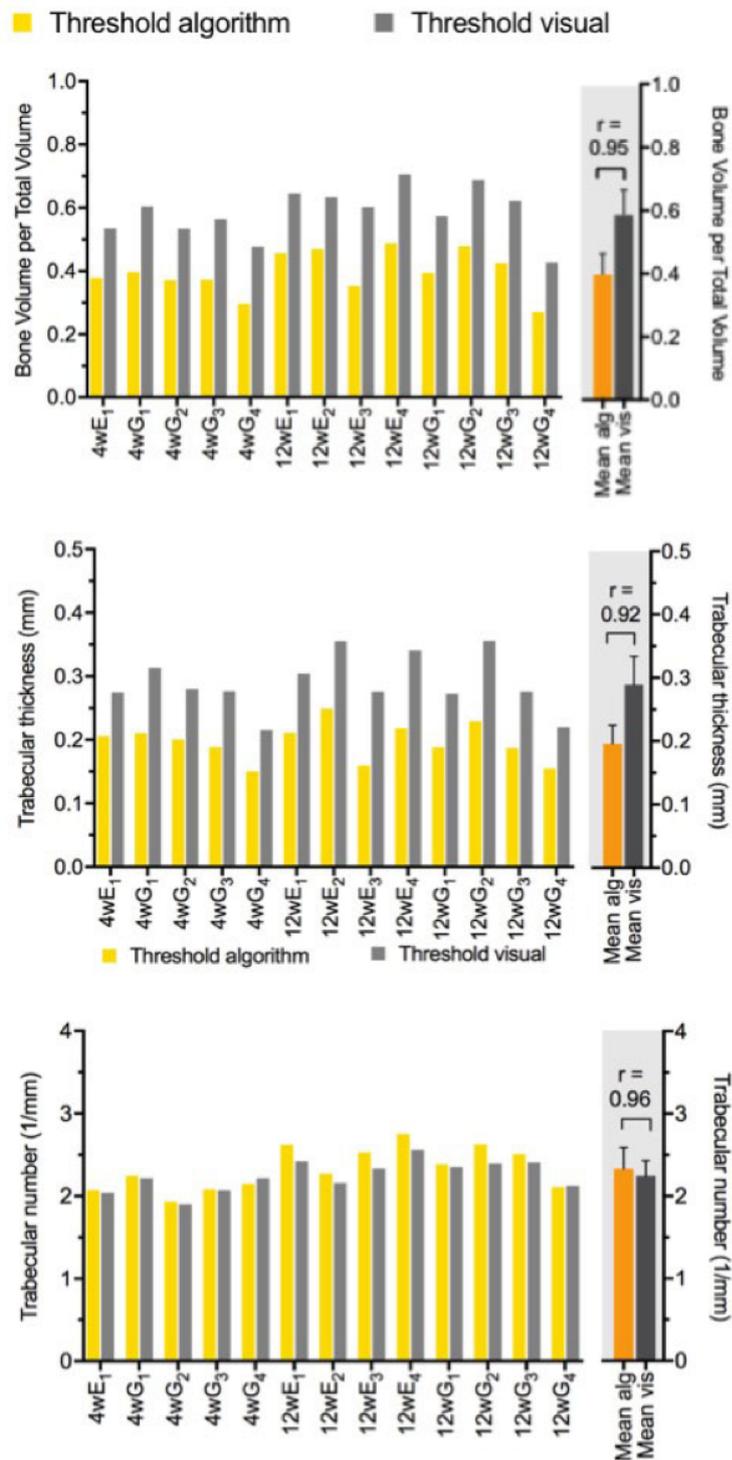


Abb. 12: Vergleich visueller und algorithmischer Threshold

Auswertung der Trabekelparameter BV/TV (1), Tb.Th (2) und Tb.N (3) je entnommenem Knochenzylinder mit dem algorithmischen (gelb) und visuellen Threshold (grau). Darstellung der Mittelwerte je Parameter und Threshold (orange/dunkelgrau). r = Pearson-Korrelation

wurde einer Überschätzung des weniger dichten Knochens durch den visuellen Threshold vorgebeugt. Außerdem ist der Algorithmus unabhängig vom Betrachter, wird nicht von äußeren Umständen wie Bildschirm- und Lichtverhältnissen beeinflusst und ermöglicht so eine bessere Reproduzierbarkeit. Für jede Probe wurde mit den gleichen Messparametern algorithmisch der individuelle Threshold bestimmt und aus diesen der einheitliche Threshold von 270 gemittelt. Mit diesem Wert erfolgte die Binarisierung aller Proben.

4.3 Analyse der Daten durch ROIs

Für die Beurteilung des Knochens wurden die Parameter BV/TV, Tb.N und Tb.Th betrachtet (Threshold = 270). In jeder Probe wurden drei unterschiedlich platzierte ROIs ausgewertet um die Trabekelparameter in verschiedenen Lokalisationen vergleichen zu können. Diese drei ROIs wurden so gewählt, dass das Innere des Defekts (ROI_{INNER}) getrennt von seiner Umgebung und in zwei verschiedenen Höhen des Defektes (ROI_{AROUND} und ROI_{UNDER}) ausgewertet werden konnte (siehe Abb. 9).

Verglichen wurden anschließend (i) die Behandlungsgruppen E und G sowie (ii) die beiden Behandlungszeiträume 4 w und 12 w. Übergeordnetes Ziel war eine Beurteilung der Aussagekraft der verschiedenen ROIs über die räumliche Verteilung der Trabekelparameter.

Tab. 2: Statistische Auswertung

	Empty				Growth Factor				p	4w				12w				p		
	n	25%	Median	75%	n	25%	Median	75%		n	25%	Median	75%	n	25%	Median	75%			
ROI _{INNER}	BV/TV	6	0.004	0.013	0.030	8	0.002	0.006	0.021	0.75	6	0.001	0.003	0.007	8	0.007	0.020	0.045	0.005	**
	Tb.N	5	0.322	0.476	0.508	8	0.291	0.558	1.036	0.62	4	0.237	0.268	0.301	8	0.397	0.481	0.582	0.01	**
	Tb.Th	6	0.081	0.098	0.110	8	0.069	0.098	0.122	0.75	6	0.055	0.095	0.126	8	0.084	0.098	0.116	0.95	
ROI _{AROUND}	BV/TV	6	0.252	0.104	0.391	8	0.217	0.125	0.357	>0.99	6	0.253	0.343	0.389	8	0.103	0.142	0.219	0.04	*
	Tb.N	6	1.968	0.956	2.929	8	2.279	1.646	2.575	0.75	6	1.898	2.386	2.539	8	1.119	1.701	3.424	0.66	
	Tb.Th	6	0.157	0.136	0.179	8	0.142	0.121	0.186	0.49	6	0.147	0.171	0.197	8	0.121	0.136	0.160	0.11	
ROI _{UNDER}	BV/TV	6	0.175	0.076	0.289	8	0.150	0.047	0.262	0.85	6	0.168	0.232	0.283	8	0.038	0.088	0.198	0.11	
	Tb.N	6	1.738	1.039	2.539	8	1.593	0.831	2.187	0.85	6	1.677	2.151	2.191	8	0.582	1.261	3.024	0.28	
	Tb.Th	6	0.129	0.108	0.144	8	0.122	0.115	0.162	0.75	6	0.119	0.135	0.165	8	0.106	0.115	0.143	0.08	

Statistischer Vergleich der Gruppen E und G (links) sowie 4 w und 12 w (rechts) je ROI durch Anwendung des Mann Whitney U-Tests. Signifikanzniveau 5%. (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$. Reduziertes n in ROI_{INNER} für Tb.N: zu wenig Knochenmaterial, um verlässlichen Wert auszugeben (vom Auswertungsprogramm als unsichere Ergebnisse eingestufte Werte wurden nicht mit eingeschlossen).

Die beiden Behandlungsmethoden zeigten unabhängig von der betrachteten ROI keinen signifikant unterschiedlichen Einfluss auf die Trabekelparameter. Im Vergleich der Behandlungszeiträume von 4 und 12 Wochen zeigten sich bei den Tieren mit längerer

Standzeit ein signifikanter Zuwachs von BV/TV und Tb.N in der ROI_{INNER} und eine signifikante Abnahme des BV/TV in der ROI_{AROUND}. Diese Ergebnisse deckten sich mit der dreidimensionalen Rekonstruktion der Scans in Abbildung 11. Auch hier war visuell ein Unterschied zwischen den Standzeiten, jedoch nicht zwischen den Behandlungsgruppen erkennbar.

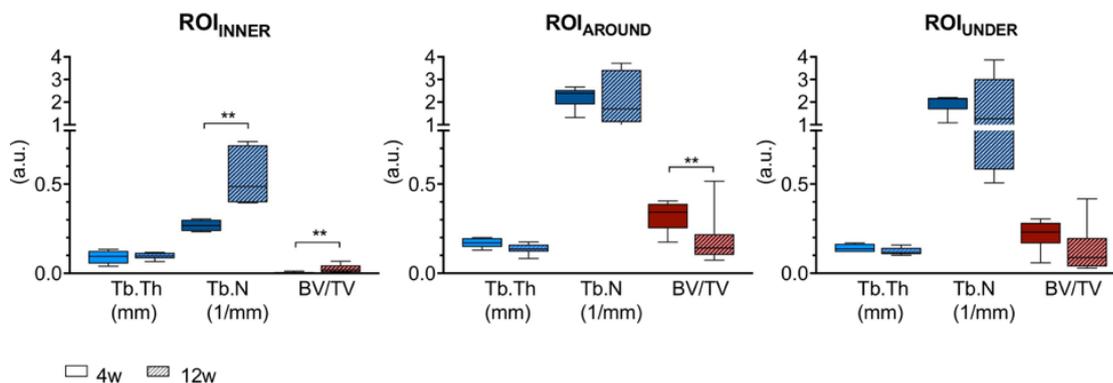


Abb. 13: Vergleich der Standzeiten im Boxplot

Darstellung der Ergebnisse je ROI und Parameter im Vergleich von 4 Wochen zu 12 Wochen

Um die Prozesse in der räumlichen Relation zum Defekt und in der zeitlichen Entwicklung nachvollziehen zu können ist die Auswertung der einzelnen ROIs ausschlaggebend. In ROI_{INNER} war der Zuwachs des BV/TV von 4 w (Median = 0,003) auf 12 w (Median = 0,02) signifikant ($p = 0,005$), das heißt bei längerer Standzeit fand sich eine größere Menge an Knochen im Defekt. Gemessen an der erwarteten Heilung des Defektes war die absolute Knochenneubildung im Defekt jedoch gering. Der signifikante Anstieg der Trabekelanzahl ($p = 0,01$) ohne gleichwertigen Anstieg der Trabekeldicke ließ darauf schließen, dass das beobachtete Knochenwachstum in der ROI_{INNER} auf die Bildung neuer Trabekel zurückzuführen ist.

Durch die Darstellung in Boxplots (Abb. 13) sind Entwicklungen innerhalb und zwischen den ROIs erkennbar, die Tendenzen aufzeigen obwohl sie oberhalb des Signifikanzniveaus liegen. In ROI_{AROUND}, die ausschließlich die Umgebung des Defektes einbezieht, nimmt das BV/TV von 4 w zu 12 w signifikant ab ($p = 0,04$); in der ROI_{UNDER} (ebenfalls Umgebung des Defektes) zeigt der Median eine Tendenz in die gleiche Richtung (Median 4 w = 0,232 ; 12 w = 0,088). Bezogen auf die Abnahme der Trabekeldicke und -anzahl in ROI_{AROUND} und ROI_{UNDER} lässt dies die Vermutung zu, dass der Knochenverlust zunächst auf den Abbau der weniger dichten Trabekelränder bis zum vollständigen Verlust des Trabekels zurückzuführen ist. Ein Hinweis dafür ist, dass die Trabekeldicke in ROI_{AROUND} und ROI_{UNDER} von 4 zu 12 Wochen stärker abnimmt als die Trabekelanzahl (ROI_{AROUND}: $p_{Tb.Th} = 0,11$ und $p_{Tb.N} = 0,66$; ROI_{UNDER}: $p_{Tb.Th} = 0,08$ und $p_{Tb.N} = 0,28$). Die Auswertung dieser drei ROIs zeigte, dass sich der Knochen durch den Defekt an verschiedenen Lokalisationen unterschiedlich entwickelt. Sie lässt folgende Aussagen über die Anwendbarkeit dieser Methodik zu, wenn die Relation der Knochen-

parameter zum Defekt beurteilt werden soll:

- (i) Eine Differenzierung der Parameter in ihrer Lage in und um den Defekt ist durch die individuelle Wahl der ROIs prinzipiell möglich.
- (ii) Je kleiner die ROI desto präziser die Aussagekraft über diesen Bereich der Probe.
- (iii) Die vollständige Auswertung der Probe durch zahlreiche kleine ROIs liefert präzisere (da nicht aus vielen Werten gemittelte) Ergebnisse. Schwierigkeiten ergeben sich hier durch die Unübersichtlichkeit bei der Auswertung vieler einzelner ROIs, deren vergleichbare Platzierung in allen Proben ebenfalls gewährleistet sein muss.
- (iv) Die Größe der ROIs und ihre Anzahl ist in der praktischen Anwendung begrenzt. Während im vorliegenden Datensatz die visuelle Betrachtung der Scans einen Einfluss des Defektes bis nah an die Enden der Proben annehmen ließ konnte keine ROI gewählt werden, die dies adäquat hätte darstellen können. Die (heterogene) Probengröße und die gewölbte Gelenkoberfläche verhinderten im Scanco-Programm eine einheitliche große ROI, die sowohl die gesamte Tiefe des Defektes als auch ein ausreichendes Areal um den Defekt herum einbezogen hätte. Für die Vergleichbarkeit der ROIs zwischen den Proben mussten diese jedoch einheitlich gesetzt werden, weshalb weniger und kleinere Areale einbezogen wurden.

Die Auswertung innerhalb eines abgrenzbaren Defektes ist mit dieser Methode gut durchführbar. Eine häufige Fragestellung in Versuchen dieser Art ist beispielsweise die Analyse des neu gewachsenen Knochens innerhalb eines Defekts. Die ROI kann an den Grenzen des ursprünglichen Defekts ausgerichtet werden. Die gesamte Region of Interest befindet sich innerhalb des Defektes, sodass die weitere Größe der Probe keinen limitierenden Einfluss auf die Platzierung der ROIs hat. Durch die Wahl verschiedener kleinerer ROIs innerhalb des Defektes kann auch auf die Verteilung der Parameter innerhalb des Defektes eingegangen werden (beispielsweise oberes/mittleres/unteres Drittel oder nach seitlicher Ausrichtung). Eine Herausforderung stellen Proben dar in denen der ursprüngliche Defekt nicht mehr erkennbar ist, wie beispielsweise im vorliegenden Datensatz bei ausgedehnter Osteolyse.

In diesem Versuch sollte aber zusätzlich der Einfluss der Behandlung auf das umliegende Gewebe untersucht werden. Die Quantifizierung der zusätzlich aufgetretenen Osteolyse und eine Aussage über ihre Verteilung (beispielsweise ihr Bezug zu den Seitenrändern/dem Grund des Defektes oder ihre Tiefe) ließ sich durch die limitierte Auswahl an ROIs nicht zufriedenstellend erreichen. Obwohl die verwendeten ROIs einen ersten Eindruck der Knochenentwicklung vermittelten (an den Seitenrändern des Defektes nach 12 Wochen Heilungszeit Abnahme von Knochen, innerhalb des Defektes eine Zunahme an Knochen) reichten diese Ergebnisse in Deutlichkeit und Präzision nicht aus, um die heterogenen deskriptiven Eindrücken der Scans zufriedenstellend zu quantifizieren und zu objektivieren.

4.4 Entwicklung der distanzorientierten Darstellungsmethode

4.4.1 Deskriptive Definierung ossärer Zonen

Die makroskopisch sichtbaren Knochenveränderungen in den Proben erstreckten sich weiter um den Defekt als die ROIs im vorherigen Analyseprozess abzubilden vermochten. Grundlegend ließen sich Proben mit klaren Defekträndern und ohne erkennbare Osteolyse, deren Trabekelstruktur sehr homogen wirkte, von solchen mit prominenten Um- und Abbauprozessen unterscheiden. In letzteren stachen visuell zwei Knochenzonen hervor, die sich deutlich voneinander differenzieren ließen. Knochen des Typus A schien aus dichten, langen und dünnen Trabekeln mit wenigen, dafür sehr weiten Zwischenräumen zu bestehen. Der sich davon abgrenzende Knochentypus B wirkte visuell weniger dicht, die Trabekel schienen kurz und dick und die Zwischenräume der Trabekel klein, jedoch zahlreich. Diese Areale fanden sich in unterschiedlichem Ausmaß und an verschiedenen Lokalisationen in den Proben wieder. Typ A wirkte wie reifes, dichtes, möglicherweise älteres Knochengewebe, Typus B wie junger, weicher Knochen.^{21,67} Insbesondere Knochentyp B war auffällig, da er sich deutlich von der homogenen Trabekelstruktur der Proben mit klarem Defektrand unterschied. Es war daher von großem Interesse, die Verteilung dieser Knochentypen in der gesamten Probe darstellen und so einen Eindruck von ihrer Beziehung zum Defekt erhalten zu können. Ziel der Analyse stellte dar, (a) diese auffälligen Knochenherde zu charakterisieren und zu quantifizieren und (b) ihre Relation zum Defekt zu bewerten.

4.4.1.1 Schritt 1: Selektion

In einem ersten Schritt wurden die Knochentypen definiert. Dazu wurden die Knochentypen A und B visuell in allen Proben aufgesucht und mit einer ROI (100x100x100 Pixel) markiert (siehe Abb.14). Diese ROI fungierte wie eine technische Biopsie. Ihre Analyse ermöglichte es, den visuell auffälligen Knochenbereich anhand seiner Trabekelparameter zu charakterisieren. Je Probe wurde, wenn möglich, eine ROI für Knochentyp A (ROI_A) und eine für Typ B (ROI_B) gesetzt.

4.4.1.2 Schritt 2: Charakterisierung

Für jede ROI wurde ein Histogramm erstellt, welches die Verteilung der Knochendichte widerspiegelt. Außerdem wurden die Trabekelparameter Tb.Sp, Tb.Th und Tb.N der ROIs durch das BoneJ Plugin der Analysesoftware Fiji ausgewertet, um eine spätere Charakterisierung anhand weiterer Parameter vornehmen zu können. Die Differenzierung der Knochentypen erfolgte jedoch zunächst anhand der Dichte, um den visuellen Eindruck zu überprüfen. Hierzu wurden in Abbildung 15 die Histogramme der ROIs von Knochentyp A und Knochentyp B aufgetragen und miteinander verglichen, was einem etablierten Vorgehen bei der Trennung unterschiedlicher Gewebetypen entspricht.^{67,68}

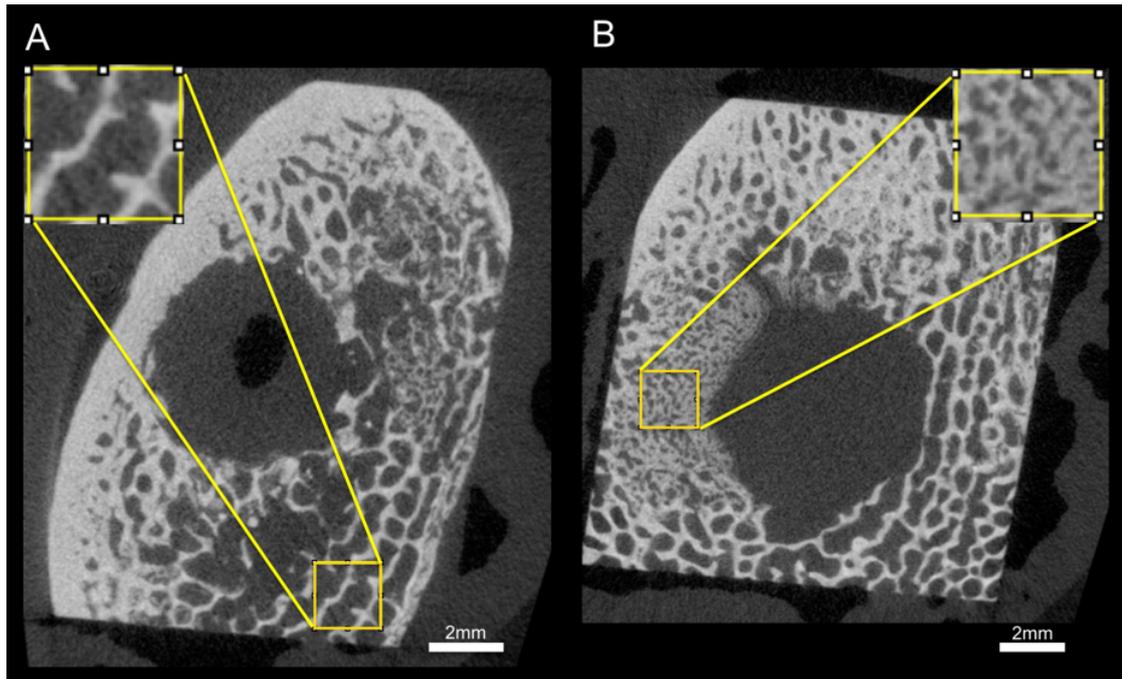


Abb. 14: Visueller Eindruck Knochentyp A und B

Zweidimensionale Schnittbilder durch Probe 12wG4. Gelb = ROI (100x100x100px) (A) dünne, lange Trabekel aus dichtem Knochen mit weiten Zwischenräumen; (B) kurze, dicke Trabekel aus weniger dichtem Knochen mit kleinen Zwischenräumen

4.4.2 Separation Threshold

Die in 4.4.1.2 beschriebene Darstellung der Histogramme ergab folgendes Bild:

Die Histogramme der beiden Knochentypen unterschieden sich wie bereits visuell angenommen deutlich voneinander. Während die Histogramme der ROI_B ihren Peak im Mittel bei einem Grauwert von 8264 zeigten lag der Peak der Histogramme aus ROI_A bei 9617. Dies unterstützt die Annahme, dass der in ROI_B erfasste Knochen weniger stark mineralisiert war als der Knochen in ROI_A.

Knochen, der zum Typus A gehört, lässt sich demnach vor allem durch Dichtewerte um 9617 beschreiben, während in Knochentyp B vermehrt Dichtewerte um 8264 vorliegen. Anhand dieser Dichtewerte lassen sich die beiden Typen charakterisieren und differenzieren. Um in der gesamten Probe alle Dichtewerte vereinfacht entweder Knochentyp A oder B zuzuordnen zu können wurden die Dichtewerte zwischen den beiden Peaks gleichmäßig zu je 50% Typ A und Typ B zugeteilt. Dadurch ergab sich ein Threshold von 8940, der mittig die Peaks der ROI_A und ROI_B Histogramme trennt. Durch diesen Separation Threshold werden die Grauwerte einer Probe in einen „High Threshold Bereich“ oberhalb von 8940 sowie einen „Low Threshold Bereich“ unterhalb von 8940 eingeteilt. Der Low Threshold Bereich umfasst nun die Grauwerte, die Knochentyp B zugeteilt wurden, der High Threshold Bereich die des Knochentyps A. Die Bestimmung des Background Thresholds erfolgte anhand der ROI_B-Histogramme: Für jedes

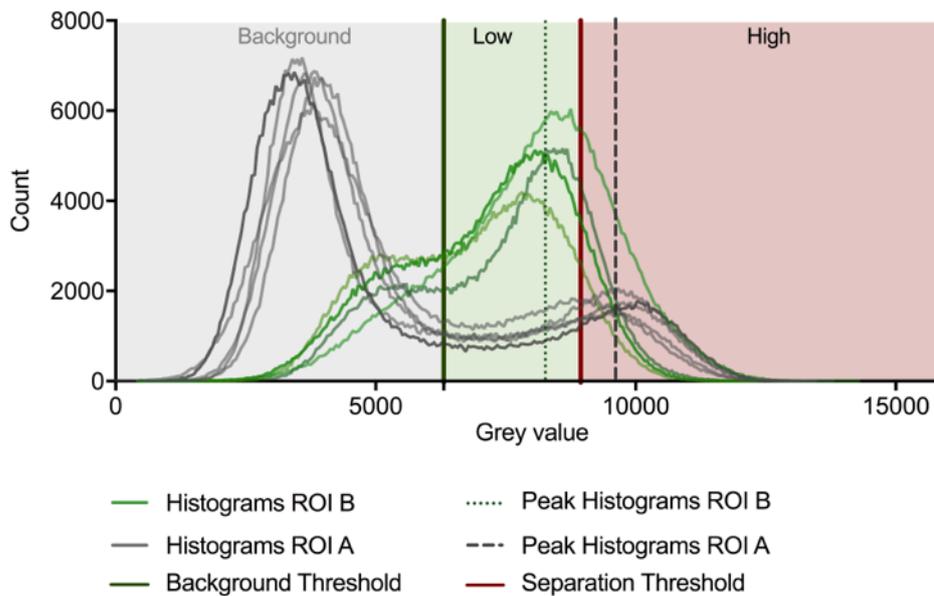


Abb. 15: Histogramme von Knochentyp A und B

Histogramme der ROIs von Knochentyp A (grau) und Knochentyp B (grün); eingezeichnet: gemittelte Peaks der Histogramme von ROI_A und ROI_B (gestrichelt), der mittig dazwischen liegende Separation Threshold sowie der Background Threshold (dunkelgrau senkrecht)

Histogramm wurde visuell der Background-Threshold bestimmt und die einzelnen Werte anschließend gemittelt. Der erhaltene Background-Threshold von 6307 grenzte den Low Threshold Bereich nach unten hin ab.

Das Ergebnis dieser Einteilung war eine Aufteilung aller Grauwerte der Proben in Background (0-6307), Low Threshold Bereich (6308-8940) und High Threshold Bereich (8941-16000), wobei letztere die visuell differenzierten Knochentypen beschreiben.

4.4.2.1 Anwendung des Separation Threshold

Durch die Zuordnung der Dichtewerte des High Threshold Knochentyp A und die des Low Thresholds Knochentyp B erhält man nach Anwendung der Thresholds auf die Scans eine Darstellung der Proben mit nur einem Knochentyp (Dichtetyp). Dies ermöglicht die Beurteilung der Grauwerte in zwei Kategorien.

Nach diesem Schema wurden alle Proben binarisiert und in Lower Threshold Bereich und Higher Threshold Bereich aufgeteilt.

4.4.2.2 Auswertung

Die Anwendung des Separation Thresholds ergab bei Tieren mit 4 Wochen Standzeit und überwiegend klaren Defektränder ohne Knochenrückgang übereinstimmend eine homogene Verteilung der Trabekel. Die in ihrem Zentrum mineralisierten und dichten Trabekel (Abb. 16: schwarz in der Higher Threshold Grafik) sind von einer jeweils dünnen Schicht

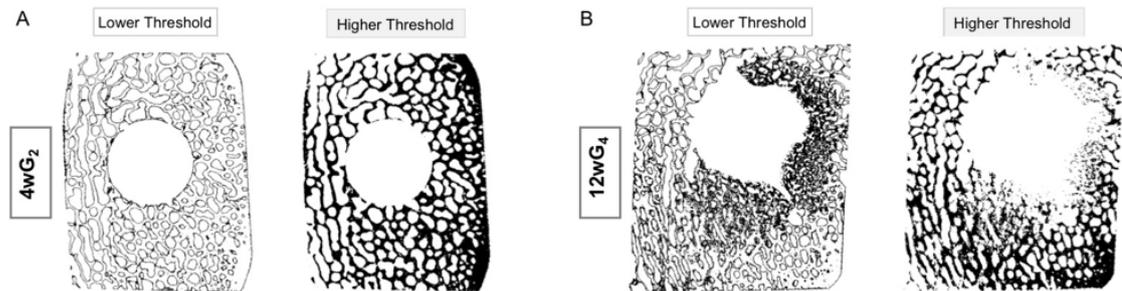


Abb. 16: Binarisierung mittels Separation Threshold

Binarisierung der Proben anhand des Separation Thresholds mit der Darstellung der Grauwerte des Lower Threshold (1. Schnittbild) und des Higher Threshold (2. Schnittbild). (A) Probe mit 4 Wochen Standzeit (B) Probe mit 12 Wochen Standzeit

weicherem weniger dichten Knochen umgeben (schwarze feine Trabekellinien der Lower Threshold Grafik). Im subchondralen Bereich war der Knochen zunehmend dichter (Zunahme von Knochen des Higher Thresholds, Abnahme von Lower Threshold Knochen) und von weniger Zwischenräumen durchsetzt. Die Verteilung von beiden Dichtewerten erschien homogen und der physiologischen Trabekelstruktur entsprechend. Die Proben mit 12 Wochen Heilungszeit zeigten mit der visuellen Darstellung übereinstimmend unscharfe Defektränder mit Osteolysen und einer unregelmäßigeren Verteilung der Dichtewerte. In der Nähe des Bohrloches zeigen sich beispielsweise in Abbildung 16 Herde von weniger dichtem Knochen (Lower Threshold Area). An gleicher Stelle in der Auswertung des Higher Thresholds findet sich kein Knochen. Diese Herde zeichnen sich daher durch vermehrten weichen Knochen bei gleichzeitiger Abnahme von hartem Knochen aus. Derartige Herde, in denen ein Knochentyp überwiegt, bedingen ein inhomogenes Bild der Knochenstruktur und sind beinahe ausschließlich in Tieren mit 12 Wochen Standzeit zu finden. Diese Darstellung zeigt deutlich die Umbauprozesse in den Proben längerer Standzeit und die Verteilung verschieden dichter Knochentypen. Die beschriebenen Herde deuten auf eine vermehrte Knochenneubildung hin und scheinen sich in Höhe und Abstand zum Defekt unterschiedlich zu verteilen.

Der Erkenntnisgewinn aus dieser Darstellung basiert allerdings auf der einzelnen Betrachtung aller zweidimensionalen Schnittbilder. Eine übersichtliche Darstellung oder Quantifizierung ist nicht gegeben, daher bleibt es bei einem visuellen exemplarischen Eindruck. Eine allgemeine Aussage über die Relation dieser Knochenherde zum Defekt und Biomaterial ist ein erstrebenswertes tiefergehendes Analyseziel, um mögliche Kausalzusammenhänge zwischen Knochenentwicklung und Defekt oder Material erkennen zu können. Angestrebt wurde daher die zweidimensionale Darstellung von Knochenparametern in ihrem räumlichen Bezug (Distanz und Höhe) zu einem zentralen Ausgangspunkt, in diesem Fall einem Defekt mit eingebrachtem Biomaterial.

4.4.3 Grundlagen der distanzorientierten VpD-Methode

4.4.3.1 Methodische Entwicklung

Die in 4.4.2 visuell beschriebenen Knochenherde unterscheiden sich in ihrer Verteilung innerhalb der Probe sowohl in ihrem Abstand zum Defekt als auch in ihrer Höhe. Das Ziel war die Beschreibung der Trabekelparameter in Bezug auf ihre Höhe und Distanz zum Defekt zusammengefasst in einer zweidimensionalen Darstellung. So kann eine Aussage darüber getroffen werden, ob sich der Knochen abhängig von seinem Abstand zu einem Ausgangspunkt verändert. Für die praktische Entwicklung der Methodik wurden die Dichteparameter der entnommenen Knochenzylinder herangezogen. Dadurch erfolgte die Entwicklung an physiologischem, weitestgehend unbehandeltem Knochengewebe.

Die Schnittbilder der Proben wurden binarisiert und dadurch alle Pixel entweder Hintergrund oder auszuwertendem Material (Knochen) zugeordnet. Ausgehend von der Mitte des Knochenzylinders wurden die Schnittbilder ringförmig aufgeteilt, wobei jeder Ring einen Pixel breit war. Innerhalb des Ringes wurde der Anteil an Knochenpixeln an den Gesamtpixeln bestimmt. Dadurch lässt sich erfassen wie viel Knochen auf einer bestimmten Entfernung pro Schnittbild zu finden ist. Beispielsweise besteht die Probe auf Distanz n zu 50% aus Knochen, wenn der Ring (= Kreisumfang) insgesamt 100 Pixel erfasst, von denen 50 Pixel Knochen und 50 Pixel Hintergrund entsprechen. Diese Berechnung wurde in Pixelschritten für alle Radien bis zum Probenrand durchgeführt (Abb. 17: von der Probenmitte ausgehend größere Kreise). Dadurch werden alle Werte auf einer Entfernung n zu einem Wert zusammengefasst (beispielsweise 100 Pixel gesamt, davon 50 Pixel Knochen = 50%). So ergibt sich für jeden Radius und damit jede Entfernung zum Ausgangspunkt ein Wert. Diese Berechnung erfolgte in den Knochenzylindern je Schnittbild von Beginn bis Ende der Probe. Basierend auf dieser methodischen Grundlage wird die Methodik der Einfachheit halber auch als Value-per-Distance Methode (VpD) bezeichnet.

Unter der Annahme eines kreisrunden Objektes wie in der schematischen Abbildung 17 gibt es einen maximalen Radius, der exakt die Pixel des Probenrandes erfasst. Bei einem anders geformten Objekt werden ab einer Distanz x zur Mitte des Defektes bereits Teile des Kreisumfangs außerhalb der Probe liegen. Der entwickelte Algorithmus stellt die auszuwertenden Pixel nicht als absoluten Wert dar sondern immer anteilig an den Gesamtpixeln des Umfanges die in der ROI_X liegen, welche an dieser Stelle entsprechend verringert wären (siehe 3.4.2.1, Schritt 2 und 4). Das Verhältnis bleibt daher aussagekräftig. Um beurteilen zu können auf wie viel Knochenmaterial der Wert basiert wurde das Makro um eine Kontrollfunktion erweitert. Sie stellt grafisch dar, wie viele Pixel je Distanz innerhalb der Probe (technisch innerhalb der ROI_X) liegen und entsprechend in die Auswertung einbezogen wurden. Diese zusätzliche Kontrolle galt der Absicherung der Funktionalität des entwickelten Makros. Auf die zusätzliche Darstellung der einzelnen Kontrollgrafiken wird im Folgenden verzichtet, da keine die Aussagekraft der Methode schmälernenden Ergebnisse beobachtet wurden. Für die detaillierte Vorgehens-

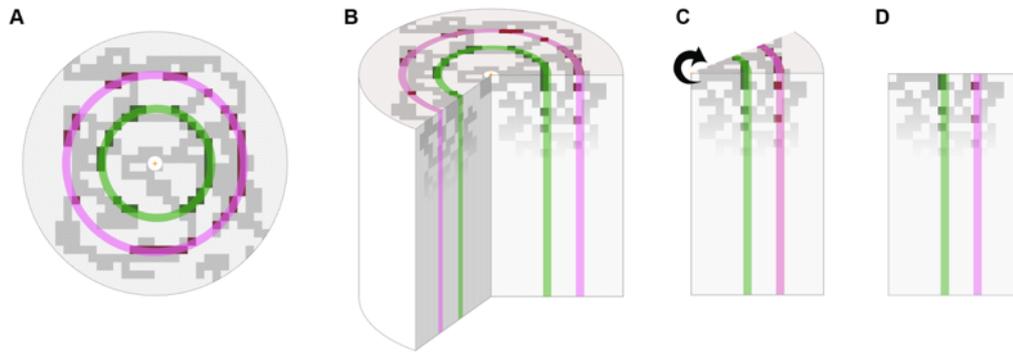


Abb. 17: Grundlage der distanzabhängigen VpD-Darstellung

(A) Aufsicht auf einen schematischen Knochenzylinder. Ausgehend von einem Mittelpunkt werden alle Pixel der gleichen Entfernung betrachtet. Auf dem Umfang von Kreisen mit kleinen Radien n (grün) werden weniger Pixel einbezogen als bei größeren Radien (rosa). Je Distanz n wird der Anteil von Hintergrund- zu Knochenpixeln berechnet. Dies erlaubt eine Aussage über die durchschnittliche Knochenmenge je Entfernung. (B) Schräge Ansicht eines angeschnittenen Knochenzylinders: Die in (A) beschriebene Messung wird in die Tiefe für jedes Schnittbild fortgesetzt. Dadurch wird als zusätzliche Komponente die Höhe in die Auswertung mit einbezogen. (C) und (D): Die Addition der Werte für jede Entfernung n führt zur Zusammenfassung in einer zweidimensionalen Darstellung. Sie beinhaltet die Informationen „Entfernung zum Ausgangspunkt“, „Höhe in der Probe“ sowie den Wert des betrachteten Parameters an dieser Stelle.

weise des entwickelten Makros sei hier auf die methodische Erläuterung unter Punkt 3.4.2.2 verwiesen.

4.4.3.2 Testung der VpD-Methodik an den unbehandelten Knochenzylindern

Da die Ausgangsfrage die Verteilung von Knochentyp A und B aus 4.4.2 darstellte wurde der dort bestimmte Separation Threshold auf die Knochenzylinder angewendet. Anschließend erfolgte die VpD-Auswertung an den zwei resultierenden binarisierten Bildstapeln, einmal mit dem Lower Threshold Bereich, der den weichen Knochen darstellt, sowie dem Higher Threshold Bereich mit dem dichteren Knochen. Das Ergebnis dieser Analyse ist eine zweidimensionale grafische Darstellung der Parameter mit ihrem räumlichen Bezug zum Mittelpunkt der Probe. Um die Verteilung beider Knochentypen in einer Grafik vergleichen zu können wurden die individuellen Grauwertgrafiken als RGB-Bild zusammengefasst und entsprechend farblich codiert. Das nachfolgend dargestellte Bild umfasst demnach sowohl die resultierende Einzelgrafik durch die Anwendung des Lower Thresholds (grün) als auch die des Higher Thresholds (rot).

Die Grafiken A₂-D₂ in Abbildung 18 zeigen die Verteilung von Knochentyp A (rot) und B (grün) im Längsschnitt vier exemplarischer Knochenzylinder. Die Trabekel sind zentral dicht (Knochentyp A) und werden zu den Zwischenräumen von dünnen Schichten Knochentyp B ausgekleidet. Die Verteilung erscheint homogen, Knochentyp A überwiegt gleichmäßig. Die Grafiken A₁-D₁ sind das zugehörige grafische Ergebnis der entwickelten VpD-Darstellungsmethode. Linksseitig befindet sich die Mitte des Knochenzylinders, von wo die Auswertung in den in Pixelschritten größer werdenden Radien erfolgte. Oben

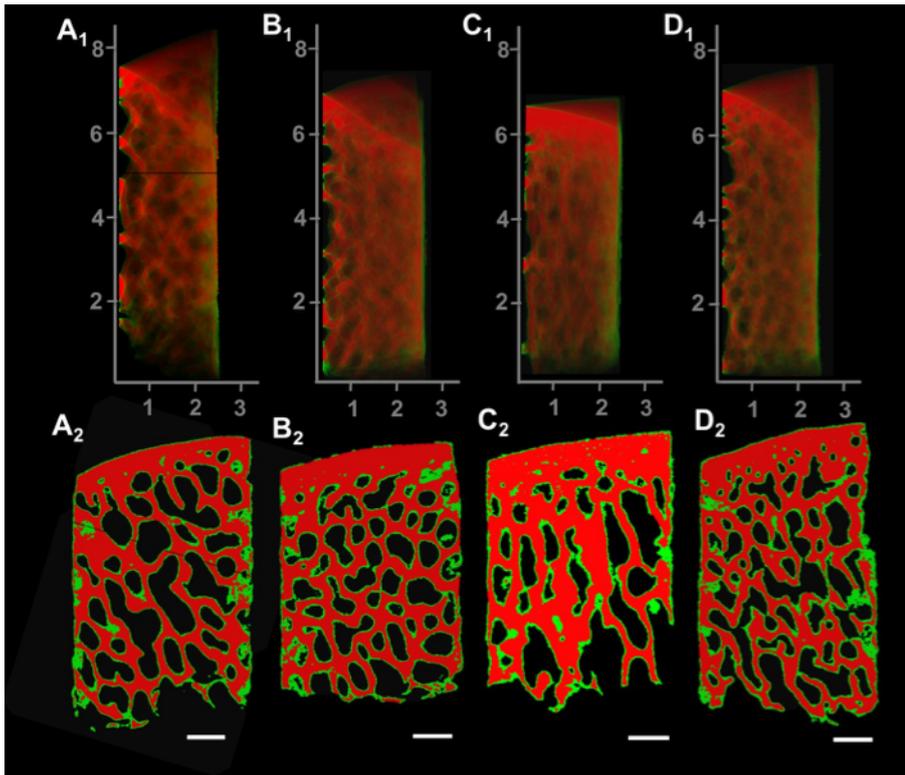


Abb. 18: Grafisches Ergebnis der VpD-Methode

(A₁-D₁) Zweidimensionales grafisches Ergebnis der VpD-Darstellungsmethode an vier beispielhaften Knochenzylindern. Links jeweils Mittelpunkt des Knochenzylinders und Ausgangspunkt der Auswertung. Y-Achse entspricht der Höhe des Knochenzylinders in mm, x-Achse = Distanz zum Ausgangspunkt (mm). Unten exemplarisch zum Vergleich (A₂-D₂) Längsschnitte durch die Knochenzylinder. Färbung: Knochentyp A = rot; Knochentyp B = grün; schwarz = Dichtewerte außerhalb der verwendeten Threshold-Bereiche. Scalebar = 1 mm

entspricht auch hier der Oberfläche des Knochenzylinders. Diese zweidimensionale Darstellung beinhaltet folgende Informationen: (1) Entfernung zur Mitte der Probe, x-Achse, (2) Verteilung in der Höhe der Probe, y-Achse, (3) Menge Knochentyp A, rot und (4) Menge Knochentyp B, grün. Eine hohe Intensität an roten Pixeln entspricht einem Überwiegen von Knochentyp A auf dieser Distanz zum Mittelpunkt. Entsprechend verhält es sich mit Knochentyp B in grün. Je weniger Knochenpixel auf einem Umfang gezählt wurden (rot oder grün), desto höher der Anteil an Hintergrundpixeln (schwarz). Dies ergibt in der Darstellung schwarz (kein Knochen auf diesem Umfang) oder einen schwachen Farbton (wenig Knochen im Verhältnis zu Hintergrund). Die farbliche Intensität spiegelt demnach die Menge an Knochen wider. In den Grafiken A₁-D₁ ist die Verteilung von Knochentyp A und B homogen (analog zur Darstellung in A₂-D₂). Durch das Zusammenfassen der Werte je Entfernung überlagert sich die Darstellung von Trabekeln und Zwischenräume (schwarz/geringe Farbintensität), was zu einer Unschärfe in der Darstellung der trabekulären Struktur führt. Dies ermöglicht eine übergeordnete Beurteilung der Homogenität der Trabekelstruktur, welche in den hier betrachteten Zylindern als

gleichmäßig zu interpretieren ist. Die hohe Intensität von Knochentyp A nahe der Oberkante der Knochenzylinder spiegelt die subchondrale Knochenplatte wider, die sich durch sehr dichten massiven Knochen auszeichnet. Die groß wirkenden Trabekelzwischenräume nahe dem Zentrum der Probe (links) ergeben sich durch die mathematisch bedingte geringe Pixelanzahl auf den Kreisumfängen mit kleinen Radien. Je größer die Entfernung zum Ausgangspunkt desto stärker gemittelt sind die Pixelwerte, da bei größerem Umfang mehr Pixel einbezogen werden.

Eine dünne schwarze Linie in A_2 spiegelt ein computertomographisches Ringartefakt dar, welches sich in genau einem Schnittbild findet. In diesem fehlerhaften Slice wurde weder dichter noch weniger dichter Knochen zugeordnet, der Slice wurde schwarz dargestellt. In A_1 ist analog dazu eine gerade verlaufende, schwarze Linie zu erkennen, die dem Slice in der entsprechenden Höhe entspricht. Dieses eine Ringartefakt kann durch einen Pixeldefekt oder eine Verunreinigung der Detektorplatte entstehen⁴⁰ und hat in dieser Arbeit keinen relevanten Einfluss.

Diese zweidimensionale Darstellung der Parameter (hier Knochentyp A und Knochentyp B, differenziert über die Dichte) ist eine übersichtliche Zusammenfassung von vier Informationen, die eine Aussage über die Verteilung der Parameter in Höhe und Distanz zum Mittelpunkt ermöglicht.

4.4.4 Anwendung und Auswertung anhand der Dichte

Nachdem die Methodik an physiologischem, homogen strukturiertem Knochen entwickelt wurde folgte die Anwendung auf die auszuwertenden Proben. Da die Knochenanteile aller Schnittbilder abzüglich ihres Hintergrundes in die Auswertung einfließen sollten wurde zunächst ein Makro entwickelt, welches den Knochen markiert (Grundlage dieser Entwicklung: siehe 3.4.2.1). Aufgrund der inhomogenen Probenränder war eine manuelle Auswahl des Knochens in jedem Schnittbild (14 Proben zu etwa 1000 Schnittbildern) nicht zu leisten und nicht objektivierbar. Die durch das Makro automatisiert erstellte ROI_X umfasst die gesamte Knochenprobe, schließt kleinere Pixelfehler in der Umgebung aus und kategorisiert Pixel, die nicht Knochen entsprechen (weiß), in „Umgebung“ außerhalb der Probe (wird aus der ROI_X ausgeschlossen) und Trabekelzwischenräumen (wird in die ROI_X eingeschlossen). Zusätzlich wird das Bohrloch erkannt und ebenfalls aus der ROI_X ausgespart.

Anhand der ROI_X wurde anschließend der entwickelte VpD-Algorithmus auf die auszuwertenden Proben angewendet. Die Darstellung erfolgte anhand der visuell deutlichen Unterschiede in zwei Gruppen: Gruppe N (No Osteolysis) zeigt klare Defektränder, die Abgrenzung zum umliegenden Knochengewebe ist scharf und es sind keine deutlichen Umbauprozesse zu erkennen. In Gruppe O (Osteolysis) fällt die Abgrenzung des Defektes schwer, die Knochenstruktur ist nicht homogen und es finden sich Ausbreitungen des Defekts. Diese Einteilung deckt sich nicht vollständig mit der Gruppierung nach Standzeiten wie in der ersten Auswertung, ermöglicht aber eine an die Fragestellung

besser angepasste Darstellung sowie eine Überprüfung der Methodik auf ihre Anwendbarkeit. Um zu untermauern, dass diese Analysemethode nicht nur visuell eindrückliche Ergebnisse ermöglicht sondern auch quantifizierbar ist, wurden die ermittelten numerischen Werte zusätzlich unter Vernachlässigung des Höhenparameters in ein auswertbares zweidimensionales Koordinatensystem übertragen.

4.4.4.1 Deskriptive Auswertung

Die entwickelte Darstellungsmethode ermöglicht einen übersichtlichen Eindruck der räumlichen Verteilung der Trabekelparameter, in diesem Fall von zwei dichteabhängig getrennten Knochentypen (siehe Abb. 19). Auf der x-Achse ist die Entfernung zum Mittelpunkt des ursprünglichen Defekts aufgetragen ($r =$ Radius des Defekts), auf der y-Achse die Höhe in der Probe. Jeder Punkt im Koordinatensystem gibt Aufschluss über die Verteilung von rot und grün markiertem Knochen sowie Hintergrundpixeln (schwarz).

In Gruppe N fällt auf, dass bei allen Proben der ursprünglich hinzugefügte Defekt deutlich zu erkennen ist. Ab einer Entfernung, die mit dem Radius des gebohrten Defekts übereinstimmt, geht entlang einer klaren Kante der radiologisch leere Defekt in Knochengewebe über. Auch die untere Begrenzung des Defektes ist klar abgrenzbar. Das Knochengewebe entspricht überwiegend Knochentyp A (rot). Der weniger dichte grüne Knochen B verteilt sich in geringerer Menge gleichmäßig in der Probe. Areale mit schwächerer Farbintensität beschreiben einen höheren Anteil von Pixeln, die weder Knochentyp A noch B entsprechen und damit dem Hintergrund zugeordnet werden. Hier befindet sich demnach kein Knochen. Dort wo der Knochen porös und die Trabekelzwischenräume entsprechend größer sind ist die Färbung der Probe weniger intensiv. Die stark gefärbten roten Bereiche, die besonders deutlich im gewölbten Oberflächenbereich der Probe zu erkennen sind, decken sich gut mit dem Verlauf der subchondralen Knochenplatte. Diese ist stark mineralisiert und kaum porös. Die Übereinstimmung ist ein Indiz für eine adäquate Auswertung und Darstellung durch die distanzorientierte Methode. In den Bereichen unterhalb der Defekte scheint das Verhältnis zwischen Knochentyp A und B stärker zu Knochentyp B (grün) zu tendieren als in den seitlichen Bereichen (N_1, N_3, N_6). Insgesamt ist die Färbung hier weniger intensiv und die Struktur gröber. Dies lässt größere trabekuläre Zwischenräume ohne Knochen, also eine erhöhte Porosität vermuten. Diese Beobachtung korreliert gut mit der Annahme, dass der Knochen bei zunehmendem Übergang in Spongiosa und Markraum physiologischer weise poröser wird. Die Übergänge und Verteilung von Knochentyp A und B entwickeln sich dennoch gleichmäßig und zeigen insgesamt ein homogenes Bild der Knochendichte.

Diese Annahme wird unterstrichen von den nebenstehenden Darstellungen der Werte im Koordinatensystem. Von Beginn bis Ende des Defektes wurden hier die Werte je Knochentyp gemittelt und abhängig von ihrer Entfernung zum Defekt aufgetragen. Auf der y-Achse findet sich der Anteil von Knochentyp A und B an den insgesamt einbezogenen Werten. Bis zum Rand des Defekts, der sich auch hier deutlich durch den ersten

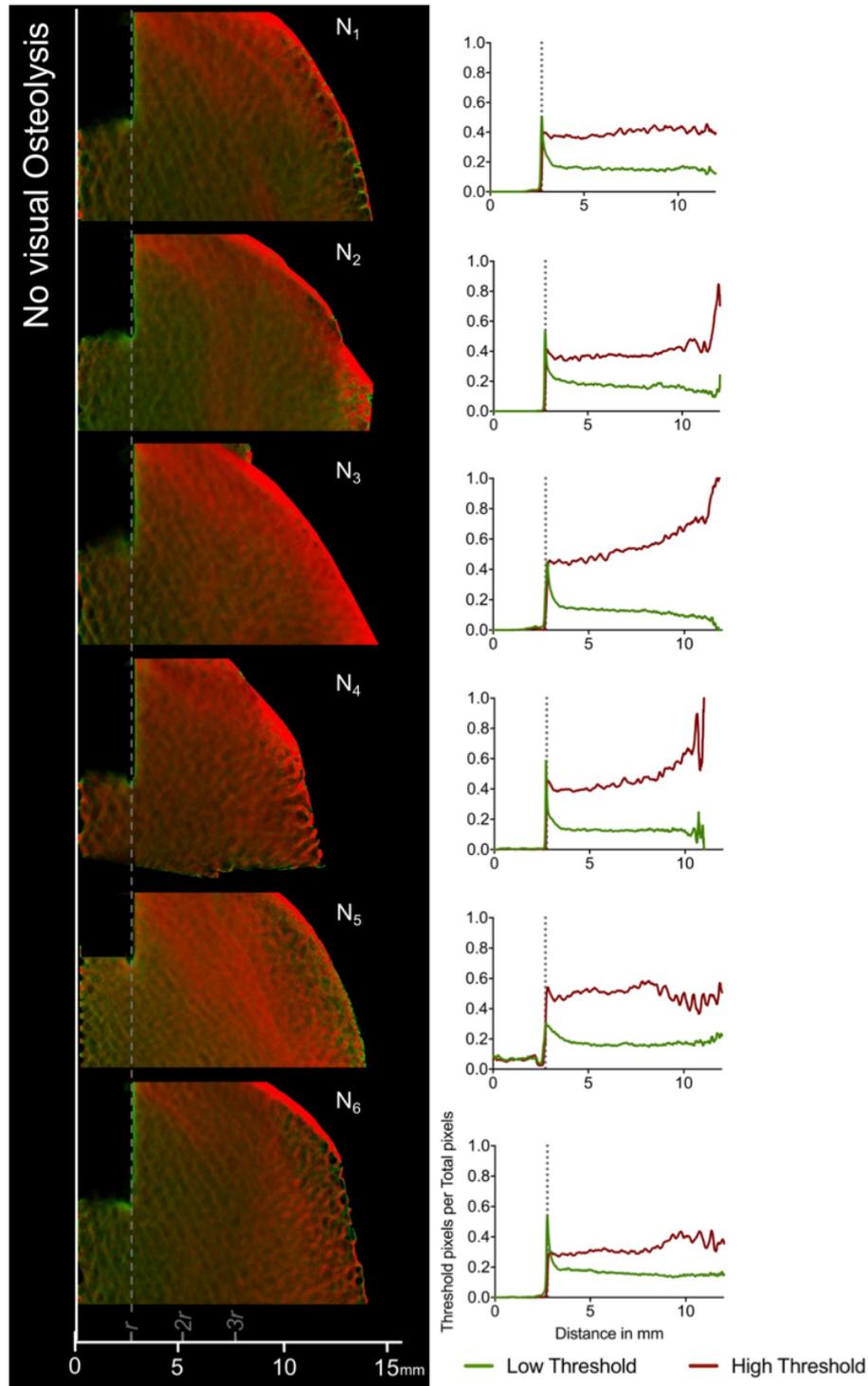


Abb. 19: Ergebnis der VpD-Darstellung ohne sichtbare Umbauprozesse (N_1 - N_6)

Grün = Knochen des Lower Threshold Bereichs. Rot = Knochen des Higher Threshold Bereichs. Schwarz = Pixel außerhalb von Lower und Higher Threshold-Bereich. X-Achse Bild: Distanz zur Mitte des ursprünglichen Defekts. $r = 2,8$ mm (Radius des Defekts). Rechts davon die zugehörige Darstellung der Werte in einem Koordinatensystem, gemittelt über die Höhe von Beginn bis Ende des ursprünglichen Defekts. X-Achse Koordinatensystem: Distanz zur Mitte des ursprünglichen Defekts. y-Achse: Anzahl der Pixel von Knochentyp A (rot) und B (grün) im Verhältnis zur Gesamtzahl an Pixeln in dieser Entfernung. Gestrichelte Linie: Radius des ursprünglichen Defekts.

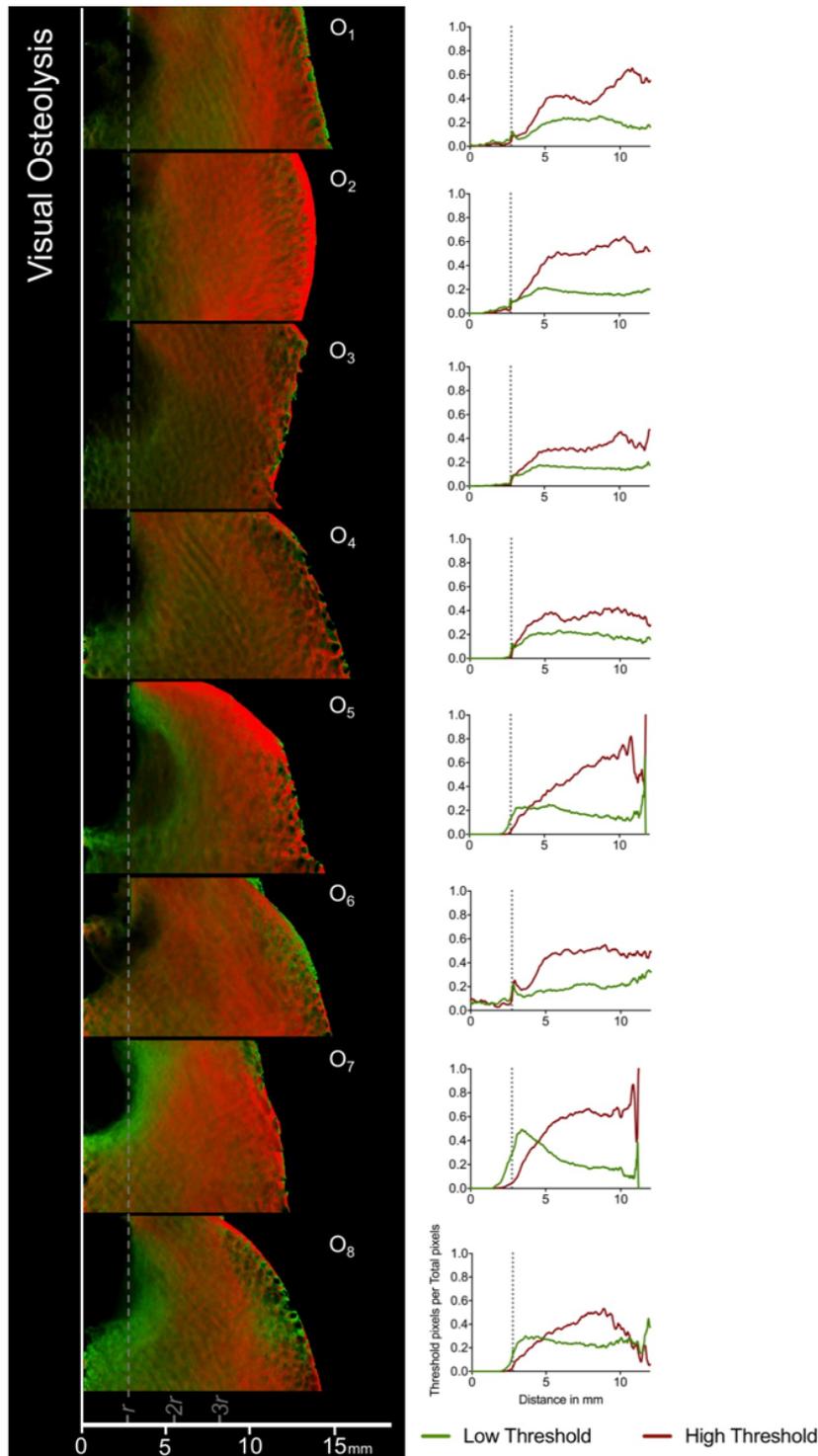


Abb. 20: Ergebnis der VpD-Darstellung mit sichtbaren Umbauprozessen (O_1 - O_8)

Grün = Knochen des Lower Threshold Bereichs. Rot = Knochen des Higher Threshold Bereichs. Schwarz = Pixel außerhalb von Lower und Higher Threshold Bereich. X-Achse: Distanz zur Mitte des ursprünglichen Defekts. $r = 3,8$ mm, Radius des Defektes. Rechts davon die zugehörige Darstellung der Werte in einem Koordinatensystem, gemittelt über die Höhe von Beginn bis Ende des ursprünglichen Defekts. X-Achse Koordinatensystem: Distanz zur Mitte des ursprünglichen Defekts. y-Achse: Anzahl der Pixel von Knochentyp A (rot) und B (grün) im Verhältnis zur Gesamtzahl an Pixeln in dieser Entfernung. Gestrichelte Linie: Radius des ursprünglichen Defekts.

Knochenanstieg erkennen lässt, findet sich nahezu kein Knochen. In der Entfernung zum Mittelpunkt des Defektes, die dem Rand des ursprünglichen Bohrloches r entspricht, findet sich eine große Menge Knochentyp B (grün) sowie gleichzeitig ansteigend aber in etwas geringerer Menge Knochentyp A (rot). Der Peak von Knochentyp B an dieser Stelle ist auch durch die dünne grüne Schicht in der grafischen Darstellung am Rand des Defekts zu erkennen. Dieser kurze steile Anstieg erklärt sich durch die dünne Schicht weniger dichten Knochens, die sich an dieser Stelle aufgrund des klaren Defektrandes summiert. Anschließend lässt sich die homogene Verteilung von Knochentyp A und B an den gleichmäßig verlaufenden Graphen erkennen, die nahezu konstant im gleichen Verhältnis zueinander stehen. Dabei überwiegt der dichte Knochentyp A, was sich mit dem physiologischen Aufbau der Trabekel deckt. Der deutliche Anstieg von Knochentyp A in großer Entfernung zum Defekt (N_2 , N_3 , N_4) lässt sich auch hier mit dem Übergang in die subchondrale Knochenplatte erklären und übereinstimmend in der Grafik wiederfinden. Die Verteilung der Knochenstruktur in Gruppe N ist vergleichbar mit der als physiologisch angenommenen Struktur der Knochenzylinder (Vergleich siehe Abb. 18).

Die Proben der Gruppe O zeigen ein weniger homogenes Bild. Auffällig ist zunächst, dass keine klaren Defektränder zu erkennen sind. In Entfernung r , wo das Ende des gesetzten Defekts lag, geht der leere Knochendefekt nicht in Knochengewebe über sondern erstreckt sich häufig ballonförmig in das umliegende Gewebe. Der zusätzliche Knochenverlust über den Defekt hinaus spricht für eine deutliche Osteolyse, welche auch visuell zu Beginn der Analysen (siehe Abb. 11) in vielen Proben zu erkennen war.

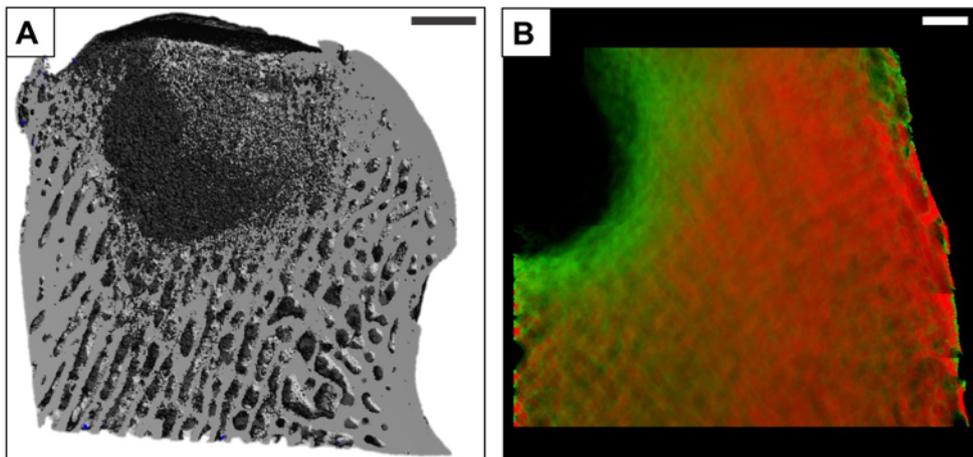


Abb. 21: Vergleich der Darstellung mit CT und distanzorientierter Darstellungsmethode

Deskriptiver Vergleich zweier Darstellungsformen, beispielhaft an sample 12wG3 bzw O_7 (A) 3D-Rekonstruktion mittels μ CT; (B) entwickelte distanzorientierte Darstellungsmethode. Es zeigt sich übereinstimmend eine Ausbreitung des ursprünglichen Knochendefekts und entsprechende deutliche Osteolysen sowohl makroskopisch als auch in der rechten Abbildung mit der zusätzlichen Information über vornehmlich wenig mineralisierten Knochen in der Nähe zum Defekt. Scalebar = 1 mm

In dieser Darstellungsform wird deutlich, in welchem räumlichen Bezug zum Defekt

die Resorptionsvorgänge besonders ausgeprägt waren. Die deutlichsten Knochenrückgänge finden sich dort, wo das Ende des Bohrlochdefekts angenommen werden kann, also in der Tiefe.

Auch die Verteilung von Knochentyp A und Knochentyp B unterscheidet sich von den Proben aus Gruppe N. Hier ist auffällig, dass der Defekt nicht schlagartig in eine homogene Knochenstruktur mit einem ausgewogenen Verhältnis von Knochentyp A und B übergeht wie in Gruppe N, sondern in einigen Proben zunächst in weichen Knochen (grün) (ausgeprägt vor allem in den Proben O₅, O₇ und O₈). Erst in größerer Entfernung zum Defekt stellt sich ein ähnliches Bild ein wie in den Proben aus Gruppe N. Das deutliche Überwiegen von Knochentyp B entspricht den Herden von weichem, potenziell neu gebildetem Knochenmaterial, die es aus Schritt 4.4.1 in ihrer räumlichen Verteilung zu analysieren galt. Deskriptiv kann an dieser Stelle festgehalten werden, dass sich das Auftreten von Herden dieses Knochentyps B, der für weichen, neuen, wenig porösen Knochen stand, auf die Bereiche in unmittelbarer Nähe zum Defekt beschränkt. Ein räumlicher (und in einem nächsten Schritt auch zu diskutierender kausaler) Zusammenhang zum Defekt kann daher angenommen werden.

Die zugehörigen Graphen der Gruppe O unterstreichen die deskriptiven Unterschiede zu Gruppe N. Von der Mitte des Defektes bis zum Seitenrand (Entfernung r) ist auch in Gruppe O kein Knochen zu erkennen. Lediglich in Probe O₇ befindet sich in geringen Menge Knochen vom weichen Typ B (grün) im Defekt. Hier kann ein Einwachsen von neuem Knochen angenommen werden. Im Kontrast zu Gruppe N ist jedoch deutlich, dass der Beginn des Knochengewebes insgesamt in größerer Entfernung zum Defekt einsetzt und geringer ausgeprägt ist. Am Bohrlochrand findet sich kein deutlicher Peak. Insgesamt ist hier die Gesamtknochenmenge im Vergleich zu Gruppe N reduziert. Diese Beobachtungen lassen sich als ausgeprägte Osteolyse zusammenfassen. Das Verhältnis von Knochentyp A zu B ist weniger stark zugunsten von dichtem Knochen verschoben. In den Proben O₅, O₇ und O₈ überwiegt nah am Defekt zunächst sogar der weiche Knochentyp B. Erst in größerer Entfernung zum Defekt stellt sich ein ähnliches Verhältnis wie in Gruppe N ein, was darauf schließen lässt, dass der Knochen in größerer Entfernung zum Defekt eine physiologische homogene Struktur beibehalten hat. Gleichzeitig lässt dies den Schluss zu, dass die deutliche Veränderung der Knochenstruktur auf ihren räumlichen (und wahrscheinlich kausalen) Zusammenhang zum Defekt zurückzuführen ist.

Zusammenfassend ermöglichte die Darstellung der Proben durch die entwickelte VpD-Methode folgende Schlüsse:

- (i) Die Darstellung der Dichteparameter in direktem räumlichen Bezug (Entfernung und Höhe) ist möglich und gibt Aufschluss über die Verteilung eines Parameters in der gesamten Probe
- (ii) Proben ohne erkennbare Umbauprozesse zeigen eine homogene Verteilung der Parameter und einen deutlichen Übergang von Defekt zu Knochengewebe

- (iii) In Proben mit Umbauprozessen visualisiert die Darstellung direkt den räumlichen Bezug von Osteolysen und das Verhältnis von Knochentyp A und B bezogen auf die Entfernung zum Defekt.
- (iv) Die in 4.4.1 angestrebte Aussage über die räumliche Verteilung der auffälligen Knochenherde konnte so visuell bezogen auf die Knochendichte getroffen werden.

4.4.4.2 Quantitative Analyse der Graphen

Die visuelle Interpretation der Ergebnisse der VpD-Darstellung lässt die Vermutung zu, dass sich Knochentyp A und B in Gruppe O anders verteilen als in Gruppe N. Um diesen Eindruck quantitativ zu belegen und damit die Aussagekraft der Darstellungsmethode zu validieren wurden die Werte zusätzlich statistisch ausgewertet.

HYPOTHESEN Es galt folgende Hypothesen aus der deskriptiven Analyse zu überprüfen:

- (a) In Gruppe O findet sich in der Nähe des Defekts weniger Knochen als in Gruppe N (Osteolyse)
 - (i) Nebenhypothese: Es ist sowohl weicher Knochen (Typ B) als auch dichter Knochen (Typ A) vermindert.
- (b) Das Verhältnis von Knochentyp A und B ist in Gruppe O nah am Defekt zugunsten Typ B verschoben.
- (c) Mit zunehmender Distanz zum Defekt nähern sich die Dichtewerte beider Gruppen wieder einander an.

METHODISCHES VORGEHEN Nach dem Schema in Abbildung 22 wurden in verschiedenen Entfernungen zum Defekt (x-Achse) die y-Werte für Knochentyp A (High Threshold Bereich) und Knochentyp B (Low Threshold Bereich) erhoben.

Für die Überprüfung von Hypothese a) wurde die Gesamtknochenmenge je x-Wert durch die Summierung der y-Werte beider Knochentypen berechnet. Die Menge von weichem Knochen (y_1) addiert zur Menge an hartem Knochen (y_2) ergibt die Gesamtmenge des Knochens in dieser Entfernung x . Für die Beantwortung der Nebenhypothese wurden die Werte für weichen und harten Knochen einzeln erhoben. Je Gruppe (O und N) wurden die Werte gemittelt und mit dem Mann Whitney U-Test verglichen.

Für die Überprüfung von Hypothese b) wurde nach gleichem Schema an den gleichen x-Werten der Quotient zwischen Knochentyp A (rot) und Knochentyp B (grün) gebildet. Ein Wert < 1 bedeutet ein Überwiegen von Knochentyp B (weich, grün), bei einem Wert > 1 überwiegt Knochentyp A (dicht, rot). Auch hier wurden die Werte je Gruppe gemittelt und die Gruppen O und N über den Mann Whitney U-Test verglichen.

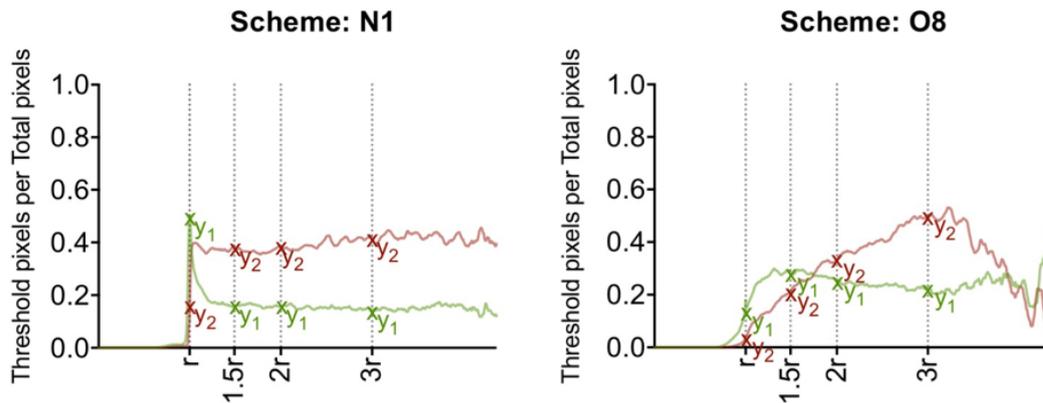


Abb. 22: Schematische Darstellung der mathematischen Berechnung der Graphen

N_1 = exemplarischer Graph aus Gruppe N; O_8 = Exemplarischer Graph aus Gruppe O. x-Achse: Distanz zur Mitte des Defektes, r = Radius des ursprünglichen Defekts; grün = Lower Threshold Knochen; rot = Higher Threshold Knochen; Je x-Wert (r ; $1,5r$; $2r$; $3r$) Erhebung der zugehörigen y-Werte von weichem und hartem Knochen (grün = y_2 , rot = y_1)

Hypothese c) wurde durch den Vergleich der x-Werte überprüft: Je größer die Entfernung zum Defekt, desto weniger signifikante Unterschiede wurden erwartet. Die Werte sind in Tabelle 3 dargestellt.

ERGEBNISSE Der Parameter „Summe“ beschreibt die Gesamtmenge an Knochen je x-Wert anteilig an allen einbezogenen Pixeln. Die Hypothese aus der deskriptiven Beschreibung der Graphen war, dass in Gruppe O nahe dem Bohrloch die Knochenmenge im Vergleich zu Gruppe N reduziert ist, da hier Osteolysen erkennbar waren. Der statistische Vergleich der Gruppen zeigt, dass direkt an der Grenz des Defektes in Gruppe O tatsächlich signifikant weniger Knochen gemessen wurde als in Gruppe N ($p = 0.0009$). Dieses Ergebnis deckt sich mit der visuellen Einschätzung der Grafiken und Koordinatensysteme. Bei zunehmender Entfernung zum Defekt nimmt der Unterschied zwischen den Gruppen ab. Obwohl ab Distanz von $1,5r$ kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen bestand zeigen die Mediane einen Trend, der die ursprünglichen Hypothesen unterstützt: Während der Mean der Gruppe N (visuell homogenes Knochenbild) von $1,5r$ bis $3r$ nahezu konstant bleibt nimmt die Knochenmenge in Gruppe O über die gleiche Distanz stetig zu. Der Vergleich der Mean Werte zeigt demnach eine Entwicklung der Werte von Gruppe O von signifikanter Osteolyse an $1r$ bis hin zu Annäherung an die konstanten Werte von Gruppe N bei einer Entfernung zum Defekt von $3r$.

Der Quotient zwischen Knochentyp A und B beschreibt das Verhältnis der Knochenanteile. Am Rand des Bohrloches (r) liegt kein signifikant unterschiedliches Verhältnis der Knochentypen vor. Dies lässt sich vor allem durch den hohen Peak von Knochentyp B erklären, der in Gruppe N durch die klare Bohrlochkante entsteht, aber in direkter Nachbarschaft sofort wieder abfällt. Aussagekräftiger ist daher der Vergleich in etwas

Tab. 3: Auswertung der Graphen der distanzorientierten Darstellungsmethode

		Summe (y_2+y_1)	Quotient (y_2/y_1)	Knochentyp A	Knochentyp B
1r	Mean O	0.165	0.319	0.038	0.127
	SEM (n=8)	0.034	0.056	0.009	0.028
	Mean N	0.590	0.410	0.163	0.427
	SEM (n=6)	0.064	0.111	0.045	0.049
	p	0.000	0.449	0.008	0.000
		*	ns	**	***
1.5r	Mean O	0.456	1.338	0.248	0.208
	SEM (n=8)	0.049	0.141	0.017	0.036
	Mean N	0.553	2.438	0.389	0.164
	SEM (n=6)	0.029	0.253	0.030	0.010
	p	0.148	0.002	0.001	0.317
		ns	*	***	ns
2r	Mean O	0.630	1.939	0.412	0.218
	SEM (n=8)	0.036	0.162	0.029	0.014
	Mean N	0.570	2.754	0.416	0.154
	SEM (n=6)	0.028	0.290	0.031	0.008
	p	0.240	0.023	0.935	0.004
		ns	*	ns	**
3r	Mean O	0.670	2.588	0.479	0.192
	SEM (n=8)	0.038	0.291	0.038	0.012
	Mean N	0.593	3.195	0.450	0.143
	SEM (n=6)	0.040	0.368	0.041	0.006
	p	0.192	0.214	0.624	0.007
		ns	ns	ns	**

Links x-Werte r bis $3r$ mit Mean und SEM je Gruppe. Oben die vier betrachteten Parameter „Summe“, „Quotient“, „Knochentyp A“ und „Knochentyp B“. p -Wert resultiert aus dem Vergleich von Gruppe O und N je Parameter und Entfernung zum Defekt (x-Wert) anhand des Mann-Whitney-U. ns = nicht signifikant; Hauptparameter (Summe und Quotient) Signifikanzniveau 2,5%, * = $p < 0.025$; Nebenparameter (Knochentyp A und B) Signifikanzniveau 5%: * = $p < 0.5$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$

größerem Abstand zum Defekt. Bei einer Distanz von $1,5r$ zum Defekt überwiegt in beiden Gruppen Knochentyp A (Mean > 1). Dennoch ist der Unterschied zwischen Gruppe N und O signifikant, da der prozentuale Anteil von weichem Knochentyp B in Gruppe O deutlich erhöht ist. Dies deckt sich mit der Beobachtung, dass in einigen Grafiken der Gruppe O am Rand der Osteolysen zunächst weicher (grüner) Knochen zu finden ist. Im Abstand von $2r$ ist der p -Wert ebenfalls signifikant, der grüne Knochen ist anteilig stärker vertreten als in Gruppe N. Die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Gruppen nimmt über die Entfernung zum Bohrloch ab (siehe p -Werte für $1,5r$, $2r$ und $3r$). Dies lässt die Vermutung zu, dass Knochentyp A mit zunehmender Distanz zum Defekt wieder zunimmt. Bei einer Entfernung von $3r$ liegt kein signifikanter Unterschied mehr vor, die beiden Gruppen zeigen in diesem Abstand zum Bohrloch eine ähnliche

Verteilung von hartem und weichem Knochen. Der Trend in Gruppe O basiert demnach auf einem zugunsten des weichen Knochen verschobenen Verhältnis von Knochentyp A und B, welches sich mit zunehmender Entfernung an die Werte von Gruppe N anpasst (Hypothese c).

Bezüglich der Nebenhypothesen findet sich in Gruppe O eine signifikante Reduzierung von Knochentyp A in der Nähe des Defekts. Dies ergänzt sich mit den Grafiken, die nahe des Defektes einen Verlust an Knochen, insbesondere an Knochentyp A visualisieren. Mit zunehmender Entfernung zum Defekt gleicht sich auch hier Gruppe O den Werten aus Gruppe N an (ab $2r$ kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen).

Knochentyp B ist in Gruppe O unmittelbar am Rande des Defekts im Vergleich zu Gruppe N signifikant erniedrigt (analog zur visuellen Osteolyse). Im Abstand von $1.5r$ ist Knochentyp B in Gruppe O und N ähnlich stark vertreten. Interessanterweise findet sich mit zunehmender Entfernung zum Defekt ($2r$ und $3r$) in Gruppe O eine signifikant höhere Menge an Knochentyp B als in Gruppe N. Diese Entwicklung ist aus der Betrachtung der Grafiken nur zu vermuten und kann in einem kausalen Zusammenhang mit dem erhöhten Umbauprozess diskutiert werden. Die Auswertung der Haupthypothesen basiert auf einer Kombination der Parameter der Nebenhypothesen und stellt komplexere Zusammenhänge dar.

Insgesamt zeigt die statistische Auswertung der distanzorientierten Analyseverfahren, dass diese die deskriptiv gewonnenen Eindrücke auch quantitativ unterstützen kann. Der visuell gewonnene Eindruck der Osteolyse und des erhöhten Anteils von Knochentyp B in nahem Bezug zum Defekt in Gruppe O wurde durch die signifikanten Unterschiede in Summe und Quotient gefestigt. Auch die Annahme, dass sich die Knochenstruktur der beiden Gruppen mit zunehmendem Abstand zum Defekt wieder ähnlicher wird kann durch die distanzabhängige Abnahme der signifikanten Unterschiede und unter Einbeziehung der Median-Entwicklung bestätigt werden. Lediglich die Entwicklung von Knochentyp B ist in beiden Gruppen auch im größten betrachteten Abstand zum Defekt unterschiedlich. Da dieser Parameter aber auch in den Kontext der Betrachtung von Summe und Quotient eingeht, welche in ihrer Auswertung das erwartete Bild ergänzen, widerspricht er der Tauglichkeit der Analyseverfahren in keiner Weise und muss kausal diskutiert werden.

Die quantitative Auswertung galt in erster Linie der Überprüfung der visuell erhaltenen Informationen und damit der Zuverlässigkeit der entwickelten Darstellungsmethode. In der grafischen Darstellung kann die gesamte Probe bis zu ihren Rändern einschließlich der zusätzlichen Dimension der Höhe betrachtet werden. Es entfällt die Reduktion auf die vier ausgewählten x-Werte und die Vernachlässigung der Höhe in der statistischen Auswertung des Koordinatensystems, welches nur drei Dimensionen abbildet. Um einen Eindruck der räumlichen Verteilung von Parametern in der Probe zu erhalten ist die visuelle Darstellung daher eine intuitive und übersichtliche Methode mit großem Erkenntnisgewinn durch die kombinierte Darstellung von vier Informationen.

4.4.5 Übertragbarkeit der VpD-Methode auf weitere Parameter

Die neu entwickelte Methodik der distanzorientierten Darstellung lässt sich prinzipiell auf zahlreiche weitere Trabekelparameter anwenden. Im vorherigen Abschnitt wurde sie anhand der Dichtewerte demonstriert. Grundsätzlich ermöglicht der Algorithmus jedoch, jeden Parameter in seinem räumlichen Bezug zu einem zentralen Defekt oder Implantat darzustellen. Die Auswertung mehrerer Parameter und die inhaltliche Verknüpfung ihrer Verteilungsmuster kann einen deutlich über die Auswertung einzelner Parameter hinausgehenden Erkenntnisgewinn ermöglichen. Um diesen abschließend zu demonstrieren wurde die Methodik exemplarisch auf einen weiteren Trabekelparameter angewendet.

4.4.5.1 Methodische Grundlage der Auswertung anhand der Trabekelzwischenräume

In den hier zugrundeliegenden Proben ließen sich die visuell auffälligen Knochenherde anhand verschiedener Charakteristika in Knochentyp A und B unterteilen (4.4.1). Zunächst erfolgte eine Analyse der räumlichen Verteilung der Knochendichte. Die beiden ausgewählten Knochentypen unterschieden sich jedoch neben ihrer Dichte visuell auch in ihrer Trabekelstruktur. Knochentyp B zeichnete sich durch weichen Knochen mit vielen sehr kleinen Trabekelzwischenräumen aus. Knochentyp A zeigte dichte, lange Trabekel mit wenigen, großen Trabekelzwischenräumen (Abb. 14).

Ein gering mineralisierter Knochen kann grundsätzlich durch zwei Vorgänge begründet sein: Osteolytische Prozesse reduzieren die Knochendichte, ein im Abbau befindlicher Knochen weist demnach eine geringere Knochendichte auf. Aber auch junger, neu gebildeter Knochen stellt sich zunächst weich dar, da er erst im Verlauf zunehmend mineralisiert. Inhaltlich ist hier eine Differenzierung zwischen Knochenaufbau und Knochenabbau von fundamentalem Interesse. Um in den Arealen mit verminderter Knochendichte aus der Auswertung in 4.4 zwischen Knochenabbau und Knochenaufbau zu unterscheiden können die Dichtewerte mit weiteren charakteristischen Trabekelparametern in Zusammenhang gesetzt werden. Da sich die beiden Knochentypen neben der Dichte auch in ihrer Porenverteilung unterschieden wurde im Folgenden die distanzorientierte Methodik auf die Darstellung der Trabekelzwischenräume angewendet.

Die Auswertung der Trabekelzwischenräume (Poren, Spacing) mit gängigen Programmen wie dem Scanco oder Fiji erfolgt häufig durch die Bildung eines Mittelwerts für das Volumen einer ROI, welches nicht von Knochen gefüllt und daher als Trabekelzwischenraum definiert wird. Dabei kann es irrelevant sein, ob dieser Wert durch viele kleine Trabekelzwischenräume zustande kommt oder durch wenige große. Da die Abgrenzung der Knochentypen A und B jedoch visuell neben der variierenden Dichte maßgeblich auf der Anzahl der Knochenporen basiert, wurde eine eigene Überlegung der Auswertung zugrunde gelegt. Zunächst wurden durch die Funktion *Find edges* in Fiji die Trabekel in jedem Schnittbild einer Probe umrandet, sodass nur die Grenzen der Trabekel, nicht aber ihre Inhalte abgebildet wurden. Alle Schnittbilder aller Proben wurden so markiert.

Auf die analog zu Abbildung 23 entstandenen Datensätze wurde erneut die VpD-

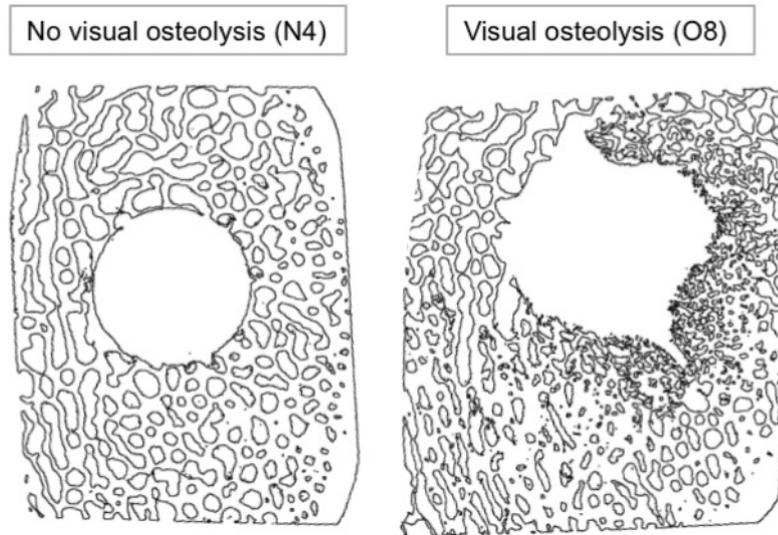


Abb. 23: Beispielhafte Darstellung der umrandeten Trabekel

Im Vergleich je ein Schnittbild von Probe N_4 sowie O_8 mit unterschiedlicher Homogenität der Trabekelstruktur.

Methodik angewandt. Ausgewertet wurde in diesem Fall der Anteil von schwarzen Pixeln bezogen auf die Gesamtpixel je Distanz r zum Zentrum des Defektes. Unter Berücksichtigung der zugrunde liegenden Überlegung und Markierung der Proben entspricht hier jeder schwarze Pixel einem Übergang von einem Trabekel zu einem Trabekelzwischenraum. Viele schwarze Pixel entsprechen demnach häufigeren Übergängen, und diese wiederum einer erhöhten Anzahl von Knochenporen - unabhängig von ihrer Größe. Diese Darstellung ermöglicht den Rückschluss auf die Porenanzahl in Abhängigkeit von der Entfernung zum Defekt. Die erstellten 2D-Bilder wurden anhand ihrer Grauwerte eingefärbt.

4.4.5.2 Auswertung der Anwendung auf Trabekelzwischenräume

Die in Abbildung 24 dargestellten Ergebnisse spiegeln das Verhältnis von Übergängen von Knochen zu Trabekelzwischenraum wider und ermöglichen so eine Aussage über die relative Anzahl von Poren je nach Abstand zum Defekt. Die Anwendung von Heatmaps ermöglicht eine bessere visuelle Differenzierung der Werte. Helle Farbtöne gehen mit einem hohen, dunkle Farbtöne mit einem geringen Anteil an Poren einher. In dieser Abbildung entsprechen beispielsweise schwarze Pixel 0% Übergängen und weiße Pixel 100%. Letzteres beschreibt einen Wechsel von Hintergrund zu Trabekel mit jedem Pixel dieses Umfanges.

In den Proben der Gruppe N zeigt sich überwiegend in Nähe zum Defekt eine höhere Anzahl an Knochenporen als in der Peripherie. Diese Beobachtung deckt sich mit der Physiologie des makroskopischen Knochenaufbaus: Die Corticalis, die besonders in N_1 , N_3 sowie N_4 an der Außenseite der Proben hervortritt, ist charakteristischerweise stark

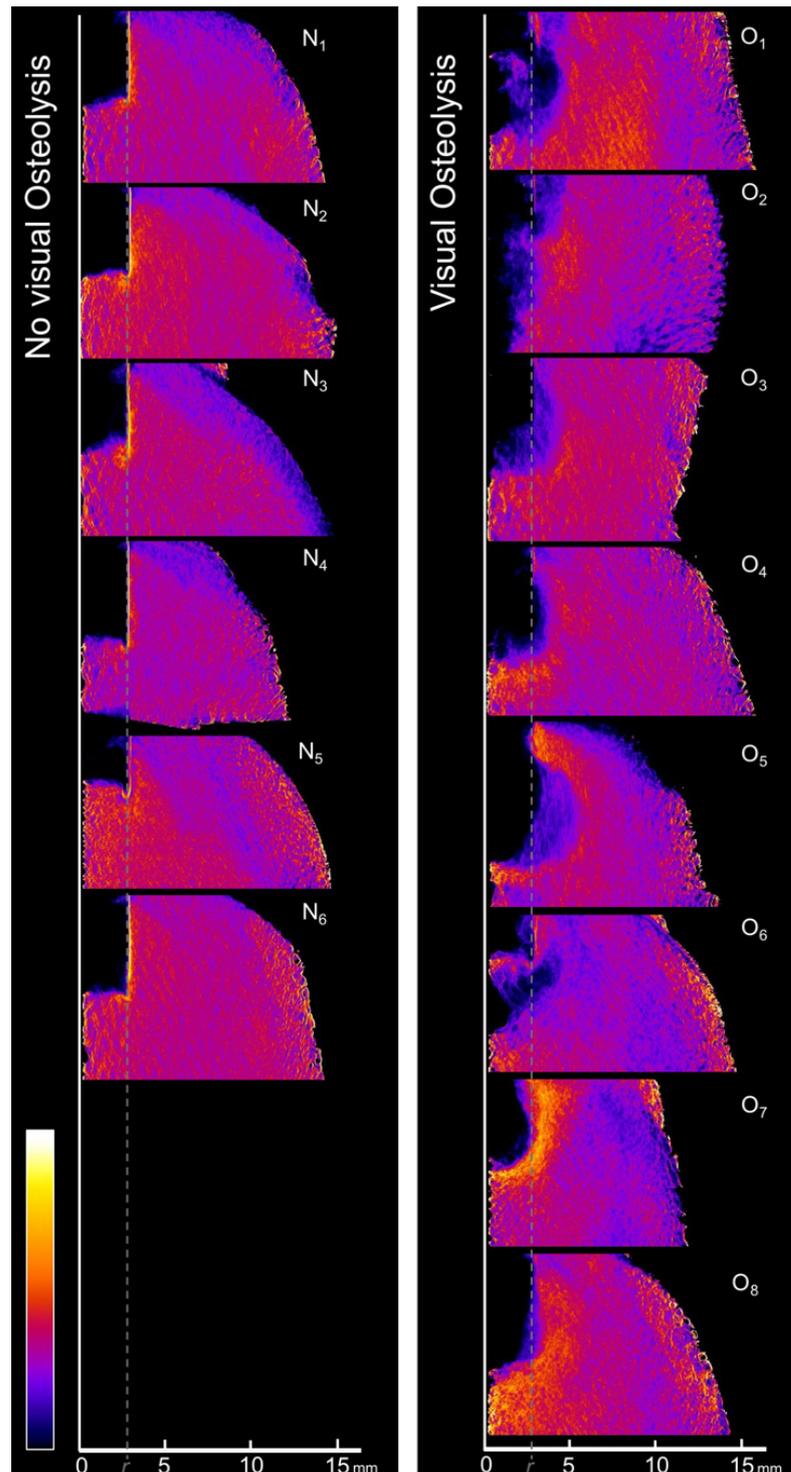


Abb. 24: Distanzorientierte Darstellung der Anzahl der Übergänge von Trabekel zu Pore
 Darstellung der Porenanzahl (Anteil der Übergänge von Trabekel zu Pore an der Gesamtheit der Pixel) je Distanz zum Bohrlochdefekt. Links (N_1 - N_6) Proben ohne visuell erkennbare Umbauprozesse. Rechts (O_1 - O_8) Proben mit erkennbaren Umbauprozessen. $r = 2,8$ mm (Radius des Defekts). Eine höhere Übergangszahl entspricht mehr Poren. Die exakte Anzahl der Poren hängt allerdings von Radius und Voxelgröße ab und müsste explizit berechnet werden. Auf einem kleineren Radius entspricht die gleiche Anzahl an Übergängen weniger Poren als auf einem größeren Radius. Dies ist sinnvoll, da hier auch eine längere Strecke betrachtet wird. (Farbkodierung: schwarz = 0% Übergänge, weiß = 100% Übergänge: Letzteres würde bedeuten, dass aneinandergrenzende Pixel auf dem entsprechenden Radius nie die gleiche Farbe haben)

mineralisiert und wenig porös (hier kongruent zu der dunklen Färbung). Die von Knochenmark gefüllte und daher poröse Pars spongiosa unterhalb der Corticalis wird durch die etwas hellere Färbung markiert. Diese unterschiedliche Werteverteilung in Gruppe N lässt sich demnach physiologisch begründen und erscheint visuell unabhängig von den zugefügten Defekten.

In den Proben O₁ bis O₃ (Abb. 24) deckt sich die erkennbare Zunahme des Bohrlochdefektes mit den Ergebnissen der makroskopischen sowie dichte-basierten VpD-Auswertung. Die Proben O₁ bis O₄ zeigen angrenzend an den Defekt eine überwiegend geringe Anzahl an Poren (dunklere Färbung). Auf der technischen Grundlage der Auswertung kann dies entweder durch wenige kleine Poren in dichtem Knochen oder durch wenige große Poren in weniger dichtem Knochen zustande kommen. Eine konkrete inhaltliche Zuordnung kann durch die Verknüpfung mit der dichteabhängigen Auswertung erreicht werden.

4.4.5.3 Verknüpfung der Auswertung anhand Dichte und Trabekelzwischenräumen

Insbesondere die Proben O₇ und O₈ weisen in ausgewählten Bereichen in Defektnähe eine hellere Färbung und somit einen erhöhten Porenanteil auf. Unter Hinzuziehung der distanzabhängigen Dichteparameter lässt sich folgende Übereinstimmung erkennen:

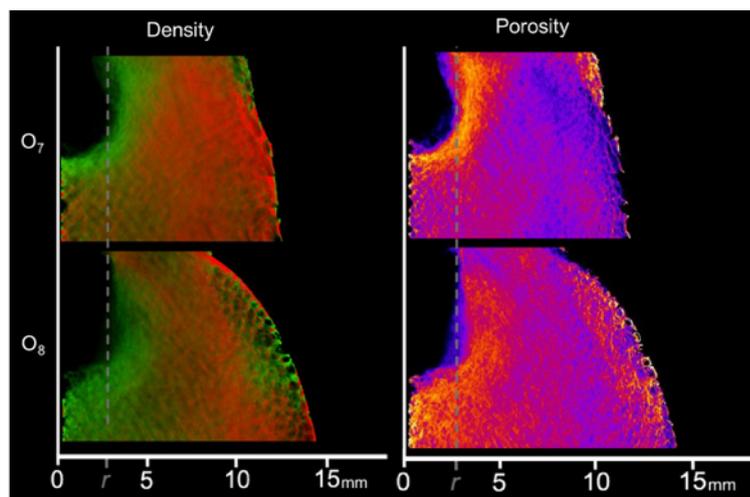


Abb. 25: Vergleich Dichte und Porenanteil in der VpD-Darstellung

Exemplarischer Vergleich der distanzorientierten Darstellung mit den Parametern Dichte und Porenanteil anhand der Proben O₇ und O₈. Farbliche Codierung jeweils analog zu Abb. 19 und 24

In Abbildung 25 wird die VpD-Auswertung mit Dichtewerten der Auswertung der Trabekelzwischenräume anhand zweier exemplarischer Proben gegenüber gestellt. Die in der Dichteauswertung überwiegend grünen Bereiche fielen insbesondere in den Proben mit deutlicher Osteolyse auf und repräsentieren wenig mineralisierten Knochen. Die gleichen Bereiche weisen in der Auswertung der Trabekelzwischenräume einen auffällig erhöhten Anteil an Poren auf. Die inhaltliche Verknüpfung beider Auswertungen ermöglicht hier eine deutliche Abgrenzung dieser Bereiche vom restlichen Knochengewebe.

Sie definieren sich durch (1) wenig mineralisierten und (2) von vielen kleinen Poren durchsetzten Knochen. Rückblickend auf Absatz 4.4.1 decken sich diese Bereiche mit den visuell beschriebenen Knochenherden vom Typ B, welcher sich hier übersichtlich in seinem Bezug zum Defekt darstellen und nach verschiedenen Parametern aufschlüsseln lässt.

FAZIT Die Distanzorientierte Darstellung verschiedener Knochenparameter ermöglicht die Charakterisierung einzelner Knochenherde in ihrem Bezug zum Defekt. Zunächst wurden die zu Beginn makroskopisch auffälligen Knochenherde und Osteolysen durch die Dichtemessung in Bezug zum Defekt gesetzt. Die räumliche Verteilung der Dichte zeigte insbesondere in Proben mit deutlicher Osteolyse Bereiche mit überwiegend weichem Knochen. Diese Herde ließen sich a) durch eine progrediente Auflösung und Demineralisierung oder b) durch eine Neubildung von noch wenig mineralisiertem Knochen erklären, ließen allerdings in jedem Fall einen Einfluss des Defekts auf das umliegende Gewebe vermuten. Für die Untersuchung des Effekts von Implantaten auf die Knochenheilung ist eine Aussage darüber, ob es sich um Knochenneubildung oder Osteolysen handelt, bedeutend. Die Kombination zweier durch die VpD-Methode dargestellter Knochenparameter (hier Dichte und Porenanteil) ermöglichte eine entsprechende weitere Zuordnung: Aufgrund der Verteilung der Poren in diesem weniger mineralisierten Knochen kann (1) eine verminderte Knochendichte mit wenigen, großen Poren einem Trabekelverlust im Rahmen eines Knochenabbaus zugeordnet werden, wohingegen (2) gering mineralisierte Herde mit zahlreichen kleinen Poren eher jungem, neu gebildeten und (noch) nicht vollständig mineralisiertem Knochen entsprechen.⁶⁷

Die VpD-Methode ermöglicht bereits einen hohen Erkenntnisgewinn, wenn nur ein Parameter in seinem räumlichen Bezug zum Defekt oder Implantat ausgewertet wird. Die Anwendung auf weitere Parameter und ihre anschließende inhaltliche Verknüpfung kann jedoch noch weit darüber hinausgehen. In diesem Fall konnten gering mineralisierte Bereiche klar einer Osteolyse oder Knochenneubildung zugeordnet und so der Einfluss des Implantats auf den Knochen deutlich besser ausgewertet werden.

5. DISKUSSION

Eine zunehmende Prävalenz und volkswirtschaftliche Relevanz von Erkrankungen des Bewegungsapparates, allen voran der Osteoporose, führte seit den 90er Jahren zu zahlreichen Untersuchungen, die sich mit der knöchernen Mikroarchitektur als Komponente der Knochenqualität beschäftigen.^{19,20,35,69}

Stetig weiter entwickelte radiologische Bildgebungsverfahren ermöglichen mittlerweile eine qualitativ hochwertige Beurteilung einzelner Trabekelparameter und erlauben Aussagen über die Qualität der Knochenstruktur.^{4,10,13,35,36,38,43,44,46,47} Dies spielt neben Studien in der Osteoporoseforschung auch bei zahlreichen therapeutischen Ansätzen eine wichtige Rolle, beispielsweise bei der Implantation von Prothesen, Osteosynthesematerialien wie Schrauben oder medikamentösen Ansätzen mit Einfluss auf die Knochenstruktur.^{31,33,57,59,60,68,70}

5.1 Limitationen in der Auswertung von definierten Arealen

Die Definition einer geeigneten Messregion ist für die Analyse der Knochenstruktur von großer Bedeutung, da ihre Auswertung einen inhaltlichen Bezug zur Fragestellung erlauben muss. Grundsätzlich werden in vielen Studien Knochenparameter mit einem räumlichen Bezug zu einem Implantat, einem Defekt oder einem Belastungspunkt ausgewertet, um die möglichen Kausalzusammenhänge zwischen Eingriff und Einfluss auf die Knochenstruktur zu untersuchen.^{31,33,67,68,71,72} Hier bietet sich bei zahlreichen Fragestellungen die Auswertung der Knocheneigenschaften innerhalb definierter Regions of Interest (ROIs) an, die in den radiologischen Bilddaten markiert werden.^{15,36,73} Die Form einer ROI ist individuell bestimmbar und kann je nach Fragestellung die gesamte Probe umfassen oder einzelne Teilbereiche, die einen Vergleich ermöglichen. In den dieser Studie zugrundeliegenden Proben wurde beispielsweise der Knochen innerhalb des zugefügten Defektes ausgewertet, indem die ROI genau an den zylindrischen Defekt angepasst wurde. Dieses Vorgehen ist simpel und elegant, da die ROIs vergleichbar und reproduzierbar definiert werden können und genau der Bereich ausgewertet wird, auf den sich die Fragestellung bezieht.

Eine Auswertung der Knochenstruktur durch ROIs ist jedoch nicht bei jeder Fragestellung und Probenbeschaffenheit zielführend. In der hier zugrundeliegenden Studie limitierte die Form der Proben die Größe und Anzahl zylindrischer vergleichbar platzierter ROIs. Hierdurch konnten die visuell auffälligen Areale nicht mit räumlichem Bezug zum Defekt in die Auswertung einbezogen werden. Eine weitere Hürde ist die Definierung von auszuwertenden Arealen, wenn die Bereiche von besonderem Interesse in einer Probe vorab unbekannt sind. Makroskopische Auffälligkeiten in einer Probe ohne erkennbares Muster sind dementsprechend ebenfalls schwer erfassbar. Eine viel diskutierte Eigenschaft der Auswertung innerhalb von ROIs ist die Darstellung der Trabekelparameter

als Mittelwert in diesem Volumen. Während dies für die Bestimmung der Knochenmenge innerhalb eines Defekts sehr sinnvoll ist können kleinere lokale Unterschiede verloren gehen, wie auch Freeman et al zeigten.⁶⁷ Sie konnten visuell unterschiedliche Regionen von Knochenneubildung innerhalb einer ROI erkennen, dies aber in den Werten nicht ablesen.⁶⁷ Ein Areal starken Knochenneubaus sowie Osteolysen an anderer Stelle innerhalb der ROI vermitteln in der Auswertung den Eindruck, es haben keine Veränderungen stattgefunden. Xu et al beschrieben außerdem in ihrer Scaffoldstudie den Nachteil, dass mit einzelnen wenigen ROIs zwar eine Erhebung der Knochenparameter möglich ist, aber innerhalb dieser keine Aussage über ihre räumliche Verteilung getroffen werden kann.⁷¹ So fanden Xu et al zwar mit der Zeit eine stetige quantitative Zunahme an Knochenneubildung in ihrer ROI, konnten jedoch ein vermehrtes Auftreten am Grund des Defekts nur visuell beschreiben.²⁵ Die Auswahl der richtigen Größe und Platzierung einer ROI hat daher einen großen Einfluss auf die Aussagekraft und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Wirth et al führten beispielsweise ihre im Vergleich zu anderen Studien signifikant stärkere Korrelation von Knochendichte und Schraubenstabilität vor allem auf die bessere Wahl ihrer ROIs zurück.³¹

5.2 Auswertung mit räumlichem Bezug ohne die Verwendung von ROIs

Aus diesen Gründen gibt es Ansätze zur Darstellung der Trabekelparameter mit einem räumlichen Bezug unabhängig von einer Zuteilung zu ROIs. So stellten Jones et al Knochenparameter in Abhängigkeit von ihrer Position in einem Scaffold dar.⁶⁸ Sie implantierten quaderförmige hydroxyapatitbasierte Scaffolds in Schaftibiae und beobachteten die Veränderungen von Scaffold und Knochen computertomographisch über mehrere Zeitpunkte hinweg. Besonders interessant ist hierbei die Auftragung einzelner Trabekelparameter abhängig von ihrer Distanz zum Rand des Scaffolds in einem Koordinatensystem. Die Neuentstehung von Knochen innerhalb des Scaffolds konnte durch die Gesamtauswertung der ROI nachgewiesen werden, die den gesamten Scaffold einschloss. Durch die distanzabhängige Auftragung konnten Jones et al zusätzlich zeigen, dass sich der neue Knochen vor allem am Rand des Scaffolds bildete und wie weit er in den Scaffold einwuchs.⁶⁸ Dies erlaubte eine zusätzliche visuelle Darstellung der räumlichen Verteilung der erhobenen Parameter innerhalb der ROI.

Ein vergleichbarer Ansatz liegt auch der hier entwickelten distanzabhängigen Darstellungsmethode zugrunde, deren Ziel die übersichtliche Darstellung von Knochenparametern in ihrem räumlichen Bezug zum Defekt war. Aufgrund der Beschaffenheit der Proben (zylindrisch statt quaderförmig) sowie einer anderen Fragestellung (Auswertung auch außerhalb des Scaffolds) war der Ansatz von Jones et al nicht direkt übertragbar. Sie bezogen sich auf das Innere des Scaffolds und trugen die dort gemessenen Trabekelparameter mit ihrem Abstand zum Rand des Defekts auf, was in der hier vorliegenden Studie wiederum nur für die Auswertung der ROI_{INNER} anwendbar gewesen wäre. Da die visuell auffälligen Areale wie Osteolysen und weiche Knochenherde außerhalb der

ROI lagen wurde der Algorithmus so abgewandelt, dass er die Knocheneigenschaften der gesamten Probe in Bezug zum Zentrum des Defektes setzt. Dies ermöglicht ohne die fehleranfällige Platzierung von ROIs in der gesamten Probe eine klare Aussage darüber, bis in welche Entfernung vom Defekt das Implantat Auswirkungen auf die Knochenstruktur zeigt. Diese zweidimensionalen Informationen wurden, vergleichbar der Darstellung bei Jones et al., als Funktion zur Distanz aufgetragen und sind so quantifizierbar. Darüber hinaus erfasst die hier entwickelte Methodik als zusätzliche Dimension die Höhe innerhalb der Probe, sodass sowohl die Entfernung zum Defekt als auch die Verteilung je nach Tiefe mit Bezug zueinander betrachtet werden können. Dies ermöglicht Rückschlüsse darüber, ob die Tiefe des Defektes oder die verschiedenen Scaffoldschichten Auswirkungen auf die Knochenstruktur zeigen. Die kombinierte Darstellung dieser Dimensionen wurde visuell umgesetzt. Die grafischen Resultate verdeutlichten im Rahmen der zugrundeliegenden Studie, aus der diese Proben entnommen wurden, ein Überwiegen des auffallend weichen Knochen vor allem in der unteren Hälfte der ursprünglichen Defekte – ein Muster, welches zuvor nicht erkennbar oder nachweisbar war und im Rahmen der zugrundeliegenden Studie nun kausal diskutiert werden kann (siehe 4.4). Ebenfalls interessant ist die Feststellung, dass die Proben mit besonders deutlichen Arealen weichen Knochens vornehmlich Scaffolds trugen, die mit Wachstumsfaktoren besetzt waren (vs Gruppe ohne Wachstumsfaktoren). Ein Einfluss der verwendeten Wachstumsfaktoren auf das Remodeling kann nun diskutiert werden. Die Anwendung und Kombination der distanzorientierten Darstellung mit zwei Parametern (Dichte und Porenanteil) erlaubte zusätzliche Rückschlüsse auf die Eigenschaften des vorherrschenden Knochens in Abhängigkeit von seinem Abstand zum Defekt, sodass weicher Knochen in Zusammenhang mit vielen kleineren Poren gesetzt werden konnte. Im Rahmen der ursprünglichen Studie ermöglichten diese Erkenntnisse eine weitergehende Diskussion der Gründe für die unerwarteten Ergebnisse und dadurch eine wissenschaftliche Einordnung des Versuches, die durch die alleinige Auswertung der ROIs nur eingeschränkt möglich war.

5.3 Anwendungsbeispiele der VpD-Methode auf andere Studien

Auch bezogen auf andere Studien kann die entwickelte Methode zusätzlichen Informationsgewinn liefern. Xu et al. untersuchten die Auswirkung von implantierten Magnesium Alloys auf das Knochenwachstum und definierten zunächst eine ROI, die das Implantat umfasste, sowie eine darum liegende mantelförmige ROI (ähnlich den in dieser Studie definierten ROIs). Sie beschrieben bei der Beobachtung der Schnittbilder im Zeitverlauf einen Abbau des Scaffolds und Korrosionen an dessen Oberfläche.⁷¹ Die hier entwickelte VpD-Methode hätte bei den zylindrischen Scaffolds möglicherweise gut angewendet werden können und die Abnahme des Scaffoldradius im Rahmen der Degradierung unmittelbar visualisiert, während dies mithilfe der gewählten ROIs nicht möglich war. Xu et al stellten außerdem die Hypothese auf, dass der beobachtete Zuwachs an neuem Knochen unter anderem auf die erhöhte Freisetzung von Magnesium bei der Zersetzung des

Scaffolds zurückzuführen sei.⁷¹ Mithilfe der VpD-Auftragung hätten die beschriebenen lokalen Korrosionen in direktem räumlichen Zusammenhang mit der Knochenneubildung betrachtet werden und diese Hypothese möglicherweise untermauert werden können. Xu et al beschrieben visuell außerdem eine Veränderung im neuen Knochenwachstum über die Zeit: zunächst wuchs der Knochen longitudinal und brüchig, nach vier Wochen breitete er sich transversal aus und der Großteil des neu gebildeten Knochens wurde am Boden des Defekts beschrieben.⁷¹ Um derartig interessante räumliche Muster erkennen, quantifizieren und kausal zuordnen zu können kann die entwickelte Darstellungsmethode eine wertvolle Ergänzung darstellen. Auch die vermutete fehlende Überbrückung des ursprünglichen Defektspaltes zwischen Scaffold und Knochen hätte – wenn denn vorliegend – in der VpD-Darstellung einer deutlichen Knochenverminderung exakt in der Entfernung entsprochen, die dem Rand des Scaffolds entspricht. Unter Berücksichtigung der Mittelwertberechnung je ROI zeigten Xu et al⁷¹ in der mantelförmigen ROI um den Scaffold dessen Auswirkungen auf den umliegenden Knochen in Form von Knochenneubildung. Das gleichzeitige Auftreten von Osteolysen und neuem Knochen hätte die aus der gemeinsamen ROI generierten Werte in ihrer Aussagekraft jedoch deutlich abgeschwächt. Die zusätzliche Auswertung durch die VpD hätte lokale Unterschiede aufzeigen, eine mögliche Verfälschung der Ergebnisse hierdurch ausschließen, eine bessere Einordnung der ROI-Werte ermöglichen und darstellen können, bis in welche Entfernung der Scaffold Einfluss auf den Knochen vermuten ließe. Eine Ergänzung der durchgeführten Auswertung durch die hier vorgestellte VpD-Methode hätte demnach die Ergebnisse der Studie gefestigt und eine weitergehende Einordnung ermöglicht.

Auch außerhalb von Scaffoldstudien ist eine Anwendung der VpD-Methode denkbar. Freeman et al untersuchten den Einfluss von Ultraschallbehandlung auf die Frakturheilungsrate bei Ratten und werteten in ihren ROIs das Knochenvolumen computertomographisch aus. Analog zu dem in dieser Arbeit genutzten Separation Threshold unterteilten auch Freeman et al. den zu analysieren Knochen anhand verschiedener Grauwerte in weniger dichten neuen Knochen (225-330), sehr dichten kortikalen Knochen (331-700) und nicht mineralisiertes Gewebe, also Hintergrund (<225).⁶⁷ Eine Erläuterung zur Entstehung dieser Grenzwerte findet sich in ihrer Publikation leider nicht.

Diese Differenzierung von verschiedenen Materialien oder Knochentypen anhand einer Zuordnung zu Grauwertbereichen ist ein gängiges, wenn auch nicht fehlerfreies Verfahren.^{67,68,73} Die Auswertung erfolgte zunächst innerhalb einer ROI, die manuell definiert wurde und die gesamte Probe einschließlich neuen, nicht mineralisierten Knochen (Kallus) umfassen sollte. Da dieses Gewebe computertomographisch nicht klar abgrenzbar ist stellten Freeman et al die Markierung der ROI als schwierig und subjektiv dar.⁶⁷ Sie rekonstruierten zunächst die Proben aus allen Grauwerten einschließlich weichen und harten Knochens und verglichen die Behandlungsgruppen über die Zeit rein visuell. Die erhobenen μ CT-Daten spiegelten ihre visuellen Eindrücke nicht wider. In einem zweiten Schritt führten sie eine 3D-Rekonstruktion mit farblicher Codierung der unterschiedlichen Dichtewerte durch und konnten deutliche Unterschiede im Remode-

ling zwischen proximalem und distalem Frakturende sehen. Daraufhin werteten sie die Grauwerte von weichem und kortikalem Knochenmaterial getrennt voneinander aus und unterteilen die ROI zusätzlich in einen proximalen und distalen Frakturanteil. Erst durch diese Anpassung der ROI zeigten sich die signifikanten Ergebnisse ihrer Studie.⁶⁷ Dies verdeutlicht, wie wichtig eine dreidimensionale Visualisierung von Knochenproben sein kann um relevante Veränderung in der räumlichen Entwicklung der Knochenstrukturen überhaupt zu erkennen und so eine mögliche Grundlage für präzisere Auswertungen zu schaffen. Die übersichtliche Darstellung dreidimensionaler Rekonstruktionen gestaltet sich jedoch schwierig, sodass die Zusammenfassung einzelner Parameter mit Hinblick auf eine zweidimensionale auswertbare Darstellung erstrebenswert sein kann. Die vorgestellte VpD-Methode fasst alle Parameter je Distanz zusammen, was auch für Freeman et al⁶⁷ ein möglicher zusätzlicher Ansatz gewesen wäre. Obwohl hier kein Defekt mit einem klaren Zentrum und zylindrischer Form vorliegt hätte als Bezugspunkt eine Gerade entlang der Femurachse definiert werden können. Wie in den VpD-Grafiken dieser Studie wären die Ausbreitung des Kallus und die beschriebenen Resorptionsvorgänge im distalen Bereich in direktem räumlichen Bezug zur Fraktur unter Verlust der Rotationsebene darstellbar und die deutlichen Unterschiede zwischen proximalem und distalen Frakturende, zusammengefasst im zweidimensionalen VpD-Bild, direkt erkennbar gewesen. Diese Anwendung funktioniert prinzipiell immer dann, wenn eine Gerade als Bezug in einer Probe definiert werden und die Rotationsebene zum Beispiel aufgrund eines symmetrischen Aufbaus oder der alleinigen Frage nach dem Abstand zur Geraden vernachlässigt werden kann.

Auch bei Wirth et al hätte die Methode die Ergebnisse untermauern und möglicherweise konkrete Konsequenzen für die klinische Anwendbarkeit haben können. Sie untersuchten anhand von 25 ROIs je Humeruskopf (human) den Zusammenhang von Trabekelparametern und der Stabilität von Spongiosaschrauben, welche insbesondere bezogen auf die Knochendichte deutlich stärker korrelierten als in bisherigen Studien. Diese Beobachtung führten Wirth et al auf die Auswahl ihrer ROIs zurück: während ihre kleinen ROIs die lokalen Knochenstrukturen in direkter Nähe zu den Implantaten erfassen, stellten globale große ROIs mit Mittelwerten der scheinbar lokal stark variierenden Knocheneigenschaften nur geringere Korrelationen zwischen Trabekelparametern und Implantatstabilität dar.³¹ Dies zeigt, dass lokale Unterschiede in der Knochenstruktur durch zu große ROIs nicht adäquat dargestellt werden und Erkenntnisse möglicherweise verborgen bleiben oder verfälscht werden können. Die VpD-Methode, ausgehend von der zentralen Schraube, hätte deutlich die Knochendichte um die Schraube herum visualisiert und auch lokale Unterschiede aufgezeigt. Lediglich die räumliche Verteilung der Parameter in Rotation zur Geraden entlang des Schraubenzentrums wäre nicht beurteilbar gewesen. Zusätzlich hätten mögliche Veränderungen abhängig von der Schraubentiefe visualisiert und die deutliche Korrelation, insbesondere gegenüber ROIs die den gesamten Humeruskopf mit einbeziehen, untermauert werden können. Möglicherweise hätte diese Darstellung auch Rückschlüsse darauf zugelassen, in welchem Umkreis der implantierten

Schraube die verschiedenen Knochenparameter einen Einfluss auf die Schraubenstabilität haben.

Zusammenfassung Die vorgestellte distanzabhängige Darstellungsmethode kann der zugrundeliegenden Arbeit und diesen Beispielen zufolge je nach Probenbeschaffenheit und Fragestellung einen deutlichen Informationsgewinn liefern. Sie ist unkompliziert anwendbar und eine wertvolle Ergänzung vieler gängiger Analysemethoden. Das zugrundeliegende Prinzip der Darstellung ist auf alle Trabekelparameter übertragbar und kann sowohl als eigenständige Auswertung sowie als Screeningmethode verwendet werden. Hier können die Trabekelparameter einer vollständigen Probe mit Bezug zu einem Zentrum dargestellt werden, um zum Beispiel die Muster in der Verteilung der Knochenparameter erkennen und die Platzierung von ROIs besser anpassen zu können. Grundvoraussetzung für die Anwendung der VpD-Methode ist immer die Definition einer Geraden, die den Bezug zum Zentrum je Schnittbild definiert, eine möglichst zylindrische Proben- oder Defektform sowie eine Vernachlässigbarkeit der Rotationsinformationen der räumlichen Verteilung. Die visuelle Darstellung kann individuell und je nach Fragestellung durch Heatmaps oder die farbliche Zuordnung von vorab definierten Wertebereichen erfolgen.

5.4 Ausblick

Die entwickelte Darstellungsmethode erlaubt eine Visualisierung der Knochenparameter aus einer neuen Perspektive mit direkten räumlichen Bezug zu einer Ausgangsgeraden. Dieser Ansatz kann in Studien mit Knochenimplantaten jeglicher Art einen zusätzlichen Erkenntnisgewinn bieten. Das zugrundeliegende Konzept kann grundsätzlich immer angewendet werden wenn numerische Parameter anhand von Grauwerten in Bezug zu einem Zentrum und, falls gegeben, zu einer Höhe visualisiert werden sollen. Dies bedeutet neben der hier exemplarischen Anwendung an Daten aus der μ CT eine mögliche Übertragung auf CT, MRT oder MDCT-Aufnahmen und somit ein potenziell breites Anwendungsspektrum.

Die Verfahren zum Erfassen der Thresholds sowie der ROI_X , welche in dieser Arbeit spezifisch auf die gegebene Probe angewendet wurden, können ebenfalls auf andere Datensätze adaptiert werden. Sie bieten eine einfache Lösung für Datensätze, die allein aufgrund ihrer Größe nicht per Hand erfasst werden können.

Die dargestellten Verfahren wurden in Java als Plugins sowie als Makros für die OpenSource Analysesoftware Fiji entwickelt,⁷⁴ könnten jedoch auch in andere Programme integriert werden. Optimierungen bezüglich der Laufzeit wären in diesem Rahmen sicherlich möglich und sinnvoll. Auch eine direkte Integration in Gerätesoftware wäre denkbar, um schnell eine zusätzliche und übersichtliche Perspektive auf die gescannten Daten zu erhalten.

Auch im Hinblick auf die aktuellen Weiterentwicklungen aus der Informatik, insbesondere von Mustererkennungsverfahren und Künstlicher Intelligenz, bietet dieses Ver-

fahren einen vielversprechenden Ansatz für weitere Entwicklungen:⁷⁵ unter Anwendung des entwickelten Algorithmus wäre in Verbindung mit Mustererkennungsverfahren und Künstlicher Intelligenz beispielsweise die vollständig automatisierte Erkennung von Knochentypen direkt in einem Graubild oder die Extrapolation von Knochenwachstum anhand von Proben unterschiedlicher Standzeiten vorstellbar.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] R. Florencio-Silva, G. R. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões und P. S. Cerri. „Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells“. In: *Biomed Res Int* 2015 (2015), S. 421746. ISSN: 2314-6141. DOI: 10.1155/2015/421746.
- [2] E. Seeman und P. D. Delmas. „Bone quality—the material and structural basis of bone strength and fragility“. In: *N Engl J Med* 354.21 (2006), S. 2250–61. ISSN: 1533-4406. DOI: 10.1056/NEJMra053077.
- [3] C. A. Agten, S. Honig, P. K. Saha, R. Regatte und G. Chang. „Subchondral bone microarchitecture analysis in the proximal tibia at 7-T MRI“. In: *Acta Radiol* 59.6 (2018), S. 716–722. ISSN: 1600-0455. DOI: 10.1177/0284185117732098.
- [4] D. Chappard, M. F. Baslé, E. Legrand und M. Audran. „Trabecular bone microarchitecture: a review“. In: *Morphologie* 92.299 (2008), S. 162–70. ISSN: 1286-0115. DOI: 10.1016/j.morpho.2008.10.003.
- [5] Renate Lüllmann Rauch. *Taschenlehrbuch Histologie*. 3. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2009.
- [6] D. Felsenberg und S. Boonen. „The bone quality framework: determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management“. In: *Clin Ther* 27.1 (2005), S. 1–11. ISSN: 0149-2918. DOI: 10.1016/j.clinthera.2004.12.020.
- [7] Gerhard Aumüller, Gabriela Aust, Arne Conrad, Jürgen Engele und Joachim Kirsch. *Duale Reihe Anatomie*. 3. Aufl. Stuttgart: Thieme, 2014, S. 1336.
- [8] B. R. McCreadie und S. A. Goldstein. „Biomechanics of fracture: is bone mineral density sufficient to assess risk?“. In: *J Bone Miner Res* 15.12 (2000), S. 2305–8. ISSN: 0884-0431. DOI: 10.1359/jbmr.2000.15.12.2305.
- [9] M. Kleerekoper, A. R. Villanueva, J. Stanciu, D. S. Rao und A. M. Parfitt. „The role of three-dimensional trabecular microstructure in the pathogenesis of vertebral compression fractures“. In: *Calcif Tissue Int* 37.6 (1985), S. 594–7. ISSN: 0171-967X.
- [10] A. J. Burghardt, T. M. Link und S. Majumdar. „High-resolution computed tomography for clinical imaging of bone microarchitecture“. In: *Clin Orthop Relat Res* 469.8 (2011), S. 2179–93. ISSN: 1528-1132. DOI: 10.1007/s11999-010-1766-x.
- [11] A. Bhan, S. Qiu und S. D. Rao. „Bone histomorphometry in the evaluation of osteomalacia“. In: *Bone Rep* 8 (2018), S. 125–134. ISSN: 2352-1872. DOI: 10.1016/j.bonr.2018.03.005.

- [12] C. C. Wu, M. J. Econs, L. A. DiMeglio, K. L. Insogna, M. A. Levine, P. J. Orchard, W. P. Miller, A. Petryk, E. T. Rush, D. M. Shoback, L. M. Ward und L. E. Polgreen. „Diagnosis and Management of Osteopetrosis: Consensus Guidelines From the Osteopetrosis Working Group“. In: *J Clin Endocrinol Metab* 102.9 (2017), S. 3111–3123. ISSN: 1945-7197. DOI: 10.1210/jc.2017-01127.
- [13] D. Chappard, N. Retailleau-Gaborit, E. Legrand, M. F. Baslé und M. Audran. „Comparison insight bone measurements by histomorphometry and microCT“. In: *J Bone Miner Res* 20.7 (2005), S. 1177–84. ISSN: 0884-0431. DOI: 10.1359/JBMR.050205.
- [14] M. Vallet und S. H. Ralston. „Biology and Treatment of Paget’s Disease of Bone“. In: *J Cell Biochem* 117.2 (2016), S. 289–99. ISSN: 1097-4644. DOI: 10.1002/jcb.25291.
- [15] R. Kocijan, S. Finzel, M. Englbrecht, K. Engelke, J. Rech und G. Schett. „Decreased quantity and quality of the periarticular and nonperiarticular bone in patients with rheumatoid arthritis: a cross-sectional HR-pQCT study“. In: *J Bone Miner Res* 29.4 (2014), S. 1005–14. ISSN: 1523-4681. DOI: 10.1002/jbmr.2109.
- [16] M. Khalid, T. Bora, A. A. Ghaiti, S. Thukral und J. Dutta. „Raman Spectroscopy detects changes in Bone Mineral Quality and Collagen Cross-linkage in Staphylococcus Infected Human Bone“. In: *Sci Rep* 8.1 (2018), S. 9417. ISSN: 2045-2322. DOI: 10.1038/s41598-018-27752-z.
- [17] E. Torres-del-Pliego, L. Vilaplana, R. Güerri-Fernández und A. Diez-Pérez. „Measuring bone quality“. In: *Curr Rheumatol Rep* 15.11 (2013), S. 373. ISSN: 1534-6307. DOI: 10.1007/s11926-013-0373-8.
- [18] „Consensus development conference: diagnosis, prophylaxis, and treatment of osteoporosis“. In: *Am J Med* 94.6 (1993), S. 646–50. ISSN: 0002-9343.
- [19] S. Khosla, B. L. Riggs, E. J. Atkinson, A. L. Oberg, L. J. McDaniel, M. Holets, J. M. Peterson und L. J. Melton. „Effects of sex and age on bone microstructure at the ultradistal radius: a population-based noninvasive in vivo assessment“. In: *J Bone Miner Res* 21.1 (2006), S. 124–31. ISSN: 0884-0431. DOI: 10.1359/JBMR.050916.
- [20] E. Legrand, D. Chappard, C. Pascaretti, M. Duquenne, S. Krebs, V. Rohmer, M. F. Basle und M. Audran. „Trabecular bone microarchitecture, bone mineral density, and vertebral fractures in male osteoporosis“. In: *J Bone Miner Res* 15.1 (2000), S. 13–9. ISSN: 0884-0431. DOI: 10.1359/jbmr.2000.15.1.13.
- [21] R. S. Weinstein und M. S. Hutson. „Decreased trabecular width and increased trabecular spacing contribute to bone loss with aging“. In: *Bone* 8.3 (1987), S. 137–42. ISSN: 8756-3282.

- [22] J. A. Kanis. „Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis: synopsis of a WHO report. WHO Study Group“. In: *Osteoporos Int* 4.6 (1994), S. 368–81. ISSN: 0937-941X.
- [23] D. Ulrich, B. van Rietbergen, A. Laib und P. Rügsegger. „The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone“. In: *Bone* 25.1 (1999), S. 55–60. ISSN: 8756-3282.
- [24] J. Compston. „FRAX–Where are we now?“ In: *Maturitas* 82.3 (2015), S. 284–7. ISSN: 1873-4111. DOI: 10.1016/j.maturitas.2015.07.024.
- [25] E. M. Curtis, R. J. Moon, N. C. Harvey und C. Cooper. „The impact of fragility fracture and approaches to osteoporosis risk assessment worldwide“. In: *Bone* 104 (2017), S. 29–38. ISSN: 1873-2763. DOI: 10.1016/j.bone.2017.01.024.
- [26] H. Johansson, F. Azizieh, N. Al Ali, T. Alessa, N. C. Harvey, E. McCloskey und J. A. Kanis. „FRAX- vs. T-score-based intervention thresholds for osteoporosis“. In: *Osteoporos Int* 28.11 (2017), S. 3099–3105. ISSN: 1433-2965. DOI: 10.1007/s00198-017-4160-7.
- [27] G. Chang, S. Boone, D. Martel, C. S. Rajapakse, R. S. Hallyburton, M. Valko, S. Honig und R. R. Regatte. „MRI assessment of bone structure and microarchitecture“. In: *J Magn Reson Imaging* 46.2 (2017), S. 323–337. ISSN: 1522-2586. DOI: 10.1002/jmri.25647.
- [28] B. C. Silva, W. D. Leslie, H. Resch, O. Lamy, O. Lesnyak, N. Binkley, E. V. McCloskey, J. A. Kanis und J. P. Bilezikian. „Trabecular bone score: a noninvasive analytical method based upon the DXA image“. In: *J Bone Miner Res* 29.3 (2014), S. 518–30. ISSN: 1523-4681. DOI: 10.1002/jbmr.2176.
- [29] G. Maquer, Y. Lu, E. Dall’Ara, Y. Chevalier, M. Krause, L. Yang, R. Eastell, K. Lippuner und P. K. Zysset. „The Initial Slope of the Variogram, Foundation of the Trabecular Bone Score, Is Not or Is Poorly Associated With Vertebral Strength“. In: *J Bone Miner Res* 31.2 (2016), S. 341–6. ISSN: 1523-4681. DOI: 10.1002/jbmr.2610.
- [30] A. Patel, G. Pavlou, R. E. Mújica-Mota und A. D. Toms. „The epidemiology of revision total knee and hip arthroplasty in England and Wales: a comparative analysis with projections for the United States. A study using the National Joint Registry dataset“. In: *Bone Joint J* 97-B.8 (2015), S. 1076–81. ISSN: 2049-4408. DOI: 10.1302/0301-620X.97B8.35170.
- [31] A. J. Wirth, J. Goldhahn, C. Flaig, P. Arbenz, R. Müller und G. H. van Lenthe. „Implant stability is affected by local bone microstructural quality“. In: *Bone* 49.3 (2011), S. 473–8. ISSN: 1873-2763. DOI: 10.1016/j.bone.2011.05.001.

- [32] J. Seebeck, J. Goldhahn, H. Städele, P. Messmer, M. M. Morlock und E. Schneider. „Effect of cortical thickness and cancellous bone density on the holding strength of internal fixator screws“. In: *J Orthop Res* 22.6 (2004), S. 1237–42. ISSN: 0736-0266. DOI: 10.1016/j.orthres.2004.04.001.
- [33] M. J. Tingart, J. Lehtinen, D. Zurakowski, J. J. Warner und M. Apreleva. „Proximal humeral fractures: regional differences in bone mineral density of the humeral head affect the fixation strength of cancellous screws“. In: *J Shoulder Elbow Surg* 15.5 (2006), S. 620–4. ISSN: 1532-6500. DOI: 10.1016/j.jse.2005.09.007.
- [34] M. Poukalova, C. M. Yakacki, R. E. Guldborg, A. Lin, M. Saing, S. D. Gillogly und K. Gall. „Pullout strength of suture anchors: effect of mechanical properties of trabecular bone“. In: *J Biomech* 43.6 (2010), S. 1138–45. ISSN: 1873-2380. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2009.12.007.
- [35] E. Lespessailles, C. Chappard, N. Bonnet und C. L. Benhamou. „Imaging techniques for evaluating bone microarchitecture“. In: *Joint Bone Spine* 73.3 (2006), S. 254–61. ISSN: 1297-319X. DOI: 10.1016/j.jbspin.2005.12.002.
- [36] A. M. Cheung, J. D. Adachi, D. A. Hanley, D. L. Kendler, K. S. Davison, R. Josse, J. P. Brown, L. G. Ste-Marie, R. Kremer, M. C. Erlandson, L. Dian, A. J. Burghardt und S. K. Boyd. „High-resolution peripheral quantitative computed tomography for the assessment of bone strength and structure: a review by the Canadian Bone Strength Working Group“. In: *Curr Osteoporos Rep* 11.2 (2013), S. 136–46. ISSN: 1544-2241. DOI: 10.1007/s11914-013-0140-9.
- [37] M. Lorentzon und S. R. Cummings. „Osteoporosis: the evolution of a diagnosis“. In: *J Intern Med* 277.6 (2015), S. 650–61. ISSN: 1365-2796. DOI: 10.1111/joim.12369.
- [38] P. Geusens, R. Chapurlat, G. Schett, A. Ghasem-Zadeh, E. Seeman, J. de Jong und J. van den Bergh. „High-resolution in vivo imaging of bone and joints: a window to microarchitecture“. In: *Nat Rev Rheumatol* 10.5 (2014), S. 304–13. ISSN: 1759-4804. DOI: 10.1038/nrrheum.2014.23.
- [39] S. Majumdar. „A review of magnetic resonance (MR) imaging of trabecular bone micro-architecture: contribution to the prediction of biomechanical properties and fracture prevalence“. In: *Technol Health Care* 6.5-6 (1998), S. 321–7. ISSN: 0928-7329.
- [40] M. L. Bouxsein, S. K. Boyd, B. A. Christiansen, R. E. Guldborg, K. J. Jepsen und R. Müller. „Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computed tomography“. In: *J Bone Miner Res* 25.7 (2010), S. 1468–86. ISSN: 1523-4681. DOI: 10.1002/jbmr.141.
- [41] A. M. Parfitt, M. K. Drezner, F. H. Glorieux, J. A. Kanis, H. Malluche, P. J. Meunier, S. M. Ott und R. R. Recker. „Bone histomorphometry: standardization of nomenclature, symbols, and units. Report of the ASBMR Histomorphometry

- Nomenclature Committee“. In: *J Bone Miner Res* 2.6 (1987), S. 595–610. ISSN: 0884-0431. DOI: 10.1002/jbmr.5650020617.
- [42] D. W. Dempster, J. E. Compston, M. K. Drezner, F. H. Glorieux, J. A. Kanis, H. Malluche, P. J. Meunier, S. M. Ott, R. R. Recker und A. M. Parfitt. „Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee“. In: *J Bone Miner Res* 28.1 (2013), S. 2–17. ISSN: 1523-4681. DOI: 10.1002/jbmr.1805.
- [43] L. A. Feldkamp, S. A. Goldstein, A. M. Parfitt, G. Jesion und M. Kleerekoper. „The direct examination of three-dimensional bone architecture in vitro by computed tomography“. In: *J Bone Miner Res* 4.1 (1989), S. 3–11. ISSN: 0884-0431. DOI: 10.1002/jbmr.5650040103.
- [44] S. J. Schambach, S. Bag, L. Schilling, C. Groden und M. A. Brockmann. „Application of micro-CT in small animal imaging“. In: *Methods* 50.1 (2010), S. 2–13. ISSN: 1095-9130. DOI: 10.1016/j.ymeth.2009.08.007.
- [45] R. Müller, H. Van Campenhout, B. Van Damme, G. Van Der Perre, J. Dequeker, T. Hildebrand und P. Rüeeggsegger. „Morphometric analysis of human bone biopsies: a quantitative structural comparison of histological sections and micro-computed tomography“. In: *Bone* 23.1 (1998), S. 59–66. ISSN: 8756-3282.
- [46] J. H. Waarsing, J. S. Day, J. C. van der Linden, A. G. Ederveen, C. Spanjers, N. De Clerck, A. Sasov, J. A. Verhaar und H. Weinans. „Detecting and tracking local changes in the tibiae of individual rats: a novel method to analyse longitudinal in vivo micro-CT data“. In: *Bone* 34.1 (2004), S. 163–9. ISSN: 8756-3282.
- [47] S. Boutroy, M. L. Bouxsein, F. Munoz und P. D. Delmas. „In vivo assessment of trabecular bone microarchitecture by high-resolution peripheral quantitative computed tomography“. In: *J Clin Endocrinol Metab* 90.12 (2005), S. 6508–15. ISSN: 0021-972X. DOI: 10.1210/jc.2005-1258.
- [48] J. A. MacNeil und S. K. Boyd. „Improved reproducibility of high-resolution peripheral quantitative computed tomography for measurement of bone quality“. In: *Med Eng Phys* 30.6 (2008), S. 792–9. ISSN: 1350-4533. DOI: 10.1016/j.medengphy.2007.11.003.
- [49] G. Diederichs, T. Link, K. Marie, M. Huber, P. Rogalla, A. Burghardt, S. Majumdar und A. Issever. „Feasibility of measuring trabecular bone structure of the proximal femur using 64-slice multidetector computed tomography in a clinical setting“. In: *Calcif Tissue Int* 83.5 (2008), S. 332–41. ISSN: 1432-0827. DOI: 10.1007/s00223-008-9181-y.
- [50] M. Ito, K. Ikeda, M. Nishiguchi, H. Shindo, M. Uetani, T. Hosoi und H. Orimo. „Multi-detector row CT imaging of vertebral microstructure for evaluation of fracture risk“. In: *J Bone Miner Res* 20.10 (2005), S. 1828–36. ISSN: 0884-0431. DOI: 10.1359/JBMR.050610.

- [51] A. S. Issever, T. M. Link, M. Kentenich, P. Rogalla, K. Schwieger, M. B. Huber, A. J. Burghardt, S. Majumdar und G. Diederichs. „Trabecular bone structure analysis in the osteoporotic spine using a clinical in vivo setup for 64-slice MDCT imaging: comparison to microCT imaging and microFE modeling“. In: *J Bone Miner Res* 24.9 (2009), S. 1628–37. ISSN: 1523-4681. DOI: 10.1359/jbmr.090311.
- [52] G. Diederichs, T. M. Link, M. Kentenich, K. Schwieger, M. B. Huber, A. J. Burghardt, S. Majumdar, P. Rogalla und A. S. Issever. „Assessment of trabecular bone structure of the calcaneus using multi-detector CT: correlation with microCT and biomechanical testing“. In: *Bone* 44.5 (2009), S. 976–83. ISSN: 1873-2763. DOI: 10.1016/j.bone.2009.01.372.
- [53] J. S. Bauer, T. M. Link, A. Burghardt, T. D. Henning, D. Mueller, S. Majumdar und S. Prevrhal. „Analysis of trabecular bone structure with multidetector spiral computed tomography in a simulated soft-tissue environment“. In: *Calcif Tissue Int* 80.6 (2007), S. 366–73. ISSN: 0171-967X. DOI: 10.1007/s00223-007-9021-5.
- [54] F. W. Wehrli, P. K. Saha, B. R. Gomberg, H. K. Song, P. J. Snyder, M. Benito, A. Wright und R. Weening. „Role of magnetic resonance for assessing structure and function of trabecular bone“. In: *Top Magn Reson Imaging* 13.5 (2002), S. 335–55. ISSN: 0899-3459.
- [55] F. W. Wehrli. „Structural and functional assessment of trabecular and cortical bone by micro magnetic resonance imaging“. In: *J Magn Reson Imaging* 25.2 (2007), S. 390–409. ISSN: 1053-1807. DOI: 10.1002/jmri.20807.
- [56] C. A. Sell, J. N. Masi, A. Burghardt, D. Newitt, T. M. Link und S. Majumdar. „Quantification of trabecular bone structure using magnetic resonance imaging at 3 Tesla—calibration studies using microcomputed tomography as a standard of reference“. In: *Calcif Tissue Int* 76.5 (2005), S. 355–64. ISSN: 0171-967X. DOI: 10.1007/s00223-004-0111-3.
- [57] K. Schlichting, H. Schell, R. U. Kleemann, A. Schill, A. Weiler, G. N. Duda und D. R. Epari. „Influence of scaffold stiffness on subchondral bone and subsequent cartilage regeneration in an ovine model of osteochondral defect healing“. In: *Am J Sports Med* 36.12 (2008), S. 2379–91. ISSN: 1552-3365. DOI: 10.1177/0363546508322899.
- [58] S. K. Lan Levengood, S. J. Polak, M. J. Poellmann, D. J. Hoelzle, A. J. Maki, S. G. Clark, M. B. Wheeler und A. J. Wagoner Johnson. „The effect of BMP-2 on micro- and macroscale osteointegration of biphasic calcium phosphate scaffolds with multiscale porosity“. In: *Acta Biomater* 6.8 (2010), S. 3283–91. ISSN: 1878-7568. DOI: 10.1016/j.actbio.2010.02.026.
- [59] Z. Pan, P. Duan, X. Liu, H. Wang, L. Cao, Y. He, J. Dong und J. Ding. „Effect of porosities of bilayered porous scaffolds on spontaneous osteochondral repair in

- cartilage tissue engineering“. In: *Regen Biomater* 2.1 (2015), S. 9–19. ISSN: 2056-3418. DOI: 10.1093/rb/rbv001.
- [60] I. Schleicher, K. S. Lips, U. Sommer, I. Schappat, A. P. Martin, G. Szalay, S. Hartmann und R. Schnettler. „Biphasic scaffolds for repair of deep osteochondral defects in a sheep model“. In: *J Surg Res* 183.1 (2013), S. 184–92. ISSN: 1095-8673. DOI: 10.1016/j.jss.2012.11.036.
- [61] D. Suárez-González, J. S. Lee, A. Diggs, Y. Lu, B. Nemke, M. Markel, S. J. Hollister und W. L. Murphy. „Controlled multiple growth factor delivery from bone tissue engineering scaffolds via designed affinity“. In: *Tissue Eng Part A* 20.15-16 (2014), S. 2077–87. ISSN: 1937-335X. DOI: 10.1089/ten.tea.2013.0358.
- [62] A. M. Pobloth, S. Checa, H. Razi, A. Petersen, J. C. Weaver, K. Schmidt-Bleek, M. Windolf, A. Tatai, C. P. Roth, K. D. Schaser, G. N. Duda und P. Schwabe. „Mechanobiologically optimized 3D titanium-mesh scaffolds enhance bone regeneration in critical segmental defects in sheep“. In: *Sci Transl Med* 10.423 (2018). ISSN: 1946-6242. DOI: 10.1126/scitranslmed.aam8828.
- [63] A. M. Pobloth, G. N. Duda, M. T. Giesecke, A. Dienelt und P. Schwabe. „High-dose recombinant human bone morphogenetic protein-2 impacts histological and biomechanical properties of a cervical spine fusion segment: results from a sheep model“. In: *J Tissue Eng Regen Med* (2015). ISSN: 1932-7005. DOI: 10.1002/term.2049.
- [64] S. C. Sartoretto, M. J. Uzeda, F. B. Miguel, J. R. Nascimento, F. Ascoli und M. D. Calasans-Maia. „SHEEP AS AN EXPERIMENTAL MODEL FOR BIOMATERIAL IMPLANT EVALUATION“. In: *Acta Ortop Bras* 24.5 (2016), S. 262–266. ISSN: 1413-7852. DOI: 10.1590/1413-785220162405161949.
- [65] L. Martini, M. Fini, G. Giavaresi und R. Giardino. „Sheep model in orthopedic research: a literature review“. In: *Comp Med* 51.4 (2001), S. 292–9. ISSN: 1532-0820.
- [66] P. Rügsegger, B. Koller und R. Müller. „A microtomographic system for the nondestructive evaluation of bone architecture“. In: *Calcif Tissue Int* 58.1 (1996), S. 24–9. ISSN: 0171-967X.
- [67] T. A. Freeman, P. Patel, J. Parvizi, V. Antoci und I. M. Shapiro. „Micro-CT analysis with multiple thresholds allows detection of bone formation and resorption during ultrasound-treated fracture healing“. In: *J Orthop Res* 27.5 (2009), S. 673–9. ISSN: 1554-527X. DOI: 10.1002/jor.20771.
- [68] A. C. Jones, C. H. Arns, A. P. Sheppard, D. W. Hutmacher, B. K. Milthorpe und M. A. Knackstedt. „Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT“. In: *Biomaterials* 28.15 (2007), S. 2491–504. ISSN: 0142-9612. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.01.046.

- [69] C. Chen, X. Zhang, J. Guo, D. Jin, E. M. Letuchy, T. L. Burns, S. M. Levy, E. A. Hoffman und P. K. Saha. „Quantitative imaging of peripheral trabecular bone microarchitecture using MDCT“. In: *Med Phys* 45.1 (2018), S. 236–249. ISSN: 2473-4209. DOI: 10.1002/mp.12632.
- [70] E. Sornay-Rendu, S. Boutroy, F. Munoz und P. D. Delmas. „Alterations of cortical and trabecular architecture are associated with fractures in postmenopausal women, partially independent of decreased BMD measured by DXA: the OFELY study“. In: *J Bone Miner Res* 22.3 (2007), S. 425–33. ISSN: 0884-0431. DOI: 10.1359/jbmr.061206.
- [71] Y. Xu, H. Meng, H. Yin, Z. Sun, J. Peng, X. Xu, Q. Guo, W. Xu, X. Yu, Z. Yuan, B. Xiao, C. Wang, Y. Wang, S. Liu, S. Lu, Z. Wang und A. Wang. „Quantifying the degradation of degradable implants and bone formation in the femoral condyle using micro-CT 3D reconstruction“. In: *Exp Ther Med* 15.1 (2018), S. 93–102. ISSN: 1792-0981. DOI: 10.3892/etm.2017.5389.
- [72] N. Tsukimura, M. Yamada, H. Aita, N. Hori, F. Yoshino, M. Chang-Il Lee, K. Kimoto, A. Jewett und T. Ogawa. „N-acetyl cysteine (NAC)-mediated detoxification and functionalization of poly(methyl methacrylate) bone cement“. In: *Biomaterials* 30.20 (2009), S. 3378–89. ISSN: 1878-5905. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.02.043.
- [73] W. J. Jurgens, R. J. Kroeze, B. Zandieh-Doulabi, A. van Dijk, G. A. Renders, T. H. Smit, F. J. van Milligen, M. J. Ritt und M. N. Helder. „One-step surgical procedure for the treatment of osteochondral defects with adipose-derived stem cells in a caprine knee defect: a pilot study“. In: *Biores Open Access* 2.4 (2013), S. 315–25. ISSN: 2164-7844. DOI: 10.1089/biores.2013.0024.
- [74] J. Schindelin, I. Arganda-Carreras, E. Frise, V. Kaynig, M. Longair, T. Pietzsch, S. Preibisch, C. Rueden, S. Saalfeld, B. Schmid, J. Y. Tinevez, D. J. White, V. Hartenstein, K. Eliceiri, P. Tomancak und A. Cardona. „Fiji: an open-source platform for biological-image analysis“. In: *Nat Methods* 9.7 (2012), S. 676–82. ISSN: 1548-7105. DOI: 10.1038/nmeth.2019.
- [75] Z. Peter, V. Bousson, C. Bergot und F. Peyrin. „A constrained region growing approach based on watershed for the segmentation of low contrast structures in bone micro-CT images“. In: *Pattern Recognition* 4.7 (2008), S. 2358–2368.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Ich, Lena Westermann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Computertomographische Analyse der ossären Mikroarchitektur mit räumlichem Bezug zu einem osteochondralen Defekt – Entwicklung einer distanzabhängigen Darstellungsmethode“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet. Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.

LEBENS LAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

DANKSAGUNG

Viele Menschen hatten Anteil an der Realisierung dieser Arbeit. Mein Dank gilt daher zunächst Professor Dr.-Ing. Georg Duda für die Ermöglichung dieser tierexperimentellen Studie.

Besonders danken möchte ich außerdem Evi Lippens,Phd, die mir als Betreuerin unermüdlich zur Seite stand. Sie hat es verstanden zur richtigen Zeit die richtigen Impulse geben und mich mit Weitsicht und Einfühlungsvermögen auch vermeintliche Tiefschläge überwinden zu lassen. Sie hat mir jederzeit vermittelt, dass sie hinter mir und dieser Arbeit steht und war für mich eine hervorragende Betreuerin und Mentorin.

Ebenso großer Dank gilt Dominik Berse. Er hat mich inspiriert, um die Ecke zu denken und mit seinen Ideen und seiner fachlichen Kompetenz die Arbeit in eine neue Richtung gelenkt. Ohne ihn wäre diese Promotion nicht entstanden.

Des Weiteren danke ich dem Julius-Wolff-Institut. Hier möchte ich Dag Wulsten, Mario Thiele und Thomas Sips hervorheben, die mir insbesondere während der Datenanalyse mit technischer Unterstützung und Humor die Arbeit erleichtert haben.

Und natürlich danke ich meinen Freunden und meiner Familie. Sie bilden die Grundlage für alles.